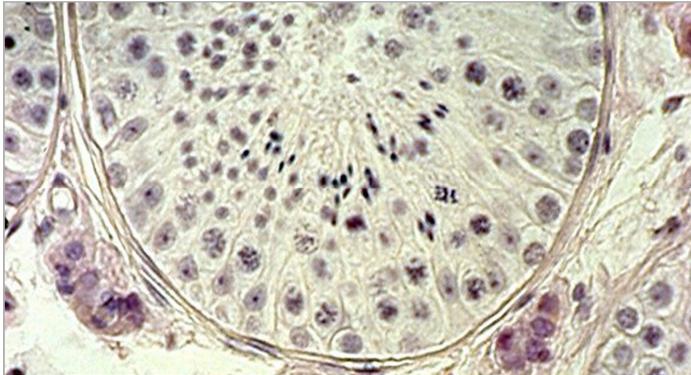


**Molekularbiologische Untersuchung des CAG-Repeats des
humanen Androgenrezeptors und Korrelation mit der
Histologie der Spermatogenese – Ist das CAG-Repeat ein
molekularer Marker für männliche Infertilität?**



INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
am Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Daniela Christa Fietz

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Martin Bergmann

**Molekularbiologische Untersuchung des CAG-Repeats des
humanen Androgenrezeptors und Korrelation mit der
Histologie der Spermatogenese – Ist das CAG-Repeat ein
molekularer Marker für männliche Infertilität?**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
am Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Daniela Christa Fietz
Tierärztin aus Offenbach am Main

Gießen 2011

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan:

Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. Martin Bergmann

Prof. Dr. Gerhard Schuler

Tag der Disputation: 20. Dezember 2011

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

Daniela Christa Fietz

Meiner Familie und Freunden gewidmet

A. Inhaltsverzeichnis

A. Inhaltsverzeichnis.....	9
B. Publikationsverzeichnis.....	12
C. Abkürzungsverzeichnis.....	16
D. Abbildungsverzeichnis.....	19
E. Einleitung.....	21
F. Literaturübersicht.....	25
1. Aufbau des Hodens.....	25
2. Beschreibung der Zellpopulationen des Hodens.....	25
2.1. Zellen innerhalb der Tubuli seminiferi contorti.....	25
2.1.1. Sertolizellen.....	25
2.1.2. Keimzellen.....	28
2.1.3. Peritubuläre Myoidzellen.....	29
2.2. Interstitium.....	30
2.2.1. Leydigzellen.....	30
2.2.2. Weitere Bestandteile des Interstitiums.....	31
3. Spermatogenese.....	31
3.1. Normale Spermatogenese.....	31
3.2. Stadien der Spermatogenese.....	35
3.3. Störungen der Spermatogenese.....	38
3.4. Bewertung der Spermatogenese.....	39
4. Aufbau und Funktion des Androgenrezeptors (AR).....	41
5. Bedeutung des CAG-Repeats.....	45
G. Material und Methoden.....	50
1. Probenumfang.....	50
2. Probengewinnung.....	50
2.1. Fixierung in Bouin'scher Lösung.....	50
2.2. Gewinnung von Kryoproben.....	51
2.3. Herstellung histologischer Schnitte.....	51
2.3.1. Paraffinschnitte.....	51
2.3.2. Gefrierschnitte.....	51
3. Histologische Untersuchung der Proben.....	51
3.1. Färbung mit Hämatoxylin und Eosin nach Mayer.....	51
3.2. Schnelfärbung von Gefrierschnitten.....	53

4. Molekularbiologische Untersuchung	53
4.1. Untersuchung von Hodenhomogenat	53
4.1.1. Gewinnung der Proben	53
4.1.2. Extraktion von DNA und RNA	53
4.1.2.1. DNA-Extraktion mit dem QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.....	53
4.1.2.2. RNA-Extraktion mit dem RNeasy FFPE Kit	54
4.2. Laser-assisted cell picking (LACP)	55
4.2.1. Herstellung der Präparate	55
4.2.2. Durchführung des LACP	57
4.2.3. Gewinnung von RNA aus LACP-Material.....	58
4.3. Qualitative Polymerasekettenreaktion (PCR)	60
4.3.1. Durchführung der PCR.....	61
4.3.2. Agarosegel-Elektrophorese	62
4.4. Qualitative Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR)	63
4.4.1. Inkubation mit DNase I.....	63
4.4.2. Reverse Transkription (RT)	64
4.4.3. Durchführung der RT-PCR.....	66
4.4.4. Agarosegel-Elektrophorese	68
4.5. Quantitative RT-PCR (RT-qPCR)	68
4.5.1. Evaluierung der Ziel- und Referenzgene.....	69
4.5.2. Durchführung der RT-qPCR.....	71
4.5.3. Auswertung der qPCR und statistische Analyse	72
4.6. Klonierung der PCR-Produkte	73
4.6.1. A-tailing	74
4.6.2. Ligation in p-GEM®-T.....	75
4.6.3. Transformation	76
4.6.3.1. Kompetente Zellen JM109.....	76
4.6.3.2. Kompetente Zellen SURE®2 supercompetent cells	76
4.6.3.3. Blau/Weiß-Screening.....	77
4.6.4. Plasmidextraktion	78
4.6.5. Doppelverdau der Plasmide und Gelelektrophorese	79
4.6.6. Archivierung der Plasmid-DNA.....	80
5. Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) der PCR-Produkte	80
6. Untersuchung des CAG-Repeats aus Blutlymphozyten-DNA und Bestimmung von Testosteron- und LH-Konzentration	82

H. Ergebnisse	85
1. Histologische Evaluierung der Hodenbiopsien	85
2. Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung	87
2.1. CAG-Repeatbestimmung in Lymphozyten-DNA	87
2.2. Qualitative PCR und RT-PCR von Hodenhomogenat	87
2.3. Qualitative RT-PCR nach LACP	89
2.4. RT-qPCR von Hodenhomogenat	91
2.5. Ergebnisse der CAG-Repeatlängenbestimmung mittels Polyacrylamidgel- Elektrophorese (PAGE)	93
2.6. Korrelation der Testosteron- und LH-Konzentration mit Histologie und CAG-Repeat	98
3. Klonierung	100
I. Diskussion	102
J. Zusammenfassung	117
K. Summary	119
L. Literaturverzeichnis	121
M. Anhang	127
1. Puffer, Nährböden und Lösungen	127
2. Reagenzien	130
3. Verbrauchsmaterialien und Geräte	133

B. Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

K.A. Hose, K. Häffner, **D. Fietz**, J. Gromoll, T. Eckert, S. Kliesch, H. Siebert, M. Bergmann. A novel sequence variation in the transactivation regulating domain of the human androgen receptor. *Fertil. Steril.* 2009; 92:390.e9-390.e11.

Impact Factor: 3,122

L. Jaroszynski, J. Zimmer, **D. Fietz**, M. Bergmann, S. Kliesch, P.H. Vogt. Translational control of the AZFa gene *DDX3Y* by 5'UTR exon-T extension. *Int. J. Androl.* 2010; 34(4):313-326.

Impact Factor: 3,601

D. Fietz, J. Geyer, S. Kliesch, J. Gromoll, M. Bergmann. Evaluation of CAG repeat length of Androgen Receptor expressing cells in human testes showing different pictures of spermatogenic impairment. *Histochem. Cell. Biol.* 2011; 136:689-697.

Impact Factor: 4,727

G. Stumpf, **D. Fietz**, J. Ezer, L.-F. Litzke, M. Bergmann. Identification of gonadal tissue in cryptorchid stallion can be improved by molecular biological analysis - a case report. *A. H. E., accepted 14th December 2011*

Impact Factor: 0,646

Abstracts

K. Hose, K. Handte, **D. Fietz**, T. Eckert, H.-C. Siebert, M. Bergmann. Sequenzvariation innerhalb des Androgenrezeptor-CAG-Repeats bei einem Patienten mit hypergonadotroper Azoospermie und SCO. 20. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Andrologie, 11.-13.09.2008 in Halle (Saale). Abstract in: J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2008; 4:213-214.

D. Fietz, K. Handte, K. Hose, J. Geyer, M. Bergmann. Androgenrezeptor-Expression in humanen Sertolizellen: Nachweis eines somatischen Mosaiks auf zellulärer Ebene bei „bunter Atrophie“ der Spermatogenese. 20. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Andrologie, 11.-13.09.2008 in Halle (Saale). Abstract in: J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2008; 4:214.

D. Fietz, K. Handte, K. Hose, J. Geyer, M. Bergmann. Expression of Androgen Receptor in human Sertoli cells: Detection of a somatic mosaicism at cellular level in infertile men showing “mixed atrophy“ of spermatogenesis. 1st GGL Conference of Life Sciences, 30.09.-01.10.2008 in Gießen. Abstract in: Kongressbuch

D. Fietz, K. Häffner, K. Hose, J. Geyer, J. Gromoll, S. Kliesch, W. Weidner, M. Bergmann. Androgenrezeptor-Expression in humanen Sertolizellen: Untersuchung eines somatischen Mosaiks auf zellulärer Ebene bei „bunter Atrophie“ der Spermatogenese. 42. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, 26.-27.02.2009 in Leipzig. Abstract in: Reprod. Dom. Anim 2009; 44(Suppl):9.

D. Fietz, K. Häffner, K. Hose, J. Geyer, J. Gromoll, M. Bergmann. Expression of Androgen Receptor (AR) in human Sertoli cells: Detection of a somatic mosaicism. 1st Symposium of the Clinical Research Unit KFO 181 "Molecular Andrology", International Workshop, 8.-10.05.2009 in Gießen. Abstract in: Kongressbuch

D. Fietz, J. Geyer, J. Gromoll, S. Kliesch, M. Bergmann. CAG repeat of human androgen receptor – a marker for male infertility? 2nd GGL Conference of Life Sciences, 30.09.-01.10.2009 in Gießen. Abstract in: Kongressbuch

D. Fietz, J. Geyer, J. Gromoll, S. Kliesch, M. Bergmann. Das CAG-Repeat des humanen Androgenrezeptors – molekularer Marker für männliche Infertilität? 3. DVR Kongress, 11.-14.11.2009 in Freiburg i.Br. Abstract in: J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2009; 6(5):236.

D. Fietz, J. Geyer, J. Gromoll, S. Kliesch, M. Bergmann. CAG repeat of human androgen receptor – a marker for male infertility? 43. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, 24.-27.02.2010 in München. Abstract in: Reprod. Dom. Anim 2010; 45(Suppl):10-11.

D. Fietz, C. Ratzenböck, D. Lang, S. Siebert, L. Konrad, J. Geyer, J. Gromoll, S. Kliesch, M. Bergmann. Expression of steroid hormone receptors in human testis. 27. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, 29.09.-01.10.2010 in Würzburg. Abstract in: Kongressbuch

D. Fietz, J. Geyer, J. Gromoll, S. Kliesch, M. Bergmann. Is there a correlation between CAG repeat length and status of spermatogenesis? 3rd GGL Conference of Life Sciences, 29.9.-01.10.2010 in Gießen. Abstract in: Kongressbuch

D. Fietz, J. Geyer, S. Kliesch, J. Gromoll, M. Bergmann. Gibt es eine Korrelation der CAG-Repeatlänge und dem Spermatogenesestatus? – Untersuchung der Zellpopulationen im menschlichen Hoden. 22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Andrologie, 29.-31.10.2010 in Hamburg. Abstract in: J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2010; 7(5):438-439.

Preise und Auszeichnungen

- 1.) Verleihung des 3. Posterpreises bei der 42. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, 26.-27.02.2009 in Leipzig.

C. Abkürzungsverzeichnis

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und physikalische Maßeinheiten sind nicht gesondert aufgeführt.

ABP	androgen binding protein
AF-1, -2	activation function 1, 2
AIS	androgen insensitivity syndrome
APES	3-Aminopropyl-triethoxysilan
AR	Androgenrezeptor
ATXN3	Ataxin 3 Gen
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CAG	Cytosin-Adenosin-Guanin
CDS	coding sequence einer mRNA
CIS	Carcinoma-in-situ
Ct	reshold cycle
DBD	DNA binding domain
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHT	Dehydrotestosteron
FFPE	formalin fixed paraffin embedded (tissue)
FGF-R3	fibroblast growth factor receptor 3
FLA	Fragmentlängenanalyse
FMR1	fragile X mental retardation 1 gene
fsc	fokales SCO
FSH	follikelstimulierendes Hormon
hCG	humanes Choriogonadotropin

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin/Eosin-Färbung
hsp	heat shock proteins
hyp	Hypospermatogenese
ICSI	intracytoplasmic sperm injection
IPTG	Isopropyl- β -Dthiogalactopyranosid
isz	immature Sertolizellen
KF	Klinefelter-Syndrom
Krypt.	Kryptorchismus
LACP	laser assisted cell picking
LBD	ligand binding domain
LH	luteinisierendes Hormon
LMPC	laser microdissection and pressure catapulting
LZ	Leydigzellen
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
msd	mehrkernige runde Spermatiden
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nsp	normale Spermatogenese
NTC	no template control, Negativkontrolle
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PK	Positivkontrolle
RIA	Radioimmunoassay
RT	Reverse Transkription / Reverse Transkriptase

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

RT-PCT	reverse transcription PCR
RT-qPCR	reverse transcription quantitative PCR
SBMA	spinal and bulbar muscular atrophy, Kennedy's Disease
SC	score count
SCO	Sertoli-Cell-Only Syndrom
sda	Arrest der Spermatogenese auf der Stufe von Spermatiden
sga	Arrest der Spermatogenese auf der Stufe von Spermatogonien
SZ	Sertolizellen
sza	Arrest der Spermatogenese auf der Stufe von Spermatozyten
T	Testosteron
TAF	Transaktivierungsfunktion
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TESE	testikuläre Spermienextraktion
TIN	testikuläre intraepitheliale Neoplasie
ts	Tubulusschatten
tu	Tumor
XGal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid

D. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Morphologie der Sertolizelle und Verbund mit den Keimzellen (nach Weinbauer et al. 2010)
- Abb. 2 Normale Spermatogenese (Paraffin, HE, Primärvergrößerung x40)
- Abb. 3 Schema der Spermatogenese im menschlichen Keimepithel (modifiziert nach Bergmann 2005)
- Abb. 4 Spermatogenese-Stadien im menschlichen Keimepithel (Clermont 1963)
- Abb. 5 Histologische Beispiele für eine normale und eine gestörte Spermatogenese (Paraffinschnitte, HE, Primärvergrößerung x40)
- Abb. 6 Aufbau des humanen AR (modifiziert nach Gelmann 2002)
- Abb. 7 Funktionsweise des AR
- Abb. 8 LACP (Paraffinschnitte, Hämatoxylin, Primärvergrößerung: 8a-e x20, 8f x5)
- Abb. 9 Funktionsweise der PCR
- Abb. 10 Funktionsweise interkalierender Fluorophore (z.B. SYBR® Green I) und deren Anwendung bei der qPCR
- Abb. 11 p-GEM®-T Vektor von Promega
- Abb. 12 Auswertung der PAGE
- Tab. 1 Histologische Evaluierung, *score count* Bewertung der verwendeten Hodenbiopsien, Testosteron- und LH-Werte
- Tab. 2 Ergebnisse der CAG-Repeatbestimmung mittels PAGE und Fragmentlängenanalyse mit monomorpher Histologie (A) und bunter Atrophie der Spermatogenese (B)
- Abb. 13 Ergebnisse der qualitativen PCR und RT-PCR von Hodenhomogenat
- Abb. 14 Ergebnisse der qualitativen RT-PCR nach LACP

- Abb. 15 Relative AR- und ABP-Expression im Hodenhomogenat in Abhängigkeit von der CAG-Repeatlänge in den Sertolizellen
- Abb. 16 Relative AR- und ABP-Expression im Hodenhomogenat in Abhängigkeit von der Histologie
- Abb. 17 Beispiel für eine Untersuchung mittels PAGE und Auswertung in Microsoft™ Excel
- Abb. 18 Darstellung von CAG-Repeatunterschieden bei Patient 11 mittels PAGE
- Abb. 19 Korrelation von CAG-Repeatlänge in Sertolizellen und Histologie
- Abb. 20 Testosteron- und LH-Konzentration im Blut in Abhängigkeit von der CAG-Repeatlänge in den Sertolizellen
- Abb. 21 Testosteron- und LH-Konzentration im Blut in Abhängigkeit von der Histologie
- Tab. 3 Sequenzierungsergebnisse und Ergebnisse der Re-Klonierung in JM109 und SURE®2

E. Einleitung

Der Androgenrezeptor (AR) ist ein liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor, dessen Transaktivierungsdomäne eine polymorphe Trinukleotidsequenz beinhaltet. Dieses CAG-Repeat, das für die Aminosäure Glutamin codiert, liegt im vorderen Bereich des ersten Exons (Transaktivierungsdomäne) und zeigt eine hohe physiologische Variabilität von neun bis 36 Repeats (Andrew et al. 1997) bzw. eine mittlere Repeatanzahl von 21 ± 2 (Quigley et al. 1995). Der AR wird in allen Geweben des Körpers exprimiert, mit Ausnahme der Milz (Gelman 2002). Im Hodenparenchym konnte der AR mittels Immunhistochemie vorwiegend in Sertolizellen, peritubulären Myoidzellen, Leydigzellen (Walker 2009) sowie Endothelzellen (Bergh und Damber 1992) detektiert werden. Die Expression in Keimzellen wird kontrovers diskutiert. Der Steroidrezeptor vermittelt die Testosteronwirkung zwischen Leydig-, Sertoli- und Keimzellen. Dadurch ist der AR essentiell für die Einleitung und Erhaltung der Spermatogenese (als Review siehe Verhoeven et al. 2010, Walker 2010).

Trinukleotidkrankungen wie Huntington Disease (Moe et al. 2008, $(CAG)_n$), Fragile X Syndrome (de Vries et al. 1998, $(CGG)_n$) und Kennedys Disease (spinal and bulbar muscular atrophy, SBMA, $(CAG)_n$) (La Spada et al. 1991) sind seit Langem bekannt. Sie gehen alle mit einer massiven Verlängerung eines CG-reichen Basentriplets einher, was die Funktion des jeweiligen Gens maßgeblich beeinflusst. Eine Verlängerung des CAG-Repeats im AR über einen „kritischen Wert“ von > 40 Repeats im Falle von SBMA kann mit einem somatischen Mosaik in verschiedenen Körpergeweben einhergehen (Tanaka et al. 1999b). Bei Kennedy's Disease kommt es unter anderem zu Muskelschwäche und -atrophie, sowie zu Muskelzuckungen und Zeichen von Androgeninsensitivität (*androgen insensitivity syndrome*, AIS) wie Gynäkomastie, Unfruchtbarkeit und Hodenatrophie (Fischbeck et al. 1999). Der

Zusammenhang zwischen CAG-Repeatlänge und männlicher Fertilität ist trotzdem immer noch strittig. Einige Arbeitsgruppen finden einen deutlichen Zusammenhang (Dowsing et al. 1999, von Eckardstein et al. 2001, Mifsud et al. 2001), andere Arbeitsgruppen dagegen nicht (Dadze et al. 2000, Rajpert-De Meyts et al. 2002, Westerveld et al. 2008, Badran et al. 2009). Es ist jedoch akzeptiert, dass eine Verlängerung des CAG-Repeats zu einer verminderten Transaktivierungsaktivität des AR (Tut et al. 1997) und eventuell auch zu milden Formen des AIS führen kann (Rajender et al. 2007).

In den oben genannten Gruppen wurde die Länge des CAG-Repeats durch eine Fragmentlängenanalyse der DNA aus Blutlymphozyten bestimmt. Der Fertilitätsstatus der Patienten wurde durch eine Ejakulatanalyse erhoben und die Männer in die Gruppen „normo-“ / „azoosperm“ bzw. „fertil“ / „infertil“ eingeteilt. Diese Einteilung spiegelt allerdings nicht die Qualität der Spermatogenese wieder. Eine Azoospermie kann zum Beispiel durch eine Obstruktion bedingt sein. Hierbei ist die Spermatogenese vollkommen intakt, der Patient ist also „fertil“, da er reife Spermien produzieren kann. Nur eine Hodenbiopsie kann deswegen Aufschluss über den Spermatogenesestatus geben (als Review siehe Bergmann und Kliesch 2010 und Cerilli et al. 2010). Die Arbeitsgruppen Dakouane-Giudicelli et al. (2006) und Casella et al. (2003) haben ihre Untersuchungen des CAG-Repeats mit der Histologie des Hodengewebes verglichen. Dakouane-Giudicelli et al. konnten dabei keinen Zusammenhang zwischen histologisch manifesten Spermatogenesestörungen bei älteren Männern und dem CAG-Repeat finden. Casella et al. dagegen konnten einen signifikanten Unterschied im CAG-Repeat ermitteln und diesen mit histologischen Befunden korrelieren. Bei einer normalen Spermatogenese wurden im Mittel 21 (8-27) Repeats bestimmt, bei einem Arrest der Spermatogenese 22 (18-28), bei Sertoli-Cell-Only Syndrom ebenfalls 22 (17-30) und bei Hypospermatogenese 23

(19-33) Repeats. Statistisch signifikant war allerdings nur der Unterschied in der CAG- Repeatlänge zwischen der Kontrollgruppe, die nicht histologisch untersucht wurden, und den Patienten mit Hypospermatogenese. Tatsächlich ist die histologische Diagnose bei vielen oligozoospermen Patienten nicht einheitlich, häufig liegt eine „bunte Atrophie“ der Spermatogenese vor. Hierbei liegen Keimtubuli mit normaler Spermatogenese neben solchen mit verschiedenen Abstufungen von Spermatogenesestörungen (Sigg 1979). Warum es zu einem solchen histologischen Bild kommen kann, ist unklar.

Es ist bekannt, dass das CAG-Repeat durch die starken Wechselwirkungen zwischen den Basen und die damit einhergehende Bildung von DNA-Sekundärstrukturen nur schwer repliziert werden kann (Samadashwily et al. 1997). Es stellt sich die Frage, ob auch beim Menschen durch Replikationsschwierigkeiten eine Verlängerung bzw. Verkürzung eines Trinukleotidrepeats innerhalb physiologischer Grenzen auftreten kann. Bettencourt et al. (2010) haben gezeigt, dass das CAG-Repeat im ATXN3-Gen im Fall der Machado-Joseph-Disease bei der Transkription verändert werden kann, so dass die cDNA ein Repeat mehr beinhaltet als die genomische DNA.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war, das CAG-Repeat nicht nur im Blut zu bestimmen, sondern auch innerhalb der AR exprimierenden Zellen des Hodens zu prüfen, ob es eine Korrelation zwischen der Repeatlänge und der Histologie der Spermatogenese gibt. Um eventuelle Unterschiede auf DNA und mRNA Ebene, d.h. zwischen der gesamten Zellpopulation des Hodens und den AR exprimierenden Zellen zu zeigen, wurde nicht nur die DNA des Hodens untersucht, sondern auch mRNA von Hodenhomogenat. Zudem wurden mit der Technik des *laser assisted cell picking* (LACP) sowohl Keimtubuli als auch Bereiche des interstitiellen Gewebes

getrennt voneinander gewonnen und eine Untersuchung der mRNA des CAG-Repeats durchgeführt. Da bei der histologischen Untersuchung der Patienten auch Fälle von „bunter Atrophie“ diagnostiziert wurden, sollte untersucht werden, ob bei diesem histologischen Bild abweichende Repeatlängen in den unterschiedlichen Bereichen gefunden werden können. Mit Hilfe der vorliegenden Doktorarbeit soll gezeigt werden, ob zwischen Blut und Hoden sowie innerhalb des Hodens selbst ein somatisches Mosaik bezüglich des CAG-Repeats vorliegt, das die Sertolizellfunktion und die Spermatogenese beeinträchtigen kann.

F. Literaturübersicht

1. Aufbau des Hodens

Der Hoden als primäres Geschlechtsorgan dient zum einen der Produktion von befruchtungsfähigen Keimzellen, zum anderen als endokrine Drüse der Hormonproduktion. Er ist von einer schützenden derben Bindegewebshaut, der *Tunica albuginea*, umgeben. Zarte Bindegewebssepten unterteilen das Hodenparenchym in mehrere Hodenlappen, *Lobuli testis*, die alle in das Zentrum des Hodens, das *Rete testis*, münden. Jedes Hodenläppchen besteht aus einem oder mehreren Samenkanälchen, den *Tubuli seminiferi contorti*, und dem die Tubuli umgebenden Interstitium mit Leydigzellen, Gefäßen und Nerven.

Die einzelnen Hodenkanälchen sind von einer *Lamina propria* umgeben, in die peritubuläre Myoidzellen eingelagert sind. Die aus dem Keimepithel entlassenen Spermien werden in das Lumen der Hodenkanälchen abgegeben, gelangen über das *Rete testis* und anschließend die *Ductuli efferentes* weiter in den Nebenhoden. Eine Übersicht über den histologischen Aufbau des Hodens kann Mayerhofer et al. (2005) entnommen werden, die Physiologie des Hodens ist bei Weinbauer et al. (2010) zusammengefasst.

2. Beschreibung der Zellpopulationen des Hodens

2.1. Zellen innerhalb der Tubuli seminiferi contorti

2.1.1. Sertolizellen

Sertolizellen sind somatische Zellen, die innerhalb des Keimepithels liegen und postpubertär mitotisch inaktiv sind. Sie wurden erstmals 1865 von Enrico Sertoli (Sertoli 1865, zitiert nach Griswold 1998) beschrieben und als einzige somatische Zellpopulation im Keimtubulus bezeichnet.

Die Sertolizellen sitzen der Basalmembran des Keimtubulus direkt auf und stehen mit einer festgelegten Anzahl Keimzellen in direktem Kontakt (im Mittel 10 Keimzellen pro Sertolizelle) (Zhengwei et al. 1998). Die Anzahl der Sertolizellen in einem Keimtubulus beeinflusst die Anzahl der am Tag produzierten Spermien und man vermutet, dass ein Rückgang der Fruchtbarkeit im Alter mit einem Absterben der Sertolizellen im Zusammenhang steht (Sharpe et al. 2003). Das Vorhandensein der Sertolizellen ist demnach eine essentielle Voraussetzung für den Aufbau und den Erhalt einer qualitativ und auch quantitativ intakten Spermatogenese (Griswold 1998). Die deswegen auch als „Ammenzellen“ bezeichneten Sertolizellen behalten ihren ständigen Kontakt mit den Keimzellen während der gesamten Spermatogenese (Abb. 1). Sie regulieren durch Vermittlung der Testosteronwirkung auf die Keimzellen nicht nur das hormonelle Milieu, sondern ermöglichen zudem auch den Schutz der Keimzellen vor dem Immunsystem des Körpers durch die Ausbildung der Blut-Hoden-Schranke (Griswold 1998). Diese Barriere kommt durch die dichte Verbindung zweier Sertolizellen durch *tight junctions* im basalen Bereich des Keimepithels zu Stande. Erstmals beschrieben wurde die Blut-Hoden-Schranke bei der Ratte von Dym und Fawcett (1970) und beim Menschen von Bergmann et al. (1989).

Im Keimepithel sind die Sertolizellen durch ihren eher unregelmäßig geformten, meist dreieckigen Zellkern charakterisiert, den man vor allem im unteren Drittel des Keimepithels findet und der meistens einen deutlichen Nucleolus enthält. Die Anzahl der Sertolizellen ist mit Eintritt in die Pubertät festgelegt und nimmt dann im Laufe des Lebens immer weiter ab (Sharpe et al. 2003).

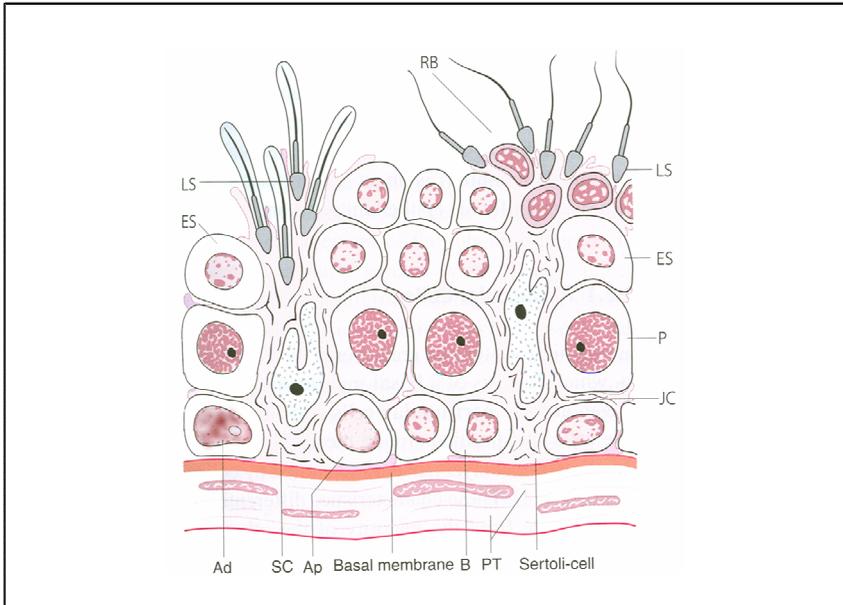


Abb. 1 Morphologie der Sertolizelle und Verbund mit den Keimzellen (nach Weinbauer et al. 2010)

Ad A-dark Spermatogonie, **Ap** A-pale Spermatogonie, **B** B-Spermatogonie, **P** pachytäne Spermatozyte, **ES** frühe /runde Spermatiden, **LS** späte, elongierende Spermatiden, **RB** Residualkörperchen, **JC** „tight junction“, Blut-Hoden-Schranke, **SC** Sertolizelle, **PT** peritubuläre Myoidzelle

Mit dem Eintritt in die Pubertät verändert sich die Morphologie der Sertolizellen und die Blut-Hoden-Schranke bildet sich aus. Zeichen für die Reifung der Sertolizellen sind laut Sharpe et al. (2003):

- a) morphologische Veränderung des Zellkerns zu einem dreigeteilten Nucleus
- b) prominentes Hervortreten des Nucleolus
- c) Verlust der Proliferationsfähigkeit
- d) Ausbildung von *tight junctions* zwischen den Sertolizellen und damit Entstehen der Blut-Hoden-Schranke

Zudem sezernieren die Sertolizellen eine Vielzahl von verschiedenen Proteinen, die von Wang et al. (2006) in die folgenden Kategorien eingeteilt wurden: 1) Zytoskelettformierung (z.B. Vimentin, Cytokeratin 18), 2) Transportproteine (z.B. *androgen binding protein* (ABP), Transferrin), 3) endokrine und parakrine Faktoren für die Keimzellernährung und -differenzierung (z.B. Anti-Müller-Hormon, AMH), 4) Zell-Zell-Kommunikationsproteine (z.B. Connexin 43) und 5) AR-Zielgene wie zum Beispiel Pem (auch bekannt als Rhox).

2.1.2. Keimzellen

Die Keimzellen sind neben den Sertolizellen die einzigen Zellen im Keimepithel. Mehrere Generationen von Keimzellen in verschiedenen Entwicklungsstadien liegen, teilweise oder vollständig von Sertolizellen umgeben, im Keimtubulus. Die Morphologie der Keimzellen ist stark von ihrem Entwicklungsstand abhängig (Clermont 1963). Die basal liegenden Spermatogonien sind durch einen mehr oder weniger kompakten Kern mit einem schmalen Zytoplasma-Saum gekennzeichnet und können weiter in zwei Typen unterschieden werden: die A- und B-Spermatogonien. Die A-Spermatogonien können anhand morphologischer Kriterien weiter klassifiziert werden: *A-dark spermatogonia* (Ad, Abb. 1) sind gekennzeichnet durch einen einheitlich dunkel gefärbten, oviden Kern, während *A-pale spermatogonia* (Ap) ein eher hell granuliertes Chromatin aufweisen. Ein oder zwei Nucleoli sind deutlich sichtbar. A-Spermatogonien dienen im Keimepithel als Reservezellen. Durch eine mitotische Teilung entsteht immer eine A-Spermatogonie, die wieder als Reserve dient und eine B-Spermatogonie. Sie ist gekennzeichnet durch einen hellen, oviden Kern mit mehreren Chromatinverdichtungen. Die primären Spermatozyten, die durch Mitose aus den B-Spermatogonien hervorgehen, sie sind vor allem durch einen großen, stark strukturierten Kern gekennzeichnet. Sie

treten dann in die 1. Reifeteilung der Meiose ein. Die postmeiotischen runden Spermatiden (ES, Abb. 1) zeichnen sich durch einen runden, dunklen Zellkern und wiederum nur wenig Zytoplasma aus. Die elongierenden Spermatiden (LS, Abb. 1) erinnern schon entfernt an die Spermien und zeigen einen eher tropfenförmigen Kern. Die „fertigen“ Spermien haben sich gedreht, der Spermienschwanz zeigt lumenwärts und der abgeflachte Kern steckt apikal im Keimepithel (Abb. 2). Das nunmehr haploide Spermium wird in das Tubuluslumen abgegeben. Durch peristaltische Bewegungen der Tubuluswand, vermittelt durch peritubuläre Myoizellen, werden die Spermien weitertransportiert und schließlich im Nebenhoden gespeichert.

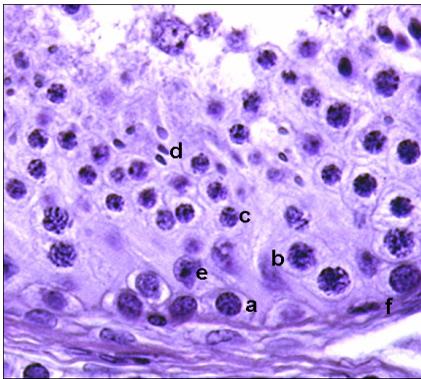


Abb. 2 Normale Spermatogenese (Paraffin, HE, Primärvergrößerung x40)

- a** Spermatogonie
- b** primäre pachytäne Spermatozyte
- c** runde Spermatide
- d** elongierte Spermatide
- e** Sertolizelle
- f** peritubuläre Myoizelle

2.1.3. Peritubuläre Myoizellen

Bei diesen Zellen handelt es sich um zur Kontraktion befähigte Fibrozyten, die in die Tubuluswand eingebettet sind. Zu diesem Zweck bilden sie das Protein α -smooth muscle actin, das als Marker für peritubuläre Zellen herangezogen wird, sowie Myosin. Sie erfüllen die Funktion des Weitertransports der in das Lumen

abgegebenen Spermien. Zudem sezernieren sie die kollagenen Fasern der Tubuluswand, in die sie selbst eingebaut sind.

2.2. Interstitialium

2.2.1. Leydigzellen

Zusammen mit Blutgefäßen, Bindegewebe und interzellulärer Matrix bilden die Leydigzellen das lockere verbindende Gewebe zwischen den Hodenkanälchen. Sie wurden das erste Mal 1850 von Franz Leydig beschrieben (Übersicht bei Weinbauer et al. 2010) und können sowohl vereinzelt als auch in Gruppen auftreten. Leydigzellen produzieren und sezernieren das wichtigste männliche Sexualhormon, das Testosteron. Man unterscheidet zwischen Leydig-Vorgängerzellen, Leydig-Stammzellen, fetalen und adulten Leydigzellen. Fetale Leydigzellen stammen wahrscheinlich aus mehreren embryonalen Geweben wie dem Zölomepithel, der Gonadenleiste oder Mesonephroszellen (Svechnikov et al. 2010). Sie können aber auch von fetalen Nebennierenzellen abstammen (O'Shaughnessy et al. 2006). Die fetalen Leydigzellen sind die einzige Testosteronquelle im Fetus und produzieren das Steroidhormon schon vor der 7. Schwangerschaftswoche. Dies geschieht noch unabhängig vom Einfluss des luteinisierenden Hormons (LH) (Svechnikov et al. 2010), da die LH-Produktion der fetalen Hypophyse erst ab der 7. Schwangerschaftswoche beginnt. Aus fetalen werden neonatale Leydigzellen, die zu unreifen Leydigzellen „degenerieren“. Adulte Leydigzellen sind typische hormonproduzierende Zellen und zeichnen sich durch ein stark ausgeprägtes endoplasmatisches Retikulum, ein große Anzahl von Mitochondrien und zahlreiche Fett-Tröpfchen aus. Letztere enthalten das Cholesterol, aus dem in den Leydigzellen das Testosteron synthetisiert wird. Adulte Leydigzellen zeigen eine nur geringe Proliferationsrate. Im adulten Hoden können Leydigzellen allerdings aus

perivaskulären und peritubulären Zellen ersetzt werden, was sowohl von LH als auch von Wachstumsfaktoren beeinflusst wird, die von den Sertolizellen sezerniert werden (Übersicht bei Weinbauer et al. 2010).

2.2.2. Weitere Bestandteile des Interstitiums

Neben den Leydigzellen können im Interstitium auch Zellen des Immunsystems vorkommen. Pro 10 bis 50 Leydigzellen findet man einen Makrophagen, die wahrscheinlich auch die Funktion der Leydigzellen, nämlich die Proliferation, Differenzierung und Steroidhormonproduktion, durch die Sekretion von Zytokinen beeinflussen (Übersicht bei Weinbauer et al. 2010). Zudem findet man im Interstitium Blut- und Lymphgefäße sowie Nervenfasern.

3. Spermatogenese

3.1. Normale Spermatogenese

Die Spermatogenese ist der Prozess zur Bereitstellung befruchtungsfähiger Keimzellen. Dieser läuft im Keimtubulus von basal nach luminal ab und endet mit der Freigabe der fertigen Spermien in das Tubuluslumen (Übersicht bei Bergmann und Kliesch 2010). Bei der Spermatogenese können drei Phasen unterschieden werden (Abb. 3):

1. mitotische Vervielfältigung und Differenzierung von Spermatogonien
2. meiotische Reifeteilungen der Spermatozyten
3. Differenzierung der haploiden Spermatischen zu reifen Spermien

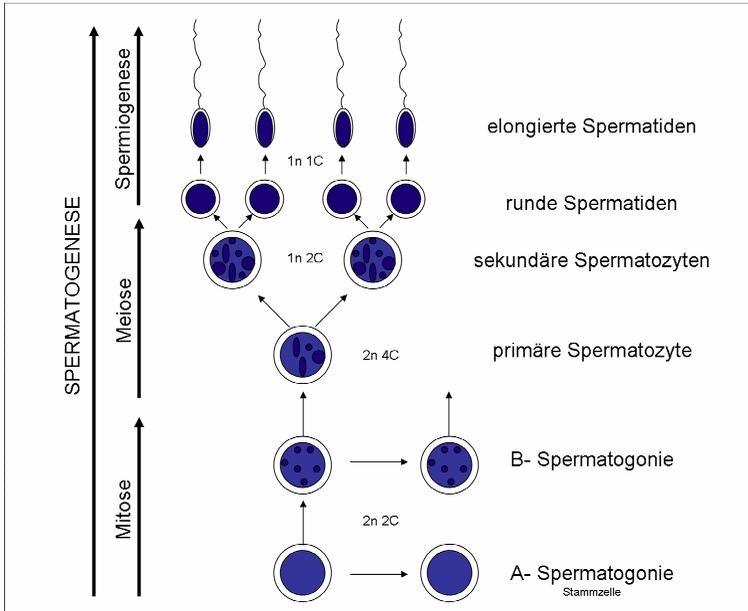


Abb. 3 Schema der Spermatogenese im menschlichen Keimepithel (modifiziert nach Bergmann 2005)

Spermatogonien sind - wie jede Körperzelle - diploide Zellen ($2n$) mit einem doppelten Chromosomensatz ($2C$). Um die Anzahl der Chromosomen in den Nachkommen konstant zu halten, müssen die Keimzellen eine meiotische Zellteilung durchlaufen, an deren Ende sie dann haploid mit einfachem Chromosomensatz ($1n\ 1C$) sind.

Bei den Spermatogonien unterscheidet man nach morphologischen Gesichtspunkten A- und B-Spermatogonien. Erstere sind lebenslang mitotisch aktiv und bilden eine Art „Stammzell-Pool“. Ein Teil der A-Spermatogonien differenziert sich zu mitotisch aktiven B-Spermatogonien und diese treten dann in die meiotische Reifeteilung ein. Diese beginnt mit der Verdopplung des DNA-Gehalts und die Chromosomen bestehen nun aus zwei identischen Schwesterchromatiden ($2n\ 4C$). Diese

Keimzellen werden nun als primäre Spermatozyten bezeichnet und durchlaufen die Prophase I der Meiose I. Die nach der ersten meiotischen Reifeteilung ist die entstandene sekundäre Spermatozyte ist haploid – das Chromosom besteht aber immer noch aus zwei Chromatiden ($1n\ 2C$). Die sekundären Spermatozyten teilen sich bereits nach wenigen Stunden in der Reduktionsteilung der Meiose in die haploiden Spermatischen mit einem einfachen Chromosomensatz ($1n\ 1C$). Die Entstehung der Keimzellen von den frühen Spermatogonien bis zum fertigen Spermium bezeichnet man als Spermatogenese, die Differenzierung der haploiden Spermatischen als Spermiogenese.

Die so entstandenen frühen Spermatischen sind runde Zellen. Um die endgültige Form eines Spermiums zu erreichen, müssen verschiedene Differenzierungsschritte durchlaufen werden. Dazu gehören die Bildung a) des Spermienkopfes, b) des Akrosoms und c) der Geißel und d) die Abschnürung des überflüssigen Zytoplasmas. Diese Differenzierungsvorgänge laufen natürlich nicht zeitlich getrennt voneinander ab, werden aber nun im Folgenden nacheinander besprochen.

Für die Bildung des Spermienkopfes muss die DNA kondensiert, d.h. „platzsparender“ verpackt werden. Für diesen Zweck werden ca. 85% der Histone, Proteine, die normalerweise die DNA aufwickeln, durch Protamine ersetzt. Bei 15% der Spermien in Hoden und Ejakulat sind noch die Histone erhalten (Tanphaichitr et al. 1978). Der Histon-Protamin-Austausch beendet die Transkription in den runden Spermatischen, da die DNA nach dem Austausch für die Anlagerung der Transkriptionsmaschinerie zu eng gepackt ist. Ein korrekter zeit- und stadienspezifischer Ablauf des Histon-Protamin-Austauschs ist deswegen essentiell für die Reifung von runden Spermatischen zu reifen Spermien im Verlauf der Spermiogenese (Steger et al. 2000, Übersicht bei Gaucher et al. 2010).

Die Bildung des Akrosoms findet in drei Phasen statt. Die hydrolytischen Enzyme des Akrosoms werden im rauen endoplasmatischen Retikulum gebildet und im Golgi-Komplex der Spermatiden modifiziert. Die so entstandenen proakrosomalen Granula verschmelzen dann zu einem einzigen akrosomalen Vesikel, das sich an der Kernmembran des späteren Vorderendes des Spermiums anheftet („Golgi-Phase“). Am Gegenpol wird die Geißelbildung durch ein Zentriol induziert (s.u.). In der nächsten Phase der Akrosombildung breitet sich das akrosomale Vesikel weiter bis über den Äquator des Nukleus aus („Kappen-Phase“). Das Akrosom enthält verschiedene hydrolytische Enzyme, u.a. Hyaluronidasen und die Protease Akrosin. Diese Enzyme werden vor der Befruchtung freigesetzt und ermöglichen dem Spermium das Durchdringen der *Corona radiata* und der *Zona pellucida* der Eizelle. In der letzten Phase, der „Akrosom-Phase“, kommt es zu einer weiteren Abflachung und Kondensation des Zellkerns, dessen Formänderung vom Akrosom begleitet wird. Dabei dreht sich die Spermatide, so dass das Akrosom in Richtung der Basalmembran des Keimtubulus zeigt und die sich bildende Geißel in Richtung Lumen.

Die Bildung der Geißel geht von den Zentriolen aus. Ein Zentriol nimmt Kontakt zum Zellkern auf, um das zweite wunden sich Mikrotubuli und Mitochondrien auf. Letztere ordnen sich im proximalen Teil der Geißel an. Die Geißel wächst in Richtung Lumen aus. Ihre Formierung ist erst bei der Freisetzung der Spermien abgeschlossen. Das überschüssige Zytoplasma mit den nicht mehr benötigten Zellorganellen wird als „Residualkörperchen“ abgeschnürt und von den Sertolizellen phagozytiert. Erst nach dessen Abschnürung können die Spermien in das Lumen abgegeben werden. Nur ein kleines Zytoplasmatröpfchen bleibt vorerst erhalten und hängt am Übergang zwischen Kopf und Geißel dem Spermium an. Er wird erst bei der Reifung im Nebenhoden entfernt (Übersicht bei Mayerhofer et al. 2005 und Schnorr und Kressin

2006). Die freigesetzten Spermien werden durch peristaltische Bewegung der Keimtubuluswand, bzw. der peritubulären Myoizellen durch die *Tubuli seminiferi recti* und das *Rete testis* zu den *Ductuli efferentes* transportiert und gelangen dann in den Nebenhoden. Dort erlangen die Spermien durch die Sekrete des Nebenhodens ihre Motilität und es kommt zu einer erneuten morphologischen Änderung der Spermienkopfform. Zudem wird der Zytoplasmotropfen entfernt, der im Keimepithel nicht von den Sertolizellen phagozytiert wurde.

Zusammenfassend kann man sagen, dass im Nebenhodenkopf, *Caput epididymidis*, die Spermienreifung stattfindet. Nachdem die Spermien das Keimepithel verlassen haben, sind sie unbeweglich. Sie erlangen ihre Bewegungsfähigkeit also erst im Nebenhoden. Außerdem kommt es zu Änderungen der Spermienmorphologie und der der Zytoplasmotropfen wandert vom Hals- in den mittleren Schwanzbereich. Im Gegensatz zur allgemeinen Meinung wird der Zytoplasmotropfen erst post-ejakulatorisch vollständig entfernt. Im weiblichen Genitale müssen die Spermien kapazitieren, um ihre Befruchtungsfähigkeit zu erlangen. Testikuläre Spermien sind nicht in der Lage, eine Eizelle zu befruchten und müssen deswegen *in vitro* kapazitiert werden (Übersicht bei Cooper 2011).

3.2. Stadien der Spermatogenese

Im Querschnitt eines Keimtubulus findet man immer eine bestimmte Assoziation von Keimzellen, die man auch als Spermatogenese-Stadium bezeichnet. Diese sind Ausdruck von „Spermatogenesewellen“, die zeitgleich im Keimepithel ablaufen (Bergmann 2005). Beim Menschen können sechs Spermatogenese-Stadien unterschieden werden (Clermont 1963, Abb. 4):

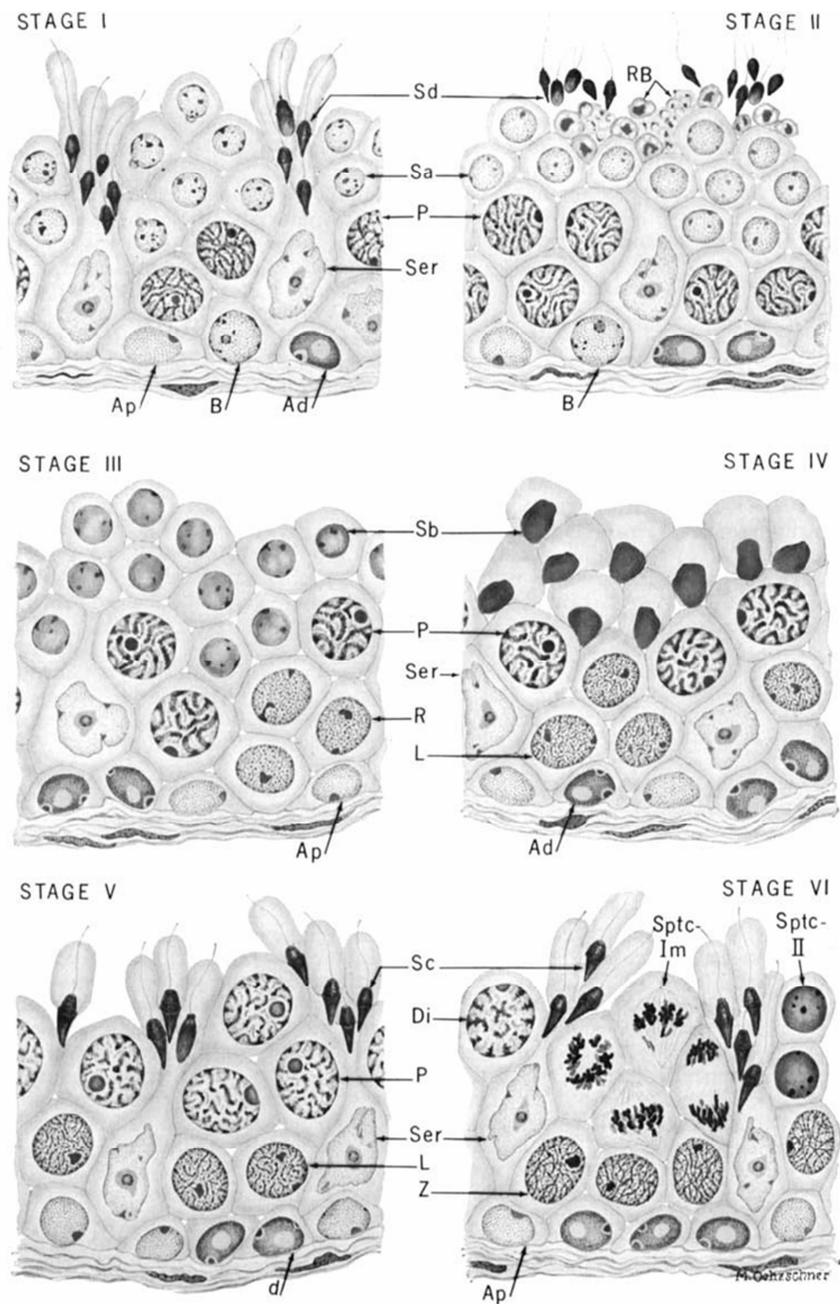


Abb. 4 Spermatogenese-Stadien im menschlichen Keimepithel (Clermont 1963)

Ad A-dark Spermatogonie **Ap** A-pale Spermatogonie **B** B-Spermatogonie
Sd, Sc elongierte Spermatozoen **Sa, Sb** runde Spermatozoen **Ser** Sertolizelle
L primäre Spermatozoen im Leptotänstadium **Z** primäre Spermatozoen im
Zygotänstadium **P** primäre Spermatozoen im Pachytänstadium **RB**
residual body **R** in der Entwicklung arretierte primäre Spermatozoen **Di**
primäre Spermatozoen im Diplotänstadium **Sptc-I, Sptc-II** sekundäre
Spermatozoen

Stadium I ist gekennzeichnet durch das Auftreten von zwei Spermatozoengenerationen, sowohl runde als auch elongierte Spermatozoen liegen über- bzw. nebeneinander im Keimepithel. Zusätzlich kommen primäre Spermatozoen im Pachytän-Stadium, A- und B-Spermatogonien vor.

Stadium II ist charakterisiert durch das Auftreten von nahezu „fertigen“ Spermien. Die elongierten Spermatozoen schnüren den *residual body* ab und vollenden die Spermiation. Zudem liegen pachytäne Spermatozoen, A- und B-Spermatogonien vor. Am Ende von Stadium II erfolgt der *sperm release*.

Stadium III ist gekennzeichnet durch das Auftreten nur einer Spermatozoengeneration, da die reifen Spermatozoen das Keimepithel verlassen haben. Es liegen zwei Generationen von Spermatozoen vor, pachytäne und präleptotäne, zudem kommen A-Spermatogonien vor.

Stadium IV wird durch die beginnende Elongation der runden Spermatozoen charakterisiert. Zudem treten primäre Spermatozoen im Pachytän- und Leptotänstadium auf und zahlreiche A-Spermatogonien können auf der Basalmembran identifiziert werden.

In **Stadium V** elongieren die Spermatiden weiterhin, die beiden Spermatozytengenerationen fahren in ihrer Entwicklung fort, die jüngere Generation befindet sich nun im Zygotänstadium. Weiterhin sieht man A-Spermatogonien auf der Basalmembran. Am Ende des fünften Stadiums durchlaufen die Spermatozyten die 1. Reifeteilung der Meiose.

Stadium VI ist demnach gekennzeichnet durch das Auftreten der sekundären Spermatozyten. Diese vollziehen allerdings umgehend die 2. Reifeteilung und werden zu frühen runden Spermatiden, so dass das Stadium VI nur sehr selten in der Histologie zu finden ist.

3.3. Störungen der Spermatogenese

Störungen der Spermatogenese führen zu Sub- oder Infertilität und können sicher nur mit Hilfe einer Hodenbiopsie untersucht werden. Die Richtlinien der *European Association of Urology*, EAU (Dohle et al. 2005) beschreiben die Untersuchung von Ejakulat und die möglichen Störungen wie Azoospermie, Oligozoospermie, Asthenozoospermie oder Teratozoospermie. Da Ejakulatanormalien aber sowohl durch eine Störung der Spermatogenese im Hoden als auch durch pathologische Veränderungen der samenableitenden Wege oder der akzessorischen Geschlechtsdrüsen bedingt sein können, ist eine Ejakulatanalyse nicht ausreichend für die Diagnosestellung. Eine diagnostische Hodenbiopsie ist indiziert bei Azoospermie, die mit einem normalen Hodenvolumen und einem normalen FSH-Wert einhergeht (normogonadotrope Azoospermie). Sie dient der Differenzierung zwischen einer obstruktiven und nicht-obstruktiven Azoospermie. Die Hodenbiopsie kann auch als Teil der Therapie genutzt werden, wenn sich Patienten mit einer nicht-obstruktiven Azoospermie für die assistierte Reproduktion entscheiden und Spermien

aus dem Hodengewebe extrahiert werden sollen (testikuläre Spermienextraktion, TESE). Auch bei Patienten mit Klinefelter Syndrom (Genotyp 47 XXY) ist eine Hodenbiopsie indiziert, da Spermien für eine intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) extrahiert werden können. Bei Patienten mit erhöhtem Risiko für maligne Keimzelltumore (z.B. durch familiäre Prädisposition, Hodenatrophie, Unfruchtbarkeit oder Kryptorchismus) können Tumorstufen (*Carcinoma in situ*, CIS bzw. testikuläre intraepitheliale Neoplasie, TIN) und Mikrokalzifikationen durch eine Hodenbiopsie entdeckt werden (Dohle et al. 2005).

Spermatogenese-Störungen können an allen Punkten der Keimzellentwicklung auftreten. Es kann dabei zu einer nur quantitativ gestörten, aber qualitativ intakten Spermatogenese (Hypospermatogenese, hyp) kommen, bei der noch Spermien produziert werden. Es können sich aber auch Spermatogeneseearreste auf der Stufe von Spermatiden (sda), Spermatozyten (sza) oder Spermatogonien (sga) entwickeln, oder ein vollständiges Fehlen von Keimzellen (Sertoli-Cell-Only Syndrom, SCO). Bei einem „leeren“ Tubulus spricht man von Tubulusschatten (ts) (Abb. 5). Darüber hinaus können verschiedene Differenzierungsstörungen wie z.B. mehrkernige Spermatiden auftreten.

3.4. Bewertung der Spermatogenese

Die histologische Bewertung der Hodenbiopsien erfolgt semi-quantitativ mittels *score count* Analyse nach Johnsen (1970) oder Bergmann und Kliesch (2010). Bei der Bewertung nach Johnsen wird jedem Spermatogenesebild ein bestimmter Zahlenwert zugeordnet, der *score count* ergibt sich schließlich durch die Berechnung des arithmetischen Mittelwertes. Bei der Bewertung nach Bergmann und Kliesch dagegen ergibt sich der *score count* aus der Anzahl an Hodenkanälchen, die reife Spermien enthalten. Demnach gibt er wieder, wie viele spermatogenetisch aktive

Tubuli es in der Hodenbiopsie gibt und wie gut die Chancen bei einer TESE sind, Spermien zu finden. Ein *score count*, der nach Johnsen berechnet wurde, gibt nur das durchschnittliche histologische Bild der Hodenbiopsie wieder, nicht aber die Anzahl von Tubuli, die eventuell noch befruchtungsfähige Spermien enthalten, die mittels TESE für eine nachfolgende ICSI- Behandlung gewonnen werden können.

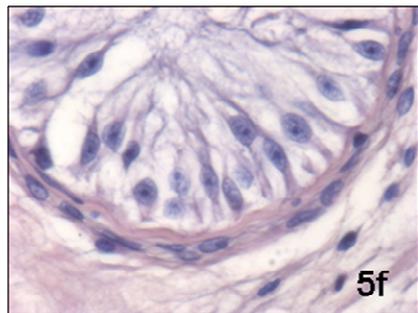
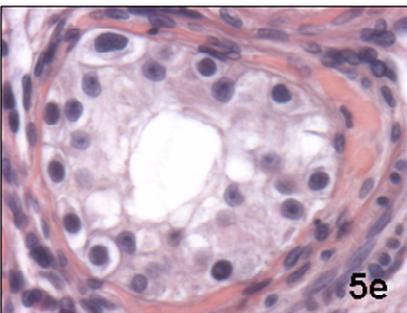
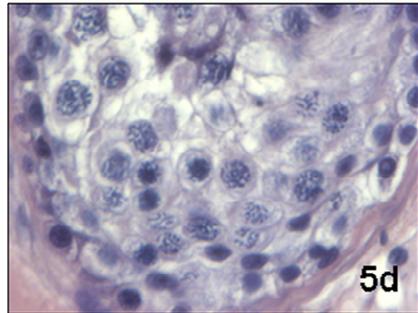
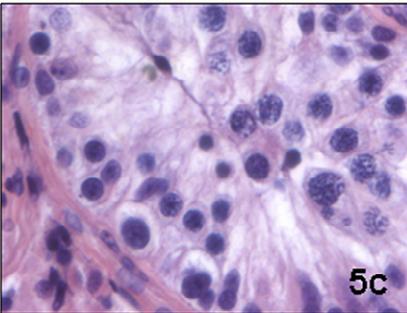
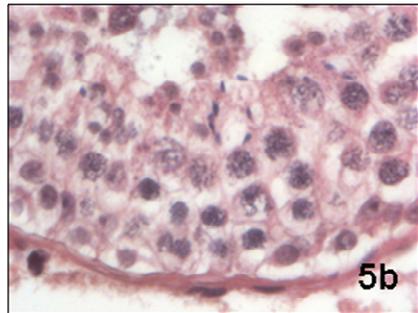
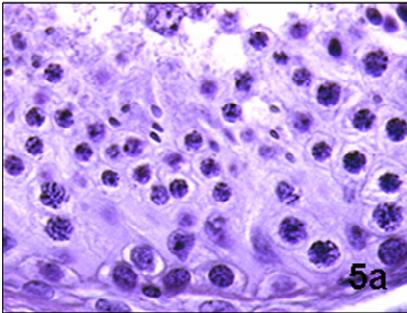


Abb. 5 Histologische Beispiele für eine normale und eine gestörte Spermatogenese (Paraffinschnitte, HE, Primärvergrößerung x40)

- a normale Spermatogenese (nsp)
- b quantitativ gestörte Spermatogenese, Hypospermatogenese (hyp)
- c Spermatidenarrest (sda)
- d Spermatozytenarrest (sza)
- e Spermatogonienarrest (sga)
- f Sertoli Cell Only Syndrom (SCO)

4. Aufbau und Funktion des Androgenrezeptors (AR)

Der AR ist ein liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor und gehört zur Superfamilie der Steroidhormonrezeptoren (Gelman 2002, Claessens et al. 2005). Er liegt auf dem langen Arm des X-Chromosoms (Xq11-12) und der *open reading frame* umfasst 2763 Basenpaare (bp, GenBank Accession Number NM_000044.2). Der AR besteht aus acht Exonen von unterschiedlicher Länge (Abb. 6).

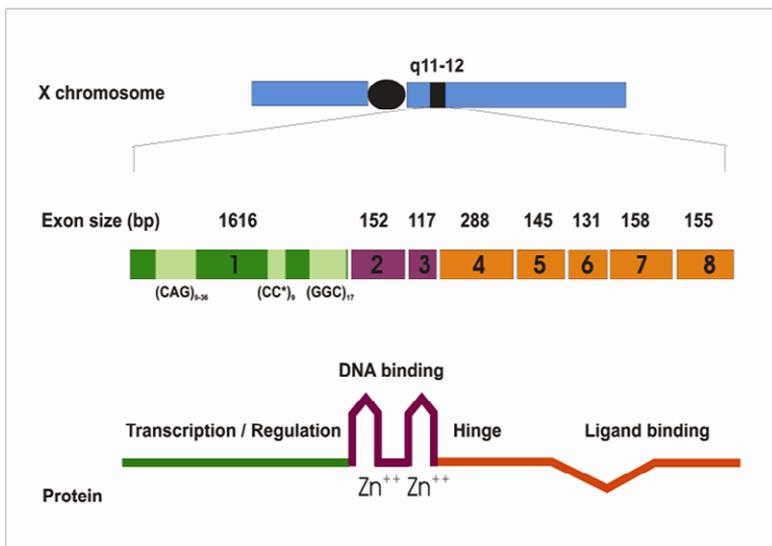


Abb. 6 Aufbau des humanen AR (modifiziert nach Gelmann 2002)

Innerhalb von Exon 1 befindet sich eine polymorphe Trinukleotidsequenz, das CAG-Repeat (Cytosin – Adenosin – Guanin). Die physiologische Länge des CAG-Repeats liegt bei neun bis 36 (Andrew et al. 1997) bzw. 11 bis 31 Repeats (La Spada et al. 1991) mit einer mittleren Repeatlänge von 21 ± 2 Repeats (Quigley et al. 1995). Das Basentriplett CAG codiert für die Aminosäure Glutamin und liegt am Beginn der Transaktivierungsdomäne des AR (Beginn: Base 172 der CDS). Exon 2 und Exon 3 bilden die *DNA binding domain* (DBD) mit zwei Zinkfingermotiven und die Exone 4 bis 8 bilden die *ligand binding domain* (LBD).

Exprimiert wird der AR in fast allen Geweben des Körpers bis auf die Milz (Gelman 2002). Im Hoden wird der AR in Sertolizellen, Leydigzellen, peritubulären Myoidzellen, glatten Muskelzellen sowie in Endothelzellen (Bergh und Damber 1992) exprimiert, aber nicht in Keimzellen. Einige Arbeitsgruppen haben zwar immunhistochemisch den AR in Keimzellen nachgewiesen, z.B. Lubahn et al. (1989) und Kimura et al. (1993). Generell geht man allerdings davon aus, dass die AR-Expression in Keimzellen höchstens stadienspezifisch ist (Übersicht bei Walker 2009).

Den 2763 Basenpaaren entsprechen 919 Aminosäuren (AS), aus denen das AR-Protein aufgebaut ist. Die Transaktivierungsdomäne erstreckt sich von AS 1-537, die DNA-bindende Domäne von AS 538-625 und die hinge-Region und die Ligandenbindende Domäne von AS 626-919 (Gelman, 2002). Ebenso wie bei anderen Steroidhormonrezeptoren, z.B. dem Estrogen-, Progesteron- und Glucocorticoidrezeptor, unterscheidet man auch beim AR verschiedene Transaktivierungsfunktionen (TAFs) oder *activation functions* (AF). Bei den meisten Steroidhormonrezeptoren ist die in der LBD lokalisierte AF-2 hauptsächlich für die Transaktivierungsfunktion verantwortlich. Beim AR dagegen ist die AF-2 von eher untergeordneter Bedeutung, dagegen spielt die AF-1 in der N-terminalen Domäne

eine größere Rolle für die Transaktivierungsfunktion des AR und ist somit hauptverantwortlich für die Rolle des AR als Transkriptionsfaktor. Die AF-1 befindet sich im Bereich der AS 1 bis 485 mit einer Kernregion im Bereich der AS 101 bis 370 des AR-Proteins, und liegt damit also im Bereich des CAG-Repeats (AS 58-89). Sie ist liganden-abhängig, d.h. sie wird nur aktiviert, wenn ein Ligand an den AR gebunden hat. Eine weitere *activation function*, die AF-5, befindet sich in der Transaktivierungsdomäne des AR im Bereich von AS 360 bis 528 mit einem Kernbereich von AS 360 bis 485. Die AF-5 ist im Gegensatz zu der AF-1 liganden-unabhängig, d.h. sie ist in der Lage bei einem AR-Molekül ohne LBD (konstitutiver AR) die Transaktivierungsfunktion aufrecht zu erhalten. Sie wird bei dem normalen AR von der LBD gehemmt, unabhängig ob diese einen Liganden gebunden hat oder nicht. Die AF-2 in der LBD selbst ist wiederum liganden-abhängig (Brinkmann et al. 1999, Übersicht bei McEwan 2004 und Sadar 2011). Die Funktion des AR als Transkriptionsfaktor wird durch die koordinierte Aktivierung der beiden TAFs und einer Rekrutierung von Co-Faktoren erreicht. So bindet zum Beispiel der Transkriptionsfaktor p160 an die N-terminale Domäne des AR und verstärkt die Aktivität der AF-1 (Irvine et al. 2000). Deswegen wurde auch vermutet, dass eine Verlängerung des CAG-Repeats zu einer gestörten Interaktion zwischen Co-Faktoren und TAF und somit zu einer Androgeninsensitivität führen kann (Wallerand et al. 2001).

Der nicht von Testosteron aktivierte AR liegt in den Zellen an *heat shock proteins* (hsp) gebunden zytoplasmatisch vor. Nachdem der Ligand Testosteron (T) oder Dehydrotestosteron (DHT) in die Zelle aufgenommen wurde, kommt es zu einer Konformationsänderung, die eine Abspaltung von den hsp's zur Folge hat. Nach der Bindung des Liganden an den Rezeptor und einer Dimerisierung (Homodimer) gelangt der Rezeptor-Hormon-Komplex in den Zellkern und bindet mit der DBD und

der *hinge*-Region an spezifische DNA-Sequenzen (Abb. 7). Im Zellkern fungiert der AR als Transkriptionsfaktor, an den sich Co-Aktivatoren und/oder Co-Repressoren anlagern können (Übersicht bei Bennett et al. 2010). Ein wichtiger Co-Aktivator ist p160 (Irvine et al. 2000), der die Expression von AR-Zielgenen aktiviert (Lee und Chang 2003). Es wird vermutet, dass der AR auch ohne Bindung des Liganden im Zellkern die Genexpression aktivieren kann (Gelman 2002). Wang et al. (2006) haben gezeigt, dass der AR in den Sertolizellen essentiell wichtig für die Reifung der Sertolizellen und die Ausprägung der Blut-Hoden-Schranke, sowie für die Initiation und Erhaltung einer quantitativ und qualitativ normalen Spermatogenese ist. Damit die Sertolizellen ihre „Tätigkeit“ als Ammenzellen für die Keimzellen, die den AR selbst nicht exprimieren, erfüllen können, müssen sie die Androgenwirkung auf die Keimzellen übertragen. Zu den Sertolizell-spezifischen Genen, die ein Zielgen des AR sind, gehört auch das *androgen binding protein* (ABP) (Übersicht bei Dohle et al. 2003).

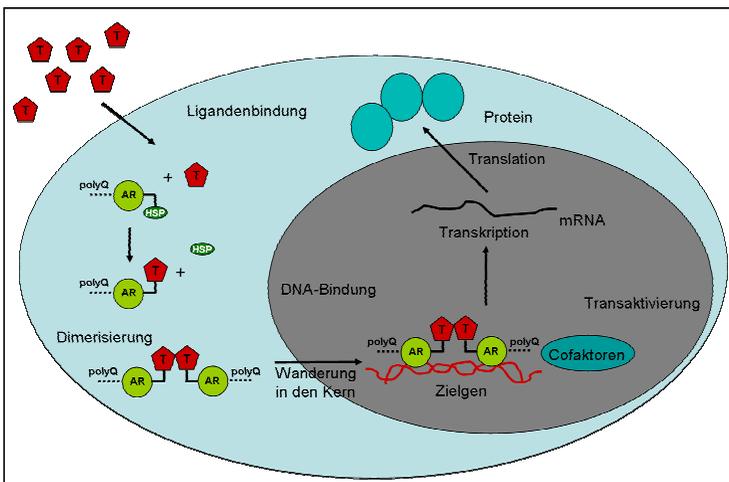


Abb. 7 Funktionsweise des AR

5. Bedeutung des CAG-Repeats

Trinukleotiderkrankungen, die auf einer massiven Verlängerung eines Basentriplets beruhen, sind schon lange bekannt. So kommt es beim Fragile X Syndrome (de Vries et al. 1998) zu einer Verlängerung des CGG-Repeats auf eine Zahl von 43 bis 200 Repeats, bei der Huntington Disease (Gusella und MacDonald 1995b) verlängert sich das CAG-Repeat auf über 36 Repeats und bei spino-bulbärer Muskelatrophie (SBMA) (La Spada et al. 1991) auf über 40 CAG-Repeats.

Erstmalig beschrieben wurde die spino-bulbäre Muskelatrophie 1968 von Kennedy et al. (1968). Die Symptome dieser Erkrankung sind neben Muskelschwund, mangelndem Muskeltonus und geistiger Retardation auch Hodendystrophie und Unfruchtbarkeit. Erst 1991 konnten La Spada et al. zeigen, dass der Gendefekt auf Exon 1 des AR liegt und mit einer Verlängerung des CAG-Repeats einhergeht. Dies erklärte auch den Einfluss auf die AR-Funktion und somit die Fertilitätsstörungen bei SBMA-Patienten. Die Verlängerung des CAG-Repeats rückte in den Fokus als Ursache für männliche Infertilität. Tatsache ist allerdings, dass die SBMA mit einer massiven Verlängerung der Trinukleotidsequenz auf über 40 Repeats einhergeht und es stand in Frage, ob auch geringgradig verlängerte (oder verkürzte) CAG-Repeats fertilitätsbeeinflussend sein können. Daraufhin wurde in vielen Studien das CAG-Repeats aus dem Blut fertiler und infertiler Patienten bestimmt, unter anderen von Dowsing et al. (1999), Dadze et al. (2000), Mifsud et al. (2001), von Eckardstein et al. (2001), Rajpert-De Meyts et al. (2002) und Casella et al. (2003). Dabei herrscht aber wenig Einigkeit, ab welcher CAG-Anzahl von einem erhöhten Infertilitätsrisiko gesprochen werden kann, Mifsud et al. (2001) zum Beispiel setzen die Grenze bei 26 Repeats und sprechen ab diesem Wert von einem siebenfach erhöhten Risiko für das Vorliegen einer Azoospermie. In einer Meta-Analyse haben Davis-Dao et al.

(2007) 33 Studien zusammengefasst und eine geringgradig positive Korrelation zwischen verlängerten CAG-Repeats und männlicher Infertilität feststellen können.

Da das CAG-Repeat in der Transaktivierungsdomäne liegt, wird vermutet, dass die Verlängerung der Trinukleotidsequenz die Transaktivierungsaktivität des AR beeinflusst und somit zu einer verschlechterten Expression seiner Zielgene führt (Tut et al. 1997). Hose et al. (2009) zeigten, dass bereits der Austausch einer Base im CAG-Repeat zu einem Aminosäureaustausch von Glutamin zu Arginin und damit zu einer Veränderung der dreidimensionalen Struktur der Transaktivierungsdomäne führen kann. Es kommt sowohl zu einer Verlängerung von 34Å auf 43Å als auch zu einer Verkleinerung des Durchmessers der α -Helix von 16Å auf 15Å. Demnach kann man sich vorstellen, dass eine Verlängerung der Repeatsequenz um ein Basentriplett die dreidimensionale Struktur und damit die Transaktivierungsfunktion beeinflussen kann. Eine verminderte Aktivität des AR kann zum Androgeninsensitivitätssyndrom (AIS) führen. Bei AIS unterscheidet man verschiedene Ausprägungen, zum einen das *complete* AIS (CAIS) mit weiblichem Genital, Ausbildung einer weiblichen Brust, weiblicher Fettverteilung und fehlender Schambehaarung und zum anderen verschiedene Abstufungen von *partial* AIS (PAIS), welche zum Teil auch mit Infertilität einhergehen können (Rajender et al. 2007). Zitzmann et al. (2009) untersuchten ebenfalls die Auswirkungen der CAG-Repeatlänge auf die Fertilität des Mannes und gehen davon aus, dass durch unterschiedlich lange CAG-Repeats auch beim eigentlich fertilen Mann die Androgensensitivität beeinflusst werden kann. Huhtaniemi et al. (2009) sind in ihrer Hypothese allerdings noch weiter gegangen. Sie machen nicht nur die verlängerten Trinukleotidsequenzen auf dem AR für die Symptome des AIS verantwortlich, sondern auch die erhöhten Östrogenwerte, die sie bei Patienten mit verlängertem CAG-Repeat messen konnten. Um die verminderte Transaktivierungsaktivität des AR auszugleichen, seien die Testosteronwerte erhöht -

und in gleichem Maße die Östrogenwerte, da das Testosteron/Östrogen-Verhältnis immer gleich bleibe. Die typischen Symptome der AIS wie z.B. Gynäkomastie seien demnach eher auf die erhöhten Östrogenwerte als auf mangelnde Testosteronwirkung zurückzuführen. Gelmann (2002) hat in einem Review über die molekulare Funktion des AR die N-terminale Region, in der das CAG-Repeat liegt, als die am wenigsten evolutionär konservierte Region beschrieben und darin Auswirkungen auf Verhalten und Funktion des Rezeptors vermutet. Tatsächlich sei aber nicht das komplette N-terminale Ende verantwortlich für die Transaktivierungsaktivität des AR, sondern vor allem der Bereich um die Basenpaare 210 bis 334. Betrachtet man nun die Gensequenz des AR (GenBank Accession No. NM_000044.2), befindet sich in dieser Region das CAG-Repeat. Tut et al. (1997) haben dem Androgenrezeptor mit einem verlängerten CAG-Repeat eine verminderte Transaktivierungsfunktion beigemessen, ebenso Irvine et al. (2000), die bei einer Verlängerung der repetitiven Sequenz eine verminderte Bindung des Co-Aktivators p160 feststellen konnten. Schiffer et al. (2008) untersuchten den Einfluss eines massiv verlängerten CAG-Repeats (CAG₃₀₆) mit Hilfe artifizieller Plasmide, mit denen Hefezellen transfiziert wurden. Für die beobachtete Wachstumshemmung der Hefezellen und die verminderte Transaktivierungsfunktion des AR machten sie aber nicht nur ein verlängertes CAG-Repeat verantwortlich, sondern auch lösliche Rezeptorfragmente. Diese „AR-Bruchstücke“ seien in der Lage, den physiologischen AR zu binden und so zu inaktivieren.

Trotz dieser molekularbiologischen Analyse ist immer noch nicht ausreichend bekannt, warum die Trinukleotidexpansionen zu so schwerwiegenden Erkrankungen führen können. Sicher ist, dass die Bildung von DNA-Sekundärstrukturen durch starke Baseninteraktion, vor allem durch die drei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen Guanin und Cytosin, zu Fehlern in der Replikation der DNA und

bei der Genexpression führen kann. Eine Beeinflussung der Replikation in Bakterien, die mit unterschiedlichen Trinukleotiden transfiziert wurden (Bowater et al. 1996, Chastain und Sinden 1998, Pearson und Sinden 1998), sowie eine Verlängerung oder Verkürzung der Repeats im Zellzyklus (Samadashwily et al. 1997) ist schon länger bekannt. Die genauen Mechanismen sind bis heute noch unklar, vermutet wird allerdings ein „Gleiten“ der Polymerase auf dem DNA-Strang, da die Trinukleotidsequenzen zur Bildung von *hairpins* oder *loops* führen können (Bowater et al. 1996, Shimizu et al. 1996, Moe et al. 2008). Samadashwily et al. (1997) haben vermutet, dass das Replikationsverhalten in Bakterien auch auf tierische Zellen übertragen werden könne. Eine Verlängerung des CAG-Repeats im AR des Menschen könnte demnach auch auf einen Polymerasefehler zurückgeführt werden. Die Schwierigkeiten bei der Replikation können auch zu Mutationen führen, denn Lesefehler der Polymerase können zu einem Basenaustausch führen. In der Tat sind mehr als 200 Mutationen des AR bekannt. Allerdings liegen nur 23 davon auf Exon 1 (Gottlieb et al. 1999). Mutationen führen zu einer verminderten Aktivität des AR und damit zu Androgeninsensitivität (Quigley et al. 1995, Wang et al. 1998, Davis-Dao et al. 2007).

Interessant ist auch die Tatsache, dass es bei Trinukleotiderkrankungen zu somatischen Mosaiken kommen kann. Bekannt ist dies z.B. bei der SBMA (Ito et al. 1998, Tanaka et al. 1999b) und auch beim Fragile X Syndrom (Taylor et al. 1999). Es stellt sich also die Frage, ob es nicht generell bei Repeatstrukturen zu Schwierigkeiten bei der Replikation und damit zu unterschiedlichen Genkopien in verschiedenen Zellen kommen kann und damit nicht auch Mosaik des CAG-Repeats möglich sind. Somatische Mosaik im Hoden sind bereits bekannt. Tanaka et al. (1999b) konnten im Hodengewebe von SBMA-Patienten unterschiedliche DNA-Moleküle mit verschiedenen langen CAG-Repeats zeigen. Ein somatisches Mosaik im

Rezeptor-Gen des Fibroblastenwachstumsfaktors (FGF-R3) (G1138A) in Hodenbiopsien von Männern mit Achondroplasie konnte von Dakouane-Giudicelli et al. (2008) nachgewiesen werden. Bettencourt et al. (2010) konnten zeigen, dass im Fall der Machado-Joseph Disease im CAG_n des ATXN3-Gens unterschiedliche Repeatanzahlen in DNA und cDNA eines Patienten vorliegen können. Im Mittel enthielt die cDNA in ihren Untersuchungen ein CAG Repeat mehr als die dazugehörige DNA.

Doch auch in anderen Organen, wie zum Beispiel der Prostata, konnte ein somatisches Mosaik des AR-CAG nachgewiesen werden. Alvarado et al. (2005) haben das CAG-Repeat des AR bei Patienten mit Prostatakarzinomen mit Hilfe von laserassistierter Mikrodissektion untersucht. Dabei wurden „gesunde“ und „kranke“ Bereiche des Prostatagewebes getrennt voneinander gewonnen und auf die CAG-Repeatlänge untersucht. Bei allen untersuchten Proben (n = 72) konnte eine Gewebheterogenität von bis zu 11 Repeats festgestellt werden. Alvarado et al. postulierten, dass das Auftreten des somatischen Mosaiks als wichtiges genetisches Ereignis vor allem in präkanzerogenem Gewebe gewertet werden könne.

G. Material und Methoden

1. Probenumfang

Untersucht wurden 34 Hodenbiopsien von 33 Patienten aus der Biopsiebank des Instituts für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der JLU Gießen. Die Patienten wurden im Universitätsklinikum Münster (Centrum für Reproduktionsmedizin, UKM Münster) oder im Zentrum für Chirurgie, Anästhesiologie und Urologie der JLU Gießen wegen normo- oder hypergonadotroper Azoospermie und wegen obstruktiver Azoospermie nach Vasektomie (Übersicht bei Bergmann und Kliesch 2010) vorstellig. Nach schriftlicher Einverständniserklärung wurde die Hodenbiopsie in Allgemeinanästhesie durchgeführt. Die vorliegende Studie wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Justus-Liebig-Universität Gießen (Entscheidung 75/00 und 56/05) genehmigt. In Blutproben von 17 Patienten wurde im Center für Reproduktionsmedizin das CAG-Repeat in der Lymphozyten-DNA bestimmt. Bei 16 Patienten konnte das CAG-Repeat nur im Hodengewebe bestimmt werden. Bei 29 von 33 Patienten wurden die Testosteron- und LH-Werte im peripheren Blut bestimmt.

2. Probengewinnung

2.1. Fixierung in Bouin'scher Lösung

Nach der Entnahme der Hodenbiopsien von drei Bereichen des Hodens wurde eine der Biopsien in Bouin'scher Fixierlösung für 24 Stunden in Dunkelheit fixiert. Nach der Fixierung wurde das Gewebe mit 70%igem Alkohol gespült und dann mit Hilfe des Einbitters EG 1160 (Leica) in Paraffin eingebettet.

2.2. Gewinnung von Kryoproben

Eine weitere Biopsie wurde nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert.

2.3. Herstellung histologischer Schnitte

2.3.1. Paraffinschnitte

Mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms (Modell SM2000R von Fa. Leica) wurden 5µm dicke Paraffinschnitte hergestellt, in einem 50°C warmen Wasserbad gestreckt und dann auf APES beschichtete Objektträger aufgezogen. Über Nacht wurden die Objektträger bei 37°C getrocknet und bis zur Weiterverarbeitung bei Raumtemperatur gelagert.

2.3.2. Gefrierschnitte

Mit Hilfe eines Gefriermikrotoms (Modell FrigoCut 2800 von Fa. Reichert-Jung) wurden 9µm dicke Gefrierschnitte hergestellt und auf APES beschichtete Objektträger aufgebracht.

3. Histologische Untersuchung der Proben

3.1. Färbung mit Hämatoxylin und Eosin nach Mayer

Nach der Trocknung der Objektträger wurden diese zur Beurteilung des Spermatogenesestatus mit den Farbstoffen Hämalaun und Eosin-G gefärbt. Dabei wurde das Protokoll nach Mayer befolgt. Bei dieser Färbung erscheinen basophile Strukturen (Zellkerne) blau-violett und eosinophile Strukturen (Zytoplasma, interstitielles Gewebe) rosa. Das Färbeprotokoll lautete wie folgt:

- a) Rehydrierung der Hodenschnitte in einer absteigenden Alkoholreihe mit vergälltem Alkohol (Roth)
 - a. Schwenken in Xylol für 3 x 10 min
 - b. Schwenken in 100% Alkohol für 5 min
 - c. Schwenken in 96% Alkohol für 5 min
 - d. Schwenken in 80% Alkohol für 5 min
 - e. Schwenken in 70% Alkohol für 5 min
 - f. Schwenken in 60% Alkohol für 5 min
 - g. Schwenken in 50% Alkohol für 5 min
 - h. Schwenken in Aqua dest. für 5 min

- b) Färbung der Hodenschnitte
 - a. Schwenken in gefiltertem Hämalan (sauer) nach Mayer für 1 min
 - b. Spülen in fließendem Leitungswasser (Bläuen) für 10 min
 - c. Schwenken in gefiltertem Eosin-G 0,5% wässrig für 5 min
 - d. Kurzes Spülen in Leitungswasser

- c) Dehydrieren der Hodenschnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit vergälltem Alkohol
 - a. Kurzes Spülen in 80% Alkohol
 - b. Kurzes Spülen in 96% Alkohol
 - c. Schwenken in 100% Alkohol für 2 x 2 min
 - d. Schwenken in Xylol für 3 x 10 min

- d) Eindeckeln der Hodenschnitte mit Vitro-Clud® (Langenbrinck)

3.2. Schnellfärbung von Gefrierschnitten

Nach dem Anfertigen der Kryoschnitte und kurzem Trocknen an der Luft wurde 1:1 mit Aqua dest. verdünntes Hämalaun nach Mayer direkt auf den Schnitt aufgetropft. Nach ca. 30 sec wurde das Hämalaun mit Leitungswasser abgespült und der Schnitt unter dem Mikroskop bewertet.

4. Molekularbiologische Untersuchung

4.1. Untersuchung von Hodenhomogenat

4.1.1. Gewinnung der Proben

Zur Untersuchung von Hodenhomogenat wurde mit Bouin'scher Lösung fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe verwendet. Für die spätere DNA- und mRNA-Extraktion wurde das Mikrotom mit RNase Away (Molecular BioProducts) gesäubert und das Paraffinblöckchen soweit mit einer sterilen Einmalklinge angeschnitten, damit eine saubere Schnittfläche vorlag. Danach wurden je nach Größe der Hodenbiopsie zehn bis zwanzig 5µm dicke Paraffinschnitte angefertigt und mit einer sterilen Pinzette in ein steriles 2ml Probengefäß mit Schraubdeckel und Deckeldichtung überführt.

4.1.2. Extraktion von DNA und RNA

4.1.2.1. DNA-Extraktion mit dem QIAamp DNA FFPE Tissue Kit

Nach dem Anfertigen der Paraffinschnitte wurde das Paraffin mittels Xylol p.a. (Roth) von den Schnitten ausgelöst und überschüssiges Xylol in einem darauf folgenden Waschschritt mit 100% Ethanol p.a. (Roth) entfernt. Danach wurde das Gewebe durch eine Inkubation mit Proteinase K und Lyse-Puffer aus dem QIAamp DNA FFPE (formalin fixed paraffin embedded) Tissue Kit (Qiagen) über Nacht bei 56°C in einem Wasserbad verdaut. Durch das darauf folgende Erhitzen auf 90°C für 15 min wurden

die Formalinverlinkungen entfernt und die Proteinase inaktiviert. Daraufhin wurde die DNA an die Silikonmembran der mitgelieferten Säulen gebunden und gewaschen, wonach Kontaminanten durch die Membran zentrifugiert und dann verworfen wurden. Nach dem letzten Waschschrift wurde die gebundene DNA wieder in Lösung gebracht und in einem letzten Zentrifugationsschritt gewonnen. Das genaue Protokoll kann dem Handbuch des QIAamp DNA FFPE Tissue Kits entnommen werden. Die Konzentration der gewonnenen DNA wurde mit einem BioPhotometer (Eppendorf) gemessen und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

4.1.2.2. RNA-Extraktion mit dem RNeasy FFPE Kit

Nach dem Anfertigen der Paraffinschnitte wurde das Paraffin mittels Xylol p.a. (Roth) von den Schnitten ausgelöst und überschüssiges Xylol in einem darauf folgenden Waschschrift mit 100% Ethanol p.a. (Roth) entfernt. Danach wurde das Gewebe durch eine Inkubation mit Proteinase K und Lyse-Puffer aus dem RNeasy FFPE Kit (Qiagen) über Nacht (max. 18 Stunden, damit ein Verdau der mRNA vermieden werden kann, mindestens jedoch für drei Stunden) bei 55°C im Wasserbad verdaut. Durch das Erhitzen der Probe auf 80°C für 15 min wurden die Formalinverlinkungen zerstört und die Proteinase inaktiviert. Die RNA wurde daraufhin an die Silikonmembran der mitgelieferten Säulen gebunden und gewaschen. Kontaminanten wurden durch die Membran zentrifugiert und dann verworfen. Nach dem Waschen wurde die gebundene RNA in Lösung gebracht und in einem letzten Schritt zentrifugiert. Die gewonnene RNA wurde mit einem BioPhotometer (Eppendorf) gemessen und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

4.2. Laser-assisted cell picking (LACP)

Die Technik des LACP ermöglicht die isolierte molekularbiologische Untersuchung verschiedener Zellpopulationen aus einem Gewebe (Espina et al. 2007). Mit Hilfe eines Zeiss PALM MicroBeam und der dazugehörigen Software PALM Robo (Zeiss AG) ist es möglich, bestimmte Areale eines histologischen Präparates zu markieren, mit Hilfe eines Kaltlasers herauszuschneiden und mittels LMPC- (laser microdissection and pressure catapulting) Technik in einem Probengefäß aufzufangen. Dafür benötigt man spezielle, mit einer Folie beschichtete Objektträger (MembranSlide 1.0 PEN, Zeiss), auf die das Objekt aufgebracht wird. Der Laserstrahl verschmilzt Objekt und Folie miteinander, das Gewebestück auf der Folie wird dann aus dem Verbund herauskatapultiert und in einem speziellen Tube (MicroTube 500, Zeiss) in einem Mineralöl-Tropfen aufgefangen. Durch dieses berührungslose Präparieren kann eine hohe Reinheit der Gewebeprobe gewährleistet werden.

4.2.1. Herstellung der Präparate

Vor dem Schneiden der Paraffin- oder Kryopräparate wurden die PALM-Objektträger für 30 min mit UV-Licht bestrahlt um eine bessere Anhaftung des Gewebes zu gewährleisten.

Für die Paraffinpräparate wurde das Mikrotom mit 70%igem Alkohol gereinigt und das Paraffinblöckchen soweit mit einer sterilen Einmalklinge angeschnitten, dass eine saubere Schnittfläche vorlag. Danach wurden 5µm dicke Paraffinschnitte hergestellt und in ein 50°C warmes und ebenfalls gereinigtes Wasserbad mit sterilem Aqua bidest. gegeben. Nach maximal zwei Minuten, wenn sich die Schnitte gestreckt hatten, wurden diese auf die PALM-Objektträger aufgezogen. Die Objektträger wurden über Nacht bei 56°C im Wärmeschrank getrocknet und dann in einer luftdicht verpackten sterilen Küvette gelagert. Vor dem LACP wurden die Paraffinschnitte

entparaffiniert und mit Hämalaun nach Mayer leicht angefärbt. Dabei wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

- a) Entparaffinieren durch absteigende Alkoholreihe mit Xylol und Ethanol p.a.
(Roth)
 - a. Auftropfen von Xylol, reinst für 2 x 2 min
 - b. Auftropfen von 100% Alkohol p.a. für 1 min
 - c. Auftropfen von 96% Alkohol p.a. für 1 min
 - d. Auftropfen von 70% Alkohol p.a. für 1 min
 - e. Auftropfen von autoklaviertem DEPC- Wasser für 1 min

- b) Färben des Hodenschnittes
 - a. Auftropfen von sterilfiltriertem Hämalaun für ca. 30-45 sec
 - b. Abspülen des Hämalauns mit autoklaviertem DEPC-Wasser und Wässern für 30 sec

- c) Dehydrierung der Hodenschnitte durch aufsteigende Alkoholreihe mit Ethanol p.a. für jeweils 10 sec
 - a. Auftropfen von 70% Alkohol p.a.
 - b. Auftropfen von 96% Alkohol p.a.
 - c. Auftropfen von 100% Alkohol p.a.

Danach wurden die Objektträger in einer sterilen Glasküvette transportiert.

Für die Kryopräparate wurden von den bei -80°C gelagerten Proben 9µm dicke Schnitte angefertigt und auf die PALM-Objektträger aufgezogen, welche sofort bei

-80°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren wurden. Vor dem LACP wurden die Schnitte aufgetaut und mit Hämalaun nach Mayer leicht angefärbt. Dabei wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

- a) Auftauen des Schnittes bei Raumtemperatur für 10 min bzw. bis der Schnitt trocken erscheint.

- b) Färben des Hodenschnittes
 - a. Auftropfen von sterilfiltriertem Hämalaun für ca. 30-45 sec
 - b. Abspülen des Hämalaun mit autoklaviertem DEPC-Wasser und Wässern mit DEPC-Wasser für 30 sec

- c) Dehydrierung der Hodenschnitte mit Ethanol p.a. (Roth)
 - a. Auftropfen von 70% Alkohol p.a. für 10 sec
 - b. Auftropfen von 96% Alkohol p.a. für 10 sec
 - c. Auftropfen von 100% Alkohol p.a. für 10 sec

4.2.2. Durchführung des LACP

Zuerst wurde unter Sichtkontrolle die Morphologie des Gewebes bewertet. Mit der dazugehörigen Software wurden die Areale von Interesse markiert, mittels eines Laserstrahls mit der Folie verschmolzen, ausgeschnitten und in den Deckel eines Probengefäßes geschleudert (Abb. 8). Einzelne Tubulusanschnitte und Interstitiumsbereiche konnten so getrennt voneinander gewonnen werden. Bei Vorliegen von mehreren Histologien in einem Schnitt wurden diese auch getrennt voneinander gewonnen, kryokonserviert und weiterverarbeitet. Der Deckel des Probengefäßes

wurde mit 2,5µl Mineralöl (Sigma) benetzt, um die Anheftung der Gewebstücke zu erleichtern.

Gewonnen wurden immer mindestens 50 Tubulus- und 20 Interstitiumsanschnitte. Nach der Gewinnung wurde das Probengefäß in flüssigem Stickstoff eingefroren und dort bis zur Weiterverarbeitung belassen.

4.2.3. Gewinnung von RNA aus LACP-Material

Proben aus Gefriermaterial wurden direkt nach dem LACP aus dem Stickstoff genommen und auf Eis aufgetaut. Danach wurden 5µl carrierRNA Arbeitslösung (4ng/µl) sowie 345µl RLT-Puffer aus dem RNeasy Micro Kit (Qiagen) zugegeben. Nach dem Vortexen mit dem Deckel nach unten, um die Gewebstücke aus dem Deckel zu entfernen, wurde die Probe bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Am Tag der Weiterverarbeitung wurde der Probe 350µl 70% Alkohol p.a. zum Fällern der RNA zugegeben und die RNA auf die Silikonmembran der mitgelieferten Säulen gegeben, gebunden und gewaschen. Kontaminanten wurden durch die Membran zentrifugiert und dann verworfen. Nach dem Waschen wurde die gebundene RNA in Lösung gebracht und zentrifugiert. Das ausführliche Protokoll kann dem Handbuch des RNeasy Micro Kits entnommen werden. Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde mit einem BioPhotometer gemessen und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

Bei der Verwendung von FFPE-Material wurde das Probengefäß nach der Gewinnung direkt bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Die Weiterverarbeitung fand mit dem RNeasy FFPE Kit (Qiagen) statt (siehe oben).

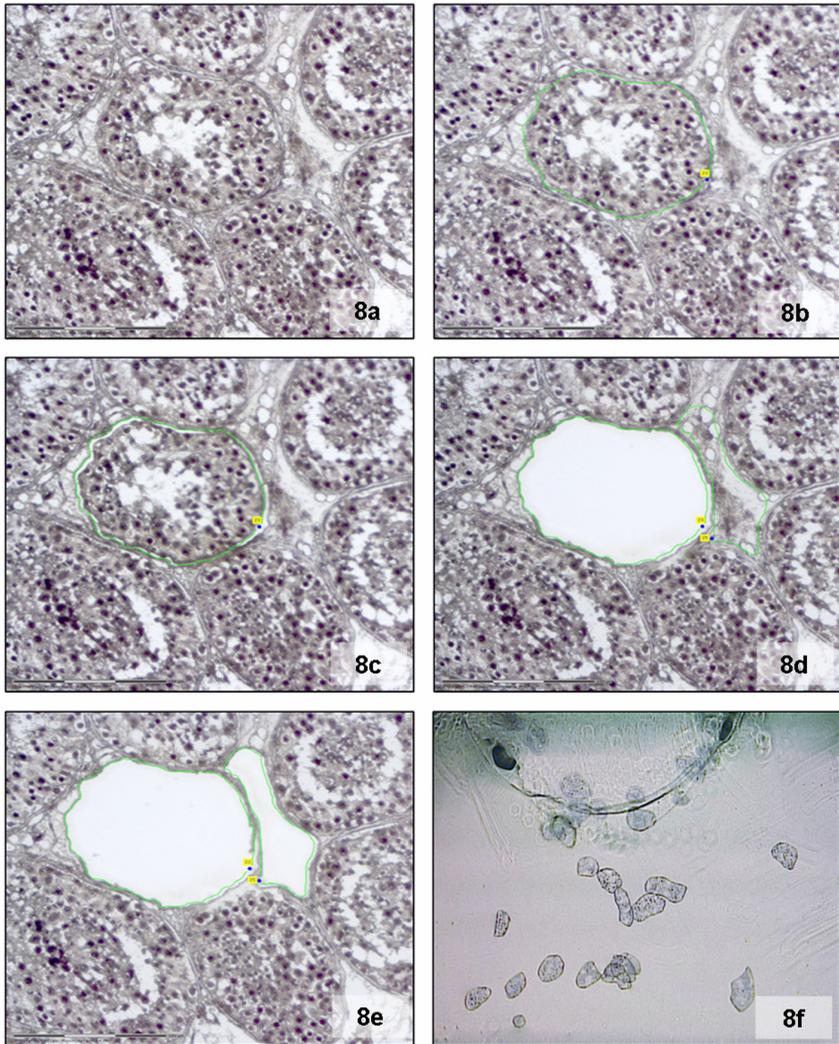


Abb. 8 LACP (Paraffinschnitte, Hämatoxylin, Primärvergrößerung: 8a-e x20, 8f x5)

- a Morphologische Untersuchung des Gewebes
- b Markierung des Keimtubulus (zeigt normale Spermatogenese)
- c Exzision des markierten Gewebes
- d Katapultieren des ausgeschnittenen Gewebes und Markierung des Interstitium-Bereichs
- e Exzision und Katapultieren des Interstitiums
- f Betrachtung der katapultierten Gewebstücke im Deckel des Tubes

4.3. Qualitative Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) handelt es sich um eine Methode zur Vervielfältigung von DNA *in vitro*. Unter Verwendung eines Enzyms, der DNA-abhängigen DNA-Polymerase, und einem Gemisch aus den Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dATP, dUTP, dTTP und dGTP) wird nach Auftrennung des DNA-Doppelstrangs bei hohen Temperaturen und nach Anlagerung der sense- und antisense-Primer (die Temperatur hierbei ist abhängig von der Basenzusammensetzung der Primer) der DNA-Einzelstrang vervielfältigt. Nachdem der Einzelstrang komplett vervielfältigt ist, beginnt der Zyklus erneut, die neu entstandenen DNA-Doppelstränge werden wieder aufgetrennt (Abb. 9).

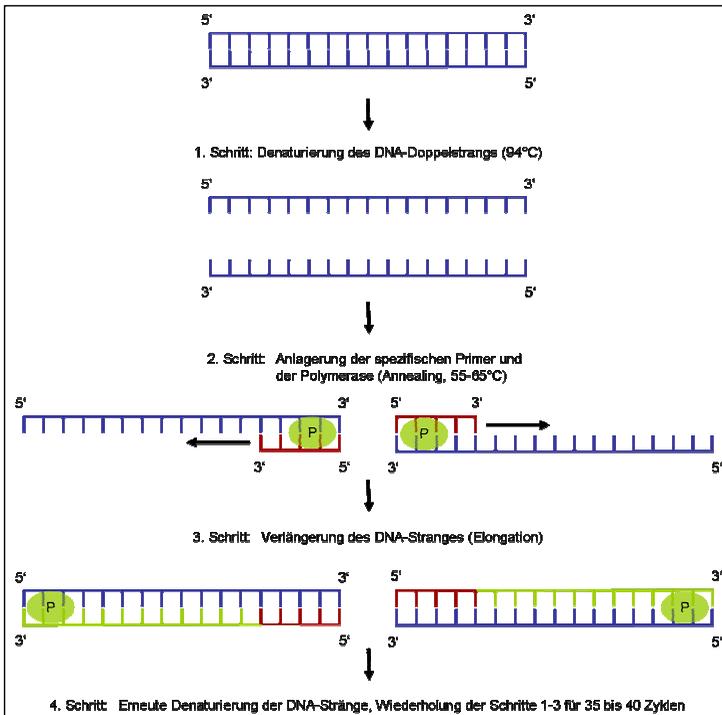


Abb. 9 Funktionsweise der PCR

4.3.1. Durchführung der PCR

Für die Amplifikation der DNA wurde die Taq DNA Polymerase (Qiagen) verwendet. Die beigefügte Q-Solution soll die Genauigkeit der PCR bei Vorliegen einer GC-reichen Region verbessern, da sie das Schmelzverhalten der GC-reichen DNA verändert und so zur Auflösung eventuell vorhandener *hairpin* und/oder *loop*-Strukturen führen soll. So soll verhindert werden, dass die Polymerase Basen auslässt oder vervielfältigt. Die bei der PCR verwendeten Primer zur Detektion des CAG-Repeats und des internen Kontrollgens β -Actin wurden von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert. Die Primersequenz lautet:

Primer	RefSeq	Primersequenz	Produkt
CAG	NM_000044.2	for 5' – AGTGATCCAGAACCCGGGC – 3' rev 5' – TTGGGGAGAACCATCCTCA – 3'	200 bp
β -Actin	NM_001101.3	for 5' – CCTTCCTGGGCATGGAGTCCTG – 3' rev 5' – GGAGCAATGATCTTGATCTTC – 3'	202 bp

Für einen einfachen Versuchsansatz wurde folgender Mastermix angesetzt:

1x Ansatz	Reagenz	Konzentration	Hersteller
5 μ l	10 x Reaktionspuffer	5mM	Qiagen
10 μ l	5 x Q-Solution	10mM	Qiagen
3 μ l	dNTP-Mix	10mM	Applied Biosystems
1 μ l	for Primer	10pM	Eurofins MWG
1 μ l	rev Primer	10pM	Eurofins MWG
0,25 μ l	Taq DNA Polymerase	5U/l	Qiagen
19,75 μ l	steriles Aqua bidest		

Für einen PCR-Ansatz von 50µl wurden 10µl gDNA zu 40µl Mastermix hinzugefügt. Als Positivkontrolle diente die cDNA eines Patienten mit normaler Spermatogenese (PK, Tab. 1). Von diesem Patienten wurden wegen des hohen cDNA-Gehalts nur 2µl cDNA und 8µl steriles Aqua bidest. hinzugefügt. Für die Negativkontrolle (no template control, NTC) wurde dem Mastermix 10µl steriles Aqua bidest. zugegeben. Alle Ansätze wurden gut gemischt und anzentrifugiert. Im T3 Thermocycler (Biometra) wurden die Proben nach folgendem Programm inkubiert:

- | | |
|---------------------|-------------------------------------|
| 1. 95°C für 10 min | Aktivierung der HotStart Polymerase |
| 2. 94°C für 1 min | Auftrennung der DNA-Doppelhelix |
| 3. 58°C für 1 min | Anlagerung der Primer |
| 4. 72°C für 1 min | Amplifikation des DNA-Stranges |
| 5. 72°C für 5 min | endgültige Amplifikation |
| 6. abkühlen auf 4°C | |

Die Schritte 2 bis 4 wurden 45x wiederholt. Die Lagerung der PCR-Produkte fand bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung statt.

4.3.2. Agarosegel-Elektrophorese

Zur Visualisierung des PCR-Produkts wurde ein 2%iges Agarosegel mit dem Farbstoff SYBR Green I (Sigma) verwendet. Dafür wurden 50ml 1xTAE Puffer mit 1g Agarose FineRes (Bioline) in der Mikrowelle aufgekocht, nach Abkühlen auf ca. 60°C mit 5µl SYBR Green I vermischt und in einen Gelträger passend für die Agagel Mini® Kammer (Biometra) gegossen. Pro Tasche wurden 10µl PCR-Produkt mit 2µl Loading Dye vermischt und hineinpipettiert. Der Gelträger wurde in die Kammer mit Laufpuffer eingelassen. Die Auftrennung fand bei 125V für 35 min statt. Nach der

Elektrophorese wurde das Ergebnis mit Hilfe des Transilluminator UVsolo (Biometra) und dazugehöriger UVIdoc (Biometra) dokumentiert. Das restliche PCR-Produkt wurde für weitere Anwendungen wieder bei -20°C eingefroren.

4.4. Qualitative Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR)

Bei der RT-PCR wird statt DNA *copy* DNA (cDNA) in die PCR eingesetzt. Eine Voraussetzung für die RT-PCR ist also die reverse Transkription von extrahierter mRNA in cDNA. Um eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen, wird die mRNA zuvor einer Behandlung mit DNase I unterzogen. Durch die RT-PCR kann ermittelt werden, welche Gene in einer Probe exprimiert werden.

4.4.1. Inkubation mit DNase I

Durch eine Behandlung mit DNase I (recombinant, RNase-free, Roche über Invitrogen) wurde die eventuell in der mRNA noch vorhandene genomische DNA (gDNA) verdaut. Um einen gleichzeitigen Verdau der empfindlicheren mRNA zu verhindern, wurde dem Reaktionsansatz ein RNase Inhibitor zugesetzt. Für einen einfachen Ansatz wurde folgender Mastermix angesetzt:

1x Ansatz	Reagenz	Konzentration	Hersteller
1µl	MgCl ₂	25mM	Applied Biosystems
1µl	10x PCR Gold Buffer	10mM	Applied Biosystems
1µl	DNase I, recombinant	10U/l	Roche
0,25µl	RNase Inhibitor	40U/l	Ambion

Zu 3,25µl des DNase-Mastermixes wurden 6,25µl RNA-Lösung gegeben. Nachdem beides gut gemischt wurde, wurde es nach folgendem Protokoll im Thermocycler inkubiert:

1. 37°C für 25 min Verdau genomischer DNA durch die DNase I
2. 75°C für 10 min Deaktivierung der DNase I
3. abkühlen auf 4°C

Nach der DNase-Behandlung wurde die behandelte mRNA sofort weiter verarbeitet.

4.4.2. Reverse Transkription (RT)

Bei der reversen Transkription wird unter Verwendung der Desoxyribonukleotidtriphosphate dTTP, dATP, dCTP und dGTP mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) aus mRNA cDNA geschrieben. Die Reversen Transkriptasen sind mit viralen RNA-abhängigen DNA-Polymerasen verwandt, zum Beispiel mit der des murinen Leukämievirus' (muLV). Diese Retroviren können mittels des Enzyms ihr Genom, das aus *single strand* RNA (ssRNA) besteht, in cDNA umschreiben und so in das Wirtsgenom integrieren. Qiagen empfiehlt bei einer Verwendung von carrierRNA bei der mRNA-Extraktion Random Hexamer statt Oligo(dT) Primer als Startermoleküle. Es handelt sich dabei um kurze Primerstücke, die aus sechs Basen bestehen und willkürlich zusammengesetzt sind. Diese Primer lagern sich an die mRNA an und bieten der RT den nötigen Startpunkt zur Umschreibung.

Das folgende Protokoll weicht in der Mengenzusammensetzung geringfügig vom Originalprotokoll der Firma Applied Biosystems ab, um bei den geringen mRNA-Mengen nach LACP eine möglichst große Ausbeute an cDNA zu erzielen. Für einen einfachen Ansatz wurde folgender Mastermix angesetzt:

1x Ansatz	Reagenz	Konzentration	Hersteller
2,2µl	MgCl ₂	25mM	Applied Biosystems
1,1µl	10x PCR Gold Buffer	10mM	
4,4µl	dNTP-Mix	10mM	
0,55µl	Random Hexamers	50mM	
0,55µl	RNase Inhibitor	20U/l	
0,55µl	MultiScribe RT	5U/l	

Zu 9,35µl des RT-Mastermixes wurden 1,65µl der behandelten mRNA-Lösung gegeben und vermischt. Nach folgendem Protokoll wurde der Ansatz im Thermocycler inkubiert:

1. 21°C für 8 min Anlagerung der Random Hexamers
2. 42°C für 15 min Umschreibung von mRNA in cDNA durch die RT
3. 99°C für 5 min Inaktivierung der RT
4. 5°C für 5 min Abkühlung
5. abkühlen auf 4°C

Um den Erfolg der DNase-Behandlung zu kontrollieren, wurde bei einem Aliquot der behandelten mRNA-Lösung die RT durch die gleiche Menge steriles Aqua bidest. ersetzt (im Nachfolgenden –RT-Kontrolle genannt). Nach einem korrekten gDNA-Verdau kann bei einer nachfolgenden PCR in der –RT-Kontrolle kein Signal detektiert werden, da weder gDNA noch umgeschriebene cDNA vorhanden sind. Sollte dagegen ein Signal vorhanden sein, bedeutet das eine Kontamination der mRNA mit gDNA. In diesem Fall muss die verbliebene mRNA erneut einer DNase-

Behandlung unterzogen und neu umgeschrieben werden. Bis zur Weiterverarbeitung wurde die cDNA bei -20°C konserviert.

4.4.3. Durchführung der RT-PCR

Für die RT-PCR wurde ebenfalls die Taq DNA Polymerase (Qiagen) verwendet, ebenso die beigefügte Q-Solution zur verbesserten Amplifikation von GC-reichen Regionen. Für die RT-PCR wurden dieselben Primer wie für die PCR verwendet (Primersequenzen siehe oben). Für einen einfachen Ansatz wurde folgender Mastermix angesetzt:

1x Ansatz	Reagenz	Konzentration	Hersteller
5µl	10 x Reaktionspuffer	5mM	Qiagen
10µl	5 x Q-Solution	10mM	Qiagen
1µl	dNTP-Mix	10mM	Applied Biosystems
1µl	for Primer	10pM	Eurofins MWG
1µl	rev Primer	10pM	Eurofins MWG
0,25µl	Taq DNA Polymerase	5U/l	Qiagen
21,75µl	steriles Aqua bidest		

Für einen RT-PCR-Ansatz von 50µl wurden 10µl cDNA zu 40µl Mix hinzugefügt. Als Positivkontrolle wurde cDNA eines Patienten mit normaler Spermatogenese verwendet. Von diesem Patienten wurden nur 2µl cDNA und 8µl steriles Aqua bidest. hinzugefügt. Für die NTC wurde dem Mastermix 10µl steriles Aqua bidest. zugegeben. Alle Reagenzien wurden gut gemischt und anzentrifugiert. Im Thermocycler wurden die Proben nach folgendem Programm inkubiert:

MATERIAL UND METHODEN

- | | |
|---------------------|-------------------------------------|
| 1. 95°C für 10 min | Aktivierung der HotStart Polymerase |
| 2. 94°C für 1 min | Auftrennung der DNA-Doppelhelix |
| 3. 58°C für 1 min | Anlagerung der Primer |
| 4. 72°C für 1 min | Amplifikation des DNA-Stranges |
| 5. 72°C für 5 min | endgültige Amplifikation |
| 6. abkühlen auf 4°C | |

Die Schritte 2 bis 4 wurden 45x wiederholt. Durch die CG-reichen Areale, die amplifiziert werden sollten, wurden auch bei der RT-PCR dem Mastermix dNTPs zugefügt. Es wurde beobachtet, dass die Signale dadurch verstärkt werden konnten. Zur Überprüfung der Reinheit der cDNA bzw. des Erfolgs der DNase-Behandlung, wurde zusätzlich eine RT-PCR mit dem internen Kontrollgen β -Actin („housekeeping gene“, nicht-reguliertes Gen als interne Kontrolle) durchgeführt. Die verwendeten Primer wurden ebenfalls von Eurofins MWG Operon bezogen und in einer Konzentration von 10pM eingesetzt. Für einen RT-PCR-Ansatz von 25 μ l wurden 5 μ l cDNA bzw. 5 μ l der –RT-Kontrolle hinzugefügt. Alle Reagenzien wurden gut gemischt und anzentrifugiert. Im Thermocycler wurden die Proben nach folgendem Programm inkubiert:

- | | |
|---------------------|-------------------------------------|
| 1. 95°C für 10 min | Aktivierung der HotStart Polymerase |
| 2. 94°C für 45 sec | Auftrennung der DNA-Doppelhelix |
| 3. 55°C für 45 sec | Anlagerung der Primer |
| 4. 72°C für 45 sec | Amplifikation des DNA-Stranges |
| 5. 72°C für 2 min | endgültige Amplifikation |
| 6. abkühlen auf 4°C | |

Die Schritte 2 bis 4 wurden 45x wiederholt. Die Lagerung der PCR-Produkte fand bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung statt.

4.4.4. Agarosegel-Elektrophorese

Zur Visualisierung des PCR-Produkts wurde ebenfalls ein 2%iges Agarosegel verwendet und die PCR-Produkte nach dergleichen Methode aufgetrennt (siehe oben).

4.5. Quantitative RT- PCR (RT-qPCR)

Um eine quantitative Aussage über die Expression eines Gens zu machen, wird die Technik der quantitativen RT-PCR (RT-qPCR) oder auch RealTime-PCR angewandt. Hierbei wird der PCR-Reaktion ein Farbstoff zugefügt, der mit der entstandenen doppelsträngigen DNA interkaliert, d.h. sich in die entstandene DNA-Doppelhelix einlagert (Abb. 10). Erst in doppelsträngige DNA eingebunden, kann er durch Licht angeregt, Fluoreszenzsignale aussenden. Je mehr doppelsträngige DNA entsteht, desto mehr Farbstoff kann sich einlagern und desto mehr Signal kann vom Reader aufgenommen werden. Dieser Anstieg der Fluoreszenz wird in Echtzeit (*real time*) angezeigt und gibt Hinweis auf die Menge der eingesetzten Kopien des zu untersuchenden Gens.

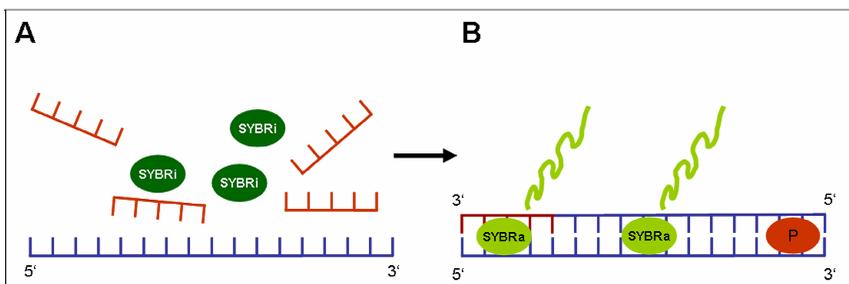


Abb. 10 Funktionsweise interkalierender Fluorophore (z.B. SYBR® Green I) und deren Anwendung bei der qPCR

- A** Vor der Amplifikation doppelsträngiger DNA kann der Farbstoff SYBR Green nicht binden, d.h. er ist inaktiv. Angeregt mit Licht sendet er keine Fluoreszenz (SYBRi) aus
- B** Bei bzw. nach der Amplifikation (P = Polymerase) doppelsträngiger DNA lagert sich SYBR Green in die DNA-Helix ein (SYBRa) und sendet nach Anregung mit Licht seinerseits Fluoreszenz der Wellenlänge 540 nm (hellgrüne Linien) aus. Diese kann nun detektiert werden.

Für die Untersuchung der Genexpression können zwei verschiedene Methoden angewandt werden, die absolute und die relative Quantifizierung. Bei der absoluten Quantifizierung wird durch Herstellung und Verdünnung von Plasmid-DNA eine Eichkurve erstellt, auf der dann die absolute Menge des Zielgens in einer unbekannt Probe ermittelt werden kann. Bei der relativen Quantifizierung dagegen wird die Expression des Zielgens mit einer internen Kontrolle, dem *housekeeping gene*, verrechnet. So können unterschiedliche Ausgangsmengen an cDNA bis zu einem gewissen Maß ausgeglichen werden und man erhält die Genexpression eines Zielgens in Relation zu einem internen Kontrollgen und normalisiert auf einen willkürlich festgelegten Kalibrator. Dabei handelt es sich im Allgemeinen um die Probe, die nach der Korrektur die niedrigste Referenzgenexpression aufweist. In meinen Untersuchungen wurde allerdings für die Auswertung der Standardreihen und der durchgeführten RT-qPCR nach der $\Delta\Delta C_t$ Methode die firmeneigene Software CFX Manager®, Version 2.0 (Bio-Rad) verwendet (siehe unten).

4.5.1. Evaluierung der Ziel- und Referenzgene

Um eine relative Quantifizierung durchführen zu können, müssen sowohl Ziel- als auch Kontrollgen in ihrer Effizienz vergleichbar sein. Für die RT-PCR wurden Primer zur Detektion des humanen AR und des *androgen binding proteins* (ABP) verwendet.

MATERIAL UND METHODEN

Als Kontrollgen wurde wieder β -Actin gewählt. Die Primer für die RT-qPCR sollen möglichst kurz sein, so dass hier Amplifikatlängen von unter 100bp angestrebt wurden. Die Primer wurden ebenfalls von Eurofins MWG Operon synthetisiert, die Sequenzen können der folgenden Tabelle entnommen werden:

Primer	RefSeq	Primersequenz	Produkt
humAR	NM_000044.2	for 5' – GCTTCTACCAGCTCACCAAGCT – 3' rev 5' – CTTGATTAGCAGGTCAAAGTGAAGT – 3'	85 bp
ABP	NM_001040	for 5' – CCTGGGCCTTCTCTTTGGA – 3' rev 5' – GGTGGAGACTGAGCCAAGATG – 3'	102bp
β -Actin	NM_001101.3	for 5' – TTCCTTCCTGGGCATGGAGT – 3' rev 5' – TACAGGTCTTTGCGGATGTC – 3'	89 bp

Für die RT-qPCR wurde der iQ SYBR Super Mix (Bio-Rad) verwendet, er enthält neben der Polymerase bereits dNTPs, so dass nur noch die Primer, A. bidest. und die *template* cDNA zugefügt werden muss. Für einen einfachen Ansatz wurde folgender Mix angesetzt:

1x Ansatz	Reagenz	Konzentration	Hersteller
10 μ l	2 x iQ SYBR Super Mix		Bio-Rad
0,6 μ l	for Primer	10pM	Eurofins MWG
0,6 μ l	rev Primer	10pM	Eurofins MWG
7,8 μ l	steriles Bidest		

Für die Verdünnungsreihe wurde jeweils 1 μ l cDNA mit 19 μ l Mastermix vermischt. Die cDNA wurde zuvor in einer absteigenden dekadischen Reihe verdünnt (unverdünnt, 1:10, 1:100 und 1:1000) und die Proben im Dreieransatz pipettiert. Verwendet wurde die cDNA eines Patienten mit normaler Spermatogenese, die mRNA wurde vor der

MATERIAL UND METHODEN

DNase-Behandlung und Umschreibung auf 200ng/µl eingestellt. cDNA und Mix wurden in eine 96-well Platte (µltraAmp PCR Plate low profile, Sorenson) pipettiert, mit einem Microseal ,B' Adhesive Seal (Bio-Rad) verschlossen und im CFX96 (Bio-Rad) nach folgendem Programm inkubiert:

1. 95°C für 3 min Aktivierung der iQ Taq Polymerase
2. 95°C für 10 sec Auftrennung der DNA-Doppelhelix
3. 59°C für 1 min Anlagerung der Primer und Amplifikation

Wiederholung der Schritte 2-3 für 39 Zyklen mit anschließender Schmelzkurve:

5. 60 => 95°C (+0,05°C) für 5 sec
6. abkühlen auf 4°C

4.5.2. Durchführung der RT-qPCR

Nach der Ermittlung der Reaktionseffizienz für die Gene AR, ABP und β-Actin wurde die RT-qPCR für 31 der 33 Patienten mit der cDNA aus dem Hodenhomogenat durchgeführt. Die Patienten 7 und 23 (Tab. 2) konnten nicht mittels qPCR untersucht werden, da nicht genügend mRNA in ausreichend guter Qualität vorhanden war. Für einen einfachen Ansatz wurde folgender Mix angesetzt:

1x Ansatz	Reagenz	Konzentration	Hersteller
10µl	2 x iQ SYBR Super Mix		Bio-Rad
0,6µl	for Primer	10pM	Eurofins MWG
0,6µl	rev Primer	10pM	Eurofins MWG
6,8µl	steriles Bidest		

Hier wurden pauschal 2µl cDNA mit 18µl Mastermix vermischt, in eine 96-well Platte pipettiert, verschlossen und nach dem oben genannten Protokoll im CFX96 Cycler inkubiert.

4.5.3. Auswertung der qPCR und statistische Analyse

Die Auswertung der qPCR erfolgte mit Hilfe der CFX Manager ® Software (Bio-Rad) nach der $\Delta\Delta C_t$ Methode.

Als C_t (*threshold cycle*) wird der Zyklus der RT-qPCR bezeichnet, bei dem die gemessene Fluoreszenz eine festgelegte Marke, den Treshold, überwunden hat. Der Schwellenwert wird von der Software so berechnet, dass die Amplifikation in diesem Bereich exponentiell stattgefunden hat. Zur Berechnung der relativen Genexpression müssen zuerst die ΔC_t -Werte des Zielgens ($GOI = gene\ of\ interest$) und des Referenzgens (Ref) bestimmt werden. Dies erfolgt nach der folgenden Formel:

$$\Delta C(t)_{GOI} = E_{GOI}^{(C_{T(min)} - C_T)}$$

Dabei ist E die Effizienz des Primersystems. Bei $E = 2$ ist die Effizienz 100%, d.h. bei jedem PCR-Zyklus kommt es zu einer exponentiellen Verdopplung der Menge an PCR-Produkt. Die Effizienz wurde mittels der Standardverdünnungen bestimmt und kann bei der verwendeten CFX Manager® Software genau definiert werden. So können geringgradige Effizienzunterschiede ausgeglichen werden. Als $C_{T(min)}$ bezeichnet man den Wert mit dem geringsten C_t -Wert des Zielgens. Da bei der vorliegenden Untersuchung nur ein Referenzgen verwendet wurde, richtet sich die Bestimmung von ΔC_t ebenfalls nach dieser Formel.

Um nun die normalisierte Expression des Zielgens zu erhalten, muss der ΔC_t -Wert des Zielgens mit dem ΔC_t des Referenzgens (oder bei mehreren Referenzgenen mit einem Normalisierungsfaktor) verrechnet werden. Dies ergibt sich aus dieser Formel:

$$\Delta\Delta C(t)_{GOI} = \frac{\Delta C(t)_{GOI}}{(\Delta C(t)_{Ref\ 1} \times \Delta C(t)_{Ref\ 2} \times \dots \times \Delta C(t)_{Ref\ n})^{\frac{1}{n}}}$$

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS 19.0 (IBM Deutschland GmbH, München). Für den Vergleich der Varianzen wurde eine univariante ANOVA durchgeführt, gefolgt von einem *Levene* Test und einem *student's t*-Test für unabhängige Stichproben für einen Vergleich der Mittelwerte.

4.6. Klonierung der PCR-Produkte

Bei der Klonierung handelt es sich um eine molekularbiologische Methode zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten durch die Einschleusung (Transformation) der DNA in Trägermoleküle (z.B. Plasmide) und danach in aufnahmebereite Bakterien, die die Plasmide und damit die DNA in ihrem normalen Zellzyklus vermehren. Diese Methode wird unter anderem zur Herstellung von Sonden für die *in situ*-Hybridisierung angewendet, oder - wie im hier vorliegenden Fall - um die Sequenzierung von kurzen DNA-Fragmenten zu erleichtern. Da es sich bei dem hier amplifizierten Stück des AR-Gens um ein relativ kurzes DNA-Fragment von nur 200bp Länge handelt, wurde das PCR-Produkt (Insert) in den Vektor eingebunden (ligiert) und kloniert, um eine sehr genaue Sequenzierung ab der ersten Base und damit die bessere Bestimmung der CAG-Repeatzahl zu ermöglichen.

Nach der Ligation in das p-GEM®-T Vektorsystem (Promega) wurde der Vektor mit dem Insert in die kompetenten Zellen JM109 (Promega) und auch SURE®2 supercompetent cells (Stratagene) eingeschleust und in diesen vermehrt.

4.6.1. A-tailing

T-Vektoren wie z.B. der p-GEM®-T Vektor zeigen an ihrer *multiple cloning site*, an der das Insert dann eingebaut werden soll, einen Thymin-Überhang. Bei einem PCR-Produkt mit einem Adenosin-Überhang (A-Tail) ist die Klonierung in den Vektor stark vereinfacht, da die beiden Basen komplementär sind (T/A-Klonierung). Bei der PCR-Reaktion muss demnach eine Polymerase verwendet werden, die dem PCR-Produkt einen A-Tail hinzufügt. Hat man eine Polymerase verwendet, die dem PCR-Produkt keinen A-Überhang hinzufügt, oder möchte man den bereits vorhandenen A-Überhang verlängern, kann man dem PCR-Produkt vor der Ligation in den Vektor noch einen artifiziellen Poly-A-Schwanz mittels so genanntem A-Tailing anhängen. Für einen 10µl Ansatz wurde folgender Mastermix angesetzt:

1x Ansatz	Reagenz	Konzentration	Hersteller
7µl	PCR-Produkt		
1µl	10x Reaktionspuffer		Qiagen
1µl	dATP (1:50 verdünnt)	2mM	Promega
1µl	Taq DNA Polymerase	5U/l	Qiagen

Die Proben wurden gemischt und kurz zentrifugiert. Es folgte eine Inkubation bei 70°C für 30 min im Wasserbad und eine kurze Lagerung auf Eis. Alternativ wurde der Ansatz bei -20°C über Nacht gelagert.

4.6.2. Ligation in p-GEM®-T

Die Ligation erfolgte in den 3kb großen pGEM®-T Vektor. Er verfügt über einen SP6 und T7 RNA Polymerase Promotor, der eine *multiple cloning site* mit dem Enzym β -Galaktosidase flankiert (Abb. 11).

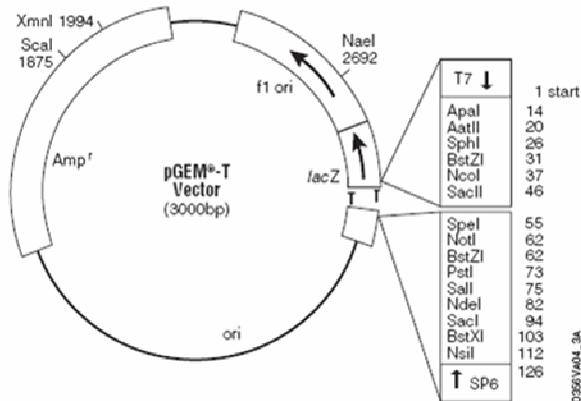


Abb. 11 p-GEM®-T Vektor von Promega

Für einen 10µl Ligationsansatz wurde folgender Mastermix angesetzt:

1x Ansatz	Reagenz	Konzentration	Hersteller
5µl	2x Ligasepuffer		Promega
1µl	p-GEM®-T Vektor	50ng/µl	
3µl	PCR-Produkt aus A-tailing	2mM	
1µl	T4 DNA Ligase	5U/l	

Der Ansatz wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann für 3,5 h im Kühlschrank aufbewahrt und dann über Nacht bei 4 °C im Kältebad inkubiert.

4.6.3. Transformation

4.6.3.1. Kompetente Zellen JM109

JM109 Zellen sind für eine einfache Klonierung von PCR-Produkten geeignet und sollen nach Herstellerangaben nur eine geringe Rekombinase-Aktivität (recA-) besitzen. Das bedeutet, dass sie das aufgenommene PCR-Produkt während ihres Zellzyklus nur geringgradig bis gar nicht verändern.

Im Anschluss an die Inkubation des Ligationsansatz über Nacht, wurden die JM109 Zellen für mindestens 5 min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde sanft mit einer großvolumigen Pipette gemischt, da eine zu starke mechanische Belastung der Bakterien vermieden werden sollte. Zu 50µl der kompetenten Zellen wurden 2µl des Ligationsansatzes gegeben und vorsichtig gemischt. Danach wurde der Ansatz für 20 min auf Eis inkubiert und dann für genau 45 sec einem Hitzeschock von 42°C unterzogen, um die Aufnahme des Vektors in die Bakterien zu ermöglichen. Nach dem Hitzeschock wurde der Ansatz sofort für 2 min auf Eis gestellt, danach wurden dem Ansatz 950µl SOC-Medium (Invitrogen) zugegeben. Die Probengefäße wurden dann auf dem Rüttler befestigt und schüttelnd (150 U/min) bei 37°C für 90 min inkubiert. Daraufhin wurden von einem Ansatz 100-300µl auf je eine LB-Anzuchtplatte mit Ampicillin, XGal und IPTG gegeben und vorsichtig ausgespatelt. Nachdem die Platten getrocknet waren, wurden sie auf dem Deckel liegend über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.6.3.2. Kompetente Zellen SURE@2 supercompetent cells

Die kompetenten SURE@2 (Stratagene) wurden zusätzlich für die Klonierung verwendet, weil sie besonders für die Klonierung von schwierigen DNA-Fragmenten mit einer Neigung zu DNA-Sekundärstrukturen geeignet sind. Da diese Zellen ebenfalls für eine Blau-/Weiß-Differenzierung und eine Verwendung mit dem

pGEM®-T Vektor geeignet sind, wurden für die Klonierung bereits extrahierte Plasmide aus den JM109 Zellen (siehe oben) verwendet.

Die kompetenten Zellen wurden für 5 min auf Eis aufgetaut und dann mit 2µl β-Mercaptoethanol vorsichtig vermischt. Dies soll die Aufnahme des Vektors ermöglichen. Nach einer zehninütigen Inkubation auf Eis wurde 1µl Plasmid-DNA (0,1-50ng) hinzugefügt und für 30 min auf Eis inkubiert. Durch den Hitzeschock von 42°C für genau 30 sec wurden die Bakterien dazu gebracht, die Plasmide aufzunehmen. Nach einer sofortigen Inkubation auf Eis für 2 min wurde dem Ansatz 900µl NZY+ Medium zugegeben und für 1 h bei 37°C auf dem Schüttler bei 250 U/min geschüttelt. Auf den vorbereiteten LBamp-Platten mit Ampicillin, XGal und IPTG wurden 100-200µl Transformationsmix ausplattiert. Die Platten wurden daraufhin auf dem Deckel liegend über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.6.3.3. Blau/Weiß-Screening

Das Blau/Weiß-Screening ermöglicht es, zwischen Bakterien zu unterscheiden, die a) keinen Vektor, b) den Vektor ohne Insert oder c) den Vektor mit Insert aufgenommen haben.

Da der p-GEM®-T Vektor eine Ampicillinresistenz trägt, können nur die Bakterien auf dem LB-Medium mit Ampicillin (LBamp) wachsen, die den Vektor aufgenommen haben. Alle anderen Bakterien ohne Vektor werden in ihrem Wachstum gehemmt.

Um die Bakterien zu selektieren, die den Vektor mit dem Insert aufgenommen haben, wurden den LB-Nährböden zwei Reagenzien zugesetzt, je 40µl XGal (Invitrogen) und IPTG (Appligene). Auf dem Vektor ist das Enzym β-Galaktosidase kodiert. Dieses Enzym baut XGal zu einem gelben Zwischenprodukt (5-Brom-4-chlor-Indoxyl) ab, das mit Luftsauerstoff zu dem tiefblauen 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo oxidiert. Bakterien, die den Leervektor aufgenommen haben, erscheinen deswegen blau. Ist

dagegen das Insert aufgenommen worden, wird das Enzym β -Galaktosidase nicht mehr exprimiert und XGal wird nicht abgebaut. Die Bakterienkolonien bleiben demnach weiß.

Normalerweise ist die Blau-/Weiß-Differenzierung nach einer Inkubation bei 37°C über Nacht abgeschlossen. Um die Farbbildung deutlicher zu machen, wurden die Platten anschließend noch für einen Tag im Kühlschrank gelagert. Danach wurden die weißen Kolonien mit einer abgeflamten Draht-Öse abgenommen und auf einer neuen LBamp-Platte (=Masterplatte) ausgestrichen, so dass nach einer erneuten Inkubation über Nacht eine ausreichende Menge an monoklonalen Bakterienkolonien zur Verfügung stand. Die Masterplatten wurden im Kühlschrank gelagert.

4.6.4. Plasmidextraktion

Für die Plasmidextraktion wurden die Kolonien in Flüssigkultur gebracht. Dafür wurde flüssiges LB-Medium mit Ampicillin versetzt und jeweils 5 ml davon in einem sterilen Reagenzglas mit den Bakterien beimpft. Hierfür wurden die Bakterienkolonien mit einer abgeflamten Draht-Öse von den Masterplatten abgenommen. Die Flüssigkultur wurde dann für 4 h bei 37°C gerüttelt (225 U/min), danach wurde neues Flüssigmedium zugegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die optische Dichte bestimmt und die Plasmide mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) extrahiert. Das genaue Protokoll kann dem Handbuch des QIAprep Spin Miniprep Kits entnommen werden. Die Menge an Plasmid-DNA wurde mit dem BioPhotometer bestimmt. Bis zu ihrer Weiterverarbeitung wurden die Plasmide bei -20°C gelagert.

4.6.5. Doppolverdau der Plasmide und Gelelektrophorese

Um festzustellen, ob die Plasmide auch das vollständige Insert aufgenommen haben wurde ein Doppolverdau der Plasmide mit anschließender Gelelektrophorese durchgeführt.

Jeder Vektor enthält Schnittstellen für verschiedene Restriktionsenzyme (Abb. 11). Die Wahl der einzusetzenden Enzyme für den Doppolverdau richtet sich nach dem Insert, das natürlich keine Schnittstelle für das verwendete Enzym enthalten darf, damit es nicht zerschnitten wird. In unseren Untersuchungen wurden die zwei Restriktionsenzyme NcoI und NotI (NEB) verwendet. Für 20 μ l Reaktionsvolumen wurde folgender Mix angesetzt:

1x Ansatz	Reagenz	Konzentration	Hersteller
x μ l	200ng Plasmid-DNA		
0,5 μ l	NotI	10U/ μ l	NEB
0,5 μ l	NcoI	10U/ μ l	
0,5 μ l	BSA	10mg/ml	
	steriles Bideist ad 20 μ l		

Die Menge an eingesetzter Plasmid-DNA wurde durch die Messung mit dem BioPhotometer ermittelt. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert, am nächsten Tag wurden die Enzyme durch eine Inkubation bei 65°C für 20 min im Wasserbad inaktiviert und die Elektrophorese durchgeführt.

Dafür wurde ein 2%iges Agarosegel hergestellt und der vollständige Ansatz mit 4 μ l Loading Dye geladen. Die Elektrophorese fand für 40min bei 125V statt, danach wurden mit Hilfe der Uvsolo und UVIdoc (Biometra) die Banden visualisiert.

Plasmide, die das Insert beinhalteten, wurden zum Sequenzieren zu SRD (Scientific Research Development, Oberursel, Deutschland) geschickt.

4.6.6. Archivierung der Plasmid-DNA

Um die Plasmid-DNA zu archivieren, wurden von den entsprechenden Bakterienkolonien Glycerolkulturen angelegt. Hierfür wurde von den Masterplatten der entsprechende Zellklon abgenommen und in Flüssigmedium mit Ampicillin geimpft. Nach einer Inkubation bei 37°C über Nacht wurden 400µl der Flüssigkultur mit 600µl autoklaviertem Glycerol (Roth) vermischt und für 15 min auf Eis gestellt. Nach dieser Vorkühlung wurden die Glycerolkulturen in flüssigem Stickstoff gelagert.

5. Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) der PCR-Produkte

Nachdem in der Agarosegel-Elektrophorese gezeigt wurde, dass die PCR zu einer einheitlichen Bande bei 200bp geführt hat, wurde zusätzlich eine hochauflösende native PAGE durchgeführt. Anders als Agarose erzeugt Acrylamid beim Aushärten ein sehr viel feineres Netzwerk, mit dem auch geringe Unterschiede in der Länge der PCR-Produkte detektiert werden können. Für ein 20 x 20cm großes Gel mit einer 6,5%igen Acrylamid-Konzentration wurde folgende Mischung erstellt:

1 Gel	Reagenz	Hersteller
56ml	steriles Bidest	
7,5ml	10x TAE Puffer	
12ml	Acrylamid (19:1 in Wasser)	Serva
400µl	Ammoniumpersulfat, 10%ig	
40µl	TEMED	

Das Gel wurde in den Gelträger eingefüllt und bis zum Auspolymerisieren, mindestens aber für 30 min, bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Erhärten des Gels wurde der Gelträger in die Pufferkammer verbracht und diese mit 1,6l 1xTBE Puffer befüllt. Von den PCR-Produkten wurden 20µl bis 30µl des PCR-Produkts mit 4µl bzw. 6µl TBE Loading Dye vermischt aufgetragen. Als Marker wurden zwei verschiedene DNA-Leitern verwendet, zum einen der Marker puC19Msp1 (Roth) mit Banden bei 501bp, 401bp, 331bp, 242bp, 190bp, 147bp und 110bp und zum anderen der Marker GeneRuler® Low Range DNA Ladder (Fermentas) mit Banden bei 500bp, 400bp, 300bp, 200bp, 150bp und 100bp.

Das Gel wurde an eine Spannungsquelle angeschlossen. Für 30 min wurde eine Spannung von 20mA pro Gel angelegt, anschließend eine höhere Spannung (40mA) für 150 min. Nach Beenden der Elektrophorese wurde das Gel aus der Kammer herausgenommen und mit GelGreen (Biotium) für 30 min gefärbt. Nach dieser Zeit wurde die Färbelösung abgeschüttet und das Gel für 15 min mit Leitungswasser gespült. Das Ergebnis wurde mit einem UV Transilluminator (ImageMaster) dokumentiert.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer Eichkurve, die in dem Datenverarbeitungsprogramm MS Excel™ erstellt wurde. Zu diesem Zweck wurde die Lauflänge der Markerbanden ermittelt und mit der Bandenlänge in bp korreliert. Der Korrelationskoeffizient lag dabei zwischen $R^2 = 0,9$ und 1 (Abb. 12). Danach wurde die Lauflänge der PCR-Produkte gemessen und mit der Geradengleichung $y = mx + b$ die genaue Länge des Produkts ermittelt. Das PCR-Produkt mit einer Länge von 202bp enthält 22 CAG-Repeats, davon wurde dann die Repeatanzahl bei den PCR-Produkten abgeleitet.

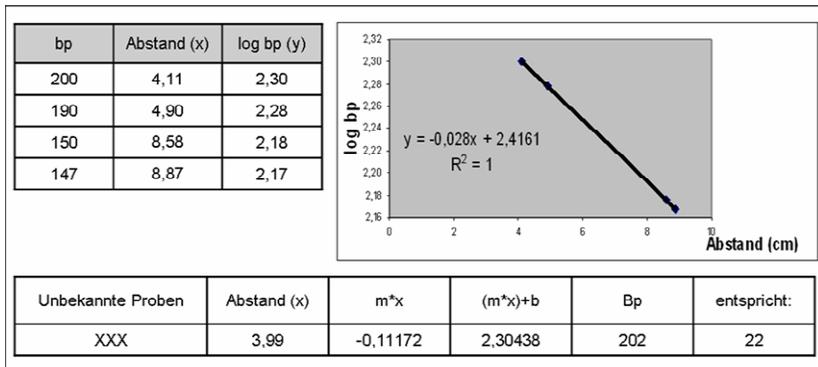


Abb. 12 Auswertung der PAGE

6. Untersuchung des CAG-Repeats aus Blutlymphozyten-DNA und Bestimmung von Testosteron- und LH-Konzentration

Die Bestimmung des CAG-Repeats aus DNA von Blutlymphozyten ist die Standardmethode im Centrum für Reproduktionsmedizin des Universitätsklinikums Münster. Zu diesem Zweck wird aus Blutlymphozyten DNA isoliert und dann eine PCR durchgeführt. Die verwendeten Primer sind bei dieser PCR fluoreszenzmarkiert, um eine nachfolgende Fragmentlängenanalyse (FLA) möglich zu machen. Die Primer wurden ebenfalls von Eurofins MWG Operon bezogen.

Primer	Primersequenz
humar	for 5' – TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC – 3'
humi (6-FAM)	rev 5' – GCTGTGAAGGTTGCTGTTCTCAT – 3' (6-FAM)

1-2µl der extrahierten DNA wurde zu folgendem Mastermix gegeben:

1x Ansatz	Reagenz	Konzentration	Hersteller
2,5µl	5x Reaktionspuffer		Qiagen
5µl	5x Q-Solution		
1µl	dNTP Mix	1mM	
1µl	humar Primer	20pM	
1µl	humi (6-FAM) Primer	20pM	
0,3µl	Taq DNA Polymerase	5U/l	Qiagen
20,75µl	steriles Bidest		

Die PCR-Konditionen waren:

- | | |
|--------------------|-------------------------------------|
| 1. 94°C für 2 min | Aktivierung der HotStart Polymerase |
| 2. 94°C für 45 sec | Auftrennung der DNA-Doppelhelix |
| 3. 59°C für 30 sec | Anlagerung der Primer |
| 4. 72°C für 1 min | Amplifikation des DNA-Stranges |
| 5. 72°C für 10 min | endgültige Amplifikation |
| 6. 6°C für 10 min | Lagerung im Cycler |

Die Schritte 2 bis 4 wurden 30x wiederholt. Die PCR-Produkte wurden auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

Für die Fragmentlängenanalyse wurden mit 0,1µl Rox 500 (Applied Biosystems) und 19,9µl HI-DI Formamid (Applied Biosystems) vermischt und spezielle, für diesen Lauf vorgeschriebene Mikrotiterplatten (ABgene, AB-1100) vorgelegt. 20-30ng des PCR-Produkts werden zu dem Mix pipettiert und die Platte mit Klebefolie verschlossen. Die CAG-Repeatlänge wird mit dem ABI 3730 DNA-Analyzer (Applied Biosystems)

und der Software Gene Scan 3.7 ABI Prism (Applied Biosystems) ermittelt. Zu diesem Zweck werden die fluoreszierenden PCR-Produkte in einem elektrischen Feld ihrer Länge entsprechend aufgetrennt. Die Software wertet die Länge des PCR-Produktes aus und zeigt sie in einem Chromatogramm als Peak an. Für die „Übersetzung“ der ermittelten Länge des PCR-Produktes in die Anzahl der $(CAG)_n$ des CAG-Repeats wurde eine Standardkurve mit bekannten CAG-Repeatlängen angelegt, in der man die entsprechenden Werte ablesen kann. Bei jedem Lauf wird zudem ein Längenstandard (ROX 500, ABI), sowie drei Proben mit bekannter CAG-Repeatlänge mitgeführt.

Die Testosteronbestimmung fand mittels RIA aus Serumproben fand ebenfalls im Centrum für Reproduktionsmedizin statt (Behre et al. 1997), die Nachweisgrenze liegt bei 0,7nmol/l. Die untere Grenze für normale Testosteronkonzentrationen sind 12nmol/l. Mittels Immunoassay wurde das LH bzw. Lutropin im Blut bestimmt. Der Normbereich liegt bei 0,8 - 6,1IU/l.

H. Ergebnisse

1. Histologische Evaluierung der Hodenbiopsien

Für jede Hodenbiopsie wurden der Spermatogenesestatus und der *score count* (SC) nach Bergmann und Kliesch (2010) bestimmt (Tab. 1). Grau unterlegt sind dabei die Proben, die für die weiteren Untersuchungen verwendet wurden.

Nr.	Anamnese / Besonderheiten	rechter Hoden	SC	linker Hoden	SC	Testosteron (nmol/l)	LH (IU/l)
1	normogonadotrope obstruktive Azoospermie	nsp	10	nsp	10	17,5	8,8
2	normogonadotrope obstruktive Azoospermie	nsp	10	hyp	8	30,3	3,2
3	normogonadotrope obstruktive Azoospermie	nsp	10	nsp	10	14,8	4,9
4	Hodentumor links	nsp	10	tu, hyp	-	22,9	4,2
5	normogonadotrope obstruktive Azoospermie	nsp	10	nsp	10	19,7	11,7
6	normogonadotrope obstruktive Azoospermie	hyp	10	hyp	10	12,7	2,3
7	hypogonadotrope obstruktive Azoospermie	SCO	0	SCO, hyp	5	4,0	1,9
8	normogonadotrope obstruktive Azoospermie	hyp	10	hyp	10	-	-
9	Hodentumor beidseits	-	-	tu, hyp	-	26,2	0,2
10	normogonadotrope nicht-obstruktive Azoospermie	sza	0	sga	0	10,5	7,2
11	hypergonadotrope nicht-obstruktive Azoospermie	sza	0	sza	0	14,2	2,7
12	hypergonadotrope nicht-obstruktive Azoospermie	sza	0	sza	0	17,2	4,6
13	normogonadotrope nicht-obstruktive Azoospermie	sza	0	hyp,sza	-	7,1	2,7
14	hypergonadotrope nicht-obstruktive Azoospermie	sga	0	fsc	0	12,8	6,5
15	normogonadotrope nicht-obstruktive Azoospermie	sza	0	sga	0	1,1	0,5
16	hypergonadotrope nicht-obstruktive Azoospermie	sga	0	sga	0	12,4	12,3
17	Hodentumor rechts	tu, sga	-	isz	0	-	-
18	Hodentumor rechts, Krypt.	tu, sga	0	hyp	6	-	-
19	hypergonadotrope nicht-obstruktive Azoospermie	SCO	0	SCO	0	23,1	7,8
20	hypergonadotrope nicht-obstruktive Azoospermie, KF	SCO	0	SCO	0	10,0	13,3
21	hypergonadotrope nicht-obstruktive Azoospermie	SCO	0	SCO	0	15,8	4,6
22	hypergonadotrope nicht-obstruktive Azoospermie	hyp, fsc	1	SCO	0	19,7	4,2
23	hypergonadotrope nicht-obstruktive Azoospermie, Krypt.	SCO	0	hyp	9	-	-

ERGEBNISSE

Nr.	Anamnese / Besonderheiten	rechter Hoden	SC	linker Hoden	SC	Testosteron (nmol/l)	LH (IU/l)
24	hypogonadotrope nicht-obstruktive Azoospermie	hyp, fsc	4	hyp, fsc	2	14,0	0,3
25	Krypt.	SCO	0	hyp, fsc	6	11,0	4,5
26	normogonadotrope nicht-obstruktive Azoospermie	hyp, fsc	2	hyp, fsc	3	9,2	6,2
27	Hodentumor links	hyp, fsc	3	tu, hyp, fsc	2	22,5	5,5
28	hypergonadotrope nicht-obstruktive Azoospermie, Krypt.	hyp, fsc	3	fsc	0,3	23,0	7,2
29	normogonadotrope nicht-obstruktive Azoospermie	–	–	hyp, msd	4	14,2	3,7
30	normogonadotrope nicht-obstruktive Azoospermie	hyp	9	sda, sza, hyp	2	16,6	4,1
31	Mikrolithiasis	hyp, sza, msd	1	hyp, sza, msd	4	13,5	4,2
32	normogonadotrope nicht-obstruktive Azoospermie	hyp, msd	9	hyp, msd	7	12,8	5,8
33	normogonadotrope nicht-obstruktive Azoospermie	hyp, msd	7	sga	0	9,0	3,6
PK	Prostatakarzinom	hyp	10	hyp	10	–	–

Tab. 1 Histologische Evaluierung, *score count* Bewertung der verwendeten Hodenbiopsien, Testosteron- und LH-Werte

nsp	normale Spermatogenese
hyp	qualitativ intakte Spermatogenese, Hypospermatogenese
sza	Spermatogenese-arrest auf der Höhe der primären Spermatozyten
sga	Spermatogenese-arrest auf der Höhe der Spermatozyten
SCO	Sertoli-cell-only Syndrom
tu	Tumor
msd	mehrkernige runde Spermatozyten
fsc	fokales SCO
isz	immature Sertolizellen
KF	Klinefelter-Syndrom
Krypt.	Kryptorchismus
IU	internationale Einheiten

Bei der Beurteilung der Spermatogenese war auffällig, dass in vielen Fällen zwei oder mehr Diagnosen gefunden werden konnten; in diesem Fall spricht man von einer „bunten Atrophie“ der Spermatogenese (Patienten Nr. 24-33).

2. Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung

2.1. CAG-Repeatbestimmung in Lymphozyten-DNA

Bei 17 der 33 Patienten lag der CAG-Wert, der in der Lymphozyten-DNA bestimmt wurde, vor. Die Untersuchung mittels Fragmentlängenanalyse ergab bei 16 der 17 Patienten einen einheitlichen Wert (Tab. 2), bei Patient 20 zeigten die Fragmentlängenanalyse und auch die Untersuchung mittels PAGE zwei CAG-Repeatlängen, 20 und 24 (FLA) bzw. 19 und 23 CAG (PAGE). Der Grund dafür ist, dass Patient 20 am Klinefelter-Syndrom (Genotyp 47XXY) leidet und es deswegen zwei X-Chromosome gibt, die jeweils einen Androgenrezeptor mit unterschiedlicher CAG-Repeatlänge exprimieren können. Bei neun der 16 Patienten, bei denen das CAG-Repeat in den Blutlymphozyten mittels FLA bestimmt wurde, wurde eine parallele Untersuchung derselben Probe mittels PAGE durchgeführt. Bei einem dieser Patienten konnte ein Unterschied von sechs Repeats (Patient 2, Tab. 2) zwischen dem Ergebnis der Fragmentlängenanalyse und der PAGE gezeigt werden. Bei Patient 7 (Tab. 2) wurde die Untersuchung in Blutlymphozyten nur mittels PAGE durchgeführt.

2.2. Qualitative PCR und RT-PCR von Hodenhomogenat

Bei der Untersuchung der DNA von Hodenhomogenat mittels qualitativer PCR und RT-PCR konnte das Vorhandensein von AR-DNA und -cDNA in allen Proben gezeigt werden (Abb. 13). Die Bande lag immer in der erwarteten Höhe von 200bp. Bei der RT-PCR wurde die -RT-Kontrolle mit dem Gen β -Actin mitgeführt, um den Erfolg der DNase-Behandlung zu kontrollieren.

ERGEBNISSE

A Monomorphe Histologie

Nr.	Histologie	Hormonkonzentration im Blut		Methode	CAG-Repeat in Blut-DNA	CAG-Repeat in Hodenhomogenat, untersucht in		CAG-Repeat in LACP-Material (mRNA), untersucht in		
		T (nmol/L)	LH (IU)			DNA	mRNA	SZ	LZ	
1	nsp	17,5	8,8	FLA	25	–	–	–	–	
				PAGE	–	25	25	23	25	
2		30,3	3,2	FLA	21	–	–	–	–	
				PAGE	27	25	–	25	25	
3		14,8	4,9	FLA	24	–	–	–	–	
				PAGE	–	23	22	23	23	
4		22,9	4,2	FLA	26	–	–	–	–	
				PAGE	24	24	21	24	24	
5		19,7	11,7	FLA	–	–	–	–	–	
				PAGE	–	18	18	18	18	
6	hyp	12,7	2,3	FLA	24	–	–	–	–	
				PAGE	–	23	23	23	23	
7		4,0	1,9	FLA	–	–	–	–	–	
				PAGE	25	23	23	23	23	
8		–	–	FLA	–	–	–	–	–	
				PAGE	–	–	–	27	27	
9		26,2	0,2	FLA	–	–	–	–	–	
				PAGE	–	20	20	20	20	
10		sza	10,5	7,2	FLA	22	–	–	–	–
					PAGE	–	22	21	21	21
11	14,2		2,7	FLA	22	22	17	22	22	
				PAGE	21	23	21	21	21	
12	17,2		4,6	FLA	25	–	–	–	–	
				PAGE	24	24	22	21	18	
13	7,1		2,7	FLA	21	–	–	21	21	
				PAGE	20	22	22	20	20	
14	sga		12,8	6,5	FLA	19	19	–	–	19
					PAGE	19	18	18	18	18
15		1,1	0,5	FLA	23	–	–	–	–	
				PAGE	–	23	23	23	23	
16		12,4	12,3	FLA	23	–	–	–	–	
				PAGE	21	21	23	20	23	
17		–	–	FLA	–	–	–	–	–	
				PAGE	–	23	–	22	22	
18		–	–	FLA	–	–	–	–	–	
				PAGE	–	23	23	23	23	
19	SCO	23,1	7,8	FLA	21	–	–	–	–	
				PAGE	–	21	21	19	21	
20		10,0	13,3	FLA	24+20	–	–	–	–	
				PAGE	23+19	20	19	19	19	
21		15,8	4,6	FLA	25	–	–	–	–	
				PAGE	–	24	–	24	24	
22		19,7	4,2	FLA	22	23	23	23	23	
				PAGE	21	22	21	21	21	
23		SCO ^a	–	–	FLA	–	–	–	–	–
					PAGE	–	19	19	18	18
	hyp ^b	FLA			–	–	–	–	–	
		PAGE			–	23	23	18	23	

B Bunte Atrophie der Spermatogenese

Nr.	Histologie	Hormonkonzentration im Blut		Methode	CAG-Repeat in Hodenhomogenat, untersucht in	CAG-Repeat aus mRNA von Sertolizellen nach LACP; Untersuchung von Keimepithelien mit	
		T (nmol/L)	LH (IU)		hyp	hyp	SCO / Arrest
24		14,0	0,3		24	23	23
25		11,0	4,5		21	14	20
26	hyp / SCO	9,2	6,2	PAGE	24	22	24
27		22,5	5,5		19	20	18
28		23,0	7,2		27	25	22
29		14,2	3,7		22	20	17
30		16,6	4,1		21	12	23
31	hyp / Arrest	13,5	4,2	PAGE	21	19	20
32		12,8	5,8		24	–	23
33		9,0	3,6		20	17	–

Tab. 2 Ergebnisse der CAG-Repeatbestimmung mittels PAGE und Fragmentlängenanalyse mit monomorpher Histologie (A) und bunter Atrophie der Spermatogenese (B)

SZ = Sertolizellen

LZ = Leydigzellen

T = Testosteron

LH = luteinisierendes Hormon

FLA = Fragmentlängenanalyse

„–“ = keine Bestimmung des CAG-Repeats erfolgt

„+“ = Vorhandensein mehrerer CAG-Repeatbanden innerhalb einer Probe in einer Untersuchung

„^a“ = rechter Hoden bzw.

„^b“ = linker Hoden des Patienten 23

2.3. Qualitative RT-PCR nach LACP

Bei Material aus LACP-Versuchen konnte eine Bande bei einer Höhe von ca. 200bp mittels Elektrophorese ebenso nachgewiesen werden. Auch hier wurde zur Materialkontrolle eine PCR für β -Actin mit einer –RT-Kontrolle durch- und in der Elektrophorese mitgeführt. Neben den Tubulusanschnitten wurden auch Teile des

Interstitials gepickt und derselben Prozedur unterworfen (Abb. 14). Auch hier konnte eine Bande bei ca. 200bp detektiert werden.

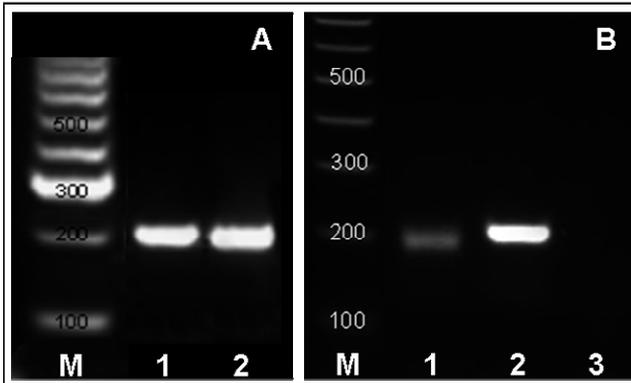


Abb. 13 Ergebnisse der qualitativen PCR und RT-PCR von Hodenhomogenat

- A** Qualitative PCR von Hoden- (1) und Blut-DNA (2) eines Patienten mit sza (Patient 11); M = 100bp Marker
- B** Qualitative RT-PCR von Hoden-cDNA (1= CAG-Repeat, 2= β -Actin, 3= β -Actin -RT) eines Patienten mit sza (Patient 10); M = 100bp Marker

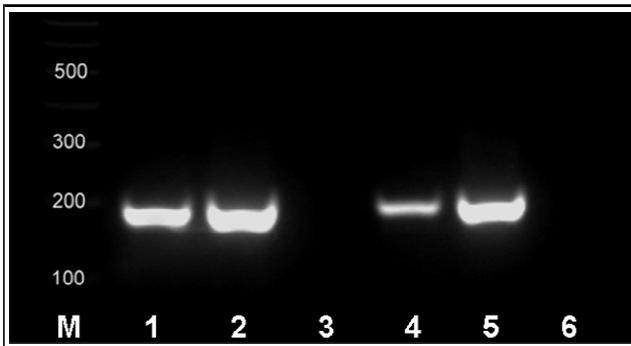


Abb. 14 Ergebnisse der qualitativen RT-PCR nach LACP

Detektion des CAG-Repeat des AR in Tubulusanschnitten (1= CAG-Repeat, 2= β -Actin, 3= β -Actin -RT) und Interstitium (4= CAG-Repeat, 5= β -Actin, 6= β -Actin -RT) eines Patienten mit hyp (Patient 6); M = 100bp Marker

2.4. RT-qPCR von Hodenhomogenat

Nach der Etablierung der Primersysteme für AR, ABP und β -Actin wurde für 31 von 33 Patienten eine quantitative RT-PCR im Doppelansatz durchgeführt. Bei allen Patienten mit zum Teil extrem unterschiedlichen histologischen Befunden konnte die Expression des AR und von ABP nachgewiesen werden.

Die Expression von AR korrelierte nicht mit der Länge des CAG-Repeats (Abb. 15) und der Histologie, unabhängig davon, ob es sich um eine monomorphe Histologie oder Patienten mit bunter Atrophie der Spermatogenese handelte (Abb. 16). Bei Patient 20 mit Klinefelter-Syndrom und einem SCO in der Histologie, konnte eine besonders hohe relative Genexpression des AR nachgewiesen werden. Mit einer CAG-Repeatlänge von 19 liegt er eher am unteren Ende der gemessenen Repeatanzahl, verglichen mit den anderen Patienten.

Ein signifikanter Unterschied der ABP-Expression in Abhängigkeit von der ermittelten CAG-Repeatlänge konnte nicht gezeigt werden (Abb. 15). Die einfaktorielle Varianzanalyse (unfaktorielle ANOVA) zeigte einen signifikanten Unterschied ($p = 0,012$). Nachfolgend wurden die Mittelwerte der Gruppen paarweise in einem *student's t*-Test für unabhängige Stichproben verglichen. Dabei wurde die relativen Genexpressionswerte der Patienten innerhalb einer Diagnose gepoolt. Die Expression von ABP bei Patienten mit nsp oder hyp (Patient 1-6 und 8-9, Tab. 2) war signifikant unterschiedlich ($p = 0,028$) zu der Expression bei Patienten mit schweren Spermatogenesestörungen (Patient 10-23, Tab. 2, Abb. 16). Bei Patienten mit einer bunten Atrophie der Spermatogenese (Patienten 24-33, Tab. 2) konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen Histologie und ABP-Expression ermittelt werden. Die Genexpressionswerte der Patienten 24-33 wurden nicht in die Statistik mit einbezogen, da es sich durch die Untersuchung von Hodenhomogenaten um Mischpopulationen handelt (hyp/SCO bzw. hyp/Arrest).

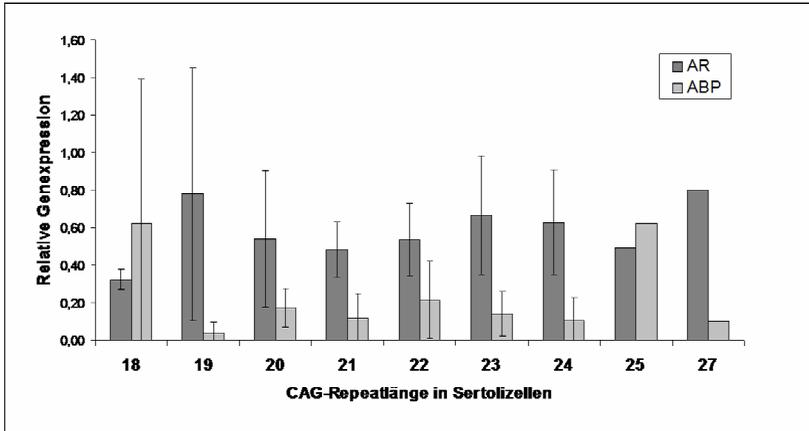


Abb. 15 Relative AR- und ABP-Expression im Hodenhomogenat in Abhängigkeit von der CAG-Repeatlänge in den Sertolizellen
Die Expressionsunterschiede zwischen den Gruppen „AR-Expression“, „ABP-Expression“ und der CAG-Repeatlänge sind statistisch nicht signifikant ($p > 0,5$). Darstellung von arithmetischem Mittelwert und Standardabweichung.

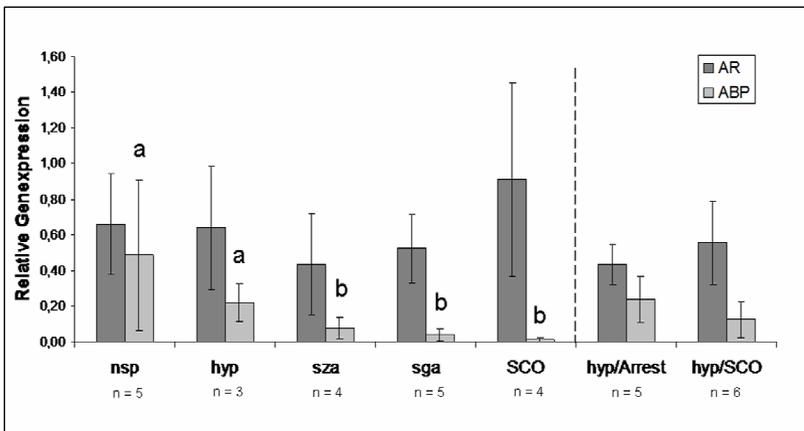


Abb. 16 Relative AR- und ABP-Expression im Hodenhomogenat in Abhängigkeit von der Histologie
Die statistisch signifikant verringerte Expression von ABP ($p = 0,028$) zwischen den Gruppen nsp/hyp und sza/sga/SCO wird durch verschiedene Buchstaben angegeben. Die Expression von AR zeigte keine statistischen Veränderungen in Korrelation zur Histologie. Darstellung von arithmetischem Mittelwert und Standardabweichung.

2.5. Ergebnisse der CAG-Repeatlängenbestimmung mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)

Bei der PAGE wurde das PCR-Produkt aus der PCR bzw. RT-PCR erneut im elektrischen Feld aufgetrennt. Durch die höhere Auflösung konnten die PCR-Produkte, die auf dem Agarosegel nur minimal unterschiedlich weit gelaufen waren, deutlicher aufgetrennt werden. Bei der PAGE konnte für jede Probe ein CAG-Wert ermittelt werden, indem die Laufweite mit Hilfe einer Eichkurve in die Basenpaarlänge umgerechnet wurde (Abb. 17).

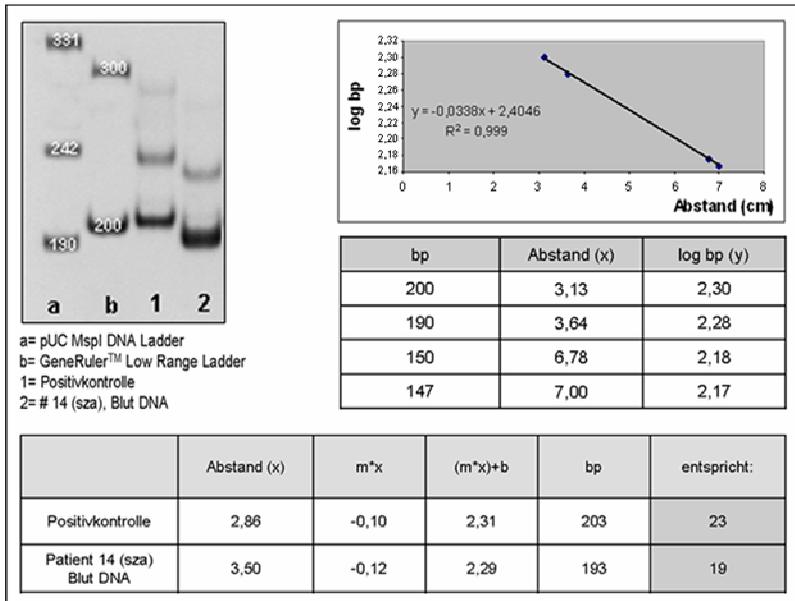


Abb. 17 Beispiel für eine Untersuchung mittels PAGE und Auswertung in Microsoft™ Excel

Alle untersuchten CAG-Repeatlängen befanden sich innerhalb der physiologischen Grenzwerte zwischen 12 und 27 Repeats.

Bei den Patienten mit einem monomorphen Bild der Spermatogenese (Patienten 1-23, Tab. 2) konnte bei drei von 17 Patienten (Patient 2, 4 und 12) ein Unterschied von mehr als zwei Repeats zwischen der untersuchten Blut-DNA und dem Hodengewebe nachgewiesen werden. Bei den verbliebenen 14 Patienten dagegen kam es höchstens zu einer Differenz von 1-2 Repeats zwischen den Geweben Blut und Hoden. Bei Patient 20 konnten mittels PAGE zwei CAG-Längen innerhalb der Blut-DNA nachgewiesen werden, ebenso bei der Fragmentlängenanalyse derselben DNA. Bei Patient 20 handelt es sich um einen Patienten mit Klinefelter-Syndrom (Genotyp 47XXY), so dass hier auch zwei unterschiedliche AR-Moleküle erwartet wurden.

Bei Patient 20 mit zwei CAG-Repeatlängen innerhalb der Blut-DNA konnte im untersuchten Hodengewebe nur ein einheitliches CAG-Repeat ermittelt werden, dass sich in der Länge an einem der beiden AR-Moleküle von nur einem X-Chromosom zu orientieren scheint.

Bei einem Vergleich der CAG-Repeatlängen innerhalb der untersuchten Gewebefractionen des Hodens konnte bei fünf Patienten (Patient 4, 11, 12, 16 und 23) ein Unterschied von mehr als zwei Repeats detektiert werden. Bei Patient 4, der eine normale Spermatogenese zeigt, konnte in Hodenhomogenat auf mRNA-Ebene im Vergleich zu den anderen Proben ein Unterschied von drei CAGs gezeigt werden. Bei einem weiteren Patienten (Patient 11, Tab. 2) konnte eine Differenz von 5 Repeats nachgewiesen werden. Dieser Unterschied wurde jedoch in diesem Fall mittels FLA bestimmt und konnte mittels PAGE nicht bestätigt werden. Das Ergebnis der PAGE konnte mittels Sequenzierung der entsprechenden PCR-Produkte bestätigt werden (Abb. 18). Bei Patient 12 konnte in dem getrennt mittels LACP gewonnenen interstitiellen Gewebe eine CAG-Repeatlänge von 18 ermittelt werden. In der DNA und mRNA des Gesamthodens und innerhalb der Sertolizellpopulation

zeigten sich dagegen durchweg höhere Werte, so dass eine maximale Differenz von sechs Repeats nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu konnte bei Patient 16 der niedrigste CAG-Wert innerhalb der Sertolizellfraktion dargestellt werden, der mit drei Repeats von den anderen untersuchten Hodenproben abwich. Bei Patient 23, von dem der rechte und der linke Hoden getrennt voneinander untersucht wurden, konnte sowohl zwischen den beiden Hoden als auch innerhalb der verschiedenen Zellpopulationen eines Hodens ein Repeatunterschied gezeigt werden. Während der rechte Hoden (SCO) einheitlich 19 bzw. 18 Repeats aufwies, konnten beim linken Hoden (hyp) 23 Repeats in der Gesamt-DNA bzw. -mRNA sowie in der Leydigzellfraktion ermittelt werden, in der Sertolizellfraktion jedoch nur 18 Repeats. Bei den Patienten mit einer einheitlichen Histologie der Spermatogenese konnte in 82% der untersuchten Proben von der CAG-Repeatlänge der Blut-DNA auf das CAG-Repeat im Hodengewebe geschlossen werden. In 78% der Fälle bestand auch kein Unterschied zwischen den Zellpopulationen des Hodens.

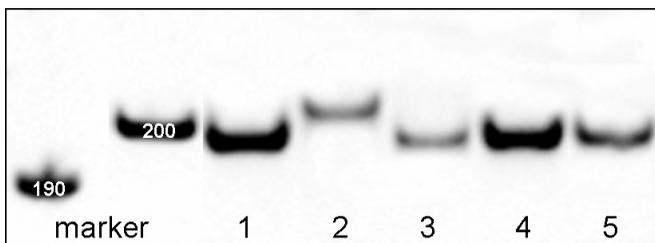


Abb. 18 Darstellung von CAG-Repeatunterschieden bei Patient 11 mittels PAGE

- marker = pUC Marker (Roth), GeneRuler™ Low Range (Fermentas)
- 1 = Blut (DNA)
- 2 = Hodenhomogenat (DNA)
- 3 = Hodenhomogenat (mRNA)
- 4 = Sertolizellen (mRNA)
- 5 = Interstitium (mRNA)

Bei den Patienten mit einer bunten Atrophie der Spermatogenese (Patienten 24-33, Tab. 2) wurde aus Mangel an Blut- und Hoden-DNA nur das Hodengewebe auf mRNA-Ebene untersucht. Neben der CAG-Bestimmung im Homogenat wurden die Sertolizellen aus Tubuli mit normaler und gestörter Spermatogenese mittels LACP getrennt voneinander gewonnen und untersucht. Bei fünf von zehn Patienten (Patient 25, 28-30 und 33, Tab. 2) konnte ein CAG-Repeatunterschied von bis zu 11 Repeats zwischen den untersuchten Proben gezeigt werden. Anders als bei den Patienten mit einer einheitlichen Histologie der Spermatogenese konnte bei Patienten mit einer bunten Atrophie das CAG-Repeat nicht eindeutig mit einer einzelnen Untersuchung bestimmt werden.

Sowohl bei den Patienten mit einer monomorphen Histologie (Abb. 19 A) als auch bei Patienten mit einer bunten Atrophie (Abb. 19 B) zeigten sich keine Korrelation zwischen CAG-Repeatlänge und histologischem Bild der Spermatogenese.

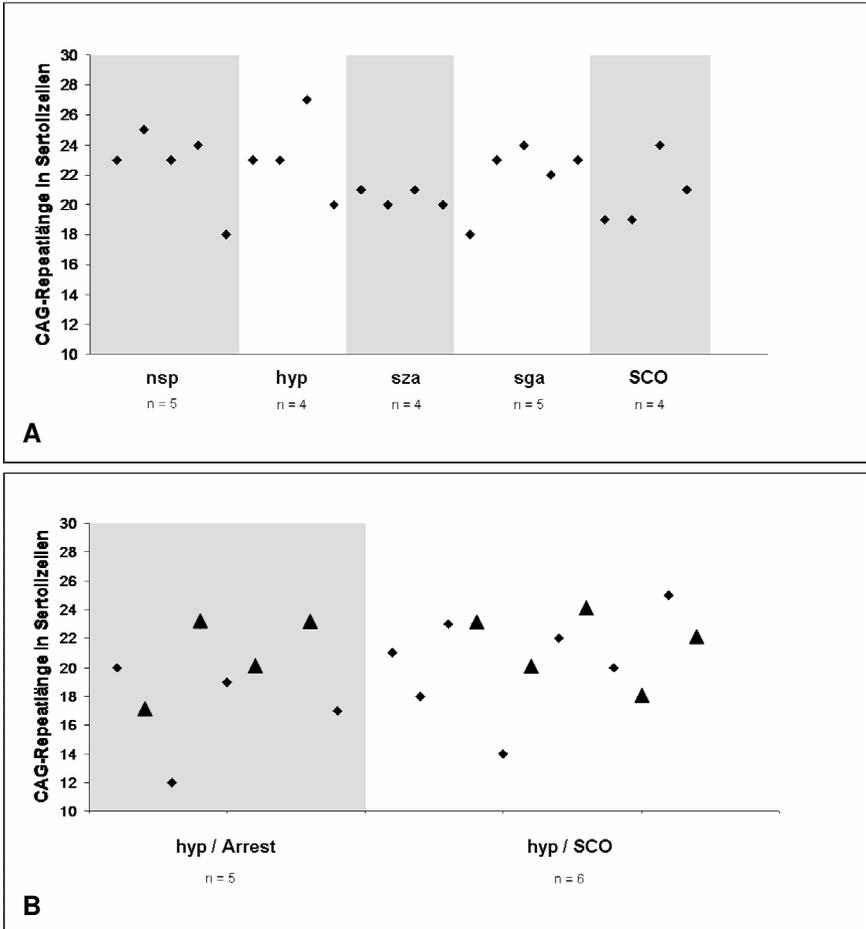


Abb. 19 Korrelation von CAG-Repeatlänge in Sertolizellen und Histologie

A Monomorphe Histologie

B Bunten Atrophie der Spermatogenese; CAG-Repeatlänge in den Tubuli mit einer Hypospermatogenese als Rhombus (◆), Repeatlänge in den Tubuli mit einem Arrest der Spermatogenese bzw. einem Sertoli-Cell-Only Syndrom als Dreieck (▲)

Zwischen der CAG-Repeatlänge in den Sertolizellen und dem histologischen Status der Spermatogenese besteht kein statistisch signifikanter Zusammenhang ($p > 0,05$).

2.6. Korrelation der Testosteron- und LH-Konzentration mit Histologie und CAG-

Repeat

Bei 29 von 33 Patienten liegen die Testosteron- und LH-Konzentration im Blut vor. Bei acht von diesen 33 Patienten (Patient 7, 10, 13, 15, 20, 25, 26 und 33, Tab. 2) lag die Testosteronkonzentration bei $\leq 12,0\text{nmol/l}$. Bei vier weiteren Patienten (Patient 6, 14, 16 und 32, Tab. 2) lag die Testosteronkonzentration zwischen $12,0\text{nmol/l}$ und $13,0\text{nmol/l}$. Bei drei der insgesamt zwölf Patienten mit erniedrigten Hormonwerten wurde deswegen eine Hormontherapie mit hCG (Patient 24) bzw. Testosteron-Gel (Patient 15 und 16, 50mg/d) durchgeführt.

Bei drei Patienten (Patient 9, 15 und 24) lag die LH-Konzentration unter der physiologischen Grenze von $0,8\text{IU/l}$. Die Testosteron- und LH-Konzentration im Blut zeigte keine Korrelation zu der CAG-Repeatlänge in den Sertolizellen (Abb. 20) und auch bei extrem unterschiedlichen histologischen Diagnosen gab es keinen Zusammenhang mit den Hormonwerten (Abb. 21).

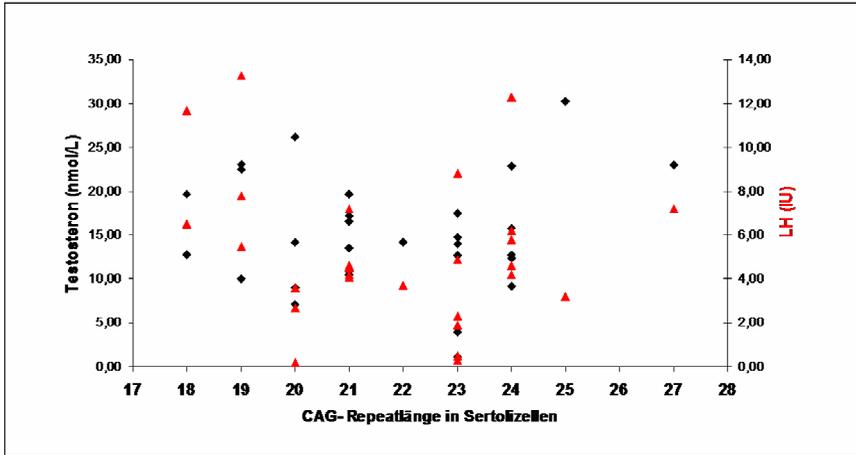


Abb. 20 Testosteron- und LH-Konzentration im Blut in Abhängigkeit von der CAG-Repeatlänge in den Sertolizellen
 Zwischen der CAG-Repeatlänge und der Testosteron-Konzentration (♦, in nmol/l) bzw. der LH-Konzentration (▲, in IU) besteht kein statistisch signifikanter Zusammenhang ($p > 0,05$).

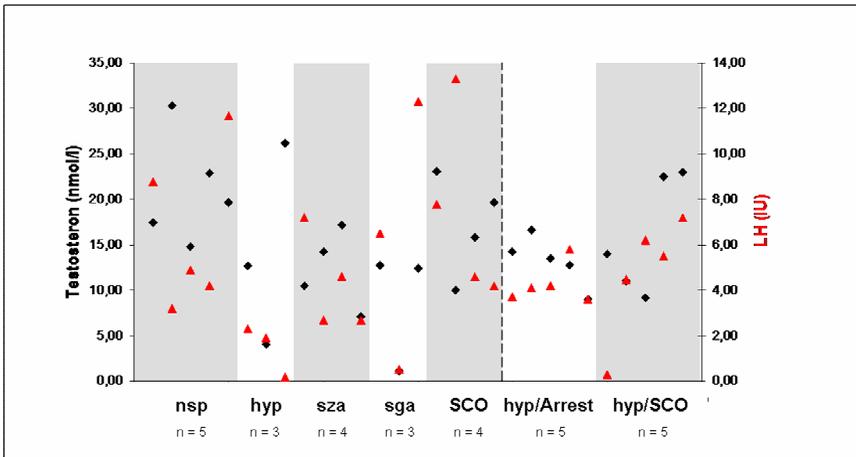


Abb. 21 Testosteron- und LH-Konzentration im Blut in Abhängigkeit von der Histologie
 Zwischen dem histologischen Status der Spermatogenese und der Testosteron-Konzentration (♦, in nmol/l) bzw. der LH-Konzentration (▲, in IU) besteht kein statistisch signifikanter Zusammenhang ($p > 0,05$).

3. Klonierung

Von acht Patienten (Patienten 1, 11, 13, 14, 19, 20, 22 und 24, Tab. 2) wurde das durch RT-PCR amplifizierte CAG-Repeat in den p-GEM@-T-Vektor ligiert und in JM109 E. coli (K12-Stamm) vermehrt. Insgesamt konnten 40 sequenzierfähige Klone gewonnen werden (Tab. 3).

Dabei zeigten sich innerhalb der Sertolizellpopulation dieser acht Patienten zum Teil gravierende Differenzen von bis zu sechs Repeats. Um die Möglichkeit eines somatischen Mosaiks abzuklären, wurde die Untersuchung der CAG-Repeatlängen mittels PAGE wiederholt, wobei sich zeigte, dass a) es keine multiplen CAG-Repeats innerhalb der untersuchten Sertolizellpopulation gab und b) bei der PAGE zum Teil vollkommen andere CAG-Repeatanzahlen ermittelt wurden. Bei der Re-Klonierung traten bei Verwendung der JM109 Zellen Fehler auf, von neun Klonen zeigten nur sechs die korrekte CAG-Repeatlänge. Bei einer Transformation in SURE@2 Zellen dagegen konnte in zehn von zehn Fällen das korrekte Repeat kloniert und sequenziert werden. Die Klonierung mit SURE@2 Zellen erwies sich zudem als deutlicher in der Sequenzierung als bei den JM109 Zellen.

Nr.	Histologie	CAG-Repeatlänge in Sertolizellen ermittelt mittels		Re-Klonierung der fett gedruckten (CAG) _n -Plasmide zu Kontrollzwecken
		PAGE	Klonierung	
1	nsp	23	20, 20, 21, 21, 21, 26, 26, 26, 26, 26	<u>SURE@2 cells</u> : 26, 26, 26, 26, 26, 26, 26, 26, 26, 26
11	sza	21	21, 21, 22, 22, 22	–
13	sza	20	19, 21	–
14	sga	18	19	–
19	SCO	19	20, 20, 20, 21, 21, 21, 25, 26, 26, 26, 26, 26	<u>JM109</u> : 21, 25, 26, 26, 26, 26, 26, 26, 28
20	SCO	19	22	–
22	SCO	21	22, 23, 23	–
24	hyp/SCO	23	24, 25, 25, 25, 25	–

Tab. 3 Sequenzierungsergebnisse und Ergebnisse der Re-Klonierung in JM109 und SURE@2

I. Diskussion

Trinukleotiderkrankungen wie SBMA (Tanaka et al. 1999a, Fischbeck et al. 1999), Fragile X Syndrom (Shimizu et al. 1996, de Vries et al. 1998) und Huntington' Disease (Gusella und MacDonald 1995a) sind seit Langem bekannt. Diese Krankheiten zeichnen sich durch eine massive Verlängerung einer Trinukleotidsequenz aus, die zu den spezifischen Krankheitssymptomen führt. Im Fall der SBMA kommt es zu einer massiven Verlängerung der CAG-Repeatsequenz des AR. Neben neuro-muskulären Ausfallserscheinungen und geistiger Retardierung treten auch Hodenatrophie und Azoospermie bei diesen Patienten auf. Aber auch bei gesunden Patienten ist bekannt, dass es sich bei dem CAG-Repeat um eine stark polymorphe Sequenz handelt mit einem physiologischen Rahmen von neun bis 36 (Andrew et al. 1997) bzw. 11 bis 31 Repeats (La Spada et al. 1991). Es stellen sich die Fragen, (a) warum es zu solchen Verlängerungen oder Verkürzungen kommen kann, (b) ob auch innerhalb physiologischer Grenzen das CAG-Repeat Einfluss auf die Spermatogenese nehmen kann und (c) ob die bei SBMA und Fragile X beobachteten somatischen Mosaik auch bei Patienten mit einer bunten Atrophie der Spermatogenese auftreten können.

Das Phänomen der Trinukleotidverlängerung (oder auch -verkürzung, auch wenn dies sehr viel seltener vorkommt) wurde intensiv mit Hilfe von Bakterien untersucht, bei denen Plasmide mit repetitiven Sequenzen eingeschleust wurden. Es zeigte sich, dass diese unterschiedlich langen Trinukleotidsequenzen oft nur schwer korrekt repliziert und auch sequenziert werden konnten, weil sie durch die Wiederholung der immer gleichen Basen zur Bildung von Sekundärstrukturen neigen. Besonders bei $(CAG)_n$ - $(CTG)_n$ oder anderen GC-reichen Bereichen kommt es durch die Ausbildung von drei Wasserstoffbrückenbindungen ($C \equiv G$, statt $A = T$) mit einer hohen

Wahrscheinlichkeit zur Bildung von DNA-Sekundärstrukturen wie *hairpins* und/oder *loops* der DNA (Richards und Sutherland 1994, Yu et al. 1995, Pearson und Sinden 1998) und damit zu einer Beeinträchtigung des Replikationskomplexes. Der Replikationsprozess kann durch die Störung der Polymerase vollständig abbrechen, da es zu Strangbrüchen kommt. Die Reparationsmechanismen der Zelle führen dann zu einer Expansion der Trinukleotidregion (Samadashwily et al. 1997). Möglich ist aber auch ein „Gleiten“ der Polymerase auf dem strukturveränderten DNA-Strang, der sich daraufhin im nächsten Zellzyklus wieder streckt. So kann es zu einer Expansion der Trinukleotidsequenz kommen. Deletionen sind prinzipiell auch möglich, treten aber seltener auf. Ob vor allem längere Trinukleotide die Replikation beeinflussen oder auch kürzere repetitive Bereiche (Samadashwily et al. 1997) oder ob die Länge der repetitiven Sequenz dabei keine Rolle spielt (Pelletier et al. 2003), wird kontrovers diskutiert. Bowater et al. (1996) untersuchten die Auswirkungen unterschiedlich langer CAG-Repeats, mit denen *E. coli* transfiziert wurden, auf die Replikation der Bakterien. Verwendet wurden Vektoren mit 17, 98 und 175 CAGs, wobei die größten Veränderungen bei den längsten Repeats beobachtet wurden. Samadashwily et al. (1997) beobachteten weiterhin, dass auch bei Hefen eine Expansion der repetitiven Sequenz möglich ist und vermuteten, dass das Phänomen auch auf den Menschen übertragbar sei.

Diese Theorie wurde dadurch bestätigt, dass es bei Fragile X Syndrom und Huntington' Disease zu einer Trinukleotidexpansion von einer Generation auf die nächste kommen kann. Bei Patienten mit Fragile X Syndrom kann sich die so genannte „Prämutation“, bei der eine Expansion des CGG-Repeats auf dem FMR1-Gen von normalerweise sechs bis 54 Repeats auf 43 bis 200 CGGs stattgefunden hat, von einer Generation auf die nächste (oder auch innerhalb der embryonalen

Entwicklung eines Individuums) zu einer Vollmutation (> 200 CGG-Repeats) entwickeln (de Vries et al. 1998). Auch Moe et al. (2008) haben solche Mutationen im Fen1-Gen bei Huntington' Disease entdeckt und führten dies entweder auf ein Gleiten der Polymerase auf dem DNA-Strang, die Entstehung von Haarnadelstrukturen oder Fehler in den DNA-Reparaturmechanismen der Zelle zurück.

Auch in unseren Untersuchungen konnten Probleme bei der Replikation von unterschiedlich langen CAG-Repeats in Bakterien festgestellt werden. Dabei wurden zwei verschiedene Bakterienstämme verwendet, beide negativ für das Gen Recombinase (recA-) und damit vom Hersteller als für „schwierige Klonierungen“ geeignet beschrieben. Bei der Klonierung der PCR-Produkte aller Patienten konnten unterschiedliche CAG-Repeatlängen festgestellt werden. Die maximale Differenz waren sechs Repeats. Eine wiederholte Transformation in E. coli JM109 führte zum Auftreten von verschiedenen langen (CAG)_n, dabei trat sowohl eine Expansion (+2 Repeats) als auch eine Deletion (-5 Repeats) auf. Erst die Verwendung eines anderen Bakterienstammes führte zu einem reproduzierbaren Ergebnis. Bei der Wiederholung der Klonierung mit SURE®2 Zellen kam es zu keinen Expansionen oder auch Deletionen im Insert. SURE Zellen (Stop Unwanted Rearrangement Events) werden speziell für Klonierungen von Produkten mit einer hoher Wahrscheinlichkeit von Sekundärstrukturbildungen verwendet. Unsere Ergebnisse zeigen also, dass es auch bei physiologischen CAG-Repeatlängen zu Störungen im Replikationsmechanismus der Bakterien kommen kann.

Um die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf den Menschen zu überprüfen, wurde die Trinukleotidsequenz im menschlichen Gewebe untersucht. Knoke et al. (1999)

bestimmten bei einem oligozoospermen Patienten die CAG-Repeatlänge in der DNA aus Blutlymphozyten und konnten eine Variabilität von 19 ± 1 (CAG)_n ermitteln. Bettencourt et al. (2010) konnten außerdem zeigen, dass nicht nur die Replikation gestört sein kann, sondern auch die Transkription von DNA zu mRNA. Bei der Machado-Joseph-Disease, einer Form der Spinozerebellären Ataxie (Typ 3), kommt es bei dem betroffenen Gen ATNX3 zu einer Expansion des CAG-Repeats auf 56 bis 84 Repeats (normal: 13 bis 41) (Yamada et al. 2008). Bettencourt et al. konnten zeigen, dass es bei der Transkription der ATNX3 DNA zu einer Elongation kommen kann, so dass die cDNA im Mittel ein CAG-Repeat mehr enthält als die DNA.

Doch nicht nur bei der normalen Replikation und Transkription im Zellzyklus können Trinukleotidsequenzen störend einwirken. Auch bei molekularbiologischen Untersuchungsmethoden müssen repetitive Sequenzen als Fehler- bzw. Störquellen beachtet werden. Um einen Methodenfehler bei unseren Untersuchungen auszuschließen, wurde immer eine Positivkontrolle mitgeführt, deren Repeatlänge zuvor mittels Sequenzierung festgestellt wurde, zudem wurden die Analysen wiederholt. Dabei traten immer wieder Abweichungen der Anzahl der bestimmten CAG-Repeats auf. In den meisten Fällen handelte es sich um kleine Abweichungen von 1-2 Repeats. Es kann also auch hier zu einem Gleiten der Polymerase bei der Amplifikation und eventuell auch bei der Transkription (bzw. reversen Transkription) kommen. Bei fünf Patienten mit einer einheitlichen Histologie der Spermatogenese (Patient 4, 11, 12, 16 und 23, Tab. 2) konnte ein Unterschied von bis zu sechs Repeats zwischen den untersuchten Geweben bzw. Zellpopulation festgestellt werden, so dass hier von einem „echten“ Unterschied ausgegangen werden kann. Bei Patienten mit einer bunten Atrophie der Spermatogenese konnten sogar noch größere Abweichungen zwischen Sertolizellen aus Tubuli mit normaler und gestörter

Spermatogenese festgestellt werden. Um die Methode weiter zu überprüfen, wurde ein Teil des Probenmaterials von dem Labor des Centers für Reproduktionsmedizin und Andrologie der Universität Münster mit einer weiteren Methode untersucht. Bei der dort angewandten Fragmentlängenanalyse kam es ebenso zu einer Abweichung von bis zu fünf Repeats innerhalb des Probenmaterials eines Patienten (zwischen Hodenhomogenat-mRNA und den anderen Fraktionen von Patient 11, Tab. 2). In einer Probe trat sowohl mittels Fragmentlängenanalyse als auch mittels PAGE eine Doppelbande auf. Bei Patient 20 (Tab. 2) konnten in der Blut-DNA zwei verschiedene CAG-Repeatlängen gezeigt werden, einmal 20 und 24 CAGs (FLA) bzw. 19 und 23 CAGs (PAGE). Vorberichtlich war allerdings bekannt, dass dieser Patient am Klinefelter-Syndrom erkrankt ist. Bei diesem Genotyp (47XXY) treten zwei X-Chromosome auf, so dass diese Patienten auch zwei unterschiedliche AR-Varianten aufweisen können. Zitzmann et al. (2004) zeigten, dass bei heterozygoten Männern ein X-Chromosom inaktiviert wird und es sich dabei meist um das mit dem kürzeren CAG-Repeat handelt. In unseren Untersuchungen hat sich allerdings gezeigt, dass bei Patient 20 scheinbar das X-Chromosom mit dem längeren Repeat inaktiviert wurde, da im Hoden die kürzeren Repeats exprimiert sind.

Aber auch bei Patienten, die nicht an dem Klinefelter-Syndrom litten, traten immer wieder mehrere Banden im PAGE-Gel auf. Chastain und Sinden (1998) haben entdeckt, dass lange Trinukleotidsequenzen im elektrischen Feld ein anderes Wanderungsverhalten zeigen als kurze Repeats. Zhang et al. (1994) haben das Phänomen ebenfalls beobachtet und als „Heteroduplex“ bezeichnet. In einem nicht-denaturierenden Gel können sich Produkte aus verschiedenen PCR-Zyklen zusammenlagern und so zusätzliche Banden bilden. Außerdem beschreibt er eine schwache, knapp unter dem Hauptprodukt liegende Bande als typisch bei der Amplifizierung und Elektrophorese von Trinukleotidrepeats. Diese Heteroduplexe

wandern durch ihre Größe, Faltung und damit Komplexität langsamer im elektrischen Feld als „normale“ PCR-Produkte. Die Banden, die auch bei unseren Versuchen über der eigentlich PCR-Bande in der PAGE erscheinen, stellen demnach wahrscheinlich solche Heteroduplexe dar, da die betreffenden PCR-Produkte sequenziert wurden und nur eine CAG-Repeatlänge enthielten. Inwiefern solche „Mehrfachbanden“ oder ein so genanntes „Leiterphänomen“ in einer Probe einem Heteroduplexphänomen entstammen oder ob sie eine tatsächliche Gewebheterogenität diagnostizieren, muss dementsprechend mit Versuchswiederholungen und/oder Sequenzierungen weiter untersucht werden.

Beim Auftreten von Mehrfachbanden oder auch einfach nur Unterschieden in der CAG-Repeatlänge innerhalb der Proben eines Patienten stellt sich also die Frage, ob es sich bei diesem Phänomen um ein echtes somatisches Mosaik, einen Fehler in der Arbeit der Polymerasen oder um das Auftreten von Heteroduplexen handelt. Das Auftreten eines somatischen Mosaiks im Zusammenhang mit Trinukleotidkrankungen ist kein unbekanntes Phänomen. Tanaka et al. (1999b) konnten bei Patienten mit SBMA ein somatisches Mosaik des verlängerten CAG-Repeats in verschiedenen Geweben nachweisen. Sie machten allerdings nicht die unterschiedlichen Zelltypen für das Auftreten des Mosaiks verantwortlich, sondern vielmehr die Länge des Repeats selbst und die Expression des AR im Gewebe. Eine Beteiligung der postnatalen Zellteilung an der Entstehung somatischer Mosaik sei eher unwahrscheinlich, da sich das CAG-Repeat bei Kennedy's Disease als stabil herausgestellt habe. In der Herz- und Skelettmuskulatur, in Haut, Prostata und dem Hoden konnten mittels ALFred Technologie verschiedene CAG-Repeatlängen detektiert werden. Der Hoden war sogar eines der Gewebe mit der größten Variabilität der CAG-Repeatlänge. Auch in unseren Untersuchungen konnten wir bei

Patienten mit einer bunten Atrophie der Spermatogenese eine Gewebheterogenität der CAG-Repeats feststellen. Untersucht wurde das Repeat in Sertolizell-mRNA aus Tubuli mit einer normalen bzw. Hypospermatogenese und Tubuli mit einem Reifungsarrest bzw. einem SCO. Bei fünf der zehn untersuchten Biopsien konnten wir einen Unterschied in der Repeatlänge von bis zu 11 Repeats feststellen. Und auch bei drei Biopsien mit einheitlicher Histologie konnte ein Unterschied zwischen Sertoli- und Leydigzellen von bis zu fünf Repeats gezeigt werden. Allerdings konnte bei der Untersuchung des dazugehörigen Hodenhomogenats auf mRNA-Ebene kein Mosaik detektiert werden. Ein ähnliches Phänomen zeigten auch Alvarado et al. (2005) in ihren Untersuchungen von Prostatakarzinomschnitten mittels LACP. Sie stellten fest, dass bei allen untersuchten Proben, bei denen unveränderte und pathologische veränderte Prostataabschnitte getrennt voneinander untersucht wurden, ein somatisches Mosaik des CAG-Repeats im AR vorlag. Auch hier lag der maximale Unterschied bei 11 CAGs. In frischem Gefriermaterial von Prostatakarzinompatienten konnte ebenfalls ein Mosaik ermittelt werden. Allerdings wurde kein paraffin-eingebettetes Homogenatmaterial von den Proben, die auch die LACP durchliefen, untersucht. In Hoden- und anderen Gewebhomogenaten konnte diese Gruppe kein somatisches Mosaik bestimmen.

Wie schon von Tanaka et al. (1999b) gezeigt, scheint es in jedem Gewebe eine vorwiegend exprimierte CAG-Repeatlänge zu geben (in der oben genannten Studie zeigt der höchste Peak bei der ALFred Untersuchung diese Repeatlänge an). Da die Technik der RT-PCR und der nachfolgenden PAGE weniger sensitiv ist als die Fragmentlängenanalyse, gehen wir davon aus, dass bei der Untersuchung unserer Proben nur die dominant vertretene CAG-Repeatlänge dargestellt bzw. sequenziert werden konnte. Das würde ein Fehlen von Doppelbanden in den Homogenatproben erklären, wenn eine CAG-Repeatdifferenz zwischen Sertoli- und Leydigzellen bzw.

Sertolizellen aus unterschiedlichen Histologien festgestellt werden konnte. Eine Abklärung des Phänomens könnte durch die Untersuchung unseres Probenmaterials mittels ALFred-Technik erreicht werden.

Außerdem stellte sich die Frage, wie das histologische Bild einer bunten Atrophie der Spermatogenese, bei der Keimtubuli mit normaler Spermatogenese neben solchen mit Spermatogenesestörungen liegen (Sigg 1979), zu Stande kommen kann. Spermatogenesedefekte, die sich in einer monomorphen Histologie manifestieren, sind mit einer Störung der Sertolizelldifferenzierung assoziiert (Bruning et al. 1993, Sharpe et al. 2003, Brehm et al. 2006).

Ein Grund für die Funktionsstörung von Sertolizellen kann also eine Mutation des AR, eine Differenzierungsstörung der Sertolizellen im Allgemeinen oder eine veränderte Proteinbiosynthese der Sertolizellen sein. Da in unseren Untersuchungen gezeigt wurde, dass die CAG-Repeatlänge nicht mit der Histologie korreliert und auch die Expression des AR nicht signifikant mit dem histologischen Status der Spermatogenese und der CAG-Repeatlänge korreliert ist, haben wir die Expression eines Sertolizell-spezifischen Proteins, des *androgen binding proteins*, ABP, untersucht. ABP wird von den Sertolizellen sezerniert und ermöglicht den Transport von Testosteron. Wir konnten zeigen, dass die ABP-Expression bei Patienten mit einer gestörten Spermatogenese (Reifungsarreste oder SCO) im Vergleich zu Patienten mit einer normalen Spermatogenese signifikant verringert exprimiert wird. Allerdings konnte auch hier kein Zusammenhang zu ermittelten CAG-Repeatlänge gefunden werden, was mit den Ergebnissen von Huhtaniemi et al. (2009) konform ist. In seiner Studie wurden die SHBG-Werte (*sex hormone binding globulin*) im Zusammenhang mit der CAG-Repeatlänge aus Blut-Lymphozyten untersucht, wobei sich jedoch kein signifikanter Zusammenhang zeigte. Da wir die AR- und ABP-

Expression nicht an LACP-Material, sondern nur im Hodenhomogenat untersucht haben, zeigte sich bei den Patienten mit bunter Atrophie ein Summationsbild aus Hypospermatogenese- und Reifungsarrest bzw. SCO-Tubuli, so dass diese Proben nicht in die statistische Auswertung einbezogen wurden. Die Unterschiede in der ABP-Expression zwischen Patienten mit Hypospermatogenese und Arrest der Spermatogenese sowie Hypospermatogenese und SCO erreichten das Signifikanzlevel nicht.

In unseren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass es keine Korrelation zwischen CAG-Repeatlänge und Histologie gibt, d.h. auch bei fertilen Männern, die wegen einer Refertilisierung nach Vasektomie biopsiert wurden und eine normale Spermatogenese aufwiesen, konnte in fast allen Fällen ein recht langes Trinukleotid von 23 bis 27 CAGs nachgewiesen werden (Patient 1 - 4 und 6 - 8, Tab. 2). Patient 8 mit 27 Repeats zeigt eine quantitativ gestörte Spermatogenese. Da die CAG-Repeatlänge weder mit einer hochgradig gestörten Spermatogenese noch mit quantitativ gestörter bzw. normaler Spermatogenese korreliert, kann das CAG-Repeat, wenn es im physiologischen Rahmen verlängert oder verkürzt ist, nicht kausal für die Spermatogenesestörungen verantwortlich sein.

Neben den vielfältigen Meinungen über die Auswirkungen bzw. den Grad der durch das verlängerte CAG-Repeat auftretenden Fertilitätsstörung, sind auch die möglichen Ursachen noch nicht vollkommen aufgedeckt. Eine Änderung der dreidimensionalen Struktur der Transaktivierungsdomäne durch eine Verlängerung bzw. Verkürzung des CAG-Repeats (Hose et al. 2009) kann zu einer veränderten Ansprechbarkeit des Rezeptors auf Testosteron führen, so dass die Funktionalität des AR eingeschränkt wird. Neben einer Veränderung der dreidimensionalen Struktur des AR muss auch

die Theorie von Schiffer et al. (2008) berücksichtigt werden. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass AR-Moleküle mit einer verlängerten Trinukleotidsequenz „normale“ Rezeptormoleküle binden und so inaktivieren können. Die Studie wurde allerdings mit künstlich hergestellten AR-Molekülen durchgeführt und der stärkste Effekt bei einer Repeatlänge von 201 bis 306 CAGs beobachtet. In allen anderen Studien, die sich mit dem Zusammenhang zwischen Trinukleotidrepeat und Fertilität befassen, lag die Repeatlänge im physiologischen Bereich (Dowsing et al. 1999, von Eckardstein et al. 2001, Mifsud et al. 2001), nur bei Untersuchungen der SBMA wurden Patienten untersucht, bei denen die Trinukleotidsequenz mehr als 40 CAGs aufwies (La Spada et al. 1991).

Von mehreren Studien wird bestätigt, dass eine Verlängerung des CAG-Repeats zu einer verminderten Transaktivierungsfunktion des Androgenrezeptors und damit auch zu einem Androgeninsensitivitätssyndrom (AIS) führen kann. Dies könne auf eine Beeinflussung eines Bereichs der Transaktivierungsdomäne, die *activation function* (AF-1), durch das CAG-Repeat des AR zurückgeführt werden. Bei den Steroidhormonrezeptoren unterscheidet man mindestens zwei Transaktivierungsfunktionen (TAFs), AF-1 und AF-2. Bei den meisten Steroidhormonrezeptoren ist die AF-2 in der liganden-bindenden Domäne die für die Aktivität der Rezeptoren als Transkriptionsfaktor am wichtigsten. Dies ist beim AR anders, hier ist die AF-1 in der N-terminalen Domäne für die Transaktivierungsfunktion essentiell während die AF-2 in ihrer Bedeutung zurücksteht (Übersicht bei Sadar 2011). Für die Transkriptionsaktivierung ist auch beim AR die koordinierte Aktivierung beider TAFs und die Rekrutierung von Co-Faktoren essentiell. Eine Strukturänderung durch das Verlängern der Repeatsequenz kann demnach zu einem veränderten Bindungsverhalten der AF-1 mit den Co-Faktoren führen, denn schon leichte

Veränderungen im CAG-Repeat verändern die dreidimensionale Struktur maßgeblich (Hose et al. 2009). Co-Faktoren wie p160 binden an die AF-1, eine Verlängerung des CAG-Repeats kann zu einer verminderten Bindung und damit zu AIS führen (Tut et al. 1997, Wallerand et al. 2001).

AIS ist in verschiedenen Schweregraden bekannt: *partial* AIS (PAIS) mit idiopathischer Infertilität und unverändertem äußeren Genitale, *mild* AIS (MAIS) mit Zeichen der Gynäkomastie (weibliche Fettverteilung in der Körpermitte, verstärktes Brustwachstum) bis hin zu *complete* AIS (CAIS) mit weiblichem äußeren Genitale (Quigley et al. 1995, Rajender et al. 2007). Zwischen diesen Formen sind die Grenzen fließend. Während diese Arbeitsgruppen die entstehenden Symptome eines AIS allein auf die Verlängerung des CAG-Repeats und damit auf die verminderte Transaktivierungsfunktion des AR zurückführen, machten Huhtaniemi et al. (2009, 2010) eine allgemein veränderte Hormonsituation für die Ausprägung des Phänotyps verantwortlich. Ihrer Theorie nach wird eine verringerte Testosteronsensitivität durch einen erhöhten Blut-Testosteronwert ausgeglichen. Da das Verhältnis zwischen Testosteron und Östrogen, welches irreversibel aus Testosteron synthetisiert wird, stets gleich bleiben muss, geht mit einem Testosteronanstieg auch immer eine Erhöhung der Serum-Östrogenwerte einher (Huhtaniemi et al. 2009). Die Symptome des AIS wie Gynäkomastie, Unfruchtbarkeit und Libidoverlust sollen demnach eher auf einen Anstieg der Östrogene als auf einen Abfall des Testosterons bzw. eine Testosteroninsensitivität zurückzuführen sein. In unseren Untersuchungen konnten wir keinen Zusammenhang zwischen der Testosteron- und LH-Konzentration im Blut, der CAG-Repeatlänge und der histologischen Situation im Hoden herstellen. Auch extreme Spermatogenesestörungen wie SCO und Arreste gehen in unserer Studie nicht mit einer reflektorischen Erhöhung des Testosterons einher.

Regadera et al. (2001) zeigten in ihrer Studie, dass eine gestörte Spermatogenese bei Patienten mit Kryptorchismus mit einer reduzierten AR-Expression einhergehen kann, was wiederum zu einem AIS führen würde. Dabei untersuchten sie Biopsien kryptorchider Patienten, die entweder Tubuli mit Keimzellen, Tubuli mit einem reinen SCO oder Tubuli mit unreifen bzw. de-differenzierten Sertolizellen enthielten. Auch bei unseren Patienten trat viermal Kryptorchismus als Anamnese auf (Patient 18, 23, 25 und 28, Tab. 1), aber bei keinem dieser Patienten konnte eine reduzierte AR-Expression vermerkt werden. Zudem konnten keine Zeichen einer De-Differenzierung der Sertolizellen festgestellt werden.

Da wir bei unseren Untersuchungen keine Korrelation zwischen CAG-Repeatlänge und histologischem Status der Spermatogenese oder dem Grad der Sertolizelldifferenzierung feststellen konnten, können wir keinen Zusammenhang zwischen der CAG-Repeatlänge und männlicher Infertilität sehen. Bei Studien, die einen Zusammenhang in ihren Untersuchungen darstellen konnten, wurde das CAG-Repeat aus Blutlymphozyten-DNA bestimmt und die Aussage über die Fertilität der Patienten wurde durch eine Ejakultanalyse bestimmt und nicht histologisch auf Hodenebene. Bei der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass alle CAG-Repeats, die in den verschiedenen Geweben (Blut und Hoden) bzw. in den verschiedenen Zellpopulationen des Hodens ermittelt werden konnten, innerhalb der physiologischen Grenzen von neun bis 36 (Andrew et al. 1997) bzw. 11 bis 31 Repeats (La Spada et al. 1991) liegen. Die vorliegende Arbeit ist unseres Wissens nach, neben Studien von Dakouane-Giudicelli et al. (2006) und Casella et al. (2003), die erste Untersuchung der Korrelation zwischen CAG-Repeatanzahl und Histologie der Spermatogenese auf Ebene der AR-exprimierenden Zellen des Hodens. Dakouane- Giudicelli et al. (2006) haben 28 Männer im Alter von 53 bis 102 Jahren

untersucht, 23 der Probanden waren über 70 Jahre alt. Das Hodengewebe wurde nach dem Tode entnommen und histologisch untersucht. Von den 28 Patienten zeigten 13 eine ungestörte Spermatogenese und 15 eine gestörte Spermatogenese. In der zweiten Gruppe zeigten vier Histologien einen Spermatidenarrest und in 11 Biopsien konnte ein Spermatogonien- bzw. Spermatozytenarrest, sowie ein SCO diagnostiziert werden. Das CAG-Repeat wurde in dieser Arbeit aus Hoden-DNA bestimmt, ein Zusammenhang zwischen der Länge der repetitiven Sequenz und der Histologie der Spermatogenese konnte nicht gezeigt werden. Dakouane-Giudicelli et al. (2006) schlussfolgerten, dass das CAG-Repeat aus dem Blut keinen Hinweis auf die Histologie im Hoden der von ihnen untersuchten älteren Männer geben kann. Casella et al. (2003) dagegen konnten durchaus einen Zusammenhang zwischen dem CAG-Repeat und der Hodenhistologie feststellen. Dabei wurden Patienten aus mehreren Gruppen untersucht, neben Patienten mit hyp, SCO oder Spermatogenese-arresten, die histologisch diagnostiziert wurden, auch „normale“ Kontrollpatienten, die durch eine bewiesene Vaterschaft als „fertil“ definiert wurden. Die Arbeitsgruppe bestimmte das CAG-Repeat aus Blutlymphozyten und ermittelte eine mittlere Repeatlänge von $22,0 \pm 3,9$ CAGs bei den unfruchtbaren Patienten ($22,0 \pm 3,01$ bei SCO, $22,0 \pm 3,06$ bei Spermatogenese-arresten und $23,0 \pm 3,63$ bei Patienten mit hyp) und $21,0 \pm 3,9$ bei den Kontrollen. Zwischen den Kontrollen und schwerwiegenden Spermatogenesestörungen bestand kein signifikanter Unterschied in der CAG-Repeatlänge, sondern nur zwischen den Kontrollpatienten und den Patienten mit hyp. Das bedeutet allerdings nicht, dass die Kontrollpatienten eine quantitativ und qualitativ intakte Spermatogenese aufwiesen, da keine Hodenbiopsien durchgeführt wurden. Zudem fällt auf, dass die Repeatunterschiede zwischen „fertil“ und „infertil“ mit nur 1-2 Repeats sehr gering sind. Ähnliche Zahlen konnte zum Beispiel auch die Arbeitsgruppe Mifsud et al. (2001) zeigen. Die „fertilen“

Patienten wiesen in dieser Studie im Mittel $20,72 \pm 0,52$ CAGs auf, die infertilen Patienten dagegen $21,95 \pm 0,31$ CAGs. Trotz dieser geringen Unterschiede bestätigten auch Mifsud et al. einen Zusammenhang zwischen CAG-Repeatlänge und männlicher Fertilität und postulierten ein vierfach erhöhtes Risiko für die Entstehung einer Azoospermie bei ≥ 26 Repeats (Mifsud et al. 2001). Die Frage bleibt, ob die Länge des CAG-Repeats überhaupt einen Einfluss auf die Spermatogenese bzw. die Fertilität hat, und wenn ja, ab wann von einem erhöhten Infertilitätsrisiko gesprochen werden kann. Die Arbeitsgruppe Davis-Dao et al. (2007) hat deswegen 33 Studien zum Zusammenhang zwischen Trinukleotidexpansion auf Exon 1 des AR-Gens und männlicher Infertilität in einer Meta-Analyse zusammengeführt und eine geringgradige positive Korrelation zwischen CAG-Polymorphismen und idiopathischer Infertilität ermittelt. Im Gegensatz zu Huhtaniemi et al. (2009) machen Nenonen et al. (2010) nicht generell ein verlängertes CAG-Repeat für ein erhöhtes Subfertilitätsrisiko verantwortlich, sondern auch Repeats, die in ihrer Länge eher im unteren Bereich der Normalverteilung liegen. Eine gestörte AR-Funktion könne also selbst im physiologischen Bereich sowohl von kurzen als auch von langen Repeats verursacht werden. In unseren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass auch Patienten mit einer normalen Spermatogenese (Patient 5 und 8, Tab. 2) ein kurzes bzw. langes Repeat innerhalb der physiologischen Grenzwerte exprimieren können. Im Gegensatz dazu zeigten viele Patienten mit einer schwerwiegend gestörten Spermatogenese eine CAG-Repeatlänge im mittleren physiologischen Bereich.

In unseren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass kein Zusammenhang zwischen den Spermatogenesestörungen der untersuchten Patienten und deren CAG-Repeatlänge besteht. Da auch bei schwerwiegenden Spermatogenesestörungen das

CAG-Repeat nicht verlängert ist, kann es nicht die Ursache für die Sertolizellfunktionsstörung sein. Gleichzeitig konnten wir zeigen, dass das CAG-Repeat in Blutlymphozyten-DNA die Situation im Hodengewebe gut widerspiegelt und deswegen weiterhin für die Bestimmung herangezogen werden kann. Dennoch kann das CAG-Repeat unserer Meinung nach nicht als molekularer Marker für Spermatogenesestörungen bezeichnet werden, da wir keine Zusammenhänge zwischen der Repeatlänge und definierten histologischen Befunden feststellen konnten.

J. Zusammenfassung

In der vorliegenden Doktorarbeit sollte geklärt werden, inwieweit ein Zusammenhang zwischen dem polymorphen CAG-Repeat des humanen Androgenrezeptors (AR) und a) der Histologie der ungestörten und auch gestörten Spermatogenese, b) der AR- und ABP-Expression selbst und c) der Testosteronkonzentration im Blut besteht.

Das CAG-Repeat ist bekannt durch die spino-bulbäre Muskelatrophie (SBMA, Kennedy's Disease), die neben den neuro-muskulären Degenerationen mit einer Beeinträchtigung der Fruchtbarkeit einhergeht. Bei dieser Erkrankung ist zudem das Vorkommen von Mosaiken bekannt, d.h. das Auftreten unterschiedlich langer CAG-Repeats im AR-Gen verschiedener Gewebe. Es stellte sich die Frage, ob auch ein moderat verlängertes, aber immer noch innerhalb der physiologischen Grenzen liegendes CAG-Repeat Einfluss auf die männliche Fertilität nehmen kann. Darüber hinaus war fraglich, ob die Bestimmung des Trinukleotidrepeats aus dem Blut als diagnostisches Werkzeug verwendet werden kann, oder ob zwischen den Kompartimenten Blut und Hoden bzw. innerhalb der Zellpopulationen im Hoden selbst ein somatisches Mosaik besteht.

Deswegen untersuchten wir das CAG-Repeat nicht nur in der DNA aus Blutlymphozyten, sondern auch in den Zellpopulationen des Hodens auf DNA und mRNA-Ebene. Einzelne Zellpopulationen konnten durch die Technik des Laser-assistierten Zellpicking (LACP) isoliert voneinander gewonnen und untersucht werden. Verwendet wurden zwei verschiedene Techniken zur Bestimmung des CAG-Repeats. Zum einen wurde die Fragmentlängenanalyse als Standardmethode durchgeführt, zum anderen die in diesem Zusammenhang neue native Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE).

Wir konnten Folgendes mit unseren Untersuchungen zeigen:

- a) alle von uns bestimmten Repeats waren innerhalb der physiologischen Grenzen
- b) es gibt keinen Zusammenhang zwischen dem CAG-Repeat und dem histologisch definierten Spermatogenesestatus
- c) die AR-Expression im Hoden ist unabhängig von Spermatogenesestörungen und CAG-Repeatlänge
- d) die ABP-Expression ist bei Spermatogenesestörungen signifikant herunterreguliert, aber ebenfalls unabhängig von der CAG-Repeatlänge
- e) die CAG-Repeatbestimmung innerhalb der physiologischen Grenzen ist anfällig für Störungen der Polymeraseaktivität durch Bildung von DNA-Sekundärstrukturen
- f) bei Patienten mit einer bunten Atrophie der Spermatogenese können Unterschiede in der CAG-Repeatlänge zwischen Sertolizellen auftreten, die aus Tubuli mit normaler und gestörter Spermatogenese stammen

Störungen in der Replikation und Transkription können durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen Guanin und Cytosin bei CAG-Repeats leicht entstehen und sind als Ursache von Replikationsabbrüchen bei Bakterien und Hefen schon lange bekannt.

Weitere Untersuchungen in der Arbeitsgruppe sollen klären, inwieweit auch im physiologischen Rahmen liegende CAG-Repeats die Expression von Zielgenen des AR beeinflussen können und ob es eine optimale CAG-Repeatlänge für die AR-Funktion gibt.

K. Summary

It was the aim of this doctoral thesis to elucidate, whether there is a connection between the polymorphic CAG repeat of the human androgen receptor (AR) and a) normal and impaired spermatogenesis, b) AR and ABP expression itself and c) testosterone concentration in the peripheral blood.

The CAG repeat has gained interest in the context of spinal bulbar muscular atrophy (SBMA, Kennedy's disease), which is not only characterized by neuromuscular degeneration but also impairment of fertility in men. In SBMA, mosaics are known to occur, meaning that distinct CAG repeat lengths in the AR gene in different tissues exist. It is in question, whether also moderate expanded but still physiological CAG repeats may influence spermatogenesis. At the same time it is questionable, if the determination of CAG repeat length in peripheral blood is a useful diagnostic tool for spermatogenic impairment detection or if a somatic mosaicism between blood and testis in within the testis itself exists.

For this purpose, we were not only examining CAG repeat in blood lymphocyte DNA, but also in different cell populations of the testis on DNA and mRNA level. Single cell populations were assessed separately by applying laser assisted cell picking (LACP) technique and examined independently from each other. We used two different methods for CAG length determination, fragment length analysis as standard method on the one, and native additionally polyacrylamide gel electrophoresis on the other hand.

We were able to show the following results:

- a) all assessed CAG repeats were within the physiological range
- b) there is no correlation between CAG repeat length and histologically assessed status of spermatogenesis
- c) the AR expression is independent of CAG repeat length and impairment of spermatogenesis
- d) the ABP expression is significantly down regulated in patients with severely impaired spermatogenesis but independent of CAG repeat length
- e) determination of CAG repeat length within the physiological range is susceptible for polymerase failure due to the formation of secondary DNA structures
- f) patients showing a mixed atrophy of spermatogenesis show CAG length differences in Sertoli cell populations originating from tubules showing normal or impaired spermatogenesis

Defects of replication and transcription machinery may be caused by H⁺ bondings between the bases Guanin and Cytosin, which develop easily and are known to stop replication processes in bacteria and yeast.

Further experiments in this working group have to elucidate, whether even CAG repeats within the physiological range can influence gene expression of AR target genes and if an ideal CAG repeat length for AR function exists.

L. Literaturverzeichnis

- Alvarado C, Beitel LK, Sircar K, Aprikian A, Trifiro M, Gottlieb B (2005) Somatic mosaicism and cancer: a micro-genetic examination into the role of the androgen receptor gene in prostate cancer. *Cancer Res.* 65(18):8514-8518. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0399.
- Andrew SE, Goldberg YP, Hayden MR (1997) Rethinking genotype and phenotype correlations in polyglutamine expansion disorders. *Hum. Mol. Genet.* 6(12):2005-2010.
- Badran WA, Fahmy I, Abdel-Megid WM, Elder K, Mansour R, Kent-First M (2009) Length of androgen receptor-CAG repeats in fertile and infertile Egyptian men. *J. Androl.* 30(4):416-425. doi:10.2164/jandrol.108.005843.
- Behre HM, Kliesch S, Pühse G, Reissmann T, Nieschlag E (1997) High loading and low maintenance doses of a gonadotropin-releasing hormone antagonist effectively suppress serum luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and testosterone in normal men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82(5):1403-1408.
- Bennett NC, Gardiner RA, Hooper JD, Johnson DW, Gobe GC (2010) Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42(6):813-827. doi:10.1016/j.biocel.2009.11.013.
- Bergh A, Damber JE (1992) Immunohistochemical demonstration of androgen receptors on testicular blood vessels. *Int. J. Androl.* 15(5):425-434. doi: 10.1111/j.1365-2605.1992.tb01357.x.
- Bergmann M, Nashan D, Nieschlag E (1989) Pattern of compartmentation in human seminiferous tubules showing dislocation of spermatogonia. *Cell Tissue Res.* 256:183-190.
- Bergmann M (2005) Spermatogenesis - physiology and pathophysiology. *Urologe A* 44(10):1131-1132, 1134-1138. doi:10.1007/s00120-005-0909-2.
- Bergmann M, Kliesch S (2010) Testicular biopsy and histology. In: Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (Eds.) *Andrology. Male Reproductive Health and Dysfunction.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 155–167.
- Bettencourt C, Santos C, Montiel R, Kay T, Vasconcelos J, Maciel P, Lima M (2010) The (CAG)_n tract of Machado-Joseph Disease gene (ATXN3): a comparison between DNA and mRNA in patients and controls. *Eur. J. Hum. Genet.* 18(5):621-623. doi:10.1038/ejhg.2009.215.
- Bowater RP, Rosche WA, Jaworski A, Sinden RR, Wells RD (1996) Relationship between *Escherichia coli* growth and deletions of CTG.CAG triplet repeats in plasmids. *J. Mol. Biol.* 264(1):82-96. doi:10.1006/jmbi.1996.0625.
- Brehm R, Rey R, Kliesch S, Steger K, Marks A, Bergmann M (2006) Mitotic activity of Sertoli cells in adult human testis: an immunohistochemical study to characterize Sertoli cells in testicular cords from patients showing testicular dysgenesis syndrome. *Anat. Embryol.* 211(3):223-236. doi:10.1007/s00429-005-0075-8.
- Brinkmann AO, Blok LJ, de Ruiter PE, Doesburg P, Steketeer K, Berrevoets CA, Trapman J (1999) Mechanisms of androgen receptor activation and function. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 69(1-6):307-313.
- Bruning G, Dierichs R, Stümpel C, Bergmann M (1993) Sertoli cell nuclear changes in human testicular biopsies as revealed by three dimensional reconstruction. *Andrologia* 25(6):311-316.

- Casella R, Maduro MR, Misfud A, Lipshultz LI, Yong EL, Lamb DJ (2003) Androgen receptor gene polyglutamine length is associated with testicular histology in infertile patients. *J. Urol.* 169(1):224-227. doi:10.1097/01.ju.0000035361.18870.6e.
- Cerilli LA, Kuang W, Rogers D (2010) A practical approach to testicular biopsy interpretation for male infertility. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 134(8):1197-1204.
- Chastain PD, Sinden RR (1998) CTG repeats associated with human genetic disease are inherently flexible. *J. Mol. Biol.* 275(3):405-411. doi:10.1006/jmbi.1997.1502.
- Claessens F, Verrijdt G, Haelens A, Callewaert L, Moehren U, d'Alesio A, Tanner T, Schauwaers K, Denayer S, van Tilborgh N (2005) Molecular biology of the androgen responses. *Andrologia* 37(6):209-210. doi:10.1111/j.1439-0272.2005.00698.x.
- Clermont Y (1963) The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am. J. Anat.* 112:35-51. doi:10.1002/aja.1001120103.
- Cooper TG (2011) The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian J. Androl.* 13(1):130-138. doi:10.1038/aja.2010.97.
- Dadze S, Wieland C, Jakubiczka S, Funke K, Schröder E, Royer-Pokora B, Willers R, Wieacker PF (2000) The size of the CAG repeat in exon 1 of the androgen receptor gene shows no significant relationship to impaired spermatogenesis in an infertile Caucasoid sample of German origin. *Mol. Hum. Reprod.* 6(3):207-214.
- Dakouane-Giudicelli M, Legrand B, Bergere M, Giudicelli Y, Cussenot O, Selva J (2006) Association between androgen receptor gene CAG trinucleotide repeat length and testicular histology in older men. *Fertil. Steril.* 86(4):873-877. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.03.035.
- Dakouane Giudicelli M, Serazin V, Le Sciellour CR, Albert M, Selva J, Giudicelli Y (2008) Increased achondroplasia mutation frequency with advanced age and evidence for G1138A mosaicism in human testis biopsies. *Fertil. Steril.* 89(6):1651-1656. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.04.037.
- Davis-Dao CA, Tuazon ED, Sokol RZ, Cortessis VK (2007) Male infertility and variation in CAG repeat length in the androgen receptor gene: a meta-analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92(11):4319-4326. doi:10.1210/jc.2007-1110.
- Dohle GR, Colpi GM, Hargreave TB, Papp GK, Jungwirth A, Weidner W (2005) EAU guidelines on male infertility. *Eur. Urol.* 48(5):703-711. doi:10.1016/j.eururo.2005.06.002.
- Dohle GR, Smit M, Weber RFA (2003) Androgens and male fertility. *World J Urol* 21(5):341-345. doi:10.1007/s00345-003-0365-9.
- Dowsing AT, Yong EL, Clark M, McLachlan RI, Kretser DM de, Trounson AO (1999) Linkage between male infertility and trinucleotide repeat expansion in the androgen-receptor gene. *Lancet* 354(9179):640-643.
- Dym M, Fawcett DW (1970) The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol. Reprod.* 3(3):308-326.
- Eckardstein S von, Syska A, Gromoll J, Kamischke A, Simoni M, Nieschlag E (2001) Inverse correlation between sperm concentration and number of androgen receptor CAG repeats in normal men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86(6):2585-2590.
- Espina V, Heiby M, Pierobon M, Liotta LA (2007) Laser capture microdissection technology. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 7(5):647-657. doi:10.1586/14737159.7.5.647.

- Fischbeck KH, Lieberman A, Bailey CK, Abel A, Merry DE (1999) Androgen receptor mutation in Kennedy's disease. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 354(1386):1075-1078. doi:10.1098/rstb.1999.0461.
- Gaucher J, Reynoird N, Montellier E, Boussouar F, Rousseaux S, Khochbin S (2010) From meiosis to postmeiotic events: the secrets of histone disappearance. *FEBS J.* 277(3):599-604. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07504.x.
- Gelmann EP (2002) Molecular biology of the androgen receptor. *J. Clin. Oncol.* 20(13):3001-3015.
- Gottlieb B, Pinsky L, Beitel LK, Trifiro M (1999) Androgen insensitivity. *Am. J. Med. Genet.* 89(4):210-217.
- Griswold MD (1998) The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9(4):411-416. doi:10.1006/scdb.1998.0203.
- Gusella JF, MacDonald ME (1995a) Huntington's disease. *Semin. Cell Biol.* 6(1):21-28.
- Gusella JF, MacDonald ME (1995b) Huntington's disease: CAG genetics expands neurobiology. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5(5):656-662.
- Hose KA, Häffner K, Fietz D, Gromoll J, Eckert T, Kliesch S, Siebert H, Bergmann M (2009) A novel sequence variation in the transactivation regulating domain of the human androgen receptor. *Fertil. Steril.* 92(1):390.e9-390.e11. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.02.068.
- Huhtaniemi IT, Pye SR, Limer KL, Thomson W, O'Neill TW, Platt H, Payne D, John SL, Jiang M, Boonen S, Borghs H, Vanderschueren D, Adams JE, Ward KA, Bartfai G, Casanueva F, Finn JD, Forti G, Giwercman A, Han TS, Kula K, Lean MEJ, Pendleton N, Punab M, Silman AJ, Wu FCW (2009) Increased estrogen rather than decreased androgen action is associated with longer androgen receptor CAG repeats. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94(1):277-284. doi:10.1210/jc.2008-0848.
- Huhtaniemi IT, Pye SR, Holliday KL, Thomson W, O'Neill TW, Platt H, Payne D, John SL, Jiang M, Bartfai G, Boonen S, Casanueva FF, Finn JD, Forti G, Giwercman A, Han TS, Kula K, Lean MEJ, Pendleton N, Punab M, Silman AJ, Vanderschueren D, Labrie F, Wu FCW (2010) Effect of polymorphisms in selected genes involved in pituitary-testicular function on reproductive hormones and phenotype in aging men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95(4):1898-1908. doi:10.1210/jc.2009-2071.
- Irvine RA, Ma H, Yu MC, Ross RK, Stallcup MR, Coetzee GA (2000) Inhibition of p160-mediated coactivation with increasing androgen receptor polyglutamine length. *Hum. Mol. Genet.* 9(2):267-274.
- Ito Y, Tanaka F, Yamamoto M, Doyu M, Nagamatsu M, Riku S, Mitsuma T, Sobue G (1998) Somatic mosaicism of the expanded CAG trinucleotide repeat in mRNAs for the responsible gene of Machado-Joseph disease (MJD), dentatorubral-pallidolusian atrophy (DRPLA), and spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). *Neurochem. Res.* 23(1):25-32.
- Johnsen SG (1970) Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* 1(1):2-25.
- Kennedy WR, Alter M, Sung JH (1968) Progressive proximal spinal and bulbar muscular atrophy of late onset. A sex-linked recessive trait. *Neurology* 18(7):671-680.
- Kimura N, Mizokami A, Oonuma T, Sasano H, Nagura H (1993) Immunocytochemical localization of androgen receptor with polyclonal antibody in paraffin-embedded human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 41(5):671-678.

- Knocke I, Jakubiczka S, Lehnert H, Wieacker P (1999) A new point mutation of the androgen receptor gene in a patient with partial androgen resistance and severe oligozoospermia. *Andrologia* 31(4):199-201.
- La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck KH (1991) Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 352(6330):77-79. doi:10.1038/352077a0.
- Lee H, Chang C (2003) Recent advances in androgen receptor action. *Cell. Mol. Life Sci.* 60(8):1613-1622. doi:10.1007/s00018-003-2309-3.
- Lubahn DB, Tan JA, Quarmany VE, Sar M, Joseph DR, French FS, Wilson EM (1989) Structural analysis of the human and rat androgen receptors and expression in male reproductive tract tissues. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 564:48-56.
- Mayerhofer A, Vogt H, Zanner R (2005) Männliche Geschlechtsorgane. In: Gratzl M (Ed.) *Histologie*. Springer Medizin Verlag Heidelberg, pp 369–384.
- McEwan IJ (2004) Molecular mechanisms of androgen receptor-mediated gene regulation: structure-function analysis of the AF-1 domain. *Endocr. Relat. Cancer* 11(2):281-293. doi: 1351-0088/04/011–281.
- Mifsud A, Sim CK, Boettger-Tong H, Moreira S, Lamb DJ, Lipshultz LI, Yong EL (2001) Trinucleotide (CAG) repeat polymorphisms in the androgen receptor gene: molecular markers of risk for male infertility. *Fertil. Steril.* 75(2):275-281.
- Moe SE, Sorbo JG, Hohen T (2008) Huntingtin triplet-repeat locus is stable under long-term Fen1 knockdown in human cells. *J. Neurosci. Methods* 171(2):233-238. doi:10.1016/j.jneumeth.2008.03.012.
- Nononen HA, Giwercman A, Hallengren E, Giwercman YL (2010) Non-linear association between androgen receptor CAG repeat length and risk of male subfertility - a meta-analysis. *Int J Androl* 34:327-332. doi: 10.1111/j.1365-2605.2010.01084.x.
- O'Shaughnessy PJ, Baker PJ, Johnston H (2006) The foetal Leydig cell-- differentiation, function and regulation. *Int. J. Androl.* 29(1):90-95; discussion 105-8. doi:10.1111/j.1365-2605.2005.00555.x.
- Pearson CE, Sinden RR (1998) Trinucleotide repeat DNA structures: dynamic mutations from dynamic DNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8(3):321-330.
- Pelletier R, Krasilnikova MM, Samadashwily GM, Lahue R, Mirkin SM (2003) Replication and expansion of trinucleotide repeats in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 23(4):1349-1357.
- Quigley CA, Bellis A de, Marschke KB, el-Awady MK, Wilson EM, French FS (1995) Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocr. Rev.* 16(3):271-321.
- Rajender S, Singh L, Thangaraj K (2007) Phenotypic heterogeneity of mutations in androgen receptor gene. *Asian J. Androl.* 9(2):147-179. doi:10.1111/j.1745-7262.2007.00250.x.
- Rajpert-De Meyts E, Leffers H, Petersen JH, Andersen AG, Carlsen E, Jørgensen N, Skakkebaek NE (2002) CAG repeat length in androgen-receptor gene and reproductive variables in fertile and infertile men. *Lancet* 359(9300):44-46.
- Regadera J, Martínez-García F, González-Peramato P, Serrano A, Nistal M, Suárez-Quian C (2001) Androgen receptor expression in sertoli cells as a function of seminiferous tubule maturation in the human cryptorchid testis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86(1):413-421.

- Richards RI, Sutherland GR (1994) Simple repeat DNA is not replicated simply. *Nat. Genet.* 6(2):114-116. doi:10.1038/ng0294-114.
- Sadar MD (2011) Small Molecule Inhibitors Targeting the "Achilles' Heel" of Androgen Receptor Activity. *Cancer Res.* 71(14):1208-1213. doi:10.1158/0008-5472.CAN_10-3398.
- Samadashwily GM, Raca G, Mirkin SM (1997) Trinucleotide repeats affect DNA replication in vivo. *Nat. Genet.* 17(3):298-304. doi:10.1038/ng1197-298.
- Schiffer NW, C eraline J, Hartl FU, Broadley SA (2008) N-terminal polyglutamine-containing fragments inhibit androgen receptor transactivation function. *Biol. Chem.* 389(12):1455-1466. doi:10.1515/BC.2008.169.
- Schnorr B, Kressin M (2006) Progenese, Vorentwicklung. In: Schnorr B, Kressin M (Eds.) *Embryologie der Haustiere. Ein Kurzlehrbuch.* Enke, Stuttgart, pp 3-46.
- Sertoli E (1865) Dell' esistenza di particolari cellule ramificante nei cunalicoli seminiferi del testicoli umano. *Morgagni* 7:31-40.
- Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS (2003) Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 125(6):769-784.
- Shimizu M, Gellibolian R, Oostra BA, Wells RD (1996) Cloning, characterization and properties of plasmids containing CGG triplet repeats from the FMR-1 gene. *J. Mol. Biol.* 258(4):614-626. doi:10.1006/jmbi.1996.0273.
- Sigg C (1979) [Classification of tubular testicular atrophies in the diagnosis of sterility. Significance of the so-called "bunte Atrophie"]. *Schweiz Med Wochenschr* 109(35):1284-1293.
- Steger K, Pauls K, Klonisch T, Franke FE, Bergmann M (2000) Expression of protamine-1 and -2 mRNA during human spermiogenesis. *Mol. Hum. Reprod.* 6(3):219-225.
- Svechnikov K, Landreh L, Weisser J, Izzo G, Col n E, Svechnikova I, S der O (2010) Origin, development and regulation of human Leydig cells. *Horm Res Paediatr* 73(2):93-101. doi:10.1159/000277141.
- Tanaka F, Ito Y, Sobue G (1999a) [Somatic mosaicism of expanded CAG trinucleotide repeat in spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA)]. *Nippon Rinsho* 57(4):862-868.
- Tanaka F, Reeves MF, Ito Y, Matsumoto M, Li M, Miwa S, Inukai A, Yamamoto M, Doyu M, Yoshida M, Hashizume Y, Terao S, Mitsuma T, Sobue G (1999b) Tissue-specific somatic mosaicism in spinal and bulbar muscular atrophy is dependent on CAG-repeat length and androgen receptor--gene expression level. *Am. J. Hum. Genet.* 65(4):966-973.
- Tanphaichitr N, Sobhon P, Taluppeth N, Chalermisarachai P (1978) Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. *Exp. Cell Res.* 117(2):347-356.
- Taylor AK, Tassone F, Dyer PN, Hersch SM, Harris JB, Greenough WT, Hagerman RJ (1999) Tissue heterogeneity of the FMR1 mutation in a high-functioning male with fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 84(3):233-239.
- Tut TG, Ghadessy FJ, Trifiro MA, Pinsky L, Yong EL (1997) Long polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with reduced trans-activation, impaired sperm production, and male infertility. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82(11):3777-3782.

- Verhoeven G, Willems A, Denolet E, Swinnen JV, Gendt K de (2010) Androgens and spermatogenesis: lessons from transgenic mouse models. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 365(1546):1537-1556. doi:10.1098/rstb.2009.0117.
- Vries BB de, Halley DJ, Oostra BA, Niermeijer MF (1998) The fragile X syndrome. *J. Med. Genet.* 35(7):579-589.
- Walker WH (2009) Molecular mechanisms of testosterone action in spermatogenesis. *Steroids* 74(7):602-607. doi:10.1016/j.steroids.2008.11.017.
- Walker WH (2010) Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 365(1546):1557-1569. doi:10.1098/rstb.2009.0258.
- Wallerand H, Rémy-Martin A, Chabannes E, Bermont L, Adessi GL, Bittard H (2001) Relationship between expansion of the CAG repeat in exon 1 of the androgen receptor gene and idiopathic male infertility. *Fertil. Steril.* 76(4):769-774.
- Wang Q, Ghadessy FJ, Yong EL (1998) Analysis of the transactivation domain of the androgen receptor in patients with male infertility. *Clin. Genet.* 54(3):185-192.
- Wang R, Yeh S, Chen L, Lin H, Zhang C, Ni J, Wu C, Di Sant'Agnese PA, deMesy-Bentley KL, Tzeng C, Chang C (2006) Androgen receptor in sertoli cell is essential for germ cell nursery and junctional complex formation in mouse testes. *Endocrinology* 147(12):5624-5633. doi:10.1210/en.2006-0138.
- Weinbauer G, Luetjens C, Simoni M, Nieschlag E (2010) Physiology of Testicular Function. In: Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (Eds.) *Andrology. Male Reproductive Health and Dysfunction*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 11–59.
- Westerveld H, Visser L, Tanck M, van der Veen F, Repping S (2008) CAG repeat length variation in the androgen receptor gene is not associated with spermatogenic failure. *Fertil. Steril.* 89(1):253-259. doi: 10.1016/j.fertnstert. 2007.02.001.
- Yamada M, Sato T, Tsuji S, Takahashi H (2008) CAG repeat disorder models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol.* 115(1):71-86. doi:10.1007/s00401-007-0287-5.
- Yu A, Dill J, Mitas M (1995) The purine-rich trinucleotide repeat sequences d(CAG)₁₅ and d(GAC)₁₅ form hairpins. *Nucleic Acids Res.* 23(20):4055-4057.
- Zhang L, Leeflang EP, Yu J, Arnheim N (1994) Studying human mutations by sperm typing: instability of CAG trinucleotide repeats in the human androgen receptor gene. *Nat. Genet.* 7:531-535.
- Zhengwei Y, Wreford NG, Royce P, Kretser DM de, McLachlan RI (1998) Stereological evaluation of human spermatogenesis after suppression by testosterone treatment: heterogeneous pattern of spermatogenic impairment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83(4):1284-1291.
- Zitzmann M, Depenbusch M, Gromoll J, Nieschlag E (2004) X-chromosome inactivation patterns and androgen receptor functionality influence phenotype and social characteristics as well as pharmacogenetics of testosterone therapy in Klinefelter patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89(12):6208-6217. doi:10.1210/jc.2004-1424.
- Zitzmann M (2009) The role of the CAG repeat androgen receptor polymorphism in andrology. *Front Horm Res* 37:52-61. doi:10.1159/000175843.

M. Anhang

1. Puffer, Nährböden und Lösungen

a) Bouinsche Lösung

Menge	Reagenz	Firma	Anleitung
210 ml	gesättigte wässrige Pikrinsäure	Sigma	Formalin filtern; mit Pikrinsäure mischen und vor Gebrauch Eisessig zugeben. Proben mit 10x Menge Bouin 24 h fixieren.
70 ml	konzentriertes Formalin, 36,5-38%	Sigma	
10 ml	konzentrierte Essigsäure, 100% (Eisessig)	Merck	

b) 10x TAE pH 8,0 für SYBR Green

Menge	Reagenz	Firma	Anleitung
48,4 g	TRIZMA Base	Sigma	Alle Komponenten mischen; einstellen des pH-Wertes auf 8.0 mit 4N NaOH; Gebrauchslösung: 100ml 10x TAE + 900ml A. bidest
3,72 g	EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Sigma	
ad 1 l	steriles A. bidest		

c) Loading Dye für Agarosegele

Menge	Reagenz	Firma	Anleitung
0,25 ml	Bromphenolblau-Stammlösung	Sigma	Mischen der Komponenten und gründliches Rühren auf dem Magnetrührer, da Ficoll® 400 lange zum Lösen braucht. Filtrieren und Aliquotieren.
0,25 ml	Xylencyanol-Stammlösung	Sigma	
1,5 g	Ficoll® 400	Serva	
1,5 ml	0,5 M EDTA	Sigma	
ad 10 ml	1x TAE Puffer (s.o.)		

d) 10x TBE pH 8,0 für die PAGE

Menge	Reagenz	Firma	Anleitung
108 g	Tris (Pufferan $\geq 99,9\%$ p.a.)	Sigma	Komponenten mischen und autoklavieren; Gebrauchslösung: 100ml 10x TBE + 900ml A. bidest
55 g	Borsäure ($\geq 99,8\%$, pulv.)	Sigma	
7,4 g	EDTA Disodium (analytical grade)	Serva	
ad 1 l	steriles A. bidest		

e) Loading Dye für PAGE

Menge	Reagenz	Firma	Anleitung
5 mg	Bromphenolblau	Sigma	Alle Komponenten mischen und aliquotieren.
5 ml	Glycerol ($\geq 98\%$, Ph.Eur., H ₂ Ofrei)	Roth	
5 ml	1x TBE Puffer (s.o.)		

f) GelGreen Färbelösung für PAGE

Menge	Reagenz	Firma	Anleitung
150 μ l	GelGreen	Biotium	Alle Komponenten mischen und in dunkler Flasche lagern.
450 ml	1x TBE Puffer (s.o.)		
50 ml	1M NaOH-Lösung		

g) LB-Agar

Menge	Reagenz	Firma	Anleitung
10 St.	LB-Agar-Medium Kapseln	Bio101	Kapseln mit H ₂ O in handelsüblichem Dampfkochtopf für 20 min kochen, nach dem Abkühlen Zugabe des Ampicillins und Gießen der Platten.
25 mg	Ampicillin-Natriumsalz (1%)	Bio- Chemica	
250 ml	steriles A. bidest		

h) LB-Medium

Menge	Reagenz	Firma	Anleitung
5 St.	LB-Medium Kapseln	MP Biomedica- cals	Kapseln mit H ₂ O in handelsüblichem Dampfkochtopf für 15 min kochen, Lagerung bei 4 °C.
200 ml	steriles A. bidest		

ANHANG

i) NYZ+ Broth

Menge	Reagenz	Firma	Anleitung
10 g	NZ Amin	Sigma	Reagenzien für die Stammlösung in A. bidest lösen, pH-Wert mit 4N NaOH auf 7.5 einstellen und autoklavieren. Vor Gebrauch restliche Reagenzien zu 50ml Stammlösung zugeben. Lagerung bei 4°C.
5 g	Hefeextrakt	Sigma	
5 g	NaCl	Sigma	
ad 1 l	steriles A. bidest		
restliche Reagenzien auf 50 mL Stammlösung:			
625 µl	1M MgSO ₄ -Lösung	Merck	
625 µl	1M MgCl ₂ -Lösung	Merck	
500 µl	2M Glukose-Lösung	Sigma	

j) XGal-Lösung

Menge	Reagenz	Firma	Anleitung
20 mg	XGal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid)	Invitrogen	Mischen und aliquotieren; Lagerung bei -20°C.
1 ml	N,N-Dimethylformamid	Sigma	

k) ITPG-Lösung

Menge	Reagenz	Firma	Anleitung
20 mg	IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	Appligene	Mischen und aliquotieren; Lagerung bei -20°C.
1 ml	steriles A. bidest		

l) 4N NaOH

Menge	Reagenz	Firma	Anleitung
8 g	NaOH-Plätzchen	Merck	Mischen auf dem Magnetrührer.
ad 50 ml	steriles A. bidest		

m) 0,1M Tris/HCl pH 7,3 in DEPC

Menge	Reagenz	Firma	Anleitung
1,21 g	Tris (Pufferan, ≥ 99.9% p.a.)	Sigma	Alle Komponenten mischen und mit HCl auf einen pH-Wert von 7.3 einstellen. Lagerung bei -20°C.
ca. 5 ml	konzentrierte HCl (25%)	Roth	
ad 100 ml	DEPC-H ₂ O (s.u.)		

n) DEPC-H₂O

Menge	Reagenz	Firma	Anleitung
2 ml	Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma	Mischen und inkubieren für 24 h bei 37 °C; danach autoklavieren.
2 l	steriles A. bidest		

2. Reagenzien

Reagenz	Hersteller
5x Q-Solution, 10 mM	Qiagen, Hilden, Deutschland
10x Reaktionspuffer, 5 mM	Qiagen, Hilden, Deutschland
10x PCR Gold Buffer	AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA
Acrylamid/Bis Solution 19:1, 40% (w/v)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Agarose FineRes	Biolone, London, UK
Ammoniumpersulfat (APS), analytical grade	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ampicillin-Natriumsalz, 1%	BioChemica über AppliChem, Darmstadt, Deutschland
APES (3-Aminopropyl-triethoxysilan)	Merck GmbH, Darmstadt, Deutschland
Borsäure, ≥ 99,8%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs, Ipswich, Boston, MA, USA
D-(+)-Glucose	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
dATP, 100 mM	Promega, Madison, WI, USA
DNase I, recombinant, 10 U/L	Roche über Invitrogen Ltd., Paisley, UK
Eosin G-Lösung, 0.5% wässrig	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure, 99-100% zur Synthese	Merck GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethanol ROTIPURAN®, ≥99,8%, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Reagenz	Hersteller
Ethidiumbromid, 10 mg/ml stock solution	Merck GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Disodium, analytical grade	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ficoll® 400, molecular biology grade	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Formalin, 36.5-38% molecular grade	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
GelGreen™ Nucleic Acid Stain, 10000x in Wasser	Biotium über Biotrend, Köln, Deutschland
GeneAmp® dNTP blend, 10 mM	AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA
GeneRuler™ Low Range DNA Ladder, 25-700 bp	Fermentas, Burlington, Ontario, Canada
GeneScan™ 500Rox™ Size Standard	AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA
Glycerol, ≥ 99,5%, Ph.Eur. wasserfrei	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hämalaunlösung, sauer, nach Mayer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hi-Di™ Formamide	AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Appligene Oncor Lifescreeen, Watford, UK
iQ SYBR Green Supermix, 2x	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
LB-Agar-Medium, Kapseln	Bio101 Inc., Vista, CA, USA
LB-Medium, Kapseln	MP Biomedicals, Irvine, CA, USA
N,N-Dimethylformamid	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED), für PAGE	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Natriumchlorid	Merck GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid, Plätzchen	Merck GmbH, Darmstadt, Deutschland
Nco I restriction enzyme, 10000 U/mL	New England Biolabs, Ipswich, Boston, MA, USA
Not I restriction enzyme, 10000 U/mL	New England Biolabs, Ipswich, Boston, MA, USA
N-Z-Amine® AS	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Magnesiumchlorid für PCR, 25 mM	AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA
Magnesiumchlorid, wasserfrei zur Synthese	Merck GmbH, Darmstadt, Deutschland

Reagenz	Hersteller
Magnesiumsulfat-Heptahydrat, zur Analyse	Merck GmbH, Darmstadt, Deutschland
MultiScribe® Reverse Transcriptase, 5 U/L	AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA
Pikrinsäure, 98% reagent grade	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
p-GEM®-T Vector System II mit kompetenten Zellen JM109	Promega, Madison, WI, USA
pUC19 Marker ready-to-use, 26-501 bp	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Quantitas 50bp-2kb DNA Leiter	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland
Random Hexamers, 50 mM	AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA
RNAse Away™	Molecular BioProducts Inc. über Thermo Fisher Scientific, San Diego, CA, USA
RNAse Inhibitor, 20 U/L, 2000 U	AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA
RNAse Inhibitor 40 U/L, 2500 U	Ambion über AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA
Salzsäure, konzentriert 25%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
S.O.C. Medium	Invitrogen Ltd., Paisley, UK
SURE®2 supercompetent cells	Stratagene über Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA
SYBR® Green I nucleic acid gel stain	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Taq DNA Polymerase, 5 U/L	Qiagen, Hilden, Deutschland
TRIS Pufferan®, ≥ 99,9% p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizma® Base, ≥ 99,9%	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Vitro-Clud®	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
XGal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid)	Invitrogen Ltd., Paisley, UK
Xylencyanol	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Xylol ROTIPURAN®, ≥ 99,8% p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Yeast Extract	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

3. Verbrauchsmaterialien und Geräte

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Einmal-Kulturröhrchen, 14 ml mit Deckel	Greiner BioOne über MAGV, Kremsmünster, Österreich
FilterTip 0,5-10µl, 0-20µl, 0-100µl, 0-200µl, 0-1000µl	Nerbe plus, Winsen/Luhe, Deutschland
MembranSlide 1.0 PEN	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Microseal ‚B‘ Adhesive Seals, optical	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
MicroTube 500	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Mineralöl, für die Mikrobiologie	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Mµlulti®-Reaktionsgefäß 650µl, 2ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mµlulti®-SafeSeal® Tubes 1.7ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
PCR Tubes 650µl	Nerbe plus, Winsen/Luhe, Deutschland
Petrischalen mit Nocken, Polystyrol, steril, Ø 90 mm	Nunc über Thermo Fischer Scientific, Langenselbold, Deutschland
Pipettenspitzen gelb 200µl, blau 1000µL	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
QIAamp DNA Micro Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Micro Kit, FFPE Tissue Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Röhrchen, 50 mL, PP, konischer Boden	Greiner BioOne über MAGV, Kremsmünster, Österreich
SuperFrost Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
TwistTop Vials 1.5ml, TwistTop Vial Caps	Sorenson BioScience Inc., Salt Lake City, UT, USA
µltraAmp PCR Plate, low profile	Sorenson BioScience Inc., Salt Lake City, UT, USA
UV-Küvette mikro, 8.5mm Zentrums- höhe	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland

Geräte	Hersteller
ABI 3730 DNA Analyzer	AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA
Agagel Mini Horizontal Gel Electrophoresis	Biometra, Göttingen, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Brutschrank mit Rüttelplatte	WTB Binder, Tuttlingen, Deutschland
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
CFX96™ Manager Software Version 1.6	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
EG 1160 Einbetter	Leica, Solms, Deutschland
Frigocut AM 2800	Reichert-Jung, Nussloch, Deutschland
GeneScan™ 3.7 ABI Prism	AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA
K15 Kühlbad	Haake über Thermo Fischer Scientific, Langenselbold, Deutschland
inoLab pH-Meter	WTW, Weilheim, Deutschland
MR3003 Magnetrührer mit Heizfunktion	Heidolph, Schwabach, Deutschland
PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
PowerPac 200 Power Supply	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Reax Control Vortexer	Heidolph, Schwabach, Deutschland
SM 2000R Mikrotom	Leica, Solms, Deutschland
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
TB1 Thermoblock	Biometra, Göttingen, Deutschland
UVsolo Transilluminator	Biometra, Göttingen, Deutschland
UVIdoc	Biometra, Göttingen, Deutschland
Variomag Elektronikrührer	Variomag über Thermo Fischer Scientific, Langenselbold, Deutschland
Zentrifuge Hettich Mikro 120	Hettich über MAGV GmbH, Rabenau, Deutschland

Als erstes möchte ich meinem Betreuer, Prof. Dr. Bergmann, für die Überlassung dieses Themas und seine gute Betreuung – auch in schwierigen Zeiten der Doktorarbeit – danken. Er hatte eine Zuversicht, die mir manchmal fehlte, aber mich doch hoffen machte, alles gut hinter mich bringen zu können.

Als nächstes möchte ich die sowohl Prof. Dr. Petzinger als auch die gute Seele des Graduiertenkollegs „Molekulare Veterinärmedizin“, Frau Heber, erwähnen, die mich in der ersten Phase der Doktorarbeit unterstützt haben.

Der Stiftung der Eheleute Dr. med. vet. Hans-Joachim und Gertrud Engemann und ihrem Vorstand, Prof. Dr. Thiel, möchte ich für die finanzielle Unterstützung danken und für das sichere Gefühl, dass man nicht ohne ein Dach über dem Kopf dastehen wird.

Frau Prof. Dr. Baumgart-Vogt und dem Sekretariat des Graduiertenkollegs GGL möchte ich für die Möglichkeiten der Erweiterung meines Horizontes durch die wöchentlichen Seminare danken.

Ein herzliches Danke schön soll auch an Frau Prof. Dr. Kliesch und Herrn Prof. Dr. Gromoll aus dem Universitätsklinikum Münster gehen, Frau Prof. Dr. Kliesch für die Bereitstellung des Probenmaterials, der CAG-, Testosteron- und LH-Werte, Herrn Prof. Dr. Gromoll für die wissenschaftlichen Auseinandersetzungen, auch wenn es für mich nicht immer einfach war. Auch Herrn Prof. Dr. Weidner möchte ich danken, denn auch aus der Urologie in Gießen stammen Proben, die ich in meiner Doktorarbeit verwenden durfte.

Ein überaus herzliches „DANKE SCHÖN!!“ und noch viel, viel mehr als das soll Herrn Prof. Dr. Geyer erreichen – Achim, ohne Dich wäre diese Doktorarbeit nix geworden!

Auch wenn es manchmal den Anschein hat, man steht doch nicht allein im Labor, man braucht Hilfe. Ich bin sehr froh, dass ich so viele nette und geduldige Menschen um mich herum hatte, die mir geholfen und mich unterstützt haben – oder bei denen ich auch einfach nur mal meinen Frust loswerden konnte. Martina, Anne, Roswitha, Susi, Alex, Jutta, Kathrin, Regina und auch Frau Lahrmann aus Münster: Vielen, vielen Dank für eure/Ihre Hilfe!

Ich denke, nun kommen wir zum Bereich der Freunde und Familie. Nie hatte ich mehr Spaß als in unserem kleinen stickigen Doktorandenzimmer, wenn die TKBA kam, wenn uns zum Heulen zu Mute war oder wenn wir Tränen gelacht haben. Sarah, Clara, Karola und vor allem Tini: Danke für die schöne Zeit! Auch in meinem zweiten „Zuhause“ mit Britta und Sabine: Danke für den Spaß und die anregenden Gespräche mit euch! Ich weiß, dass ich auch mal meine schlechte Laune an euch ausgelassen habe. Letzteres gilt auch besonders für meine Mutter und meinen Freund. Sie hatten es nicht immer leicht mit mir. Euch allen ein großes DANKE SCHÖN!