

**Die Expression von MUC 1 in Keimzellen der normalen und gestörten
Spermatogenese**

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

vorgelegt von Claus Günther Eiermann
aus Bonn

Gießen 2004

Aus dem Institut für Pathologie
Leiter: Prof. Dr. A. Schulz
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. A. Schulz

Gutachter: Prof. Dr. W. – B. Schill

Tag der Disputation: 22.02.2005

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
1.1 Anatomische Aspekte	3
1.2 Spermatogenese	4
1.2.1 Spermatozytogenese	4
1.2.2 Spermiogenese	6
1.3 Kinetik der Spermatogenese	8
1.4 Effektivität und Pathologie der Spermatogenese	9
1.4.1 Diagnostik	10
1.4.2 Therapie	11
1.5 Muzine	12
1.5.1 Definition	12
1.5.2 Nomenklatur und Gewebeverteilung der Muzine	12
1.5.3 Funktion und Eigenschaften von Muzinen	14
1.6 MUC 1	15
1.6.1 Gensequenz von MUC 1	17
1.6.2 Proteinstruktur von MUC 1	19
1.6.3 Glykosylierung von MUC 1	19
1.6.4 Expression von MUC 1 in normalem menschlichem Gewebe	20
1.6.5 MUC 1 im Reproduktionstrakt	21
2. Fragestellung	23
3. Material und Methoden	24
3.1 Patientenkollektiv und Gewebe	24
3.2 Verwendete Antikörper	25
3.3 Immunhistochemie	26
3.3.1 Paraffinschnitte	26
3.3.2 Mikrowellenbehandlung	26
3.3.3 APAAP-Methode	27
3.4 Proteinbiochemie	29
3.4.1 Proteinaufbereitung	29

3.4.2	Proteinproben	29
3.4.3	Polyacrylamidgelelektrophorese	30
3.4.4	Immunoblot	31
4.	Ergebnisse	33
4.1	Proteinbiochemie	33
4.2	Molekulare Expressionsanalysen	33
4.3	Immunhistochemie	34
4.3.1	Normale Spermatogenese	34
4.3.1.1	HMFG 1	34
4.3.1.2	HMFG 2	35
4.3.1.3	SM 3	35
4.3.2	Gestörte Spermatogenese	35
4.3.2.1	HMFG 1	36
4.3.2.2	HMFG 2	36
4.3.2.3	SM 3	36
5.	Diskussion	45
6.	Zusammenfassung	50
7.	Literaturverzeichnis	52
8.	Anhang	62
8.1	Rezepte für Ansätze der Immunhistochemie	62
8.2	Rezepte für Ansätze der Proteinbiochemie	63
8.3	Reagenzien	67
8.4	Verwendete Antikörper	68
8.5	Verwendete Laborgeräte/Materialien	69
9.	Danksagung	70
10.	Curriculum vitae	71

1. Einleitung

1.1 Anatomische Aspekte

Der Hoden des adulten Mannes, der Ort der Spermatogenese, hat ein durchschnittliches Volumen von 20-25 ml. Sein Parenchym wird von mehreren Septen (Septula testis), die radiär von der Kapsel (Tunica albuginea) zum Hilus verlaufen, in ca. 250-300 Läppchen (Lobuli testis) unterteilt. Innerhalb der Lobuli verlaufen geschlängelt die Hodenkanälchen (Tubuli seminiferi contorti), in denen die Spermatogenese abläuft. Diese Kanälchen münden über das am hinteren Rand gelegene Rete testis in die Ductuli efferentes des Nebenhodenkopfes [39]. Das zwischen den Tubuli seminiferi contorti gelegene Interstitium wird durchzogen von Blut-, Lymphgefäßen und Nervenfasern. Außerdem befinden sich dort die Leydig-Zwischenzellen, die das männliche Sexualhormon Testosteron produzieren, ferner kollagenes Bindegewebe mit Fibrozyten, vereinzelt Makrophagen und Mastzellen. Die Tubuli seminiferi setzen sich aus dem Keimepithel und der Lamina propria zusammen. Beide sind durch eine Basalmembran voneinander getrennt. Die in der Lamina propria befindlichen Myofibroblasten zeichnen sich durch periodische Kontraktionen aus, die wahrscheinlich hormonell beeinflusst werden und für den Transport der Spermatozoen in Richtung Nebenhoden verantwortlich sind [39]. Das Keimepithel untergliedert sich wiederum in Sertoli-Zellen und Keimzellen. Sertoli-Zellen sind hochprismatische Zellen, die von der Basalmembran bis zum Lumen reichen und mit ihren feinen Ausläufern den Raum zwischen den Keimzellen ausfüllen. Ihre Aufgaben sind vielfältig. Sie unterteilen das Keimepithel in ein basales und ein adluminales Kompartiment und bilden auf diese Weise die Blut-Hoden-Schranke aus, die als immunologische Barriere dient. Dadurch verhindern sie Autoimmunreaktionen, die durch die Expression von Oberflächenantigenen an Spermatozyten während ihres Reifeprozesses ausgelöst werden können. Sertoli-Zellen übernehmen zudem eine Ernährungsfunktion für die heranreifenden Keimzellen und sind darüber hinaus in der Lage, überschüssiges Zytoplasma, das bei der Ausreifung der Spermatozyten zu Spermien als Residualkörper anfällt, sowie nicht freigesetzte Spermatozoen zu phagozytieren [39]. Die Keimzellen durchlaufen

mehrere Reifestadien und „wandern“ dabei, ausgehend vom basalen Kompartiment, nach adluminal.

1.2 Spermatogenese

Die Keimzellen durchlaufen während der Spermatogenese drei größere Phasen. In der ersten Phase entwickeln sich aus den Stammzellen, so genannten Spermatogonien vom Typ A, nach Durchlaufen mehrerer mitotischer Teilungsvorgänge Spermatogonien vom Typ B. Diese Typ B-Spermatogonien treten im weiteren Verlauf ihrer Entwicklung in die zweite Reifephase, die Meiose ein, aus der am Ende die frühen runden Spermatozyten hervorgehen. Diese ersten beiden Phasen werden unter dem Begriff der Spermatozytogenese zusammengefasst. Unmittelbar nach der Spermatozytogenese folgt die Spermiogenese, in der die frühen Spermatozyten eine Metamorphose durchlaufen, bis sie schlussendlich als reife Spermien in das Lumen der Tubuli seminiferi freigesetzt werden [59].

1.2.1 Spermatozytogenese

Die Spermatozytogenese startet mit den Stammzellen, den Spermatogonien vom Typ A, die permanenten Kontakt mit der Basalmembran der Tubuli seminiferi haben. Man unterteilt hier in den Typ Ad (= dark) und den Typ Ap (= pale). Spermatogonien vom Typ Ad sind mitotisch aktiv. Einerseits sorgen sie durch Produktion weiterer Typ Ad-Spermatogonien für die Erneuerung der basalen Stammzellen. Andererseits entwickeln sie sich zu Spermatogonien des Typs Ap, die sich ihrerseits zu Spermatogonien vom Typ B differenzieren und damit in den weiteren Ablauf der Spermatogenese eingebunden werden [26,59]. Die diploiden Spermatogonien vom Typ B lösen sich allmählich von der Basalmembran und durchlaufen die erste Entwicklungsstufe der Meiose, die *Prophase*. Zu Beginn der *Prophase*, dem *Präleptotän*, kommt es zu einer DNA-Reduplikation, so dass am Ende dieser Phase tetraploide Zellen vorliegen, die so genannten primären Spermatozyten (= Spermatozyten I. Ordnung) [39]. Orientierend an den jeweils typischen Kernformen lässt sich die *Prophase* in weitere verschiedene Phasen untergliedern. In dem nun folgenden *Leptotän* kondensiert das Chromatin und verdichtet sich zu Fäden. Das

sich hieran anschließende *Zygotän* zeichnet sich durch Paarbildung homologer Chromosomen aus. In der vorletzten Phase, dem *Pachytän*, kommt es zum Austausch genetischen Materials zwischen homologen Chromosomen als crossing-over mit konsekutiv entstehenden Chiasmata. Die während dieser Phase zu beobachtenden Kernvergrößerungen machen eine Unterscheidung in frühe und späte pachytäne Spermatozyten möglich. Die letzte Stufe der *Prophase*, das *Diplotän*, ist durch die Trennung der Chromosomen voneinander gekennzeichnet [39]. Diese *Prophase*, der Beginn der Meiose, beansprucht im Durchschnitt einen Zeitraum von etwa 22 Tagen. Dies ist auch der Grund dafür, dass in einem histologischen Präparat des Keimepithels mehr als nur eine Generation von Spermatozyten zu sehen ist. Die nun folgenden *Meta-*, *Ana-* und *Telophase*, in denen sich jeweils die Chromosomen an der Äquatorialebene aufreihen, anschließend zu den entgegengesetzten Polen auseinandergezogen und dort wieder zu Chromatinfäden entfaltet werden, verlaufen prinzipiell identisch mit der Mitose ab. Allerdings kommt es im Verlaufe der Meiose zu keiner vollständigen Trennung der Chromatiden, so dass nach der Zellteilung ein diploider Chromosomensatz vorhanden ist. Im Rahmen dieser 1. Reifeteilung, der Meiose, gehen am Ende aus einem primären Spermatozyten mit tetraploidem Chromosomensatz zwei diploide sekundäre Spermatozyten (= Spermatozyten II. Ordnung) hervor. Die Spermatozyten II. Ordnung durchlaufen jetzt ohne eine erneute DNA-Reduplikation die 2. Reifeteilung, die wie eine normale Mitose abläuft. Am Ende dieses Prozesses entstehen aus einem Spermatozyten II. Ordnung zwei haploide Tochterzellen, Spermatischen [39]. Aus einer diploiden Stammzelle sind also nach Ablauf der Spermatozytogenese vier haploide Spermatischen hervorgegangen (Abb.1). Man muss jedoch bedenken, dass im Verlaufe dieses Entwicklungsprozesses etwa 40% aller menschlichen Keimzellen degenerieren [59]. Somit ist die Effektivität der menschlichen Spermatogenese, verglichen mit anderen Spezies, mit etwa 6×10^6 Spermatozoen pro Gramm Hodengewicht pro Tag relativ gering [39].

1.2.2 Spermiogenese

Am Ende der Spermatozytogenese treten die frühen runden Spermatiden in die Spermiogenese ein. Im Zuge dessen unterliegt eine Spermatide bis zur vollständigen Ausreifung zum Spermium Transformationen, die durch drei, größtenteils gleichzeitig auftretende Prozesse, charakterisiert sind. Dabei kommt es einerseits zur Kondensation des Zellkerns, wobei das Volumen auf etwa 1/10 des Ausgangswertes abnimmt. Des Weiteren durchläuft die Zelle die in mehreren Stufen ablaufende Phase der Akrosomenbildung. Währenddessen beginnt bereits die Bildung der Geißel, die später für die Beweglichkeit des Spermiums verantwortlich ist [39]. Die so entstandenen elongierten Spermatiden werden nun im Rahmen der Spermiation in das Tubuluslumen abgegeben und fortan als Spermien bezeichnet (Abb.1). Die Tatsache, dass die Keimzellen während der gesamten Spermatozytogenese über zytoplasmatische Brücken miteinander verbunden sind, garantiert eine größtenteils synchrone Entwicklung der Zellen [17,59]. Dabei dauert die gesamte Spermatogenese vom Erscheinen der Ap-Spermatogonien bis hin zur Freisetzung der Spermien etwa 74 Tage [59].

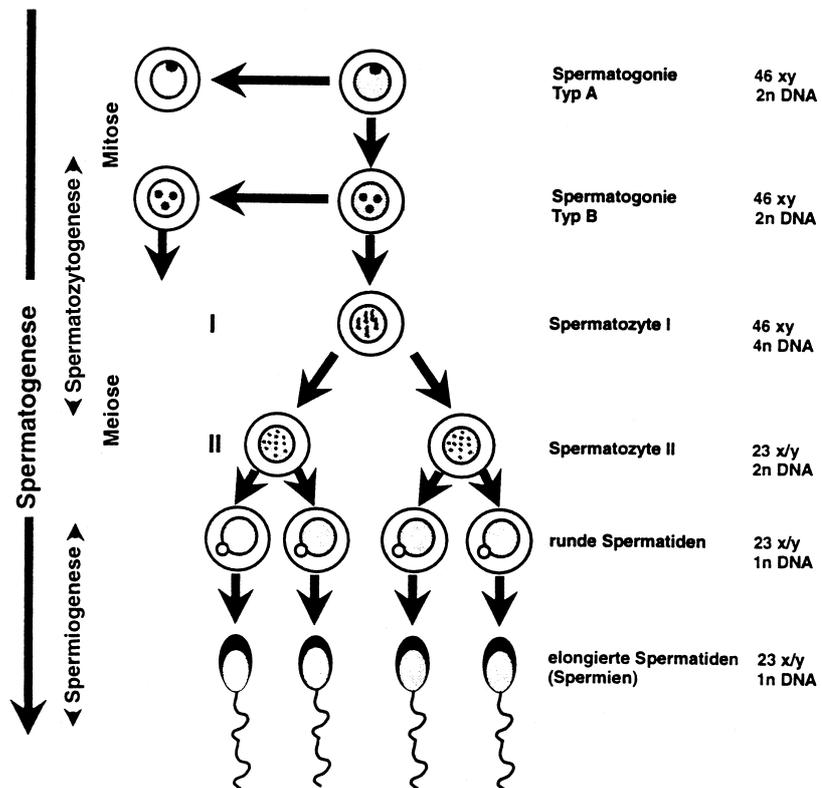


Abb. 1: Schematische Darstellung der Spermatogenese

nach: Krause et al.1998 [39]

1.3 Kinetik der Spermatogenese

Bei physiologisch ablaufender Spermatogenese können beim Menschen sechs verschiedene Keimzellstadien unterschieden werden. Diese Einteilung erfolgt in Abhängigkeit von der Spermatozytenreifung und beginnt mit dem Stadium I beim Auftreten früher Spermatozyten (step 1). Aufgrund der Tatsache, dass in diesem Stadium die Entwicklung der vorangegangenen Spermatozytengeneration noch nicht abgeschlossen ist, tauchen in einem solchen histologischen Querschnitt ebenso elongierte Spermatozyten (step 7) auf, die kurz vor ihrer Spermiation stehen. So wird man bei der histologischen Untersuchung des Keimepithels im Stadium I auf zwei verschiedene Entwicklungsstufen von Spermatozyten stoßen. Das gleichzeitige Auftreten verschiedener Stadien in einem Querschnitt liegt darin begründet, dass die Spermatogenese innerhalb eines Tubulus helikal angeordnet ist (Abb.2).

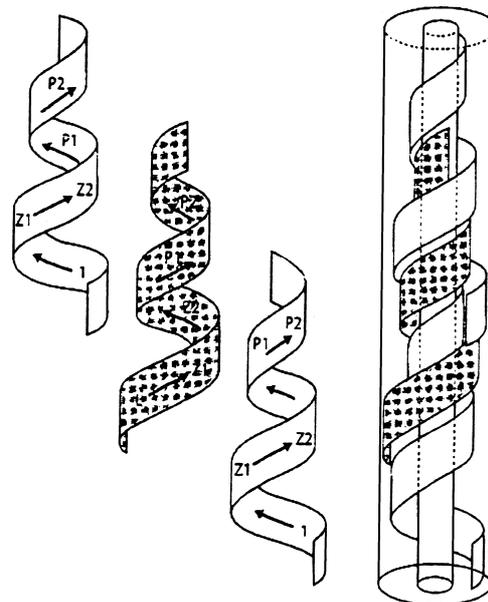


Abb. 2: Helikale Anordnung der Spermatogenese

nach: Krause et al.1998 [39]

1.4 Effektivität und Pathologie der Spermatogenese

Die Effektivität der Spermatogenese beim Menschen liegt im Vergleich zu den meisten anderen Spezies bei nur ca. 25-35%. Keimzelldegenerationen spielen dabei eine ganz entscheidende Rolle. Während junge Männer im Alter zwischen 27 und 42 Jahren in ca. 85% ihrer Tubuli eine weitgehend normale Spermatogenese zeigen, nimmt die Rate mit zunehmendem Alter ab und liegt im Alter zwischen 80 und 89 Jahren bei nur noch 16%. Mit der Zunahme der Degeneration von Keimzellen nimmt gleichzeitig die Effektivität der Spermatogenese ab [35,59]. Bei verschiedenen Spezies hat man versucht, auf verschiedenen Entwicklungsstufen der Spermatogenese die Keimzelldegeneration zu quantifizieren, indem man im Rahmen mikroskopischer Untersuchungen die degenerierten Zellen gezählt, die Verhältnisse der Keimzellgruppen zueinander bestimmt und die tägliche Spermaproduktion pro Gramm Parenchym ermittelt hat. Obwohl sich hierbei gezeigt hat, dass degenerative Veränderungen in allen drei Phasen der Spermatogenese, nämlich im Rahmen der Mitose von Spermatogonien, der Meiose und der Spermio-genese auftraten, konnte man bei jungen Erwachsenen beobachten, dass eine Degeneration sehr häufig zum Ende der Meiose in Erscheinung trat. Barr et al. haben Anfang der 70iger Jahre bereits Untersuchungen bezogen auf die Keimzellentwicklung durchgeführt und festgestellt, dass das Verhältnis von Spermatisden zu primären Spermatozyten, das idealerweise bei 4 liegt, doch nur einen Wert von 2,45 erreicht. Das lässt darauf schließen, dass eine signifikante Anzahl von Keimzelldegenerationen tatsächlich zum Ende der Meiose auftreten [2]. Um ein besseres Verständnis für die geringe Effektivität zu bekommen, hat man die Anzahl der Keimzellen innerhalb einer einzelnen Keimzellgeneration und die Generationen im einzelnen in drei verschiedenen Untersuchungsgruppen mit unterschiedlich effektiver Spermatogenese eingeteilt und miteinander verglichen. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigte, dass zwar auch Männern mit hoher Effektivität der Spermatogenese vereinzelt Keimzellen fehlen, die Gruppe mit niedriger Effektivität aber insgesamt weniger Keimzellen aufwies. Dies manifestierte sich in der Form, dass sowohl weniger Keimzellgenerationen auf der jeweiligen Entwicklungsstufe auftraten als auch die Anzahl der Keimzellen innerhalb einer Generation abgenommen hatte. Dies lässt den Rückschluss zu, dass die Effektivität im Wesentlichen von dem Fehlen der Keimzellen beziehungsweise dem Maß der

Degeneration der Zellen abhängt. Als Ursache für das Fehlen einzelner Keimzellen innerhalb der jeweiligen Entwicklungsstufen und der damit einhergehenden Ineffektivität der Spermatogenese wird eine fehlende Synchronisation der Teilung von Spermatogonien oder die Degeneration der entsprechenden Ursprungszellen angenommen. So ist eine synchrone Keimzellentwicklung unmöglich geworden und äußert sich in entsprechenden „Löchern“ innerhalb der Entwicklungsstufen der Spermatogenese [35].

Im klinischen Alltag stößt man bei der Ursachenforschung einer bestehenden Fertilitätsstörung in etwa 4-30% der Fälle auf einen Spermatogenese-arrest [52]. Diese Reifestörung kann ein- oder beidseitig auftreten und verschiedene Ursachen haben. Einerseits können sie einen primär genetischen Ursprung haben, andererseits aber auch auf sekundäre Einflussfaktoren zurückzuführen sein. Für eine genetische Ursache kommen z.B. autosomale Anomalien oder Mikrodeletionen im langen Arm des Y-Chromosoms infrage, zu sekundären Faktoren zählen toxische Einwirkungen (Antibiotika, Chemotherapie), Hitze oder Allgemeinerkrankungen [52].

1.4.1 Diagnostik

Bei der für die Therapie wichtigen Ursachenforschung einer bestehenden männlichen Infertilität steht die beidseitige Hodenbiopsie im Vordergrund. Sie ist zur Zeit noch unverzichtbar, um z. B. eine Azoospermie auf dem Boden einer Reifestörung von Obstruktionen der ableitenden Samenwege differenzieren zu können. Zur Bewertung der Spermatogenese kann auf der Grundlage bestimmter histologischer Muster ein so genannter „Score count“ erstellt werden (Abb.3).

Tubuli seminiferi		Score
reife Spermatozyten	Reifearrest auf Stufe primärer Spermatozyten	
100%		10
90%		9
80%		8
70%		7
60%		6
50%		5
40%	20%	4
30%	40%	3
20%	60%	2
10%	80%	1
0	100%	0

Abb. 3: Histologische Evaluation von Hodenbiopsien auf der Grundlage des Erscheinens reifer Spermatozyten oder Reifestörungen auf Stufe primärer Spermatozyten
nach: Holstein et al.1983 [33]

1.4.2 Therapie

Während im Rahmen einer Obstruktion der ableitenden Samenwege ein chirurgisches Vorgehen angestrebt wird, ist eine wirksame Therapie eines Spermatogenese-arrestes bis heute nicht bekannt. Man sollte zumindest nach der Biopsieentnahme Gewebe des Patienten kryokonservieren, um im Falle eines Kinderwunsches bei bestehender Azoospermie und noch vorhandenen haploiden Keimzellen im Keimepithel eine intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) durchführen zu können [51].

1.5 Muzine

1.5.1 Definition

Muzine gehören zu einer Familie von Glykoproteinen mit einem außergewöhnlich hohen Molekulargewicht von mehr als 250 kDa, die sowohl an der Oberfläche epithelialer Zellen als auch in sezernierter Form im Lumen des Gastrointestinal-, Respirations- und Urogenitaltraktes nachgewiesen werden [24,48]. Die Glykoproteine der Muzin-Familie bestehen zu 50–90% aus Kohlenhydraten, die mit einem fadenförmigen Proteinrückgrat verankert sind [22,48]. Ein Charakteristikum, das die Muzine von anderen Proteinen unterscheidet, ist der hohe Gehalt an Threonin, Serin, Prolin, Alanin und Glycin, denen innerhalb des Moleküls bestimmte Aufgaben zukommen [57]. Die Kohlenhydratseitenketten, die einen hohen Prozentsatz des Moleküls ausmachen, werden größtenteils über eine α -1,3- Bindung zwischen N-Acetyl-Galactosamin und dem Sauerstoffatom der Aminosäuren Serin und Threonin an das Proteinrückgrat geheftet. Darüber hinaus kommt es zusätzlich zu diesen O-glykosidischen Bindungen auch zu Verbindungen zwischen dem Stickstoffatom von Asparagin und N-Acetyl-Glucosamin im Sinne einer N-glykosidischen Bindung [15]. Eine Besonderheit, die bei bislang allen bekannten Muzinen nachgewiesen werden konnte, ist die sogenannte Tandem-Repeat-Region [22]. Dieser Teil des Core-Proteins besteht aus einer bestimmten Anzahl an Aminosäuren, die für die jeweiligen Muzine spezifisch ist. Die Wiederholungen der Tandem-Repeat-Region innerhalb der so genannten VNTR (= variable number of tandem repeat) variieren im Durchschnitt zwischen 21 und 125 [48]. Bedingt durch die VNTR beobachtet man eine erhebliche Variabilität in der Größenausdehnung des Moleküls, das bis zu 500 nm über die Plasmamembran hinausragen kann [22,66].

1.5.2 Nomenklatur und Gewebeverteilung der Muzine

MUC 1 war das erste Gen der Muzinfamilie, das entdeckt wurde [19]. Dieses Molekül ist außerdem noch unter anderen Namen, wie z.B. human milk fat globule (HMFG)-Antigen, DF 3-Antigen, epithelial membrane antigen (EMA), MAM-6, polymorphic epithelial mucin (PEM) und Episialin bekannt [66].

Mittlerweile sind 19 verschiedene Muzine entdeckt worden, die bezüglich ihrer Nomenklatur von MUC 1 bis MUC 19 durchnummeriert werden (Tabelle 1). Man kann die gesamte Familie der Muzine in sezernierte, zu denen etwa MUC 2, MUC 5AC, MUC 5B, MUC 6, MUC 7, MUC 19 zählen, sowie membranständige Formen, wie z.B. MUC 1, MUC 3, MUC 4, MUC 11, MUC 12, MUC 13, MUC 17 aufteilen [20].

Tabelle 1: Genlokalisierung und Expression bisher bekannter Muzine
[10,12,25,31,40,42,55,61,62,68,70,71,72]

Muzin	Chromosom	Expression
MUC 1	1q21-24	Mamma, Pancreas, diverse Epithelien
MUC 2	11p15	Dünndarm, Kolon
MUC 3	7q22	Dünndarm, Kolon
MUC 4	3q29	Kolon, Tracheobronchialsystem
MUC 5AC	11p15	Magen, Tracheobronchialsystem
MUC 5B	11p15	Magen, Tracheobronchialsystem
MUC 6	11p15	Magen
MUC 7	4	Speicheldrüsen
MUC 8	12q24.3	Hoden, Spermien, Plazenta, Cervix
MUC 9	1p13	Zona pellucida
MUC 10	?	Glandula submandibularis der Maus
MUC 11	7q22	Kolon
MUC 12	7q22	Kolon
MUC 13	3q13.3	Trachea, Gastrointestinaltrakt
MUC 14	?	?
MUC 15	11p14.3	Prostata, Hoden, Ovar, Kolon, Dünndarm
MUC 16	19p13.3	Ovarialkarzinom
MUC 17	7q22	Dünndarm, Kolon, Magen
MUC 18	?	Bronchialsystem, Prostata, glatte Muskulatur
MUC 19	12	Glandula sublingualis, Glandula submandibularis

1.5.3 Funktion und Eigenschaften von Muzinen

Die Funktion der Muzine wird in erster Linie durch die enorme strukturelle Ausdehnung bestimmt, wodurch eine physikalische Barriere zum Schutz der Zelle entsteht. Durch die feste Verankerung membrangebundener Muzine mit den Aktinfilamenten der Zelle besteht eine Verbindung zwischen dem Zellinneren und der unmittelbaren Umgebung. Muzine bilden aufgrund ihrer bis zu 500 nm über die Zellmembran hinausragenden Struktur ein sterisches Hindernis und dienen so als Schutzschild vor Mikroorganismen, Toxinen und proteolytischen Attacken. Die Kohlenhydratseitenketten der Muzine können aber auch eine spezifische Elimination von pathogenen Keimen bewirken, da sie für einige Erreger, wie z.B. *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* und das Influenza-Virus als unmittelbare Bindungsrezeptoren dienen. Gelöste Muzine hingegen bilden eine erste „Verteidigungslinie“, die nicht unmittelbar mit der Zelloberfläche verbunden ist, diese aber schützend bedeckt. In dieser Mucusschicht können Keime bereits vor einem ersten Kontakt mit der Zelle abgefangen und über die mucociliäre Clearance eliminiert werden [15,20,57].

Eine weitere Funktion, die dem Muzinmolekül durch die Zuckerseitenketten verliehen wird, ist der Schutz der Zelle vor Dehydratation. Die Sialinsäure, die meist an terminaler Position der Kohlenhydratseitenkette steht, gibt dem Molekül eine negative Ladung, aufgrund derer andere Zellen abgestoßen werden. Da Muzine vorzugsweise an der apikalen Membran epithelialer Zellen exprimiert werden, wird im Falle von Gefäßen, Drüsen und deren Ausführungsgängen die gegenseitige Zellreihe abgestoßen und so das Offenbleiben der Lumina gewährleistet [29]. Im Falle von Tumorzellen weiß man heute, dass sich die Expression nicht auf die apikale Zellmembran beschränkt, sondern über die gesamte Oberfläche der Tumorzellen ausweiten kann. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass mit einer verstärkten Expression von Muzinen über die gesamte Oberfläche der Tumorzellen auch das Metastasierungspotential eines Tumors steigt [38,57,73].

1.6 MUC 1

Aufgrund der Tatsache, dass MUC 1 bislang im Menschen, in Mäusen und Rindern nachgewiesen werden konnte, geht man heute davon aus, dass es in allen Säugetieren ähnlich exprimiert wird [57]. MUC 1 ist in erster Linie ein transmembranes Muzin, dessen Molekulargewicht zu beinahe 90% auf die Kohlenhydratseitenketten zurückzuführen ist, die überwiegend O-glykosidisch mit dem Core-Protein verbunden sind. Die cDNA dieses Muzins codiert ein Protein mit einer sehr großen extrazellulären Komponente (1000 bis 2200 Aminosäuren), die zum größten Teil aus der 20 Aminosäuren umfassenden Tandem-Repeat-Region besteht. Außerdem besitzt MUC 1 einen hydrophoben transmembranen Teil sowie einen 72 Aminosäuren langen phosphorylierten zytoplasmatischen Schwanz, der wiederum ein Signalmotiv enthält [20]. Durch diesen zytoplasmatischen Anteil ist MUC 1 direkt mit den Aktinfilamenten des Zytoskeletts verbunden und intrazellulär verankert [66].

Das Vorläufermolekül von MUC 1 unterliegt unmittelbar nach der Translation einer proteolytischen Modifikation und wird dabei in einen kleinen, den transmembranen und zytoplasmatischen Anteil beinhaltenden sowie einen größeren Teil gespalten, der hauptsächlich aus dem extrazellulären Abschnitt besteht. Die zwei so entstandenen Anteile bleiben nicht-kovalent miteinander verbunden [20,29]. Dieser Vorgang der Proteolyse findet im Endoplasmatischen Retikulum der Zelle statt [29]. Es wird vermutet, dass das so entstandene Heterodimer nach seiner Verankerung in der apikalen Zellmembran durch eine zweite proteolytische Spaltung sehr schnell den extrazellulären Bereich abwerfen kann. Über den zytoplasmatischen Schwanz ist das Molekül zur Signaltransduktion an das Zellinnere befähigt und damit in der Lage, z.B. Veränderungen des extrazellulären Milieus an den Zellkern weiterzugeben (Abb.4) [20].

Ein weiterer Schritt in der Reifung von MUC 1 ist die Glykosylierung des Core-Proteins, die im Golgi-Apparat stattfindet und bei der zahlreiche Zuckermoleküle an die Aminosäuren Serin und Threonin in Form einer O-glykosidischen Bindung angehängt werden [29]. Diese umfangreiche Glykosylierung und der hohe Anteil an Prolin mit etwa 20% innerhalb des Core-Proteins, was von essentieller Bedeutung für die Struktur von MUC 1 ist, verleihen dem Molekül große Rigidität und machen es extrem resistent gegenüber Proteasen [29,57]. Diese Moleküleigenschaften, gepaart

mit den zahlreichen Wiederholungen der Tandem-Repeat-Sequenz, machen MUC 1 zu einem äußerst stabilen Molekül, das mit seiner enormen Längenausdehnung, die Glykokalyx, die etwa 10 nm über die Zellgrenzen hinausreicht, überragt [18,20,29]. Da MUC 1 als Bestandteil der Zellmembran angesehen werden kann, verläuft sehr wahrscheinlich sein Abbau größtenteils in den zelleigenen Lysosomen [57].

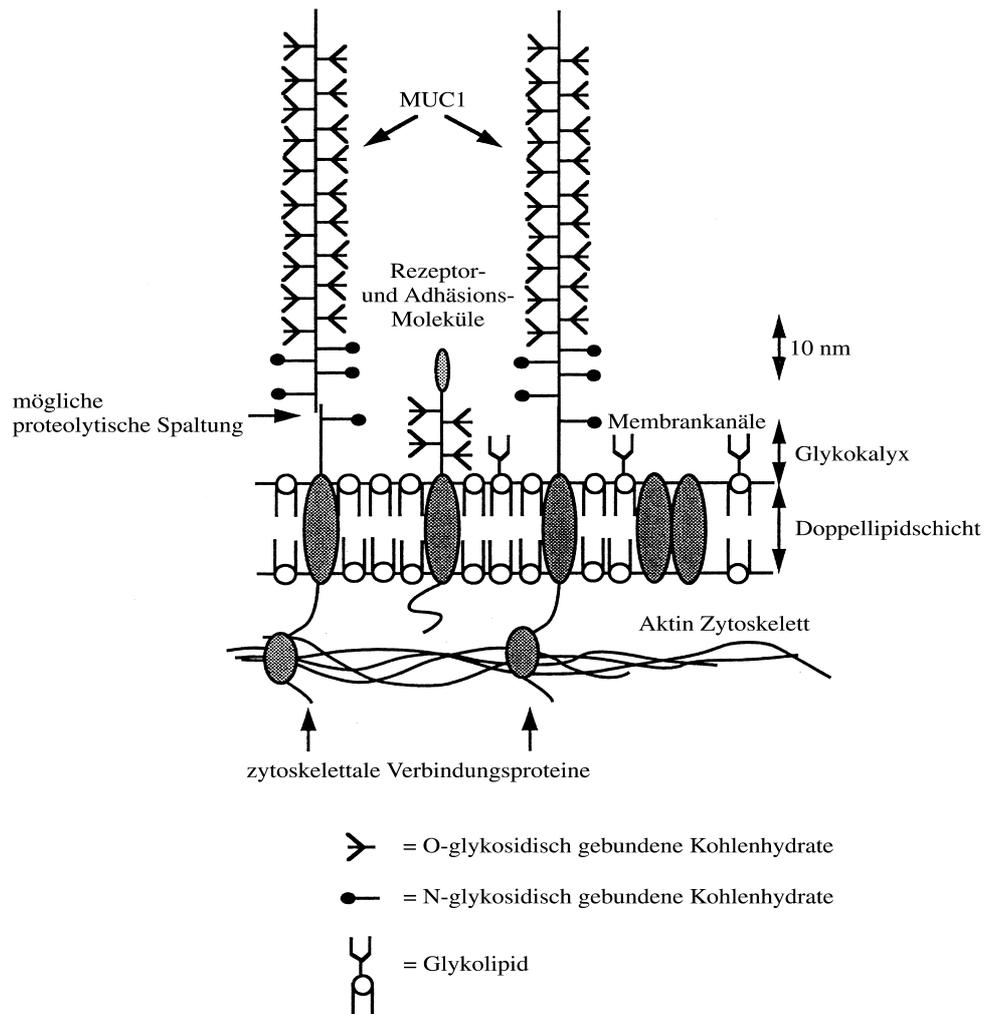


Abb. 4: Schema des transmembranen Muzins, MUC 1, mit extrazellulärem Bereich und zytoplasmatischer Verankerung
nach: Patton et al. 1995 [57]

1.6.1 Gensequenz von MUC 1

Das dem MUC 1-Molekül entsprechende Gen, *MUC 1*, befindet sich auf dem Chromosom 1q21-24 [31]. Es handelt sich dabei um eine ungewöhnlich kompakte Genstruktur, die in Abhängigkeit von der Größe der VNTR (=variable number of tandem repeats) annähernd 4-7 kb der DNA des Genoms überspannt [22,65]. Analysen der DNA von MUC 1 haben gezeigt, dass sie insgesamt aus sieben Exons besteht, die für vier charakteristische Regionen von MUC 1 kodieren [21,61]:

- a) N-terminale Region inklusive einer hydrophoben Signalsequenz
- b) Tandem-Repeat-Region
- c) C-terminale Region, bestehend aus der transmembranen Sequenz
- d) zytoplasmatischer Schwanz

Die extrem große VNTR Domäne, die vollständig im Exon 2 lokalisiert ist, besteht aus einer 60 bp langen, für 20 Aminosäuren kodierenden Sequenz, die sich individuell verschieden häufig wiederholt [61]. Die enorme Anzahl an möglichen Wiederholungen dieser Sequenz ist verantwortlich für den nachweisbaren Polymorphismus dieser Glykoproteine [13,27,57]. Alleine in der nordeuropäischen Bevölkerung beobachtet man zwischen 20 und 125 genetisch determinierte Wiederholungen in der VNTR des Moleküls [65].

MUC 1 ist in erster Linie als transmembranes Molekül bekannt. Alternative Splicing Prozesse führen aber zu verschiedenen Isoformen von MUC 1, die sowohl membrangebunden als auch sezerniert in Erscheinung treten können (Abb.5) [1,3,19]. Durch solche Vorgänge sind bislang drei weitere Isoformen bekannt geworden: MUC 1/Y, MUC 1/Z und MUC 1/SEC [3,20]. MUC 1/Y ist ein 282 bp umfassendes Molekül, das keine Tandem Repeats enthält. Diese Form wurde erstmalig in Mammakarzinom-Zelllinien nachgewiesen [53]. Es hat sich gezeigt, dass dieses Molekül in zwei verschiedenen Varianten auftaucht, die sich durch ihr Molekulargewicht unterscheiden (33 kDa und 42-45 kDa). Diese Beobachtung wird auf unterschiedliche Glykosylierung zurückgeführt [75]. MUC 1/Z, auch bezeichnet als MUC 1/X, verfügt ebenso wenig wie MUC 1/Y über die Tandem-Repeat-Region, ist aber mit 336 bp ein vergleichsweise größeres Molekül [53]. MUC 1/SEC hingegen ist durch das Fehlen des transmembranen und zytoplasmatischen Anteils charakterisiert und stellt somit eine sezernierte Form von MUC 1 dar. Die Funktion von MUC 1/SEC ist bislang nicht ausreichend erforscht. Man vermutet, dass

MUC 1/SEC durch Bindung an MUC 1/Y dessen Phosphorylierung induzieren und so zur Signaltransduktion beitragen kann [3,20,75].

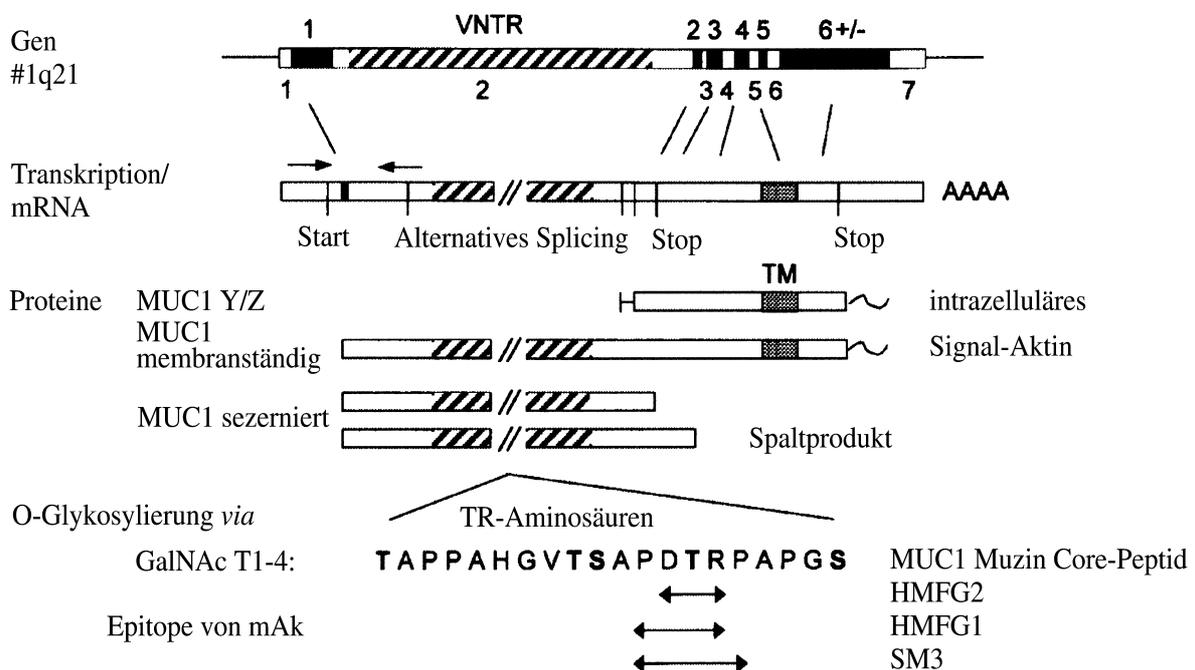


Abb. 5: Molekulare Organisation von MUC 1

nach: Franke et al.2001 [19]

Das Diagramm erläutert den genetischen Polymorphismus von MUC 1. Die Exon 2-Region kodiert für eine unterschiedliche Anzahl von Tandem repeats innerhalb der VNTR, die für die verschiedenen Allele verantwortlich ist.

Alternative Splicing-Prozesse innerhalb der primären mRNA auf Ebene der Transskription führen zu unterschiedlichen Isoformen von MUC 1.

Dabei entstehen neben dem MUC 1 mit vollständiger Moleküllänge (=MUC 1 membranständig) Varianten, denen die VNTR Region fehlt (=MUC 1 Y/Z) oder sezernierte Formen mit fehlendem transmembranen Abschnitt (=MUC 1 sezerniert).

Nach abgeschlossener Translation findet die Glykosylierung in Abhängigkeit der zellspezifischen GalNAc-Transferasen T1–T4 statt.

Die entsprechenden Epitope der monoklonalen Antikörper HMFG 1, HMFG 2 und SM 3 sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

1.6.2 Proteinstruktur von MUC 1

Die Proteinstruktur von MUC 1 lässt sich, wie bereits geschildert, in insgesamt 4 Abschnitte unterteilen. Eine Besonderheit, die dieses Molekül von anderen Glykoproteinen maßgeblich unterscheidet, ist die bereits erwähnte Tandem-Repeat-Region, deren Gehalt an den Aminosäuren Serin, Threonin, Prolin, Alanin und Glycin mit etwa 80% sehr hoch ist [22]. Die mehrfachen Wiederholungen dieser 20 Aminosäure langen Sequenz und ihre ausgiebige Glykosylierung resultieren in einer enormen Stabilitätszunahme. Hinzu kommt, dass die Aminosäure Prolin an der Entstehung von β -Faltblattstrukturen maßgeblich beteiligt ist und in gleichem Maß der Bildung von α -Helixformationen entgegenwirkt. Auch das begünstigt eine Streckung des Moleküls, das mit durchschnittlich 200 - 500 nm Länge über die Zellmembran hinausragt [29].

Zu beiden Seiten wird die Tandem-Repeat-Region von Cysteinresten flankiert. Über diese Aminosäure ist insbesondere die sezernierte Form von MUC 1 dazu in der Lage, via Disulfidbrückenbindungen die zuvor von der Zelle freigesetzten Monomere zu einem Geflecht aus Oligomeren zu verknüpfen. Der so entstandene Muzinfilm wird über die hierdurch neu gewonnenen adhäsiven und viskösen Eigenschaften seiner protektiven Funktion gerecht. Bezüglich der transmembranen Isoform vermutet man, dass hier ebenso wie bei anderen transmembranen Molekülen Fettsäuren an die Cysteinreste gehängt werden, die das Molekül stärker in der Membran verankern und so zusätzlich stabilisieren [23,45,53].

1.6.3 Glykosylierung von MUC 1

Unmittelbar nach dem Zusammenbau des Core-Proteins an den Ribosomen wird das Peptid zum rauhen Endoplasmatischen Retikulum transportiert. Hier wird das Vorläufermolekül an fünf dafür infrage kommenden Positionen, die außerhalb der Tandem-Repeat-Region liegen, einer sehr frühen N-Glykosylierung zwischen Asparagin und N-Acetyl-Glucosamin unterzogen. Die wesentlich umfangreichere O-Glykosylierung findet anschließend im Golgi-Apparat statt [30,43,57]. Die Monosaccharide, die als Bausteine für die Seitenketten von MUC 1 fungieren, sind im einzelnen: N-Acetyl-Galactosamin (GalNAc), N-Acetyl-Glucosamin (GlcNAc), Galactose, Fucose und Sialinsäure. Die initiale Anheftung von GalNAc an Serin bzw.

Threonin erfolgt mit Hilfe von GalNAc-Transferasen. Die vier bislang bekannten Vertreter dieser Enzymfamilie, GalNAcT1-4, sind durch ihr organspezifisches Vorkommen für die verschiedenen Glykosylierungsformen von MUC 1 mitverantwortlich [4,47,66]. Außer dem gewebespezifischen Enzymbestand scheint die Aminosäuresequenz des Core-Proteins für die Glykosylierung von essentieller Bedeutung zu sein [63]. Es wurde gezeigt, dass ein unmittelbares Nebeneinander von Serin und Threonin ebenso wie die gleichzeitige Anwesenheit von Prolin die Glykosylierung von MUC 1 in Gang setzt [50]. Nachdem GalNAc an Serin bzw. Threonin gekoppelt wurde, folgt das Anhängen weiterer Monosaccharide. So wächst das Molekül rasch in die Länge und gewinnt durch zahlreiche Verzweigungen der Polysaccharidkette an Komplexität [46]. Das Ende einer solchen Seitenkette bildet im Regelfall Sialinsäure, Fucose oder Galactose. Nach Abschluss der Glykosylierung wird das Molekül in den Membranen sekretorischer Vesikel zur Zellmembran transportiert [57]. Der gesamte Prozess läuft in drei verschiedenen Phasen ab: In der *Initiationsphase* wird GalNAc an das Protein angehängt. Darauffolgend werden während der *Elongationsphase* weitere Zuckermoleküle ergänzt. Das abschließende Hinzufügen peripherer Zuckerreste geschieht in der *Terminationsphase* [15].

1.6.4 Expression von MUC 1 in normalem menschlichen Gewebe

MUC 1 wird überall auf sekretorischen Zellen von Drüsen und Ausführungsgängen exprimiert [20,31]. Obwohl das Molekül im Regelfall an der apikalen Zellmembran exprimiert wird, konnte es auch innerhalb der Zelle nachgewiesen werden. Inwiefern es dort spezielle Funktionen übernimmt oder ob lediglich Vorläufer des Proteins detektiert sind, ist bis heute nicht geklärt. So ist wenig darüber bekannt, ob MUC 1 permanent im Inneren der Zelle lokalisiert ist oder dort lediglich während des Transportvorgangs zur Zelloberfläche markiert wurde [57]. MUC 1 konnte bisher in verschiedensten Geweben nachgewiesen werden (Tabelle 2).

Tabelle 2: Verteilung von MUC 1 im menschlichen Körper [8,31,74]

Gastrointestinaltrakt	Urogenitaltrakt	Andere Gewebe
- Speicheldrüsen	- Niere	- Bronchus
- Ösophagus	- Blasenurothel	- Mamma
- Magen	- Ureter	
- Gallenblase	- Prostata	
- Pankreas	- Uterus	
- Kolon	- Rete testis	
	- Epididymis	

Eine Expression von MUC 1 in männlichen Keimzellen wurde bisher nicht nachgewiesen, unter den gesamten Muzinen ist lediglich die Präsenz von MUC 8 an der Zelloberfläche von Spermien beschrieben worden [12]. Im Reproduktionstrakt von Frauen konnte eine unterschiedliche Intensität in der Expression von MUC 1 an Zellen beobachtet werden, die dem hormonellen Zyklus unterliegen; so z.B. im Endometrium oder der Brustdrüse. Untersuchungen haben gezeigt, dass sowohl Progesteron als auch Östrogen starken Einfluss auf die Expression von MUC 1 an der luminalen Seite des Endometrium-Epithels nehmen können. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass das Zusammenspiel von Insulin, Hydrokortison und Prolaktin eine deutliche Zunahme der MUC 1-Expression in Brustdrüsenepithelien bewirkte. Diese Untersuchungen erhärten den Verdacht, dass die Regulation der Expression von MUC 1 hormonell gesteuert ist [7,56,69].

1.6.5 MUC 1 im Reproduktionstrakt

Zahlreiche Studien zu der Expression und Wirkung von Muzinen liegen für den weiblichen Genitaltrakt vor, da MUC 1 und MUC 9 im Eileiter deutlich exprimiert werden. Man geht aufgrund von in vitro Untersuchungen davon aus, dass diese Glykoproteine, vermittelt durch ihre anti-adhäsiven Eigenschaften, einer Eileiterschwangerschaft vorbeugen [40]. Interessant ist auch die Expression von MUC 1 im Endometrium. Abhängig vom hormonellen Status zeigen die luminalen

Zellen mal eine stärkere, mal eine schwächere Expression. So konnte u.a. gezeigt werden, dass MUC 1 kurz vor der Implantation eines Embryos lokal kaum exprimiert wird bzw. veränderte Glykoformen auftreten, die sogar pro-adhäsive Wirkung entfalten [28,40]. Im unteren Genitaltrakt der Frau ist hier die protektive Eigenschaft der Muzine gegenüber Bakterien bedeutend. Zwar werden hier auch Immunglobuline vom Typ A sezerniert, die Mikroorganismen abwehren, aber diese Antikörper sind erstaunlicherweise nicht permanent nachweisbar. IgA konnte z.B. nicht während der östrogenen Phase nachgewiesen werden. In diesem Fall dient das Muzin-sezernierende Vaginalepithel als entscheidende Verteidigungslinie nicht nur gegenüber Krankheitserregern, die während des Geschlechtsaktes übertragen werden können, sondern auch gegenüber der eigenen Vaginalflora. Versuche an Mäusen haben gezeigt, dass MUC 1-negative Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe, nachweislich verursacht durch die physiologische Vaginalflora, in hohem Maße chronische Entzündungen wie z.B. Vulvovaginitis oder Cervicitis entwickelten. Einhergehend mit den chronischen Entzündungen wurden gehäuft Fertilitätsstörungen und eine erhöhte Rate an Spontanaborten beobachtet [14,40].

Bis heute weiß man dagegen nur wenig über die Funktion von Muzinen im männlichen Reproduktionstrakt. Das größte Augenmerk galt bislang der Prostata, die eine Expression von Muzinen sowohl auf normalen als auch malignen Epithelzellen zeigt. Unter den transmembranen Muzinen wird MUC 1 hier stark exprimiert [40]. Außerdem konnte im Nebenhoden ein Protein, HE 6, nachgewiesen werden, das viele membranübergreifende Domänen und muzinähnliche Regionen besitzt [54]. Hinsichtlich der Keimzellen konnte bislang nur die Präsenz von MUC 8 auf der Oberfläche von Spermien nachgewiesen werden. Man vermutet, dass aufgrund dieser Muzinummantelung und den damit verbundenen anti-adhäsiven Eigenschaften der Spermientransport durch den männlichen und weiblichen Reproduktionstrakt erleichtert wird [12,40].

2. Fragestellung

MUC 1 wurde bisher im Rahmen zahlreicher Untersuchungen in unterschiedlichen Epithelzelltypen sowohl des weiblichen als auch des männlichen Reproduktionstraktes nachgewiesen.

Die vorliegende Arbeit soll den Zufallsbefund einer aufgefallenen Immunreaktivität von anti-MUC 1–Antikörpern in Keimzellen der normalen Spermatogenese abklären; sie beschäftigt sich daher erstmalig mit dem Nachweis einer Expression von MUC 1 in menschlichem Hodengewebe bzw. seinem Auftreten in männlichen Keimzellen.

Da unterschiedliche Glykosylierungsformen von MUC 1 bekannt sind, sollen diese ferner durch definierte Antikörper unterschieden und zusätzlich erfasst werden.

Hier liegt der morphologische Schwerpunkt der Arbeit darin, zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen Glykosylierungsvarianten von MUC 1 und der Keimzeldifferenzierung im Laufe der Spermatogenese besteht. Ferner soll geprüft werden, ob Besonderheiten eine pathologisch gestörte Spermatogenese charakterisieren.

3. **Material und Methoden**

3.1 **Patientenkollektiv und Gewebe**

Die morphologischen Analysen wurden an insgesamt 65 Hodengewebebe-
proben durchgeführt, die von 63 verschiedenen Patienten stammten. Das durchschnittliche
Alter der Patienten lag bei 34 Jahren, die Altersverteilung reichte insgesamt von 20-
72 Jahren. Die zur Untersuchung herangezogenen Gewebeproben wurden einerseits
am Institut für Pathologie der Justus-Liebig-Universität in Gießen (Leiter: Prof. Dr. A.
Schulz) in einem Zeitraum von 1996 bis 1999 im Rahmen der Routinediagnostik
formalinfixiert und paraffineingebettet archiviert. Dieses Material betraf 27
verschiedene Patienten, die aufgrund eines Keimzelltumors orchidektomiert wurden
und in tumorfreien Arealen eine normale oder nur diskret veränderte
Spermatogenese aufwiesen. In den übrigen 36 Fällen stand archiviertes Biopsie-
Material aus der Routinediagnostik des Anatomischen Instituts der Veterinärklinik der
Justus-Liebig-Universität (Leiter: Prof. Dr. M. Bergmann) zur Verfügung.
Dieses Material umfasste reine oder kombinierte Spermatogenese-arreste auf
verschiedenen Entwicklungsstufen der Keimzellen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Verteilung der Spermatogenesestörungen im Biopsie-Material

Arreste auf der Entwicklungsstufe von:	Anzahl
Spermatogonien	6
Spermatozyten	17
Spermatiden	5
Fokales SCO	5
Kombinierte testikuläre Atrophie	8

Normale Spermatogenese war in 11 Fällen nachweisbar, entsprechend einem Score ≥ 8 [33].

Zusätzlich wurde frisches Gewebe von drei Patienten untersucht, das durch Orchidektomie bei bestehendem Prostatakarzinom (Patientenalter 53 Jahre), kleinem peripherem Teratom (Alter 18 Jahre) sowie Epididymitis (Alter 32 Jahre) gewonnen und entweder sofort weiterverarbeitet oder unmittelbar in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde.

3.2 Verwendete Antikörper

Zur Detektion des MUC 1-Proteins kamen drei verschiedene monoklonale Antikörper von der Maus in einer Konzentration von jeweils 10 μ g/ml zum Einsatz, die in Abhängigkeit von den mit dem Core-Protein verankerten Kohlenhydratseitenketten sehr eng benachbarte Sequenzen innerhalb der VNTR (= Variable Number of Tandem Repeats) erkennen (Abb. 5 und Tabelle 4). Diese Antikörper sind sehr gut charakterisiert und als „Gold-Standard“ in dem Nachweis von MUC 1 bekannt [6]. HMFG 1 und HMFG 2 reagieren mit den hoch- bzw. voll-glykosylierten Molekülvarianten, SM 3 dagegen lediglich mit nicht- oder nur gering glykosyliertem MUC 1-Protein.

Tabelle 4: Monoklonale Antikörper gegen MUC1 [6]

Antikörper	Epitop
HMFG-1	PDTR
HMFG-2	DTR
SM 3	PDTRP

Im Rahmen der verwendeten APAAP-Technik kamen darüber hinaus standardisierte Sekundär- und Tertiärantikörper zum Einsatz (Tabelle 5).

Tabelle 5: Sekundär- und Tertiärantikörper

Antikörper	Epitop	Konzentration
Anti Maus IgG (LINK)	Maus IgG	29 µg/ml
Anti-AP (APAAP)	Alkalische Phosphatase	0,09 µg/ml

3.3 Immunhistochemie

3.3.1 Paraffinschnitte

Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden von jedem Paraffinblock Schnitte der Dicke 2-3 µm angefertigt. Diese Schnitte wurden, um einer Faltenbildung vorzubeugen, in ein Wasserbad mit 40-50 °C überführt. Die geglätteten Schnitte wurden anschließend auf spezielle Objektträger (Superfrost, Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgezogen. Unmittelbar danach wurden die Objektträger für mehrere Stunden zum Trocknen bei 37 °C in einen Brutschrank gestellt und später bei Raumtemperatur gelagert.

3.3.2 Mikrowellenbehandlung

Die Vorbehandlung der Paraffinschnitte in der Mikrowelle bewirkt eine bessere Demaskierung gesuchter Epitope in den fixierten Geweben. Die Objektträger wurden hierzu möglichst gleichmäßig auf Kunststoffküvetten verteilt, welche dann mit Zitratpuffer (siehe Anhang) vollständig aufgefüllt wurden. Danach wurden die Küvetten kreisförmig in eine Mikrowelle gestellt, um so eine möglichst gleichmäßige Erwärmung des Zitratpuffers zu erzielen. Die Schnitte wurden nun einer 6x fünfminütigen Mikrowellenbehandlung bei 600 Watt Leistung unterzogen. Zwischen den einzelnen Durchgängen wurde regelmäßig überprüft, ob noch ausreichend Pufferlösung in den Küvetten vorhanden war. Im Anschluss an den letzten

Behandlungsdurchgang wurden die Schnitte zum Abkühlen für 15 Minuten in Tris–Waschpuffer (siehe Anhang) gegeben.

3.3.3 APAAP–Methode

Zur immunhistochemischen Untersuchung wurde die Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Technik (APAAP) angewandt. Dabei diente das Verfahren nach Cordell et al. als Vorlage [11].

a) Fixierung

Zunächst wurden die Objektträger bei Raumtemperatur für 10 Minuten in Xylol entparaffinisiert und dann 10 Minuten in Aceton nachfixiert. Zum Schluss kamen die Paraffinschnitte für weitere 10 Minuten in ein Aceton/Tris-Waschpuffer - Gemisch mit dem Verhältnis 1:1. Nachdem sie noch einmal in Tris-Waschpuffer gespült worden waren, konnten sie der Mikrowellentechnik zugeführt werden.

b) Antigendemaskierung

Um die entsprechenden Epitope im Präparat zu demaskieren, wurden die Paraffinschnitte in der Mikrowelle (s.o.) vorbehandelt.

c) Inkubationen

Sämtliche Antikörper, die bei den Untersuchungen Verwendung fanden, wurden mit RPMI (siehe Anhang) auf die jeweiligen Endkonzentrationen verdünnt. Die Inkubationszeiten der einzelnen Antikörper sind in Tabelle 6 aufgelistet. Der dort beschriebene Spülvorgang mit Tris–Waschpuffer, der sich an jeden Inkubationsvorgang anschloss, hatte den Zweck, nicht gebundene Antikörper aus dem Präparat zu spülen und somit eine optimale Färbereaktion zu gewährleisten.

Der wiederholte Inkubationsdurchgang mit dem Brücken (LINK)- bzw. Detektions (APAAP)-Antikörper diente der Reaktionsintensivierung. Das abschließende zehnmahlige Spülen mit Tris-Waschpuffer sollte garantieren, dass auch die restlichen, nicht gebundenen Antikörper aus dem Präparat abdiffundieren.

Tabelle 6: Inkubationsschema der APAAP-Methode

1.	Primärantikörper	30 min.
	Spülen in Tris-Waschpuffer (getrennt nach Antikörpern)	3-mal
2.	Brückenantikörper (LINK) 1:40	30 min.
	Spülen in Tris-Waschpuffer	3-mal
3.	Detektionsantikörper (APAAP) 1:50	30 min.
	Spülen in Tris-Waschpuffer	3-mal
4.	Brückenantikörper (LINK) 1:40	10 min.
	Spülen in Tris-Waschpuffer	3-mal
5.	Detektionsantikörper (APAAP) 1:50	10 min.
	Spülen in Tris-Waschpuffer	10-mal

d) Entwicklung

An den letzten Spülvorgang schloss sich die Entwicklung an, bei der die im Präparat gebundene alkalische Phosphatase mit Hilfe von Neufuchsin (siehe Anhang) unter gleichzeitiger Blockierung der endogenen alkalischen Phosphatase durch Laevamisol sichtbar gemacht wurde. Die Entwicklungslösung (Mengenangaben siehe Anhang) wurde wie folgt angesetzt: Laevamisol wurde in entsprechender Menge einem Gemisch aus Entwicklungspuffer und Propandiol (Lösung I) zugegeben. Der pH-Wert dieser Lösung wurde mittels HCL und NaOH auf 9,75 eingestellt. Des Weiteren wurden Natriumnitrit mit Aqua dest. (Lösung II) und Naphtol-AS-Bi-Phosphat mit N,N-Dimethylformamid (Lösung III) gemischt. Nachdem Neufuchsin der Lösung II zugegeben worden war, wurde erst diese, dann die Lösung III dem Ansatz I beigemischt. Die Entwicklungslösung wurde sofort filtriert und auf Glasküvetten aufgeteilt. Nun erfolgte die Entwicklung der Präparate für ca. 25 Minuten auf einem Rüttler bei etwa 150/min.

e) Gegenfärbung

Nach Ablauf der Entwicklung wurden die Präparate für 2 Minuten in Hämalaun gegengefärbt und anschließend mit Leitungswasser gespült, um überschüssiges Hämalaun zu entfernen. Abschließend wurden die Präparate mit Hilfe von Glycergel (DAKO), das zuvor auf ca. 80 °C erhitzt wurde, eingedeckelt. Nach Abschluss des gesamten Färbeprozesses wurden die Präparate bei Raumtemperatur gelagert und standen der weiteren Auswertung zur Verfügung.

3.4 Proteinbiochemie

3.4.1 Proteinaufbereitung

Frisches kryokonserviertes humanes Hodengewebe, für diese Analyse von Herrn Prof. Dr. Bergmann, Klinik für Veterinärmedizin der JLU in Gießen, zur Verfügung gestellt, wurde unter ständiger Kühlung auf Eis in kleinste Stücke zerteilt. Es wurde strikt darauf geachtet, dass ausschließlich Hodenparenchym erfasst wurde, das keine Anteile des Rete testis oder Nebenhoden aufweisen konnte. Mit Hilfe eines Homogenisators wurde das Gewebe nach Zugabe von 2ml HEPES-Puffer (siehe Anhang) homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenisat einmal für 15 Minuten bei 12000g zentrifugiert, um dadurch eine Sedimentation des überschüssigen Zelldetritus zu erreichen. Der Überstand wurde abpipettiert und in Eppendorf-Tubes bei -80°C eingefroren. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch.

3.4.2 Proteinproben

Am Ende der zuvor beschriebenen Aufbereitung ergaben sich zwei Proben mit verschiedenen Proteinkonzentrationen, die Probe 1A mit 16 mg/ml und die Probe 2A mit 3,5 mg/ml. 100 µl der höher konzentrierten Probe 1A wurden zunächst mit 400 µl HEPES-Puffer verdünnt und anschließend mit 500 µl Probenpuffer (siehe Anhang) vermischt. Die niedriger konzentrierte Probe 2A wurde direkt 1:1 mit Probenpuffer auf insgesamt 1 ml verdünnt. Nach guter Durchmischung wurden die Proben kurz aufgekocht und anschließend 200 µl in die breite Geltasche eingefüllt. Zur Ermittlung

des Molekulargewichtes lief während des Elektrophoresevorgangs der standardisierte Molekulargewichts-Marker MW-SDS-BLUE (Fa. Sigma) mit.

3.4.3 Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Vorbereitung des beabsichtigten Western- bzw. Immunoblots wurden als Trennmedium Polyacrylamidgele verwendet, die durch Vernetzung von Acrylamid mit Bisacrylamid zu einem Polymer unter Verwendung des Reaktionsstarters APS (Ammoniumperoxidinsulfat) und des Beschleunigers TEMED (N,N,N,N-Tetramethyläthylendiamin) entstehen. SDS (Natriumdodecylsulfat), ein anionisches Detergens, bindet stark an Proteine, die dadurch eine negative Ladung erhalten und so eine Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld aufgrund ihrer Größe erlauben. Zur Vermeidung von Verunreinigungen aller verwendeten Gegenstände wurden sämtliche Arbeitsschritte mit Handschuhen durchgeführt. Die Glasplatten, Abstandhalter (spacer) und Käme wurden zunächst in einer Seifenlauge gereinigt und danach mit Aqua dest. gespült. Die verwendeten Glasplatten wurden zusätzlich in 100%-igem Alkohol entfettet. Nach dem Zusammenbau der Glasplatten und deren Einsetzen in Gelgießkammern des Systems Bio-Rad wurden die Gele, entsprechend der vorgegebenen Rezepte (siehe Anhang), angesetzt und gegossen. Das zunächst gegossene Trenngel wurde mit gesättigtem N-Butanol überschichtet. Nach Auspolymerisation des Gels wurde die Überschichtungslösung mit Hilfe von Filterpapier abgezogen und dann in gleicher Weise das Sammelgel gegossen. Um Geltaschen für die Proteinlösung und die Markersubstanz zu erzeugen, in die später die Proteinlösung und die Markersubstanz eingefüllt werden sollten, wurde in das noch nicht auspolymerisierte Sammelgel ein Plastikamm eingesetzt. Nachdem auch das Sammelgel auspolymerisiert war, wurde der Kamm entfernt und die so entstandenen Geltaschen mit Elektrophoresepuffer (siehe Anhang) ausgespült. Die Glasplatten, mit den sich dazwischen befindlichen Gelen, wurden jetzt aus der Gießkammer herausgenommen und in die Elektrophoresekammer (Bio-Rad) eingesetzt. Im Anschluss daran wurden sowohl die Proteinproben als auch die Markersubstanz in die Geltaschen eingefüllt. Entsprechend dem zu kalkulierenden Molekulargewicht der MUC 1 Proteine von 250 bis 500 kDa [21] wurden für die Elektrophorese bestimmte Bedingungen gewählt. Für die hergestellten 7,5%-igen

Gele wurde eine Laufzeit von 2,5 Stunden bei folgenden Stromspannungen veranschlagt:

In der ersten halben Stunde wurde eine Stromspannung von 80 V gewählt, um das Protein auf dem Boden des Sammelgels zu konzentrieren. Danach, im Bereich des Trenngels, wurde für ca. eine Stunde eine Spannung von 100 V angelegt. Für die letzte Stunde des Elektrophoresevorgangs wurde eine Spannung von 150 V gewählt.

3.4.4 Immunoblot

Um die im Gel befindlichen elektrophoretisch aufgetrennten Proteine durch Immunreaktion sichtbar zu machen, wurden sie auf ein Nitrozellulose-Papier übertragen. Dazu wurde ein „Blot-Sandwich“ wie folgt zurechtgelegt: Zur Kathodenseite hin ein Schwamm, darauf ein Whatman-Filterpapier und das entsprechende Gel, das mit Aqua dest. umspült wurde. Auf das Gel wurden zwei Nitrozellulose-Blotmembranen gelegt, dann wieder ein Whatman-Papier und zum Schluss erneut ein Schwamm. All diese Materialien wurden zuvor in CAPS-Puffer (siehe Anhang) getränkt. Nun wurde das „Blot-Sandwich“ in die Blot-Kammer (Bio-Rad), die vollständig mit CAPS-Puffer gefüllt war, eingesetzt. Es folgte der Blotvorgang bei 150 mA für 35 min, nach dessen Abschluss das Nitrozellulose-Papier über Nacht in Magermilchlösung (siehe Anhang) gelegt wurde. Dies erfolgte zur Unterdrückung unspezifischer Antikörperbindungen. Zur Detektion der Proteine wurde das Nitrozellulose-Papier in ein spezielles Miniblotter-System (Bio-Rad) eingespannt, das aufgrund separater Spurkanäle die gleichzeitige Analyse mit verschiedenen Antikörpern ermöglicht. Als Primärantikörper wurden die auch in der Immunhistochemie verwendeten Antikörper HMFG 1, HMFG 2 und SM 3 eingesetzt, als Negativkontrolle diente der gegen Kaninchen-Antigen gerichtete monoklonale Antikörper MR 12/53. Als Positivkontrolle wurde der monoklonale Antikörper CG 2 eingesetzt, der das bei 170 kDa zu erwartende somatische Angiotensin-Converting-Enzym der Leydig-Zellen des Hodenparenchyms erkennt. Die einzelnen Antikörper wurden in selektierten Bahnen nach dem Schema von Tabelle 7 gleichzeitig inkubiert.

Tabelle 7: Inkubationsschema des Immunoblots

1.	Primärantikörper	45 min.
	Spülen mit Tris-Waschpuffer	2-mal
2.	Brückenantikörper (LINK) 1:40	45 min.
	Spülen mit Tris-Waschpuffer	2-mal
3.	Detektionsantikörper (APAAP) 1:50	45 min.
	Spülen mit Tris-Waschpuffer	3-mal

Nach der letzten Spülung wurde das Nitrozellulose-Papier aus dem Inkubator genommen und in einer Entwicklungslösung (siehe Anhang) bei Raumtemperatur unter Sichtkontrolle entwickelt. Unmittelbar im Anschluss konnten die Nitrozellulose-Papiere ausgewertet werden.

4. Ergebnisse

4.1 Proteinbiochemie

Das Protein von MUC 1 konnte im adulten Hodengewebe, das weder Anteile des Rete testis noch des Nebenhodens enthielt, mittels Western-blot Analysen eindeutig nachgewiesen werden. Beide monoklonalen Antikörper, HMFG 1 und HMFG 2, die ihre Epitope innerhalb der VNTR in Abhängigkeit des Glykosylierungsstatus von MUC 1 erkennen, ließen jeweils zwei unterschiedliche Proteinbanden sichtbar werden, die beide einem Molekulargewicht von deutlich mehr als 200 kDa entsprachen (Abb. 6A). Die jeweilige Detektion von zwei hochmolekularen Banden ist auf die zu erwartende genetische Variabilität unterschiedlicher Allele zurückzuführen und ein Charakteristikum von MUC 1. Wie mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers SM 3 geprüft, ließen sich niedrig glykosylierte Varianten von MUC 1 im Hodenparenchym nicht nachweisen (Abb. 6A).

4.2 Molekulare Expressionsanalysen

Zur weiteren und unabhängigen Bestätigung von MUC 1 auch auf der Stufe der Transkription werden mittels RT-PCR ergänzende Expressionsanalysen erwähnt. Diese Analysen wurden von Frau Dr. Pauls und Herrn Dr. Franke im Institut für Pathologie der Justus-Liebig-Universität parallel durchgeführt und sollen daher kurz präsentiert werden.

Hierbei wurden mRNA Extrakte aus Gefrierproben zweier unterschiedlicher Fälle untersucht, die ebenfalls lediglich aus reinem Hodengewebe mit normaler Spermatogenese ohne Anteile des Rete testis oder des Nebenhodens bestanden.

Die verwendeten Primer überspannen das Intron 1 und eine Region von 27bp Länge am 5'-Ende des Exon 2, einer Sequenz, die in den Vorgang des alternativen Splicings von primärer MUC 1 RNA eingebunden ist. Durch dieses alternative Splicen entstehen zwei bekannte Varianten der MUC 1 mRNA, die von Ligtenberg et al. beschriebenen Varianten A und B [45]. Diese für MUC 1 mRNA charakteristischen Varianten werden durch die erzielten cDNA-Produkte mit 118bp

respektive 145bp Länge auch im Hodenparenchym gefunden (Abb. 6C) und hier speziell in Spermatozyten nach Laser-assistiertem Zellpicking (Abb. 6D).

Somit wurde von der Arbeitsgruppe auch auf Ebene der Transkription der Nachweis erbracht, dass im menschlichen Hodengewebe MUC 1 tatsächlich exprimiert wird.

4.3 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Reaktionen von HMFG 1 und HMFG 2 bestätigten die Expression von MUC 1 in menschlichen Keimzellen. Darüber hinaus zeigten sie ein - in Abhängigkeit vom Ausmaß der MUC 1-Glykosylierung - jeweils unterschiedliches und interessantes Färbemuster mit Spezifität für bestimmte Entwicklungsstufen und pathologische Alterationen der Keimzellendifferenzierung.

In allen Untersuchungsreihen konnte MUC 1 nur in differenzierenden Keimzellen, nicht aber in Leydig-Zwischenzellen oder sonstigen Zellformen des Hodenparenchyms nachgewiesen werden. Der Antikörper SM 3, der lediglich gering glykosylierte Formen von MUC 1 detektiert, zeigte in Analogie zu den Ergebnissen der Western-blot Untersuchungen keinerlei Reaktion mit Keimzellen oder sonstigen Zellen des Hodenparenchyms. Dies galt sowohl für alle untersuchten Fälle mit normaler als auch mit gestörter Spermatogenese.

4.3.1 Normale Spermatogenese

4.3.1.1 Die durch HMFG 1 detektierten Glykosylierungsvariante von MUC 1 zeigte in allen untersuchten Fällen eine Expression auf der Differenzierungsstufe pachytäner Spermatozyten sowie einiger elongierter Spermatischen. Neben der von Tubulus zu Tubulus in Gruppen spermatozytärer Zellen variablen und generell maximal schwachen Immunreaktion fanden sich jedoch immer wieder einige Gruppen von Spermatozyten, die eine sehr intensive Markierung aufwiesen (Abb. 7A). Letztere waren zytologisch oft auffällig mit deutlich degenerativen oder abnormen zellulären Differenzierungsmustern (Abb. 7C). Diese, durch HMFG 1 hervorgehobenen Spermatozyten, grenzten zudem oft unmittelbar an Tubulus-Bereiche an, in denen das Fehlen einer kompletten Keimzellgeneration offensichtlich war (Abb. 7C). Sertolizellen, Spermogonien und innerhalb des Lumens der Tubuli

seminiferi gelegene Spermatozoen wiesen hingegen konstant keine Immunreaktion für HMFG 1 auf.

4.3.1.2 Im Gegensatz zu HMFG 1 fand sich die HMFG 2-Glykosylierungsvariante von MUC 1 ausschließlich und konstant auf der Keimzelldifferenzierungsstufe der Spermatischen. Innerhalb dieser Differenzierungsform zeigten die elongierten gegenüber den runden Spermatischen die relativ intensivste Markierung (Abb. 7B). Die übrigen Keimzellstufen, beginnend mit den Spermato gonien, aber auch Spermatozyten und Spermatozoen, zeigten keine zu sichernde Immunreaktion für HMFG 2, ebenso wenig wie Sertoli-Zellen oder extratubuläre Zellformen.

4.3.1.3 Der monoklonale Antikörper SM 3, der im Gegensatz zu den oben aufgeführten Antikörpern nur eine gering glykosylierte Form von MUC 1 erkennen kann, zeigte auf keiner Entwicklungsstufe eine nachweisbare Immunreaktion in Keimzellen und diente somit als ergänzende Negativkontrolle der immunhistologischen Untersuchung.

4.3.2 Gestörte Spermatogenese

Das Grundprinzip einer Expression von MUC 1 nur in differenzierenden Keimzellen fand sich auch in allen untersuchten Fällen mit gestörter Spermatogenese. Unabhängig von der Art der zugrundeliegenden Störung waren die glykosylierten HMFG 1- und HMFG 2- Molekülvarianten nur auf den Stufen der Spermatozyten bzw. Spermatischen nachweisbar, d.h., ggf. noch vorhandene Spermato gonien oder tubulär freiliegende Spermien zeigten sich stets negativ. Die Konstanz der erzielten Ergebnisse zwischen den einzelnen Fällen und pathologischen Fallgruppen erlaubt eine zusammenfassende Darstellung der Resultate, die sich an der jeweils erreichten Differenzierung der Keimzellen orientiert (Tabelle 8). Ein gutes Beispiel hierfür und die Analogie zum Normalbefund bieten die 8 analysierten Fälle einer gemischten tubulären Atrophie. Diese zeigten eine quantitativ zwar deutlich reduzierte Spermatogenese (auf dem Boden einer reduzierten Spermato gonienzahl) und relativ vermindertes Auftreten von MUC 1-Protein, jedoch keinen qualitativen Unterschied im zellulären Expressionsmuster (Abb. 7D und E). Als Hauptbefund wiesen dagegen aber alle 17 analysierten Fälle mit Spermatozytenarrest eine sehr

starke HMFG 1-Immunreaktivität in den reifungsarretierten Keimzellen auf (Abb. 7F), begleitet von einer ebenfalls abnormen, etwas variableren Immunreaktivität der in Spermatozyten sonst nicht vorkommenden HMFG 2-Variante (Abb. 7G).

4.3.2.1 HMFG 1 markierte somit überdeutlich die pachytänen Spermatozyten in allen Fällen einer spermatozytären Reifungsblockade. In anderen Störungen, wie z.B. der gemischten tubulären Atrophie oder dem Arrest auf Ebene der Spermatiden, war eine Akkumulation der HMFG 1-Variante dagegen nicht zu verzeichnen (Tabelle 8). In diesem Zusammenhang interessant ist die Beobachtung, dass Gruppen von Spermatozyten einer irritierten Spermatogenese, die z.B. in der Nachbarschaft von Keimzelltumoren vorkommt, oft ein relativ verstärktes Signal für HMFG 1 aufwiesen (Abb. 8A und B). Das immunhistologische Signal in Spermatozyten war nicht strikt auf die Zellmembran begrenzt, sondern zudem diffus im Zytoplasma der Spermatozyten nachweisbar (Abb. 8B).

4.3.2.2 HMFG 2 reagierte wiederum spezifisch in Spermatiden, wobei elongierte Zellen etwas intensiver markiert wurden als runde. Entsprechend der normalen Spermatogenese fand sich in diesen Keimzellen ein deutlich diffuses, zytoplasmatisches Signal (Abb. 8C). Die durch HMFG 2 indizierte MUC 1-Glykosylierungsvariante zeigte keine Akkumulation oder quantitative Veränderungen in Fällen einer Reifungsblockade auf Stufe der Spermatiden (Tabelle 8). Als alleinige Ausnahme wurde hier die bereits erwähnte und z.T. starke Immunreaktivität in reifungsarretierten Spermatozyten bei Spermatozytenarrest gefunden.

4.3.2.3 Eine gering glykosylierte MUC 1-Variante wurde weder im Zusammenhang mit Atrophien noch Reifungsstörungen der Keimzellen detektiert. Wie bei normaler Spermatogenese zeigte sich SM 3 stets komplett negativ innerhalb des analysierten Hodenparenchyms (Abb. 8D).

Tabelle 8: Zusammenfassung der MUC 1-Immunreaktivität in normaler und gestörter Spermatogenese [19]:

Morphologie	Analysierte Fälle	HMFG 1	HMFG 2	SM 3
Sertoli-Zellen	65	–	–	–
- Sertoli-Cell-Only	5 ^b	–	–	–
Spermatogonien	65	–	–	–
- Atrophie ^c	8	–	–	–
- Spermatogonienarrest	6 ^b	–	–	–
Spermatozyten	65	–	–	–
- Lepto-/Zygotän	53	– / + ^a	–	–
- Pachytän	17	+++	– / +++ ^a	–
Spermatiden	53	–	+	–
- runde	48	– / + ^a	++ / + ^a	–
- elongierte	5 ^b	–	+	–
- Spermatidenarrest				
Spermatozoen	48	–	–	–

Legende:

- ^a unterschiedliche Immunreaktivität zwischen verschiedenen Tubuli seminiferi
- ^b nur in kombinierten Störungen nachgewiesen
- ^c bezieht sich auf eine reduzierte Spermatogonienzahl bei gemischter tubulärer Atrophie
- ^d nur pathologische Fälle wurden aufgelistet

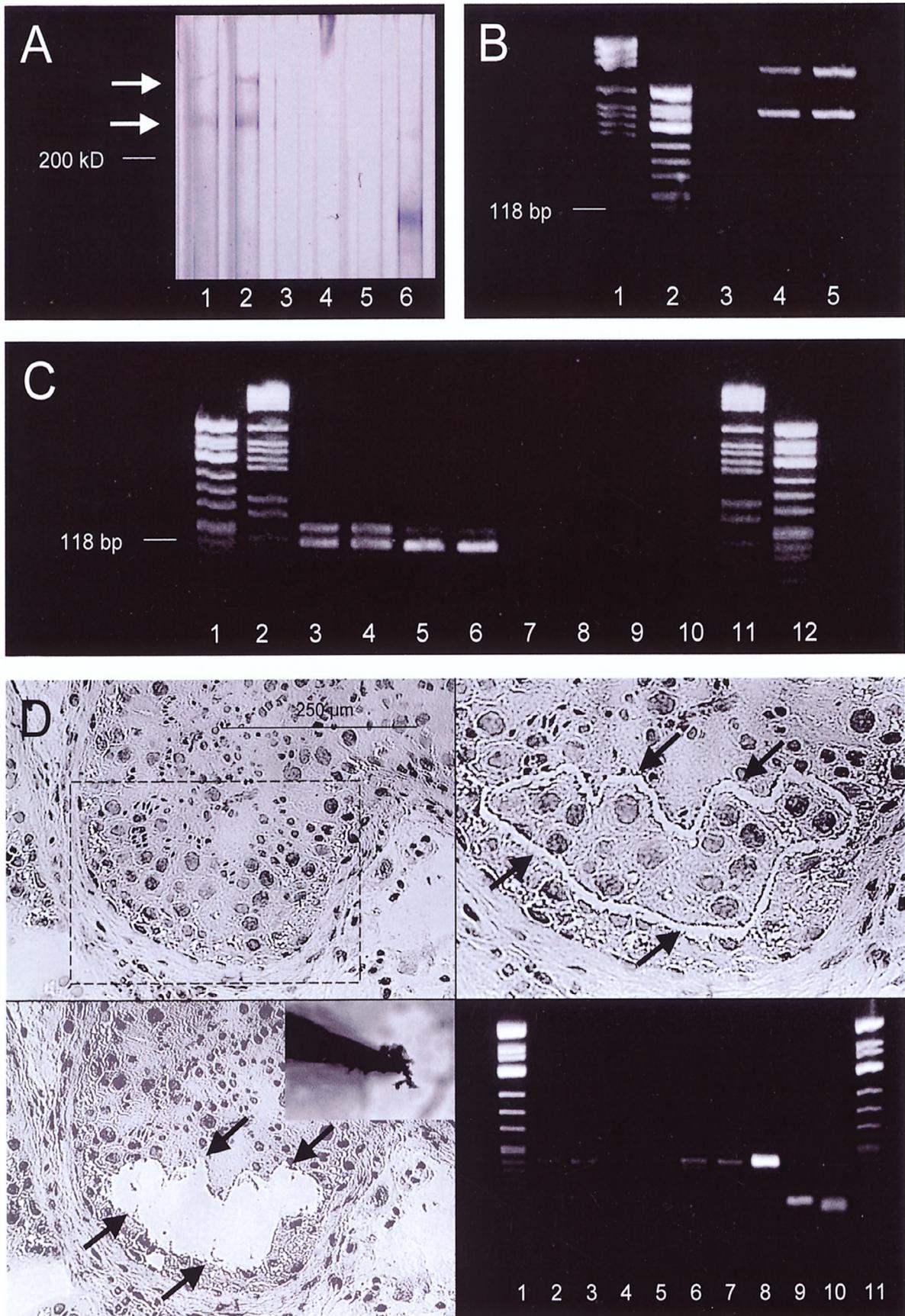


Abb. 6

ad Abb. 6: Molekulare Detektion von MUC 1 in Gewebeextrakten reinen Hodenparenchyms ohne Anteile des Rete testis oder Nebenhodens (A-C). UV-Laser assoziiertes Zellpicking aus Tubuli seminiferi (D).

(in Kooperation mit Frau Dr. Pauls und Herrn Dr. Franke)

A) Die Immunoblot-Analysen zeigen zwei Signale oberhalb eines Molekulargewichtes von 200 kDa. Der Spurkanal 1 zeigt 2 Banden, die mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers HMFG 1 detektiert werden, die entsprechenden Signale im Spurkanal 2 werden durch den monoklonalen Antikörper HMFG 2 sichtbar gemacht. Eine positive Immunreaktion durch den monoklonalen Antikörper SM 3 ist nicht nachweisbar (Spurkanal 3). Spur 4 und 5 zeigen die Negativkontrollen, im Spurkanal 6 erkennt CG 2 als Positivkontrolle das Angiotensin-Converting-Enzym der Leydig-Zellen bei einem Molekulargewicht von 170 kDa.

B) Unter Verwendung eines Primers, der das Intron 1 überspannt, werden im Rahmen der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) bei der Untersuchung der cDNA zwei sehr lange DNA-Fragmente detektiert (Spurkanal 4 und 5). Der Spurkanal 3 zeigt die Negativkontrolle, Spur 1 und 2 zeigen die molekularen Marker.

C) Die Reverse Transkriptase (RT)-PCR der mRNA zeigt die MUC 1 cDNA mit einer Länge von 118 bp, entsprechend der zuvor von Ligtenberg et al. beschriebenen Variante B und eine Splice-Variante mit der Länge von 145 bp, die der Variante A nach Ligtenberg et al. entspricht [45] (Spurkanal 3 bis 6). Bei diesen Analysen wurden Gewebeproben zweier unterschiedlicher Individuen untersucht, wobei Spur 3 und 4 dem einen, Spur 5 und 6 dem anderen Fall entsprechen. Spur 7 bis 10 sind Negativkontrollen; Spur 1,2,11 und 12 zeigen molekulare Markersubstanzen.

D) Eine Gruppe von Spermatozyten wird mit einem UV-Laser aus dem Zellverband herausgelöst (Bild rechts oben). Die selektierten Zellen werden mit Hilfe eines Mikromanipulators aufgenommen und in ein Reaktions-Tube überführt. Die Ergebnisse der anschließenden RT-PCR, die mit sechs „Zell-Clustern“, bestehend aus 10-15 Spermatozyten,

durchgeführt wurde, zeigten in den meisten Fällen die 118 bp (Variante B) lange cDNA von MUC 1 (Spurkanälen 2 bis 7). Spurkanal 8 zeigt die Positiv-, 9 und 10 die Negativkontrolle, 1 und 11 den molekularen Marker.

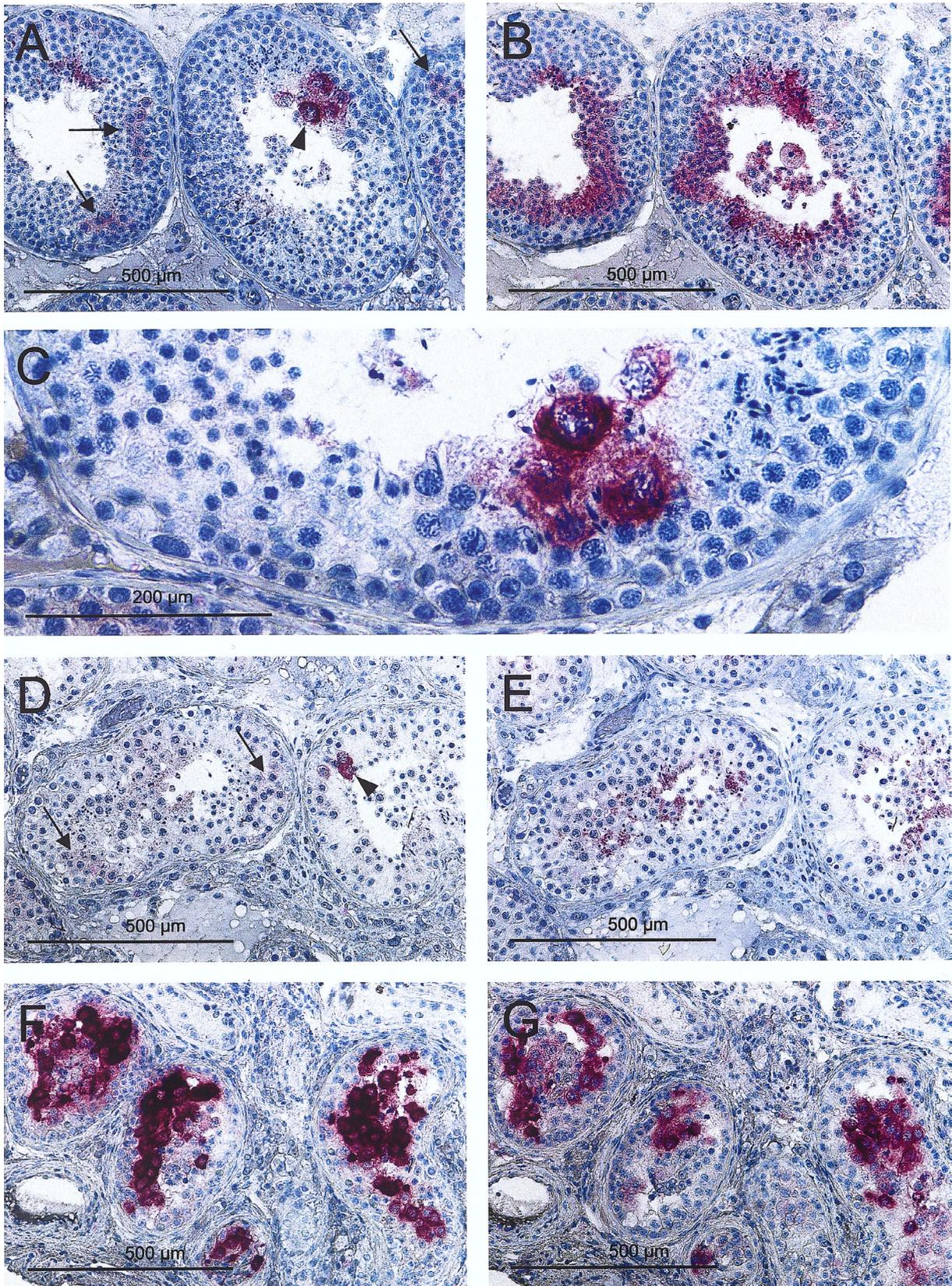


Abb. 7

ad Abb. 7: Immunhistologische Detektion von MUC 1 in menschlichem testikulären Gewebe mit normaler Spermatogenese (A-C), gemischter tubulärer Atrophie (D und E) und Fällen mit Spermatozytenarresten (F und G).

A) HMFG 1 liefert lediglich ein schwaches Signal in einigen Gruppen pachytäner Spermatozyten (Pfeile), wohingegen Spermatozyten mit abnormaler Meiose eine starke Färbereaktion zeigen (Pfeilkopf). Einige Gruppen elongierter Spermatiden waren ebenso immunreaktiv mit HMFG 1.

B) Die MUC 1 Glykosylierungsvariante, die durch HMFG 2 detektiert wird, liefert in fast allen Spermatiden eine Immunreaktion. Eine besonders intensive Färbung zeigen dabei elongierte Spermatiden.

C) Intensiv durch HMFG 1 gefärbte Spermatozyten mit veränderter Morphologie und fehlenden Keimzellgenerationen zeigt der linke Ausschnitt des Tubulus (Detailausschnitt von **A**).

D) In gemischter tubulärer Atrophie mit lediglich qualitativ intakter Spermatogenese liefert die Immunreaktion durch HMFG 1 ein ähnliches Bild, verglichen mit der normalen Spermatogenese. Im Gegensatz zu den gelegentlich auftretenden reifungsblockierten Spermatozyten mit intensiver Immunreaktion (Pfeilkopf) zeigen einige Gruppen von Spermatozyten ein lediglich schwaches Färbesignal (Pfeile).

E) In gemischter tubulärer Atrophie zeigt die MUC 1 Glykosylierungsvariante, die durch HMFG 2 detektiert wird, ebenso wie bei normal ablaufender Spermatogenese eine Immunreaktion mit Spermatiden.

F) Spermatozyten in Tubuli mit Reifungsarresten zeigen eine übereinstimmende intensive Immunreaktion mit der durch HMFG 1 erkannten MUC 1 Glykosylierungsvariante.

G) In Fällen mit Spermatozytenarrest konnte sogar die MUC 1 Glykosylierungsvariante, die durch HMFG 2 detektiert wird, in Spermatozyten nachgewiesen werden.

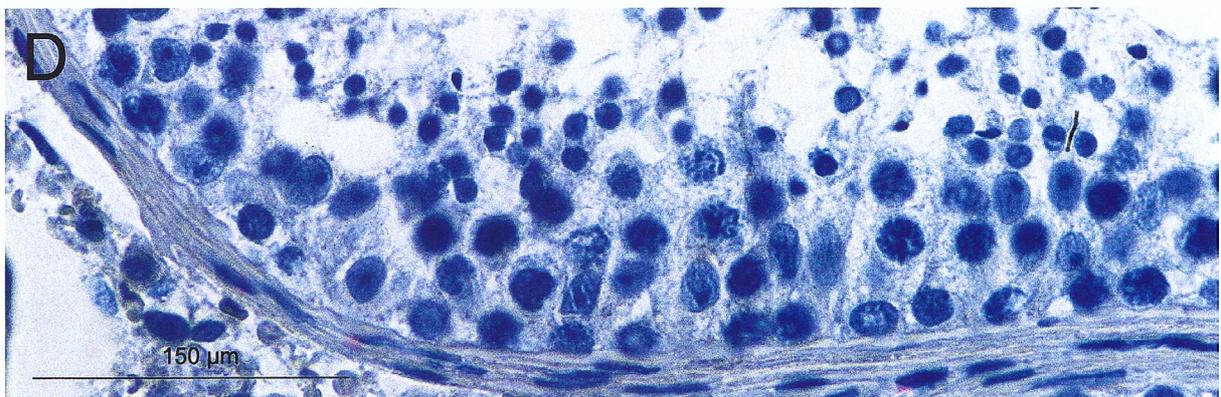
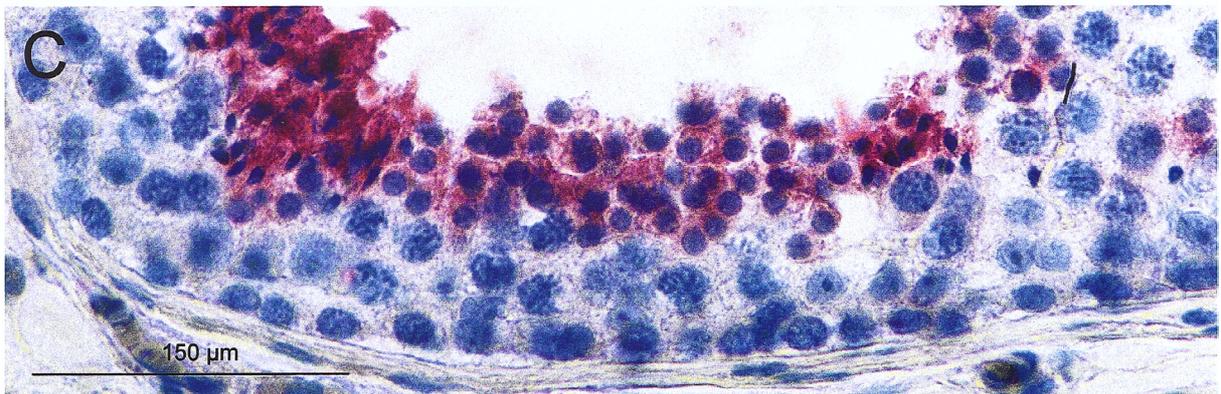
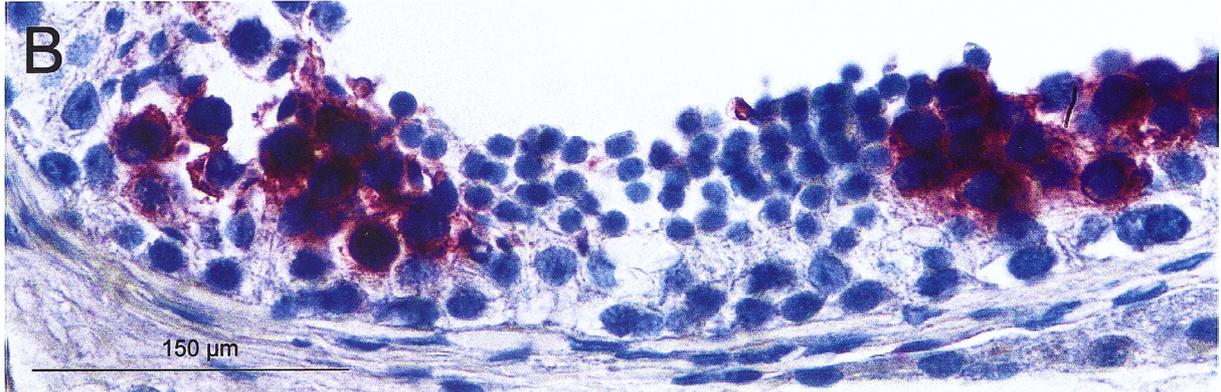
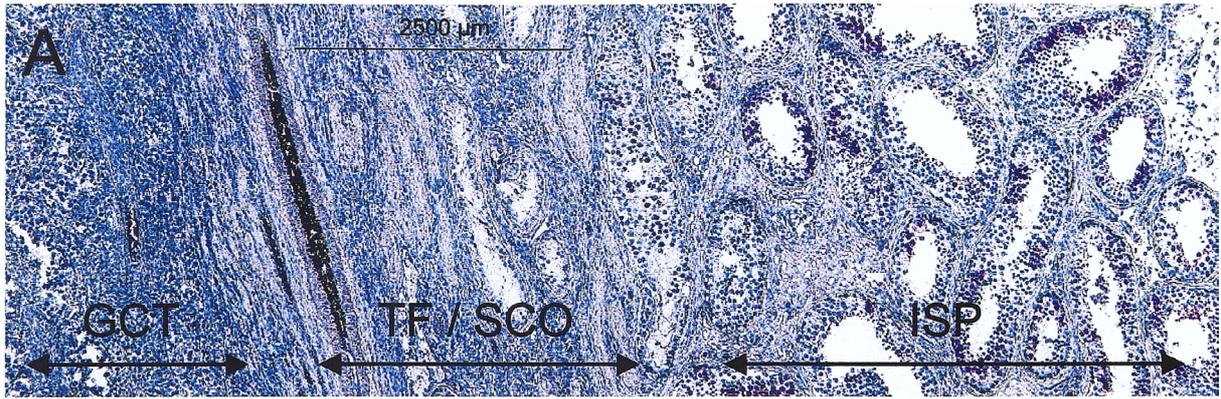


Abb. 8

ad Abb. 8: Immunreaktivität von MUC 1 Glykosylierungsvarianten in Tubuli seminiferi mit gestörter Spermatogenese in unmittelbarer Nachbarschaft zu Keimzelltumoren (A-D).

A) Im Vergleich zur normalen Spermatogenese zeigen Spermatozyten in Tubuli mit gestörter Spermatogenese wesentlich häufiger und intensiver eine Immunreaktivität gegenüber HMFG 1 (vergleiche Abb. 7A). Dies trat in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem Keimzelltumor (Seminom) auf, der in seiner Verdichtungszone atrophische und fibrotische Veränderungen sowie in einigen begleitenden Tubuli Sertoli-Cell-Only Muster aufwies.

B) Die Immunreaktion gegenüber HMFG 1 zeigt, dass diese Glykosylierungsvariante nicht allein auf die Zellmembran der Spermatozyten beschränkt ist, sondern auch innerhalb des Zytoplasmas vorkommt.

C) HMFG 2, der die entsprechende Glykosylierungsvariante von MUC 1 in Spermatischen detektiert, zeigt bezogen auf diese Zellen ein zytoplasmatisches Färbemuster und reagiert teilweise mit elongierten Spermatischen.

D) SM 3, der niedrigglykosylierte MUC 1 Varianten erkennt, zeigte keinerlei Immunreaktivität gegenüber Keimzellen oder anderen Zellen des menschlichen Hodenparenchyms.

5. *Diskussion*

In der vorliegenden Arbeit wird die Expression von MUC 1 in differenzierenden Keimzellen des humanen Testis erstmals beschrieben [19]. Dieser Befund überrascht, da von dem in vieler Hinsicht pleomorphen Muzin MUC 1 (Abb. 5), auch epitheliales Membran-Antigen (EMA) oder polymorphes epitheliales Muzin (PEM) genannt, allgemein nur die Expression in epithelialen Zellformen der Schleimhautoberfläche und keine Rolle in Hodengewebe oder Spermatogenese zu erwarten war. Es wird demonstriert, dass pachytäne Spermatozyten regelhaft MUC 1 exprimieren, wobei zwei analysierte Glykosylierungsvarianten des Proteins (HMFG 1 und HMFG 2 [15]) die Differenzierungsstadien von pachytänen Spermatozyten und Spermatischen diskriminieren. Darüber hinaus wird die auffallend stark vorgefundene Expression von MUC 1 in abnorm differenzierten Keimzellen und in allen Spermatozyten bei Reifungsarrest vor dem Hintergrund möglicher physiologischer und pathophysiologischer Funktionen diskutiert.

Die meisten Studien zum MUC 1 beziehen sich auf seine Expression und spezielle Glykosylierungsformen in epithelialen Tumoren, was mögliche Strategien zur Tumorrüherkennung durch Antikörper-Markierung und Einsatzmöglichkeiten als Tumor-Vakzine eröffnet [36,37]. Daher stammt das gegenwärtige Wissen über die funktionellen Rollen von MUC 1 Proteinen überwiegend von Tumor- und Tiermodellen [3,34,41,67]. Erst kürzlich wurde mRNA und Protein von MUC 1 auch in nicht-epithelialen Tumorzelllinien gezeigt, was der Annahme seiner rein epithelialen Expression klar widerspricht [53]. Noch ist allerdings unklar, ob nicht-epitheliale Tumoren MUC 1 infolge einer Genamplifikation aberrant exprimieren oder sich nur das Expressionspotential des Herkunftsgewebes widerspiegelt. Chromosomale rearrangements am 1q21 Locus des MUC 1 Genes sind mögliche Ursache einer aberranten Expression in einigen B-Zelllymphomen [16], wobei MUC 1 Varianten allerdings auch in Plasmozytomen und in normalen, nicht-aktivierten menschlichen T-Lymphozyten gefunden werden [9,64]. Im Vergleich zu epithelialen Zellformen wird MUC 1 hier allerdings nur in geringen Mengen detektiert, abhängig von der Sensitivität der benutzten Nachweismethode [53].

Zumindest eine frühere Arbeit, die verschiedenste menschliche Gewebe auf die Verteilung von MUC 1 Varianten mit den gleichen HMFG-Antikörpern untersuchte, berichtet über keine auffallende Immunreaktivität in Testis und Spermatogenese [74]. Dieser Unterschied zu den eigenen Daten ist vermutlich auf die Sensitivität der verwandten APAAP-Technik und die überwiegend schwachen immunhistologischen Signale einer normalen Spermatogenese (Abb. 7A und B) zurückzuführen. Zudem erscheinen die immunreaktiven Signale – unüblich zu epithelialen Zellformen – ganz überwiegend zytoplasmatisch (Abb. 8B und C). Ein solches immunhistologisches Muster lässt vermuten, dass reifende Keimzellen eher eine sezernierte MUC 1 Isoform als eine strikt membranös verankerte exprimieren, entweder infolge einer alternativen Splice-Variante [68] oder durch Abtrennung des zytoplasmatischen Ankers [5]. Dies unterstellt, muss sogar erwogen werden, dass die Immunhistochemie die tatsächliche Menge an MUC 1 nicht korrekt wiedergibt, sondern der größte Teil des Muzins durch methodisch bedingte Auswaschung dem Nachweis entgeht.

Ungeachtet dessen werden die eigenen immunhistologischen Befunde durch ein Tiermodell klar gestützt. In transgenen Mäusen, die das menschliche MUC 1 Protein und seine Varianten in allen Geweben und Zellen identisch zum Menschen und in einem identischen Glykosylierungsmuster exprimieren, fiel seinerzeit als einzige Ausnahme bereits eine MUC 1-Expression auch in Keimzellen auf [58]. Tatsächlich finden sich in diesem Modell die detailliert beschriebenen Glykosylierungsvarianten von humanem MUC 1 in einer mit den eigenen Befunden übereinstimmenden immunhistologischen Sequenz, angezeigt durch HMFG 1 in Spermatozyten und HMFG 2 in Spermatiden [58]. Diese Sequenz ist vermutlich Folge der komplexen O-Glykosylierung des MUC 1 Muzins, die abhängig ist von dem lokalen Zugriff auf verschiedene N-GalNac-Transferasen T1-T4 [4]. Soweit bekannt, werden GalNac-Transferasen in der menschlichen Spermatogenese exprimiert, z.B. GalNac-T3 mit strikter Begrenzung auf frühe Stadien reifender Keimzellen und ejakulierter Spermien [47]. Höchstwahrscheinlich unterliegt das exprimierte MUC 1 Basisprotein somit zellspezifisch modulierenden Einflüssen, die das unterschiedliche Expressionsmuster der Glykosylierungsvarianten in pachytänen Spermatozyten und Spermatiden erklären.

Die Expression von MUC 1 in reifenden Keimzellen des normalen Testis adulter Männer kann als gesichert gelten. Unabhängig von den immunhistologischen Ergebnissen wird dies in unserer Arbeitsgruppe durch den übereinstimmenden Nachweis von MUC 1 mRNA und Protein in Gewebeextrakten sowie durch zellspezifische mRNA-Analysen in Spermatozyten belegt (Abb. 6) [19]. Morphologisch interessant und daher zusammenfassend hervorzuheben sind vier weitere Beobachtungen, die auch das Kollektiv analysierter Störungen der Spermatogenese einbeziehen:

- 1.) HMFG 1 markiert Spermatozyten der normalen Spermatogenese stets variabel, d.h. von negativ bis schwach positiv, immer aber die gesamte Gruppe dieser Zellen gleichsinnig und – als Gruppe – konstant (Abb. 7A).
- 2.) Herdförmig abnorm differenzierte Spermatozyten, ein Normalbefund auch der regulären Spermatogenese, zeigen sich immunhistologisch stets stark durch HMFG 1 markiert (Abb. 7C).
- 3.) Eine „irritierte“ Spermatogenese zeigt in Spermatozyten ein relativ verstärktes Signal für die durch HMFG 1-erkannte MUC 1 Variante (Abb. 8A und B).
- 4.) Bei spermatozytärem Reifungsarrest fällt stets eine starke HMFG 1-Markierung aller reifungsblockierten Zellen auf, oft von einer auf dieser Differenzierungsstufe aberranten HMFG 2-Markierung begleitet (Abb. 7F und G).

Dies spricht dafür, dass graduelle Unterschiede in der spermatozytären Expression einer glykosylierten MUC 1 Variante vorkommen, die quantitativ mit dem Ausmaß der Reifungsstörung zunehmen. Unter Berücksichtigung der komplexen Differenzierungsprozesse und ihrer Dauer während der laufenden Spermatogenese (Abschnitt 1.2) deutet dies ferner darauf hin, dass die HMFG 1-Variante des MUC 1 in Abhängigkeit von Zeit und zellulärer Reifungsdauer entsteht und in arretierten oder abnormalen Spermatozyten akkumuliert. Eine weitere Möglichkeit ist die prolongierte Aussetzung des MUC 1 Proteins gegenüber einer speziell modifizierenden O-Glykosylierung, wobei noch zu klären ist, ob eine Überexpression bestimmter N-GalNac-Transferasen zu den beobachteten Phänomenen beiträgt. In diesem Zusammenhang lässt sich das Gegenteil aber, eine defekte bzw. defiziente Glykosylierung, mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschließen. In der vorliegenden Arbeit konnten lediglich hochglykosylierte MUC 1 Varianten nachgewiesen werden. Der SM 3-Antikörper, der ausschließlich niedrig glykosyliertes MUC 1 erkennt, war

stets negativ. Letzteres lässt zwangsläufig auf einen im Prinzip auch bei Spermatogenesestörungen intakten Glykosylierungsapparat in differenzierenden Keimzellen schließen.

Das vorbeschriebene Muster, in dem die HMFG 1 Variante von MUC 1 in normaler und gestörter Spermatogenese nachgewiesen wurde, kann auf eine funktionelle Bedeutung hinweisen. MUC 1 Isoformen, die O-glykosylierte VNTR Regionen enthalten, sind extrem lange und rigide Moleküle, die hauptsächlich anti-adhäsive Zelleigenschaften vermitteln [44]. Unabhängig davon, ob membrangebunden oder sezerniert, um ein visköses Gel an der Oberfläche zu bilden, würde jede Akkumulation glykosylierter MUC 1 Proteine in differenzierenden Keimzellen zwangsläufig den Spaltraum zu den umgebenden Sertoli-Zellen vergrößern, die physiologische Zell-Kommunikation beeinträchtigen und vermutlich die Ablösung und den Transport verspäteter oder abnormaler Keimzellen beschleunigen. Ähnliche, MUC 1-vermittelte Mechanismen sind für Tumorepithelien aus der Metastasenforschung gut bekannt [57,73], wohingegen die tubuläre Freisetzung abnorm differenzierter Spermatozyten ebenfalls lange bekannt ist [32] und eines der morphologischen Charakteristika des Spermatozytenarrestes darstellt (Abb. 7F und G). In dieser Funktion wäre die MUC 1 Expression differenzierender Keimzellen einem physiologischen Sicherheitssystem zuzuordnen, das den exakten Zeitrahmen reifender Keimzellen kontrolliert und das Keimepithel vor den relativ häufigen Meiosedefekten schützt. Angesichts der Variabilität von MUC 1 Isoformen, seinen Glykosylierungseigenschaften und der Fähigkeit kurzer Molekülvarianten wiederum als Rezeptor für sezerniertes MUC 1 Protein zu fungieren [3], können weitere potentielle Funktionen zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden. Muzine oder Muzin-ähnliche Moleküle sind auf der Oberfläche von Spermien beschrieben worden [12] und kommen im Epididymis [54,74] sowie weiblichen Genitaltrakt und Ovar vor [40]. Daher ist es durchaus möglich, dass bestimmte, von Spermatozyten exprimierte MUC 1 Isoformen (Abb. 8C) zu der Glykokalyx der Spermienoberfläche [60] beitragen und somit eine zusätzliche Rolle bei der Spermienreifung, ihrem Transport und der Ovumerkennung spielen.

Ungeachtet der möglichen Bedeutung und den sicherlich neu aufgeworfenen Fragestellungen hat die vorliegende Arbeit zur Expression von MUC 1 in Keimzellen

auch eine praktische Konsequenz. Die Tatsache, dass HMFG 1 eine Glykosylierungsvariante von MUC 1 erkennt, die ausgeprägt und diesbezüglich selektiv in abnormalen oder reifungsarretierten Spermatozyten auftritt, macht diesen Antikörper zu einem vorzüglichen Marker. Dieser ermöglicht vermutlich erstmals die immunhistologisch selektive Darstellung arretierter humaner Spermatozyten und dürfte somit für die Diagnostik männlicher Fertilitätsstörungen durchaus infrage kommen. Weiterhin eröffnet HMFG 1 die Option, die Effektivität der humanen Spermatogenese, einschließlich assoziierter Phänomene wie Meiosedefekte und fehlende Generationen von Keimzellen [32,35], noch eingehender zu studieren.

6. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, die Expression von MUC 1 erstmals in Keimzellen der normalen und gestörten Spermatogenese nachzuweisen. Weiterhin sollte geprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen der potentiellen Expression verschiedener MUC 1 Glykosylierungsvarianten und bestimmten Entwicklungsstufen der Keimzellen sowie unterschiedlichen Reifestörungen besteht.

Hierzu wurden 65 Hodengewebeproben von 63 verschiedenen Patienten untersucht, die im Rahmen der Routinediagnostik sowohl des Instituts für Pathologie der Justus-Liebig-Universität in Gießen, als auch des Anatomischen Instituts der Veterinärklinik der Justus-Liebig-Universität in Gießen in den Jahren 1996-1999 archiviert waren. Das Material umfasste 27 Kontrollen einer mehr oder weniger normalen Spermatogenese, ferner 36 Fälle unterschiedlicher Spermatogenesestörungen. Zur immunhistochemischen Erfassung des Expressionsmusters von MUC 1 kamen drei monoklonale Antikörper zum Einsatz, die unterschiedliche Glykosylierungsformen des Moleküls detektieren.

Dies waren HMFG 1 und HMFG 2 gegen hochglykosylierte Varianten, SM 3 gegen niedrigglykosylierte Varianten von MUC 1 in menschlichem Hodengewebe. Die bei diesen Untersuchungen zu vermutende Expression von MUC 1 wurde zunächst durch RT-PCR Analysen und Western-blot bestätigt. Sowohl mRNA als auch das Protein von MUC 1 konnten hier eindeutig nachgewiesen werden, was seine Expression sowohl auf Transkriptions-, als auch Translationsebene belegt.

Die immunhistologische Analyse zeigte, dass zwei der drei verwendeten Antikörper, HMFG 1 und HMFG 2, die in Abhängigkeit von der Glykosylierung sehr ähnliche Epitope von MUC 1 erkennen, mit unterschiedlichen Entwicklungsstufen der Keimzellen reagieren. Dagegen zeigte sich mit dem dritten Antikörper, SM 3, der eine minderglykosylierte Form von MUC 1 erkennt, keinerlei Reaktion in allen untersuchten Geweben, was u.a. gegen Defekte des Glykosylierungsprozesses in der gestörten Spermatogenese spricht.

Die stark glykosylierte HMFG 1-Variante von MUC 1 wurde in pachytänen Spermatozyten sowie in elongierten Spermatischen gefunden. Während normalerweise eine nur schwache Immunreaktion in der normalen Spermatogenese vorlag, war eine sehr intensive Immunfärbung stets in einzelnen Gruppen von Spermatozyten

auch innerhalb des normalen Hodenparenchyms nachweisbar, die einen Reifearrest oder degenerative Veränderungen beziehungsweise abnorme Entwicklungsmuster zeigten. Ferner war eine starke Expression der HMFG 1-Variante in allen 17 untersuchten Fällen mit Spermatozytenarrest in den reifungsblockierten Zellformen obligat. Die HMFG 2-Variante trat in der normalen Spermatogenese dagegen lediglich in Spermatiden auf, war äquivalent auch in 5 Fällen mit Spermatidenarrest in den reifungsblockierten Zellen nachweisbar, zeigte aber auch eine aberrante Immunreaktion in Spermatozyten im Falle ausgeprägter Spermatozytenarreste.

Die Ergebnisse zeigen, dass MUC 1 eine Rolle in der Keimzeldifferenzierung spielt und sich die HMFG 1-Glykosylierungsvariante des MUC 1 als ein hervorragender Marker für Spermatozytenarreste eignet.

Welche Aufgaben MUC 1 im Rahmen der Spermatogenese zukommen, ist noch nicht geklärt. Es ist jedoch zu vermuten, dass die Akkumulation von anti-adhäsiv wirkenden MUC 1-Varianten in atypischen und reifungsarretierten Keimzellen zu ihrer erleichterten Ausstoßung aus dem Sertoli-Zellverband führt. Ihre somit programmierte Freisetzung und Ausschleusung über das Lumen der Tubuli seminiferi würde damit einem geweblichen Sicherheits- und Schutzmechanismus sowohl im Falle der normalen als auch gestörten Spermatogenese dienen.

MUC 1 könnte auf diese Weise einen exakten zeitlichen Ablauf der Keimzellreifung garantieren und das Keimepithel vor unvermittelt auftretenden Meiosedefekten und dem Verbleib abnorm differenzierter Keimzellen schützen.

7. **Literaturverzeichnis**

1. Apostolopoulos V, McKenzie IFC
Cellular mucins: targets for immunotherapy
Crit Rev Immunol 1994, 14: 293-309
2. Barr AB, Moore DJ, Paulsen CA
Germinal cell loss during human spermatogenesis
J Reprod Fertil 1971, 25: 75-80
3. Baruch A, Hartmann M, Yoeli M, Adereth Y, Greenstein S, Stadler Y, Skornik Y, Zaretsky J, Smorodinsky NI, Keydar I, Wreschner DH
The breast cancer-associated MUC1 gene generates both a receptor and its cognate binding protein
Cancer Res 1999, 59: 1552-1561
4. Bennett EP, Hassan H, Mandel U, Mirgorodskaya E, Roepstorff P, Burchell J, Taylor-Papadimitriou J, Hollingsworth MA, Merkx G, van Kessel AG, Eiberg H, Steffensen R, Clausen H
Cloning of a human UDP-N-Acetyl- α -D-Galactosamine: polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase that complements other GalNac Transferases in complete O-Glycosylation of the MUC1 tandem repeat
J Biol Chem 1998, 273: 30472-30481
5. Boshell M, Lalani E-N, Pemberton L, Burchell J, Gendler S, Taylor-Papadimitriou J
The product of the human MUC1 gene when secreted by mouse cells transfected with the full-length cDNA lacks the cytoplasmatic tail
Biochem Biophys Res Commun 1992, 185: 1-8
6. Burchell J, Taylor-Papadimitriou J
Effect of modification of carbohydrate side chains on the reactivity of antibodies with core-protein epitopes of the MUC1 gene product
Epith Cell Biol 1993, 2: 155-162
7. Carson DD, DeSouza MM, Kardon R, Zhou X, Lagow E, Julian JA
Mucin expression and function in the female reproductive tract
Hum Reprod Update 1998, 4: 459-464

8. Chambers JA, Hollingsworth MA, Trezise AEO, Harris A
Developmental expression of mucin genes MUC1 and MUC2
J Cell Sci 1994, 107: 413-424
9. Chang J-F, Zhao H-L, Phillips J, Greenburg G
The epithelial mucin, MUC1, is expressed on resting T Lymphocytes and can function as a negative regulator of T Cell activation
Cell Immunol 2000, 201: 83-88
10. Chen Y, Zhao YH, Kalaslavadi TB, Hamati E, Nehrke K, Le AD, Ann DK, Wu R
Genome-wide search and identification of a novel gel-forming mucin MUC 19/Muc19 in glandular tissues
Am J Respir Cell Mol Biol 2004, 30: 155-165
11. Cordell JL, Falini B, Erber WN, Gosh AK, Abdulaziz Z, Macdonald S, Pulford KA, Stein H, Mason D
Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP-complexes)
J Histochem Cytochem 1984, 32: 219-229
12. D`Cruz OJ, Dunn TS, Pichan P, Haas GG, Sachdev GP
Antigenic cross-reactivity of human tracheal mucin with human sperm and trophoblasts correlates with the expression of mucin 8 gene messenger ribonucleic acid in reproductive tract tissues
Fertil Steril 1996, 66: 316-326
13. Dahiya R, Kwak K-S, Byrd JC, Ho S, Yoon W-H, Kim YS
Mucin synthesis and secretion in various human epithelial cancer cell lines that express the MUC-1 mucin gene
Cancer Res 1993, 53: 1437-1443
14. DeSouza MM, Surveyor GA, Price RE, Julian JA, Kardon R, Zhou X, Gendler S, Hilkens J, Carson DD
MUC1/episialin: a critical barrier in the female reproductive tract
J Reprod Immunol 1999, 45: 127-158
15. Devine PL, McKenzie IFC
Mucins: structure, function, and associations with malignancy
Bio Essays 1992, 14: 619-625

16. Dyomin VG, Palanisamy N, Lloyd KO, Dyomina K, Jhanwar SC, Houldsworth J, Chaganti RSK
MUC1 is activated in B-cell lymphoma by the t(1;14)(q21;q32) translocation and is rearranged and amplified in B-cell lymphoma subsets
Blood 2000, 95: 2666-2671
17. Ewing LL, Davis JC, Zirkin BR
Regulation of testicular function. A spatial and temporal view.
In: Greep RO, (Hrsg.): International Review of Physiology, Vol.22, Baltimore, University Park Press, 1980: 41-115
18. Fontenot JD, Tjandra N, Bu D, Ho C, Montelaro RC, Finn OJ
Biophysical characterization of one-, two-, and three-tandem repeats of human mucin (muc-1) protein core
Cancer Res 1993, 53: 5386-5394
19. Franke FE, Kraus S, Eiermann C, Pauls K, Lalani E-N, Bergmann M
MUC1 in normal and impaired spermatogenesis
Mol Hum Reprod 2001, 7: 505-512
20. Gendler S
MUC1, the renaissance molecule
J Mammary Gland Biol Neoplasia 2001, 6: 339-353
21. Gendler SJ, Lancaster CA, Taylor-Papadimitriou J, Duhig T, Peat N, Burchell J, Pemberton L, Lalani E-N, Wilson D
Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin
J Biol Chem 1990, 265: 15286-15293
22. Gendler SJ, Spicer AP, Lalani E-N, Duhig T, Peat N, Burchell J, Pemberton L, Boshell M, Taylor-Papadimitriou J
Structure and biology of a carcinoma-associated mucin, MUC1
Am Rev Respir Dis 1991, 144: 42-47
23. Gum JR
Mucin genes and the proteins they encode: structure, diversity, and regulation
Am J Respir Cell Mol Biol 1992, 7: 557-564

24. Gum JR
Mucins: Their structure and biology. Human mucin glycoproteins: varied structures predict diverse properties and specific functions
Biochem Soc Trans 1995, 23: 795-799
25. Gum JR, Crawley SC, Hicks JW, Szymkowski DE, Kim YS
MUC 17, a novel membrane-tethered mucin
Biochem Biophys Res Commun 2002, 291: 466-475
26. Heller CG, Clermont Y
Kinetics of the germinal epithelium in man
Rec Prog Horm Res 1964, 20: 545-575
27. Heukamp LC, van Hall T, Ossendorp F, Burchell JM, Melief CJM, Taylor-Papadimitriou J, Offringa R
Effective immunotherapy of cancer in MUC1-transgenic mice using clonal cytotoxic T Lymphocytes directed against an immunodominant MUC1 epitope
J Immunother 2002, 25: 46-56
28. Hey NA, Meseguer M, Simon C, Smorodinsky NI, Wreschner DH, Ortiz ME, Aplin JD
Transmembrane and truncated (SEC) isoforms of MUC 1 in the human endometrium and Fallopian tube
Reprod Biol Endocrinol 2003, 1: 2
29. Hilkens J, Wesseling J, Vos HL, Storm J, Boer B, van der Valk SW, Maas MCE
Involvement of the cell surface-bound mucin, episialin/MUC1, in progression of human carcinomas
Biochem Soc Trans 1995, 23: 822-826
30. Ho JJL, Kim YS
Serological pancreatic tumor markers and the MUC1 apomucin
Pancreas 1994, 9: 674-691
31. Ho SB, Niehans GA, Lyftogt C, Yan PS, Cherwitz DL, Gum ET, Dahiya R, Kim YS
Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues
Cancer Res 1993, 53: 641-651

32. Holstein AF, Eckmann C
Megalospermatocytes: Indicators of disturbed meiosis in man
Andrologia 1986, 18: 601-609
33. Holstein AF, Schirren C
Histological evaluation of testicular biopsies. In Schirren C und
Holstein AF (Hrsg.), *Fortschritte der Andrologie* 8,
Grosse Verlag, Berlin 1983: 108-117
34. Hudson MJH, Stamp GWH, Hollingsworth MA, Pignatelli M, Lalani E-N
MUC1 expressed in PanC1 cells decreases adhesion to type 1 collagen but
increases contraction in collagen lattices
Am J Pathol 1996, 148: 951-960
35. Johnson L, Chaturvedi PK, Williams JD
Missing generations of spermatocytes and spermatides in seminiferous
epithelium contribute to low efficiency of spermatogenesis in humans
Biol Reprod 1992, 47: 1091-1098
36. Karsten U, Diotel C, Kilch G, Paulsen H, Goletz S, Müller S, Hanisch F-G
Enhanced binding of antibodies to the DTR motif of MUC1 tandem repeat
peptide is mediated by site-specific glycosylation
Cancer Res 1998, 58: 2541-2549
37. Koumariou AA, Hudson M, Williams R, Epenetos AA, Stamp GWH
Development of a novel bi-specific monoclonal antibody approach for
tumour targeting
Br J Cancer 1999, 81: 431-439
38. Kraus S, Abel PD, Nachtmann C, Linsenmann HJ, Weidner W, Stamp GW,
Chaudhary KS, Mitchell SE, Franke FE, Lalani E-N
MUC 1 mucin and trefoil factor 1 protein expression in renal cell carcinoma:
correlation with prognosis
Hum Pathol 2002, 33: 60-67
39. Krause W, Weidner W
Andrologie, Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane
Enke Verlag Stuttgart 1998: 9-14
40. Lagow E, DeSouza MM, Carson DD
Mammalian reproductive tract mucins
Hum Reprod Update 1999, 5: 280-292

41. Lalani E-N, Berdichevsky F, Boshell M, Shearer M, Wilson D, Stauss H, Gendler SJ, Taylor-Papadimitriou J
Expression of the gene coding for a human mucin in mouse mammary tumor cells can affect their tumorigenicity
J Biol Chem 1991, 266: 15420-15426
42. Lapensee L, Paquette Y, Bleau G
Allelic polymorphism and chromosomal localization of the human oviductin gene (MUC9)
Fertil Steril 1997, 68: 702-708
43. Lesuffleur T, Zweibaum A, Real FX
Mucins in normal and neoplastic human gastrointestinal tissues
Crit Rev Oncol Haematol 1994, 17: 153-180
44. Ligtenberg MJL, Buijs F, Vos HL, Hilkens J
Suppression of cellular aggregation by high levels of episialin
Cancer Res 1992, 52: 2318-2324
45. Ligtenberg MJL, Vos HL, Gennissen AMC, Hilkens J
Episialin, a carcinoma-associated mucin, is generated by a polymorphic gene encoding splice variants with alternative amino termini
J Biol Chem 1990, 265: 5573-5578
46. Liu X, Sejbal J, Kotovych G, Koganty RR, Reddish MA, Jackson L, Gandhi SS, Mendonca AJ, Longenecker BM
Structurally defined synthetic cancer vaccines: analysis of structure, glycosylation and recognition of cancer associated mucin, MUC-1 derived peptides
Glycoconj J 1995, 12: 607-617
47. Mandel U (1998) 4th Copenhagen Workshop on 'Carcinoma In Situ and Cancer of the Testis', Copenhagen May 18-21, 1997, organized by Rajpert-De Meyts E, Grigor KM and Skakkebeak NE, APMIS, 106, S.126
48. Messeguer M, Pellicer A, Simon C
MUC1 and endometrial receptivity
Mol Hum Reprod 1998, 4: 1089-1098

49. Mikuz G
Männliche Geschlechtsorgane. In: Böker W, Denk H, Heitz PhU (Hrsg.), *Pathologie*
Urban & Schwarzenberg, München, 1996: 773-796
50. Müller S, Goletz S, Packer N, Gooley A, Lawson AM, Hanisch, F-G
Localization of O-glycosylation sites on glycopeptide fragments from lactation-associated MUC1
J Biol Chem 1997, 272: 24780-24793
51. Nieschlag E, Behre HM
Hodenbiopsie. In Nieschlag E und Behre HM (Hrsg.), *Andrologie, Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*
Springer Verlag, Berlin 2000: 123-134
52. Nieschlag E, Behre HM
Spermatogenese-arrest. In Nieschlag E und Behre HM (Hrsg.), *Andrologie, Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*
Springer Verlag, Berlin 2000: 169-170
53. Oosterkamp HM, Scheiner L, Stefanova MC, Lloyd KO, Finstad CL
Comparison of MUC-1 mucin expression in epithelial and non-epithelial cancer cell lines and demonstration of a new short variant form (MUC-1/Z)
Int J Cancer 1997, 72: 87-94
54. Osterhoff C, Ivell R, Kirchhoff C
Cloning of a human epididymis-specific m RNA, HE6, encoding a novel member of seven transmembrane-domain receptor superfamily
DNA Cell Biol 1997, 16: 379-389
55. Pallesen LT, Berglund L, Rasmussen LK, Petersen TE, Rasmussen JT
Isolation and characterization of MUC 15, a novel cell membrane associated mucin
Eur J Biochem 2002, 269: 2755-2763
56. Parry G, Li J, Stubbs J, Bissell MJ, Schmidhauser C, Spicer AP, Gendler SJ
Studies of muc-1 mucin expression and polarity in the mouse mammary gland demonstrate developmental regulation of muc-1 glycosylation and establish the hormonal basis for mRNA expression
J Cell Sci 1992, 101: 191-199

57. Patton S, Gendler SJ, Spicer AP
The epithelial mucin, MUC1, of milk, mammary gland and other tissues
Biochim et Biophys Acta 1995, 1241: 407-424
58. Peat N, Gendler SJ, Lalani E-N, Duhig T, Taylor-Papadimitriou J
Tissue-specific expression of a human polymorphic epithelial mucin (MUC1) in transgenic mice
Cancer Res 1992, 52: 1954-1960
59. Schlegel PN, Chang TSK
Physiology of male reproduction: The testis, epididymis, and ductus deferens. In Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ (Hrsg.), *CAMPELL'S UROLOGY*
W. B. Saunders company 7th edition 1998, 2: 1254-1286
60. Schröter S, Osterhoff C, McArdle W, Ivell R
The glycocalyx of the sperm surface
Hum Reprod Update 1999, 5: 302-313
61. Seregini E, Botti C, Massaron S, Lombardo C, Capobianco A, Bogni A, Bombardieri E
Structure, function and gene expression of epithelial mucins
Tumori 1997, 83: 625-632
62. Shankar V, Pichan P, Eddy RL, Tonk V, Nowak N, Sait SNJ, Shows TB, Schultz RE, Gotway G, Elkins RC, Gilmore MS, Sachdev GP
Chromosomal localization of a human mucin gene (MUC8) and cloning of the cDNA corresponding to the carboxy terminus
Am J Respir Cell Mol Biol 1997, 16: 232-241
63. Silverman HS, Sutton-Smith M, McDermott K, Heal P, Leir SH, Morris HR, Hollingsworth MA, Dell A, Harris A
The contribution of tandem repeat number to the O-glycosylation of mucins
Glycobiology 2003, 13: 265-277
64. Takahashi T, Makiguchi Y, Hinoda Y, Kakiuchi H, Nakagawa N, Imai K, Yachi A
Expression of MUC1 on myeloma cells and induction of HLA-unrestricted CTL against MUC1 from multiple myeloma patient
J Immunol 1994, 153: 2102-2109

65. Taylor-Papadimitriou J, Gendler SJ
Structure, biology and possible clinical applications of carcinoma associated mucins (Review)
Int J Oncol 1992, 1: 9-16
66. von Mensdorff-Pouilly S, Snijdewint FGM, Verstraeten AA, Verheijen RHM, Kenemans P
Human MUC1 mucin: a multifaceted glycoprotein
Int J Biol Markers 2000, 15: 343-356
67. Wesseling J, van der Valk SW, Vos HL, Sonnenberg A, Hilkens J
Episialin (MUC1) overexpression inhibits integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix components
J Cell Biol 1995, 129: 255-265
68. Williams SJ, McGuckin MA, Gotley DC, Eyre HJ, Sutherland GR, Antalis TM
Two novel mucin genes down-regulated in colorectal cancer identified by differential display
Cancer Res 1999, 59: 4083-4089
69. Williams SJ, Wreschner DH, Tanaka A, Tsarfaty I, Keydar I, Dion AS
Multiple protein forms of the human breast tumor-associated epithelial membrane antigen (EMA) are generated by alternative splicing and induced by hormonal stimulation
Biochem Biophys Res Commun 1990, 170: 1331-1338
70. Williams SJ, Wreschner DH, Tran M, Eyre HJ, Sutherland GR, McGuckin MA
MUC 13, a novel human cell surface mucin expressed by epithelial and hemopoietic cells
J Bio Chem 2001, 276: 18327-18336
71. Wu GJ, Wu MWH, Wang SW, Liu Z, Qu P, Peng Q, Yang H, Varma VA, Sun QC, Petros JA, Lim SD, Amin MB
Isolation and characterization of the major form of human MUC 18 cDNA gene and correlation of MUC 18 over-expression in prostate cancer cell lines and tissues with malignant progression
Gene 2001, 279: 17-31
72. Yin BWT, Lloyd KO
Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen
J Biol Chem 2001, 276: 27371-27375

73. Yonezawa S, Taira M, Osako M, Kubo M, Tanaka S, Sakoda K, Takao S, Aiko T, Yamamoto M, Irimura T, Kim YS, Sato E
MUC1 mucin expression in invasive areas of intraductal papillary mucinous tumors of the pancreas
Pathol Int 1998, 48: 319-322
74. Zotter S, Hageman PC, Lossnitzer A, Moor WJ, Hilgers J
Tissue and tumor distribution of human polymorphic epithelial mucin
Cancer Rev 1988, 11-12: 55-101
75. Zrihan-Licht S, Baruch A, Elroy-Stein O, Keydar I, Wreschner DH
Tyrosine phosphorylation of the MUC1 breast cancer membrane proteins
Cytokine receptor-like molecules
FEBS Lett 1994, 356: 130-136
76. Zrihan-Licht S, Vos HL, Baruch A, Elroy-Stein O, Sagiv D, Keydar I, Hilkens J, Wreschner DH
Characterization and molecular cloning of a novel MUC1 protein, devoid of tandem repeats, expressed in human breast cancer tissue
Eur J Biochem 1994, 224: 787-795

8. Anhang

8.1 Rezepte für Ansätze der Immunhistochemie

<u>Zitratpuffer:</u>	<i>Stammlösung A:</i>	0.1M Zitronensäure
	<i>Stammlösung B:</i>	0.1M Natriumcitrat
		Aqua destillata

Die beiden Stammlösungen werden im Kühlschrank aufbewahrt. Kurz vor Gebrauch werden 9 ml der Lösung A mit 41 ml der Lösung B gemischt und mit 450 ml Aqua dest. auf 500 ml Gesamtlösung aufgefüllt.

<u>Tris-Waschpuffer:</u>	<i>Stammlösung:</i>	Tris-Base	18.0	g
		Tris-HCL	137.0	g
		NaCl	175.6	g
		Aqua dest.	2.5	l

Der pH-Wert wird zwischen 7.4 und 7.6 eingestellt und danach der gesamte Ansatz auf 20 l hochverdünnt.

<u>RPMI-Gebrauchslösung:</u>	RPMI – Konzentrat	50	ml
	Aqua dest.	450	ml
	Inaktiviertes Rinderserum	50	ml
	Natriumazid	0.5	g

<u>Neufuchsin:</u>	Neufuchsin	5.0	g
	HCL 2N	100	ml

<u>Entwicklungspuffer:</u>	Tris-Base	49.0	g
	Tris-HCl	15.0	g
	NaCl	87.0	g
	Aqua dest.	1750	ml

Entwicklungslösung:

Anzahl der Küvetten	1	2	3	
Entwicklungspuffer	35	70	105	ml
Propandiol	12.5	25	37.5	ml
Laevamisol	20	40	60	mg
Natriumnitrit	10	20	30	mg
Aqua dest.	250	500	750	µl
Naphtol-AS-Bi-Phosphat	25	50	75	mg
N,N-Dimethylformamid	300	600	900	µl
Neufuchsin	100	200	300	µl

8.2 Rezepte für Ansätze der Proteinbiochemie

<u>HEPES-Puffer:</u>	HEPES (pH 7.4)	20	mM/l
	EDTA	1	mM/l
	Pepstatin	0.1	mM/l
	PMSF	10	µM/l
pH auf 7.4 einstellen und danach	DTT	0.1	mM/l zugeben.

<u>Tris-HCl (pH 8.8,1.5M):</u>	Tris-Base	13.6	g
	Aqua dest.	40	ml

Mit 1N HCl (25%) auf pH 8.8 einstellen und anschließend mit Aqua dest. auf 75 ml auffüllen.

<u>Tris-HCl (pH 6.8,0,5M):</u>	Tris-Base	3.0	g
	Aqua dest.	30	ml

Mit 1N HCl (25%) auf pH 6.8 einstellen und anschließend mit Aqua dest. auf 50 ml auffüllen.

Gelansatz:

(Rezept für 1 Gel mit 10 ml Gesamtmenge)

1) Trenngel:

7.5%:

Acrylamid	2.5	ml
Tris-HCl (pH 8.8,1.5M)	2.5	ml
SDS (10%)	100	µl
Aqua dest.	4.9	ml
TEMED	10	µl
APS (10%)	100	µl

2) Sammelgel:

5%:

Acrylamid	0.835	ml
Tris-HCl (pH 6.8,0.5M)	0.625	ml
SDS (10%)	50	µl
Aqua dest.	3.515	ml
TEMED	5	µl
APS (10%)	25	µl

<u>Tankpuffer 10 fach:</u>	Tris-Base	60	g
	Glycine	288	g

Mit H₂O auf 2000 ml auffüllen.

<u>Elektrophoresepuffer:</u>	Tankpuffer 10 fach	500	ml
	SDS (10%)	50	ml

Mit H₂O auf 5000 ml auffüllen.

<u>Sammelgelpuffer:</u>	Tris-Base	12.0	g
	H ₂ O	160	ml

Mit HCl auf pH 6.8 einstellen und bei 4°C lagern.

<u>Probenpuffer 2 fach:</u>	Sammelgelpuffer	2.5	ml
	SDS (10%)	4.0	ml
	Glycerin	2.0	ml
	2-Mercaptoethanol	1.0	ml
	Bromphenolblau	95	mg

<u>CAPS-Puffer (10 fach):</u>	CAPS	22.13	g
	Aqua dest.	900	ml

Mit 2N NaOH auf pH 11.0 einstellen und anschließend mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen.

Magermilchlösung:

Magermilchpulver	25.0	g
Tris-Base	0.45	g
Tris-HCl	3.43	g
NaCl	4.39	g

Mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen und anschließend den pH-Wert auf 7.4–7.6 einstellen.

Entwickleransatz:

1)	Tris-Puffer:	Tris-Base	24.2	g
		MgCl ₂	0.81	g

Mit HCl auf 9.5 oder 8.0 einstellen und anschließend mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen.

2)	IPSL (Indoxyl-Phosphat-Stock-Lösung):	Methanol	10.0	ml
		Aceton	5.0	ml
		5-Bromo-4-chloro- 3-indolphosphat	60.0	mg
3)	Entwicklungslösung:	Nitro-blue-tetrazolium	5.0	mg
		IPSL	0.75	ml

Mit Tris-Puffer (pH 9.5 oder 8) auf 50 ml auffüllen.

8.3 Reagenzien

2-Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt)
5-Bromo-4-chloro-3-indolphosphat (Sigma, Deisenhofen)
Aceton (Roth, Frankfurt)
Acrylamid (Sigma, St.Louis)
Ammoniumperoxodisulfat / APS (Merck, Darmstadt)
Bisacrylamid (Sigma, St.Louis)
Bromphenolblau (Merck, Darmstadt)
CAPS (Roth, Karlsruhe)
Dithiotreitol / DTT (Sigma, Deisenhofen)
EDTA (Sigma, Deisenhofen)
Glycergel (Dako, Glostrup)
Glycerin (Serva, Heidelberg)
Glycin (Merck, Darmstadt)
HCL 2N (aus Titrisol von Merck, Darmstadt)
HEPES (Sigma, Deisenhofen)
Laevamisol (Sigma, Deisenhofen)
Magermilchpulver (Fluka, Steinheim)
Methanol (Riedel-deHaen, Seelze)
MgCl₂ (Merck, Darmstadt)
MW-SDS-Blue / 27-180 kDa (Sigma, St.Louis)
N,N,N,N-Tetramethyläthylendiamin / TEMED (Merck, Darmstadt)
N,N-Dimethylformamid (Merck, Darmstadt)
NaCl (Roth, Karlsruhe)
Naphtol-AS-Bi-Phosphat (Sigma, Deisenhofen)
Natriumdodecylsulfat / SDS (Sigma, St.Louis)
Natriumnitrit (Merck, Darmstadt)
Natriumzitat (Merck, Darmstadt)
N-Butanol (Merck, Darmstadt)
Neufuchsin (Schmidt GmbH, Köngen)
Nitro-blue-tetrazolium (Sigma, St.Louis)
Pepstatin (Sigma, Deisenhofen)
Phenylmethylsulfonylfluorid / PMSF (Sigma, Deisenhofen)

Prestained-SDS-Blue standards (BIO-RAD)
Propandiol (Merck, Darmstadt)
Rinderserum, inaktiviert (Seromed, Berlin)
RPMI-Konzentrat (RPMI1640, Life Technologies, Faisley)
Tris-Base (Sigma, Deisenhofen)
Tris-HCL (USB, Amersham)
Xylol (Roth, Karlsruhe)
Zitronensäure (Merck, Darmstadt)

8.4 Verwendete Antikörper

1. Primärantikörper (HMFG-1, HMFG-2, SM-3): Monoklonaler Antikörper der Maus.
Zur Verfügung gestellt vom Imperial Cancer Research Found (ICRF), London, UK
2. Brückenantikörper (LINK): Polyklonaler Rabbit-Anti-Mouse Antikörper der Fa. DAKO. Code No. E 354, Lot 113
3. Detektionsantikörper (APAAP): Monoklonaler Maus-Antikörper der Fa. DAKO. Code No. D 0651, Lot 106
4. MR12/53: Monoklonaler Antikörper gegen Kaninchen-Antigen, Fa. DAKO
5. CG2: Monoklonaler Antikörper gegen menschliches ACE, Fa. BMA, Augst, Schweiz

8.5 Verwendete Laborgeräte/Materialien

Mikrotom	Leica, Wetzlar (JUNG SM 2000 R)
Rüttler	Fa. Heidolph, REAX 2000
Waage	Fa. Mettler, PM 480 Delta Range
pH-Meter	Fa. Schott Geräte, CG 820
Mikrowelle	Siemens
Objektträger	SuperFrost Plus / 25x75x1.0 mm, Menzel, USA
Miniblotter-System	Mini-PROTEAN II, Fa. Bio-Rad, Richmond, USA
Western-blot-System	Mini-PROTEAN II, Fa. Bio-Rad, Richmond, USA

9. Danksagung

In erster Linie gilt mein Dank meinen Eltern und meiner Familie, die mir durch ihre oft aufopferungsvolle Haltung den Weg bis hierher ermöglicht haben.

Sowohl Herrn Prof. Dr. A. Schulz, Leiter des Instituts für Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen als auch Herrn Dr. F. E. Franke, Oberarzt am Institut für Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen möchte ich für die Überlassung des Themas danken. Herrn Dr. F. E. Franke gebührt besonderer Dank für seine ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung sowie seine dauerhafte Unterstützung und seinen Ansporn bei der Auseinandersetzung mit der dargestellten Thematik. Jederzeit stand er mir mit Rat und Tat zur Seite.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Prof. Dr. W. Weidner, Leiter der Klinik für Urologie am Zentrum für Chirurgie, Anästhesie und Urologie der Justus-Liebig-Universität Gießen sowie Herrn Dr. S. Kraus, ehemals Assistenzarzt der Klinik für Urologie für die engagierte Zusammenarbeit, die vielen Ratschläge und Hilfen.

Besonders zu danken habe ich auch Herrn Prof. Dr. M. Bergmann, Leiter des Anatomischen Institutes der Veterinärklinik der Justus-Liebig-Universität Gießen, der durch sein unermüdliches Engagement und seine Hilfestellung einen wesentlichen Beitrag zur Erkenntnis und Beurteilung der experimentellen Untersuchungen erbracht hat.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Labors des Institutes für Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen für die freundliche Zusammenarbeit und wertvolle Unterstützung bei der dortigen Arbeit bedanken.

Ich bin ebenfalls meinen Freunden, Begleitern und Ratgebern zu Dank verpflichtet, die mich dauerhaft unterstützten und zur Weiterarbeit motivierten. In diesem Zusammenhang ist besonders Frau Dr. K. Pauls zu erwähnen, die als damalige Mitdotorandin in der Pathologie meinen Weg während der experimentellen Untersuchungszeit begleitet hat.

10. Curriculum vitae

Name:	Claus Günther Eiermann
Geburtsdatum:	31. Januar 1975
Geburtsort:	Bonn
Eltern:	Elisabeth Eiermann, geb. Faust Wilhelm Eiermann
Familienstand:	ledig
1981 – 1985	Besuch der Katholischen Grundschule Schloßstraße in Troisdorf
1985 – 1994	Besuch des Gymnasiums des Collegium Josephinum in Bonn
1994	Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife
1994 – 1995	Ableistung des Grundwehrdienstes
Oktober 1995 – Mai 2002	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Gießen
Mai 2002	Ärztliche Prüfung an der Justus-Liebig-Universität in Gießen und Erteilung der Erlaubnis zur Tätigkeit als Arzt im Praktikum
Februar 2003 – Februar 2004	Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der Abteilung für Unfallchirurgie des Klinikum Leverkusen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. J. Ahlers
ab März 2004	Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der Abteilung für Orthopädie des St. Josef-Hospital in Bonn/Beuel unter der Leitung von Herrn Dr. N. Moos

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.