

**Einfluss der Hyperglykämie auf den männlichen Reproduktionstrakt
unter Berücksichtigung der Entstehung von Glykierungsendprodukten
bei Typ 1 Diabetes mellitus**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
(Doctor medicinae, Dr. med.)
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Dina Caterina Léonie Stute

Gießen (2019)

Aus der klinischen Forschungseinheit in der medizinischen Klinik und Poliklinik III
unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Linn des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Thomas Linn
Gutachter: Prof. Dr. Fischer

Tag der Disputation: 26.10.2020

“La inteligencia sin ambición es un pájaro sin alas.”
Salvador Dalí

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Diabetes mellitus	7
1.1.1	Epidemiologie des DM	8
1.1.2	Diagnose des DM	8
1.1.3	Typ 1 DM	9
1.1.4	Therapie des DM	10
1.1.5	Insulinbiosynthese und Mutationen im Insulin Gen	10
1.1.6	Mausmodelle des T1DM	12
1.1.7	Komplikationen des DM.....	13
1.1.8	Entstehung von Advanced Glykation Endproducts (AGEs)	14
1.1.9	Methylglyoxal, Glyoxalase und D-Lactat.....	16
1.1.10	Rezeptor für Advanced Glycation Endproduct (RAGE)	18
1.1.11	Liganden von RAGE und dessen Interaktion mit RAGE.....	19
1.1.12	Signalkaskaden der Liganden-RAGE-Interaktion	21
1.1.13	Nf- κ B Signalkaskade.....	22
1.2	Der männliche Reproduktionstrakt: Anatomie, Morphologie und Funktion	24
1.2.1	Sertoli-Zellen und Blut-Hoden-Schranke	25
1.2.2	Nebenhoden und Blut-Nebenhodenschranke	26
1.2.3	Spermatogenese, Spermiogenese, Spermienreifung	28
1.2.4	Die männliche Reproduktion in Bezug auf T1DM.....	29
1.3	Ziele der Arbeit.....	32
2	Material und Methoden	33
2.1	Verarbeitungen der Gewebeproben	33
2.1.1	Bestimmung des Methylglyoxalanteils in Hoden und Nebenhoden durch Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS).....	34
2.2	Zellkultur	34
2.2.1	WL-3 Zelllinie	34
2.2.1.1	Auftauen der Zellen	35
2.2.1.2	Teilung und Umsetzen der Zellen	35
2.2.1.3	Kryokonservierung von Sertoli-Zellen.....	35

2.2.1.4	Wachsen der Sertoli-Zellen auf Objektträgern.....	36
2.2.1.5	Behandlungen mit Glukose	36
2.2.1.6	Behandlung mit MG.....	37
2.2.1.7	MTT-Test und Bestimmung der Konfluenz der Sertoli-Zellen.....	37
2.2.1.8	Apoptosedetektion mit Hilfe der Durchflusszytometrie FACS	39
2.2.1.9	Toxizitätstest für Glukose.....	40
2.2.1.10	MG-Bestimmung.....	41
2.2.1.11	Bestimmung des entstandenen D-Lactats und der Glyoxalase I-Aktivität	41
2.3	Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR).....	42
2.3.1	Grundsatz der qRT-PCR Methode.....	43
2.3.2	RNS-Isolation	43
2.3.2.1	Probenaufbereitungen für RNS-Analysen	43
2.3.3	Translation in cDNS	44
2.3.4	Überprüfung und Ansetzen der Primer.....	45
2.3.5	qRT-PCR	45
2.3.6	Berechnung der qRT-PCR Daten	46
2.4	Histologie und Immunhistochemie.....	47
2.4.1	Fixierung, Sektionierung und Färbung von Organen	47
2.4.2	Lichtmikroskopie	47
2.4.2.1	Hämatoxylin-Färbung.....	47
2.4.2.2	Semiquantitative Auswertung der Spermatozoendichte	48
2.4.2.3	Antikörper (AK)-Färbungen.....	48
2.4.2.4	Carboxymethyllysin (CML)-Färbung unter Verwendung des M.O.M. Kit.....	49
2.4.3	Fluoreszenzmikroskopie.....	50
2.4.3.1	Färben von Zellen.....	50
2.5	Protein-Methoden	50

2.5.1	Lyse der Gewebe und Zellen und Bestimmung der Proteinkonzentration.....	50
2.5.2	Milliplex MAP Kit-Assay.....	52
2.5.3	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	52
2.5.4	Western Blot und Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	52
2.6	Statistische Auswertungen.....	53
3	Ergebnisse.....	55
3.1	Studien an der <i>Ins2^{Akita+/-}</i> Maus.....	55
3.1.1	Diabetischer und reproduktiver Phänotyp der <i>Ins2^{Akita+/-}</i> Maus.....	55
3.1.2	Pathologien im Nebenhoden der <i>Ins2^{Akita+/-}</i> Maus.....	55
3.1.3	Auswirkungen von T1DM auf die AGE und MG-Entstehung im Reproduktionstrakt der <i>Ins2^{Akita+/-}</i> Maus und Detektion des Rezeptors RAGE.....	59
3.1.3.1	Produktion von Methylglyoxal im Reproduktionstrakt der <i>Ins2^{Akita+/-}</i> Maus.....	59
3.1.3.2	Lokalisierung und Produktion von RAGE und dessen Liganden im Reproduktionstrakt der <i>Ins2^{Akita+/-}</i> Maus.....	60
3.1.3.3	Liganden-RAGE-Interaktion und Aktivierung der RAGE-Signalkaskade in der <i>Ins2^{Akita+/-}</i> Maus.....	71
3.2	Studien an der WL-3 Sertoli-Zelllinie.....	80
3.2.1	Charakterisierung der WL-3 Sertoli-Zelllinie.....	80
3.2.2	ED-50 Toxizitätstest für MG und Glukose an WL-3 Zellen.....	81
3.2.3	MG und Liganden-RAGE-Interaktion innerhalb der WL-3 Zelllinie.....	83
3.2.3.1	Entstehung von MG und Aktivierung des enzymatischen Schutzmechanismus der Glyoxalase I unter D-Lactat-Entstehung.....	83
3.2.3.2	Morphologie der WL-3 Sertoli-Zelle, Detektion von AGEs und Analyse der durch Liganden-RAGE-Interaktion aktivierten Signalkaskaden.....	85
4	Diskussion.....	91

4.1	Veränderungen/Beeinträchtigungen im männlichen Reproduktionstrakt der <i>Ins2</i> ^{Akita+/-} Mäuse	92
4.1.1	Lokalisierung von Liganden und RAGE im Reproduktionstrakt der <i>Ins2</i> ^{Akita+/-} Maus	94
4.1.2	Liganden-RAGE-Interaktion und nachgeschaltete Signalkaskaden	102
4.2	Einfluss von Hyperglykämie auf die Funktion der Sertoli-Zelle.....	106
4.3	Einfluss von MG auf die Funktion der Sertoli-Zelle	107
4.3.1	MG-Stoffwechsel innerhalb der Sertoli-Zelle	107
4.3.2	Morphologie der WL-3 Sertoli-Zelle, die Produktion von AGEs und Analyse der durch Liganden-RAGE-Interaktion aktivierten Signalkaskaden	108
5	Zusammenfassung	109
6	Summary	110
7	Abkürzungsverzeichnis	111
8	Abbildungsverzeichnis	115
9	Tabellenverzeichnis	117
10	Literaturverzeichnis	118
11	Anhang	138
11.1	Materialien	138
11.1.1	Chemikalien	138
11.1.2	Kits.....	139
11.1.3	Puffer, Lösungen und Medien	139
11.1.4	Verbrauchsmaterial	141
11.1.5	Instrumente	142
11.1.6	Software	143
11.1.7	Primer	143
11.1.8	Antikörper	144
11.2	Ergänzende Dokumente	146
12	Publikationsverzeichnis	148
13	Ehrenwörtliche Erklärung	149
14	Danksagung	150

1 Einleitung

Diabetes mellitus (DM) ist eine Gruppe heterogener Erkrankungen, die eine hyperglykämische Stoffwechsellage gemeinsam haben. Weltweit wird eine steigende Prävalenz beobachtet, wodurch DM derzeit eine große Herausforderung für das Gesundheitswesen stellt. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) schätzte eine Prävalenzzunahme des DM von 108 Millionen (Mil.) (4,7%) im Jahr 1980 auf 422 Mil. (8,5%) im Jahr 2014²⁵⁵. Unterschieden werden zwei wesentliche Typen des DM: Typ 1 (T1DM), welcher primär in der Kindheit oder Jugend auftritt und circa (ca.) 5-10% betrifft und Typ 2 (T2DM) an dem vor allem (v.a.) die ältere Population und Menschen mit ungesundem Lebensstil erkranken und der ca. 90% ausmacht^{82,255}. Die medizinische und ökonomische Relevanz des T1DM wird in den nächsten Jahren immer mehr in den Fokus rücken, da die Prävalenz an T1DM-Erkrankungen stetig zunimmt. So wird im Jahr 2035 nach Schätzungen der Internationalen Diabetes Federation (IDF) die weltweite Anzahl an DM-Erkrankungen ca. 592 Mil. ausmachen⁹¹. Dies bedeutet, dass auch die sich im reproduktiven Alter befindende Population von der steigenden Zunahme an T1DM betroffen sein wird^{2,214}.

Langandauernder Diabetes begünstigt die Entstehung von Folgeerkrankungen⁹. Es stellt einen der Hauptgründe der Erblindung, Nierenversagen, Herzinfarkte, Schlaganfälle und Amputationen der unteren Extremität dar. Schätzungen zufolge sollen die Folgen des erhöhten Blutzuckers (BZ) bei DM im Jahr 2030 die achthäufigste Todesursache ausmachen²⁵⁵.

Dass DM nicht ohne Auswirkungen für das männliche Reproduktionsorgan bleibt, geht aus diversen Studien hervor, die u.a. eine Häufung von erektiler und ejakulativer Dysfunktion, Beeinträchtigung der Quantität und Qualität der Spermienparameter, einem verminderten sexuellen Antrieb und Befriedigung sowie verringerte Schwangerschaftsraten detektierten^{5,156,198,202,242}. Es ist bekannt, dass eine hyperglykämische Stoffwechsellage die Spermatogenese negativ beeinflusst, zu morphologischen Veränderungen im Hoden sowie Nebenhoden führt und Einfluss auf den Glukosemetabolismus der Sertoli-Zellen hat^{4,34,128,211,218,250}.

Der Hoden stellt für die Entwicklung der Keimzellen (Spermatogenese und Spermio-genese) ein hochspezialisiertes und immunprivilegiertes Organ dar^{54,78,209,223}. Durch enge Kommunikation zwischen den Sertoli-Zellen (hodenspezifische Epithelzellen) wird eine Grenze zwischen Hoden, Blutsystem und Interstitium aufgebaut, welche einen autoimmunen Angriff auf die sich entwickelnden Spermien verhindert und für einen kontrollierten Stoffaustausch sorgt^{78,79,196,209,270}. Dieses hochspezifische System erstreckt sich im Nebenhoden

weiter, in dem die Spermatozoen in einer einzigartigen immunoregulatorischen epididymalen Flüssigkeit weiter ausreifen und gespeichert werden können^{12,41,78,196}.

Es gibt verschiedene, untereinander widersprüchliche Ansätze, die versuchen, den Pathomechanismus der eingeschränkten Fertilität bei T1DM Patienten zu erklären^{2,3,156,198,202,242,34,72,105,106,129,133,137,139}. Die meisten Autoren schließen daraus, dass weiterführende Studien zu potentiellen molekularen und regulatorischen Veränderungen erforderlich sind^{2,3,156,248}.

Im Zusammenhang mit der Pathogenese diverser Folgeerkrankungen des DM, wie Nephropathie, Retinopathie und Neuropathie, steht die, teils über Oxidativen Stress (OS) getriggerte, Akkumulation von Advanced Glycation Endproducts (AGEs)^{25,63,96,121,201,216,230}. Es wurde zwar bereits beschrieben, dass AGEs zur männlichen Subfertilität beitragen können^{3,97,105,133,137,173}. Allerdings existieren nur wenige Studien, die den Zusammenhang von AGEs, deren Rezeptorinteraktion (RAGE) und Signalkaskade (Nf-κB) auf die Fertilität des an T1DM erkrankten Mannes untersuchten. In der Regel wird hierbei nur auf einen Teil der pathologischen Achse Bezug genommen^{4,5,133,137,138,173,191}.

Es stehen Mausmodelle zur Untersuchung der Stoffwechselsituation bei T1DM zur Verfügung¹¹¹. Unterschieden werden genetische, von durch Pharmaka induzierten T1DM Modellen, wie dem durch Streptozotocin- (STZ) oder Alloxan (ALX)-gabe induzierten DM^{52,69,80,93,111,169}. Für die vorliegende Arbeit wird das genetische *Ins2*^{Akita+/-} Modell verwendet, welches durch eine fehlerhafte Faltung des *Ins2* Insulinproduktes zur Schädigung der Insulin produzierenden β-Zellen führt und somit zu einer ausgeprägten Hyperglykämie (> 350 mg/dl) führt²⁴⁸.

Beeinflusst von der widersprüchlichen und begrenzten Datenlage zur Subfertilität bei T1DM, ist es Ziel dieser Arbeit, den Effekt von AGEs auf die Fertilität des T1DM-Patienten, den Zusammenhang von Hyperglykämie und AGE Entstehung im männlichen Reproduktionstrakt sowie die Mechanismen und Signalkaskaden, welche hinter der Interaktion von AGEs mit RAGE stehen, systematisch zu untersuchen.

Hierfür wird zunächst eine Übersicht über DM, die AGE/RAGE Interaktion und den männlichen Reproduktionstrakt gegeben, gefolgt von einem Kapitel zu den verwendeten Methoden und Materialien, um anschließend die Ergebnisse darzustellen und mit der Diskussion zu schließen.

1.1 Diabetes mellitus

DM gehört zu einer Gruppe heterogener Krankheiten, welche chronische Hyperglykämie, eine Verminderung der Insulinwirkung sowie eine Störung der Insulinproduktion gemein haben. Langfristig kommt es zu einer Beeinträchtigung der insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas und der Notwendigkeit einer Insulintherapie¹⁰⁹.

Die überwiegende Anzahl der DM Fälle wird als Typ 1 ca. 5-10% oder Typ 2 Diabetes, welcher ca. 90% ausmacht, klassifiziert^{9,82}. T1DM ist eine Erkrankung, die aus einer gegen körpereigene β -Zellen gerichteten Autoimmunreaktion resultiert und durch externe Auslöser wie z.B. virale Infektionen oder Stress provoziert wird. Sie wird durch den Nachweis von Autoantikörpern im Blutserum festgestellt. T1DM betrifft v.a. junge Menschen und führt zu einem absoluten Insulinmangel, der subkutane Insulininjektionen lebensnotwendig macht^{109,255}. Bei Erstmanifestation gehören Gewichtsreduktion, vermehrtes Durstgefühl (Polydipsie) und damit verbundenes Wasserlassen (Polyurie) sowie allgemeines Schwächegefühl zu den klassischen Symptomen^{109,255}.

T2DM ist eine Erkrankung, die meist im höheren Alter auftritt und oft über lange Zeit asymptomatisch verläuft. Häufig geht sie mit dem metabolischen Syndrom einher, welches arterielle Hypertonie, Adipositas und einen gestörten Glukose- und Fettstoffwechsel beinhaltet. Bei dieser Form des Diabetes entwickelt sich über Jahre eine Insulinresistenz bzw. eine insuffiziente Insulinproduktion. Im Gegensatz zu den T1DM-Patienten müssen T2DM-Patienten in der Regel kein Insulin substituieren, da ihr Körper noch ausreichende Mengen produziert. Allerdings sollten diese Patienten auf eine kohlehydratarme Ernährung und sportliche Aktivität achten, um ihren Insulinbedarf niedrig zu halten. In vielen Fällen wird der T2DM erst aufgrund bereits auftretender Folgeerkrankungen (1.1.7) diagnostiziert^{109,255}.

Weitere Klassifikationen des DM beinhalten genetische Defekte der β -Zell Funktion, wozu der Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY) zählt. Bisher sind 13 verschiedene Typen bekannt, die monogenetisch entweder dominant, rezessiv oder mitochondrial vererbt werden oder *de-novo* entstehen. Sie führen zu einer Beeinträchtigung der Pankreas- und/oder Inselzellentwicklung bzw. Insulinsekretion⁴⁸. Des Weiteren gehören Störungen des exokrinen Pankreas, Endokrinopathien, medikamenteninduzierter DM, DM hervorgerufen durch Infekte oder immunvermittelt, DM als Begleiterscheinung von angeborenen Erkrankungen wie dem Down-Syndrom oder auch Gestationsdiabetes, der während der Schwangerschaft erstmalig auftritt, zur heterogenen Gruppe des DM^{9,109,111}.

1.1.1 Epidemiologie des DM

Weltweit wird eine steigende Prävalenz von DM beobachtet, was u.a. am Bevölkerungswachstum und -struktur sowie einem sich veränderndem Lebensstil, der von Adipositas und Bewegungsmangel geprägt ist, begründet wird²¹³. Eine Studie der WHO schätzte die Prävalenzzunahme des DM von 108 Mil. Erkrankten (4,7%) im Jahr 1980 auf 422 Mil. (8,5%) im Jahr 2014. Ein beschleunigter Prävalenzanstieg wird in Ländern mit mittlerem und geringem Einkommen beobachtet, wobei hier der Altersgipfel bei 45-64 Jahren liegt^{213,253,255}. In Industrienationen ist zwar ein Hauptteil der Betroffenen an T2DM erkrankt und meist über 64 Jahre alt, jedoch steigt nach Angaben einer aktuellen Studie, welche weltweit die Inzidenzen von T1DM zwischen 1989-2013 untersuchte, die Anzahl an T1DM-Patienten im Schnitt innerhalb nur eines Jahres um ca. 3,4%¹⁷⁹. Dies hat zur Folge, dass auch die Bevölkerung im reproduktiven Alter von der steigenden Zunahme an DM betroffen sein^{2,214}.

Im Global Health Report der WHO von 2016 wird berichtet, dass DM als Hauptursache der Erblindung, Nierenversagen, Herzinfarkte, Schlaganfälle und Amputationen der unteren Extremität gilt. Es wird geschätzt, dass DM im Jahr 2030 die achthäufigste Todesursache sein wird²⁵⁵. Unter Berücksichtigung der weltweit zunehmenden Relevanz von DM und dessen Komplikationen (1.1.7) ist es Ziel dieser Arbeit, Ursachen für die eingeschränkte Fertilität bei diabetischen (d.) Männern zu finden.

1.1.2 Diagnose des DM

Basierend auf den Empfehlungen der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) gilt DM als manifest, wenn mindestens einer der folgenden Befunde zutrifft: 1. klassische o.g. Symptome und Gelegenheits-Blutglukosewerte von $> 11,1$ mmol/l (> 200 mg/dl), 2. im venösen Plasma oder Serum gemessene Nüchternblutglukosewerte von $> 7,0$ mmol/l (126 mg/dl) bzw. kapillär gemessene Werte von $> 6,1$ mmol/l (> 110 mg/dl), 2 Stunden (Std.) post OGGT (Oraler Glukosetoleranz-Test mit 75g p.o. zugeführter Glukose) von $> 11,1$ mmol/l (200 mg/dl)^{109,255}.

Eine weitere diagnostische Methode ist die Bestimmung des glykierten Hämoglobins (HbA1c)⁴⁸. Im physiologischen Zustand findet eine Glykierung an ca. 4-6% der Erythrozyten am Hämoglobin A_{1c} statt^{59,119}. In der Praxis wird der HbA1c zur Abschätzung des mittleren BZ-Spiegels der letzten drei Monate verwendet und spiegelt so die Einstellung des DM wider^{2,59,255}.

1.1.3 Typ 1 DM

Im Folgenden wird T1DM, dessen Ätiologie und Pathophysiologie näher definiert. T1DM wird untergliedert in den immunvermittelten T1DMa und den sehr selten auftretenden idiopathischen T1DMb, bei dem keine Autoantikörper oder monogenetischen Defekte detektiert werden^{9,60}. T1DM tritt meist bei Kindern und jungen Erwachsenen auf, wobei sich die Erkrankung auch im höheren Alter in Form des latenten Autoimmundiabetes im Erwachsenenalter (LADA) entwickeln kann^{60,109,148,214}. Autoimmune Erkrankungen basieren meist auf dem Versagen der Spezifität oder einer fehlerhaften Erkennung von körpereigenen Antigenen^{59,78}. Durch T-Zellen vermittelt kommt es bei T1DM zur autoaggressiven Zerstörung der pankreatischen β -Zellen, welche durch den Nachweis von Autoantikörpern gegen Inselzellen, Insulin, Zinktransporter 8 (ZnT8), Glutamat-Decarboxylase (GAD65) oder gegen die Tyrosinphosphatasen IA-2 und IA-2b bestimmt werden kann. Bei Anwesenheit aller Antikörper (AK) entwickelt sich nahezu ausnahmslos ein manifester DM^{9,159}. Bisher ist die genaue Ursache des T1DM noch nicht geklärt, doch es existieren verschiedene Risikofaktoren, die eine Entwicklung evozieren können. Hierzu zählen bekannte Genloci wie die humanen Leukozyten Antigene (HLA) HLA-DQA1, HLA-DQB1 und HLA-DRB1, deren Polymorphismus mit T1DM korreliert, und die dem Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) zugehörig sind^{1,28,33,159}. Der MHC ist, als Teil des Immunsystems, mit der Erkennung von auf der Zelloberfläche repräsentierten Proteinen zuständig⁷⁵. Über die genetische Prädisposition hinaus gibt es weitere Faktoren, die zur Entstehung des T1DM beitragen, bisher aber noch weitestgehend unerforscht sind. Hierzu zählen bestimmte Umweltfaktoren wie virale Erreger, z.B. Coxsackie B4, Rhino- und Influenza Virus, Mangel an Vitamin D oder übermäßiger Milch- und Fleischkonsum^{28,33}.

Es kommt zu interindividuellen Variationen bezogen auf den Krankheitsbeginn, da das Fortschreiten der β -Zell-Zerstörung zeitlich stark variiert. Bei Kleinkindern ist diese im Vergleich zu Erwachsenen meist beschleunigt. Bei LADA besteht lange Zeit eine ausreichende Restfunktion der β -Zellen, welche eine ketoazidotische Stoffwechsellage vermeidet¹⁰⁹. Bei Erstdiagnose weisen einige Patienten bereits eine Ketoazidose auf, während andere unter langsam fortschreitenden Hyperglykämien leiden, die unter Stress rasch in eine Ketoazidose übergehen können^{9,60,89,109}. Sobald mehr als 80% der β -Zellen zerstört sind, wird ein T1DM insulinpflichtig¹¹².

1.1.4 Therapie des DM

Fokus der DM Therapie ist das Erreichen eines physiologischen BZ, um u.a. Folgeschäden so effektiv wie möglich vorzubeugen. Hierfür stehen neben Beeinflussung durch Ernährung und Lebensstil, wie körperlichem Training und ausgewogener Ernährung, medikamentöse Methoden zur Verfügung^{82,148,180,194}. Medikamentös können bei T2DM orale Antidiabetika wie Biguanide (Metformin) genutzt werden^{56,82}. Therapie der Wahl bei T1DM, Gestationsdiabetes und Patienten mit unzureichender körpereigener Insulinproduktion ist die subkutane Injektion von Insulin⁸². Dieses wurde erstmalig 1921 von Frederic Banting und Charles Best isoliert¹⁶. Das Insulin muss unter Berücksichtigung der eingenommenen Kohlenhydrate zu jeder Mahlzeit appliziert werden³¹. Zudem muss der basale Insulinbedarf (nahrungsunabhängig) mit einem langwirksamen Insulin oder unter einer Dauertherapie mit einer Insulinpumpe, die kontinuierlich kleine Mengen Insulin über einen Katheter abgibt, abgedeckt werden¹¹⁸.

Im Forschungsstadium befindet sich die Transplantation von Langerhansschen Inselzellen. Die Therapie von DM mit Hilfe von Inselzell- oder Pankreas Transplantationen umgeht zwar die täglichen BZ-Messungen und Insulin-Injektionen, jedoch handelt es sich hierbei um einen invasiven und risikobelasteten Eingriff, der durch die kontinuierliche Gabe von Immunsuppressiva begleitet wird^{180,194}.

Auch wenn die Forschung eine Imitierung des physiologischen Glukosestoffwechsels über Medikamente und eine risikoärmere Inselzell- bzw. Pankreas Transplantation zum Ziel hat, so ist die Medizin derzeit noch nicht in der Lage, DM dauerhaft durch eine Zellersatztherapie zu heilen⁶⁰.

1.1.5 Insulinbiosynthese und Mutationen im Insulin Gen

Insulin stellt ein essentielles Hormon des anabolen Glukosestoffwechsels dar und fungiert über die Bindung an spezifische, sich auf der Zelloberfläche befindliche Rezeptoren. Diese sind im Fettgewebe, der Leber und im Muskel lokalisiert. Insulin besteht aus zwei Polypeptidketten, die aus 51 Aminosäuren (AS) aufgebaut sind¹¹. Es reguliert postprandiale BZ-Konzentrationen, indem es periphere Zellen dazu stimuliert Glukose aufzunehmen, in der Leber die Glykogenese initiiert und die Synthese des Glukagons in den pankreatischen α -Zellen inhibiert, was zur Reduktion des BZ führt. Des Weiteren fördert Insulin die Protein- und Fettsynthese sowie die Proliferation des Zellwachstums. Die Insulinwirkung wird primär über die im Blut zirkulierende Glukosekonzentration reguliert. Bei BZ-Werten $< 3,3$ mmol/l wird es nicht sekretiert. Steigt der BZ, wird es im Verhältnis zu dessen Anstieg sekretiert. Zudem führen

1.1.6 Mausmodelle des T1DM

Es gibt diverse T1DM Mausmodelle, zu denen sowohl genetische Modelle, wie die non-obese diabetic (NOD) Maus, die *Ins2*^{Akita+/-} Maus oder die Munich *Ins2*^{C95S} Maus gehören, als auch Mausmodelle, welche durch Intervention mit Noxen wie STZ oder ALX einen T1DM entwickeln^{52,69,80,93,111,169}. Da in der vorliegenden Arbeit mit der *Ins2*^{Akita+/-} Maus gearbeitet wurde, wird diese im Folgenden beschrieben.

Die *Ins2*^{Akita+/-} Maus stellt ein monogenetisches diabetisches Mausmodell dar, welches von Yoshioka et al. aus einem Stamm von C57Bl/6N Mäusen etabliert und erstmals 1997 beschrieben wurde^{248,264}. Es trägt eine autosomal dominante Mutation in der Mody-Region und entwickelt Hyperglykämien und β -Zell Dysregulationen²⁴⁸. Die Mody-Region bezieht sich auf die Ätiologie des humanen Mody Diabetes¹¹¹, welcher autosomal dominant vererbt wird und durch eine spontane Missense-Mutation im *Ins2* Gen am distalen Ende von Chromosom 7 hervorgerufen wird. Dadurch kommt es zu einer Translokation eines Cysteins mit einem Tyrosin, welches zu einer funktionellen Beeinträchtigung des Proteins führt, da es zur inkorrekten Ausbildung der Disulfidbrücken kommt^{52,248}. Die resultierende fehlerhafte Faltung des Proteins führt zu endoplasmatischem Stress und Apoptose der β -Zelle²⁴⁸, was zu ausgeprägter Hyperglykämie führt^{28,109,178,206}. Da homozygote Mäuse dieses Stammes eine frühe Mortalität (nach 8-12 Wochen (Wo.)) aufweisen²⁰⁷, wurde in der vorliegenden Arbeit mit heterozygoten Mäusen gearbeitet, um so Langzeiteffekte des T1DM untersuchen zu können. Auch wenn beide heterozygoten Geschlechter Hyperglykämien aufweisen, so zeigt sich insbesondere bei vier bis fünf Wo. alten männlichen Mäusen ein manifester T1DM mit ausgeprägteren mit Hyperglykämie assoziierten Symptomen wie Polydypsie, Polyurie, Hypoinsulinämie und Schädigung der β -Zellen^{28,109,178,206}.

Die BZ-Spiegel von heterozygoten *Ins2*^{Akita+/-} zeigen vergleichbare Werte wie T1DM-Patienten mit einer Restsekretion von ca. 1/10 der Ursprungsmenge an Insulin. Dies ermöglicht die Erforschung von Langzeitfolgen des T1DM, wie der diabetischen Nephropathie (DN). Im Hinblick auf die Entwicklung und Progression der DN zeigt sich in *Ins2*^{Akita+/-} Mäusen ein erhöhter Nieren/Körpergewicht-Index, erhöhte BZ-, Triglycerid- sowie Albumin-Werte und Albumin-Kreatinin-Quotienten mit Abnahme der Glomerulären Filtrationsrate (GFR)^{14,102,109,126}.

In Bezug auf die mit Diabetes assoziierte Retinopathie (DR) zeigten *Ins2*^{Akita+/-} eine Zunahme der vaskulären Permeabilität und Apoptose der retinalen Ganglionzellen sowie eine reduzierte Dicke der Retina mit reduziertem Blutfluss^{71,87}. Darüber hinaus zeigte sich das *Ins2*^{Akita+/-} Mausmodell in vorausgegangenen Studien bereits als geeignetes Modell für die Untersuchung reproduktiver Folgeschäden^{110,173}.

1.1.7 Komplikationen des DM

Hyperglykämien, welche das Krankheitsbild des DM stetig begleiten, können in verschiedenen Organen wie der Retina, in den Glomeruli der Niere sowie peripheren Nerven zu zellulären mikrovaskulären Schädigungen führen. Dies geschieht insbesondere dann, wenn der BZ über einen längeren Zeitraum schlecht eingestellt ist. Die primär vaskulär bedingte DR zählt zu den schwerwiegenden und häufigen Komplikationen des DM. DR stellt eine der häufigsten Erblindungsgründen im Erwerbsalter dar⁷¹ und tritt nach 10-15 Jahren bei ca. 90% des T1DM (zu 50% proliferative DR) und bei ca. 30% des T2DM auf und gilt als erster Indikator für eine bestehende diabetische Mikroangiopathie⁸².

Eine weitere Komplikation des DM, die mit Hyperglykämie korreliert¹⁰¹, ist die DN welche wesentlich zur erhöhten Morbidität und Mortalität bei DM beiträgt^{126,230}. Zudem ist DN, die am häufigsten zur Dialyse führende Erkrankung und ist mit erhöhter kardiovaskulärer Mortalität assoziiert. T2DM-Patienten entwickeln hierbei nach ca. 20 Jahren in bis zu 20% und T1DM-Patienten sogar in bis zu 75% eine terminale Niereninsuffizienz^{9,82,101}. Im Verlauf der DN kommt es zur Verdickung der glomerulären Basalmembran, der Entstehung von Mikroaneurysmen und mesangialen Knötchen^{82,121}. Dies spiegelt sich in Protein-, Mikroalbumin- und Makroalbuminurie über das Auftreten von interstiliellen Fibrosen und Glomerulosklerosen bis hin zur Niereninsuffizienz wider^{82,101,104}.

Weiterhin verbreitet ist die periphere diabetische Neuropathie (PDN), welche besonders schmerzhaft verläuft^{93,201}. Die Prävalenz unter allen Diabetikern liegt bei 50-60%. Im Verlauf kommt es zu reduzierter nervaler Funktionalität und Durchblutung, welche zur Minderversorgung und schließlich zu einer permanenten Schädigung des Nervs führt. Klinisch äußert sich die PDN durch Taubheit, Brennen, Kribbelgefühl, reduziertes Vibrationsempfinden und stärkste Schmerzen im betroffenen Versorgungsgebiet^{82,201}.

Darüber hinaus können makrovaskuläre Schäden bei DM wie Arteriosklerose, chronische Inflammation und Verletzung der arteriellen und coronaren Gefäßwand zu Myokardinfarkt, apoplektischen Insult und der Amputation von unteren Gliedmaßen führen^{9,32,109,121,247}.

Dass DM zu Komplikationen im Reproduktionstrakt in Hinsicht einer eingeschränkten Fertilität führt, ist bereits Fokus diverser Studien und soll im Detail in Kapitel 1.2.4 besprochen werden^{5,6,97,242}.

Es gibt Studien zur Pathogenese der diabetischen Komplikationen, welche aufzeigen, dass häufig eine Assoziation von Hyperglykämie zu verschiedenen Signalkaskaden besteht. Aktiviert werden Signalkaskaden der Inflammation und des OS^{97,144,201} (Abbildung 2), wozu

unter anderen der Polyol- und MAPK-(mitogen-activated-protein-Kinasen) Signalweg, erhöhte Produktion von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und die Entstehung von AGEs zählen^{25,63,96,121,201,216}. Gesondert eingegangen wird in dieser Arbeit auf die durch Hyperglykämie bedingte Entstehung von AGEs²⁰¹ und die Bedeutung der dadurch aktivierten Signalkaskaden für die männliche Fertilität des T1DM-Patienten.

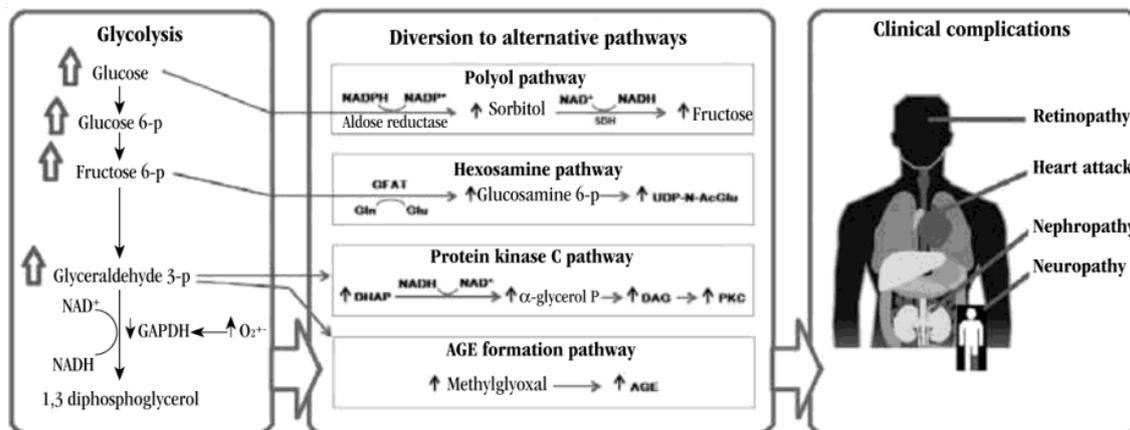


Abbildung 2: Metabolische Signalwege, die zur Entwicklung von mit T1DM assoziierten Komplikationen beitragen¹⁷⁵

1.1.8 Entstehung von Advanced Glykation Endproducts (AGEs)

AGEs sind Produkte, die aus einer nicht-enzymatischen Reaktion zwischen den Aldehydgruppen von reduzierenden Zuckern mit den Aminogruppen von Proteinen, Lipiden oder Nukleinsäuren entstehen. Diese Reaktion wird auch als Maillard-Reaktion bezeichnet^{63,119,216,228,230,236}.

Die Maillard-Reaktion (Abbildung 3) ist eine konzentrationsabhängige Reaktion, die im hyperglykämischen Zustand beschleunigt auftritt^{175,216}.

Im weiteren Verlauf führt die Reaktion zur Bildung von reversiblen Schiff'schen Basen zwischen der Amino- und Aldehydgruppe, zur Formierung eines Ketoamins als Zwischenprodukt, und über mehrere Umlagerungsschritte zu einem Amadoriprodukt^{175,216,228,230}. Das glykierte Hämoglobin HbA1c zählt zu den am besten bekannten Amadoriprodukten und macht im physiologischen Zustand ca. 5% des Hämoglobins aus, stellt jedoch kein endgültiges AGE dar^{82,97,216}. Endgültige AGEs entstehen erst nach einer Reihe von Dehydrations-, Kondensations- und Oxidationsreaktionen Schritten^{175,228}. Daher werden AGEs v.a. in Verbindung mit langlebenden extrazellulären Proteinen, die über einen längeren Zeitraum

erhöhten Glukosekonzentrationen ausgesetzt sind nachgewiesen. Hierzu zählen strukturelle Proteine der Matrix und Basalmembran, wie Kollagene, Myelin oder Fibrinogen^{63,230}.

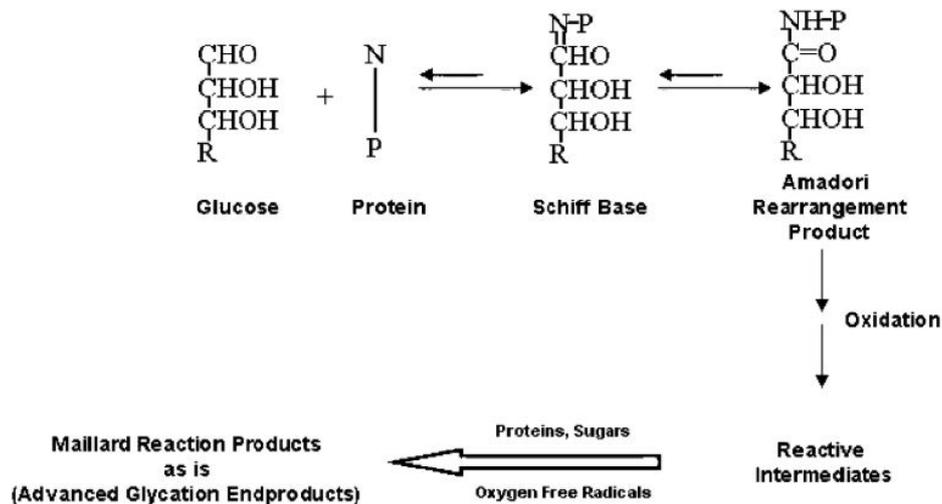


Abbildung 3: Weg der AGE-Entstehung nach der Maillard-Reaktion²⁶⁹

Alternativ können AGEs durch glykolytische Zwischenprodukte wie Glyoxal, Methylglyoxal (MG) und 3-Desoxyglucoson entstehen. Diese Zwischenprodukte können z.B. aus dem Abbau von Amadoriprodukten, OS oder dem Zerfall von (phosphorylierten) Zwischenprodukten hervorgehen^{63,228,230}. Hyperglykämien führen dazu, dass in Mitochondrien anstatt ATP vermehrt ROS und reaktive Stickstoffspezies entstehen, woraus ein reduzierter Sauerstoffverbrauch resultiert^{121,130,144,230}. ROS sind sehr reaktive Moleküle, die zur beschleunigten Schädigung von Lipiden, Proteinen und DNS beitragen und relevant für Komplikationen bei DM sind^{144,230}.

Der Begriff OS beschreibt den Zustand eines enormen Aufkommens an ROS, das entweder aus massiver Produktion oder insuffizienter Beseitigung resultiert, welche jeweils durch Hyperglykämien begünstigt werden^{121,221,230}.

Es ist bekannt, dass die durch Hyperglykämie bedingte Produktion von AGEs und deren Akkumulation im Gewebe durch OS hervorgerufen werden kann als auch, dass AGEs selbst OS begünstigen und diese Mechanismen die Entwicklung von Folgeerkrankungen bei DM fördern^{4,21,105,107,230,244}.

Unterschieden werden zwei wesentliche Gruppen von AGEs. AGEs, die aus der Bindung von Aldehyden an Lysinreste der Proteine hervorgehen, wie Carboxyethyllysin (CEL), Pyrrolin, aus Glyoxal abgeleitete Lysin Dimere (GOLD), Methylglyoxal-Lysine Dimere (MOLD), aus 3-Desoxyglucoson abgeleitete Lysin Dimere (DOLD) und Carboxymethyllysin (CML). CML ist das bisher am besten definierte AGE, welches im

menschlichen Körper die höchste Serumkonzentration aufweist und in verschiedenen Studien mit der Progression von DM assoziierten Krankheiten in Verbindung gebracht wird^{21,58,105,133,173,187,228,230}. Zum anderen gibt es AGEs, die aus der Bindung von Aldehyden an Argininreste der Proteine hervorgehen. Hierzu zählen das aus Glyoxal abgeleitete Hydromidazolone (G-H1), das aus MG abgeleitete Hydroimidazolone (MG-H1) und das aus 3-Deoxyglucoson abgeleitete Hydroimidazolone (3DG-H1)^{21,147,175,228,237}.

1.1.9 Methylglyoxal, Glyoxalase und D-Lactat

In diesem Kapitel wird auf die Entstehung der AGEs über das Zwischenprodukt MG eingegangen, während in Kapitel 1.1.8 die Maillard-Reaktion näher beschrieben wurde. Es gibt AGEs, die aus Reaktionen mit α -Oxoaldehyd entstehen, wie das MG, Glyoxal oder 3-Deoxyglucoson. Sie können dabei aus verschiedenen chemischen und metabolischen Stoffwechselwegen hervorgehen^{21,216,237}. Berner et al. beschreiben, dass die α -Oxoaldehyd-Produkte die wichtigste Quelle für intra- und extrazelluläre AGEs darstellen und dass ein erhöhter BZ zu gesteigerter MG-Bildung führt^{21,175,216}. MG zählt zu den endogen reaktiven Dicarboxyl-Metaboliten. Es entsteht u.a. durch spontane Degradation von Triosephosphat-Zwischenprodukten, wie Glyceraldehyd-3-Phosphat und Dihydroxyacetonphosphat, oder während der anaeroben Glykolyse¹⁸⁴. Darüber hinaus geht es aus dem Zerfall von Glukose oder glykierten Proteinen²³⁶ sowie aus der nichtenzymatischen Phosphat-Elimination von Glyceralaldehyden, Psosphaten und Dihydroxyacetonen hervor. Als reaktives, intrazelluläres Dicarboxyl reagiert MG mit Aminogruppen von intra- und extrazellulären Proteinen und führt zur Entstehung von AGEs wie Carboxyethyllysin (CEL), Methylglyoxal-Lysin-Dimer (MOLD), MG-Hydroimidazolone (MG-H1), Tetrahydropyrimidin und Argpyrimidin (Abbildung 4)^{21,121,216,237,260}.

Hervorzuheben ist, dass CML vermehrt unter OS anfällt²³⁰ und nicht direkt aus MG resultiert. Es handelt sich also um zwei verschiedene Entstehungsmechanismen von AGEs.

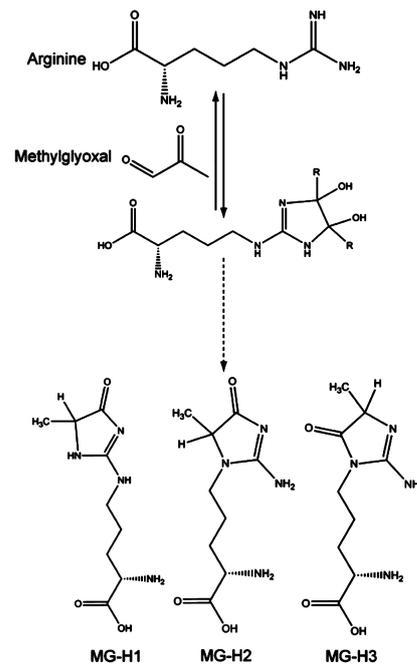


Abbildung 4: Chemische Darstellung der AGE-Entstehung aus Arginin über das Zwischenprodukt Methylglyoxal²⁵⁹

Da MG ca. 20000-fach reaktiver als Glukose ist und als hoch reaktives Produkt zur Glykierung führen kann (auch Glykierung von Proteinen und DNS), wodurch es vermehrte Strangbrüche und Leserastermutationen in der DNS induzieren kann^{157,234}, ist es entscheidend, dass MG-Spiegel durch Schutzmechanismen niedrig gehalten werden. Glykierungen können metabolische, strukturelle und funktionale Veränderungen des Proteins bewirken. Sind mitochondriale Proteine betroffen, trägt dies zur vermehrten Bildung von ROS bei¹⁵³. Die Glykierung durch MG findet primär an den Arginin-Seitenketten statt und führt über die Bildung von Hydroimidazolone zu einem Verlust der positiven Ladung. Es gibt drei Isomere der durch MG entstandenen Hydroimidazolone (MG-H1-3), die alle Liganden des Rezeptors RAGE sind^{49,259}.

Ein Schutzmechanismus gegen das hochtoxische MG stellt der Glyoxalase (GLO)-Komplex dar, welcher aus GLO-1 und GLO-2 gebildet wird und als Koenzym Glutathion nutzt (Abbildung 5). Er sorgt dafür, dass MG zu dem unschädlichen D-Lactat abgebaut wird^{21,116,153}.

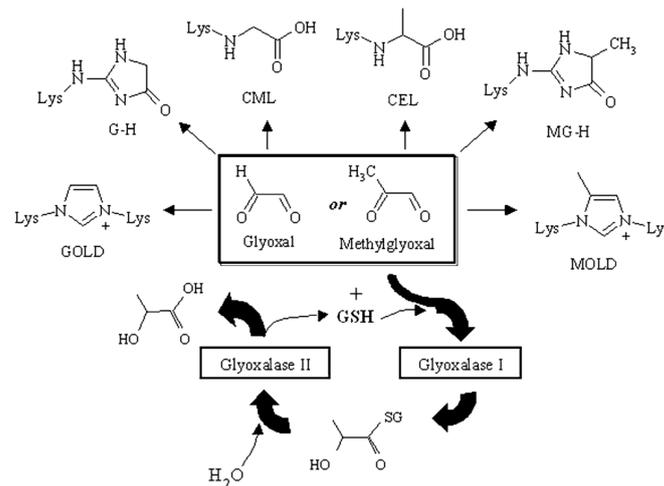


Abbildung 5: Abbau von AGEs über den Glyoxalase (GLO)-Mechanismus¹¹⁶

1.1.10 Rezeptor für Advanced Glycation Endproduct (RAGE)

Ein essenzieller Rezeptor für AGEs ist RAGE. Er gehört zu den transmembranen Proteinen Typ 1, mit einer N-terminalen extrazellulären Domäne. RAGE hat eine Molekülmasse von ca. 45 Kilodalton (kDa) und ist aus 404 AS-Einheiten aufgebaut, von denen 332 zum extrazellulären Kompartiment zählen^{103,175,191}. Dieses besteht aus zwei C-Typ-Domänen und einer vorgeschalteten V-Domäne, die essentiell für die Ligandenbindung ist. Die transmembranäre Domäne des Rezeptors besitzt zwei stark geladene zytosolische Schwänze, die bedeutend für die intrazellulären Signalwege sind (siehe dafür Abbildung 6). RAGE gehört zur Immunglobulin-Superfamilie der „Cell surface immunglobuline“, deren Expression durch verschiedene Pathologien wie Arteriosklerose aktiviert wird^{63,103}. Darüber hinaus zählt RAGE zu den multiligandären Pattern-Recognition-Rezeptoren und fungiert somit nicht nur als Ligand für AGEs, sondern auch für High-mobility-group-Proteine (HMGBs), β -Amyloide, S100/CalgranulinA, Macrophagen Antigen 1 (Mac-1) und Heparin^{57,103,171,175,192}.

RAGE zählt zu den bisher am besten erforschten Rezeptoren für AGE und ein Zusammenhang zu DM-Komplikationen konnte in verschiedenen Studien bereits belegt werden^{4,21,25,63,77,105,107,230,244,260}. Es existieren weitere Rezeptoren von RAGE, wie AGE-R1-3, CD36 und verschiedene AGE-Bindeproteine wie N-Glykane, Ezrin und Megalin^{25,175,230} auf diese wird in folgender Arbeit jedoch nicht eingegangen.

Da die Interaktion der Liganden mit RAGE für die Entwicklung von mit DM assoziierten Komplikationen einen hohen Stellenwert hat, wird im Folgenden auf diese Interaktion, die Signalkaskaden und dessen Einfluss auf den Stoffwechsel eingegangen. Neben

AGE als Ligand wird im weiteren Verlauf HMGB gesondert beschrieben (Kapitel 1.1.11), da die Interaktion von HMGB1 mit RAGE eine zentrale Rolle im Pathomechanismus des DM und von Inflammationen zu spielen scheint^{25,74,171,193,215}.

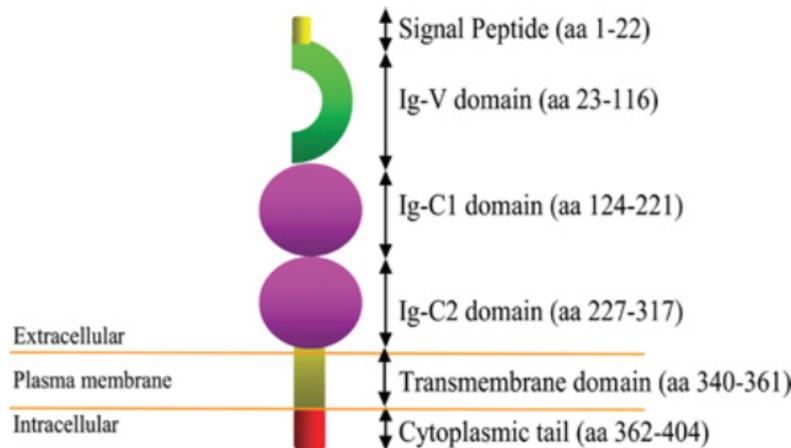


Abbildung 6: Schematische Darstellung von RAGE¹⁰³

1.1.11 Liganden von RAGE und dessen Interaktion mit RAGE

Neben AGEs zählen High-Mobility-Group-Box-Proteine (HMGBs) zu Liganden von RAGE²²⁰ (siehe Abbildung 7 A). HMGBs sind nicht-histomale chromosomale Proteine zu denen HMGB1, HMGB2, HMGB3, HMGB4 zählen. Während HMGB1 ubiquitär mit Ausnahme von Neuronen exprimiert wird, ist HMGB2 spezifisch für Thymus und Hoden. HMGB3 wird in lymphatischen Organen²²⁰ und HMGB4 in Hoden und Gehirn detektiert³⁶. HMGB1 ist zum einen ein nukleärer Faktor, der zur Stabilisation der DNS während der Transkription dient. Zum anderen ist es ein Zytokin, das u.a. als Antwort auf Infektionen und zellulären Stress folgt. Außerhalb der Zelle aktiviert es das Immunsystem und vermittelt Chemotaxis und Zellmigration, die Differenzierung von Immunzellen sowie die Produktion von Zytokinen über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors (Tf) $\text{Nf-}\kappa\text{B}$. Über die Interaktion mit verschiedenen Zelloberflächenrezeptoren, u.a. auch RAGE, stellt es eine essentielle Brücke zum angeborenen Immunsystem dar, indem es intrazelluläre Kaskaden aktiviert, welche die Funktion und Modulation der Immunzellen regulieren^{22,74,113,140,193,262}.

Nogueira-Machado et al. gehen davon aus, dass diese Rezeptorinteraktion wesentlich zu einer inflammatorischen Reaktion bei DM beiträgt und dass Hyperglykämie die Expression von HMGB moduliert^{171,247}.

In-vitro-Studien zeigen, dass die Bindung von AGEs an RAGE zu OS und der Aktivierung des Tf Nf- κ B führt. Nf- κ B ist ein auf freie Radikale sensitiver Tf, welcher die Transkription von Genen wie Endothelin-1, Thrombomodulin und Gewebefaktoren moduliert und zur Freisetzung proinflammatorischer Faktoren wie IL-1 α , IL-6, TNF- α und HMGB1 führt und somit die Entwicklung von Komplikationen bei DM begünstigt^{154,185,192,193,216,246}. Für einige Organe wurde beschrieben, dass die Transkription von RAGE durch die Bindung eines Liganden, im Sinne einer positiven Rückkopplungsschleife, hochreguliert werden kann^{63,171,229}. Dies führt zur Bildung von ROS über eine NAD(P)H-Oxidase^{24,230,261}. Diese aktiviert den o.g. positiven Rückkopplungsmechanismus, der wiederum die Expression von RAGE fördert und so zur Beschleunigung inflammatorischer Prozesse beiträgt, welche im Verlauf zu diabetischen Folgeschäden führen können^{19,63,77,171,229,230,244,260}. Eine detaillierte Beschreibung der Signalkaskaden findet sich in Kapitel 1.1.12.

Ligandenbindung an RAGE bewirkt u.a. Chemotaxis, Migration und Reifung der Immunzellen sowie die Hochregulation von Zell-Oberflächen-Rezeptoren, den Zelladhäsionsproteinen ICAM (interzellulärem Adhäsionsmolekül-1) und VCAM (vaskulärem Zelladhäsionsmolekül-1), MCP-1 (Makrophagen-Chemoattraktorprotein), VEGF (Endothelwachstumsfaktor) und E-Selektin (endotheliales Selektin)^{20,171,226}. Diese Liganden-Rezeptor-Interaktion resultiert somit in einer Progression vom mit DM assoziierten Komplikationen (Abbildung 7 B), da hierdurch günstige Bedingungen für Entzündungen und Neovaskularisierungen geschaffen werden^{19,46,113,147,171}.

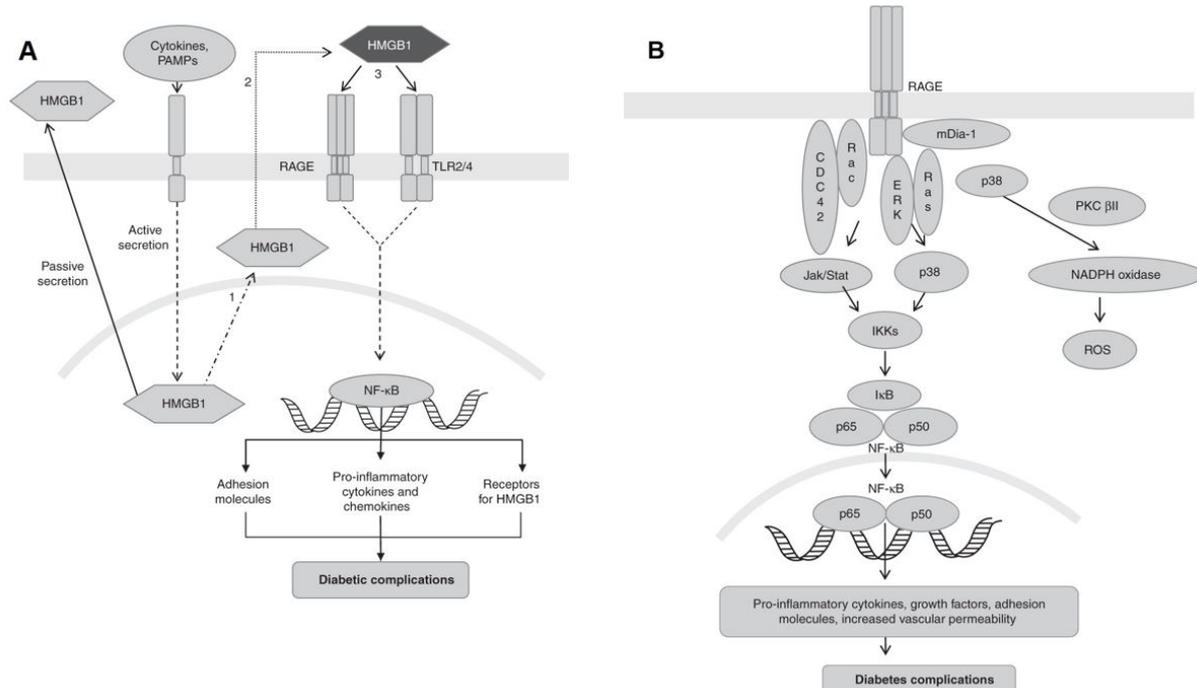


Abbildung 7: Aktivierung von RAGE über HMGB1 (A) und Signalkaskaden der Liganden-RAGE-Interaktion¹⁷¹ (B)

1.1.12 Signalkaskaden der Liganden-RAGE-Interaktion

Neben der Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase zählen zu den durch Liganden-RAGE-Interaktion aktivierten Signalkaskaden der MAPK- (ERK1 und 2 und p38), Akt/PKB- und JNK-Signalweg, die alle zu einer Translokation von Nf-κB in den Zellkern führen^{4,24,230,29,63,92,107,170,171,192,193}. Intrazellulär bedingt eine RAGE-Bindung u.a. eine Aktivierung von der GTPase cell division cycle 42 (Cdc42). Cdc42 wie auch Rac zählen zur Untergruppe der Rho-GTPasen. Über die Interaktion mit Rac, trägt Cdc42 zur Aktivierung der Nf-κB Signalkaskade bei (Abbildung 7 B)^{63,171}. Jene Aktivierung erfolgt entweder direkt über Cdc42/Rac-Interaktion⁶³, über den JAK/STAT-Signalweg¹⁷¹ oder über den p38/JNK-Signalweg¹⁹³. Zudem ist Cdc42 im Zellwachstum und -migration, Motilität¹⁷¹ sowie dem Neuriten-Wachstum involviert⁸⁸ und wirkt so auf das Zytoskelett. Eine weitere durch RAGE-Bindung aktivierte Signalkaskade, die ebenso die Nf-κB Translokation in den Zellkern fördert, läuft über einen Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K)-aktivierenden Signalweg²⁹. Dieser wird über eine gesteigerte Expression der NADPH-Oxidase aktiviert, welche zur erhöhten ROS-Produktion führt. Im weiteren Verlauf führt PI3K zu einer direkt zur Aktivierung des thymoma viral proto-oncogene 1 (Akt1), welches zur Familie der Proteinkinasen B gehört und wiederum Nf-κB aktiviert. Akt1 spielt eine zentrale Rolle in der Vermittlung von zellulären

Prozessen wie dem Glukose-Metabolismus, der Proteinsynthese- und umsatz, der inflammatorischen Antwort und dem Zellschutz (anti-apoptotisch)^{78,161,199}. Zum anderen führt PI3K zur Aktivierung der Extracellular-signal Regulated Kinase (ERK)¹⁹, welche zusätzlich direkt über ROS aktiviert werden kann^{63,88,193}. Ferner gilt ERK als direkter Ligand an den zytoplasmatischen Rest (Tail) von RAGE, während ERK1 entweder über ERK2 oder direkt an RAGE bindet. Dies führt zur Downstream-Aktivierung von Nf- κ B (Kapitel 1.1.13) und somit zu einer potentiellen Entstehung von Gewebsfunktionsstörungen^{92,192,193}.

1.1.13 Nf- κ B Signalkaskade

Der Tf Nf- κ B stellt eine essentielle Verbindung zwischen Liganden-RAGE-Interaktion und der Expression von Genen dar, welche das Immunsystem, Zellüberleben, Differenzierung und Proliferation beeinflussen^{24,76}. Zur Nf- κ B-Familie werden RELA (p65), RELB, REL (c-Rel), Nf- κ B1 (p50/p105) und Nf- κ B2 (p52/p100) gezählt. Diese formen homo- oder heterodimere Komplexe^{76,181}. Unter physiologischen Konditionen befinden sich die meisten Nf- κ B-Untereinheiten in einem nicht aktivierten Zustand, gebunden an Inhibitoren im Zytoplasma. Diverse pathologische Stimuli wie OS und AGE-Akkumulation führen jedoch zur Aktivierung des Nf- κ Bs.

Es gibt zwei wesentliche Signalkaskaden, die die Aktivierung des Nf- κ Bs bedingen. Dies sind der klassische und der alternative Weg. Beide Wege werden über einen I κ B-Kinase (IKK)-Komplex aktiviert, wobei sich der Aufbau dieses Komplexes unterscheidet. Die Phosphorylierung an der Proteinkinase A (PKA)-Phosphorylierungsstelle induziert eine Degradierung des I κ B-Inhibitors und führt zur Aktivierung und Translokation des Nf- κ B-Dimers in den Nukleus. Phosphorylierungsstellen der Nf- κ B-Untereinheit p65 sind das Serin 276 und das Serin 536. Die Phosphorylierung ist essentiell für die Bindung von Nf- κ B an die DNS und die Aktivierung der Effektorgane^{38,62,132,199}. In der Regel ist dieser Mechanismus von zyklischer und transientser Natur und wird über die kontinuierliche Degradierung und Resynthese des I κ B-Komplexes gesteuert^{38,62,76,181,224}.

Aktiviertes und in den Zellkern transloziertes Nf- κ B bindet an Promotoren der Zielgene, um so dessen Transkription einzuleiten. Da NF- κ B-Untereinheiten in allen Zelltypen exprimiert werden und es diverse Aktivatoren gibt, wird die Induktion der unterschiedlichen NF- κ B-Dimere von sehr vielseitigen Einflüssen bedingt. Daher ist es nicht überraschend, dass die Funktionen von Nf- κ B-Komplexen in Abhängigkeit von der Umgebung, in der sie gefunden werden, variieren und sogar gegensätzliche biologische Effekte induzieren kann¹⁸². Hierzu zählen u.a. inflammatorische (TNF- α , IL, ICAM, VCAM-1), proliferative (Cycline, CDK2,

MYC), angiogenetische (VEGF, HIF1 α), proapoptotische (Fas, Bax, TRAIL, TNF- α) oder auch antiapoptotische (Bcl-2, TRAF) Gene^{24,38,76,132}. Während der klassische Signalweg durch eine Vielzahl von Entzündungssignalen aktiviert wird und zur koordinierten Expression mehrerer entzündlicher und angeborener Immungene führt, wird der alternative Weg durch Cytokine wie dem B-Zell-aktivierenden Faktor der TNF-Familie (BAFF) und den CD40-Liganden (CD40L) aktiviert und spielt eine zentrale Rolle bei der Expression von Genen, die an der Entwicklung und Erhaltung von sekundären lymphoiden Organen beteiligt sind. So ist bekannt, dass der klassische Signalweg Einfluss auf die Pathogenese diverser chronischer Erkrankungen, wie u.a. COPD, Asthma, Colitis ulcerosa, Arteriosklerose oder rheumatische Arthritis nimmt¹²⁰. Zudem ist erwiesen, dass in Abhängigkeit zu den aktivierten Untereinheiten von Nf- κ B eine spezifische Gruppe von Zielgenen transkribiert wird^{76,98}. So kann Nf- κ B unter bestimmten Umständen, wie dem Vorhandensein von Tumorsuppressorgenen, oder dem Einfluss von UV-Licht, die Expression der Zielgene unterdrücken⁹⁸. Hierdurch kann es sowohl pro- wie auch anti-apoptotisch wirken^{98,182}.

Innerhalb dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt auf folgende Gene der Nf- κ B-Achse gelegt und jene an dieser Stelle detaillierter beschrieben.

Der Inhibitor der kappaB-Kinase-beta (I κ B κ B) agiert als Teil des IKK-Komplexes der Nf- κ B-Signalkaskade, indem er Inhibitoren des Nf- κ Bs phosphoryliert und so die Translokation des nun freien Nf- κ Bs in den Zellkern ermöglicht⁶².

NFKBIA (NFKB inhibitor alpha auch bekannt als I κ B α) stellt einen Gegenspieler des I κ B κ B Gens dar. Es transkribiert für Gene, die dafür verantwortlich sind, dass der IKK-Komplex bestehen und somit an Nf- κ B gebunden bleibt, sodass dieses nicht in den Kern translozieren kann^{76,199}.

RELA ist das Gen, welches die Untereinheit p65 des Tf Nf- κ Bs kodiert. Phosphorylierung und Acetylierung von RELA sind wesentliche posttranslationale Modifizierungen, die zur Aktivierung des Nf- κ Bs führen^{62,181,182}.

Ferner existieren „Gegenspieler von Nf- κ B“ wie das Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2). Es spielt eine Rolle bei der Abwehr und Resistenz gegen OS, indem es die Expression von antioxidativen Genen über das sog. Antioxidant-response-Element (ARE) reguliert^{130,167}. Der Nrf2-Mechanismus trägt zur Eindämmung der mit DM assoziierten Pathologien, wie der pankreatischen β -Zell-Apoptose, bei. Nrf2 wird daher als therapeutischer Ansatz zur Reduktion von Spätfolgen in Betracht gezogen wird²³.

Wie beschrieben, führt die Aktivierung von Nf- κ B u.a. zu inflammatorischen Prozessen. Innerhalb vorliegender Arbeit wurden einige inflammatorische Gene analysiert und

sollen daher an dieser Stelle genauer beschrieben werden. Hierzu gehören die beiden Untereinheiten IL-1 α und IL-1 β , welche zusammen das IL-1 formieren. Es zählt zusammen mit IL-6 und TNF- α zu den endogenen Pyrogenen und trägt u.a. über die Initiierung der Produktion von TNF- α zur Regulation der zellulären Immunantwort bei^{33,53}. Der Gewebsnekrosefaktor TNF- α beteiligt sich ähnlich dem IL-1-Komplex an der akuten zellulären Immunantwort. IL-10 hingegen zählt zu den antiinflammatorischen IL und inhibiert als solches die Immunantwort, indem es z.B. die antigenspezifische T-Zell Proliferation inhibiert^{53,79}.

1.2 Der männliche Reproduktionstrakt: Anatomie, Morphologie und Funktion

Der männliche Reproduktionstrakt (Abbildung 8) beinhaltet den paarig angelegten Hoden (Testis) und Nebenhoden (Epididymis), den Samenleiter (Ductus deferens), akzessorische Drüsen und den Penis.

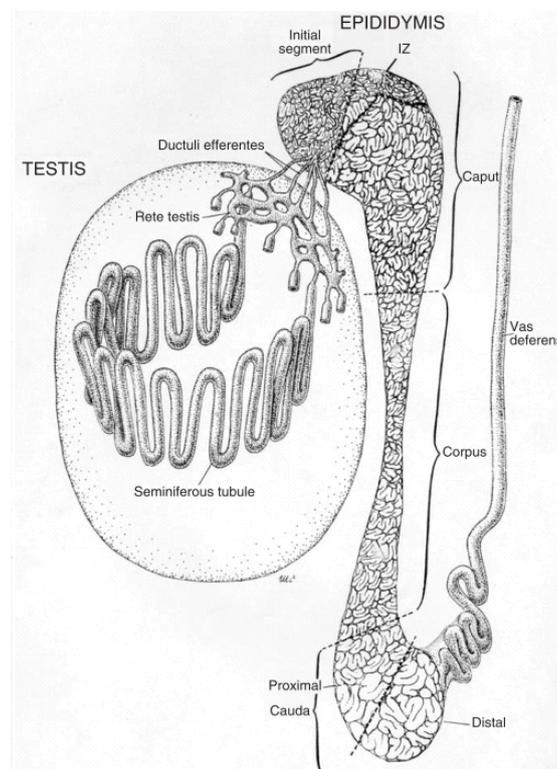


Abbildung 8: Skizzierte Darstellung des männlichen Reproduktionstrakts¹⁹⁶

Der Hoden gilt als immunprivilegiertes und hochspezialisiertes Organ, welches der Proliferation der männlichen Keimzellen und der Produktion des Hormons Androgen (Testosteron) dient. Der Begriff immunprivilegiert impliziert, dass die sich entwickelnden Spermien vor einer autoimmunen Attacke von der Blut-Hoden-Schranke (BHS) geschützt

werden^{54,78,209,223}. Im Nebenhoden, der dem Hoden direkt aufliegt, werden die Spermatozoen, welche bereits Spermatogenese und Spermiogenese durchlaufen haben, gespeichert und reifen weiter aus¹⁹⁶.

Der Hoden (Abbildung 9) ist aus zwei Kompartimenten aufgebaut. Hierzu zählen die Samenkanälchen (Tubuli seminiferi), in denen die Spermatogenese stattfindet und das Interstitium, welches sich in mehrere Hodenläppchen (Lobuli testis) gliedert²⁴⁹.

Die Tubuli seminiferi sind aus Keim- und Stützzellen aufgebaut und von einer Basalmembran sowie von einer aus glatten Muskelzellen bestehenden Lamina propria umgeben. Die Sertoli-Zellen (Stützzellen), welche in Kapitel 1.2.1 genauer definiert werden, sitzen der Basalmembran auf, während ihr Zytoplasma zum Lumen reicht.

Zwischen den Tubuli seminiferi liegen in Gruppen angeordnet die Leydig-Zellen (Zwischenzellen), welche das männliche Geschlechtshormon Testosteron bilden, sowie Myofibroblasten^{204,208,241}.

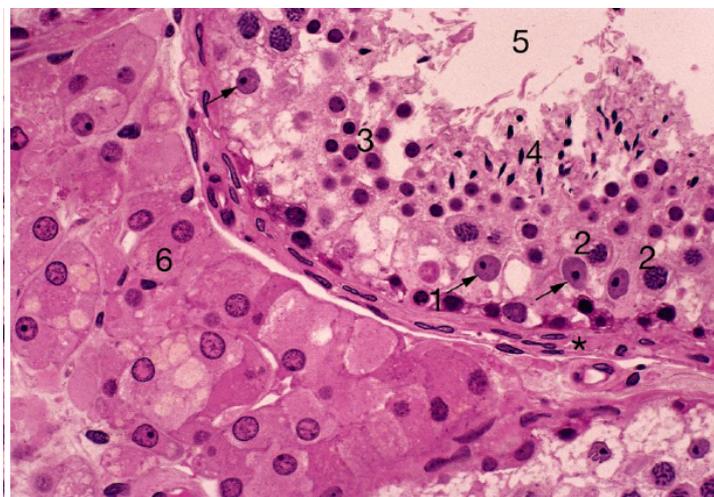


Abbildung 9: Plastikschnitt einer H.E. Färbung eines menschlichen Hodens in 450-facher Vergrößerung

Mit Pfeil gekennzeichnet sind Sertoli-Zellen, 1. Spermatogonien, 2. Spermatozyten I. Ordnung, 3. frühe Spermatide, 4. weitestgehend ausdifferenzierte Spermatide, 5. Lumen des Tubulus seminiferus, 6. Leydig Zellen, * Myofibroblasten²⁴⁹.

1.2.1 Sertoli-Zellen und Blut-Hoden-Schranke

Sertoli-Zellen sind für den Hoden spezifische somatische sekretorische Zellen, die erstmals vom italienischen Histologen Enrico Sertoli als Ammen-Zellen der Tubuli seminiferi beschrieben wurden^{66,210}. Sertoli-Zellen haben multiple Aufgaben, zu denen die Formierung der

Tubuli seminiferi und der BHS über Tight junctions zählen. Zudem haben sie eine ernährende und unterstützende Funktion in Hinsicht auf die Entwicklung der Keimzellen. Das Vorhandensein einer BHS ist essentiell um zu verhindern, dass die einzigartigen Antigene, die während der Spermatogenese entstehen, nicht von Mechanismen der immunologischen Toleranzinduktion erfasst werden. Sie schützt somit vor einer autoimmunen Reaktion. Außerdem beschränkt die BHS den Eintritt von Molekülen und Zellen aus dem Blutsystem und Interstitium in den Tubulus, sodass eine einzigartige Mikroumgebung für die sich entwickelnde Keimzelle geschaffen wird^{178,79,150,196,209,270}. Durch den immunprivilegierten Charakter des Hodens wird verhindert, dass Immunzellen die Antigene welche auf den Spermatozoen exprimiert werden, als solche erkennen und diese attackieren^{12,45,150,209,223}. Darüber hinaus sind Sertoli-Zellen für die Abgabe der reifen Spermatozoen und die Produktion des Androgen-bindenden Proteins verantwortlich^{196,232,249}. Während der fetalen Periode tragen sie über die Koordinierung der Migration und Differenzierung hodenspezifischer Zellen zur Entstehung eines funktionsfähigen Hoden bei. So induzieren sie z.B. über die Sekretion des Anti-Müller-Hormons (AMH) die Regression der Müller-Gänge^{66,232,249}.

Bisher bestand die Annahme, dass Sertoli-Zellen ab dem Erreichen der Pubertät nicht weiter proliferieren und eine endgültige Zahl von 3×10^6 in Nagetieren und 1800×10^6 in Menschen erreichen, sodass jegliche Schädigung der Sertoli-Zelle als Ursache einer gestörten Fertilität angesehen werden konnte^{51,266}. Für eine physiologisch ablaufende Spermatogenese ist eine intakte BHS als essentiell. Defekte der BHS tragen zur reduzierten Fertilität bis hin zur Infertilität bei^{5,6,232,266}.

1.2.2 Nebenhoden und Blut-Nebenhodenschranke

Der Nebenhoden (Epididymis) stellt einen aus mehreren einzelnen Gängen (Ductus efferentes) konvergierten Gang dar, der bei Mäusen ca. 1 m und bei Menschen bis zu 6 m lang ist^{196,204,208}. Er liegt dem Hoden von dorsomedial an und gliedert sich in ein initiales Segment, mittleren und distalen Caput (Kopf), mittleren und distalen Corpus (Körper) und Cauda (Schwanz). Er ist durch bindegewebige Septen in mehrere Lobuli gegliedert, in welchen eine spezifische Genexpression und Proteinkonzentration herrscht^{12,150,204}. Der Nebenhoden übernimmt die Funktion der Spermienreifung sowie deren Transport, Schutz und Speicherung. Die verschiedenen epididymalen Zellen sind verantwortlich für die Sekretion und Aufrechterhaltung des spezifischen Mikromilieus¹¹⁰. In Abbildung 10 dargestellt ist ein Querschnitt (Abbildung 10 A) des Nebenhodens sowie morphologische und histologische Veränderungen (Abbildung 10 B) im Verlauf des Organs. Die epithelialen und

hochsekretorischen Hauptzellen, die einen basal gelegenen Nucleus aufweisen, sind über den gesamten Gang angeordnet und sind für die Erstellung des Mikromilieus mit verantwortlich. Die endozytierenden apikalen Zellen sowie sog. Narrow-Zellen finden sich im initialen Segment und der intermediären Zone. Narrow-Zellen sind endozytotoische Zellen und produzieren H^+ -Ionen, die zur Zusammensetzung der Samenflüssigkeit beitragen. Clear-Zellen stellen weitere zur Endozytose befähigte, nebenhodenspezifische, Zellen dar. Sekretorische Basalzellen befinden sich an der Basalmembran ohne dabei Kontakt zum Lumen des Ductus zu haben. Zudem kommen lympho- oder monozytenähnliche Zellen, die sog. Halo-Zellen an der Basis des Epithels vor^{42,67,196}.

Umgeben wird der Nebenhoden von einer glatten Muskelschicht. Am Lumen befinden sich, auf den Hauptzellen sitzenden immobilen Stereozilien. Diese haben die Aufgabe, die Spermatozoen weiter zu transportieren bzw. die Membranoberfläche für Proteine, die an Resorption und Sekretion beteiligt sind, zu vergrößern^{12,85,196}. Im Verlauf des Nebenhodens variieren diese zellulären Strukturen. Die Dicke des Epithels nimmt von Caput zu Cauda ab während der luminale Diameter und die Dicke der peritubulären glatten Muskulatur zunimmt. Das Caput ist arm, die Cauda reich an Spermatozoen¹².

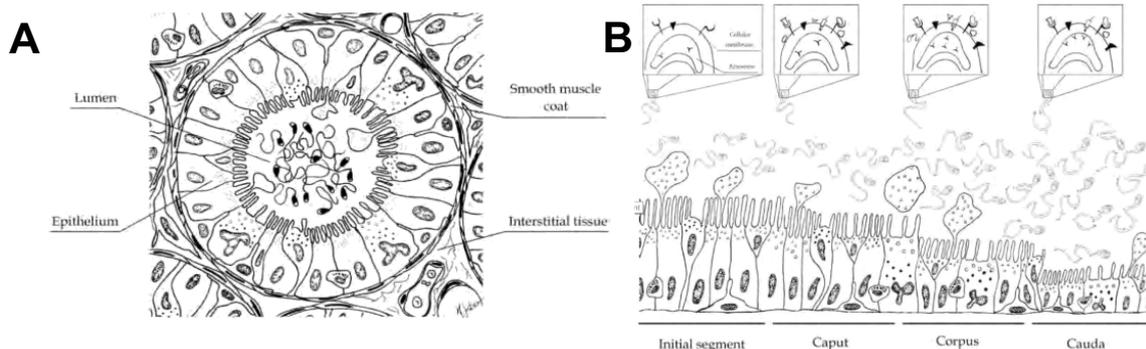


Abbildung 10: Schematische Darstellung eines Querschnitts des Nebenhodens (A) sowie der morphologischen Veränderungen des Epithels im anatomischen Verlauf des Nebenhodens (B)¹²

Wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben übernimmt die BHS des Hodens die Aufgabe, eine immunologische Reaktion auf die immunogenen Spermatozoen zu unterdrücken. Robaire et al. vermuten daher, dass es eine solche Barriere auch im Nebenhoden geben müsse^{150,196}. Zwar konnte bisher ein immunprivilegierter Zustand im Nebenhoden nicht eindeutig nachgewiesen werden, doch müsste es Mechanismen im Sinne einer Blut-Nebenhoden-Schranke (BNS), geben, die die heranreifenden Spermatozoen vor einer immunologischen Reaktion

schützen^{42,67,78}. Bekannt ist, dass junktionale Komplexe (aufgebaut aus Tight junctions, Makula adhaerens und Gap Junctions), zwischen Hauptzellen bestehen. Die Anzahl der Tight junctions ist dabei im Verlauf des Nebenhodenganges von Caput zu Cauda abnehmend⁴³. Der Meinung einiger Autoren nach ist eine solche BNS für eine spezifische Zusammensetzung der Samenflüssigkeit und ein spezielles Mikromillieu zuständig, in welchem die immunogenen Spermatozoen weiter heranreifen^{12,42,67,78,196}. Allerdings ist die BNS nach derzeitigem Kenntnisstand im Gegensatz zur BHS nicht sehr stabil und kann durch verschiedene Einflüsse wie Stress oder z.B. metabolische Veränderungen geschädigt werden und so zur Entwicklung von Subfertilität beitragen^{42,67,123}.

1.2.3 Spermatogenese, Spermiogenese, Spermienreifung

Mit dem Einsetzen der Pubertät beginnt im Hoden die Produktion der Spermien, die beim Menschen bis zu 64 Tage, beim Nagetier bis zu 48 Tage dauert^{35,145}. Die Keimzellen durchlaufen bis zum Erreichen des funktionsfähigen Spermiums drei wesentliche Stadien. Die mitotische Vermehrung der Stammzellen, die Meiose der Spermatozyten und die Entwicklung zum reifen Spermium.

Die Spermatogenese stellt hierbei die zelluläre Reifung der Keimzelle zur reifen Spermatozoe dar und findet im Tubulus seminiferi des Hodens statt. Zu Beginn steht die Urkeimzelle, die in der vierten Embryonalwoche im Dottersack entsteht und zur Gonadenanlage wandert. Ab diesem Zeitpunkt werden sie Spermatogonien genannt und verbleiben bis zum Einsetzen der Pubertät in einem inaktiven Zustand. Sie entwickeln sich weiter zu Typ A-Spermatogonien (Stammzellen), welche der Basalmembran anliegen, und Typ B-Spermatogonien, welche sich mitotisch zu Spermatozyten I. Ordnung teilen. Diese treten, die BHS nach luminal durchwandernd, in die Meiose I ein und entwickeln sich zu zwei haploiden Spermatozyten II. Ordnung. In der darauffolgenden Meiose II entwickeln sich aus einem Spermatozyten II. Ordnung je zwei haploide Spermotide. Am Ende der Spermatogenese steht die Spermiation. Hierbei handelt es sich um einen Prozess der Freilassung reifer Spermien aus den unterstützenden Zellstrukturen der Sertoli-Zellen ins Lumen des Tubulus seminiferus, wobei das überbleibende Zytoplasma der Spermotide (Restkörper) von den Sertoli-Zellen phagozytiert wird^{7,172,203,212,249}. Die Spermatogenese wird in der Histologie als ein zyklischer Prozess beschrieben, der beim Menschen in sechs (I-VI), bei der Maus in zwölf (I-XII) Stadien eingeteilt wird. Die Keimzellen entwickeln sich in konsistenten Gruppierungen, die als zelluläre Assoziationen bezeichnet werden⁷. Innerhalb dieser differenzieren die Keimzellen von den Typ A-Spermatogonien (I) basal gelegen zu den Spermotiden (VI) luminal gelegen in einer

geordneten Systematik^{7,174,223}. Während sich ein Tubulus (im Querschnitt betrachtet) bei der Maus in nur einer zellulären Assoziation befindet, sind im menschlichen Tubulus meist zwei bis vier zelluläre Assoziationen innerhalb eines Tubulus zu sehen^{7,122,223}.

In der Spermiogenese, welche ebenso im Hoden stattfindet, kommt es durch Kondensation des Zellkerns, Bildung des Akrosoms (durch Fusion der Lysosomen) und Ausbildung des Spermienschwanzes zur Ausreifung von runden Spermatiden zu reifen elongierten Spermien (Spermatozoen). Über den Ductus excretorius gelangen die Spermatozoen in den Nebenhoden^{12,17,45,54,203}. Sertoli-Zellen, in welchen die sich entwickelnde Keimzelle eingebettet ist und durch welche sie von äußeren Faktoren geschützt wird, sind somit essentiell für eine korrekt ablaufende Spermiogenese¹⁷².

Durch den Nebenhoden werden die Spermatozoen mit Hilfe der Kontraktion von Myofibroblasten weitertransportiert. Der Transit durch den gesamten Nebenhoden dauert beim Menschen ca. zwei bis sechs Tage und beim Nager zwischen acht bis zwölf Tagen^{42,196}. Während dieses Transports reifen die Spermatozoen weiter aus und erwerben die Fähigkeit der Motilität, die essentiell für eine erfolgreiche Befruchtung ist. Beim Verlassen des Hodens sind die Spermatozoen noch immobil, im Caput des Nebenhodens schwimmen sie bereits zirkulär während sie sich in der Cauda bereits kraftvoll geradeaus bewegen können, befruchtungsfähig sind und bis zur nächsten Ejakulation bzw. bis über mehrere Tage gespeichert werden können^{41,42,196}.

Reife Spermien bestehen aus einem Kopfteil und einem Schwanzteil, der sich in Hals, Mittel-, Haupt-, und Endstück gliedert. Im Kopf ist der Nukleus lokalisiert, welchem das Akrosom wie eine Kappe aufliegt. Das Akrosom beinhaltet für die Kontaktaufnahme mit der Eizelle essenzielle Enzyme wie z.B. Hyaluronidasen und Akrosin. Zentral im Schwanz gelegen befindet sich das aus Mikrotubuli bestehende Axonema, dessen Gleitbewegungen die Fortbewegung des Spermiums ermöglichen. Im Mittelstück sind für die Gewährleistung der Energieversorgung Mitochondrien lokalisiert^{12,204,241}.

1.2.4 Die männliche Reproduktion in Bezug auf T1DM

Wie in Kapitel 1.1.7 bereits beschrieben führt T1DM zu diversen Spätkomplikationen in verschiedenen Organen, darunter auch im Reproduktionstrakt. Bekannt ist, dass die Kontrolle des BZ im Sinne der Vermeidung von großen Schwankungen und dem Auftreten von Hyper- und Hypoglykämien einen großen Einfluss auf die sexuelle Funktionalität hat^{5,200,202,250}. Häufig zeigt sich eine Beeinflussung der Spermienfunktion und nicht zwingend der Spermienzahl. Eine große Bedeutung hat der Prozess der Spermienreifung, v.a. die Spermatogenese, welche direkt

vom Glukosemetabolismus abhängig ist⁵. Aus diesem Grund ist die Kontrolle der speziellen Mikroumgebung der Spermien und eine intakte BHS für eine adäquate Spermatogenese essenziell^{5,6,270}.

Der Zusammenhang zwischen T1DM und der männlichen Fertilität wurde sowohl in Tiermodellen als auch am Menschen untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass es zu einer Einschränkung der Fertilität auf verschiedenen Ebenen kommt. Zu diesen zählen Pathologien der Spermatogenese, degenerative sowie apoptotische Veränderungen der Hodenmorphologie, ein erhöhter Glukosemetabolismus in den Sertoli-Zellen, eine Reduktion der Testosteronsynthese- und -sekretion, erektile und ejakulatorische Dysfunktionen, eine reduzierte Libido und Impotenz^{4,5,128,211}. Zudem zeigen sich atrophische Veränderungen im Nebenhoden wie eine Reduktion der Spermatozoen die mit Zunahme von OS korreliert²¹⁸. Klinisch zeigten sich eine erhöhte Korrelation von T1DM mit erhöhten HbA1c-Werten einhergehend mit erektiler Dysfunktion²⁵⁰, einem verminderten sexuellen Antrieb und Befriedigung²⁰² sowie retrograder Ejakulation und verringerten Schwangerschaftsraten¹⁵⁶. Hodenmorphologische Veränderungen, die zu einer gestörten Spermatogenese beitragen, wurden durch mikroskopische Untersuchungen im Interstitium, der Wand und dem Epithel der Tubuli seminiferi lokalisiert. Zudem wurde eine Keimzellreduktion beobachtet³⁴. In Untersuchungen der Spermaparameter zeigen sich in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse. Es gibt Studien, die Änderungen bezüglich der Morphologie und Motilität der Spermien detektieren^{156,198,243}. Bei der Spermienanalyse von T1DM-Patienten konnte hierbei eine reduzierte Anzahl an beweglichen Spermatozoen und ein höherer Anteil an Spermatozoen mit reduziertem mitochondrialen Membranpotential (MMP), mit aktivierter Caspase 3 (ein essentielles Enzym der Apoptose), fragmentierter DNS und erhöhten ROS nachgewiesen werden^{2,105,139,198,198,242}. Es ist bekannt, dass MMP mit funktionalen Spermienparametern wie der Beweglichkeit und Befruchtungsfähigkeit korreliert⁸. Männer mit T1DM weisen im Vergleich zu Gesunden vermehrt Spermatozoen mit verminderter Qualität und eingeschränkter Beweglichkeit auf^{2,30,81,243}. Dies passt zu retrospektiven Kohortenstudien an 2819 Männern mit T1DM, welche aufwiesen, dass diese weniger Lebendgeburten zeugten²¹⁷. Holstein et al. konnten an einer Studie mit 333 männlichen Diabetikern (T1DM) aufzeigen, dass diese im Vergleich mit der Gesamtfruchtbarkeitsrate der deutschen Referenzbevölkerung signifikant weniger Kinder zeugten⁸⁶, sowie insgesamt mehr Paare bei denen der Mann an T1DM erkrankt war Fruchtbarkeitsbehandlungen aufsuchten und zu niedrigeren Schwangerschaftsraten führen¹⁵⁶. Widersprüchliche Ergebnisse zeigten sich bei anderen Forschungsgruppen, die keine Veränderungen in spermalen Parametern unter T1DM feststellen konnten. Allerdings wurden

in einigen dieser Studien ähnliche Veränderungen in der Mikrostruktur der Spermien beobachtet. Es wurde ein signifikanter Anstieg von AGEs und Lipidperoxidation in Samenplasma und Spermatozoen von an T1DM erkrankten Männern sowie eine reduzierte antioxidative Kapazität beschrieben^{97,105,173}.

Auch zeigt sich RAGE bei T1DM als signifikant erhöht und direkt mit erhöhter DNS-Fragmentierung in den Spermatozoen korreliert^{106,137}. RAGE wurde im Hoden, Caput des Nebenhodens (vor allem den Hauptzellen) und den Akrosomen der Spermien lokalisiert^{137,173}. Das AGE CML konnte im Epithel der Tubuli seminiferi, den Kernen der Spermatogonien und Spermatozyten, dem Zytoplasma der Basal- und Hauptzellen des Nebenhodens und im Schwanz, Mittelstück und Kopf der Spermien lokalisiert werden. Im Gegensatz zu RAGE zeigten sich bei CML keine signifikanten Unterschiede¹⁰⁵.

Da Veränderungen bezüglich der Reproduktionsfähigkeit bei T1DM auf molekularer Ebene zu vermuten sind, ist davon auszugehen dass sich Pathomechanismen der gehäuften Fälle von Subfertilität unter Menschen mit T1DM ebenfalls auf molekularer und regulatorischer Ebene abspielen^{2,139}. Basierend auf dieser Annahme ist es das Hauptziel dieser Arbeit, den Zusammenhang und die dahinterliegenden Mechanismen zu analysieren.

Ziele der Arbeit

In den vorangegangenen Kapiteln wurde hervorgehoben, dass eine Verbindung zwischen T1DM und einer reduzierten männlichen Fertilität besteht. Akkumulation von AGEs stehen dabei im klaren Zusammenhang mit Komplikationen unter T1DM. Daher ist die Hypothese dieser Arbeit, dass unter Hyperglykämie AGEs im männlichen Reproductionstrakt erhöht sind und dies die Fertilität negativ beeinflusst. Im Folgenden werden die Relevanz von Hyperglykämie auf die AGE-Entstehung und -Akkumulation sowie die Mechanismen und Signalkaskaden, die hinter der Interaktion von Ligand und RAGE stehen, im Detail untersucht. Hierfür wurden folgende Zielsetzungen anhand des *Ins2^{Akita+/-}* Mausmodells sowie der WL-3 Sertoli-Zelllinie analysiert.

1. Untersuchung von Glykierungsendprodukten im Hoden und Nebenhoden der *Ins2^{Akita+/-}* Maus
 - 1.1. Morphologische bzw. funktionelle Beurteilung des Reproductionstrakts des Hodens und Nebenhodens der *Ins2^{Akita+/-}* Maus
 - 1.2. Analyse der MG-Produktion im Hoden und Nebenhoden in der *Ins2^{Akita+/-}* Maus
 - 1.3. Lokalisation und Evaluierung der AGE-Entstehung, im speziellen CML sowie RAGE im Hoden und Nebenhoden der *Ins2^{Akita+/-}* Maus
 - 1.4. Untersuchung der Regulation der AGE/RAGE-Signalkaskaden (Cdc42, Akt1, ERK1/2) sowie der Aktivierung des T_fNf-κB im Hoden und Nebenhoden der *Ins2^{Akita+/-}* Maus
2. Dosis-Wirkungsbeziehung von Glukose und MG im Kulturmedium auf Funktionen der WL-3 Sertoli-Zelllinie
 - 2.1. Detektion von AGE und RAGE in der Sertoli-Zelllinie sowie Untersuchung von Signalkaskaden in Anwesenheit von unterschiedlichen Glukosekonzentrationen

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen Aufschluss über die Relevanz von Glykierungsendprodukten, deren Rezeptorinteraktion und der dadurch aktivierten Signalkaskaden bei durch Hyperglykämie induzierter männlicher Subfertilität geben.

2 Material und Methoden

Mit dem Ziel den Einfluss von Hyperglykämien auf die Entstehung und die Signalkaskaden von Glykierungsendprodukten und dessen Wirkung auf den männlichen Reproduktionstrakt zu untersuchen, wurden sowohl Experimente an der heterozygoten *Ins2*^{Akita+/-} Maus sowie an einer WL-3 Sertoli-Zelllinie durchgeführt. Das folgende Kapitel beschreibt das verwendete Tiermodell, die Zelllinie und Methoden. Im Anhang (Kapitel 11.1) ist eine Übersicht der verwendeten Materialien gelistet.

2.1 Verarbeitungen der Gewebeproben

Die Arbeitsgruppe (AG) von Prof. Hammes (Universität Heidelberg/Mannheim) stellte für diese Arbeit freundlicherweise *Ins2*^{Akita+/-} Mäuse zur Verfügung, welche dort bereits seit über 30 Generationen auf C57BI7/6J-Hintergrund und unter ständiger Kontrolle des BZ gezüchtet wurden. Die AG erwarb die *Ins2*^{Akita+/-} Maus ursprünglich vom Jackson Labor (Charles River Laboratories, Deutschland) und züchtete diese in der Tierhaltungsanlage des Universitätsklinikums Heidelberg/Mannheim weiter²⁵¹. Bereits im Alter von acht Wo. zeigen ca. 50% eine dauerhafte Elevation des BZ von über 14,0 mmol/l und fallen somit unter die Klassifikation des insulinpflichtigen DM⁶⁵. Zur Vermeidung einer diabetischen Ketoazidose wurde ihnen gelegentlich subcutan Insulin verabreicht.

Als phänotypische Kontrolle wurden nicht-diabetische (n.d.) *Ins2*^{Akita+/-} Mäuse verwendet, welche einen permanenten BZ-Spiegel unter 14,0 mMol (mM)/l aufwiesen.

Die Mäuse wurden gemäß den Regulationen der deutschen Tierschutz- und haltungsmaßnahmen des Baden-Württembergischen Regierungspräsidiums Karlsruhe (Deutschland) und unter Zustimmung der Ethikkommission im Tierversuchslabor der Universitätsklinik Mannheim/Heidelberg gehalten¹⁶³. Sie wurden in Gruppengrößen von drei bis vier Tieren in Typ II Macrolon Käfigen bei einer Raumtemperatur (RT) von 21 ± 1 °C und einem Tag-Nacht-Zyklus von je 12 Std. mit ad libitum Zugang zu Essen und Wasser gehalten.

Die Tötung der Tiere erfolgte, unter intraperitonealer Gabe des Anästhetikums Ketamin (75 mg/kg KG) und dem Beruhigungsmittel Xylazin (10 mg/kg KG), durch zervikale Dislokation. Ca. 0,5 ml Blut wurden durch kardiale Punktion gewonnen, mit EDTA vermischt und bei -20 °C aufbewahrt. Hieraus konnte der relative HbA1c mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie eruiert werden. Der BZ wurde über das Accu-Check Aviva Messgerät detektiert²⁵². Das Abdomen wurde eröffnet und der Hoden sowie Nebenhoden entnommen. Meist wurde ein Organ für die Immunhistochemie gewonnen. Hierfür in

Caput/Corpus- und Caudaregion aufgeteilt, während das andere Organ, für die Protein- und Genanalysen, in Flüssigstickstoff schockgefroren wurde (Kapitel 2.1.1, 2.3 und 2.5).

2.1.1 Bestimmung des Methylglyoxalanteils in Hoden und Nebenhoden durch Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS)

In Kooperation mit der AG von Prof. Nawroth (Universitätsklinikum Heidelberg, Deutschland)¹⁶⁴ wurden dankenswerterweise in Heidelberg nach der von Rabbani N und Thornalley PJ entwickelten Methode der LC-MS/MS¹⁸⁹, Messungen der MG-Konzentration durchgeführt. Im Vergleich mit physiologischen Proben wurden die MG-Konzentrationen in Hoden- und Nebenhoden von 12 und 24 Wo. alten *Ins2^{Akita+/-}* Mäusen bestimmt. Mithilfe dieses innovativen Detektionsverfahrens, in dem unterschiedliche Massenspektrometer-Einheiten hintereinandergeschaltet werden, können Moleküle im ng/L Bereich erfasst werden⁶⁸. Die Verknüpfung mit einem Trennsystem, hier der Flüssigchromatographie (LC), ermöglicht die schnelle Detektion und Quantifizierung von sowohl reinen Stoffen als auch Stoffgemischen. An erster Position (MS) wird das Stoffgemisch über die Ionen selektiert, abgetrennt und im weiteren Verlauf der MS in immer spezifischere Fragmente gespalten^{90,99}. Die Methode wird im Detail in „Measurement of methylglyoxal by stable isotopic dilution analysis LC-MS/MS with corroborative prediction in physiological samples“ von Naila Rabbani und Paul J Thornalley beschrieben¹⁸⁹.

2.2 Zellkultur

Alle im Folgenden genannten Zellkulturexperimente wurden unter einer durch min. 1 Std. Bestrahlung mit UV-Licht sterilisierten und desinfizierten Zellkulturbank und unter Benutzung von Handschuhen durchgeführt.

2.2.1 WL-3 Zelllinie

Die WL-3 Zellen, ursprünglich von Mueller und Korach etabliert, wurden der AG Prof. Linn freundlicherweise von Dr. Lutz Konrad (Gießen, Deutschland) zur Verfügung gestellt¹⁵⁵. Die Zellen wurden im Kulturmedium (siehe Anhang 11.1.3) kultiviert und zum Wachsen, sofern nicht anders beschrieben bei 37 °C in 5% CO₂ im Inkubator gelagert. Das Medium wurde vor Beginn jedes Experiments gewechselt und während der Dauer des Experiments nicht ausgetauscht. Die Überlebensfähigkeit der Zellen wurde mit Trypan-Blau-Färbungen eruiert

und lag stets über 80%. Alle Expositionsexperimente wurden sowohl technisch als Triplikate als auch insgesamt mindestens dreifach durchgeführt.

2.2.1.1 Auftauen der Zellen

Zellen wurden aus einem Flüssigstickstoffcontainer entnommen und im Stickstoffbehälter zur Zellkulturbank transportiert. Sie wurden im Wasserbad bei 40 °C geschwenkt bis sich die Zellen von der Wand ablösten und anschließend in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Es wurden tropfenweise 10 ml Kulturmedium hinzupipettiert (Pipettus-Akku) und bei 22 °C und 1200 Upm. für 4 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen abgeklopft und mit 5 ml Medium gemischt. Schließlich wurden sie in eine Zellkulturflasche (T175) mit 35 ml Medium resuspendiert und inkubiert.

2.2.1.2 Teilung und Umsetzen der Zellen

Um die Zellen zu teilen oder umzusetzen, wurde das Medium aus der Zellkulturflasche abgenommen, verworfen und die Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Mit Trypsin und der gleichen Menge an Medium wurden die Zellen für ca. 3 Min. im Inkubator gelockert. Das Ablösen der Zellen wurde mikroskopisch geprüft. Die Zell-Medium-Suspension wurde in 50 ml Blue-Cap überführt und für 4 Min. bei 22 °C und 1200 Upm. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen durch Klopfen gelockert und mit Medium gemischt. Je nach Teilung wurde ein Anteil in eine, bereits mit 35 ml Medium gefüllte neue Zellkulturflasche gegeben. In der WL-3 Sertoli-Zellkultur wurde das Medium jeden zweiten Wochentag gewechselt und die Zellen zunächst dienstags. und freitags. Im Verhältnis 1:10, im Verlauf nur noch 1:50 geteilt.

2.2.1.3 Kryokonservierung von Sertoli-Zellen

Für die Langzeitlagerung wurden die Sertoli-Zellen in 90% FBS (steril filtriert) und 10% Dimethylsulfoxidin (DMSO) kryokonserviert. Hierfür wurde zunächst das Medium abpipettiert, die Zellen mit Trypsin abgelöst, in Zentrifugenröhrchen überführt und für 4 Min. bei 1200 Upm. und 22 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet durch Abklopfen gelöst. Dann wurden die Zellen auf Eis in Kryoeinfrieröhrchen gegeben und zunächst für 20 Min. im Kühlschrank (auf Eis) inkubiert, dann für 1 Std. bei -20 °C (ohne Eis) und schließlich über Nacht bei -80 °C eingefroren, um dann im Stickstoffcontainer gelagert zu werden.

2.2.1.4 Wachsen der Sertoli-Zellen auf Objektträgern

Die Objektträger wurden für 1 Std. in hundertprozentigen Alkohol gelegt und anschließend inkl. Objektträgerbox unter UV-Licht getrocknet. Es wurden $0,75 \times 10^6$ Zellen/ml in 3 ml Kulturmedium ausgesät und für 24 Std. inkubiert. Nach 24 Std. wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit glukosefreiem Medium gewaschen und mit dem Medium der entsprechenden Glukosekonzentration von 15 mM für 24 Std. behandelt (siehe Kapitel 2.2.1.5). Nach 24-stündiger Behandlung wurden die Objektträger luftgetrocknet und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ lichtgeschützt verstaut.

2.2.1.5 Behandlungen mit Glukose

Die im Folgenden genannten Experimente wurden in 6-Wellplatten in jeweils drei technischen Replikaten durchgeführt. Die Zellen wurden mit einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml für qRT-PCR Analysen bzw. mit einer Dichte von $0,75 \times 10^6$ Zellen für die LC-MS/MS ausgesät und über Nacht kultiviert. Für die Experimente wurden die Zellen zunächst im Kulturmedium kultiviert, um dann mit unterschiedlich angesetzten Konzentrationen (Tabelle 1) von Glukose (angesetzt in Glukosefreiem Medium (siehe Kapitel 11.1.3)) behandelt zu werden. Eine Stammlösung von 100 mM wurde für weitere Verdünnungen genutzt. Die Zellen wie auch Überstände wurden nach 1, 3, 6, 12, 24, 48, bzw. 72 Std. abgenommen. Auf die weitere Verarbeitung der Zellproben und Medien wird im Kapitel 2.2.1.6 bzw. 2.5.1 eingegangen, da diese sich je nach Verwendungszweck unterscheidet.

Tabelle 1: Pipettierschema zur Dosis-Wirkungs-Behandlung mit Glukose

Gewünschte Glukosekonzentration (mM)	Glukosefreies Medium (μl)	Glukose Stock (2 M) (μl)
,5	6980,75	19,25
10	6965	35
15	6947,5	52,5
25	6912,5	87,5
50	6825	175
100	6650	350

2.2.1.6 **Behandlung mit MG**

Für die Behandlung der WL-3 Zellen mit MG wurde zunächst die Dichte mittels des JuLI™ Br Cell Counting Module (Nano-Entek, Seoul, Korea) gemessen, um zu eruieren, wann die Zellen ca. 70% konfluent waren, um eine optimale Evaluation des MTT-Test erreichen zu können. Die Konfluenzbestimmung der Sertoli-Zellen wurde in 96-Wellplatten nach je 24, 48, 72 und 96 Std. bei einer Exposition von 10% und einer Helligkeit von 17 in je achtfacher Bestimmung und Triplikaten durchgeführt. Hierbei wurde das Medium nach 48 Std. gewechselt. Für 24 Std. wurden die Zellen mit den in Tabelle 2 dargestellten Konzentrationen an MG behandelt. Am Ende der Behandlungszeit wurden die Platten umgehend auf Eis gestellt und 500 μ l des Überstandes in einen 2 ml Eppendorftube gegeben und für 4 Min. bei 2000 Upm. und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein frisches 1,5 ml Eppendorftube gegeben und bei -80 °C eingefroren. Die in der Wellplatte verbleibenden Zellen wurden einmalig mit PBS gewaschen und anschließend mit 300 μ l Trypsin gelöst. 1,2 ml glukosefreies Medium wurde hinzugefügt, die Zellsuspension in ein 2 ml Tube überführt und für 4 Min. bei 2000 Upm. und bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, dem Zellpellet 1 ml PBS hinzugeben und erneut für 4 Min. bei 2000 Upm. und 4 °C zentrifugiert. Nun wurde der Überstand komplett entnommen und bei -80 °C bis zur Analyse eingefroren. Die Messung des entstandenen MGs erfolgte nach der im Kapitel 2.1.1 beschriebenen LC-MS/MS-Methode in Heidelberg (AG Prof. Nawroth) durch Dr. Fleming.

2.2.1.7 **MTT-Test und Bestimmung der Konfluenz der Sertoli-Zellen**

Bei dem MTT-Protokoll handelt es sich um eine Evaluierung der lebensfähigen Zellen, welche mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromid durchgeführt wird. Die mitochondriale Dehydrogenase von lebensfähigen Zellen ist in der Lage, den Tetrazoliumring unter der Entstehung von wasserunlöslichen purpurfarbenen Formazankristallen zu spalten. Die Zellen wurden hierfür lysiert und die Kristalle mittels DMSO gelöst. Über einen Microplattenleser kann die purpurne Probenlösung quantitativ bestimmt werden und weist so das Toxizitätsmaß der Zellen für die jeweilige Substanz (hier MG in 40% H₂O) auf.

Am ersten Versuchstag wurden in einer 96-Wellplatte 4000 Zellen/200 μ l (20000 Zellen/ml) in Kulturmedium (je 200 μ l Zellen + Medium) ausgesät und über Nacht inkubiert, um nach 72 Std. eine Zelldichte von 70% zu erreichen. Am zweiten Versuchstag wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS (200 μ l) gewaschen. Es wurde zunächst das 100 μ l Kulturmedium und schließlich 100 μ l der vorbereiteten Kontroll- bzw. MG-Medien (Tabelle

2) in die jeweiligen Wells pipettiert, die Platte vorsichtig gemischt und für weitere 48 Std. in den Inkubator gestellt.

Tabelle 2: Pipettierschema zur Dosis-Wirkungs-Behandlung mit MG

Konz. der Lösung (mM)	Stocklsg. (μl)	Medium (μl)	a.d. (μl)	Benötigte Gesamtmenge (ml)	a.d. aus VV (μl)	a.d. für Gesamtmenge (μl)	Endkonz. im Test (mM)
20	14,41	3980	5,59	4	14,41	20	10
Weiterverdünnungen mit der 20 mM MG-Vorverdünnung							
10	500	497,5	2,5	1	2,5	5	5
8	400	597	3	1	2	5	4
7	350	646,75	3,25	1	1,75	5	3,5
6	300	696,5	3,5	1	1,5	5	3
5	250	746,25	3,75	1	1,25	5	2,5
4	200	796	4	1	1	5	2
3	150	845,75	4,25	1	0,75	5	1,5
2	250	2238,75	11,25	2,5	1,25	12,5	1
1,5	150	1840,75	9,25	2	0,75	10	0,75
1	50	945,25	4,75	1	0,25	5	0,5
Weiterverdünnungen mit der 2 mM MG-Vorverdünnung							
800	400	597	3	1	2	5	400
600	300	696,5	3,5	1	1,5	5	300
400	200	796	4	1	1	5	200
200	150	1343,25	6,75	1,5	0,75	7,5	100
Weiterverdünnungen mit der 200 μM MG-Vorverdünnung							
2	15	1477,575	7,425	1,5	0,075	7,5	1
1,5	7,5	987,5375	4,9625	1	0,0375	5	0,75
1	5	990,025	4,975	1	0,025	5	0,5
Weiterverdünnungen mit der 2 μM MG-Vorverdünnung							
200	100	895,5	4,5	1	0,5	5	100
Herstellen des Kontrollmediums ohne MG							
0		3980	20	4	-	20	0

Am Versuchstag 4 (nach 72 Std.) wurde zunächst das MTT (Sigma, M5655) in PBS in einer Konzentration von 2 mg/ml angesetzt (hier 12 mg MTT in 12 ml PBS) und schließlich,

ohne Abnahme des Mediums, je 50 μ l MTT-Lösung in jedes Well gegeben und für 3,5 Std. inkubiert. Im weiteren Verlauf wurde das Medium inkl. MTT von den Platten abgekippt und auf Papier ausgeklopft. 200 μ l DMSO wurden in jedes Well gegeben, die Platten mit Alufolie bedeckt sowie für 1 Std. bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Absorption mittels Mikroplatten-Leser (Mithras LB 940, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) bei 570 nm (mit Referenzfilter von 620 nm und ohne Filter) sowie bei 620 nm gemessen und die Ergebnisse mit Hilfe von MS Excel 2013® für Windows® ausgewertet.

2.2.1.8 Apoptosedetektion mit Hilfe der Durchflusszytometrie FACS

Um zu analysieren, ob die Zellen durch die Behandlung mit MG in Apoptose oder Zellarrest gehen, wurde dem MTT-Test der MG-Konzentrationen von 1, 250, 400 μ M eine FACS (fluorescence-activated cell sorting) der Proteine Annexin V FITC und Propidium Iodine (PI)– (Sigma P-4170) angeschlossen. Diese Untersuchung wurde von Dr. Maresch (wissenschaftliche Mitarbeiterin der AG Prof. Linn, Gießen) vorbereitet und durchgeführt.

Hierfür wurde zunächst der 1x Bindepuffer mit sterilem H₂O vorbereitet und die PI-Stammlösung 1:6 mit sterilem H₂O verdünnt. Es wurden 15 ml Tubes für jede Probe vorbereitet und die Überstände eingesammelt. Zellen wurden mit 1 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden für 3 Min. im Inkubator mit je 200 μ l Trypsin gelöst und anschließend 2 ml Kulturmedium zur Inaktivierung des Trypsins hinzugefügt. Die Probenlösung wurde ins Tube gegeben und der Restbestand mit PBS gewaschen und im Tube gesammelt. Die Suspension wurde bei 1200 Upm. bei 4 °C und für 4 Min. zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit PBS gewaschen. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Das Zellpellet wurde schließlich in 200 μ l 1x Annexin-V Bindepuffer heraussuspendiert. Für die Kontrollprobe wurden je 4 Tubes (Zell Blank, Zellen mit Annexin V, Zellen mit PI und Zellen mit Annexin V plus PI) für alle weiteren Proben 1 Tube mit je 50 μ l Suspension vorbereitet. Zum entsprechenden Tube wurden 2,5 μ l Annexin V FITC gegeben, gemischt und für 10 Min. in Dunkelheit und bei RT inkubiert. Dann wurden erst 250 μ l 1x Bindepuffer hinzu gemischt und schließlich 2,5 μ l PI. Anschließend erfolgte die Analyse mit dem BD FACSCalibur™ (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) und die Zellphänotypisierung (siehe Abbildung 11) mittels Cell Quest Pro. Hieraus wurden die im jeweiligen Fenster erfassten (% Gated) über MS Excel 2013® für Windows® der doppelt positiven Zellen (UR in Tabelle 3 und D in Abbildung 11) ausgewertet. Pro Durchlauf wurden jeweils 10000 Zellen gezählt.

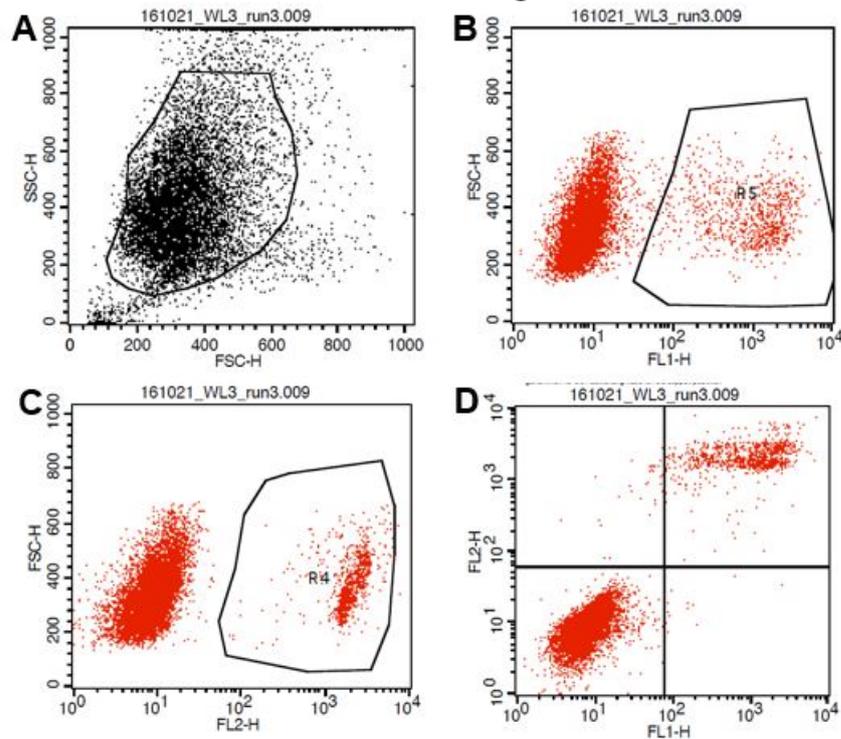


Abbildung 11: Auswertung der Phänotypisierung über Cell Quest Pro

In A wurde die zu bewertende Zellpopulation festgelegt. Während B die Annexin V positiven Zellen aufweist, sind in C die PI positiven Zellen und in D die doppelt positiven Zellen erfasst.

Tabelle 3: Übersicht über die Auswertung der FACS-Analyse über Cell Quest Pro

Quad	Event	% Gated	% Total
OL	31	0,35	0,31
OR	844	9,61	8,44
UL	7897	89,89	78,97
UR	12	0,15	0,13

OL = Oben links, OR = Oben rechts, UL = unten links (Gesamtzahl der lebenden Zellen), UR = Unten rechts, Event entspricht Anzahl der Zellen, die in Gate erfasst wurden, % gated entspricht prozentualen Anteil der Zellen, welche sich im jeweiligen Gate befanden

2.2.1.9 Toxizitätstest für Glukose

Nach dem in Kapitel 2.2.1.7 beschriebenen Vorgehen wurde von Dr. Maresch ein Toxizitätstest mit Glukose in den Konzentrationen von 50 μ M – 500 mM an den WL-3 Sertoli-Zellen (0,25

* 10^6 Zellen/ml) durchgeführt. Das MTT wurde für 4 Std. inkubiert und anschließend mit je $100 \mu\text{l}$ SDS-HCL (Natriumdodecylsulfat-Salzsäure)-Lösung weitere 4 Std. inkubiert, um dann mit einem Filter von 570 nm über den Mikroplatten-Leser gemessen zu werden.

2.2.1.10 MG-Bestimmung

Die Messung des entstandenen MGs erfolgte nach der in Kapitel 2.1.1 erklärten LC-MS/MS-Methode in Heidelberg (AG Prof. Nawroth) durch Dr. Fleming¹⁶⁴. In der in Kapitel 2.1.1 genannten Publikation wird die differente Vorbereitung des Mediums (je ca. $20 \mu\text{l}$) und der kultivierten Zellen als trockenes Zellpellet (ca. 1×10^6 Zellen) für die LC-MS/MS beschrieben¹⁸⁹.

2.2.1.11 Bestimmung des entstandenen D-Lactats und der Glyoxalase I-Aktivität

D-Lactate stellen die stabilen Endprodukte des Glyoxalase-Stoffwechsels dar und können mit einer enzymatischen Endpunkt-Fluoreszenz-Analyse mit Hilfe der D-Lactatdehydrogenase (D-LDH) bestimmt werden. Diese Messungen fanden nach einem modifizierten Protokoll von Phillips et al. in Heidelberg (AG. Prof. Nawroth) statt^{165,183}. Hierbei kommt es zur folgenden Reaktion, welche durch D-LDH katalysiert wird.



Bei einem physiologischen pH liegt die Lactat-Pyruvat-Balance auf Seiten des Lactats. Wird jedoch sowohl ein hoher pH als auch eine hohe Konzentration an NAD und Hydrazin eingestellt, so ist es möglich, das Reaktionsgleichgewicht auf die Seite des Pyruvats zu verlagern. Unter diesen Bedingungen reduziert D-Lactat in einem stöchiometrischen Verhältnis NAD zu NADH und das Ausmaß der D-Lactat-Änderung kann bei 340 nm detektiert werden¹⁸³.

GLO-1 katalysiert die Reaktion der Umwandlung von Hemithioacetal, welches durch eine nicht-enzymatische Reaktion aus MG und dem reduziertem Gluthation entsteht (Abbildung 12). Nachdem der Zellprobe Hemithioacetal (welches durch Preinkubation von MG und GSH entsteht) hinzugefügt wurde, kann die Aktivität der GLO-1 über den initialen Anstieg der Absorption bei 235 nm spektrophotometrisch gemessen werden. Für die Umwandlung des Hemithioacetals in S-D-Lactoylglutathion ist die Änderung der molare Extinktionskoeffizient $\Delta\epsilon_{235} = 1,07 \text{ mM}^{-1} \text{ c}$ entscheidend. Die GLO-1-Aktivität wird in Units pro Zellzahl angegeben, wobei eine Unit der Enzymmenge entspricht, die unter Testbedingungen die Bildung von $1 \mu\text{mol}$ S-D-Lactoylglutathion pro Min. katalysiert¹⁰. Folgende Messungen

wurden nach einem modifizierten Protokoll von Arai et al. in Heidelberg (AG. Prof. Nawroth) durchgeführt^{10,166}.

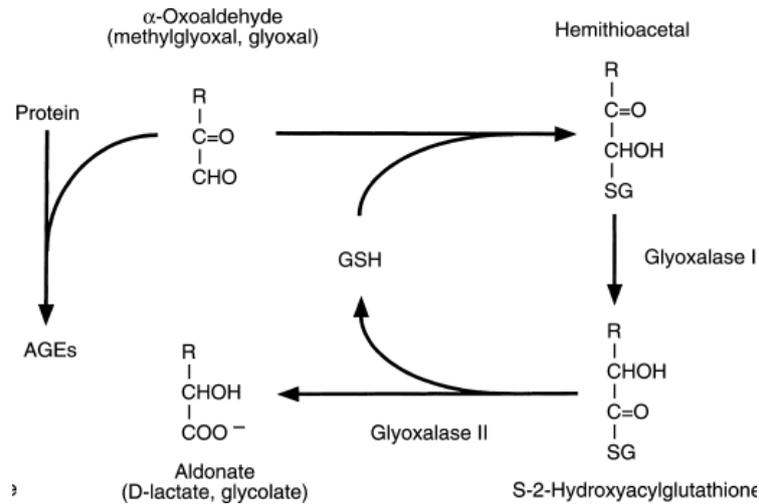


Abbildung 12: Darstellung der chemischen Reaktionen des Abbaus von Methylglyoxal über die Enzyme Glyoxalase I und II und unter der Verwendung des Substrats Glutathion (GSH)¹⁶⁰

Für die Bestimmung des entstandenen D-Lactats und die Messung der GLO-1-Aktivität wurden die Sertoli-Zellen für je 1 und 24 Std. mit unterschiedlichen Konzentrationen an Glukose (5,5, 10, 15, 25, 50,100 mM) (Kapitel 2.2.1.5) und MG (Kapitel 2.2.1.6) behandelt, wobei jeweils ca. 1×10^6 Zellen in jedes Well einer 6-Wellplatte gegeben wurden. Das Medium wurde von den Zellen entnommen und bei 1200 Upm. für 10 Min. bei 4 °C zentrifugiert, um jegliche zellulären Reste zu entfernen. Hiervon wurden je 200 μ l entnommen und für weitere Analysen bei -80 °C gelagert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, trypsinisiert und bei 1200 Upm. für 10 Min. bei 4 °C zentrifugiert und in 1 ml PBS resuspendiert. Ein Aliquot von 10 μ l wurde abpipettiert. Das PBS wurde vorsichtig vom Zellpellet abpipettiert und die Zellen als trockenes Pellet bei -80 °C gelagert.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration aus 10 μ l des Überstands wurde über einen Bradford-Assay von der AG Prof. Nawroth durch Dr. Fleming in Heidelberg durchgeführt^{10,183}.

2.3 Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Um die Expression von Genen in Zellen und Geweben zu quantifizieren, wurde die quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) verwendet. Hierbei handelt es

sich um ein Verfahren, bei dem RNS, über den Zwischenschritt der DNS-Generierung, vervielfältigt werden kann.

2.3.1 Grundsatz der qRT-PCR Methode

Aus nur einer Kopie einer spezifischen Gensequenz ermöglicht die RT-PCR eine exponentielle Erstellung von komplementärer DNS (cDNS)-Kopien¹³. Da Polymerasen, die herkömmlicherweise für PCR genutzt wurden, keine RNS-Bruchstücke amplifizieren können, etablierten Higuchi et al. 1993 ein Verfahren, in dem eine reverse Transkriptase zunächst Ribonukleinsäure (RNS) in cDNS umschreibt, welche in den anschließenden Zyklen als cDNS in der PCR vervielfältigt werden können. Hierfür benötigt die reverse Transkriptase einen Primer, meist in Form eines Oligo-dT-Nukleotides. Um Produkte der RT-PCR quantifizieren zu können, werden Doppelstrang (ds) DNS-interkalierende Farbstoffe, im Fall der vorliegenden Arbeit SYBR® Green 1, genutzt. Sofern SYBR® Green an die Doppelstrang-DNS (dsDNS) der PCR-Produkte bindet, kommt es zur Ausstrahlung von Licht. Bei Akkumulation der PCR-Produkte nimmt die Intensität der Fluoreszenz zu²⁰⁵. Am Ende des Elongationsschrittes werden in jedem Zyklus Fluoreszenzmessungen durchgeführt, um die Zunahme an amplifizierter DNS zu bestimmen¹³.

2.3.2 RNS-Isolation

Verwendet wurde das RNeasy Mini Kit von QIAGEN (QIAGEN Hilden (Düsseldorf, Deutschland) gemäß den Instruktionen des Herstellers, um totale RNS aus den kultivierten WL-3 Zellen sowie Hoden und Nebenhoden der *Ins2*^{Akitas+/-} zu gewinnen und aufzubereiten.

2.3.2.1 Probenaufbereitungen für RNS-Analysen

Kultivierte Zellen wurden mit je 1 ml RLT-Puffer, versetzt mit 1% β -Mercaptoethanol, geerntet, anschließend in 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Schockgefrorene Hoden (je ein Hoden pro Tier) wurden in je 1 ml RLT-Puffer (pro 1 ml mit 10 μ l β -Mercaptoethanol versetzt) homogenisiert. Der Homogenisator wurde in jedem Zwischenschritt mit RNase-freiem Wasser und 70% Ethanol sterilisiert. Das homogenisierte Gewebe wurde bei 13000 Upm. für 10 Min. zentrifugiert und der Überstand in ein neues Zentrifugationsröhrchen gegeben. Dieser Schritt wurde wiederholt bis der Überstand klar war.

Zu 350 μl des Zell- oder Gewebelysats wurden 350 μl 70% Ethanol in einem 2 ml Kollektionsröhrchen hinzugegeben und vermischt. Die 700 μl wurden in eine RNeasy Mini Spin Column (Spinsäule) gegeben und für 1 Min. bei 13000 Upm. zentrifugiert. Die durch die Säule durchgeflossene Flüssigkeit wurde verworfen, 500 μl des RW1-Puffers auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, 500 μl RPE-Puffer hinzugefügt und zentrifugiert. Nach Verwerfung des Durchflusses wurde die Probe mit 500 μl 80% Ethanol gewaschen und zentrifugiert. Nach diesem Schritt wurde die Spinsäule in ein frisches 1,5 ml Kollektionstube platziert, 20 μl RNase-freies Wasser hinzugefügt und für 2 Min. bei 13000 Upm zentrifugiert. Im 1,5 ml Kollektionstube befand sich nun die aufgereinigte RNS, welche bis zur Translation in cDNS bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ verwahrt wurde.

Zur RNS-Isolation von Nebenhoden wurde das Gewebe mit 1 ml QIAzol-Lysis-Reagenz homogenisiert. Die weitere RNS-Isolation erfolgte gemäß den Anweisungen des Herstellers des RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN Hilden, Düsseldorf, Deutschland).

2.3.3 Translation in cDNS

Bevor die RNS in cDNS translatiert werden konnte, wurde der Gehalt und die Reinheit (260/280 Ratio $> 1,5$ und 260/230 Ratio (RNS/DNS-Anteil) $> 1,5$) der RNS mit einem Spectrophotometer (Spectrometer NanoDrop 1000, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) bestimmt. Hierbei wurde für jede Probe eine Doppelbestimmung durchgeführt und ein Mittelwert (MW) gebildet. Um 1 μg RNS zu erhalten, wurde das für den weiteren Prozess benötigte Volumen von 8 μl wie folgt berechnet:

$$\text{Menge der Probe (1}\mu\text{g RNS)} = \frac{1000}{\text{MW der Spectrophotometermessung } \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}\right)}$$

$$\text{Menge des RNase – freien Wassers } (\mu\text{l}) = 8 - \text{Menge der Probe (1}\mu\text{g RNS)}$$

Probe und Wasser wurden in einem 200 μl PCR-Reaktionsröhrchen vermischt. Für die Gewinnung von cDNS wurde 1 μg der totalen RNS unter der Benutzung von Superskript III VILO-Kit umgekehrt transkribiert und eine 20 μl Reaktionslösung gewonnen.

Zu dem RNS-Wassergemisch wurde 1 μl DNase I Reaktionspuffer und 1 μl DNase I Amplifikationsgrade gegeben und für 8 Sek. bei 13000 Upm. zentrifugiert. Die weiteren Schritte wurden mit einem Thermocycler durchgeführt. Die Aufarbeitung der DNS fand bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ innerhalb von 15 Min. statt. Anschließend wurde 1 μl 25 mM EDTA zur Probe gegeben und

für 8 Sek. bei 13000 Upm. zentrifugiert. Daraufhin wurden die Proben für 25 Min. bei 65 °C inkubiert. Zum Schluss wurde der Mastermix (siehe Kapitel 11.1.2) zur Probe addiert und erneut zentrifugiert. Nun fand bei 50 °C für 50 Min. sowie für weitere 15 Min. bei 72 °C die reverse Transkription statt. Die Produkte der PCR wurden schließlich im Verhältnis 1:20 in einem 0,5 µl PCR-Reaktionsröhrchen verdünnt (20 µl cDNS + 380 µl RNase-freiem Wasser).

2.3.4 Überprüfung und Ansetzen der Primer

Die Auswahl der Primer fand unter Hinzunahme von Primer3 und BLAST statt. Hierbei handelt es sich um Programme, die Primer spezifisch zur PCR-Sequenz, ihrer Primerpaarspezifität und in Hinsicht auf die ausgewählte Datenbank selektieren¹⁶².

Die Primer wurden 10-fach zum molekularen Gewicht mit RNase-freiem Wasser verdünnt, gevortext und für 10 Min. inkubiert. Daraufhin wurden gleiche Mengen des Vorwärts- und Rückwärtsprimers in ein frisches Zentrifugationsröhrchen gegeben, sodass ein 1:1 Primer-Gemisch entstand. Schließlich wurde eine 1:10-Verdünnung aus 40 µl des 1:1 Primer-Gemischs und 360 µl RNase-freiem Wassers hergestellt. Die Effizienz der Primer wurde aus der Steigung einer Standardkurve ermittelt, welche aus verschiedenen Verdünnungsschritten (1:5; 1:10; 1:15; 1:20) von 1 µg RNS eines 24 Wo. alten Hodens einer C57Bl/6J Maus generiert wurde. Die Logarithmen jeder Konzentration (in dem Fall -0,70; -1,00; -1,18; -1,30) wurden gegen den Ct-Wert der jeweiligen Konzentration aufgezeichnet. Die Steigung der daraus resultierten Standardkurve wurde abgeleitet und für die Berechnung der Primer-Effizienz nach der im Folgenden gezeigten Formel verwendet²⁶.

$$\text{Effizienz (\%)} = \left(10 - \left(\frac{1}{\text{Steigung}} \right) - 1 \right) \times 100$$

Im Anhang aufgeführt (11.1.7) wird die Effizienz der in der Arbeit genutzten Primer und deren Sequenzen.

2.3.5 qRT-PCR

Für die qRT-PCR-Analysen wurde der IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) im StepOnePlus Realtime Polymerase-Kettenreaktionssystem (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) für die Durchführung der Realtime-PCR-Amplifikation verwendet. In jedem Well der 96-Wellplatte wurden 5 µl SYBR Green, 3,2 µl RNase-freies Wasser, 0,3 µl Primer (Vorwärts- und Rückwärtssequenz enthaltend) und 1,5 µl der jeweiligen cDNS gegeben. Der erste Zyklus dauerte 10 Min. bei 95 °C, gefolgt von 40 Zyklen bei 95 °C, für 15 Sek., 60 °C für 30 Sek und 72 °C für 30 Sek. Nach der Amplifikation

wurde eine Schmelzpunktkurvenanalyse durchgeführt, um die Spezifität der Produkte zu prüfen. Sie wurde unter 95 °C für 30 Sek., 60 °C für 30 Sek., gefolgt von 80 Zyklen bei 60 °C für je 10 Sek. generiert. Die Bestimmung der Expression der Gene wurde stets als Triplikat-Messung vollzogen. Das PCR-Signal der Zielgene wurde in Bezug auf die geometrischen MW zweier Referenzgene (*β-Actin* und *Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA)*) normalisiert. Zudem wurde die Expression der Zielgene durch die relative Quantifizierung über die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode ausgewertet²⁶.

2.3.6 Berechnung der qRT-PCR Daten

Für die Auswertung wurden die Expressionsdaten in einer Excelübersichtstabelle (Tabelle 13 im Anhang 11.2) sortiert. Es wurden für den Hoden 7-9 (12 Wo. n.d. = 8, 24 Wo. n.d. = 7, 12 Wo. d. = 9, 24 Wo. d. = 9) für den Nebenhoden 3-9 (12 Wo. n.d. = 7, 24 n.d. = 3, 12 Wo. d. = 8, 24 Wo. d. = 9) Organe und für die Zellversuchsreihen 5 biologische Replikate untersucht, welche jeweils als dreifache technische Replikate durchgeführt wurden.

Die Ct-Werte der Referenz- und Zielgene wurden in Bezug auf jede Probe (Gewebe und Zellen) aus Triplikaten und deren geometrischen MW erfasst. Der ΔCt -Wert ergab sich aus der Subtraktion des Ct-MW der Referenzgene (*β-Actin* und *PPIA*) von dem Ct-MW der Zielgene. Dieser wurde pro Probe/Tier berechnet. Weiterhin wurde der ΔCt -MW der Kontrollgruppe (im Falle des Gewebes n.d. *Ins2^{Akitas+/-}*) errechnet, um die Beurteilung der relativen Expression (x-fache-Änderung) der Genexpression in Relation zur Expression der Kontrollgruppe zu setzen. Der $\Delta\Delta Ct$ -Wert der einzelnen Proben wurde durch Subtraktion des ΔCt -MW der Kontrolle vom ΔCt -MW der jeweiligen Probe ermittelt. Die relative Expression der Genexpression wurde demzufolge als $2^{-\Delta\Delta Ct}$ berechnet. Um die Ergebnisse zu normalisieren, wurde ein MW der relativen Expression der Kontrollgruppen bestimmt und die relative Expression jeder einzelnen Probe wurde durch diesen dividiert. Nach Ermittlung des normalisierten $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Wertes wurden die Werte auf Normalverteilung geprüft. Sofern eine Normalverteilung vorlag, wurden die Ergebnisse auf Ausreißer mit Hilfe des Grubb's-Tests korrigiert. Hierfür wurden der MW und die Standardabweichung (SD) der normalisierten relativen Expression jeder Gruppe berechnet und der betreffende Grubb's-Wert wurde mit folgender Formel berechnet.

$$\text{Grubb's Wert} = \frac{(\text{MW der normalisierten relativen Expression der entsprechenden Gruppe} - \text{normalisierte relative Expression der Probe})}{\text{SD der normalisierten relativen Expression der Kontrollgruppe}}$$

Ausreißer konnten in Bezug auf die Gruppengröße der Kontrollgruppe erfasst werden. Die statistische Auswertung erfolgte wie in Kapitel 2.6 beschrieben und die Daten wurden schließlich als relative Expression der Genexpression in Relation zum Transkript der Kontrollgruppe über GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., CA, USA) für Windows dargestellt. Die statistische Auswertung wird im Kapitel 2.6 im Detail erläutert.

2.4 Histologie und Immunhistochemie

Die im Folgenden beschriebenen Färbungen wurden jeweils an $n = 3$ biologischen Replikaten durchgeführt.

2.4.1 Fixierung, Sektionierung und Färbung von Organen

Ganze Hoden von *Ins2^{Akitas+/-}* wurden für 24 Std. in Bouin-Lösung fixiert. Die Nebenhoden aller Versuchsgruppen wurden für 4 Std. in 3,7% Paraformaldehyd fixiert. Die Organe durchliefen zur Einbettung folgende Schritte: 80% EtOH für 30 Min., 96% EtOH für 45 Min., 99,6% EtOH für 45 Min., EBE I für 60 Min., EBE II für 60 Min., EBE III für 30 Min. und EBE IV für 30 Min. Über Nacht kamen die Organe in 46–48 °C heißes Paraffin. Am nächsten Tag wurden sie dann für 2 Std. in 46 °C heißes Paraffin gegeben, wonach sie schließlich eingebettet wurden. Für die histologische Auswertung wurden die Organe auf 5-7 µm dicke Schnitte mittels Mikrotom sektioniert.

2.4.2 Lichtmikroskopie

2.4.2.1 Hämatoxylin-Färbung

Zur Übersichtsfärbung mit Harris' Hämatoxylin wurden die Schnitte nach folgendem Schema entparaffiniert: 5 Min. Rotihistol I, 5 Min. Rotihistol II, 3 Min. EtOH 99,6%, 3 Min. EtOH 96%, 3 Min. EtOH 80%, 3 Min. EtOH 70%, 3 Min. EtOH 50%, 3 Min. Aqua destillata (A. dest.). Anschließend erfolgte die Färbung für 5-10 Min. in Harris' Hämatoxylin (1:10 verdünnt) mit darauffolgender Waschung mit Leitungswasser. Anschließend kamen die Objektträger erneut für 3 Min. in EtOH 50%, 3 Min. EtOH 70%, 3 Min. EtOH 80%, 3 Min. EtOH 96%, 3 Min. EtOH 99,6%, 5 Min. Rotihistol II und zuletzt für 5 Min. in Rotihistol II. Eingedeckt wurden die Proben mit 5 µl des Roti®-Histokitt (#6640 Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland). Entstandene Luftblasen wurden vorsichtig mit einer Metallnadel ausgestrichen und die Färbungen über Nacht getrocknet.

2.4.2.2 Semiquantitative Auswertung der Spermatozoendichte

Um eine semiquantitative Auswertung über die Spermatozoendichte in den unterschiedlichen Tiergruppen (12 vs. 24 Wo. und n.d. vs. d.) zu erhalten, wurden diese nach Hämatoxylin-Färbung in 200facher Vergrößerung mikroskopiert. Es wurde jeweils ein repräsentativer Ausschnitt fotografiert und die Anzahl der Tubuli gezählt. Für jeden Tubulus separat wurde entweder eine 0 (keine Spermatozoen im Tubulus), 1 (vereinzelte bzw. kaum Spermatozoen), 2 (einige Spermatozoen) oder eine 3 (viele Spermatozoen) notiert. Anschließend wurden die Daten (siehe Tabelle 5 in Kapitel 3.1.2) mit Hilfe von GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., CA, USA) für Windows ausgewertet. Eine Normalverteilung wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Test geprüft und anschließend wurden die verschiedenen Gruppen über einen One-way ANOVA miteinander verglichen (Kapitel 2.6). Im Anschluss wurde der Holm-Sidak's Post-hoc-Test durchgeführt. Für signifikante Ergebnisse wurde der MW, SD und der p-Wert angegeben.

Die Berechnungen des MWs und der SD werden exemplarisch an dem Beispiel der 24 Wo. d. Tiere, welche keine (0) Spermatozoen zeigten (Tabelle 5) aufgeführt.

$$MW = \frac{(12 + 30 + 4 + 4 + 13 + 0)}{6} = 10,5$$

$$SD = \sqrt{\frac{(12-10,5)^2 + (30-10,5)^2 + (4-10,5)^2 + (4-10,5)^2 + (13-10,5)^2 + (0-10,5)^2}{5}} = 10,8$$

2.4.2.3 Antikörper (AK)-Färbungen

Vor jeder AK-Färbung wurden die in Paraffin eingebetteten Schnitte nach dem folgendem Protokoll entparaffiniert und rehydriert: 5 Min. Rotihistol I, 5 Min. Rotihistol II, 2x3 Min. 99,6% EtOH, 2x 3 Min. 96% EtOH, 2x3 Min. 70% EtOH, 3 Min. A. dest. Im Anschluss wurden die Schnitte in Retrieval-Puffer (Dako REAL™ Target Retrieval Solution (10x) 32031) für 10 Min. bei 600 Watt gekocht, um Antigene zu demaskieren. Nach dem Abkühlen (30 Min.) wurden die Proben mit PAP Pen umrandet, entsprechend der Färbung beschriftet, zweimalig mit Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) für 5 Min. gewaschen und schließlich für 20 Min. mit je 100 µl Ziegen-Serum (1% in TRIS-Puffer gelöst) geblockt. Der primäre AK wurde mit TRIS (abcam anti-RAGE 1:100 (ab3611), abcam anti-AGE 1:100 (ab23722, basierend auf BSA und HSA), anti-Nf-κB p65 1:100 (D14E12) XP® Rabbit mAb #8242) und anti-Phospho-Nf-κB p65 (ser276) (Arigo biolaboratories, Cat no. ARG51515, 1:250) verdünnt und die Schnitte mit je 100 µl über Nacht bei 4 °C sowie lichtgeschützt inkubiert. Am nächsten Tag

wurden, nach Abklopfen des primären AK, die Schnitte zunächst zweimalig für je 5 Min. mit TRIS gewaschen bevor je 100 μ l des sekundären AK pipettiert wurden. Als sekundärer AK diente ein Ziege-anti-Kaninchen IgG in einer Verdünnung von 1:400 (Vector Laboratories, CA, USA). Dieser wurde unter Hinzugabe von 5% Mausserum für 1 Std. lichtgeschützt und bei RT inkubiert. Sowohl die Negativkontrolle (entspricht dem Blank, Tris/BSA ohne primär AK) als auch die Färbung wurden, nach zweimaliger Waschung mit TRIS, mit Fuchsin und Levamisol DAB unter mikroskopischer Beobachtung gefärbt, wobei die Zeit bis zur Färbung gestoppt wurde und die Wildtyp-Proben als Referenz genutzt wurden. Nach der Färbung kamen die Schnitte für 5 Min. in A. dest. und wurden anschließend mit Harris' Hämatoxylin gegengefärbt, mit Leitungswasser gewaschen und schließlich mit VectaMount (#H-5501 VectaMount Aqueous Mounting Medium, Vector Laboratories, CA, USA) eingedeckt und über Nacht getrocknet.

2.4.2.4 Carboxymethyllysin (CML)-Färbung unter Verwendung des M.O.M. Kit

Da der CML-AK (#011 Biologo, 1:100) aus Mausgewebe gewonnen wurde, erfolgte die Färbung der Schnitte unter Verwendung eines Maus-auf-Maus (M.O.M.[™]) Kits (#PK-2200 Mouse-on Mouse (M.O.M.[™]) Elite Peroxidase Kit, Vector Laboratories, CA, USA).

Zunächst wurden hierfür die Schnitte entparaffiniert und die Antigene mit Retrieval-Puffer demaskiert. Anschließend wurde die endogene Enzymaktivität für 5 Min. in einem 3% H₂O₂-Bad blockiert. Daraufhin wurden die Proben zweimalig in TRIS für je 2 Min. gewaschen und für 1 Std. mit Blocking-Reagenz inkubiert sowie im Anschluss erneut zweimalig für je 2 Min. in TRIS gewaschen. Im Folgenden wurden die Proben für 5 Min. in Diluentarbeitslösung inkubiert. Die Diluentlösung wurde zügig abgeklopft und die Proben über Nacht bei 4 °C mit dem primären AK (verdünnt 1:100 in Diluentarbeitslösung) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zweimalig für je 2 Min. in TRIS gewaschen und für 15 Min. mit biotyniliertem Anti-Maus-IgG-Reagent inkubiert und anschließend erneut nach genanntem Schema gewaschen. Die Schnitte wurden für 5 Min. mit ABC-Reagenz inkubiert. Nachdem die Proben erneut gewaschen wurden (zweimalig für 5 Min. in TRIS), wurden sie für ca. 2 Min. mit ImmPACT AMEC Red Peroxidase (HRP) Substrat (Vector Laboratories, CA, USA) angefärbt und in A. dest. für 5 Min. gewaschen. Sowohl der Blank, als auch eine der Färbungen wurden für ca. 1 Sek. in Harris' Hämatoxylin gegengefärbt, erneut für ca. 1 Min. in Leitungswasser gewaschen und dann mit VectaMount eingedeckt.

2.4.3 Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Fluoreszenzfärbung wurden die in Paraffin eingebetteten Proben zunächst, entparaffiniert. Dann wurden die Zellkerne mittels Retrieval-Puffers, für 10 Min. bei ca. 600 Watt gesprengt. Nach Kernsprengung wurden die Schnitte zweimalig mit PBS-Puffer (1x) für je 5 Min. gewaschen. Danach wurden die Zellen mit PAPPen umrandet, beschriftet und für 20 Min. mit in 1% PBS gelöstem Serum (jeweils mit dem Serum, welches mit IgG gegen den Wirt des sekundären AK gerichtet ist), geblockt. Der primäre AK (abcam anti-RAGE 1:100 (ab3611), abcam anti-AGE 1:300 (ab23722), anti-Phospho-Nf- κ B p65 (Ser536) 1:100 (Cell Signalling), anti-Nf- κ B p65 1:100 (sc-237, Santa Cruz)) wurde in PBS, 1% Serum (entsprechend des Wirts des sekundären AK, hier Esel) und in 0,1% Triton gelöst und die Probe wurde mit 100 μ l AK-Dilutions-Gemisch bzw. mit dem Gemisch ohne AK (Blank) über Nacht bei 4 °C lichtgeschützt inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Objektgläser dreimalig mit PBS gewaschen und anschließend mit 100 μ l des sekundären AK (hier RRX™-X (RRX) AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA), der 1:400 in PBS und 5% Mäuseserum verdünnt wurde (red/green), für 1 Std. bei RT in Dunkelheit inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Objektgläser zweimalig für 5 Min. mit PBS gewaschen und dann für 5 Min. mit Höchst (#33342 Höchst, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) (1:1000 in Tris pH 7 gelöst) gefärbt. Anschließend wurden die Proben für 5 Min. mit PBS gewaschen und mit Prolong Gold (ca. 5 μ l) eingedeckt, die Luftblasen mit einer Nadel ausgestrichen und mit Fixogum umrandet.

2.4.3.1 Färben von Zellen

Zur Färbung von Zellen (Lagerung bei -20 °C) wurden diese zunächst für ca. 15 Min. aufgetaut. Danach wurde das Probenmaterial mit PAP Pen eingekreist. Schließlich wurde zur Fixierung für 5 Min. Aceton (aus -20 °C Lagerung) auf die Proben gegeben und sie anschließend zweimalig für je 5 Min. mit PBS gewaschen. Ab diesem Schritt erfolgte die Färbung wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben.

2.5 Protein-Methoden

2.5.1 Lyse der Gewebe und Zellen und Bestimmung der Proteinkonzentration

Alle Schritte der Gewebslyse wurden auf Eis vollzogen. Es wurde ein Eppendorfröhrchen gewogen und tariert, um das Gewebe darin zu wiegen. Anschließend wurde der Protease-

Inhibitor-Mix (Sigma, P8340) mit kaltem PBS (0,01 M, pH 7,4) in einer Verdünnung von 1:200 gemischt und in das Eppendorfröhrchen gegeben. Das Gewebe wurde für ca. 20 Sek. langsam homogenisiert und der Homogenisator jeweils mit 70% EtOH und PBS gesäubert. Das homogenisierte Gewebe wurde bei 13000 Upm. und 4 °C für 10 Min. zentrifugiert und der Überstand bei -20 °C aufbewahrt.

Das Medium der Zellkulturexperimente wurde in 1,5 ml Eppendorfröhrchen gesammelt und bei -20 °C aufbewahrt. Adhärente Zellen wurden, sofern nicht anders beschrieben, mit PBS gewaschen und mit RIPA-Puffer und Protease/Phosphatase-Inhibitor (Verdünnung von 50:1) (#539134, Calbiochem, Merck, Deutschland) für 5 Min. lysiert. Das Lysat wurde in ein 1,5 ml Eppendorfröhrchen übertragen und bei 13000 Upm. und 4 °C für 30 Min. zentrifugiert. Der verbleibende Überstand wurde in einem frischen 1,5 ml Eppendorfröhrchen gesammelt und bei -80 °C aufbewahrt.

Um Proteinkonzentrationen zu messen wurde das Pierce TM BCA Protein-Assay-Kit (#23225, Pierce Biotechnology, IL, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Hierfür wurden gelöste BSA-Standards nach dem in Tabelle 4 dargestellten Schema hergestellt.

Tabelle 4: Verdünnungsschema für BSA-Standards zur Proteinbestimmung

Röhrchen	Volumen des Verdünnungsmittels (MilliQ) [μl]	Volumen und Quelle des BSA [μl]	Finale BSA Konzentration [μg/ml]
A	0	300 (Stammlsg.)	2000
B	125	375 (Stammlsg.)	1500
C	325	325 (Stammlsg.)	1000
D	175	175 von B Phiolen (Verdünnung)	750
E	325	325 von C vial	500
F	325	325 von E vial	250
G	325	325 von F vial	125
H	400	100 von G vial	25
I	400	0	0 = Blank

Die Arbeitslösung wurde hergestellt, indem 50 Anteile an BCA-Reagenz A mit einem Anteil Reagenz B vermischt wurden. Darauf wurden 25 μ l jeder Standardlösung oder der Probe in Duplikaten in eine 96-Wellplatte pipettiert. 200 μ l der Arbeitslösung wurden hierbei in jedes Well pipettiert und auf einer Schüttelplatte für 30 Sek. gemischt. Im Anschluss wurde die 96-

Wellplatte abgedeckt und für 30 Min. bei 37 °C inkubiert. Zu guter Letzt kühlte die Platte bei RT ab und die Absorption konnte bei 562 nm mit Hilfe des Mikroplattenlesers (Mikroplate-Reader, Mithras LB 940, Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland) bestimmt werden.

2.5.2 Milliplex MAP Kit-Assay

Um Veränderungen der Proteingehalte von ERK (Thr185/Tyr187) und Akt (Ser473) zu detektieren, wurde der MILLIPLEX MAP Human TGF β Signaling Magnetic Bead Panel 6-plex (#48-614MAG, Merck, Millipore) von Dr. Maresch verwendet und jeweils ein Miliplex-Assay nach Angaben des Herstellers und unter Nutzung des Luminex®-System (Luminex Corporation, TX, USA) durchgeführt.

2.5.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur CML Quantifizierung im Hoden und Nebenhoden wurde ein CML-ELISA nach den Instruktionen des ELISA Kit für Carboxymethyllysine (CML) (#CEB977Ge, CLOUD-CLONE CORP, TX, USA) von Dr. Maresch durchgeführt.

2.5.4 Western Blot und Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Durchführung des Western Blots verlief über zwei aufeinanderfolgende Tage. Am ersten Tag wurden die Gele gegossen, indem zuerst das Trenngel (siehe Kapitel 11.1.3) mittels 5 ml Pipette zwischen die Platten gegeben und mit Isopropanol überschichtet wurde. Nach ca. 30 Min. war das Gel polymerisiert. Anschließend wurde die Isopropanolschicht mit Hilfe von Filterpapier restlos abgenommen und die Kammer bis zur Kante mit dem Sammelgel (siehe Kapitel 11.1.3) gefüllt. Der Kamm wurde platziert und ca. 30 Min. bis zur Polymerisation gewartet.

Während der Polymerisation wurden zeitgleich die Proben in 6x Lämmli-Puffer bei 95 °C für 5 Min. aufgekocht. Kondenswasser wurde anschließend in einem kurzen Zentrifugationsschritt herunterzentrifugiert.

Die Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingespannt und mit Hilfe von Wasser auf Dichtigkeit getestet. Der Puffer wurde aufgefüllt sowie Proben und 3 μ l der PageRuler Prostained Ladder (ThermoFischer Scientific, Wattham, USA) in die Taschen pipettiert. Das Gel lief für ca. 30 Min. bei 100 V bis das Trenngel erreicht war und anschließend für ca. 100

Min. bei 150 V bis die blaue Lauflinie das untere Ende des Gels erreicht hatte, ohne dabei aus dem Gel zu diffundieren.

Parallel zur Elektrophorese wurde der semi-dry (halbtrockene) Western Blot vorbereitet. Hierfür wurde zuerst die PVDF-Membran (Cat# 05317-10EA, Immobilon-FL) für 5 Min. in Methanol aktiviert und für 2 Min. mit destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurden die Filterpapiere und die PVDF-Membran auf Gelgröße geschnitten und in Transferpuffer (5 Min.) eingeweicht.

Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurden das Sammelgel und die blaue Lauflinie mit einem Skalpell abgetrennt und das übrige Trenngel in Transferpuffer getaucht. Auf die Anode wurde ein Filterpapier, dann die Membran, das Gel und wiederum ein Filterpapier platziert und zwischendurch Luftblasen mittels 15 ml Falcon entfernt. Der Blot lief für 30 Min. bei 25 V und 150 mA. Im Anschluss zum Transfer wurde die Membran für eine bessere Proteinbindung für 15 Min. bei 37 °C getrocknet und erneut mit 100% MeOH aktiviert sowie mit dH₂O abgespült. Nach dem Blotten wurde die Membran zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts für 5 Min. in 5 ml REVERT Total Protein Stain (P/N 926-11010, LI-COR, Deutschland) inkubiert, anschließend 2x für 30 Sek. mit 5 ml REVERT Wash Solution und 1x 30 Sek. mit dH₂O gewaschen. Die Membran wurde mittels des LI-COR Odyssey® Fc Imaging System (LI-COR, Deutschland) detektiert und danach für 5 Min. in REVERT Reversal Solution und für 30 Sek. in dH₂O entfärbt. Zuletzt wurde die Membran auf einem Schwenker für 1 Std. bei RT mit 25 ml Odyssey-Blocking-Puffer (1:2 verdünnt in PBS) geblockt und über Nacht mit dem primären AK anti-RAGE (Verdünnung 1:500, #ab3611, Abcam) bei 4 °C auf einem Rotor (15 U/Min.) inkubiert.

Am zweiten Tag wurde die Membran 4x für 5 Min. bei 20 U/Min. mit PBST gewaschen. Der sekundäre AK (IRDye 800 CW (P/N 925-32211, LI-COR) wurde in einer Verdünnung von 1:20000 (0,5 µl/ml in Odyssey-Blocking-Puffer, 0,1% Tween-20 und 0,01% SDS) für 1 Std. bei RT unter Schwenken (15U/Min.) im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss der Inkubation wurde die Membran im Dunkeln 4x 5 Min. mit PBST gewaschen. Detektiert wurden Antigen/AK-Komplexe über LI-COR Odyssey® Fc Imaging System (LI-COR Bioscience, Bad Homburg, Deutschland). Für Quantifizierungen wurden die Intensitäten des Zielproteins gegen das Signal des Gesamtproteins normalisiert.

2.6 Statistische Auswertungen

Die Eingabe der Rohdaten in tabellarischer Form erfolgte mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms MS Excel 2013® für Windows®, die Erstellung der Arbeit

mit Hilfe des Textbearbeitungsprogramms MS Word 2013® für Windows®. Alle statistischen Tests wurden durch das Computerprogramm GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., CA, USA) für Windows durchgeführt. Bei allen angewandten statistischen Verfahren wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ angenommen. Die Signifikanzniveaus wurden kenntlich gemacht durch * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ und **** = $p < 0,0001$.

Alle Daten wurden mittels Shapiro-Wilk Normalverteilungstest auf Gauss'sche Verteilung getestet. Bei Normalverteilung der Daten, wurde ein unpaariger t-Test für den Vergleich zweier, oder eine two-way ANOVA für den Vergleich mehrerer Gruppen verwendet. Sofern diese Auswertung Signifikanzen aufzeigte, wurde im Anschluss der Tukey's *post-hoc* Test verwendet. Zeigten die Daten keine Normalverteilung, erfolgte der Vergleich zweier Gruppen über den Mann-Whitney-Test und die Analyse mehrerer Gruppen mit Hilfe des des Kruskal-Wallis-Tests. Zeigte dieser Signifikanzen, wurde im Anschluss der Dunn's *post-hoc* Test verwendet. Für die Berechnung der Stichprobengröße wurde die Open-Source-Software G-Power verwendet. Für die Berechnung wurden die jeweiligen MW und SD und der Wolcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet.

3 Ergebnisse

Um den Einfluss von hyperglykämischen Stoffwechsellagen, welche bei T1DM auftreten, auf den männlichen Reproduktionstrakt und die Entwicklung der Keimzelle zu analysieren, wurden sowohl das *Ins2^{Akita+/-}* Mausmodell als auch die WL-3 Sertoli-Zelllinie verwendet. Durchgeführt wurden morphologische Gewebsvergleiche, verschiedene Dosis-Wirkungs-Studien mit Glukose und MG, Detektionen und Quantifizierungen der AGEs und deren Rezeptor RAGE sowie die Interaktion der durch Liganden-RAGE aktivierten Signalkaskaden. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Hoden- und Nebenhodenanalysen der *Ins2^{Akita+/-}* Maus (Kapitel 3.1) sowie die Ergebnisse der WL-3 Sertoli-Zelllinie (Kapitel 3.2) dargestellt.

3.1 Studien an der *Ins2^{Akita+/-}* Maus

3.1.1 Diabetischer und reproduktiver Phänotyp der *Ins2^{Akita+/-}* Maus

Vorangegangene Studien der AG Linn haben den diabetischen und reproduktiven Phänotyp der *Ins2^{Akita+/-}* Maus detailliert beschrieben. Diese Untersuchungen zeigten, dass d. *Ins2^{Akita+/-}* Mäuse im Alter von 12 und 24 Wo. ein signifikant verringertes Körpergewicht aufweisen, während der BZ signifikant erhöht war. Zudem kam es zu einer 30% signifikanten Abnahme des Hodengewichts bei d. *Ins2^{Akita+/-}* Mäusen im Alter von 24 Wo. im Vergleich zu den n.d. *Ins2^{Akita+/-141,143}*.

3.1.2 Pathologien im Nebenhoden der *Ins2^{Akita+/-}* Maus

Um die Morphologie des Nebenhodens zu analysieren, wurden histologische Nebenhodenschnitte (Abbildung 13) der n.d. (A+B) und d. (C+D) *Ins2^{Akita+/-}* im Alter von 12 und 24 Wo. miteinander verglichen. Caput/Corpus- und Caudaregion wurden dabei isoliert betrachtet.

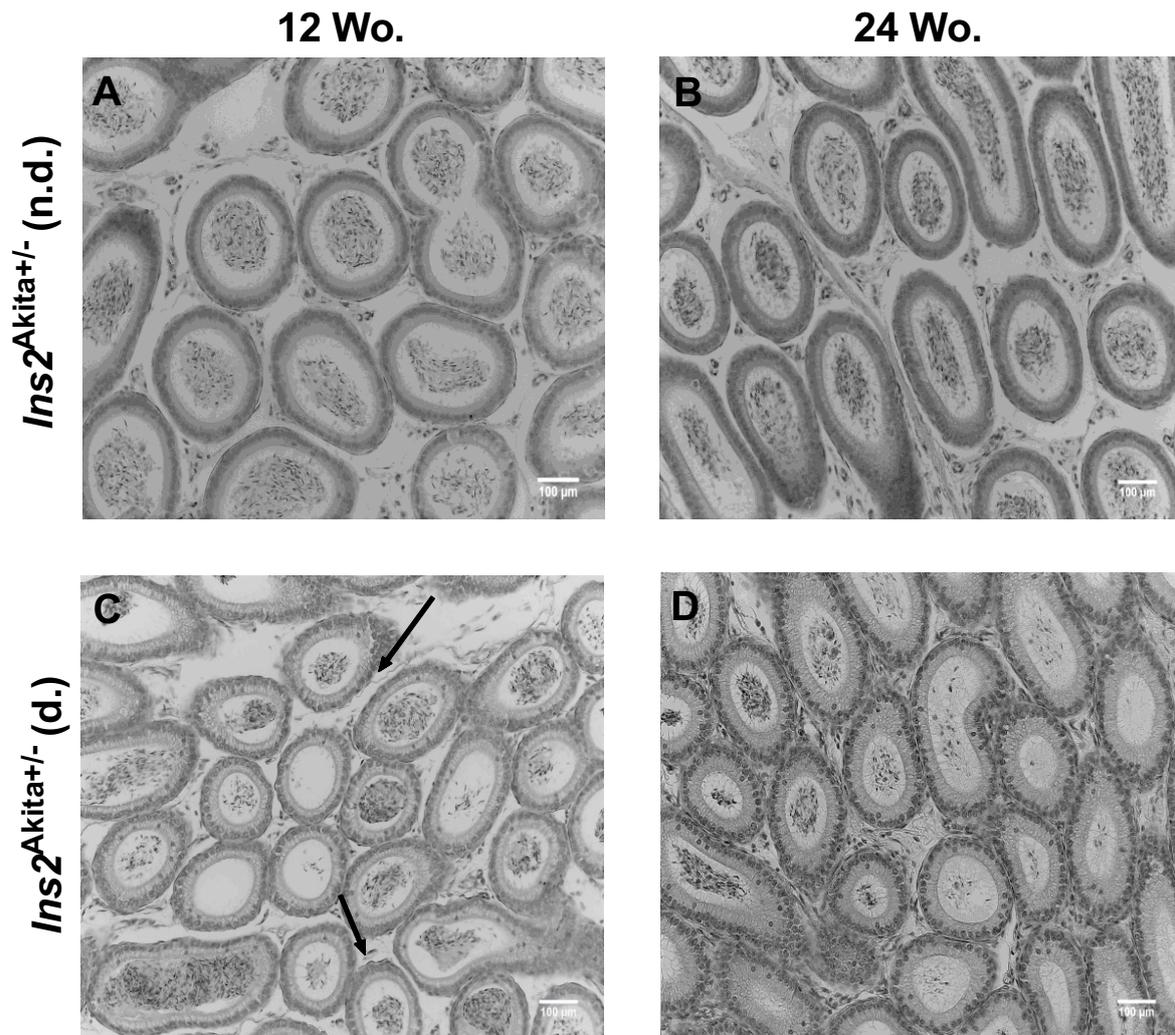


Abbildung 13: Lichtmikroskopische Hämatoxylin-Übersichtsfärbung der Caput/Corpusregion des Nebenhodens

Abgebildet sind in 200-facher Vergrößerung Hämatoxylin-Übersichtsfärbung von nicht-diabetischen (n.d. A+B) und diabetischen (d. C+D) *Ins2^{Akita}+/-* Mäusen im Alter von 12 und 24 Wo.. Die Pfeile in (C) weisen auf Unterbrechungen zwischen Epithel und glatter Muskelschicht hin. Die Abbildung zeigt repräsentative Bilder. Es wurden $n = 3$ Organe in jeder Gruppe gefärbt und evaluiert.

Bei 12 Wo. alten n.d. *Ins2^{Akita}+/-* (A) zeigten sich in der Caput/Corpusregion bereits einige Spermatozoen, während bei 24 Wo. (B) die meisten Tubuli Spermatozoen enthielten.

In den 12 (C) und 24 Wo. (D) alten d. Nebenhoden waren einzelne Tubuli mit Spermatozoen gefüllt, während andere Tubuli leer waren. Insgesamt zeigte sich die Verteilung der Spermatozoen im Vergleich zum n.d. Tier ungleichmäßig. Die glatte Muskulatur um die

Tubuli war schwach, Stereozilien aber deutlich ausgeprägt. Zudem konnten primär in den 12 Wo. alten Organen Vakuolen und Epithelrisse detektiert werden und die glatte Muskelschicht erschien an vielen Stellen vom Epithel abgehoben (siehe Pfeil in C).

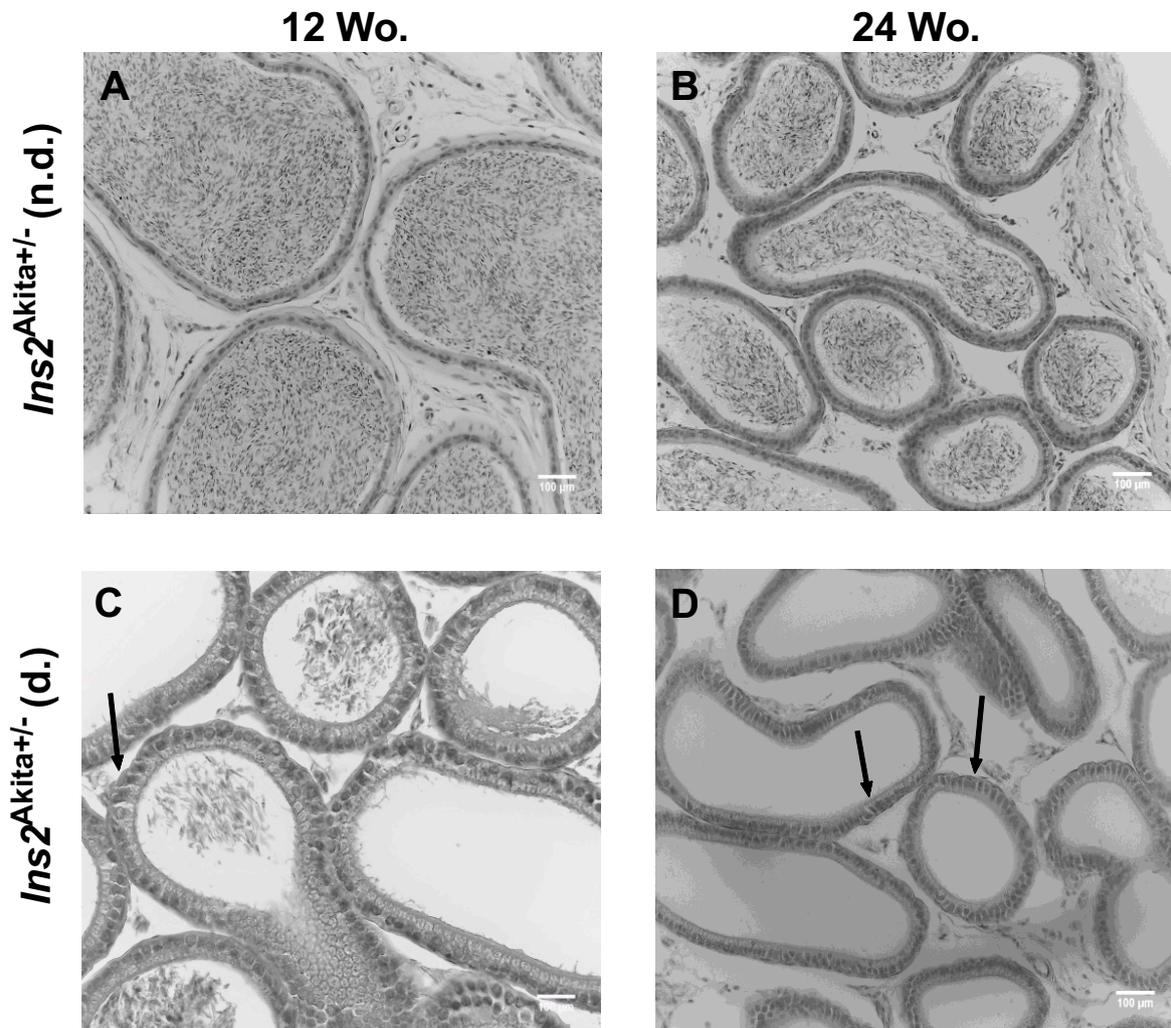


Abbildung 14: Lichtmikroskopische Hämatoxylin-Übersichtsfärbung der Cauda des Nebenhodens

Abgebildet sind in 200-facher Vergrößerung Hämatoxylin-Übersichtsfärbung von n.d. (A+B) und d. (C+D) *Ins2^{Akita+/-}* Mäusen im Alter von 12 und 24 Wo.. Die Pfeile in (C+D linker Pfeil) weisen auf Vakuolen und Ablösung der glatten Muskulatur und Basalmembran vom Tubulusepithel (rechter Pfeil in D) hin. Die Abbildung zeigt repräsentative Bilder. Es wurden $n = 3$ Organe in jeder Gruppe gefärbt und evaluiert.

In Abbildung 14 ist die Caudaregion des Nebenhodens, das Spermien-speichersegment, dargestellt. Bei 12 Wo. alten n.d. *Ins2^{Akita+/-}* (A) waren die Tubuli bereits deutlich mit Spermatozoen gefüllt und wiesen signifikant weniger Tubuli ohne

Spermatozoen (0) auf, als 24 Wo. alte d. Tiere (n.d. < d. $1,25 \pm 2,5$ vs. $10,5 \pm 10,8$, $p = 0,0105$). Die Caudaregion der 12 Wo. alten d. Nebenhoden (C) enthielt teils gar keine, teils nur wenige Spermatozoen. Hier ergab sich ein signifikanter Unterschied zum 12 Wo. alten n.d. Tier (Detektion von vielen Spermatozoen im Tubulus (3), n.d > d; $9,25 \pm 11,54$ vs. $1,33 \pm 1,75$, $p = 0,0351$). Zum Zeitpunkt der 24 Wo. (D) enthielten die Tubuli abschnittsweise Spermatozoen, jedoch waren andere komplett leer. Insgesamt wurde eine Abnahme der Spermatozoendichte im Vergleich zur n.d. *Ins2^{Akita}* (24 Wo. n.d. < 24 Wo. d.) ersichtlich und war in Hinsicht auf die Detektion von keinen Spermatozoen im Tubulus (0) signifikant ($1,67 \pm 3,2$ vs. $10,5 \pm 10,8$, $p = 0,0076$). Es zeigte sich zudem eine signifikante Zunahme von Tubuli mit vielen Spermatozoen (3) zwischen 12 Wo. n.d. > 24 Wo. d. ($9,25 \pm 11,6$ vs. $0,83 \pm 2,04$, $p = 0,0301$) (siehe Tabelle 5). Das Bindegewebe war zellarm und auch hier konnte eine Ablösung der glatten Muskulatur bzw. Basalmembran vom Epithel sowie vereinzelt Vakuolen beobachtet werden (siehe Pfeile in D). Dieses Phänomen konnte bereits bei 12 Wo. alten d. *Ins2^{Akitas}* beobachtet werden.

Tabelle 5: Semiquantitative Untersuchung der Spermatozoendichte des Nebenhodens der *Ins2^{Akitas+/-}*

	0	1	2	3		0	1	2	3
	12 Wo n.d.					12 Wo. d.			
n = 8	0	0	0	8	n = 18	2	7	6	3
n = 30	0	1	3	26	n = 88	3	5	0	0
n = 7	0	0	4	3	n = 13	2	3	8	0
n = 8	5	3	0	0	n = 13	7	6	0	0
					n = 16	6	3	3	4
					n = 9	0	2	6	1
MW	1,25	1	1,75	9,250	MW	3,33	4,33	3,833	1,33
SD	2,50	1,41	2,062	11,64	SD	2,66	1,97	3,371	1,751
	24 Wo. n.d.					24 Wo. d.			
n = 10	8	2	0	0	n = 30	12	1	6	0
n = 14	0	0	11	3	n = 41	30	11	0	0
n = 5	0	0	4	1	n = 9	4	5	0	0
n = 18	2	2	14	0	n = 10	4	5	1	0
n = 12	0	0	12	0	n = 13	13	0	0	0
n = 8	0	0	0	8	n = 12	0	0	7	5
MW	1,67	0,667	6,833	2	MW	10,5	3,67	2,333	0,833
SD	3,20	1,03	6,274	3,162	SD	10,8	4,27	3,266	2,041

Legende: 0 = keine Spermatozoen vorhanden

1 = kaum Spermatozoen

2 = mittlere Dichte an Spermatozoen

3 = viele Spermatozoen

Die Anzahl der pro Tier ausgewerteten Tubuli wird mit n angegeben

Die im Folgenden aufgeführten morphologischen Beobachtungen unterstreichen die Ergebnisse der Spermienanalyse aus vorangegangenen Untersuchungen der AG Prof. Linn. Dabei wurde die reproduktive Kapazität von je sechs 24 Wo. alten Mäusen innerhalb der genannten Gruppen verglichen und zeigte, dass die Spermiedichte in den d. *Ins2*^{Akita+/-} Mäusen signifikant geringer war und dass es zu einer signifikanten Zunahme der Zahl an Spermien mit Spermienkopf-Defekten kam^{141,143}.

3.1.3 Auswirkungen von T1DM auf die AGE und MG-Entstehung im Reproduktionstrakt der *Ins2*^{Akita+/-} Maus und Detektion des Rezeptors RAGE

Basierend auf vorangegangenen Ergebnissen (Kapitel 3.1.1) sowie Studien, die gezeigt haben, dass es unter Hyperglykämie zu erhöhten MG-Spiegeln kommt (siehe Kapitel 1.1.9)^{21,175,216}, wurde innerhalb dieser Arbeit die Produktion von MG in Hoden und Nebenhoden detektiert. Anschließend wurden der Einfluss von Glukose auf die MG-Entstehung in Sertoli-Zellen und die zellulären Schutzmechanismen gegen MG analysiert.

3.1.3.1 Produktion von Methylglyoxal im Reproduktionstrakt der *Ins2*^{Akita+/-} Maus

MG gilt als ein zentrales und hochtoxisches Zwischenprodukt der Bildung von AGEs^{116,233} und wurde in diesem Zusammenhang im Reproduktionstrakt von n.d. und d. *Ins2*^{Akita+/-} Mäusen detektiert (Abbildung 15).

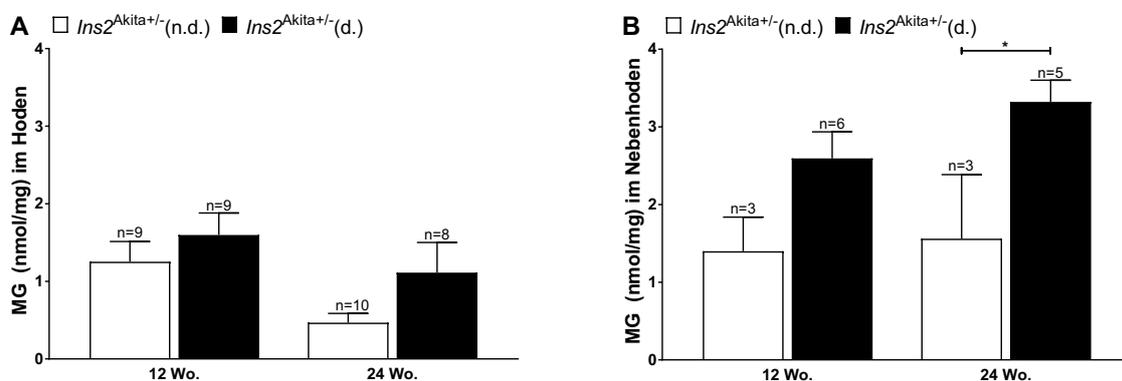


Abbildung 15: Graphische Darstellung der Bestimmung von Methylglyoxal (MG)

Dargestellt ist die MG-Konzentration im Hoden (A) und Nebenhoden (B) in nmol/mg von 12 und 24 Wo. alten n.d. und d. *Ins2*^{Akita+/-} Mäusen mit Hilfe der LC-MS/MS-Methode.

Die Analyse der MG-Konzentration im Hoden (A) ergab, dass d. *Ins2^{Akita+/-}* Mäuse sowohl im Alter von 12 als auch 24 Wo. tendenziell höhere Werte an MG aufzeigten als n.d. Tiere und dass beide Gruppen im zeitlichen Verlauf eine Reduktion des MGs aufwiesen.

Im Nebenhoden (B) war die MG-Konzentration bei 12 Wo. alten d. Tieren im Vergleich zum n.d. erhöht und wurde bei 24 Wo. (1.561 ± 1.43 vs. 3.323 ± 0.62 , $p = 0,0353$) signifikant. Insgesamt kam es im Nebenhoden im zeitlichen Verlauf zu einer Zunahme an MG.

Im Vergleich zwischen den Hoden- und Nebenhodenanalysen von 24 Wo. alten *Ins2^{Akita+/-}* wurde eine 3,5-fache Zunahme der MG-Konzentration ($1,113 \pm 1,097$ (Hoden) vs. $3,323 \pm 0,622$; (Nebenhoden) $p = 0,006$) im Verlauf des männlichen Reproduktionsorgans (Hoden < Nebenhoden) signifikant.

3.1.3.2 Lokalisierung und Produktion von RAGE und dessen Liganden im Reproduktionstrakt der *Ins2^{Akita+/-}* Maus

Die Ergebnisse aus dem vorangegangenen Kapiteln weisen darauf hin, dass es zur vermehrten Akkumulation von MG im Reproduktionstrakt von d. Tieren kommt. Da MG ein zentrales Zwischenprodukt der AGE-Entstehung darstellt, lässt sich vermuten, dass auch AGEs vermehrt im Reproduktionstrakt von d. Tieren nachzuweisen sind. Um zunächst eine Übersicht über die Verteilung von Glykierungsprodukten im Reproduktionstrakt zu erhalten, wurden anti-AGE-Färbungen durchgeführt. Anschließend wurden diese mittels quantitativer Proteinanalysen detektiert. Ein besonderer Fokus wurde hierbei auf das AGE CML gelegt, da es das bisher bekannteste und am besten erforschte AGE darstellt^{105,173}, welches zudem mit einer erhöhten Krankheitsprogression bei T1DM assoziiert wird²¹. Als weiterer Ligand von RAGE wurde die Expression der Gene *HMGB1* und *2* analysiert, da sie in einigen vorausgegangenen Studien bereits mit DM-Komplikationen assoziiert wurden^{46,147,171} und sie über die Bindung an RAGE ebenso Signalkaskaden in Gang setzen, die zur Aktivierung des TfNf- κ Bs^{46,113} (Kapitel 1.1.13) führen. Abschließend wurde der Rezeptor RAGE mittels immunhistochemischer Methoden und Western Blot untersucht.

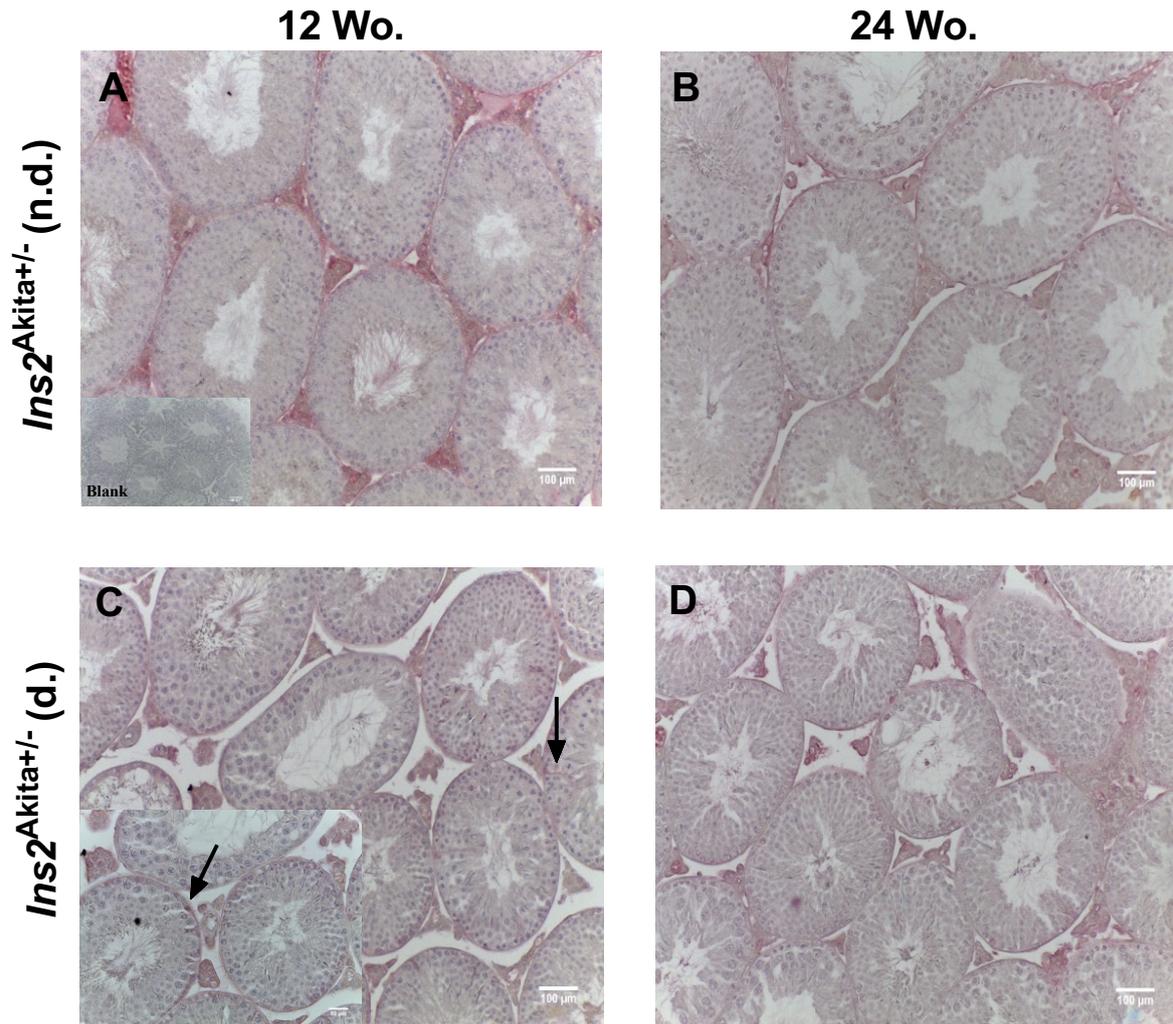


Abbildung 16: Lichtmikroskopische anti-AGE-Färbung des Hodens

Abgebildet sind in 200-facher Vergrößerung anti-AGE-Färbungen von n.d. (A+B) und d. (C+D) *Ins2^{Akita+/-}* Mäusen im Alter von 12 und 24 Wo.. In (C) mit Pfeil markiert ist das Zytoplasma einer Sertoli-Zelle. Das Bild in der linken unteren Ecke in (A) stellt den Blank (Färbung in Abwesenheit des anti-AGE Antikörpers) in (C) eine 400-fache Vergrößerung dar, in welcher mit einem Pfeil die Basalmembran markiert ist. Die Abbildung zeigt repräsentative Bilder. Es wurden $n = 3$ Organe in jeder Gruppe gefärbt und evaluiert.

In Abbildung 16 dargestellt ist eine anti-AGE-Färbung des Hodens von *Ins2^{Akita+/-}*. In den Färbungen zeigte sich v.a. bei 12 Wo. alten d. Tieren (C) neben der charakteristischen Interstitiumfärbung (angefärbt waren Bindegewebe, Leydig Zellen, Makrophagen und Blutgefäße), welche auch in den n.d. *Ins2^{Akita+/-}* (A+B) zu sehen war, eine verstärkte Färbung im Bereich der Basalmembran der Tubuli (siehe Pfeil in Vergrößerung in C) und der

Spermatogonien. Zudem waren vereinzelt Färbungen des Zytoplasmas der Sertoli-Zellen auszumachen (siehe Pfeil in C).

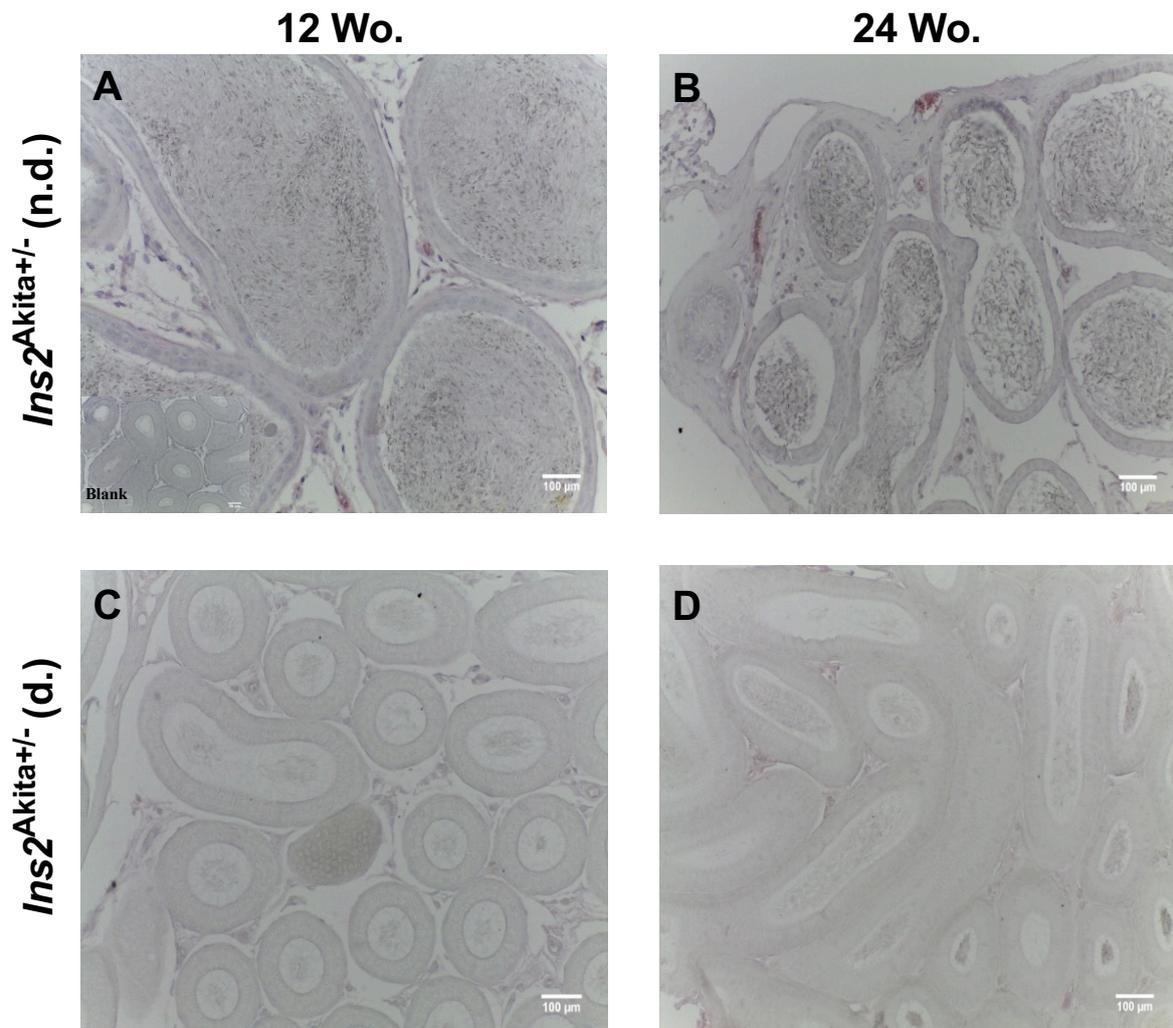


Abbildung 17: Lichtmikroskopische anti-AGE-Färbung des Nebenhodens

Abgebildet sind in 200-facher Vergrößerung anti-AGE-Färbungen von n.d. (A+B) und d. (C+D) *Ins2^{Akita+/-}* Mäusen im Alter von 12 und 24 Wo.. Der Blank ist in (A) in der linken unteren Ecke abgebildet. Die Abbildung zeigt repräsentative Bilder. Es wurden $n = 3$ Organe in jeder Gruppe gefärbt und evaluiert.

Die in Abbildung 17 dargestellten Färbungen des Nebenhodens mit anti-AGE wiesen keine Unterschiede zwischen den Gruppen auf. Durchweg waren ausschließlich das Interstitium und v.a. Blutgefäße gefärbt. Das Tubulusepithel und Lumen war negativ für AGE.

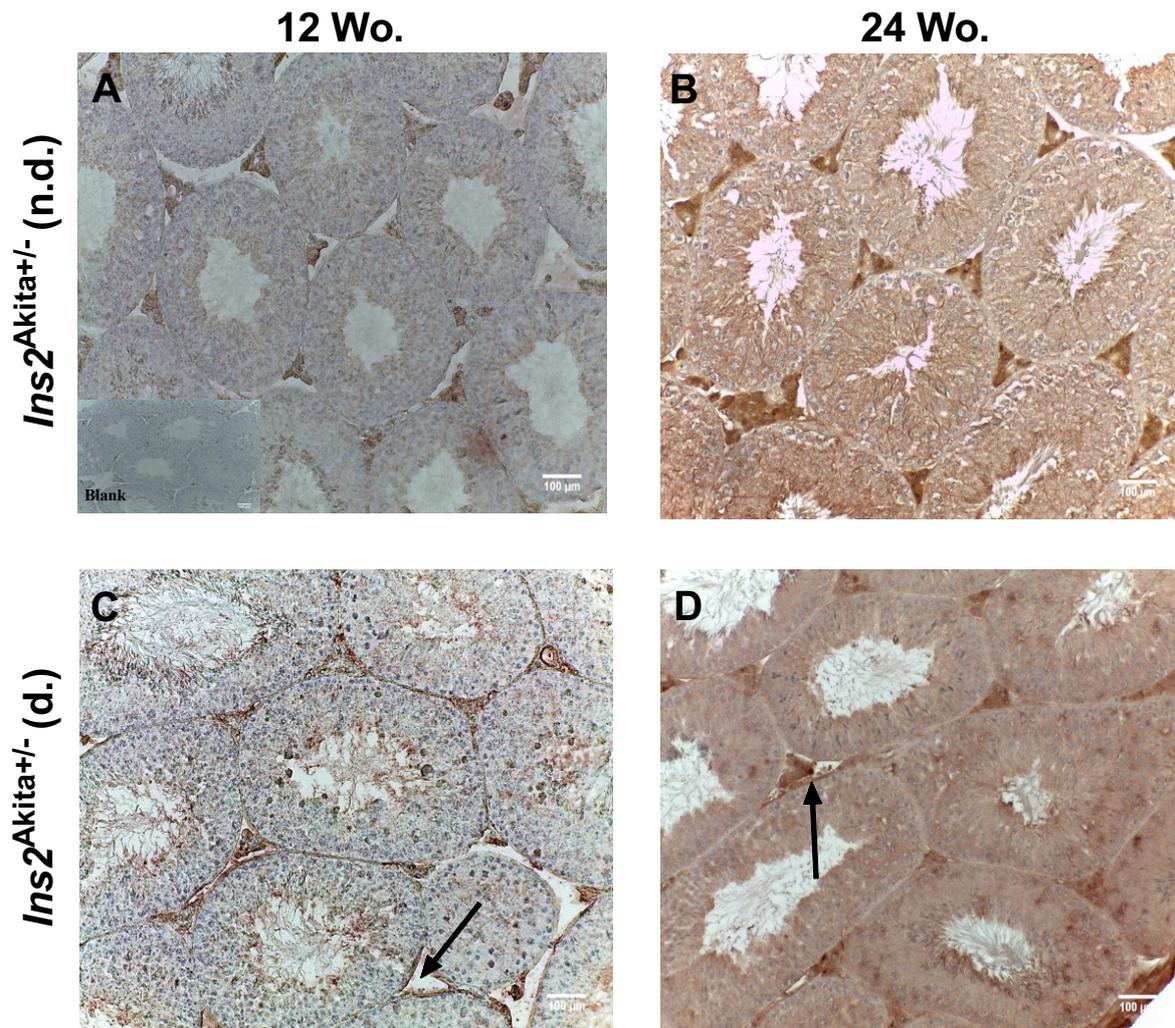


Abbildung 18: Lichtmikroskopische anti-CML-Färbung des Hodens

Abgebildet sind in 200-facher Vergrößerung anti-CML-Färbungen von n.d. (A+B) und d. (C+D) *Ins2^{Akita+/-}* Mäusen im Alter von 12 und 24 Wo.. Der Blank ist in (A) in der linken unteren Ecke abgebildet. Die Pfeile in (C) und (D) deuten auf die CML positive Basalmembran der Tubuli. Die Abbildung zeigt repräsentative Bilder. Es wurden $n = 3$ Organe in jeder Gruppe gefärbt und evaluiert.

In Abbildung 18 dargestellt ist eine anti-CML-Färbung des Hodens. Zum Zeitpunkt der 12 Wo. war in beiden Gruppen v.a. das Interstitium gefärbt, in welchem alle Zellen inkl. Leydig-Zellen positiv für CML reagierten. Diese Färbung war im d. Tier im Vergleich zum n.d. eindrücklicher. In der d. *Ins2^{Akita+/-}* konnte bereits bei 12 Wo. (C), betonter bei 24 Wo. (D), eine Färbung im Bereich der Basalmembran der Tubuli (siehe Pfeile in C+D) detektiert werden. Zudem zeigten die 24 Wo. alten Organe eine deutliche Färbung innerhalb der Tubuli. Hier war

verstärkt das Zytoplasma der Keim- und Sertoli-Zellen gefärbt. In allen Färbungen wurde in der Grenzregion zum Lumen eine deutliche CML positive Färbung vermerkt sowie v.a. bei den 12 Wo. alten d. *Ins2^{Akita+/-}* Tieren eine diffuse Färbung im Lumen.

Zur Quantifizierung des CMLs im Hoden wurde ein CML ELISA (Abbildung 19) durchgeführt.

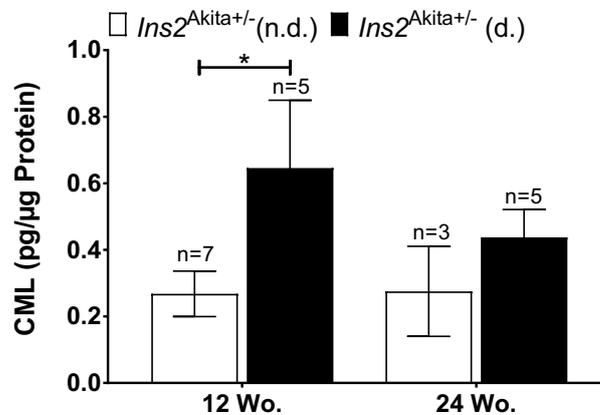


Abbildung 19: Graphische Darstellung der Proteinkonzentration von CML in pg/µg im Hoden von 12 und 24 Wo. alten n.d. und d. *Ins2^{Akita+/-}*

Während bei den 12 Wo. alten d. *Ins2^{Akita+/-}* die CML-Konzentration signifikant im Vergleich zur 12 Wo. alten n.d. *Ins2^{Akita+/-}* ($p = 0,0323$) erhöht war, bestand in den 24 Wo. alten d. *Ins2^{Akita+/-}* lediglich die Tendenz einer gesteigerten CML-Proteinkonzentration.

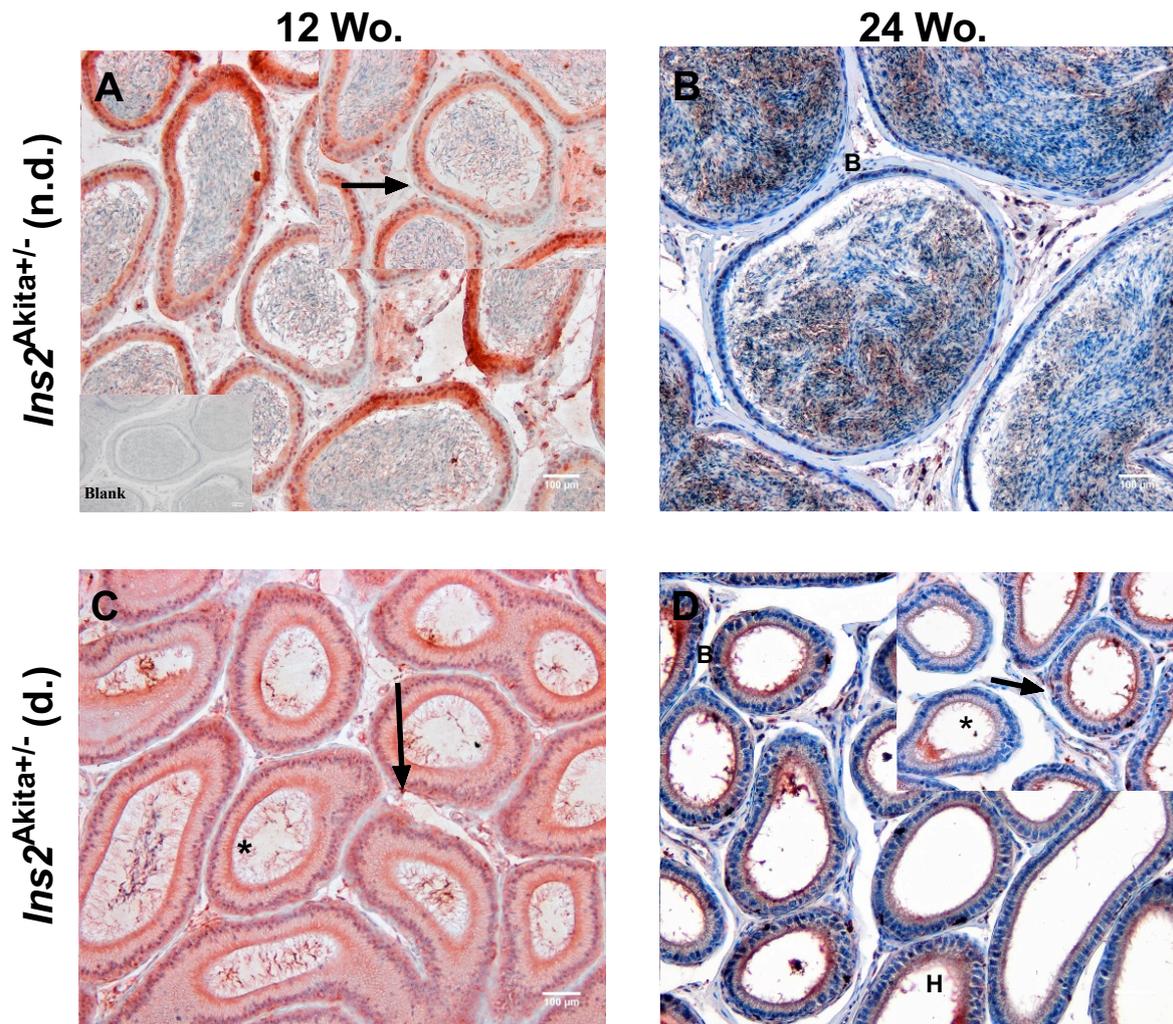


Abbildung 20: Lichtmikroskopische anti-CML-Färbung des Nebenhodens

Abgebildet sind in 200-facher Vergrößerung anti-CML-Färbungen von n.d. (A+B) und d. (C+D) *Ins2^{Akita}/-* Mäusen im Alter von 12 und 24 Wo.. Der Blank ist in (A) in der linken unteren Ecke abgebildet. Jeweils in der rechten oberen Ecke (A+C+D) ist eine 400-fache Vergrößerung eingefügt. Die Pfeile in (A+C+D) zeigen auf die CML positive Basalmembran der Tubuli. In (B +D) sind die Basalzellen mit B und in (D) das Zytoplasma der Hauptzellen mit H markiert. Die * in (C+D) markieren die Stereozilien. Die Abbildung zeigt repräsentative Bilder. Es wurden $n = 3$ Organe in jeder Gruppe gefärbt und evaluiert.

Zur weiteren Beurteilung der CML-Produktion wurden immunhistochemische Färbungen am Nebenhoden vorgenommen (Abbildung 20). Hierbei zeigten sich bei den 12 Wo. alten n.d. *Ins2^{Akita}/-* die Gefäße und vereinzelt das Zytoplasma der epididymalen Zellen, v.a. der Basalzellen (markiert mit B in B) und Hauptzellen, positiv für CML. Im Interstitium waren nur punktuelle Färbungen auszumachen. Die Basalmembran war schwach positiv für CML

(siehe Pfeil in A). Bei den 24 Wo. alten n.d. *Ins2*^{Akita+/-} entsprach die Färbung mit Ausnahme einer fehlenden Färbung der Basalmembran und glatten Muskulatur der der 12 Wo. alten n.d. Tiere. Zudem war bei 24 Wo. eine diffuse Färbung im Lumen auffällig.

Das Färbemuster der 12 Wo. alten d *Ins2*^{Akita+/-} ähnelte dem des n.d. Tiers. Auch hier waren diffuse luminale Färbungen und vereinzelt Färbungen der Basalmembran (siehe Pfeil in C) auszumachen, während das Interstitium keine deutliche Färbung für CML aufwies. Bei den 24 Wo. alten d. *Ins2*^{Akita+/-} wurden Färbungen der Stereozilien (*) und des Zytoplasmas der Hauptzellen (H) und vereinzelt der Basalzellen (B) sowie diffuse luminale und somit auch spermale Färbungen deutlich. Die Basalmembran des Tubulus war vereinzelt CML positiv (siehe Pfeile in D).

Tabelle 6: Statistische Übersicht aus qRT-PCR-Analysen von RAGE-Liganden und dem Rezeptor RAGE

Statistik	Gen	<i>Ins2</i> ^{Akita+/-}	<i>Ins2</i> ^{Akita+/-}	<i>Ins2</i> ^{Akita+/-}	<i>Ins2</i> ^{Akita+/-}	Signifikanzen
		n.d. 12 Wo.	n.d. 24 Wo.	d. 12 Wo.	d. 24 Wo.	
RAGE-Liganden und RAGE						
Median, (Intervall; und Interquartil- abstand) aus n = 3-9 Organen	<i>RAGE</i> Hoden	0,545, (0,03- 2,25; 1,9025)	0,2, (0,01-3,54; 2,36)	0,25, (0- 5,43; 2,1)	0,91, (0,02- 15,01; 2,7705)	n.s.
	<i>RAGE</i> Neben- hoden	0,21, (0,03- 5,14; 1,4055)	0, (0-3;3)	0,14, (0- 15,44; 1,815)	0,02, (0- 4,98; 0,015)	n.s.
	<i>HMGB1</i> Hoden	0,635, (0- 4,63; 0,8175)	0,14, (0-5,48; 1,55)	1,99, (0- 15,73; 8,41)	0,715, (0,02- 82,81; 10,2175)	n.s.
	<i>HMGB1</i> Neben- hoden	1,23, (0,14- 1,52; 0,86)	0,97, (0,28-1,75; 1,47)	1,455, (0,14-4,4; 2,7675)	1,38, (0,78- 2,04; 0,75)	n.s.
	<i>HMGB2</i> Hoden	1,01, (0,09- 2,01; 1,7705)	0,8, (0,09-3,18; 1,08)	0,84, (0,28-3,2; 1,255)	0,445, (0,29- 8,31; 1,4575)	n.s.
	<i>HMGB2</i> Neben- hoden	1,23, (0,14- 1,52; 0,86)	0,97, (0,28-1,75; 1,47)	1,455, (0,14-4,4; 2,7675)	1,38, (0,78- 2,04; 0,75)	n.s.

In Tabelle 6 dargestellt ist die Genexpression (die normalisierte relative Expression oder auch normalisierter Fold-Change $2^{-\Delta\Delta Ct}$ genannt) der RAGE-Liganden *HMGB1* und *2*, sowie des Rezeptors *RAGE*. Es werden in allen qRT-PCR-Analysen an Hoden und Nebenhoden

jeweils der Median aus $n = 3-9$ (für Details siehe Kapitel 2.3.5) das Intervall (kleinster und größter Wert) sowie der Interquartilabstand (die 0,25% Percentile subtrahiert von der 0,75% Percentile) abgebildet. Hieraus wurde deutlich, dass die Expression der Gene *HMGB1* und *HMGB2* nicht signifikant reguliert war. Im Vergleich mit der n.d. bestand bei der d. *Ins2^{Akita+/-}* Maus lediglich der Trend einer Hochregulation von *HMGB1*, wohingegen *HMGB2* different exprimiert wurde.

Weiterführend wurde neben AGEs auch dessen Rezeptor RAGE mittels lichtmikroskopischer anti-RAGE-Färbung im Reproduktionstrakt lokalisiert.

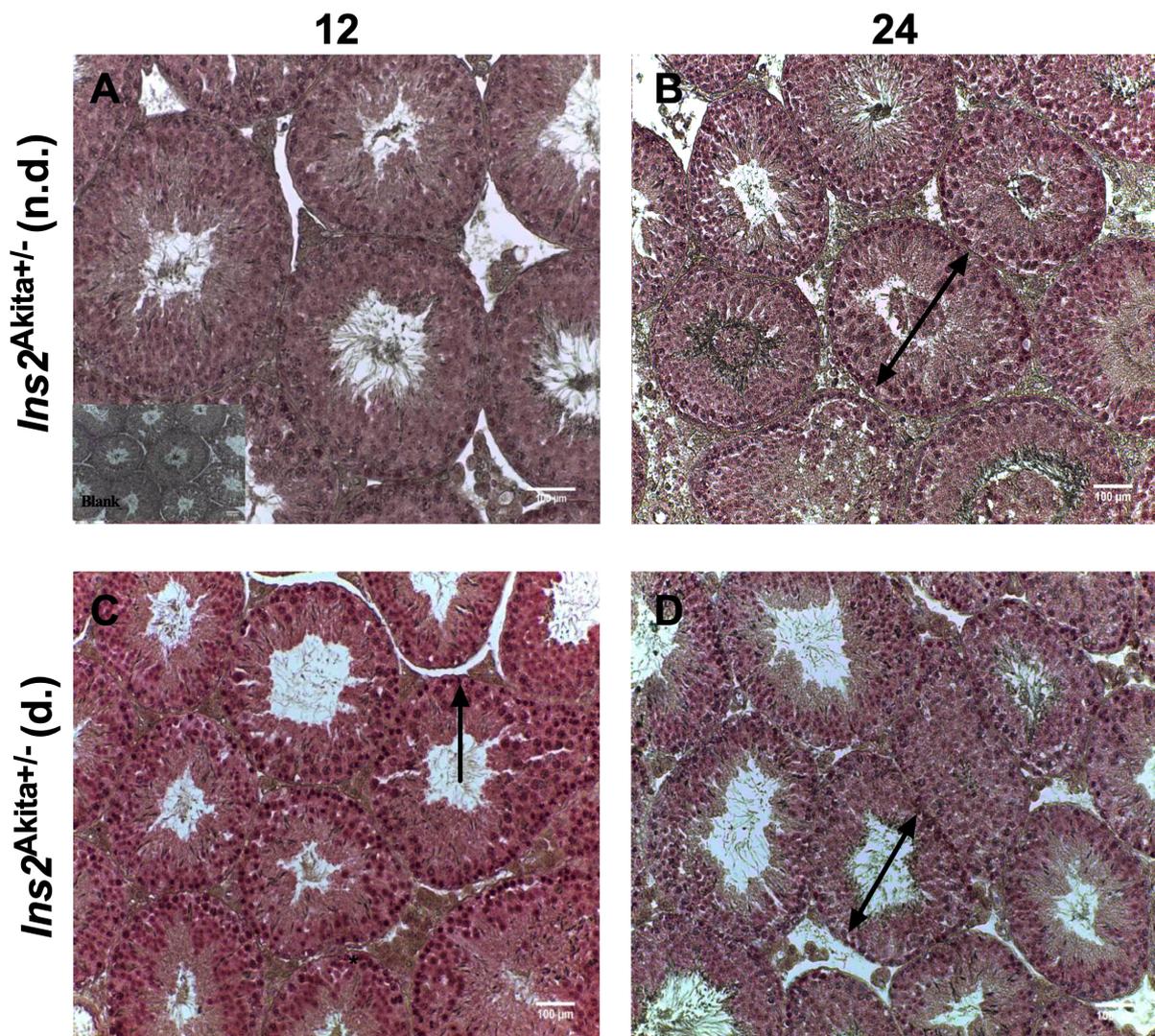


Abbildung 21: Lichtmikroskopische anti-RAGE-Färbung des Hodens

Abgebildet sind in 200-facher Vergrößerung anti-RAGE-Färbungen von n.d. (A+B) und d. (C+D) *Ins2^{Akita+/-}* Mäusen im Alter von 12 und 24 Wo.. Der Blank ist in (A) in der linken unteren Ecke abgebildet. Der Doppelpfeil (B+D) weist auf Spermatogonien, der Pfeil in (C) zeigt die

Basalmembran des Tubulus an. Die Abbildung zeigt repräsentative Bilder. Es wurden $n = 3$ Organe in jeder Gruppe gefärbt und evaluiert.

Die Färbungen der Hoden von $Ins2^{Akitas+/-}$ mit anti-RAGE (Abbildung 21) zeigten in allen vier Gruppen ein ähnliches Muster und wiesen darauf hin, dass RAGE im Tubulus des Hodens lokalisiert ist. Am deutlichsten zeigte sich eine Färbung der Spermatogonien (Doppelpfeil in B+D) und stellenweise der Spermatozyten zweiter Ordnung. Zum Zeitpunkt von 12 Wo. zeigte sich im d. Tier vereinzelt das Zytoplasma von Sertoli-Zellen sowie Keim- und Sertoli-Zellkerne gefärbt. Während in n.d. $Ins2^{Akitas+/-}$ keine Färbung im Interstitium aufzufinden war, konnte im d. Tier eine dezente Interstitiumfärbung wie auch eine Färbung im Bereich der Basalmembran des Tubulus detektiert werden (Pfeil in C). In den 24 Wo. alten $Ins2^{Akitas+/-}$ war die RAGE-Färbung in beiden Gruppen schwächer ausgeprägt. Bei den d. Tieren waren v.a. Spermatogonien kräftig gefärbt, während die übrigen Keimzellen sowie Sertoli-Zellen eine schwache Zytoplasma-Färbung aufzeigten.

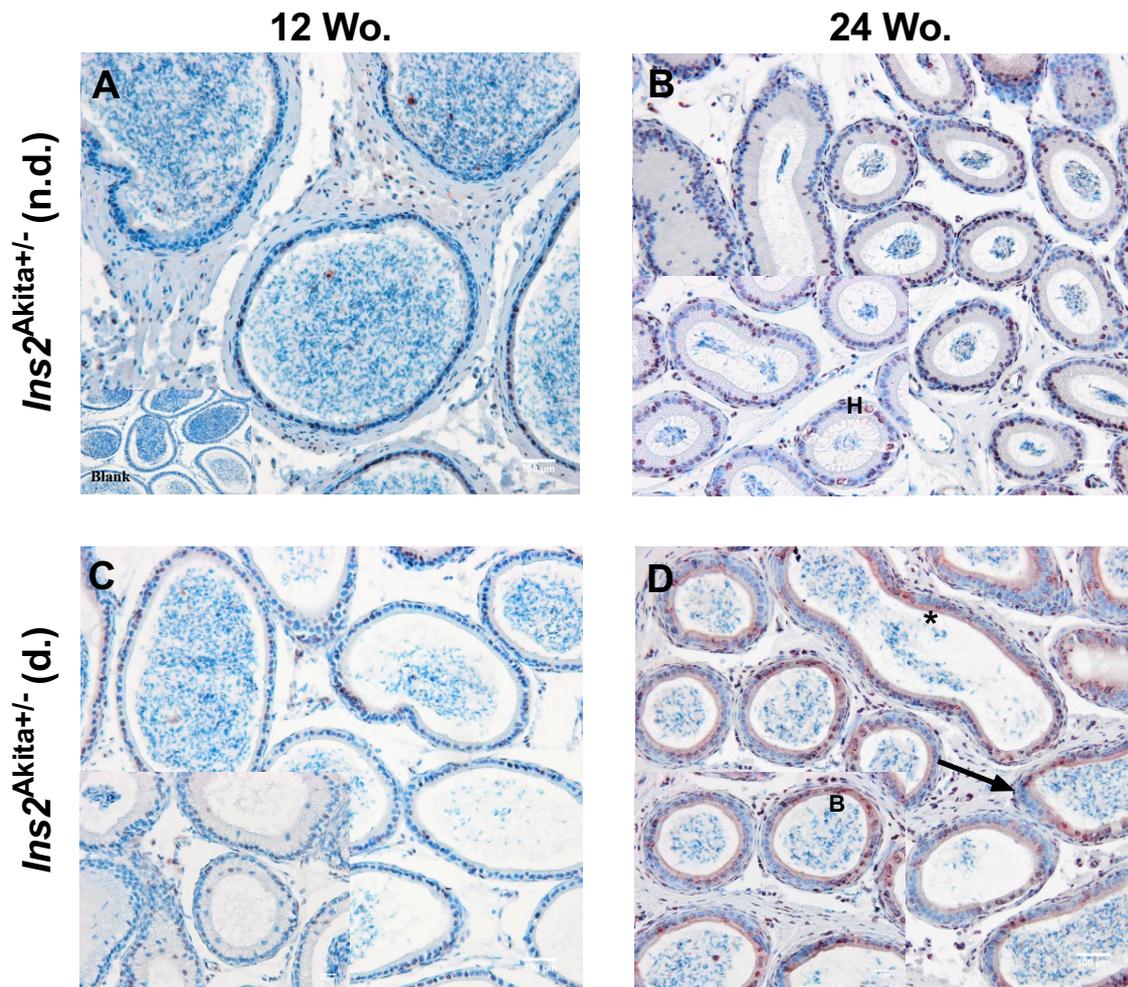


Abbildung 22: Lichtmikroskopische anti-RAGE-Färbung des Nebenhodens

Abgebildet sind in 200-facher Vergrößerung anti-RAGE-Färbungen von n.d. (A+B) und d. (C+D) *Ins2^{Akita+/-}* Mäusen im Alter von 12 und 24 Wo.. Der Blank ist in (A) in der linken unteren Ecke abgebildet. In (B-D) sind in den linken unteren Ecken 400-fache Vergrößerungen dargestellt. Der Pfeil in (D) zeigt auf die Basalmembran des Tubulus, das * auf die Stereozilien und das B auf eine Basalzelle. In der Vergrößerung in (B) ist mit H eine Hauptzelle markiert. Die Abbildung zeigt repräsentative Bilder. Es wurden n = 3 Organe in jeder Gruppe gefärbt und evaluiert.

Färbungen des Nebenhodens mit anti-RAGE (Abbildung 22) wiesen in allen vier Tiergruppen vorrangig RAGE-positive Basal- und Hauptzellen auf (siehe Markierungen H in B und B in D). Bei identischen Färbbedingungen war die RAGE-Färbung im Nebenhoden weniger ausgeprägt als im Hodengewebe. Während Zellen des Interstiums bei 12 Wo. alten n.d. Tieren nur vereinzelt RAGE positiv waren, wiesen 24 Wo. alte n.d. *Ins2^{Akita+/-}* zusätzlich

Färbungen des Endothels, des Zytoplasmas von Basal- und Hauptzellen und der glatten Muskulatur auf. Das Färbemuster von 12 und 24 Wo. alten d. *Ins2*^{Akita+/-} entsprach dem der 24 Wo. n.d. Tiere, nur dass zusätzlich Stereozilien (siehe * in D) sowie vereinzelt die Basalmembran des Tubulus (siehe Pfeil in D) positiv für RAGE waren und dass bei 24 Wo. alten d. Tieren die Färbungen im Interstitium eindrücklicher war.

Die qRT-PCR-Analyse (Tabelle 6) des *RAGE* Gens diente der ergänzenden Quantifizierung der RAGE-Expression. Im Vergleich der 12 Wo. alten Mäuse war hinsichtlich der messenger RNS (mRNS) Expression von *RAGE* im Hoden kein Unterschied auszumachen, während jedoch ein Trend zur mRNS-Expressionssteigerung in den 24 Wo. alten d. *Ins2*^{Akita+/-} zu erkennen war. Im Nebenhoden konnten keine Veränderungen zwischen den Gruppen detektiert werden.

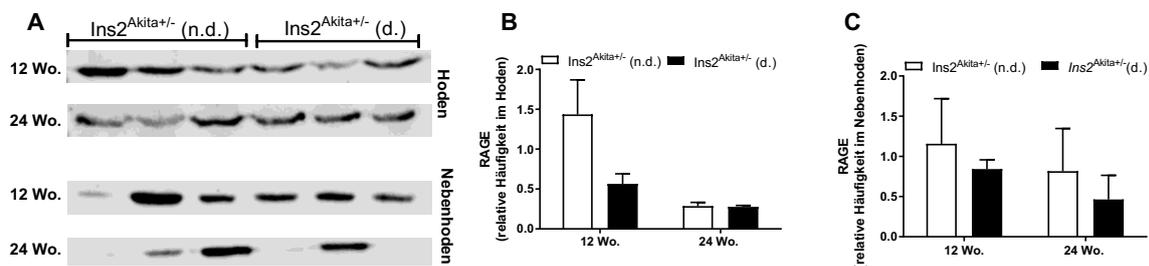


Abbildung 23: Quantitative Auswertung des Western Blots für RAGE in Hoden und Nebenhoden

Dargestellt ist der Hoden in (B) und Nebenhoden (C) von n.d. und d. *Ins2*^{Akita+/-} Mäusen im Alter von 12 und 24 Wo.. Abbildung (A) zeigt den qualitativen Western Blot. Durchgeführt wurden n = 5 Experimente, von denen drei dargestellt sind.

Um die anti-RAGE Färbungen zu quantifizieren, wurde ein Western Blot für RAGE Abbildung 23 durchgeführt. Jener zeigte, dass sowohl im Hoden wie auch Nebenhoden eine Abnahme von RAGE zwischen 12 und 24 Wo. stattfand, welche jedoch nicht signifikant wurde. Zudem konnten keine signifikanten Differenzen zwischen n.d. und d. *Ins2*^{Akita+/-} beobachtet werden. Es bestand die Tendenz, dass in d. *Ins2*^{Akita+/-} im Vergleich zu n.d. weniger RAGE nachzuweisen war.

3.1.3.3 Liganden-RAGE-Interaktion und Aktivierung der RAGE-Signalkaskade in der *Ins2*^{Akita+/-} Maus

Die vorangegangenen Untersuchungen deuteten darauf hin, dass d. Mäuse eine vermehrte Produktion von AGE aufweisen. Daher wurden die Signalkaskaden untersucht, welche durch die Liganden-RAGE-Interaktion aktiviert werden.

Der Fokus wurde dabei auf die in Kapitel 1.1.12 genannten Gene gelegt, da diese in direktem Zusammenhang zur Interaktion von AGEs bzw. HMGB1/2 und RAGE stehen. Tabelle 7 stellt die Expression jener Gene dar.

Tabelle 7: Statistische Übersicht aus qRT-PCR-Analysen über die einzelnen Gene der Liganden-RAGE-Interaktion

Statistik	Gen	<i>Ins2</i> ^{Akita+/-} n.d. 12 Wo.	<i>Ins2</i> ^{Akita+/-} n.d. 24 Wo.	<i>Ins2</i> ^{Akita+/-} d. 12 Wo.	<i>Ins2</i> ^{Akita+/-} d. 24 Wo.	Signifikanzen
Interakteure des Liganden-RAGE Signalweges						
Median der relativen mRNS Expression, (Intervall; und Interquartil-abstand) aus n=3-9 Organen	<i>ERK1</i> Hoden	0,16, (0,01-7,13; 0,15)	0,03, (0-6,73; 0,1)	0,42, (0,18-19,68; 3,615)	0,035, (0-0,8; 0,0925)	12 Wo. d. vs. 24 Wo. d p = 0,0108
	<i>ERK1</i> Nebenhoden	0,97, (0-2,27; 1,95)	0,97, (0,97-1,06; 0,09)	0,16, (0-1,9; 1,02)	5,84, (0,01-20,14; 6,63)	12 Wo. d. vs. 24 Wo. d p = 0,0070
	<i>ERK2</i> Hoden	0,715, (0,17-2,43; 1,278)	0,34, (0,17-2,58; 2,04)	2,06, (0,6-5,13; 3,91)	0,495, (0,24-35,07; 3,9155)	n.s.
	<i>ERK2</i> Nebenhoden	0,08, (0,01-6,58; 0,13)	1,24, (0,26-1,51; 1,25)	0,1, (0,01-0,28; 0,1975)	0,64, (0,1-1,25; 0,58)	12 Wo. d. vs. 24 Wo. d p = 0,0349
	<i>Akt1</i> Hoden	0,45, (0,01-3,44; 1,87)	0,18, (0,01-5,66; 0,86)	1,29, (0,03-5,47; 4,235)	0,01, (0-0,025; 0,05)	12 Wo. d. vs. 24 Wo. d p = 0,0030
	<i>Akt1</i> Nebenhoden	0,965, (0-2,26; 1,915)	0,17, (0-2,83; 2,83)	0,09, (0-2,61; 1,54)	0,04, (0-0,29; 0,165)	n.s.
	<i>Cdc42</i> Hoden	0,94, (0,04-2,32; 1,745)	0,34, (0-3,61; 1,37)	1,335, (0,65-3,97; 0,723)	0,015, (0-0,06; 0,0275)	12 Wo. d. vs. 24 Wo. d p = 0,0009
	<i>Cdc42</i> Nebenhoden	0,58, (0-2,53; 1,81)	0,27, (0,01-2,72; 2,71)	0,535, (0-17,13; 9,123)	0,55, (0,03-2,85; 1,11)	n.s.

Die Expression der *Akt1* und *Cdc42* Gene im Hoden zeigte sowohl im Gruppen- als auch Zeitvergleich eine gleichartige Tendenz. Bei 12 Wo. alten d. *Ins2*^{Akita+/-} bestand ein leichter Trend der Expressionszunahme. Bei 24 Wo. alten Tieren kam es sowohl bei *Akt1* ($p = 0,0030$) als auch *Cdc42* ($p = 0,0009$) zu einer signifikanten Verminderung innerhalb der d. Gruppe.

In der Analyse der Nebenhodenproben war bei *Akt1* bereits in den 12 Wo. alten d. *Ins2^{Akitas+/-}* der Trend einer Expressionsreduktion auszumachen, welcher sich bei 24 Wo. fortsetzte. Die Expression von *Cdc42* im Nebenhoden wies keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Gruppen auf.

In der qRT-PCR-Analyse (Tabelle 7) wurde deutlich, dass sich die Expression der Gene *ERK1* und *2* unterschieden. Die Expression von *ERK1* zeigte im Hoden eine signifikante Expressionsreduktion im zeitlichem Verlauf innerhalb der d. Gruppe ($p = 0,0108$). Gegensätzlich hierzu stellte sich die Genexpression im Nebenhoden dar. Hier zeigte sich eine signifikante Zunahme bei d. *Ins2^{Akitas+/-}* im zeitlichem Verlauf ($p = 0,0070$). Auch die Expression von *ERK2* war zwischen Hoden- und Nebenhodengewebe unterschiedlich. Im Hoden bestand ein leichter Trend der Expressionszunahme bei 12 Wo. alten d. *Ins2^{Akitas+/-}*, während diese im Nebenhoden signifikant im Vergleich zu d. 24 Wo. alten *Ins2^{Akitas+/-}* reduziert war ($p = 0,0349$).

Aufgrund der signifikanten Regulierungen von *Akt* und *ERK* auf Genebene wurde ein Multiplex, dargestellt in Abbildung 24 (*Akt*) und Abbildung 25 (*ERK*), in Hoden (A) und Nebenhodengewebe (B) durchgeführt.

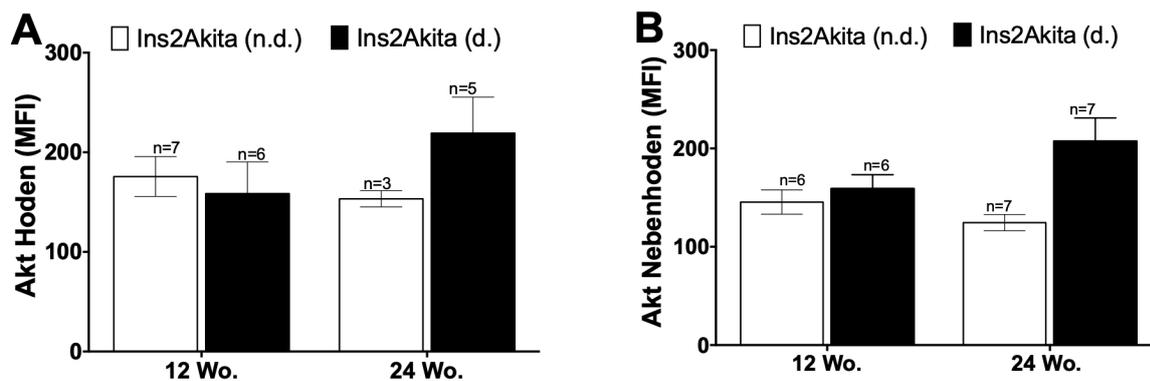


Abbildung 24: Graphische Darstellung der Proteinbestimmung von Akt über eine Multiplex-Analyse in Hoden und Nebenhoden

Abbildung 24 zeigt die Proteinbestimmung von Akt1 im Hoden (A) und Nebenhoden (B) von 12 und 24 Wo. alten n.d. und d. *Ins2^{Akitas+/-}*. Die Proteinkonzentrationen von Akt (ser473) zeigte bei 12 Wo. alten Tieren weder im Hoden (A) noch Nebenhoden (B) Unterschiede zwischen den Gruppen. Bei 24 Wo. bestand in Hoden und Nebenhoden d. Tiere ein Trend der Zunahme von Akt. Bei Zusammenfassung der Daten aus 12 und 24 Wo. alten d. Nebenhoden wurde dieser signifikant ($p = 0,0101$).

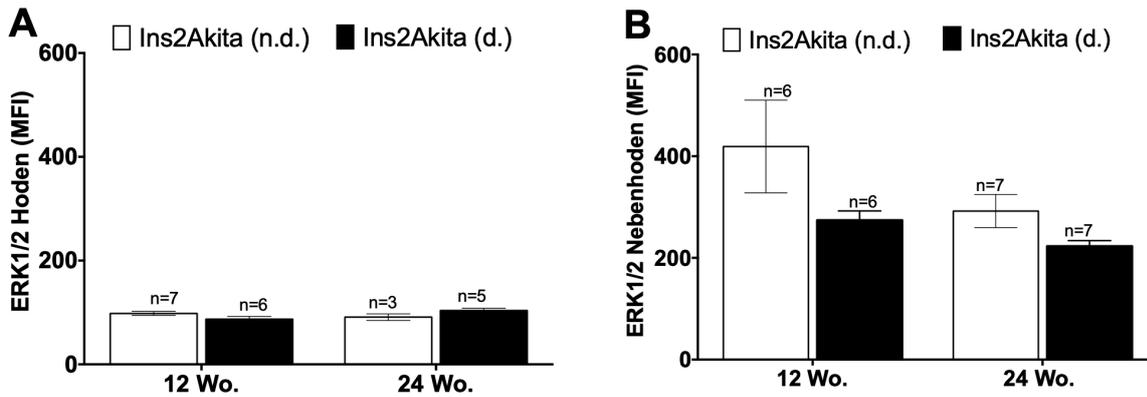


Abbildung 25: Graphische Darstellung der Proteinbestimmung von ERK1/2 über eine Multiplex-Analyse in Hoden und Nebenhoden

In Abbildung 25 ist die Proteinbestimmung von ERK1/2 des Hodens (A) und Nebenhodens (B) von 12 und 24 Wo. alten n.d. und d. *Ins2^{Akitas+/-}* dargestellt. Im Hoden (A) konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen erfasst werden. Im Nebenhoden (B) zeigte sich bei den d. Mäusen der Trend einer Proteinreduktion. Diese ergänzte das Muster der Genexpression von *ERK2*. Zudem wurde deutlich, dass die Proteinkonzentration von ERK1/2 im Nebenhoden (Mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) von ca. 300) im Vergleich zu der im Hoden (MFI von ca. 100) größer war. Im Vergleich aller Hoden ($95,33 \pm 12,31$) und Nebenhodendaten ($307,7 \pm 140,9$) zeigte sich eine signifikante Zunahme von ERK1/2 im Nebenhoden ($p < 0,0001$).

Für die Proteinanalysen von Nf- κ B sowie des aktivierten und somit an Serin 276 phosphorylierten Nf- κ Bs wurden Immunfluoreszenzfärbungen (Abbildung 26+27) der Hoden und Nebenhoden (Abbildung 28) von 12 und 24 Wo. alten n.d. und d. *Ins2^{Akitas+/-}* durchgeführt.

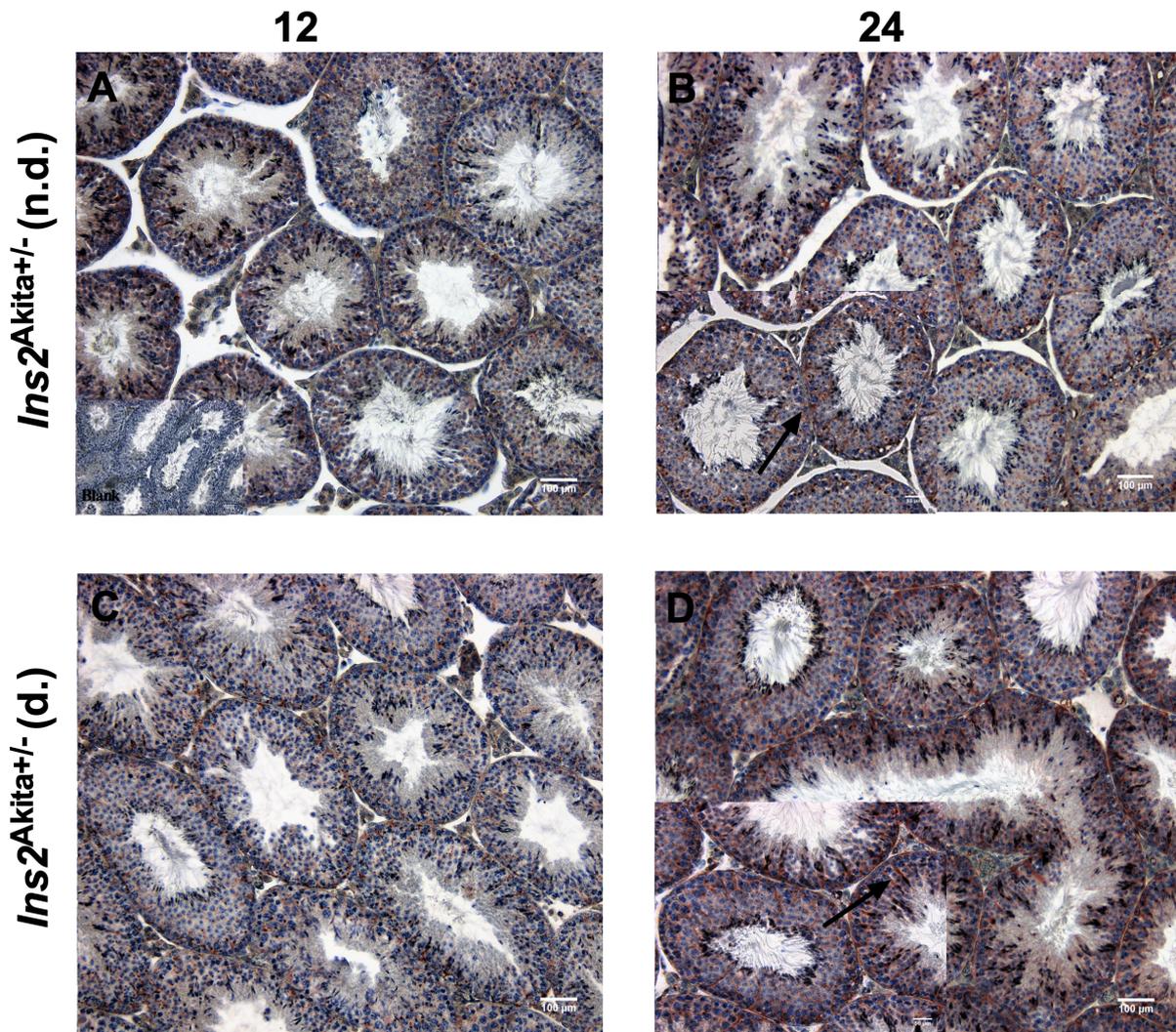


Abbildung 26: Lichtmikroskopische anti-Nf- κ B-Färbung des Hodens

Abgebildet ist in 200-facher Vergrößerung eine anti-Nf- κ B-Färbung von n.d. (A+B) und d. (C+D) *Ins2^{Akita+/-}* Mäusen im Alter von 12 und 24 Wo.. Der Blank ist in (A) in der linken unteren Ecke abgebildet. Jeweils in der linken unteren Ecke (B+D) ist eine 400-fache Vergrößerung eingefügt. Die Pfeile in (B+D) zeigen auf das Zytoplasma von Sertoli-Zellen. Die Abbildung zeigt repräsentative Bilder. Es wurden $n = 3$ Organe in jeder Gruppe gefärbt und evaluiert.

Abbildung 26 zeigt eine Nf- κ B-Färbung des Hodens. Das Interstitium war bis auf vereinzelte Blutgefäße in allen vier Gruppen negativ für Nf- κ B. Während sowohl in den n.d. wie auch d. (A+C) 12 Wo. alten *Ins2^{Akita+/-}* vereinzelte punktuelle Nf- κ B-Färbungen des Zytoplasmas von Sertoli-Zellen aufzuweisen waren, war dies bei 24 Wo. (siehe Pfeile in B+D) deutlicher.

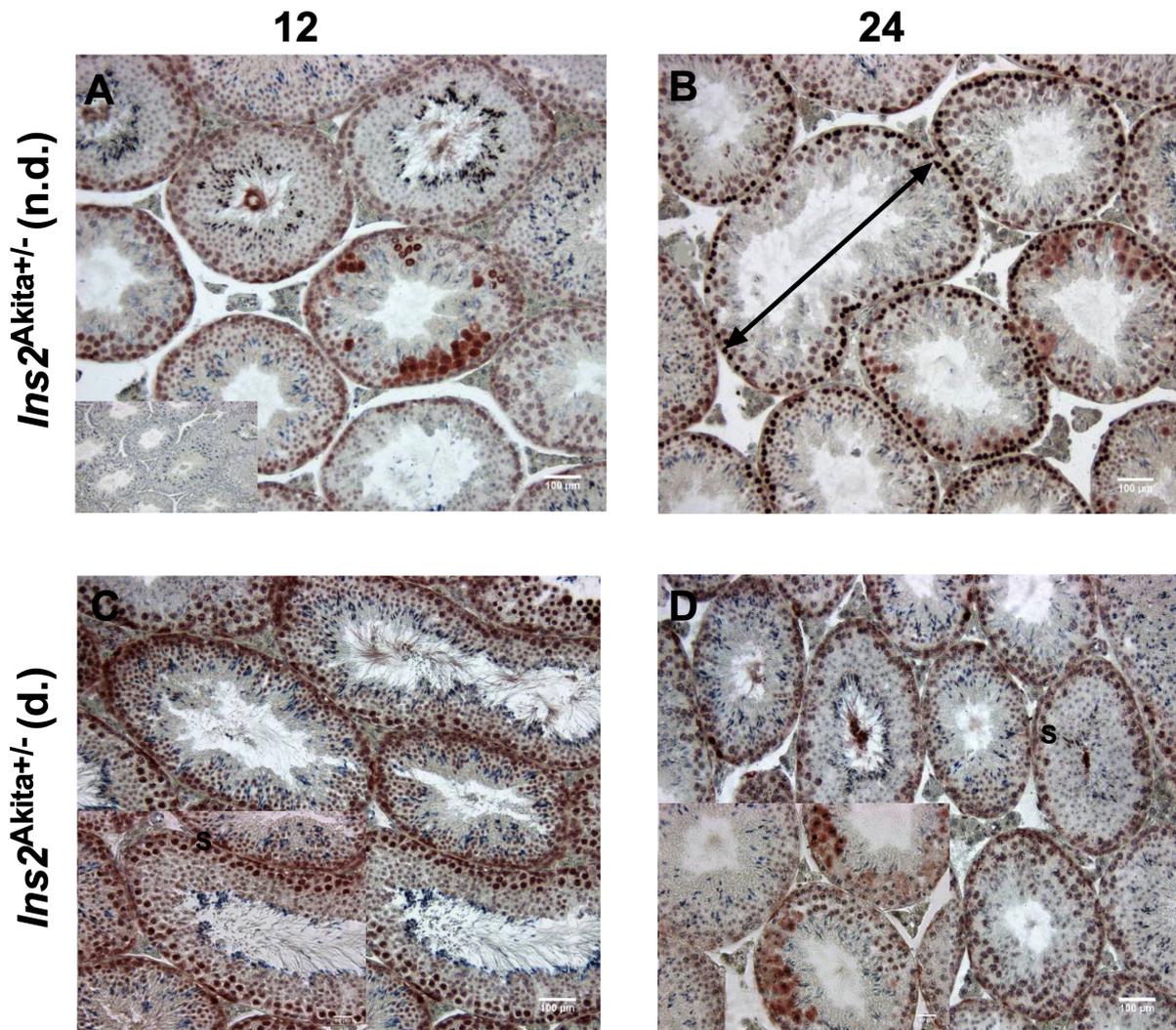


Abbildung 27: Lichtmikroskopische anti-phospho-Nf-κB Serin 276 Färbung des Hodens

Abgebildet ist in 200-facher Vergrößerung eine anti-phospho-Nf-κB Serin 276 Färbung von n.d. (A+B) und d. (C+D) *Ins2^{Akita+/-}* Mäusen im Alter von 12 und 24 Wo.. Der Blank ist in (A) in der linken unteren Ecke abgebildet. Jeweils in der linken unteren Ecke (C+D) ist eine 400-fache Vergrößerung eingefügt. Der Doppelpfeil (B) markiert die Zellkerne der Spermatogonien. Mit S (D) sind Sertoli-Zellkerne markiert. Die Abbildung zeigt repräsentative Bilder. Es wurden n = 3 Organe in jeder Gruppe gefärbt und evaluiert.

Abbildung 27 stellt eine Färbung des Hodens von n.d. und d. *Ins2^{Akita+/-}* Mäusen mit dem aktivierten Nf-κB (p-Nf-κB) dar, welches an Serin 276 phosphoryliert ist. Insgesamt wiesen alle Gruppen ein ähnliches Färbemuster auf. Während im Interstitium mit Ausnahme von vereinzelt Endothelzellen keine Anfärbung auftrat, waren die Spermatogonien (Doppelpfeil in B) und Spermatozyten in allen Gruppen positiv für p-Nf-κB. Zudem waren die

Zellkerne weiterer Keimzellreifestadien, am deutlichsten in den d. Tieren (C+D), aber auch in einzelnen Tubuli von 24 Wo. alten n.d.Tieren gefärbt. Ferner zeigten sich Sertoli-Zellkerne (markiert in D) in allen Gruppen und vereinzelt Myofibroblastenzellkerne und Basalmembranstrukturen (Pfeil in D) positiv für p-Nf- κ B. Die Spermatozoen waren diffus gefärbt (deutlich in A+D).

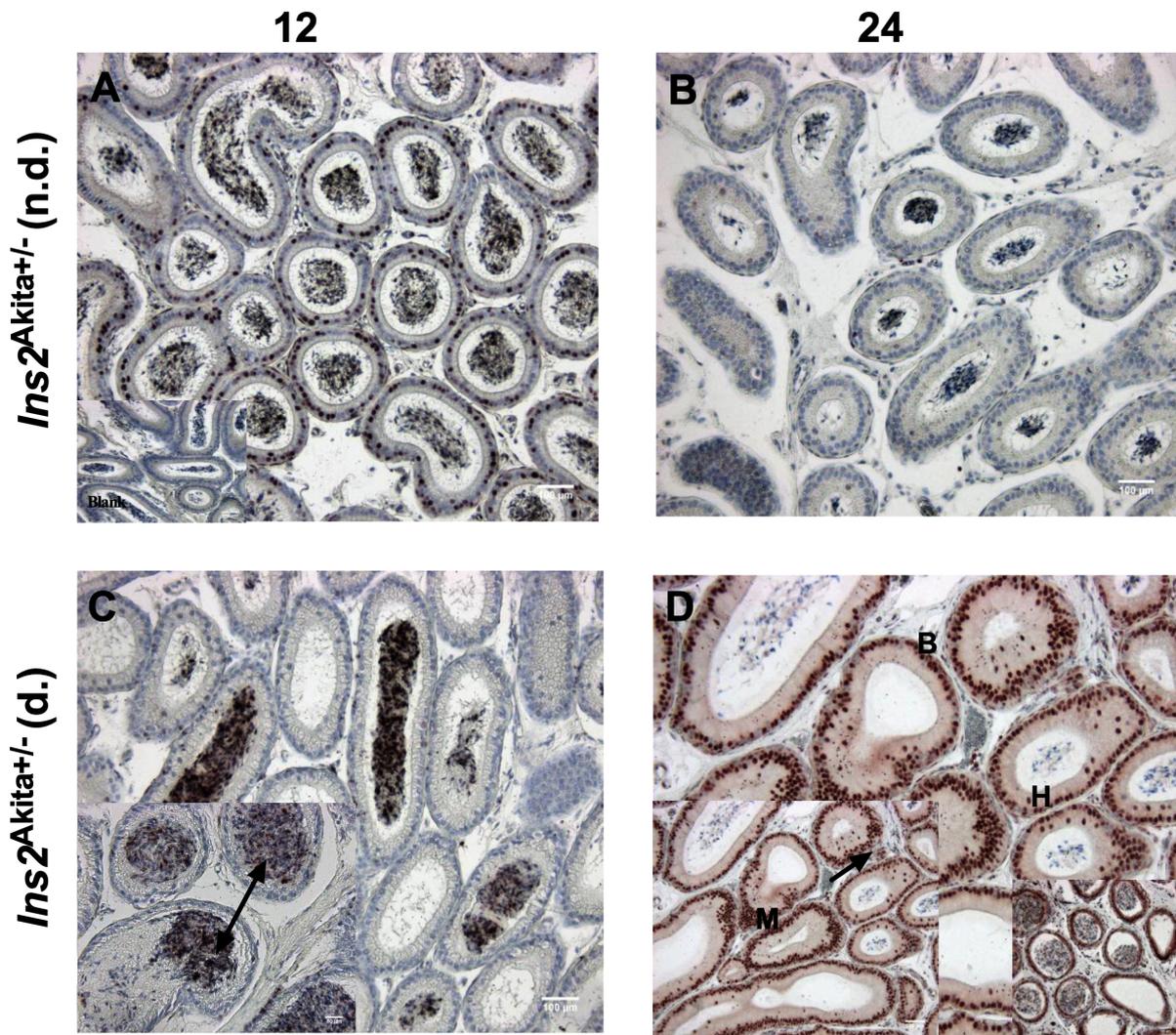


Abbildung 28: Lichtmikroskopische anti-phospho-Nf- κ B Serin 276 Färbung des Nebenhodens

Abgebildet ist in 200-facher Vergrößerung eine anti-phospho-Nf- κ B Serin 276 Färbung von n.d. (A+B) und d. (C+D) *Ins2^{Akita+/-}* Mäusen im Alter von 12 und 24 Wo.. Der Blank ist in (A) in der linken unteren Ecke abgebildet. Jeweils in der linken bzw. rechten unteren Ecke (C+D) sind 400-fache Vergrößerungen eingefügt. Der Doppelpfeil (C) markiert die Spermatozoen. Mit dem Pfeil (D) ist ein Blutgefäß, mit M (D) Myofibroblasten, mit B (D) Basalzellen und mit H (D) Hauptzellen markiert. Die Abbildung zeigt repräsentative Bilder. Es wurden $n = 3$ Organe in jeder Gruppe gefärbt und evaluiert.

Die Färbung mit p-Nf- κ B im Nebenhoden wies bei n.d. 12 Wo. alten (A) und d. 24 Wo. alten *Ins2*^{Akita+/-} (D) deutliche Färbungen der Zellkerne von Basal- und Hauptzellen (Markierungen B und H in D) auf, während in den 24 Wo. alten n.d. Tieren (B) keine und in den 12 Wo. alten d. Tieren (C) nur Färbungen der Spermatozoen (Doppelpfeil) nachzuweisen waren. Bei den 24 Wo. alten *Ins2*^{Akita+/-} (D) waren zudem Endothelzell- (Pfeil) und vereinzelt Myofibroblastenzellkerne positiv für p-Nf- κ B.

Zur weiteren Untersuchung des Nf- κ B-Signalwegs wurde die genetische Expression einiger an der Aktivierung beteiligter Gene (siehe Kapitel 1.1.13) untersucht und in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Statistische Übersicht aus qRT-PCR-Analysen von Genen der Nf- κ B-Aktivierung

Statistik	Gen	<i>Ins2</i> ^{Akita+/-}	<i>Ins2</i> ^{Akita+/-}	<i>Ins2</i> ^{Akita+/-}	<i>Ins2</i> ^{Akita+/-}	Signifikanzen
		n.d. 12 Wo.	n.d. 24 Wo.	d. 12 Wo.	d. 24 Wo.	
Nf-κB-Aktivierung						
Median, (Intervall; und Interquartil- abstand) aus n = 3-9 Organen	<i>IKBKB</i> Hoden	0,26, (0,075- 4,43; 1,718)	0,29, (0-4,8; 0,92)	0,82, (0,12- 9,55; 3,985)	0,3, (0,09- 12,09; 2,763)	n.s.
	<i>IKBKB</i> Nebenhoden	0,55, (0,01-2,8; 2,1755)	0,03, (0-2,97; 2,97)	0,24, (0,02- 3,93; 1,765)	0,34, (0,03-7,4; 1,1)	n.s.
	<i>NFKBIA</i> Hoden	0,175, (0,03- 6,17; 0,74)	0,075, (0,01- 3,45; 2,615)	0,68, (0,01- 11,3; 2,725)	0,245, (0- 4,78; 0,59)	n.s.
	<i>NFKBIA</i> Nebenhoden	0,675, (0- 3,28; 1,27)	0,56, (0-2,44; 2,44)	0,74, (0- 3,97; 1,8955)	2,235, (0- 12,29; 4,955)	n.s.
	<i>RELA</i> Hoden	0,515, (0,15- 3,15; 1,6875)	0,28, (0-2,99; 2,59)	2,27, (0,17- 13,06; 4,24)	1,415, (0,08- 3,93; 2,8575)	n.s.
	<i>RELA</i> Nebenhoden	0,215, (0,05-5,1; 1,45)	0,55, (0,26- 2,19; 1,93)	0,315, (0,03- 11,26; 2,4855)	0,32, (0,05- 3,63; 1,515)	n.s.
	<i>Nrf2</i> Hoden	0,45, (0,08- 2,93; 2,1025)	0,29, (0,07- 3,54; 1,1)	1,31, (0,06- 6,29; 3,91)	0,6, (0,09- 4,46; 1,4675)	n.s.
	<i>Nrf2</i> Nebenhoden	0,73, (0,33- 3,53; 0,31)	0,17, (0,11- 2,72; 2,61)	0,985, (0,17- 12,41; 2,4175)	0,43, (0- 1,18; 0,38)	n.s.

Sowohl *IKBKB*, *NFKBIA* und *RELA* wiesen den Trend einer Expressionssteigerung in 12 Wo. alten d. Hoden auf, welcher jeweils zum Zeitpunkt von 24 Wo. rückläufig war. Während sich im Nebenhoden bei *IKBKB* und *RELA* keine Veränderungen zeigten, war bei *NFKBIA* im zeitlichen Verlauf in der d. *Ins2*^{Akita+/-} eine Zunahme der Genexpression zu erkennen. *Nrf2*, ein antiinflammatorisches Gen, zeigte im Hoden und Nebenhoden den Trend der Expressionszunahme bei 12 Wo. alten d. Tieren.

Um eine weitere Vorstellung davon zu erlangen, ob es durch Aktivierung der Liganden-RAGE-Signalkaskaden zu einer proinflammatorischen Antwort kommt, wurden einige inflammatorische Gene (Kapitel 1.1.13) über RT-qPCR (Tabelle 9) detektiert.

Tabelle 9: Statistische Übersicht aus qRT-PCR-Analysen über inflammatorische Gene

Statistik	Gen	<i>Ins2</i> ^{Akita+/-}	<i>Ins2</i> ^{Akita+/-}	<i>Ins2</i> ^{Akita+/-}	<i>Ins2</i> ^{Akita+/-}	Signifikanzen
		n.d. 12 Wo.	n.d. 24 Wo.	d. 12 Wo.	d. 24 Wo.	
Inflammation						
Median, (Intervall; und Interquartil- abstand) aus n = 3-9 Organen	<i>IL-1α</i> Hoden	0,95, (0,05-2,69; 1,44)	0,36, (0,17-3,86; 1,4405)	0,4, (0,03- 1,69; 0,575)	1,335, (0,04- 8,23; 4,5175)	n.s.
	<i>IL-1α</i> Nebenhoden	0,96, (0,13-2,21; 1,3455)	0,47, (0,15-2,38; 2,23)	0,42, (0,03- 11,14; 5,13)	0,46, (0,15- 0,66; 0,38)	n.s.
	<i>IL-1β</i> Hoden	0,88, (0,18-2,01; 0,85)	0,53, (0,02-4,22; 1,545)	1,17, (0,03- 4,12; 3,145)	0,17, (0,03- 1,36; 0,32)	n.s.
	<i>IL-1β</i> Nebenhoden	0,19, (0,02-3,54; 2,02)	1,235, (0,06- 2,85; 2,6655)	0,17, (0,05- 11,14; 1,93)	0,245, (0,01- 0,68; 0,485)	n.s.
	<i>TNF-α</i> Hoden	1,14, (0,16-1,84; 1,52)	0,405, (0,09- 4,41; 1,463)	0,87, (0,01- 6,71; 3,035)	0,4, (0,09- 24,16; 0,58)	n.s.
	<i>TNF-α</i> Nebenhoden	0,24, (0,06-4,68; 1,018)	1,31, (0,08-2,68; 2,485)	0,1, (0,01- 11,14; 0,3775)	0,255, (0- 2,18; 0,6425)	n.s.
	<i>IL-10</i> Hoden	0,7, (0,09- 3,11; 1,27)	0,385, (0,09- 3,93; 1,695)	0,28, (0,09- 4,14; 1,62)	0,555, (0,05- 2,51; 1,2875)	n.s.
	<i>IL-10</i> Nebenhoden	0,005, (0- 6,95; 0,105)	1,42, (0,15-2,38; 2,128)	0,04, (0- 11,14; 0,07)	0,845, (0,15- 2,07; 1,618)	n.s.

In der Analyse der Hoden bzgl. der Expression von *IL-1 α* zeigte sich lediglich der Trend einer Zunahme in den 24 Wo. alten d. Proben. Dieser konnte im Nebenhoden bereits bei 12 Wo. detektiert werden und nahm bei 24 Wo. wieder ab. Das *IL-1 β* Gen zeigte hingegen bereits bei 12 Wo. eine Expressionssteigerung im Hoden- und Nebenhodengewebe von d. *Ins2^{Akitas+/-}*, welche bei 24 Wo. rückläufig war. Bei der Expression von *TNF- α* und *IL-10* konnten weder im Hoden noch im Nebenhodengewebe Unterschiede zwischen den Gruppen detektiert werden. Damit fand sich kein Hinweis auf eine Aktivierung inflammatorischer Gene.

3.2 Studien an der WL-3 Sertoli-Zelllinie

3.2.1 Charakterisierung der WL-3 Sertoli-Zelllinie

In Kapitel 1.2.1 wurde die Funktion der Sertoli-Zellen beschrieben und deren Relevanz für eine physiologisch ablaufende Spermatogenese betont. So ist bekannt, dass Schädigungen der Sertoli-Zelle die Keimzellreifung negativ beeinflussen und zu Infertilität führen können^{5,6,115,168}. Zudem besteht ein kausaler Zusammenhang zwischen erhöhtem OS, der Akkumulation von AGEs und der Aktivierung der RAGE-Signalkaskade mit einer gestörten Sertoli-Zell-Funktion^{61,67,78,158,168}. Um den direkten Einfluss der diabetischen Stoffwechsellage, insbesondere der Hyperglykämie, auf die Funktion der Sertoli-Zelle und im Hinblick auf die durch AGE-RAGE-Interaktion regulierten Signalkaskaden zu untersuchen, wurden *In-vitro*-Versuche an der immortalisierten Maus Sertoli-Zelllinie “WL-3” durchgeführt.

Diese Zelllinie wurde 2001 von Mueller und Korach etabliert und der Sertoli-Zell-Charakter über eine qRT-PCR-Analyse mit spezifischen Sertoli-Zell-Genen bestätigt¹⁵⁵. So wies die Zelllinie die Expression der spezifischen Marker SRY-Box-9 (SOX-9), Androgen Rezeptor, Vimentin, Inhibin a und b, jedoch keine Expression des FSH-Rezeptors (follikelstimulierendes Hormon) auf¹⁴³.

Um die WL-3 Zellen genauer zu charakterisieren, wurde im weiteren Verlauf mit Hilfe des JuLI™ Br Live Cell Analyzer (VWR International GmbH, Deutschland) die Konfluenz nach 24, 48, 72 und 96 Std. ermittelt (Abbildung 28). Hierüber konnte für die Dosis-Wirkungs-Studien eine adäquate Zelldichte ermittelt werden.

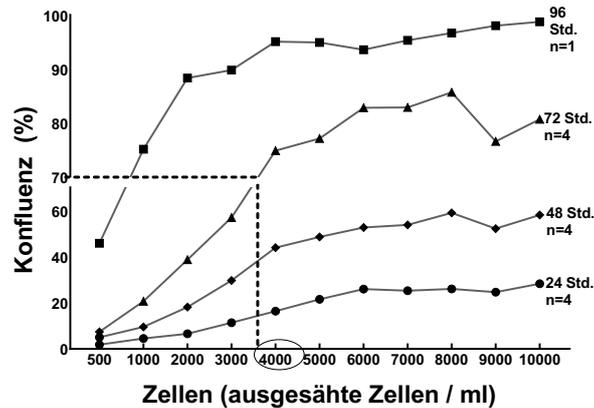


Abbildung 28: Bestimmung der Konfluenz der WL-3 Sertoli-Zellen nach 24, 48, 72 und 96 Std.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten, dass nach dem Aussäen von 4000 Zellen/ml die Sertoli-Zellen nach 72 Std. zu 70% konfluent gewachsen waren. Daraus ergab sich ferner eine Dopplungsrate von ca. 11 Std..

3.2.2 ED-50 Toxizitätstest für MG und Glukose an WL-3 Zellen

Des Weiteren wurde die mittlere Effektivdosis (ED-50) von Glukose (Abbildung 29 A) und MG (B) eruiert, um zu ermitteln, welche Konzentrationen toxische Wirkungen auf die Sertoli-Zelle haben.

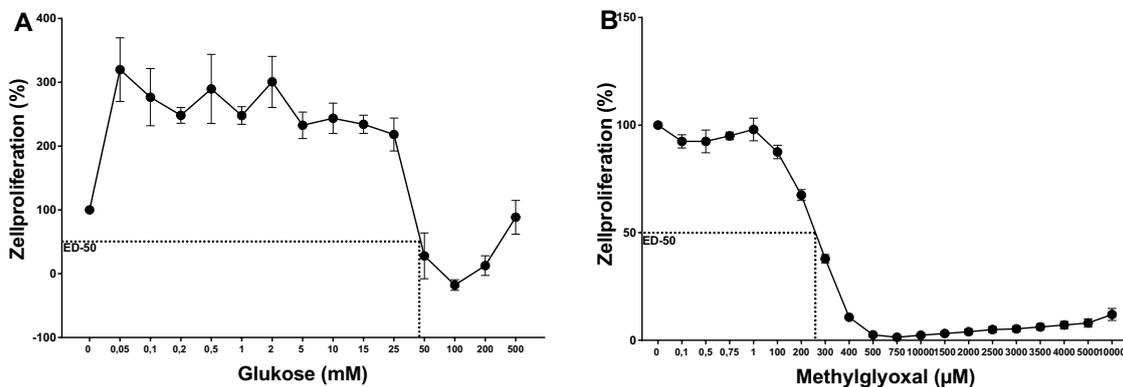


Abbildung 29: Bestimmung der Zellproliferation von Sertoli-Zellen in % nach 24 Std.

Dargestellt sind graphische Auswertungen von Behandlungen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Glukose in mM (A) und Methylglyoxal in μM (B) umgesetzt. Es wurden jeweils $n = 4$ Experimente durchgeführt.

Deutlich wurde, dass die Zellproliferation unter dem Einfluss von Glukose (A) zwischen 0,5 bis 25 mM anstieg. Dies verdeutlicht, dass WL-3-Zellen unter Zufuhr von Glukose als Energiesubstrat besser wachsen als in glukosefreiem Medium. Ab einer Glukosekonzentration von 25 mM zeigte sich jedoch ein drastischer Abfall der Proliferationsrate bis hin zu einem Proliferationsarrest ab von ca. 50 mM (ED-50 für Glukose).

Abbildung 29 B verdeutlicht, dass die Zellproliferation ab einer MG-Konzentration von ca. 100 μ M abnimmt und dass sich bereits ab ca. 250 μ M MG 50% der Sertoli-Zellen im Zellzyklusarrest bzw. in Apoptose befanden (ED-50 für MG). Ab Konzentrationen von 400 μ M waren 90% der Zellen von der MG-Toxizität beeinträchtigt.

Um zu untersuchen, ob die Proliferationsabnahme durch Apoptose verursacht wurde, wurden die Zellen mit 0, 1, 250 oder 400 μ M MG für 24 Std. behandelt und anschließend mittels FACS für Annexin V und PI (spezifische Marker der frühen und späten Apoptose) analysiert (Abbildung 30 A+ B).

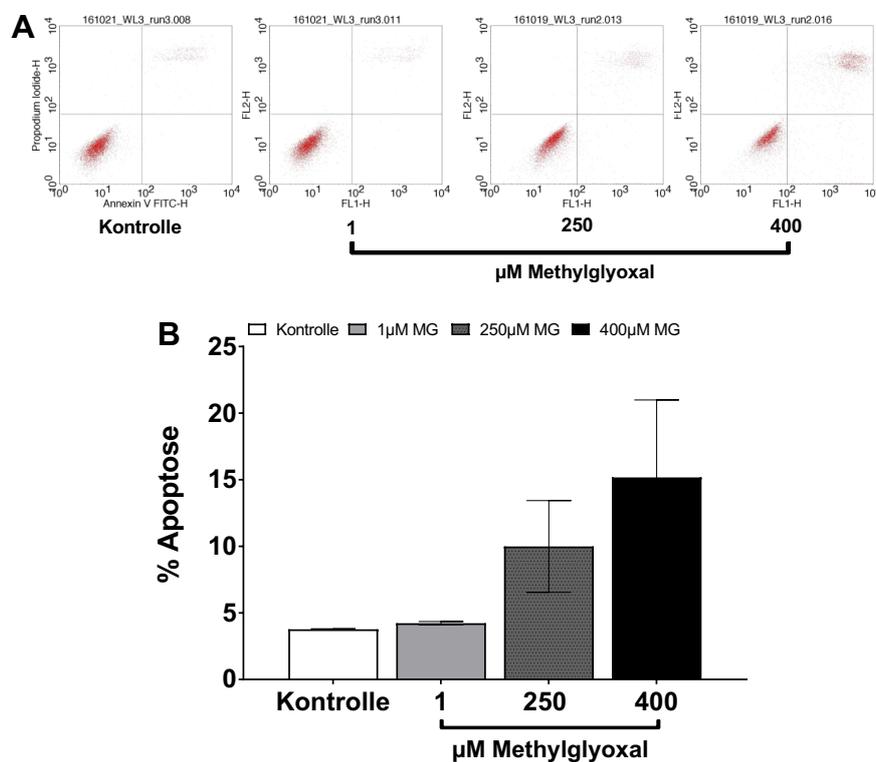


Abbildung 30: Apoptosedetektion in Sertoli-Zellen über FACS nach Behandlungen mit MG

In (A) dargestellt sind die Ergebnisse der FACS-Analyse der WL-3 Sertoli-Zellen (links die Kontrolle ohne Methylglyoxal, daneben nach Behandlung mit 1, 250 und 400 μ M Methylglyoxal). B stellt die quantitative Auswertung der doppelt positiven apoptotischen

Zellen (positiv für PI und Annexin V) in % nach 1, 250 und 400 μM Behandlung mit Methylglyoxal und ohne Behandlung dar.

Abbildung 30 weist auf, dass sich bei einer Konzentration von 250 μM MG die Apoptoserate verdoppelte und bei 400 μM MG weiter anstieg.

3.2.3 MG und Liganden-RAGE-Interaktion innerhalb der WL-3 Zelllinie

Folgendes Kapitel dient dem Nachweis der Liganden-RAGE-Interaktion in der Sertoli-Zelle. Im Fokus stehen dabei die Lokalisation der Interakteure sowie nachgeschaltete Signalkaskaden (siehe 1.1.12 und 1.1.13). Zudem wurde deren Verhalten unter physiologischen und hyperglykämischen Bedingungen untersucht.

3.2.3.1 Entstehung von MG und Aktivierung des enzymatischen Schutzmechanismus der Glyoxalase I unter D-Lactat-Entstehung

Während Kapitel 3.2.2 die toxischen Konzentrationen von Glukose und MG auf die Sertoli-Zelle erfasste, wird in diesem Kapitel (Abbildung 31) das Zusammenspiel zwischen Glukose- (A) und MG-Entstehung (B) sowie ein zentraler Abbaumechanismus des MGs mithilfe der GLO-1 (C) unter der Entstehung des Zwischenproduktes D-Lactat (D) dargestellt. Hiermit sollte eruiert werden, inwiefern die Sertoli-Zelle unter Hyperglykämie vermehrt MG akkumuliert bzw. inwieweit sie über Mechanismen verfügt, dieses hochtoxische Zwischenprodukt des Glukose Metabolismus abzubauen.

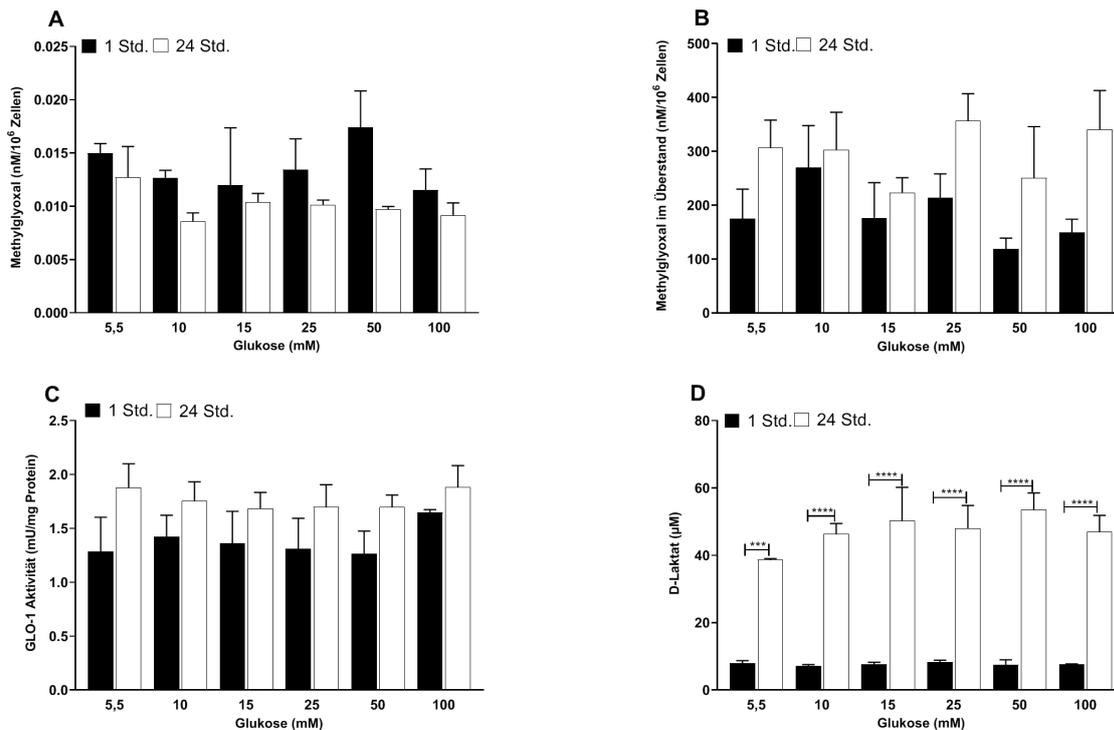


Abbildung 31: Glukose-Behandlung in unterschiedlichen Konzentrationen (mM) der WL-3 Sertoli-Zellen über den Zeitraum von 1 und 24 Std..

In (A) dargestellt ist die Akkumulation von Methyglyoxal in Zellen (nM/10⁶ Zellen) und (B) die Sekretion ins Medium (nM/10⁶ Zellen). (C) zeigt die Aktivierung des enzymatischen Schutzmechanismus Glyoxalase I (GLO-1) in mU/mg Protein und (D) die Entstehung des Abbauprodukts D-Laktat (μ M) unter Glukosebehandlung. Die Experimente (A-D) wurden als Triplikate und als $n = 3$ durchgeführt.

Untersucht wurde die Entstehung von MG sowohl im Medium der Zellen als auch innerhalb der Zellen unter der Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen an Glukose. Es diente der Erueirung, inwiefern MG vorrangig von den Zellen (Abbildung 31 B) sezerniert wird oder ob es sich innerhalb der Zelle (Abbildung 31 A) anhäuft. Hierbei zeigte sich, dass nur ein geringer Teil des MGs in der Zelle verbleibt und ein deutlich größerer Anteil sezerniert wird. Deutlich wurde, dass Glukose keinen Effekt auf die Akkumulation von MG hat, da es zu keinen Veränderungen zwischen den unterschiedlichen Behandlungen kam. Allerdings zeigte sich innerhalb der Zellen eine Abnahme von MG im zeitlichen Verlauf, während diese im Medium über 24 Std. zunahm. Im Vergleich aller Behandlungen lag das zelluläre MG zwischen 0,01-0,022 nM/10⁶ Zellen und das sezernierte MG zwischen 150-350 nM/10⁶ Zellen. Die Aktivität der GLO-1 zeigte im Vergleich der verschiedenen Glukosebehandlungen keine

Unterschiede. Im zeitlichen Verlauf stellte sich die Aktivität von GLO-1 gegenläufig zur Akkumulation von MG in den Zellen dar. Nach 24 Std. Glukosebehandlung lag diese im Schnitt bei ca. 1,8 mU/mg Protein und nach 1 Std. bei ca. 1,25 mU/mg Protein. Das Abbauprodukt D-Lactat stieg im zeitlichen Vergleich bei allen Glukose Behandlungen zwischen ca. 8 μ M nach 1 Std. und ca. 50 μ M nach 24 Std. signifikant an ($p \leq 0,0001$). Tabelle 14 (abgebildet im Anhang 11.2) fasst signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Behandlungen zusammen.

3.2.3.2 Morphologie der WL-3 Sertoli-Zelle, Detektion von AGEs und Analyse der durch Liganden-RAGE-Interaktion aktivierten Signalkaskaden

Um morphologische Veränderungen der WL-3 Zelllinie unter dem Einfluss von Hyperglykämie zu beurteilen, wurden Übersichtsfärbungen der Zellkerne nach Glukosebehandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angefertigt (Abbildung 32). Zudem wurde mittels Immunfluoreszenzfärbungen eruiert, inwiefern AGEs und RAGE innerhalb der Sertoli-Zelle akkumulieren (Abbildung 33). Im Weiteren wurde über qRT-PCR untersucht, ob unterschiedliche Glukosebehandlungen zu einer erhöhten Expression der Liganden von RAGE *HMGB1 und 2*, sowie von *RAGE* selbst führen und die relevanten Gene der Liganden-RAGE-Interaktion, der Nf- κ B-Aktivierung sowie der darauffolgenden Inflammation (Tabelle 10) untersucht.

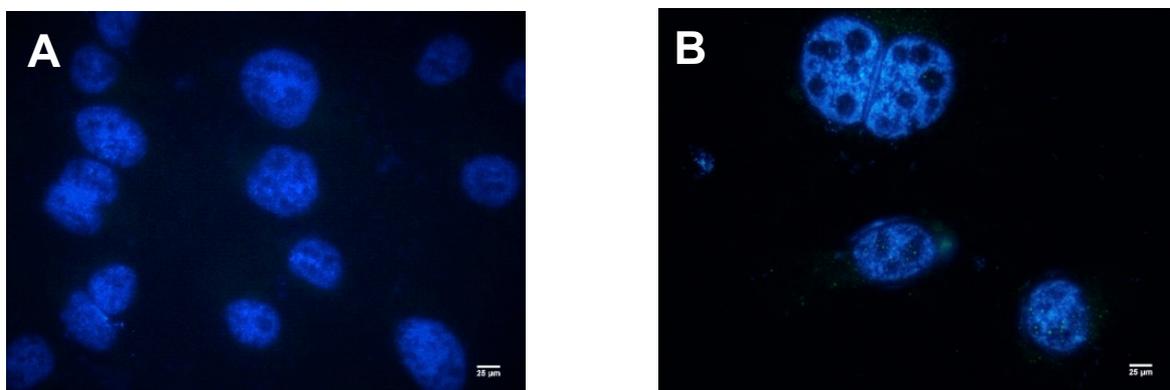


Abbildung 32: Immunfluoreszenzmikroskopische Abbildung von Sertoli-Zellen

Abgebildet sind Färbungen in 600-facher Vergrößerung von unbehandelten Sertoli-Zellen (A) und für 24 Std. mit 15 mM Glukose behandelten Sertoli-Zellen (B). Gefärbt sind ausschließlich die Zellkerne. Die Abbildung zeigt repräsentative Bilder. Es wurden je $n = 3$ Zellausstriche gefärbt und evaluiert.

In Abbildung 32 ist deutlich, dass behandelte Sertoli-Zellen (B) im Vergleich zu den unbehandelten (A) eine starke Kernvakuolisierung aufweisen.

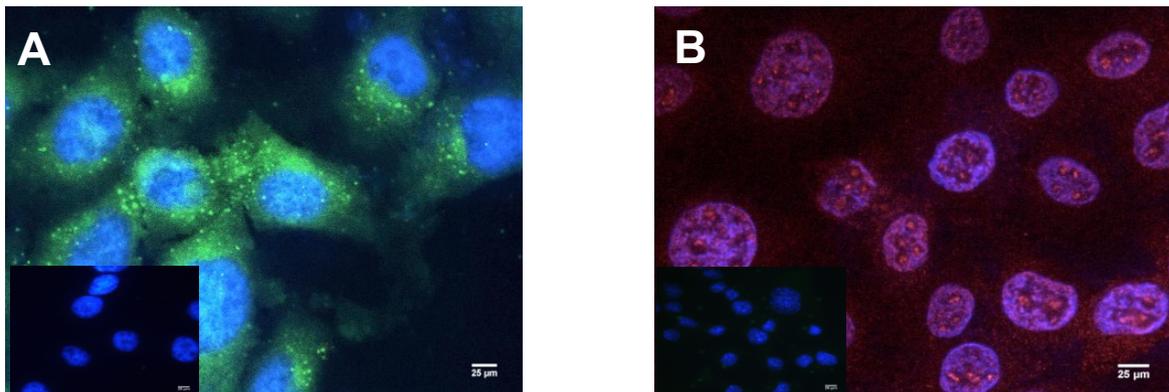


Abbildung 33: Immunfluoreszenzfärbung mit anti-AGE und anti-RAGE an Sertoli-Zellen

Fluoreszenzmikroskopische Abbildung einer anti-AGE (A) und anti-RAGE (B) Färbung an unbehandelten Sertoli-Zellen in 600-facher Vergrößerung. Jeweils in der linken unteren Ecke ist der Blank abgebildet. Die Abbildung zeigt repräsentative Bilder. Es wurden je $n = 3$ Zellausstriche gefärbt und evaluiert.

Die in Abbildung 33 dargestellte anti-AGE-Färbung (A) wies eine deutliche Färbung des Zytoplasmas auf, während RAGE (B) sowohl vereinzelt punktuell im Zytoplasma wie auch im Nukleus aufzuweisen war.

Wie bereits in Kapitel 0 beschrieben wird im Zuge dieser Arbeit analysiert, welche Gene durch die Liganden-RAGE-Interaktion aktiviert werden und inwieweit diese zu einer Aktivierung des Tf $\text{Nf-}\kappa\text{B}$ führen und es durch diesen zur Hochregulation der in Kapitel 1.1.13 beschriebenen Zielgene kommt. Aus diesem Grund wurden die Expressionen der gleichen Gene, die bereits im Gewebe (Kapitel 3.1.3.3) detektiert wurden, nun innerhalb der Sertoli-Zelle und unter Berücksichtigung verschiedener Glukosebehandlungen (5.5 mM, 10 mM und 15 mM) mit Hilfe der qRT-PCR analysiert (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Übersichtstabelle über die relative Genexpression nach Glukosebehandlung

Gen	3 Std.			12 Std.			24 Std.			48 Std.		
	5,5 mM	10 mM	15 mM	5,5 mM	10 mM	15 mM	5,5 mM	10 mM	15 mM	5,5 mM	10 mM	15 mM
RAGE und RAGE-Liganden												
<i>RAGE</i>	0,95	1,46	33,39	1,03	186,22	3,90	3,59	21,36	0,81	5,29	1,92	1,08
<i>HMGB1</i>	0,64	3,63	4,93	0,85	1,95	0,77	2,41	0,42	12,66	420,70	0,91	3,18
<i>HMGB2</i>	0,09	0,11	0,24	0,10	0,13	1,00	0,13	9,19	0,79	0,15	0,71	0,97
Interakteure des Liganden-RAGE-Signalwegs												
<i>ERK1</i>	0,84	1,13	2,95	1,25	3,27	15,38	4,22	67,98	2,81	31,68	4,11	0,81
<i>ERK2</i>	1,30	1,19	18,48	0,79	13,07	2,27	2,64	8,09	1,95	17,09	1,54	1,28
<i>Akt1</i>	0,86	1,01	2,69	0,95	1,94	4,51	3,04	5,57	20,45	1,77	6,46	7,56
<i>Cdc42</i>	2,16	2,37	0,37	2,61	23,47	23,24	7,10	355,38	13,60	198,86	2,79	2,52
Nf-κB-Aktivierung												
<i>IKBKB</i>	3,79	11,84	7,03	9,97	2,04	8,70	88,23	21,09	132,71	24,22	6,64	1039,84
<i>NFKB1A</i>	4,34	5,61	5,92	7,70	1,90	6,99	2,45	100,85	8,68	20,97	6,41	47,24
<i>RELA</i>	1,77	2,21	9,27	1,53	43,56	2,44	4,60	2,83	0,58	0,62	0,23	0,94
Antiinflammatorische Gene												
<i>Nrf2</i>	0,51	0,75	0,98	0,67	2,17	4,09	1,04	93,99	2,13	2,09	5,64	0,67
<i>IL-10</i>	7,00	1,36	20,02	0,07	0,49	3,53	2,34	11,03	53,31	152,53	13,35	11,83

In Tabelle 10 dargestellt ist die relative Expression der an RAGE-Bindung, -Interaktion und -Aktivierung beteiligter Gene, sowie Gene der darauf folgenden Signalkaskade und antiinflammatorischer Gene. Behandelt wurden die Zellen mit 5,5, 10 oder 15 mM Glukose und sie wurden nach 0, 3, 12, 24 bzw. 48 Std. geerntet. In grün markiert sind Gene mit relativer Expression > 3 in Bezug auf eine unbehandelte WL-3 Sertoli-Zell-Kontrolle und in rot markiert jene mit relativer Expression < 0,5. Die Anzahl der Experimente (in Triplikaten durchgeführt) entspricht n = 5.

Die Expression von *HMGB1* war zu der von *HMGB2* different. Während die Expression von *HMGB1* bereits eine Zunahme unter Glukosebehandlung nach 3 Std. mit relativer Expression bei 10 mM Glukosebehandlung von 3,63 und bei 15 mM von 4,93 aufwies, zeigte die Expression von *HMGB2* zunächst eine deutliche Reduktion der relativen Expression.

Untersuchungen der mRNS-Expression von *RAGE* zeigten, dass eine 10 mM Glukosebehandlung nach 12 Std. zu einer erhöhten *RAGE*-Expression (relative Expression 186,22) führte, während eine Behandlung mit 15 mM Glukose bereits nach 3 Std. einen Anstieg der relativen Expression von 33,39 verzeichnete, welcher jeweils im zeitlichen Verlauf abfiel.

Das an Zellwachstum und Motilität beteiligte *Cdc42* Gen, welches in Interaktion mit Rac zur Aktivierung von Nf-κB beiträgt, zeigte den Trend der Zunahme der Genexpression nach 12 und 24 Std. unter 10 und 15 mM Glukosebehandlung.

Bei der an essentiellen zellulären Prozessen beteiligten Proteinkinase *Akt1* wurde eine Expressionszunahme bereits nach 3 Std. und unter 15 mM Glukose (relative Expression 2,69) detektiert, welche im zeitlichen Verlauf zunahm.

Die direkt an den zytosolischen Rest von RAGE bindenden Gene *ERK1/2* wiesen folgendes Expressionsmuster auf: Bei *ERK1* trat erst im zeitlichen Verlauf in allen drei Gruppen eine Expressionszunahme auf. *ERK2* hingegen wies bereits nach 3 Std. und unter 15 mM Glukose eine Expressionssteigerung (relative Expression 18,48) auf.

Die folgende qRT-PCR-Analyse von Sertoli-Zellen diente einer differenzierten Betrachtung der in Kapitel 1.1.13 beschriebenen drei zentralen Gene der Nf- κ B-Aktivierung unter der Beeinflussung verschiedener Konzentrationen von Glukose.

Das an der Lösung von Nf- κ B vom IKK-Komplex involvierte *IKBKBI* wies v.a. unter 15 mM Glukose eine im zeitlichen Verlauf ansteigende Expression auf. Während die relative Expression unter 15 mM nach 3 Std. bereits bei 7,03 lag, war diese nach 48 Std. auf 1039,84 erhöht.

Das für das Bestehenbleiben der Bindung von Nf- κ B an den IKK-Komplex verantwortliche und somit eine Aktivierung von Nf- κ B inhibierende *NFKBIA* zeigte bereits nach 3 Std. eine Expressionszunahme, welche im zeitlichen Verlauf noch deutlicher wurde.

Die Expressionsveränderungen des für die p65-Untereinheit des Nf- κ B kodierende *RELA* zeigten unter Glukosebehandlung v.a. nach 3 (15 mM relative Expression 9,27) und 12 Std. (10 mM relative Expression 43,56) eine Erhöhung der Expression, welche im zeitlichen Verlauf wieder abfiel. Signifikant wurde dieser Unterschied nach 3 Std. zwischen 5,5 und 15 mM ($p = 0,0455$).

Zudem wurde die Expression des Nf- κ B-Gegenspielers *Nrf2* und des antiinflammatorischen Zytokins *IL-10* analysiert. Hierbei zeigte sich v.a. unter 10 mM Glukosebehandlung und im zeitlichen Verlauf der Trend einer Expressionszunahme. Das *IL-10* Gen zeigte insgesamt eine erhöhte Expression, welche nach 3 Std. 15 mM (relative Expression 20,02) und nach 48 Std. (innerhalb aller drei Gruppen) deutlich wurde.

Tabelle 11: Übersicht über ausgewählte Ergebnisse

Untersuchung/Experiment	Ergebnisse
Semiquantitative Auswertung der Spermatozoendichte im Nebenhoden von d. und n.d. 12 und 24 Wo. alten <i>Ins2^{Akita+/-}</i> Mäusen an histologischen Paraffinschnitten	<p>1. keine Spermatozoen im Tubulus (0)⊖ (24 Wo. n.d. < 24 Wo. d. $1,66 \pm 3,02$ vs. $10,5 \pm 10,8$, $p = 0,0076$)</p> <p>2. viele Spermatozoen im Tubulus (3): (12 Wo. n.d. > 24 Wo. d. $9,25 \pm 11,6$ vs $0,833 \pm 2,04$, $p = 0,0301$) → reduzierte Spermatozoendichte in 24 Wo. alten d. Nebenhoden (12 > 24 Wo.) im Vergleich zur Kontrolle</p>
Messung der MG-Konzentration im Hoden und Nebenhoden von 12 und 24 Wo. n.d. und d. <i>Ins2^{Akita+/-}</i> über LC-MS/MS	<p>1. Im Nebenhoden MG bei 12 Wo. alten d. im Vergleich zum n.d. erhöht, bei 24 Wo. (1.561 ± 1.43 vs. 3.323 ± 0.62, $p = 0,0353$) signifikant</p> <p>2. 3,5-fache Zunahme der MG-Konzentration ($1,113 \pm 1,097$ (Hoden) vs. $3,323 \pm 0,622$; (Nebenhoden) $p = 0,006$)</p>
Lichtmikroskopische Färbungen des Hodens mit anti-CML von 12 und 24 Wo. n.d. und d. <i>Ins2^{Akita+/-}</i>	In allen Färbungen wurde im Interstitium und in der Grenzregion zum Lumen eine CML positive Färbung vermerkt, sowie beim d. Tier im Bereich der Basalmembran der Tubuli.
Quantitative CML-Bestimmung mittels ELISA im Hoden von 12 und 24 Wo. n.d. und d. <i>Ins2^{Akita+/-}</i>	Signifikante Erhöhung von CML zwischen 12 Wo. alten d. ($58,77 \pm 13,69$) und 12 Wo. alten n.d. <i>Ins2^{Akita+/-}</i> ($103,06 \pm 40,69$, $p = 0,0323$).
Lichtmikroskopische Färbungen des Hodens mit anti-RAGE von 12 und 24 Wo. n.d. und d. <i>Ins2^{Akita+/-}</i>	RAGE im Tubulus des Hodens, v.a. in Spermato gonien lokalisiert. Vereinzelt im Zytoplasma von Sertoli-Zellen
Western Blots von RAGE	Zeigen Tendenz auf, dass RAGE unter Hyperglykämie (d < n.d und 12 > 24 Wo.) abnimmt.

qRT-PCR-Analyse von Hoden und Nebenhoden 12 und 24 Wo. alter n.d. und d. <i>Ins2</i> ^{Akitas+/-}	<ol style="list-style-type: none"> 1. Die Expression von <i>ERK1</i> zeigte im Hoden eine signifikante Expressionsreduktion im zeitlichen Verlauf innerhalb der d. Gruppe ($p = 0,0108$). 2. Gegensätzlich hierzu stellte sich die Genexpression von <i>ERK1</i> im Nebenhoden dar. Hier zeigte sich eine signifikante Zunahme bei d. <i>Ins2</i>^{Akitas+/-} im zeitlichen Verlauf ($p = 0,0070$). 3. <i>ERK2</i> zeigte eine signifikante Reduktion im zeitlichen Verlauf beim d. Tier (12 Wo. > 24 Wo.) mit ($p = 0,0349$).
Multiplex-Analyse von Akt im Hoden und Nebenhoden von 12 und 24 Wo. alten n.d. und d. <i>Ins2</i> ^{Akitas+/-}	Bei Zusammenfassung der Daten aus 12 und 24 Wo alten d. Nebenhoden signifikante ($p = 0,0101$) Zunahme im Vergleich zum n.d. Tier
Multiplex-Analyse von <i>ERK1/2</i> im Hoden und Nebenhoden von 12 und 24 Wo. alten n.d. und d. <i>Ins2</i> ^{Akitas+/-}	<ol style="list-style-type: none"> 1. Im Nebenhoden zeigte sich bei den d. Mäusen der Trend einer Proteinreduktion 2. Im Vergleich aller Hoden ($95,33 \pm 12,31$) und Nebenhodendaten ($307,7 \pm 140,9$) zeigte sich eine signifikante Zunahme von <i>ERK1/2</i> im Nebenhoden ($p < 0,0001$).
qRT-PCR von nachgeschalteten Signalkaskaden (Zusammenschau)	Es zeigte sich beim 24 Wo. alten d. Tier eine signifikante Abnahme, in allen evaluierten Signalwegen (<i>Cdc42</i> , <i>Akt1</i> , <i>ERK</i>).
ED-50 Toxizitätstest für 1. Glukose und 2. MG in Sertoli-Zellen und Verteilung des MGs	<ol style="list-style-type: none"> 1. ED-50 für Glukose bei 50 mM 2. ED-50 für MG bei 250 μM 3. nur ein geringer Teil des MGs verbleibt in der Zelle und ein deutlich größerer Anteil wird sezerniert.
Glukosebehandlung der Sertoli-Zelle und quantitative Bestimmung von Genen mittels qRT-PCR	<i>HMGB1</i> bereits eine Zunahme unter Glukosebehandlung nach 3 Std.

4 Diskussion

T1DM stellt mit einer permanent und rasant steigenden Prävalenz eine große Herausforderung an das zentrale Gesundheitswesen dar. Da sich T1DM in über 90% der Fälle bereits innerhalb der Kindheit bzw. Jugend entwickelt, sind zunehmend auch Männer im reproduktiven Alter betroffen^{9,214,255}. Diese Thematik wurde in verschiedenen Studien behandelt und ergab, dass T1DM eine negative Auswirkung auf die männliche Reproduktion hat. Dies äußerte sich in morphologischen, funktionellen und degenerativen Veränderungen des Hodens und Nebenhodens, dem erhöhten Auftreten von ejakulativer und erektiler Dysfunktion sowie negativen Effekten auf das Samenvolumen, als auch der Spermienanzahl, -beweglichkeit und -morphologie^{5,97,156,242}. Die Pathoäthiologie dieses Zusammenhangs wurde bisher kaum untersucht. Forscher gehen, basierend auf Humanstudien und Studien am Tiermodell, davon aus, dass T1DM zu degenerativen und apoptotischen Veränderungen in der Spermatogenese sowie u.a. zu einem erhöhten Glukosemetabolismus in den Sertoli-Zellen führt^{6,97,110}. Untersuchungen, welche sich auf molekulare Pathomechanismen der durch T1DM bedingten männlichen Subfertilität beziehen, existieren zwar, sind jedoch häufig in sich widersprüchlich. Hierzu zählen Studien, die sich auf spermale DNS oder mitochondriale Schädigung^{2,3}, Nebenhodenatrophien²⁴² sowie OS konzentrieren^{4,5,139}. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass durch Hyperglykämie gesteigerter OS und die dadurch induzierte vermehrte AGE-Akkumulation zur Entstehung diabetischer Komplikationen wie Nephropathie, Retinopathie oder Neuropathie beitragen^{92,97,121,144,201,219,244}. Es wird davon ausgegangen, dass eine Verbindung zwischen der Akkumulation von AGEs im Hoden und Nebenhoden und männlicher Subfertilität besteht^{3,97,105,133,137,173}. Karimi et al. beschrieben bspw., dass AGEs vermehrt im Samen diabetischer Männer nachzuweisen sind und diese direkt oder über die Produktion von ROS zu funktionalen Modifizierungen der Spermien führen. Humane Spermatozoen sind hierbei aufgrund fehlender Reparaturmechanismen und einem hohen Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren besonders anfällig für OS¹⁰⁵. Da hodenspezifische Zellen einen eigenen Mechanismus zur Glukose-Detektion besitzen⁵, wird angenommen, dass sie eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der durch T1DM begünstigten männlichen Subfertilität spielen. Mallidis et al. gehören zu den wenigen, die sich den Zusammenhang zwischen AGEs und verminderter Fertilität bei T1DM zum Thema gemacht haben und gehen in ihren Untersuchungen v.a. auf den Nachweis jener AGEs im Reproduktionstrakt ein¹³³. Während Alves et al. von Veränderungen innerhalb des Transportmechanismus von Glukose ausgehen^{5,6}, beschreiben Bierhaus et al., dass es unter Hyperglykämie über die Interaktion von Liganden

mit RAGE zu einer persistenten Aktivierung von Nf- κ B komme²⁴. Zudem existieren Studien, welche beschreiben, dass eine Liganden-RAGE-Interaktion die Expression von RAGE selbst hochregulieren und dass jene Aktivierung über verschiedene Signalkaskaden Nf- κ B aktiviert, welches zur Transkription von proinflammatorischen Genen führt^{19,124,191}.

Innerhalb dieser Arbeit wurde daher der Fokus auf genannte Liganden-RAGE-Interaktion gelegt und die dadurch aktivierten Signalkaskaden (Cdc42, Akt1, ERK1/2) untersucht, um Rückschlüsse auf den Mechanismus der durch Hyperglykämie induzierten männlichen Subfertilität ziehen zu können. Im Folgenden wird eine Bilanz aus den Resultaten vorliegender Arbeit, sowie ein Vergleich zu vorangegangenen Arbeiten gezogen.

4.1 Veränderungen/Beeinträchtigungen im männlichen Reproduktionstrakt der *Ins2*^{Akita+/-} Mäuse

Als Modell des T1DM diente die *Ins2*^{Akita+/-} Maus, welche durch eine Mutation im *Ins2* Gen einen manifesten T1DM entwickelt. Die Mutation führt zu einem fehlerhaft gefalteten Insulinprotein, welches im ER akkumuliert und somit ER-Stress und schließlich die Destruktion der Insulin produzierenden β -Zellen bedingt²⁴⁸. Die *Ins2*^{Akita+/-} Maus zeigt eine zum Menschen ähnliche Symptomatik des unbehandelten T1DM. Sie stellt somit ein einzigartiges Modell für die Untersuchung der durch T1DM induzierten Subfertilität dar, da die Mutation im Gegensatz zu chemisch induzierten diabetischen Mausmodellen (STZ und ALX)⁹⁷ keinen Toxin bedingten Einfluss hat. Für diese Arbeit wurde mit heterozygoten *Ins2*^{Akita+/-} Mäusen gearbeitet, welche in Mannheim (Deutschland) gezüchtet wurden und eine Phänotyp-Penetranz von 50% aufzeigen²⁵². Im Fokus stand die Untersuchung von Langzeitfolgen des Insulindefizits und der damit einhergehenden Hyperglykämie auf die Akkumulation von AGEs im Hoden und Nebenhoden, deren Bindung an RAGE und die dadurch ausgelösten Signalkaskaden auf potentielle Schädigung des Reproduktionstrakts. Als Kontrolle dienten Mäuse eines identischen Hintergrunds. Sie wiesen im Gegensatz zu diabetischen *Ins2*^{Akita+/-} (BZ > 33.3 mmol/l) einen nahezu normalen BZ von < 14.0 mmol/l auf. Innerhalb vorliegender Arbeit wurden in folgenden genannte Proteine mit Hilfe von histologischen Färbungen bzw. einem jeweiligen ELISA, Western Blot oder Multiplex bestimmt. Des Weiteren wurden die nachgeschalteten Gene der durch Liganden-RAGE-Bindung aktivierten Signalkaskaden via qRT-PCR detektiert, um so einen Eindruck davon zu erlangen, welcher Signalweg bei T1DM angesprochen wird. Abschließend wurden Gene, welche durch das phosphorylierte Nf- κ B reguliert werden und als inflammatorische Gene zur Pathologie von mit T1DM assoziierten Komplikationen beitragen, detektiert.

Dieser Arbeit vorangegangene Studien der AG Linn konnten bereits zeigen, dass d. *Ins2^{Akita+/-}* Mäuse im Alter von 12 und 24 Wo. ein signifikant verringertes Körper- und Hodengewicht besitzen, während der BZ signifikant erhöht war. Des Weiteren zeigen d. *Ins2^{Akita+/-}* Veränderungen auf Ebene der Morphologie sowie der Spermatogenese. So waren die Tubuli seminiferi bei d. Tieren im Durchmesser ca. 10% kleiner als bei n.d. *Ins2^{Akita+/-}*. Morphologische Auswertungen mittels des Johnson-Scores ergaben, dass 24 Wo. alte d. Mäuse eine signifikant reduzierte Anzahl an normalen Tubuli seminiferi aufweisen. Ferner zeigten sich bei der d. Gruppe häufiger Scores unter 5, was auf eine Störung der Spermatogenese hindeutet. Diese Beobachtung wurde dadurch gestützt, dass vermehrt pathologische Veränderungen innerhalb der Tubuli auftraten, wie eine erhöhte Anzahl an Vakuolen, degenerierte Zellen und Tubuli mit Germinalzellaplasie^{141,143}.

Innerhalb dieser Arbeit wurde der männliche Reproduktionstrakt, vorrangig der Nebenhoden der heterozyoten *Ins2^{Akita+/-}* Maus im Zusammenhang zur Liganden-RAGE-Interaktion detailliert untersucht, um zu erfahren, ob diese zur potentiellen Subfertilität bei T1DM beitragen.

Hierzu wurden die Nebenhoden von n.d. und d. *Ins2^{Akita+/-}* im Alter von 12 und 24 Wo. systematisch in der Caput/Corpus- und Caudaregion nach Hämatoxylinfärbung ausgewertet. Deutlich wurde, dass sich die morphologischen Veränderungen, welche im Hoden nachgewiesen wurden¹⁴³, im Nebenhoden fortsetzen. Die Hämatoxylinfärbung zeigte auf, dass die Tubuli im Bereich des Caput/Corpus, verstärkt in den 12 Wo. alten d. Nebenhoden, Vakuolisierungen aufwiesen und es zu Defekten im Epithel kam. Die Spermatozoendichte nahm im anatomischen Verlauf des Nebenhodens ab. Dies wurde besonders in der Caudaregion der d. *Ins2^{Akita+/-}* deutlich und bei 24 Wo. alten d. Tieren signifikant. Die Spermatozoenreduktion war bei beiden Tiergruppen im zeitlichen Verlauf progredient. Somit ist ein positiver Zusammenhang mit der Dauer des T1DM zu vermerken, wodurch die vorangegangene Spermienanalyse bestätigt wird^{141,143}.

Beobachtungen aus dieser Arbeit konnten jene vorausgeganener Arbeitsgruppen bestätigen. So zeigten Kim et al. eine signifikante Reduktion der Spermienzahl und der Zahl an motilen Spermien in d. *Ins2^{Akita+/-}* Mäusen¹¹⁰. Zudem existieren einzelne Studien an Menschen mit T1DM, welche eine reduzierte Fertilität aufweisen, die sich in einer erhöhten Anzahl an spermalen nDNS-Schäden und einer erhöhten Prävalenz von Subfertilität darstellte^{134,135,137,142,243}. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit vergleichender Untersuchungen an Spermien gesunder Männer und Männer mit T1DM. Die Ausgangshypothese dieser Arbeit, dass es bei T1DM zu Beeinträchtigungen des männlichen Reproduktionsorgans kommen kann,

wird durch die genannten Ergebnisse verstärkt. Somit wird die Notwendigkeit zur Untersuchung des Pathomechanismus deutlich, welcher hinter den erhöhten Subfertilitätsraten bei Männern mit T1DM steht.

4.1.1 Lokalisierung von Liganden und RAGE im Reproduktionstrakt der *Ins2^{Akita+/-}* Maus

Wie bereits von Tan et al. beschrieben, beeinflusst eine diabetogene Stoffwechsellage eine vermehrte Produktion von ROS und somit OS sowie eine dadurch bedingte Akkumulation von AGEs. Ein Zusammenhang zwischen mit T1DM assoziierten Komplikationen und einem vermehrten Aufkommen an AGEs wurde bereits für diabetische Nephropathie²³⁰, Retinopathie¹⁴⁹ und Neuropathie⁵⁵ beschrieben. Ein Ziel dieser Arbeit war es, herauszuarbeiten, inwieweit ein solcher Zusammenhang auch für eine mit T1DM assoziierte Schädigung des Reproduktionstraktes gilt.

Hierfür wurde zunächst eine zentrale Vorstufe der AGEs, das MG, im Hoden und Nebenhoden von n.d. und d. *Ins2^{Akita+/-}* bestimmt. Es wurde deutlich, dass MG im anatomischen Verlauf des männlichen Reproduktionstrakts zunimmt. Im Hoden zeigte sich MG bei den d. *Ins2^{Akita+/-}* im Vergleich zum n.d. Tier erhöht. Im Nebenhoden herrschten insgesamt höhere Konzentrationen an MG. Bei den 24 Wo. alten d. Tieren wurde die ca. 3,5-fache Zunahme der MG-Konzentration zwischen Hoden und Nebenhodengewebe signifikant. Zudem war eine Zunahme an MG im Nebenhoden zwischen 24 Wo. alten n.d. und d. *Ins2^{Akita+/-}* signifikant. Dass im Nebenhoden mehr MG akkumuliert, könnte damit zusammenhängen, dass der Hoden durch die BHS besser vor diesem toxischen Zwischenprodukt geschützt ist. So ist bekannt, dass der Hoden über die BHS hinaus Transporter (z.B. Efflux-Pumpen) besitzt, welche verhindern, dass toxische Produkte die heranreifenden Spermien erreichen^{40,125}. Zudem wird davon ausgegangen, dass Keim- und Sertoli-Zellen zur Regulierung der Immunantwort und durch eine Unterdrückung des Immunsystems wesentlich zum Erhalt des Immunprivilegs innerhalb des Tubulus seminiferi des Hodens beitragen²⁷⁰.

Sowohl im Hoden als auch im Nebenhoden von 24 Wo. alten d. *Ins2^{Akita+/-}* war die Konzentration an MG im Vergleich zu den n.d. Tieren größer. Während dies im Nebenhoden signifikant war, würden für den Hoden 45 Proben gebraucht (berechnet über G-Power), damit es zu einem signifikanten Unterschied zwischen 24 Wo. alten n.d. und d. *Ins2^{Akita+/-}* Maus käme. Im Nebenhoden würde sich bereits ab einer Gruppengröße von 14 eine signifikante Zunahme an MG zwischen 12 Wo. alten n.d. und d. Tieren zeigen. Insgesamt wurde im Nebenhoden (im Schnitt ca. 1,6-3,6 mmol/mg) eine höhere Konzentration an MG als im Hoden (im Schnitt ca.

0,5-1,8 mmol/mg entspricht 485-1746 mmol/g bei einem durchschnittlichen Hodengewicht von 0,97 g) (siehe hierfür Abbildung 15) nachgewiesen. Ob das hochtoxische MG²³⁸, ähnlich wie bereits für Acetaldehyd und Cadmium bekannt, zu Beeinträchtigungen der „Cell Junctionen“ der BHS und somit zu reproduktiven Dysfunktionen führen kann⁴⁰, müsste noch im Detail geklärt werden. Deutlich ist jedoch, dass es im d. Zustand vermehrt im männlichen Reproduktionsorgan nachzuweisen ist.

Da MG bereits durch einen kurzzeitigen BZ-Anstieg erhöhte Konzentrationen aufweist, stellt es eine wichtige intrazelluläre Vorstufe der AGE-Entstehung dar⁷⁰. Es gibt bisher wenige Daten zu MG-Konzentrationen. Dies hängt u.a. damit zusammen, dass eine exakte Bestimmung von MG eine große Herausforderung darstellt und je nach verwendeter analytischer Methode mit großer Variabilität (bis > 1000fach) einhergeht. So wurden je nach verwendeter Methode im Plasma von Menschen MG-Konzentrationen zwischen 123 nM – 407 µM detektiert, was sich u.a. darauf zurückführen ließ, dass bereits durch die Aufbereitung der Proben präanalytisch MG entsteht¹⁸⁹. Für vorliegende Arbeit wurde die LC-MS/MS Methode verwendet, welche über eine Gas- und Flüssigkeits-Massenspektrometrie Konzentrationen im Bereich von ng/L (0,014 nM, Molekulargewicht MG 72 g/mol²⁷²) detektieren kann und somit eine sehr genaue Methode darstellt^{68,189}. In anderen Studien wurde über eine LC-MS/MS Messung die Plasmakonzentration von MG bei Säugetieren im Bereich von 50-500 nM angegeben¹⁸, während bspw. in der Leber von C57BJ/6 Mäusen eine MG-Konzentration von ca. 3.26 ± 0.65 nmol/g detektiert wird. Bei gesunden Menschen werden über die LC-MS/MS Methode MG-Konzentrationen von ca. 132 ± 63 nM im Plasma nachgewiesen¹⁸⁹. McLellan et al. fanden mittlere MG-Konzentrationen im Blut Insulin abhängiger Diabetiker von 470.7 pMol/g (entspricht 457,5 nM), während sie bei Gesunden nur bei 79.8 pMol/g (entspricht 84,3 nM) lagen¹⁴⁶. Zudem ist ein Zusammenhang zwischen der glykämischen Kontrolle und MG-Konzentrationen im Blut bekannt. Festgestellt wurde dabei über eine Gaschromatografie mit Massenspektrometrie (GC/MS), dass Patienten mit schlecht eingestellten BZ-Werten (HbA1c von 12.9 ± 2.3) MG-Konzentrationen von 29.3 ± 5.5 µg/ml (entspricht $406,9 \pm 76,4$ µM) aufwiesen, während Kontrollgruppen (HbA1c von 5.6 ± 0.4) nur MG-Konzentrationen von 8.5 ± 0.5 µg/ml (entspricht $118,1 \pm 6,9$ µM) zeigten¹¹⁹. Dies konnte von Kong et al. bestätigt werden. Sie wiesen signifikant höhere MG-Konzentrationen bei neu diagnostizierten T2DM-Patienten (65.2 ± 19.2 ng/mL, entspricht $905,5 \pm 266,7$ nM) im Vergleich zu gesunden Probanden (40.1 ± 11.1 ng/mL, entspricht $556,9 \pm 154,2$ nM) auf. Zudem ergab sich eine positive Korrelation zwischen den MG-Konzentrationen im Plasma und dem HbA1c ($r = 0.670$, $p < 0.01$)¹¹⁴. Erhöhte MG-Konzentrationen können bei DM zur Progression von mit DM

assoziierten Komplikationen beitragen^{94,238}. Im Gegensatz zu dem HbA1c-Wert kann MG nicht als direkter Parameter für die Glykierungsrate zur Hilfe genommen werden, da MG kontinuierlich durch u.a. den Glyoxalase-Stoffwechsel abgebaut wird. Somit hängt die jeweils gemessene MG-Konzentration mit der Aktivität der Glyoxalase im jeweiligen Organ zusammen. Aktivitätsmessungen im Reproduktionstrakt der *Ins2^{Akitas+/-}* stehen noch aus und könnten eine Erklärung für die, im Vergleich zur metabolisch sehr aktiven Leber (MG-Konzentrationen von 3.26 ± 0.65 nmol/g¹⁸⁹), relativ hohen MG-Konzentrationen im Reproduktionstrakt liefern. In zukünftigen Arbeiten sollte der Zusammenhang der organspezifischen Glykierungs- und metabolischen Detoxifikationsrate systematisch untersucht werden.

Da in der vorliegenden Arbeit im Nebenhoden eine höhere MG-Konzentration beobachtet wurde als im Hoden, wäre es sinnvoll, in weitergehenden Studien die Konzentration in den Spermien selbst zu erfassen. MG könnte sich in Spermien anhäufen und somit zu reduzierten Fertilitätsraten bei Männern mit T1DM beitragen. Es wurde bereits berichtet, dass MG in Spermatozoen nachweisbar ist¹⁹⁵, aber ein Zusammenhang zu T1DM wurde bisher nicht untersucht. Insgesamt weisen die vorgelegten Ergebnisse auf eine Akkumulation von MG bei DM hin, inwieweit dieses jedoch zur Subfertilität beiträgt, muss noch erforscht werden. Hierfür fehlen systematische Untersuchungen der Fertilität an *Ins2^{Akitas+/-}* Mäusen, welche bspw. Paarungsexperimente oder *In-Vitro*-Fertilisationsstudien umfassen. Sofern die Fertilität der *Ins2^{Akitas+/-}* ausreichend bekannt ist, könnten Dosis-Wirkungsstudien mit MG (bspw. über die Nahrung) durchgeführt werden, um den Einfluss auf die Fertilität zu prüfen.

Des Weiteren wurde die Lokalisation von AGEs und deren Rezeptor RAGE im männlichen Reproduktionstrakt von n.d. und d. *Ins2^{Akitas+/-}* untersucht. Hierfür wurden Färbungen des Hodens und Nebenhodens mit einem AGE-AK durchgeführt, welcher verschiedene BSA- und HSA-AGE-Produkte detektiert. Sowohl im Hoden als auch Nebenhoden zeigte die Färbung eine Akkumulation von AGEs im Interstitium, insbesondere im Bindegewebe und in den Blutgefäßen. Innerhalb des Hodens von 12 Wo. alten d. *Ins2^{Akitas+/-}* konnten zudem AGE positive Färbungen im Zytoplasma von Sertoli-Zellen und im Bereich der Basalmembran ausgemacht werden.

Vorangegangene Studien zeigten einen hohen Anteil von AGEs in Seminalplasma und den Spermatozoen von an T1DM erkrankten Männern und diskutierten in diesem Zusammenhang eine Verminderung der Fertilität^{97,105,173}. Allerdings existieren keine Arbeiten, welche mit den hier verwendeten AGE-AK (mit Ausnahme des Spermas) den männlichen Reproduktionstrakt untersuchten. Hingegen fokussierten sich viele Studien auf CML, welches

zwar ein wesentliches AGE, jedoch nur eines von vielen verschiedenen darstellt¹⁷⁵. Aus diesem Grund wurde ergänzend CML mit Hilfe lichtmikroskopischer Färbungen sowie über einen ELISA im Hoden detektiert. Auch hier zeigte sich v.a. das Interstitium positiv für CML und via ELISA konnte eine signifikante Zunahme im Hoden der 12 Wo. alten d. Tiere detektiert werden.

Die folgende Tabelle 12 gibt eine Übersicht über die Immunhistochemie und Proteinanalyse dieser Arbeit im Vergleich zu vorangegangenen Arbeiten.

Tabelle 12: Übersicht über den Nachweis von CML im Reproduktionstrakt von *Ins2*^{Akita+/-} Mäusen im Vergleich zu vorangegangenen Arbeiten

Ergebnis	Referenzen		
	Konform	Konträr	Ergänzend
Hoden	12 Wo. d. > n.d* (<i>ELISA</i>)		Nuklei
	Interstitium (in allen Gruppen)	Schwach 134, 133 (d > n.d.) 173	Spermatogonien und
	Zytoplasma Keim- und Sertoli-Zellen (12 Wo. < 24 Wo.)	133, 138, 173	elongierender Spermatide leicht positiv (134, 173)
	Basalmembran des Tubulus: Vereinzelt (24 Wo. d. > n.d.)		
	Grenzregion zum Lumen (in allen Gruppen)	133, 138, 173	
Nebenhoden	Hauptzellen, Stereozilien (d. > n.d.)	133, 134, 138, 173	Diffuse glatte Muskulatur (133, 138)
	Basalzellen (n.d > d.)	133, 173	
	Basalmembran (vereinzelt)		133, 138

n.d. und d. Menschen^{133,134}, Kaninchen mit metabolischen Syndrom¹³⁸, 8 Wo. *Ins2*^{Akita+/-173}

In Tabelle 12 dargestellt ist eine Übersicht über den Nachweis von CML im Hoden und Nebenhoden von 12 und 24 Wo. alten *Ins2*^{Akita+/-} Mäusen.

In dieser Arbeit wurden, mit Ausnahme des ELISAs, immunhistochemische Methoden verwendet. Angegeben werden Arbeiten, welche mit Ergebnissen dieser Arbeit übereinstimmen oder diesen widersprechen. Zudem werden Ergebnisse genannt, die in dieser Arbeit nicht nachgewiesen wurden, wie Analysen an Spermien. Diese wiesen deutliche CML positive Färbungen im Spermienkopf und eine 2,3-fach höhere Konzentration an CML in d. *Ins2*^{Akita+/-} Mäusen auf¹⁷³. Spermienanalysen des Menschen bestätigten, dass CML im Spermienkopf nachzuweisen ist^{133,136}. Während die Konzentration von CML bei n.d. Männern erhöht war, konnte es im Spermischwanz und -mittelstück hingegen nur bei d. Männern nachgewiesen werden¹³³.

Die Ergebnisse genannter Arbeiten sind nur beschränkt mit den Resultaten aus vorliegender Arbeit zu vergleichen, da u.a. O'Neil et al. mit acht Wo. alten *Ins2^{Akita+/-}* arbeiteten und die Versuchsbedingungen nicht exakt reproduzierbar sind. Eine Beeinflussung auf die Funktion der Zellen und Strukturen, an welchen verstärkt CML lokalisiert war, ist derzeit noch nicht geklärt. Inwieweit die Akkumulation von CML an Stereozilien des Nebenhodens den Weitertransport der Spermatozoen oder eine Anhäufung von CML an den Hauptzellen des Nebenhodens das Mikromilieu so beeinflussen, dass es negative Effekte auf die Fertilität hat, bleibt derzeit unbeantwortet.

In Bezug auf die Färbungen im Bereich der Sertoli-Zelle und der Basalmembran ist anzumerken, dass AGEs v.a. mit Kollagen VI der Basalmembran interagieren und zur Inhibierung wichtiger Matrix-Strukturen führen können. Dies kann bei DM zu Missverhältnissen in Wachstums-, Produktions- und sekretorischen Zellen führen^{34,49,63}, da durch hyperglykämische Bedingungen die Entstehungsrate an AGEs massiv gesteigert ist⁶³. Zu betonen ist auch, dass eine intakte Basalmembran und Sertoli-Zelle wichtig für die BHS und somit für eine effektive Spermatogenese ist^{5,6}. Ablagerungen von AGEs an der Basalmembran und der Sertoli-Zelle könnten somit einen negativen Einfluss auf die Funktion der Spermien haben.

Da die Immunhistochemie vorliegender Arbeit die Tendenz aufzeigte, dass sich AGEs zum Zeitpunkt von 24 Wo. vermehrt in der Region der Basalmembran ablagern, wären weitere Forschungen zum Einfluss der Diabetesdauer auf eine AGE-Akkumulation im männlichen Reproduktionstrakt denkbar. Zudem wäre es sinnvoll, Färbungen mit spezifischen Markern für Basalmembran parallel zu AGEs durchzuführen, um besser eruieren zu können, ob zum Zeitpunkt von 24 Wo. bereits strukturelle Veränderungen vorliegen. Ferner wäre es wissenswert, an *Ins2^{Akita+/-}* Mäusen zu untersuchen, inwieweit Interventionen gegen die Formierung von AGEs, Einfluss auf den Reproduktionstrakt nehmen. Orman et al. zeigten bereits an STZ-injizierten d. Ratten einen positiven Effekt von Aminoguanidin (Hemmung von AGEs). So präsentierte sich der Hoden nach Behandlung mit Aminoguanidin morphologisch dichter und es kam zur Reduktion apoptotischer Tubuli¹⁷⁶.

Als weiterer Ligand von RAGE, welcher mit Komplikationen bei T1DM assoziiert ist¹⁷¹, wurde die Expression von *HMGB1* und 2 über qRT-PCR evaluiert. *HMGB1* steht u.a. im Zusammenhang mit Nekrose und wird als spätes proinflammatorisches Molekül betrachtet, welches passiv von nekrotischen Zellen ins Zytoplasma sezerniert wird¹²⁷. In der vorliegenden Arbeit konnten nur Trends zur Regulation von *HMGB1* und 2 im Vergleich von Hoden und Nebenhoden n.d und d. *Ins2^{Akita+/-}* ausgemacht werden, welche darauf hindeuten, dass die

Expression in der d. Maus gesteigert ist. HMGBs im Zusammenhang zum männlichen Reproduktionstrakt und/oder T1DM sind bisher wenig erforscht. Bekannt ist, dass HMGB2 primär im Hoden lokalisiert ist und HMGB1 ubiquitär mit Ausnahme von Neuronen exprimiert wird³⁶. Studien an reproduktiven Organen von *Ins2^{Akitas+/-}* liegen bisher keine vor. Mit Hilfe von qRT-PCR wurde entdeckt, dass HMGB1 endogen exprimiert wird und dass eine RAGE-Überexpression zur Reduktion der HMGB1-Expression führt¹⁵². Es ist bekannt, dass die Interaktion von HMGB1 mit RAGE starke proinflammatorische Signalkaskaden einleitet²²⁰ und zu Neovaskualisierungen führen kann. In diesem Zusammenhang wurde die HMGB1-RAGE-Interaktion als ein wesentlicher Pathomechanismus betrachtet, der zur Progression der diabetischen Retinopathie, Nephropathie und kardiovaskulären Komplikationen sowie zur Entschung von AGEs beiträgt. qRT-PCR-Analysen der Retina von durch STZ-Injektion d. Ratten zeigen eine signifikant erhöhte Expression von *HMGB1* und *RAGE* im Vergleich zu normoglykämischen Kontrollen^{256,265}. Es wurde nachgewiesen, dass Serumspiegel an HMGB1 bei Patienten mit DM im Vergleich zu gesunden Menschen erhöht und positiv mit dem HbA1c korreliert sind²⁵⁶.

In vorliegender Arbeit ergab sich zwar nur der Trend, dass *HMGB1* im Hoden und Nebenhoden der d. *Ins2^{Akitas+/-}* stärker exprimiert war, doch bekräftigt dies die Hypothese, dass mit erhöhten BZ-Spiegeln die Konzentration an *HMGB1* zunimmt^{256,265}. Um den Effekt von HMGB auf den männlichen Reproduktionstrakt weiter zu untersuchen, wäre es sinnvoll, Studien auf Proteinebene durchzuführen.

Nach Detektion der Liganden im Reproduktionstrakt wurde RAGE immunhistochemisch untersucht, um zu eruieren, inwiefern deren Lokalisationen miteinander korrelieren. Sowohl im Hoden von n.d. als auch von d. *Ins2^{Akitas+/-}* konnte nachgewiesen werden, dass RAGE, im Gegensatz zu den AGEs, primär im Tubulus und v.a. in den Spermatogonien lokalisiert war. Hierbei war eine leichte Färbung im Nukleus bei 12 Wo. alten d. *Ins2^{Akitas+/-}* sowie eine deutliche Färbung bei 12 und 24 Wo. alten d. *Ins2^{Akitas+/-}* im Zytoplasma aller Keimzellstadien und Sertoli-Zellen nachzuweisen. Hervorzuheben ist, dass nur die d. Tiere eine dezente Färbung im Interstitium aufwiesen, welche besonders deutlich im Bereich der Basalmembran war.

Im Nebenhoden stellten sich die Basal- und Hauptzellen (vermehrt bei 24 Wo.) RAGE positiv dar. Zudem zeigten sich in den d. *Ins2^{Akitas+/-}* (vereinzelt auch in 24 Wo. alten n.d.) das Endothel, Stereozilien und stellenweise die Basalmembran positiv für RAGE. Das Interstitium war am deutlichsten bei 24 Wo. alten d. *Ins2^{Akitas+/-}* gefärbt.

Während Analysen der Genexpression von RAGE Hinweise auf eine Zunahme bei 24 Wo. alten d. Tieren im Hoden andeuten, ergaben Quantifizierungen von RAGE über einen Western Blot, dass sowohl im Hoden wie auch Nebenhoden eine Abnahme von RAGE zwischen 12 und 24 Wo. stattfand. Zudem bestand der Trend, dass RAGE bei d. *Ins2^{Akita±/±}* erniedrigt war.

Vorangegangene Arbeiten zeigten im Hoden deutliche RAGE positive Färbungen in Lumennähe unabhängig vom Stadium der Spermatogenese und der Tiergruppe (*Ins2^{Akita±/±}*, STZ-Maus oder Kontrolle). Mallidis et al wiesen im Hoden von Menschen mit DM ein zu dieser Arbeit ähnliches Verteilungsmuster an RAGE nach. Das Zytoplasma aller im Tubulus lokalisierten Zellen sowie der peritubulären und interstitiellen Zellen erwies sich als RAGE positiv während die Nuklei der Sertoli- und Keimzellen negativ für RAGE waren. Auch hier zeigte sich eine deutliche Färbung im Bereich des Tubulus um die Basalmembran, Färbungen in den Nuklei einiger Spermatogonien und eine diffuse Färbung im Lumen¹³⁷. Zudem konnten Chen et al. eine signifikant erhöhte Expression ($p < 0,01$) an RAGE im Hoden von STZ-induzierten Ratten nachweisen³⁹.

Im Nebenhoden wurden in d. Tieren distinkte punktuelle und von der Basalmembran ausgehende Färbungen detektiert, während der Ductus efferentes und der Caput nicht positiv für RAGE waren. In den mit STZ behandelten Mäusen konnte zudem eine diffuse Färbung in den fluiden Komponenten des Tubulus und im intratubulären Gewebe detektiert werden¹⁷³. In anderen Arbeiten wurden in anti-RAGE-Färbungen des Nebenhodens deutliche Färbungen in Lumennähe und im Zytoplasma der Hauptzellen detektiert. In der Cauda zeigten sich die glatte Muskulatur sowie die Stereozilien stark positiv für RAGE^{137,173}. Dieses Muster stimmt mit den Färbungen in vorliegender Arbeit überein, wobei sich hier v.a. die Zellkerne wie auch vereinzelt Basalzellen und die Basalmembran (im d. Tier) positiv für RAGE zeigten.

Vorangegangene Arbeiten zeigten in Immunfluoreszenzfärbungen der Spermien von n.d. und d. Männern RAGE positive Färbungen im Kopfbereich, welcher auch positiv für CML war^{133,137}. Insgesamt existieren wenige Studien, welche quantitativ eine RAGE-Verteilung im Reproduktionstrakt von d. Tieren untersuchten. Während O'Neil et al. keine Veränderungen der RAGE-Verteilung in Spermatozoen zwischen n.d. und d. nachweisen konnten¹⁷³, zeigten Karimi et al. und Mallidis et al., dass Menschen mit DM (T1DM und T2DM) signifikant höhere Level an RAGE in Spermatozoen aufweisen. Zudem konnten sie dies positiv mit einer erhöhten DNS-Fragmentierung in Spermatozoen korrelieren^{106,137}.

Dass RAGE im Verlauf von 12 zu 24 Wo. abnimmt und der Trend besteht, dass in d. Tieren weniger RAGE in Hoden und Nebenhoden nachzuweisen ist, scheint zunächst paradox.

So ist einerseits für Endothelzellen der Aorta bekannt, dass zwischen RAGE und seinen Liganden ein positiver Feedback-Mechanismus besteht, welcher dazu führt, dass eine Akkumulation von bspw. AGEs zu einer Erhöhung von RAGE führt^{19,186,191,231}. Yao et al. verzeichneten eine Expressionssteigerung von RAGE in Endothelzellen unter hyperglykämischen Bedingungen²⁶³. In diesem Zusammenhang wurden auch RAGE positive Podozyten, Gefäße, Epithel- und Mesangialzellen in humanen Nierengewebe von d. Menschen nachgewiesen²³⁰. Vlassara et al. detektierten in peripheren Blutzellen eine Reduktion von RAGE mRNA und Protein bei niedrigen Spiegeln an AGE²⁴⁴.

Andererseits existieren Studien, welche eine Verminderung von RAGE über die Bindung von Liganden vermerken²⁶⁰. In Bezug auf idiopathische Lungenfibrose zeigte sich dieser Effekt in den alveolären Typ 2 Epithelzellen²⁵⁷. Auch Miura et al. beschreiben eine negative Korrelation zwischen AGEs und RAGE in Monozyten von d. Menschen. Die Expression von RAGE wird hierbei bei d. Menschen mit Retino- oder Nephropathie als signifikant reduziert angegeben¹⁵¹. In einer aktuellen Studie von Kumar et al. wurde das Lungengewebe von RAGE-Knockout-Mäusen im Hinblick auf idiopathische Lungenfibrose untersucht. Hieraus ging hervor, dass das Fehlen von RAGE zu vermehrten Doppelstrangbrüchen der DNS führt und zudem Zellalterung, Fibrose und Oncogenese begünstigt¹¹⁷. Im Rahmen von Untersuchungen an Nierengewebe wurde beobachtet, dass eine Reduktion der RAGE-Aktivität zu einer Abnahme der Podozytenproduktion, vermehrter Glomerulussklerose und schließlich Nierenversagen führt¹⁹⁰.

Dies könnte bedeuten, dass die Reduktion von RAGE, über die Einschränkung der DNS-Reparaturmechanismen, zu Subfertilität beiträgt. Die Expression von RAGE ist abhängig vom Typ und dem Entwicklungsstadium der Zelle. So ist bekannt, dass RAGE in adulten Zellen meist herunterreguliert ist¹⁸⁶. Dies könnte erklären, wieso in vorliegender Arbeit eine Abnahme von RAGE zwischen 12 und 24 Wo. detektiert wurde.

Die Frage, wieso RAGE im d. Zustand herunterreguliert ist, bleibt zunächst unbeantwortet. Für zukünftige Studien wäre es daher sinnvoll, die RAGE-Quantifizierung im Vergleich von n.d. und d. Tieren weiter zu untersuchen, da in dieser Arbeit die Anzahl an Tieren limitiert war und es bisher keine weiteren Arbeiten gibt, welche RAGE quantitativ im Reproduktionsorgan von *Ins2*^{Akitas+/-} untersuchten. So wäre es zielführend, mit Hilfe von Proteinanalysen RAGE in Hoden und Nebenhoden zu bestimmen und diese Daten mit den BZ-Werten sowie qualitativen Spermien-Parametern zu korrelieren. Zusätzlich wäre es denkbar eine Verpaarungsstudie mit n.d. und d. RAGE-Knockout Mäusen durchzuführen.

4.1.2 Liganden-RAGE-Interaktion und nachgeschaltete Signalkaskaden

Da sich bereits Veränderungen zwischen den Mausgruppen auf Ebene der Liganden-RAGE-Interaktion zeigten, wurde im Rahmen dieser Arbeit die dahinter geschaltete Signalkaskade analysiert (siehe Abbildung 34).

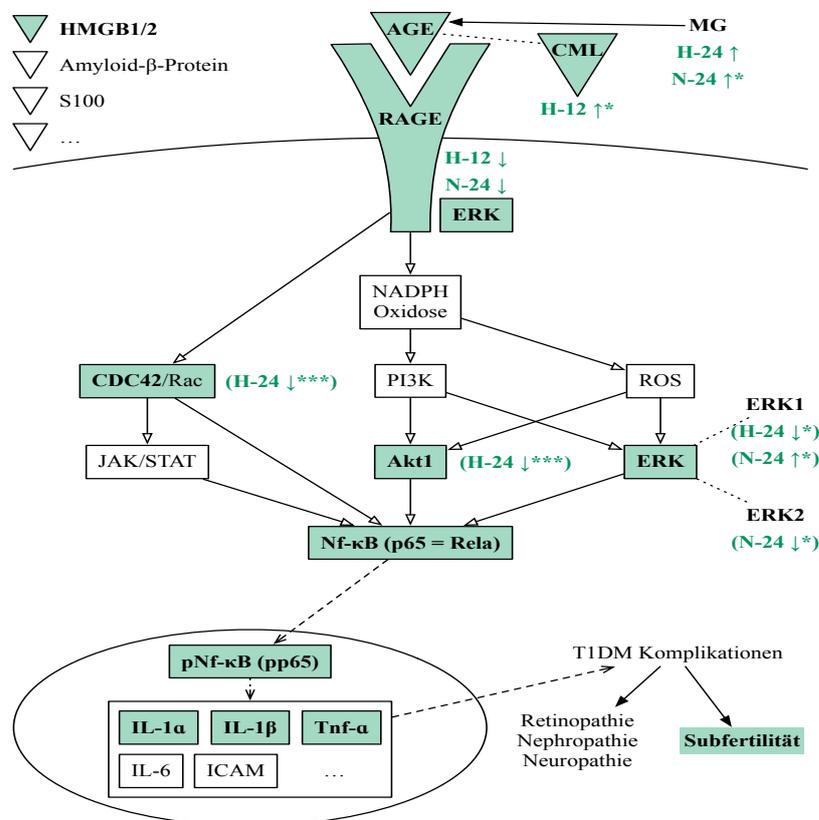


Abbildung 34: Einfluss von Hyperglykämie auf die nachgeschalteten Signalkaskaden der Liganden-RAGE-Interaktion

Die untersuchten Gene/Proteine sind in grün hinterlegt. Die Veränderungen im Hoden (H) und Nebenhoden (N) beziehen sich jeweils auf die d. *Ins2*^{Akita+/-} Maus im Vergleich zum n.d. Tier desselben Alters. Die Zahlen 12 und 24 geben das Alter in Wo. an. Die Pfeile nach unten geben den Trend einer Abnahme, nach oben einer Zunahme an, die Sternchen das Signifikanzniveau. Die in grün hinterlegten Angaben in Klammern beziehen sich auf Veränderungen auf Genebene (qRT-PCR).

In Abbildung 34 dargestellt ist die Bindung der Liganden AGE und HMGB1/2 an RAGE, wodurch verschiedene Signalkaskaden aktiviert werden, welche schlussendlich zu einer Aktivierung von Nf-κB führen (siehe Kapitel 1.1.12). In dieser Arbeit untersucht wurde das Gen *Cdc42*, welches über die Interaktion mit Rac Nf-κB aktiviert^{63,171} und eine Rolle für

Zellwachstum und Motilität spielt¹⁷¹. Zudem wurde abschnittsweise der PI3K-Signalweg untersucht, welcher u.a. über eine gesteigerte Expression der NADPH-Oxidase und über ROS-Entstehung zur Aktivierung von Akt1 bzw. ERK1/2 führt und wiederum Nf- κ B aktiviert^{19,78,199}. Ferner gilt ERK als direkter Ligand am zytoplasmatischen Rest von RAGE¹⁹².

Ziel war es, herauszuarbeiten, ob es eine Signalkaskade gibt, welche vorrangig reguliert wird und somit zur Pathologie von mit T1DM assoziierter Subfertilität beiträgt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, dass es bei 24 Wo. alten d. Tieren zu einer signifikanten Reduktion der Genexpression von *Cdc42* und *Akt1* innerhalb des Hodens kommt, während im Nebenhoden nur der Trend einer Genexpressionsreduktion beider Gene in der d. Maus bestand. Neben den Aufgaben als Regulator des Zytoskeletts und des Protein-Transports (Endo- und Exozytose) haben *In-vitro*-Studien an Sertoli-Zellen aufgezeigt, dass Cdc42 zur Permeabilität der BHS beiträgt und dieses somit für eine physiologisch ablaufende Spermatogenese von Relevanz ist. Hierbei konnte Cdc42 ubiquitär im seminiferen Epithel, v.a. in der Nähe der Basalmembran, nachgewiesen werden²⁵⁴. Wie in Kapitel 4.1.1 geschildert, können AGEs mit Kollagen VI der Basalmembran interagieren und zur Veränderung wichtiger Matrix-Strukturen führen^{49,63}. Die AG von Jefferey B. Hodgins der AnnArbor Universität in Michigan stellte die Hypothese auf, dass Cdc42 kompetitiv die Rac1 vermittelte Aktivierung der NADPH-Oxidase inhibiere und somit die Produktion von ROS hemme. Dabei sei bereits bekannt, dass renale Glomeruli von d. Menschen und Mäusen eine reduzierte Expression von *Cdc42* aufweisen. Daher gehe die AG davon aus, dass ein Verlust von Cdc42 die Apoptose von Podozyten und somit die diabetische Nephropathie beschleunige^{27,84}. Sofern sich die geschilderte Hypothese bestätigt, würde sich diese gut mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ergänzen, welche eine signifikante Reduktion der Expression von *Cdc42* im Reproduktionstrakt der d. *Ins2^{Akita+/-}* Maus aufwies. Eine Reduktion von Cdc42 könnte die Entstehung von ROS begünstigen und sich somit negativ auf die Fertilität auswirken. Dazu wurde berichtet, dass ROS zu erhöhten Schäden der spermalen nDNS beiträgt³ und Spermatozoen sehr sensibel auf OS reagieren¹⁹⁷.

Akt1, ein Überlebensfaktor, der mit Zellwachstum- und Differenzierung, Proliferation und Apoptose assoziiert ist, scheint, ebenso wie Cdc42, einen relevanten Einfluss auf die Spermatogenese über die Regulation der Keimzellproliferation und des Keimzellüberlebens auszuüben. Akt1 gilt hierbei als Zielgen eines PI3K-abhängigen Signalwegs in Sertoli-Zellen von neonatalen Ratten⁸³. Des Weiteren wurde aufgezeigt, dass hormonelle oder über den Insulin-like Wachstumsfaktor (IGF) vermittelte Stimulationen der Sertoli-Zelle den Akt1-Signalweg über PI3K aktivieren. So führt eine homozygote Deletion des Akt1 zur spontanen

Apoptose und Abschwächung der Spermatogenese im Hoden der Maus^{83,199}. Beim Mann führt ein Ausfall von Akt1 zum vorzeitigen Einsetzen der Apoptose von Stammzellen, was u.a. zu einem verkleinerten Hodenvolumen und einer dementsprechend reduzierten Spermienzahl führt¹⁹⁹. In diesem Zusammenhang ist es besonders auffällig, dass es bei 24 Wo. alten d. *Ins2^{Akitas+/-}* zu einer signifikanten Reduktion der mRNA Expression von *Akt1* kam, welche möglicherweise mit einem vorzeitigen Einsetzen der Keimzellapoptose¹⁹⁹ assoziiert ist. So spielt der Akt1-Signalweg eine essentielle Rolle für die Insulin-abhängige Glukoseaufnahme in muskulären und adipösen Geweben. Die Entstehung einer Insulinresistenz wird von Mallidis et al. mit einer Inhibierung des Akt/PKB-Signalwegs bei Menschen mit T2DM in Zusammenhang gebracht¹³¹. Dies könnte erklären, wieso es innerhalb des d. *Ins2^{Akita+/-}* Hodens zu einer signifikanten Reduktion von Akt1 kam.

Neben *Cdc42* und *Akt* kam es auch bei *ERK1* im Hoden von d. *Ins2^{Akitas+/-}* zu einer signifikanten Reduktion im zeitlichen Verlauf. Gegenätzlich stellte sich im Nebenhoden der d. *Ins2^{Akita+/-}* Maus ein signifikanter Anstieg der Genexpression im zeitlichen Verlauf dar. Im Gegensatz dazu zeigte die Expression von *ERK2* im Nebenhoden der d. *Ins2^{Akita+/-}* Maus eine signifikante Reduktion im zeitlichen Verlauf. Die Auswertung des Multiplex von ERK1/2 ergab, dass die Konzentration im Nebenhoden etwa dreifach so hoch war wie die im Hoden.

In Bezug auf DM wurde bereits festgestellt, dass Hyperglykämie die Aktivierung von ERK induziert²⁰¹ und dass der MAPK/ERK-Signalweg Einfluss auf die Entwicklung einer Insulinresistenz nimmt²⁶⁸. Ozaki et. al beschrieben, dass ERK an der Entwicklung der Insulinresistenz in Bezug auf Adipositas und T2DM beteiligt ist¹⁷⁷. Sowohl der MAPK/ERK1/2 als auch der PI3K/AKT-Signalweg tragen zu einer Reduktion von ROS bei, was einen Schutz vor Apoptose darstellt¹⁹⁴. Den Reproduktionstrakt betreffend ist bekannt, dass sich die Phosphorylierung von ERK in Sertoli-Zellen negativ auf die Intaktheit der BHS auswirkt, da ERK ein wichtiger Regulator des Aufbaus von Zellverbindungen im seminiferen Epithel darstellt. Eine Blockade des MAPK/ERK-Signalwegs könne demnach die Zerstörung der BHS minimieren²⁶⁷. Andererseits ist bekannt, dass die Verminderung der *ERK*-Expression zur Reduktion „lumicriner Faktoren“ im Reproduktionstrakt führe, welche für das zelluläre Überleben essentiell sind. „Lumicrine Faktoren“, welche aus Sertoli- und Keimzellen sezerniert werden und über den Ductus efferens in den Nebenhoden gelangen, schützen Zellen (v.a. im initialen Segment des Nebenhodens) über Aktivierung der ERK-Signalkaskade vor Apoptose²⁵⁸.

In Bezug auf die Hypothese dieser Arbeit, dass die Interaktion von AGEs mit RAGE unter hyperglykämischen Bedingungen die hier genannten Signalkaskaden in Gang setzt und

sich dies negativ auf die Fertilität des Mannes ausübt, könnte es sich lohnen jeweils einen dieser Signalwege zu inhibieren und sowohl unter normo- wie auch hyperglykämischen Bedingungen den nachgeschalteten Signaweg systematisch zu untersuchen.

Da, wie in Abbildung 34 dargestellt, alle drei durch Liganden-RAGE-Interaktion aktivierten Signalkaskaden in der Aktivierung des Tf Nf- κ B resultieren, wurde dieser immunohistochemisch in Hoden und Nebenhoden von n.d. und d. *Ins2*^{Akitas+/-} detektiert. Hierbei zeigte sich im Hoden bereits bei 12, deutlicher bei 24 Wo. alten n.d. und d. Tieren, eine Färbung im Zytoplasma der Sertoli-Zellen, ähnlich der Färbung mit anti-AGE. Das aktivierte Nf- κ B (p-Nf- κ B) war im Hoden und Nebenhoden an typischer Lokalisation im Nukleus nachzuweisen. Im Hoden n.d. und d. *Ins2*^{Akitas+/-} zeigte es sich in den Nuklei von Spermatogonien und Spermatozyten. Deutlich in d. Tieren waren Färbungen weiterer Keimzellreifestadien, diffuse Färbungen in Spermatozoen und in Sertoli-Zellkernen auszumachen. Zudem konnten vereinzelte Färbungen in Myofibroblastenzellkernen und der Basalmembran der Tubuli ausgemacht werden. Haupt- und Basalzellen des Nebenhodens bei n.d. 12 Wo. alten und d. 24 Wo. alten *Ins2*^{Akitas+/-} waren positiv für p-Nf- κ B.

Es gibt zwar einige Arbeiten, die Nf- κ B eine zentrale Rolle für Komplikationen bei DM zuschreiben und verzeichnen, dass Hyperglykämie zu einer langandauernden Erhöhung von Nf- κ B führt^{24,62}, doch gibt es keine, die dies auf den männlichen Reproduktionstrakt beziehen. Nf- κ B konnte bereits in Sertoli- und Keimzellen des Hodens¹⁸¹, passend zu den Färbungen in dieser Arbeit, nachgewiesen werden, doch für den Nebenhoden liegen keinerlei Daten vor. Zum einen gilt Nf- κ B in Sertoli-Zellen als Regulator der Spermatogenese⁴⁷, zum anderen führt Apoptose zu einer Zunahme von Nf- κ B in Sertoli-Zellen. So wird vermutet, dass Nf- κ B in Sertoli-Zellen während Stressphasen proapoptotisch auf Keimzellen wirkt¹⁸¹. Gerade aus dem Aspekt, dass alle drei untersuchten Signalkaskaden, die in einer Nf- κ B-Aktivierung resultieren herunterreguliert sind, könnte es sich lohnen die jeweiligen Proteine im Vergleich zwischen n.d. und d. Tieren zu untersuchen und diese mit den HbA_{1c}-Werten zu korrelieren. Basierend auf den Daten dieser Arbeit ist anzunehmen, dass die AGE-RAGE-Interaktion nicht zur Aktivierung eines inflammatorischen Pathomechanismus über Nf- κ B führt, sondern, dass die Akkumulation von AGEs direkt zu Schädigungen im männlichen Reproduktionsorganen beiträgt.

Auffällig ist, dass es innerhalb dieser Arbeit zu Abweichungen zwischen Genexpressionen und den von ihnen kodierten Proteinkonzentrationen kam. Dies stellt eine durchaus bekannte Schwierigkeit der Wissenschaft dar. Häufig zeigt die Expression von Genen nur eine geringe Korrelation zu ihren Proteinen^{50,108,245}. Dies ist u.a. darin begründet, dass Gene

für multiple Transkripte kodieren¹⁰⁸, posttranskriptionale und -translationale Modifikationen sowie die Regulation über die Degradierung von großer Bedeutung für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen sind²⁴⁵.

4.2 Einfluss von Hyperglykämie auf die Funktion der Sertoli-Zelle

Störungen im Glukosestoffwechsel sowie dem Insulinsignalweg können die männliche Reproduktionsfähigkeit negativ beeinflussen, indem u.a. der Energiestoffwechsel der Sertoli-Zellen beeinträchtigt wird. Dies kann sich auf die Funktion der BHS auswirken und zu Störungen der Spermatogenese führen^{2,5,6,34,95}. Zudem ist Glukose ein essentieller Energielieferant für die Aufrechterhaltung metabolischer Prozesse und der interzellulären Kommunikation während der Keimzellreifung⁶. Die Sertoli-Zelle gewährleistet hierfür eine adäquate Versorgung mit Pyruvaten und glykolytisch umgewandelten Lactaten für die heranreifenden Keimzellen^{5,6}. Aus diesem Grund führen Dysbalancen im Glukosehaushalt, wie sie beim T1DM vorkommen können, zu zellulären, morphologischen und funktionellen Störungen, welche von einem erhöhtem Auftreten von Vakuolisierungen bis hin zu Degenerationen reichen und sich somit negativ auf die Spermatogenese auswirken können⁵.

Im Glukose MTT-Assay wurde deutlich, dass die Zellproliferation unter dem Einfluss von 50 µM bis 25 mM Glukose ansteigt. Ab 25 mM Glukose zeigte sich ein drastischer Abfall der Proliferationsrate bis hin zu einem Proliferationsarrest ab ca. 50 mM (ED-50). Bemerkenswert ist, dass sich bereits eine Behandlung mit 15 mM Glukose für 24 Std. auf die Morphologie der Sertoli-Zelle auszuwirken scheint. Übersichtsfärbungen zeigten hierbei vermehrt Vakuolisierungen im Kern.

Während Hyperglykämie keinen großen Einfluss auf die Zelle zu nehmen scheint, muss diese bei Hypoglykämie ihren Metabolismus anpassen, um eine intakte Spermatogenese gewährleisten zu können. Insgesamt können BZ-Schwankungen zu veränderter Proteinsynthese und Einschränkungen der Membranintegrität führen. Untersuchungen an d. Ratten konnten erhebliche Schäden in den Tubuli seminiferi und Vakuolisierungen in Sertoli-Zellen nachweisen⁶. Gondons et al. beschrieben bereits 1998 die Bedeutung von Lactat für die Aufrechterhaltung der Spermatogenese. Die vorliegende Arbeit bestätigte durch die Bestimmung der ED-50 für Glukose bei 50 mM an einer immortalisierten Sertoi-Zelllinie die Ergebnisse von Gondons et al., welche zeigten, dass es erst zur Reduktion vitaler Sertoli-Zellen ab Glukosekonzentrationen von über 55 mM unter Kulturbedingungen kommt. Sie konnten bis zu einer Glukosekonzentration von 38 mM keinen Effekt auf Sertoli-Zellen nachweisen. Erst ab 34,5-42,1 mM Glukose wurden Störungen in der Spermatogenese und ein Verlust von

Keimzellen beschrieben⁶⁴. Insgesamt ist festzuhalten, dass die hier verwendeten Sertoli-Zellen BZ-Spitzen gut tolerierten.

Allerdings ist bekannt, dass es unter DM zu Beeinflussungen der Fertilität kommen kann (siehe Kapitel 4.1)⁶. Der direkte Zusammenhang von Hyperglykämie und einer Instabilität in der BHS konnte noch nicht aufgedeckt werden. Aus diesem Grund könnte die Isolierung von Sertoli-Zellen von d. Mäusen und eine systematische Untersuchung in Bezug auf Morphologie und Expression von Genen, welche spezifisch für Sertoli-Zellen und BHS sind eine mögliche Erklärung liefern.

4.3 Einfluss von MG auf die Funktion der Sertoli-Zelle

In dieser Arbeit wurde untersucht inwiefern MG, ein wesentliches Zwischenprodukt der AGE-Entstehung, Einfluss auf die Funktion der Sertoli-Zelle nimmt. MG ist ca. 20,000-fach reaktiver als Glukose und kann zur Glykierung (auch Glykierung von Proteinen und DNS) führen und so vermehrte Strangbrüche und Leserastermutationen in der DNS induzieren^{157,234}. Aus diesem Grund wird davon ausgegangen, dass es entscheidend ist, intrazelluläre MG-Spiegel durch Schutzmechanismen niedrig zu halten.

Der MG MTT-Assay zeigte auf, dass Sertoli-Zellen erst durch MG-Dosen von über 100 μM MG beeinträchtigt wurden. Die ED-50 lag bei ca. 250 μM und ab 400 μM MG befanden sich nahezu alle Zellen im Zellzyklusarrest bzw. in Apoptose. Die ED-50 in Sertoli-Zellen für MG war vergleichsweise hoch, in Muskelzellen von Gefäßen wird dieser mit 5,8 mM angegeben³⁷. Auch die physiologischen intra- wie extrazellulären Konzentrationen für MG im Gewebe lagen unter 10 μM ²³⁵. Die mittlere Konzentration an MG im Gehirn gesunder Mäuse betrug 0,3-1,4 mM¹⁸. Sertoli-Zellen scheinen somit sowohl für hohe Glukose als auch für hohe MG-Konzentrationen sehr robust zu sein.

4.3.1 MG-Stoffwechsel innerhalb der Sertoli-Zelle

Um die Entstehung von AGEs und deren Vorstufe MG unter der Betrachtung von diabetischen Stoffwechsellagen zu untersuchen, wurden Dosis-Wirkungsstudien mit Glukose und MG durchgeführt. Die Daten zeigen, dass MG unter Zellkulturbedingungen weitestgehend sezerniert wird und nur ein geringer Teil intrazellulär verbleibt. Zudem zeigte sich kein signifikanter Effekt von steigenden Glukosekonzentrationen auf die Entstehung von MG. Untersuchungen der zellulären Schutzmechanismen (Aktivität der GLO-1) von MG wiesen keine Veränderung bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen auf. Lediglich das

Abbauprodukt D-Lactat stieg im zeitlichen Verlauf (1-24 Std.) signifikant, blieb jedoch unbeeinflusst von unterschiedlichen Konzentrationen an Glukose.

Andere Arbeiten, welche das Plasma von Menschen mit DM untersuchten, konnten nachweisen, dass MG-Spiegel durch Hyperglykämie erhöht sind²⁵⁹ und dass sie positiv mit der Dauer des DM korrelieren (ca. 9 pmol/Jahr/g)¹⁴⁶. GLO-1-Knockout-Mäuse, welche durch STZ-Gabe diabetisch wurden, zeigten eine ca. dreifache Erhöhung an MG im Vergleich zu n.d. Tieren¹⁸⁸. Dies verdeutlicht, dass Hyperglykämie sowie der Verlust der GLO-1 Einfluss auf die Akkumulation von MG haben. In Bezug auf die Aktivität der GLO-1 bei DM ergeben sich widersprüchliche Ergebnisse. Zum einen zeigen Studien, ähnlich der Ergebnisse dieser Arbeit, dass sich die Aktivität nicht signifikant ändert^{146,239}, andererseits wiesen Jagt et al. nach, dass GLO-1 bei Menschen mit Komplikationen unter T1DM signifikant erhöht ist⁹⁴. In Bezug auf die Entehung von D-Lactat wiesen McLellan et al. eine signifikante Steigerung unter DM und eine positive Korrelation mit dem HbA1c auf¹⁴⁶. Ein ca. 220-%iger Anstieg von D-Lactat zwischen einer 5 und 25 mM Inkubation von Erythrozyten mit Glukose wurde zudem von Thornalley et al. beobachtet²³⁹. Es sind unterschiedliche Detoxifikationswege für MG bekannt, über die MG u.a. zu Pyruvat verstoffwechselt wird⁹⁴. Dies könnte erklären, warum in dieser Studie die D-Lactat Spiegel keine Steigerung unter Glukosebehandlung aufwiesen.

4.3.2 Morphologie der WL-3 Sertoli-Zelle, die Produktion von AGEs und Analyse der durch Liganden-RAGE-Interaktion aktivierten Signalkaskaden

Zur Detektion von AGE und RAGE in der Sertoli-Zelle wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Es konnte nachgewiesen werden, dass sich AGE im Zytoplasma von Sertoli-Zellen befindet, während RAGE primär im Nukleus bzw. auf seiner Oberfläche nachgewiesen werden konnte. Dies scheint zunächst kontrovers, da RAGE ein transmembranärerer Rezeptor ist, doch besitzt dieser auch einen intrazellulären Anteil¹⁸⁶, welcher ggf. hier positiv gefärbt wurde. Im Gegensatz hierzu beschreiben andere Arbeiten lediglich eine Lokalisation von RAGE im Zytoplasma der Sertoli-Zellen. Im Nukleus hingegen konnten sie RAGE nicht nachweisen^{137,138}. In einer aktuellen Arbeit von Kumar et al. wird wiederum eine Akkumulation von RAGE im Nukleus von Zellen innerhalb des Lungengewebes von Wildtyp-Mäusen beschrieben¹¹⁷. Speziell in Bezug auf die Sertoli-Zelle wurde ein spezifischer Nachweis von AGE noch nicht erbracht. Zukünftig könnte die Durchführung einer Doppelfärbung bzw. ein Ligandenassay oder Immunpräzipitation von AGE und RAGE, eine potenzielle Interaktion innerhalb der Zelle aufdecken.

5 Zusammenfassung

Diabetes mellitus Typ 1 ist eine chronische Erkrankung, dessen Inzidenz weltweit steigt, sodass zunehmend Männer im reproduktionsfähigen Alter betroffen sind. Zugleich wird eine Zunahme an Fertilitätsstörungen beim Mann beobachtet. Ein bloßer Zufall? Nein. Ein Zusammenhang zwischen T1DM und Subfertilität wird bereits beschrieben. Störungen im Ablauf der Spermatogenese sowie im Glukosestoffwechsel der Sertoli-Zelle sind hierfür mögliche Erklärungen. Eine Relation zwischen Advanced Glycation Endproducts und deren Rezeptorinteraktion (mit RAGE) wird vermutet. Der zugrundeliegende Mechanismus zwischen T1DM und Subfertilität bleibt jedoch ungeklärt.

Im Fokus dieser Arbeit wurde, anhand des *Ins2^{Akita+/-}* Mausmodells und einer kultivierten Sertoli-Zelllinie untersucht, inwiefern Hyperglykämie Einfluss auf die Akkumulation von AGEs im männlichen Reproduktionstrakt nimmt, die Funktion der Sertoli-Zelle stört und inwieweit dies über die Interaktion mit dem Rezeptor RAGE nachfolgende Signalkaskaden beeinträchtigt.

Der morphologische Vergleich des Nebenhodens n.d. und hyperglykämischer d. *Ins2^{Akita+/-}* ergab, dass die Spermatozoendichte beim d. Tier und zeitlich (12 > 24 Wo.) abnahm. Quantifizierungen von Methylglyoxal wiesen auf, dass es im Verlauf des Reproduktionstrakts (Hoden < Nebenhoden) akkumuliert, über die Zeit zunimmt (12 < 24 Wo.) und beim d. Tier erhöht ist. Färbungen des Hodens mit anti-AGEs, anti-CML und anti-RAGE, zeigten Ablagerungen im Zytoplasma von Sertoli-Zellen und im Bereich der Basalmembran (d > n.d.). ELISAs konnten eine signifikante Zunahme von CML im Hoden des d. (12 Wo.) Tiers bestätigen. Western Blots von RAGE deuten darauf hin, dass dieses unter Hyperglykämie (d < n.d und 12 > 24 Wo.) abnimmt. Untersuchungen von nachgeschalteten Signalkaskaden ergaben beim 24 Wo. alten d. Tier eine signifikante Abnahme in allen evaluierten Signalwegen (Cdc42, Akt1, ERK). Sertoli-Zellen präsentierten sich robust gegen hohe Glukose- und MG-Werte, wiesen allerdings bereits ab 15 mM Glukose Vakuolisierungen auf.

Zusammenfassend wurde aufgezeigt, dass hyperglykämische d. *Ins2^{Akita+/-}* (24 > 12 Wo.) eine Verminderung der Spermindichte aufzeigen, was auf eine reproduktive Beeinträchtigung hinweisen könnte. Während im d. Reproduktionstrakt AGEs vermehrt nachweisbar sind, ist deren Rezeptor erniedrigt und die nachgeschalteten Signalkaskaden herunterreguliert. Ein kausaler Zusammenhang zwischen der AGE-Akkumulation und den Veränderungen auf regulatorischer Ebene mit Fertilitätseinschränkungen bei der d. *Ins2^{Akita+/-}* Maus, ist zu vermuten und sollte systematisch in Fertilitätsstudien geprüft werden.

6 Summary

Type 1 Diabetes mellitus is a chronic disease with an worldwide growing incidence. Thus, progressively men of reproductive age are affected. At the same time an increase in fertility disorders is observed. A coincidence? No. An association between T1DM and subfertility has already been described. Amongst others disturbance in spermatogenesis and glucose metabolism of the Sertoli cell seem to play a role. A connection between advanced glycation endproducts and their receptor interaction (with RAGE) is suspected. However, the underlying mechanisms between T1DM and subfertility remain unknown.

For this theses we used the *Ins2^{Akita+/-}* mouse model and a cultured Sertoli cell line to investigate how hyperglycemia affects accumulation of AGEs in the male reproductive tract, the function of sertoli-cells and to what extent it interferes with downstream signalling through the interaction with the receptor RAGE.

Morphological comparison of epididymis' from n.d. (non-diabetic) and hyperglycemic d. (diabetic) *Ins2^{Akita+/-}* showed that the density of spermatozoa in d. animals and over time (12 > 24 wks.) is decreased. Quantifications of MG (a highly toxic precursor of AGE) exposed an accumulation, increases over time (12 < 24wks.) throughout the reproductive tract (testes < epididymis) and is elevated in the d. animal. Stainings of testis with anti-AGEs, anti-CML and anti-RAGE revealed deposits in the cytoplasm of Sertoli cells and basement membrane (d > n.d.). ELISAs confirmed a significant increase in CML in the testes of the d. (12 wks.) mouse. Western Blots of RAGE, however, showed that it decreased under hyperglycemic conditions (d < n.d and 12 > 24 wks.). Investigations of downstream signal cascades showed a significant decrease in all three evaluated pathways (Cdc42, Act1, ERK) after 24 wks. in d. *Ins2^{Akita+/-}*. Analyzes on Sertoli cells demonstrated that they are quite robust against high glucose and MG concentrations, but present vacuolations when treated with 15 mM glucose.

In summary, it has been shown that hyperglycemic d. *Ins2^{Akita+/-}*, evident at 24 wks, are reproductively affected. While in the d. reproductive tract AGEs are increased, their receptor is lowered and the downstream signal cascades downregulated. A causal relation between AGE accumulation and changes at regulatory level with fertility limitations in the d. *Ins2^{Akita+/-}* mouse is suspected and should be systematically observed in prospective fertility studies.

7 Abkürzungsverzeichnis

3DG-H1	3-Deoxyglucoson-Hydromidazolol
A. dest	Aqua destillata
AG	Arbeitsgemeinschaft
AGE	Advanced Glycation Endproducts
AK	Antikörper
Akt1	Thymoma viral proto-oncogene 1
ALX	Alloxan
AMH	Anti-Müller-Hormon
ARE	Antioxidant response Element
AS	Aminosäure
BHS	Blut-Hoden-Schranke
BNS	Blut-Nebenhoden-Schranke
BSA	Bovines Serumalbumin
BZ	Blutzucker
Ca.	Circa
Cdc42	Cell division cycle 42
cDNS	komplementäre DNS
CEL	Carboxyethyllysin
CML	Carboxymethyllysin
d.	diabetisch
DB	1,2-Diaminibenzol
DDG	Deutsche Diabetes Gesellschaft
D-LDH	D-Lactat Dehydrogenase
DM	Diabetes mellitus
DMSO	Dimethylsulfoxidin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DOLD	3-Deoxyglucoson- Lysin Dimer
DR	Diabetische Retinopathie
dsDNS	Doppestrang DNS
ED-50	Mittlere Effektivdosis
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase

E-Selektin	Endothel-Selektin
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetales Rinderserum
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GAD65	Glutamat-Decarboxylase 65
GADA65A	Autoantikörper gegen Glutamat-Decarboxylase der β -Zelle 65
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
G-H1	Glyoxal-Hydromidazolone
GIP	Gastroinhibitorisches Peptid
GLO	Glyoxalase
GLO-1	Glyoxalase I
GLP-1	Glukagon-like-peptide-1
GOLD	Glyoxal-Lysin Dimer
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HbA _{1c}	Glykiertes Hämoglobin
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HMGB	High Mobility Group Box Protein
HSA	Humanes Serumalbumin
HSB	High saline bicarbonate
IA2A	Autoantikörper gegen Tyrosinphosphatase
IAA	Insulinautoantikörper
ICA	Inselzellantikörper
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
IDF	Internationale Diabetes Federation
IGF	Insulin-like Wachstumsfaktor
IKK	I κ B Kinase
IL	Interleukin
Ins1	Präproinsulin 1
Ins2	Präproinsulin 2
IVF	<i>In-Vitro</i> -Fertilisationen
I κ B κ B	Inhibitor der kappaB Kinase beta
kDA	Kilodalton
LADA	Latenter Autoimmundiabetes im Erwachsenenalter

LC-MS/MS	Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie
M.	Morbus
Mac-1	Macrophagen Antigen 1
MAPK	Mitogen-activated-protein-Kinase
MCP-1	Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1
MFI	Mittlere Fluoreszenz Intensität
MG	Methylglyoxal
MG-H1	Methylglyoxal-Hydromidazon
MHC	Major Histocompatibility Complex
Mil.	Millionen
Min.	Minute
mM	mMol
MMP	Mitochondrial Membranpotential
MODY	Maturity-onset Diabetes of the Young
MOLD	Methylglyoxal-Lysin Dimer
mRNS	Messenger RNS
MW	Mittelwert
n.d.	Nicht-diabetisch
n.s.	Nicht signifikant
nDNS	Nukleäre DNS
NFKBIA	NFKB inhibitor alpha (auch bekannt als I κ B α)
NH	Nebenhoden
NOD	Non-obese diabetic
NO _x	Stickstoffoxide
nRAGE	Nukleäres RAGE
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
O ₂ ⁻	Superoxide
ONOO ⁻	Peroxynitrite
OS	Oxidativer Stress
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDN	Periphere diabetische Neuropathie
PenStrep	Penicillin-Streptomycin
PI	Propodium Iodine
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase

PKA	Proteinkinase A
PPIA	Peptidylprolyl Isomerase A
PVDF	Polyvinylidene fluoride
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RAGE	Rezeptor für Advanced Glycation Endproducts
rER	Raues endoplasmatisches Retikulum
RIP	Rezeptor interagierendes Protein
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS-HCL	Natriumdodecylsulfat-Salzsäure
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
Sek.	Sekunden
SEM	Standard Error of the Mean
SOX-9	SRY-Box-9
Std.	Stunden
STZ	Streptozotocin
T1DM	Diabetes mellitus Typ 1
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
TCA	Trichloressigsäure
Tf	Transkriptionsfaktor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	Unter anderem
Upm.	Umdrehungen pro Minute
v.a.	Vor allem
VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1
VEGF	Endothelwachstumsfaktor
Vs.	Versus
Wo.	Wochen
ZnT8	Zinktransporter 8

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Proinsulins ²²²	11
Abbildung 2: Metabolische Signalwege, die zur Entwicklung von mit T1DM assoziierten Komplikationen beitragen ¹⁷⁵	14
Abbildung 3: Weg der AGE-Entstehung nach der Maillard-Reaktion ²⁶⁹	15
Abbildung 4: Chemische Darstellung der AGE-Entstehung aus Arginin über das Zwischenprodukt Methylglyoxal ²⁵⁹	17
Abbildung 5: Abbau von AGEs über den Glyoxalase (GLO)-Mechanismus ¹¹⁸	18
Abbildung 6: Schematische Darstellung von RAGE ¹⁰⁵	19
Abbildung 7: Aktivierung von RAGE über HMGB1 (A) und Signalkaskaden der Liganden-RAGE-Interaktion ¹⁷¹ (B)	21
Abbildung 8: Skizzierte Darstellung des männlichen Reproduktionstrakts ¹⁹⁶	24
Abbildung 9: Plastikschnitt einer H.E. Färbung eines menschlichen Hodens in 450-facher Vergrößerung	25
Abbildung 10: Schematische Darstellung eines Querschnitts des Nebenhodens (A) sowie der morphologischen Veränderungen des Epithels im anatomischen Verlauf des Nebenhodens (B) ¹¹	27
Abbildung 11: Auswertung der Phänotypisierung über Cell Quest Pro	40
Abbildung 12: Darstellung der chemischen Reaktionen des Abbaus von Methylglyoxal über die Enzyme Glyoxalase I und II und unter der Verwendung des Substrats Glutathion (GSH) ¹⁶⁰	42
Abbildung 13: Lichtmikroskopische Hämatoxylin-Übersichtsfärbung der Caput/Corpusregion des Nebenhodens	56
Abbildung 14: Lichtmikroskopische Hämatoxylin-Übersichtsfärbung der Cauda des Nebenhodens	57
Abbildung 15: Graphische Darstellung der Bestimmung von Methylglyoxal (MG)	59
Abbildung 16: Lichtmikroskopische anti-AGE-Färbung des Hodens	61
Abbildung 17: Lichtmikroskopische anti-AGE-Färbung des Nebenhodens	62
Abbildung 18: Lichtmikroskopische anti-CML-Färbung des Hodens	63
Abbildung 19: Graphische Darstellung der Proteinkonzentration von CML in pg/ μ g im Hoden von 12 und 24 Wo. alten n.d. und d. <i>Ins2</i> ^{Akitas+/-}	64
Abbildung 20: Lichtmikroskopische anti-CML-Färbung des Nebenhodens	65
Abbildung 21: Lichtmikroskopische anti-RAGE-Färbung des Hodens	67

Abbildung 22: Lichtmikroskopische anti-RAGE-Färbung des Nebenhodens.....	69
Abbildung 23: Quantitative Auswertung des Western Blots für RAGE in Hoden und Nebenhoden	70
Abbildung 24: Graphische Darstellung der Proteinbestimmung von Akt über eine Multiplex-Analyse in Hoden und Nebenhoden	72
Abbildung 25: Graphische Darstellung der Proteinbestimmung von ERK1/2 über eine Multiplex-Analyse in Hoden und Nebenhoden	73
Abbildung 26: Lichtmikroskopische anti-Nf- κ B-Färbung des Hodens	74
Abbildung 27: Lichtmikroskopische anti-phospho-Nf- κ B Serin 276 Färbung des Hodens	75
Abbildung 28: Bestimmung der Konfluenz der WL-3 Sertoli-Zellen nach 24, 48, 72 und 96 Std.	81
Abbildung 29: Bestimmung der Zellproliferation von Sertoli-Zellen in % nach 24 Std.	81
Abbildung 30: Apoptosedetektion in Sertoli-Zellen über FACS nach Behandlungen mit MG	82
Abbildung 31: Glukose-Behandlung in unterschiedlichen Konzentrationen (mM) der WL-3 Sertoli-Zellen über den Zeitraum von 1 und 24 Std.....	84
Abbildung 32: Immunfluoreszenzmikroskopische Abbildung von Sertoli-Zellen.....	85
Abbildung 33: Immunfluoreszenzfärbung mit anti-AGE und anti-RAGE an Sertoli-Zellen	86
Abbildung 34: Einfluss von Hyperglykämie auf die nachgeschalteten Signalkaskaden der Liganden-RAGE-Interaktion	102

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Pipettierschema zur Dosis-Wirkungs-Behandlung mit Glukose	36
Tabelle 2:	Pipettierschema zur Dosis-Wirkungs-Behandlung mit MG	38
Tabelle 3:	Übersicht über die Auswertung der FACS-Analyse über Cell Quest Pro	40
Tabelle 4:	Verdünnungsschema für BSA-Standards zur Proteinbestimmung	51
Tabelle 5:	Semiquantitative Untersuchung der Spermatozoendichte des Nebenhodens der <i>Ins2^{Akitas+/-}</i>	58
Tabelle 6:	Statistische Übersicht aus qRT-PCR-Analysen von RAGE-Liganden und dem Rezeptor RAGE	66
Tabelle 7:	Statistische Übersicht aus qRT-PCR-Analysen über die einzelnen Gene der Liganden-RAGE-Interaktion	71
Tabelle 8:	Statistische Übersicht aus qRT-PCR-Analysen von Genen der Nf- κ B- Aktivierung	77
Tabelle 9:	Statistische Übersicht aus qRT-PCR-Analysen über inflammatorische Gene	78
Tabelle 10:	Übersichtstabelle über die relative Genexpression nach Glukosebehandlung	87
Tabelle 11:	Übersicht über ausgewählte Ergebnisse	89
Tabelle 12:	Übersicht über den Nachweis von CML im Reproduktionstrakt von <i>Ins2^{Akita+/-}</i> Mäusen im Vergleich zu vorangegangenen Arbeiten	97
Tabelle 13:	Übersicht über Berechnung der normalisierten relativen Expression aus den Ct-Werten der qRT-PCR am Beispiel von RAGE.....	146
Tabelle 14:	Übersicht über signifikante Veränderung der mit unterschiedlichen Konzentrationen an Glukose behandelten Sertoli-Zellen	147

10 Literaturverzeichnis

1. Abraham, R. S., Wen, L., Marietta, E. V. & David, C. S. Type 1 Diabetes-Predisposing MHC Alleles Influence the Selection of Glutamic Acid Decarboxylase (GAD) 65-Specific T Cells in a Transgenic Model. *J. Immunol.* **166**, 1370–1379 (2001).
2. Agbaje, I. M. *et al.* Insulin dependent diabetes mellitus: implications for male reproductive function. *Hum Reprod* **22**, 1871–1877 (2007).
3. Agbaje, I. *et al.* Increased concentrations of the oxidative DNA adduct 7,8-dihydro-8-oxo-2-deoxyguanosine in the germ-line of men with type 1 diabetes. *Reprod. Biomed. Online* **16**, 401–409 (2008).
4. Aitken, R. J. & Baker, M. A. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol. Cell. Endocrinol.* **250**, 66–69 (2006).
5. Alves, M. G. *et al.* Molecular mechanisms beyond glucose transport in diabetes-related male infertility. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1832**, 626–635 (2013).
6. Alves, M. G., Martins, A. D., Cavaco, J. E., Socorro, S. & Oliveira, P. F. Diabetes, insulin-mediated glucose metabolism and Sertoli/blood-testis barrier function. *Tissue Barriers* **1**, e23992 (2013).
7. Amann, R. P. The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? *J. Androl.* **29**, 469–487 (2008).
8. Amaral, A., Lourenço, B., Marques, M. & Ramalho-Santos, J. Mitochondria functionality and sperm quality. *REPRODUCTION* **146**, R163–R174 (2013).
9. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **35**, (2012).
10. Arai, M., Nihonmatsu-Kikuchi, N., Itokawa, M., Rabbani, N. & Thornalley, P. J. Measurement of glyoxalase activities. *Biochem. Soc. Trans.* **42**, 491–494 (2014).
11. Aronoff, S. L., Berkowitz, K. & Shreiner, B. Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon. *Diabetes Spectr.* **17**, 183–190 (2004).
12. Arrotéia, K. F., Garcia, P. V. & Barbieri, M. F. The Epididymis: Embryology, Structure, Function and Its Role in Fertilization and Infertility. in *Embryology – Updates and Highlights on Classic Topics* 41–66 (IntechOpen, 2012).
13. Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M. & Gommersall, L. Basic principles of real-time quantitative PCR. *216 Expert Rev. Mol. Diagn.* **5**, 209–219 (2005).
14. Awad, A. S. *et al.* Delayed treatment with a small pigment epithelium derived factor (PEDF) peptide prevents the progression of diabetic renal injury. *PLoS One* **10**, 1–17

- (2015).
15. Babaya, N. *et al.* A new model of insulin-deficient diabetes: Male NOD mice with a single copy of Ins1 and no Ins2. *Diabetologia* **49**, 1222–1228 (2006).
 16. Banting, Best, Collip, Campbell & Fletcher. Pancreatic Extracts in Treatment of Diabetes Mellitus. *J. Nerv. Ment. Dis.* **59**, 73 (1924).
 17. Barakat, B., Itman, C., Mendis, S. H. & Loveland, K. L. Activins and inhibins in mammalian testis development: New models, new insights. *Mol. Cell. Endocrinol.* **359**, 66–77 (2012).
 18. Bash, E. Measurement of methylglyoxal by stable isotopic dilution analysis LC-MS/MS with corroborative prediction in physiological samples. *PhD Propos.* **1**, 1–31 (2015).
 19. Basta, G., Schmidt, A. M. & De Caterina, R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: Implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc. Res.* **63**, 582–592 (2004).
 20. van Beijnum, J. R., Buurman, W. A. & Griffioen, A. W. Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1). *Angiogenesis* **11**, 91–99 (2008).
 21. Berner, A. K. *et al.* Protection against methylglyoxal-derived AGEs by regulation of glyoxalase 1 prevents retinal neuroglial and vasodegenerative pathology. *Diabetologia* **55**, 845–854 (2012).
 22. Berthelot, F. *et al.* The Effect of HMGB1, a Damage-Associated Molecular Pattern Molecule, on Polymorphonuclear Neutrophil Migration Depends on Its Concentration. *J. Innate Immun.* **4**, 41–58 (2012).
 23. Bhakkiyalakshmi, E. *et al.* Anti-hyperlipidemic and anti-oxidative role of pterostilbene via Nrf2 signaling in experimental diabetes. *Eur. J. Pharmacol.* **777**, 9–16 (2016).
 24. Bierhaus, A. *et al.* Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes* **50**, 2792–2808 (2001).
 25. Bierhaus, A., Humpert, P. M., Stern, D. M., Arnold, B. & Nawroth, P. P. Advanced glycation end product receptor-mediated cellular dysfunction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1043**, 676–680 (2005).
 26. Biosystems, A. Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR. 70 (2008). Available at: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocu

- ments/cms_042380.pdf. (Accessed: 18th September 2018)
27. Blattner, S. M. *et al.* HHS Public Access. **84**, 920–930 (2014).
 28. Bluestone, J. A., Herold, K. & Eisenbarth, G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature* **464**, 1293–1300 (2010).
 29. Boteanu, R. M., Uyy, E., Suica, V. I. & Antohe, F. High-mobility group box 1 enhances the inflammatory process in diabetic lung. *Arch. Biochem. Biophys.* **583**, 55–64 (2015).
 30. Bourne, R. B., Kretzschmar, W. A. & Esser, J. H. Successful Artificial Insemination in a Diabetic with Retrograde Ejaculation. *Fertil. Sterility* **22**, 275–277 (1971).
 31. Bretzel, R. G. *et al.* Once-daily basal insulin glargine versus thrice-daily prandial insulin lispro in people with type 2 diabetes on oral hypoglycaemic agents (APOLLO): an open randomised controlled trial. *Lancet* **371**, 1073–1084 (2008).
 32. Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **414**, 813–820 (2001).
 33. Cabrera, S. M., Henschel, A. M. & Hessner, M. J. Innate inflammation in type 1 diabetes. *Transl. Res.* **167**, 214–227 (2016).
 34. Cameron, D. O. N. F. *et al.* Interstitial Compartment Pathology and Spermatogenic Disruption in Testes From Impotent Diabetic Men. *Anat. Rec.* **213**, 53–62 (1985).
 35. Carl G. Heller, Y. C. Spermatogenesis in Man: An Estimate of Its Duration. *Science* (80-). **140**, 184–186 (1963).
 36. Catena, R. *et al.* HMGB4, a novel member of the HMGB family, is preferentially expressed in the mouse testis and localizes to the basal pole of elongating spermatids. *Biol. Reprod.* **80**, 358–66 (2009).
 37. Chang, T. *et al.* Modification of Akt1 by methylglyoxal promotes the proliferation of vascular smooth muscle cells. *FASEB J.* **25**, 1746–1757 (2011).
 38. Chen, C. NF-kappaB activity induced by inflammatory cytokines under transplantation environment impairs pancreatic islet survival and intraportal transplantation outcome. (2010).
 39. Chen, Y. *et al.* Iridoid glycoside from *Cornus officinalis* ameliorated diabetes mellitus-induced testicular damage in male rats_ Involvement of suppression of the AGEs/RAGE/p38 MAPK signaling pathway. *J. Ethnopharmacol.* **194**, 850–860 (2016).
 40. Cheng, C. Y. & Mruk, D. D. The Blood-Testis Barrier and Its Implications for. *Pharmacol. Rev.* **64**, 16–64 (2012).
 41. Cooper, T. G. Sperm maturation in the epididymis: A new look at an old problem. *Asian J. Androl.* **9**, 533–539 (2007).

42. Cornwall, G. A. New insights into epididymal biology and function. *Hum. Reprod. Update* **15**, 213–227 (2009).
43. Cyr, D. G. *et al.* Orchestration of occludins, claudins, catenins and cadherins as players involved in maintenance of the blood-epididymal barrier in animals and humans. *Asian J. Androl.* **9**, 463–475 (2007).
44. Czech, M. P. & Corvera, S. Signaling Mechanisms That Regulate Glucose Transport. *J. Biol. Chem.* **274**, 1865–1868 (1999).
45. Dacheux, J., Castella, S., Gatti, J. L. & Dacheux, F. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology* **63**, 319–341 (2005).
46. Dandona, P. *et al.* Insulin infusion suppresses while glucose infusion induces Toll-like receptors and high-mobility group-B1 protein expression in mononuclear cells of type 1 diabetes patients. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **304**, E810–8 (2013).
47. Delfino, F. & Walker, W. H. Stage-Specific Nuclear Expression of NF- κ B in Mammalian Testis. *Mol. Endocrinol.* **12**, 1696–1707 (1998).
48. Deutsche Diabetes Gesellschaft Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Diabetologie. *Diagnostik, Therapie und Verlaufskontrolle des Diabetes mellitus im Kindes- und Jugendalter S3-Leitlinie der DDG und AGPD.* (2015).
49. Dobler, D., Ahmed, N., Song, L., Eboigbodin, K. E. & Thornalley, P. J. Increased dicarbonyl metabolism in endothelial cells in hyperglycemia induces anoikis and impairs angiogenesis by RGD and GFOGER motif modification. *Diabetes* **55**, 1961–1969 (2006).
50. Edfors, F. *et al.* Gene-specific correlation of RNA and protein levels in human cells and tissues. *Mol. Syst. Biol.* **12**, 883 (2016).
51. Eriksson, M., Taskinen, M. & Leppä, S. Mitogen Activated Protein Kinase-Dependent Activation of c-Jun and c-Fos is required for Neuronal differentiation but not for Growth and Stress Response in PC12 cells. *J. Cell. Physiol.* **207**, 12–22 (2006).
52. Eringsmark Regnéll, S. & Lernmark, Å. The environment and the origins of islet autoimmunity and Type 1 diabetes. *Diabet. Med.* **30**, 155–160 (2013).
53. Feghali, C. a & Wright, T. M. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front. Biosci.* **2**, d12–d26 (1997).
54. Fijak, M. & Meinhardt, A. The testis in immune privilege. *Immunol. Rev.* **213**, 66–81 (2006).
55. Forbes, J. M., Cooper, M. E., Oldfield, M. D. & Thomas, M. C. Role of Advanced Glycation End Products in Diabetic Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, S254–S258

- (2003).
56. Frandsen, C. S., Dejgaard, T. F. & Madsbad, S. Non-insulin drugs to treat hyperglycaemia in type 1 diabetes mellitus. *LANCET Diabetes Endocrinol.* **8587**, 1–15 (2016).
 57. Frommhold, D. *et al.* RAGE and ICAM-1 differentially control leukocyte recruitment during acute inflammation in a stimulus-dependent manner. *BMC Immunol.* **12**, 56 (2011).
 58. Fu, M. X. *et al.* The advanced glycation end product, Ne-(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycooxidation reactions. *J. Biol. Chem.* **271**, 9982–9986 (1996).
 59. G Löffler, P.E. Petrides, P. C. H. *Biochemie und Pathobiochemie.* (Springer, 2007).
 60. Gallen, I. Type 1 Diabetes: Clinical Management of the Athlete. *Clin. Chem.* **367**, 194 (2012).
 61. Gelain, D. P. *et al.* Vitamin A (retinol) up-regulates the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) through p38 and Akt oxidant-dependent activation. *Toxicology* **289**, 38–44 (2011).
 62. Gilmore, T. D. Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene* **25**, 6680–6684 (2006).
 63. Goldin, A., Beckman, J. A., Schmidt, A. M. & Creager, M. A. Advanced glycation end products: Sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* **114**, 597–605 (2006).
 64. Gondos, B., Rivkind, Y. & Jovanovic, L. Effect of Increasing Glucose Concentrations on Sertoli Cell Viability in the Nonobese Diabetic Mouse*. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **28**, 236–241 (1998).
 65. Gosmanov AR, Gosmanova E, D.-C. E. Management of adult diabetic ketoacidosis. *Diabetes, Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.* **7**, 255–264 (2014).
 66. Gou, B. J. I. The Sertoli cell in vivo and in vitro. *Cell Biol. Toxicol.* **8**, 49–54 (1992).
 67. Gregory, M. & Cyr, D. G. The blood-epididymis barrier and inflammation. *Spermatogenesis* **4**, 1–13 (2014).
 68. Gros, M., Petrović, M. & Barceló, D. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta* **70**, 678–690 (2006).
 69. Gu, H. F., Ma, J., Gu, K. T. & Brismar, K. Association of intercellular adhesion molecule

- 1 (ICAM1) with diabetes and diabetic nephropathy. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **3**, 1–8 (2013).
70. Gugliucci, A. & Menini, T. The polyamines spermine and spermidine protect proteins from structural and functional damage by AGE precursors: A new role for old molecules? *Life Sci.* **72**, 2603–2616 (2003).
71. Han, Z., Guo, J., Conley, S. M. & Naash, M. I. Retinal angiogenesis in the Ins2Akita mouse model of diabetic retinopathy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **54**, 574–584 (2013).
72. Handelsman, D. J., Boylan, L. M. & Yue, D. K. Testicular Function and Glycemic Control in Diabetic Men A Controlled Study. *Andrologia* **17**, 488–496 (1985).
73. Haneda, M., Chan, S. J., Kwok, S. C., Rubenstein, A. H. & Steiner, D. F. Studies on mutant human insulin genes: identification and sequence analysis of a gene encoding [SerB24]insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 6366–70 (1983).
74. Harris, Helena E., Anderson, Ulf, and Pisetsky, D. HMGB1: A multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* **8**, 195–202 (2012).
75. Hassan, G. A., Sliem, H. A., Ellethy, A. T. & Salama, M. E.-S. Role of immune system modulation in prevention of type 1 diabetes mellitus. *Indian J. Endocrinol. Metab.* **16**, 904–9 (2012).
76. Hayden, M. S. & Ghosh, S. Shared Principles in NF- κ B Signaling. *Cell* **132**, 344–362 (2008).
77. He, C. J., Koschinsky, T., Buenting, C. & Vlassara, H. Presence of diabetic complications in type 1 diabetic patients correlates with low expression of mononuclear cell AGE-receptor-1 and elevated serum AGE. *Mol. Med.* **7**, 159–68 (2001).
78. Hedger, M. P. The Immunophysiology of Male Reproduction. in *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* 805–892 (Elsevier, 2015). doi:10.1016/B978-0-12-397175-3.00019-3
79. Hedger, M. P. *Infection, Immune Homeostasis and Immune Privilege*. (Springer Basel, 2012). doi:10.1007/978-3-0348-0445-5
80. Herbach, N. *et al.* Dominant-Negative Effects of a Novel Mutated Ins2 Loss in Munich Ins2C95S Allele Causes Early-Onset Diabetes and Severe β -Cell Mutant Mice. *Diabetes* **56**, 1268–1276 (2007).
81. Hernandez, L. C. G. J. J. C. & Miralles, J. H. M. J. P. J. M. Semen characteristics and diabetes mellitus: significance of insulin in male infertility. *Arch. Androl.* **26**, 119–127 (1991).
82. Herold, G. *Innere Medizin*. (Gerd Herold, 2015).

83. Hixon, M. L. & Boekelheide, K. Expression and localization of total Akt1 and phosphorylated Akt1 in the rat seminiferous epithelium. *J Androl* **24**, 891–898 (2003).
84. Hodgin, J. B. The Rho GTPases Cdc42 and Rac1 in diabetic Nephropathy. Available at: <http://grantome.com/grant/NIH/K08-DK088944-05>. (Accessed: 10th December 2018)
85. Hofer, D. & Drenckhahn, D. Cytoskeletal Differences Between Stereocilia of the Human Sperm Passageway and Microvilli/Stereocilia in Other Locations. *Anat. Rec.* **245**, 57–64 (1996).
86. Holstein, A., Patzer, O., Tiemann, T., Vortherms, J. & Kovacs, P. Number and sex ratio of children and impact of parental diabetes in individuals with Type 1 diabetes. *Diabet. Med.* **29**, 1268–1271 (2012).
87. Hombrebueno, J. R., Chen, M., Penalva, R. G. & Xu, H. Loss of synaptic connectivity, particularly in second order neurons is a key feature of diabetic retinal neuropathy in the Ins2Akita mouse. *PLoS One* **9**, (2014).
88. Huttunen, H. J., Fages, C. & Rauvala, H. Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE)-mediated Neurite Outgrowth and Activation of NF- κ B Require the Cytoplasmic Domain of the Receptor but Different Downstream Signaling Pathways. *J. Biol. Chem.* **274**, 19919–19924 (1999).
89. In't Veld, P. Insulitis in human type 1 diabetes: The quest for an elusive lesion. *Islets* **3**, 131–138 (2011).
90. Institut, L. LC-MS/MS - Was ist das eigentlich? 2 (2002). Available at: <http://www.lci-koeln.de/deutsch/veroeffentlichungen/lci-focus/lc-ms-ms-was-ist-das-eigentlich->. (Accessed: 19th September 2018)
91. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas Sixth edition*. (2013).
92. Ishihara, K., Tsutsumi, K., Kawane, S., Nakajima, M. & Kasaoka, T. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) directly binds to ERK by a D-domain-like docking site. *FEBS Lett.* **550**, 107–113 (2003).
93. Islam, M. S. Animal models of diabetic neuropathy: Progress since 1960s. *J. Diabetes Res.* **2013**, (2013).
94. Jagt, D. L. Vander. Methylglyoxal, Diabetes mellitus and diabetic complications. *Drug Metabol. Drug Interact.* **23**, 93–124 (2008).
95. Jain, G. C. & Jangir, R. N. Modulation of diabetes-mellitus-induced male reproductive dysfunctions in experimental animal models with medicinal plants. *Pharmacogn. Rev.* **8**, 113–21 (2014).
96. Jakuš, V. & Rietbrock, N. Advanced Glycation End-Products and the Progress of

- Diabetic Vascular Complications. *Physiol. Res.* **53**, 131–142 (2004).
97. Jangir, R. N. & Jain, G. C. Diabetes Mellitus Induced Impairment of Male Reproductive Functions : A Review. *Curr. Diabetes Rev.* **10**, 147–157 (2014).
 98. Janssens, S. & Tschopp, J. Signals from within: the DNA-damage-induced NF-kB response. *Cell Death Differ.* **13**, 773–784 (2006).
 99. Jemal, M. High-throughput quantitative bioanalysis by LC/MS/ MS. *Biomed. Chromatogr.* **14**, 422–429 (2000).
 100. Jensen, T. M. *et al.* Research: Complications Methylglyoxal is associated with changes in kidney function among individuals with screen-detected Type 2 diabetes mellitus. *Diabet. Med.* 1625–1631 (2016). doi:10.1111/dme.13201
 101. Jorge L. Gross, Mirela J. D Azevedo, S. P. S. & Luís Henrique Canani, Marta Luiza Caramori, T. Z. Diabetic Nephropathy: Diagnosis, Prevention, and Treatment. *Diabetes Care* **28**, 164–176 (2005).
 102. Kakoki, M. *et al.* Lack of both bradykinin B1 and B2 receptors enhances nephropathy, neuropathy, and bone mineral loss in Akita diabetic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 10190–10195 (2010).
 103. Kalea, A. Z., Schmidt, A. M. & Hudson, B. I. RAGE: a novel biological and genetic marker for vascular disease. *Clin. Sci.* **116**, 621–637 (2009).
 104. Kanwar, Y. S. *et al.* Diabetic Nephropathy: Mechanisms of Renal Disease Progression. *Exp. Biol. Med.* **233**, 4–11 (2008).
 105. Karimi, J., Goodarzi, M. T., Tavilani, H., Khodadadi, I. & Amiri, I. Relationship between advanced glycation end products and increased lipid peroxidation in semen of diabetic men. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **91**, 61–66 (2011).
 106. Karimi, J., Goodarzi, M. T., Tavilani, H., Khodadadi, I. & Amiri, I. Increased receptor for advanced glycation end products in spermatozoa of diabetic men and its association with sperm nuclear DNA fragmentation. *Andrologia* **44**, 280–286 (2012).
 107. Kawahito, S., Kitahata, H. & Oshita, S. Problems associated with glucose toxicity: Role of hyperglycemia-induced oxidative stress. *World J. Gastroenterol.* **15**, 4137–4142 (2009).
 108. Kendrick, N., Laboratories, K. & St, A. A gene 's mRNA level does not usually predict its protein level.pdf. (2004).
 109. Kerner, W. & Brückel, J. Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. *Diabetologie* **3**, 131–133 (2008).
 110. Kim, S. T. & Moley, K. H. Paternal effect on embryo quality in diabetic mice is related

- to poor sperm quality and associated with decreased glucose transporter expression. *Reproduction* **136**, 313–322 (2008).
111. King, A. J. F. The use of animal models in diabetes research. *Br. J. Pharmacol.* **166**, 877–894 (2012).
112. Klinke, D. J. Extent of beta cell destruction is important but insufficient to predict the onset of type 1 diabetes mellitus. *PLoS One* **3**, 1–10 (2008).
113. Klune, J. & Dhupar, R. HMGB1: Endogenous Danger Signaling. *Mol. Med.* **14**, 476–484 (2008).
114. Kong, X. *et al.* Increased plasma levels of the methylglyoxal in patients with newly diagnosed type 2 diabetes 2. *J Diabetes* **6**, 535–540 (2014).
115. Korejo, N. A., Wei, Q., Shah, A. H. & Shi, F. Effects of concomitant diabetes mellitus and hyperthyroidism on testicular and epididymal histoarchitecture and steroidogenesis in male animals. *J. Zhejiang Univ. B* **17**, 850–863 (2016).
116. Kuhla, B. *et al.* Methylglyoxal, Glyoxal, and Their Detoxification in Alzheimer's Disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1043**, 211–216 (2005).
117. Kumar, V. *et al.* Homeostatic nuclear RAGE–ATM interaction is essential for efficient DNA repair. *Nucleic Acids Res.* **45**, 10595–10613 (2017).
118. Laimer, M. *et al.* Variability of basal rate profiles in insulin pump therapy and association with complications in type 1 diabetes mellitus. *PLoS One* **11**, 1–10 (2016).
119. Lapolla, A. *et al.* Glyoxal and methylglyoxal levels in diabetic patients: Quantitative determination by a new GC/MS method. *Clin. Chem. Lab. Med.* **41**, 1166–1173 (2003).
120. Lawrence, T. The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harb. Lab. Press* 1–10 (2009).
121. Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.-L. & Fernández-Mej, C. Oxidative Stress in Diabetes Mellitus and the Role Of Vitamins with Antioxidant Actions. in *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants* 209–232 (InTech, 2013). doi:10.5772/51788
122. Leblond, C. P. & Clermont, Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **55**, 548–573 (1952).
123. Levy, S. & Robaire, B. Segment-specific changes with age in the expression of junctional proteins and the permeability of the blood-epididymis barrier in rats. *Biol. Reprod.* **60**, 1392–1401 (1999).
124. Li, J. & Schmidt, A. M. Characterization and Functional Analysis of the Promoter of RAGE, the Receptor for Advanced Glycation End Products. *J. Biol. Chem.* **272**, 16498–

- 16506 (1997).
125. Linlin Su, Dolores D Mruk, and C. Y. C. Drug transporters, the blood–testis barrier, and spermatogenesis. *J Endocrinol* **208**, 207–223 (2011).
126. Lo, C. *et al.* Overexpression of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F stimulates renal Ace-2 gene expression and prevents TGF- β 1-induced kidney injury in a mouse model of diabetes. *Diabetologia* **58**, 2443–2454 (2015).
127. Lu, Y. *et al.* Necrosis Is the Dominant Cell Death Pathway in Uropathogenic Escherichia coli Elicited Epididymo-Orchitis and Is Responsible for Damage of Rat Testis. *PLoS One* **8**, (2013).
128. Lutz, W., Leridon, H., Aitken, R. J. & Von Eyben, F. E. Fertility rates and future population trends: Will Europe’s birth rate recover or continue to decline? *Int. J. Androl.* **29**, 25–33 (2006).
129. M.J.Niven, G.A. Hitman, D. F. B. A Study of Spermatozoal Motility in Type 1 Diabetes Mellitus. *Diabet. Med.* **12**, 921–924 (1995).
130. Ma, Q. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* **53**, 401–26 (2013).
131. Mackenzie, R. W. A. & Elliott, B. T. Akt/PKB activation and insulin signaling : a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes, Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.* **7**, 55–64 (2014).
132. Majdalawieh, A. & Ro, H.-S. Regulation of I κ B α Function and NF- κ B Signaling: AEBP1 Is a Novel Proinflammatory Mediator in Macrophages. *Mediators Inflamm.* **2010**, 1–27 (2010).
133. Mallidis, C. *et al.* Advanced glycation end products accumulate in the reproductive tract of men with diabetes. *Int. J. Androl.* **32**, 295–305 (2009).
134. Mallidis, C., Agbaje, I., McClure, N. & Kliesch, S. Einfluss des Diabetes mellitus auf die Fertilität des Mannes. *Urologe* **50**, 33–37 (2011).
135. Mallidis, C. *et al.* Metabolic profile changes in the testes of mice with streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus. *Int. J. Androl.* **32**, 156–165 (2009).
136. Mallidis, C. *et al.* In situ visualization of damaged DNA in human sperm by Raman microspectroscopy. *Hum. Reprod.* **26**, 1641–1649 (2011).
137. Mallidis, C. *et al.* Distribution of the receptor for advanced glycation end products in the human male reproductive tract: prevalence in men with diabetes mellitus. *Hum. Reprod.* **22**, 2169–2177 (2007).
138. Mallidis, C. *et al.* Spermatogenic and sperm quality differences in an experimental model

- of metabolic syndrome and hypogonadal hypogonadism. *Reproduction* **142**, 63–71 (2011).
139. Mallidis, C., Agbaje, I., O'Neill, J. & McClure, N. The influence of type 1 diabetes mellitus on spermatogenic gene expression. *Fertil. Steril.* **92**, 2085–2087 (2009).
140. Mantell, L. L., Parrish, W. R. & Ulloa, L. HNGB-1 as a therapeutic target for infectious and inflammatory disorders. *SHOCK* **25**, 4–11 (2006).
141. Maresch, C. C. *et al.* Hyperglycemia is associated with reduced testicular function and activin dysregulation in the Ins2 Akita+/- mouse model of type 1 diabetes. *Mol. Cell. Endocrinol.* **446**, 91–101 (2017).
142. Maresch, C. C. *et al.* Diabetes-induced hyperglycemia impairs male reproductive function: a systematic review. *Hum. Reprod. Update* **24**, 1–22 (2017).
143. Maresch, C. C. Hyperglycaemia is Associated with Male Infertility and Activin Dysregulation in Type 1 Diabetes. (2016).
144. Maritim, A. C., Sanders, R. A. & Watkins, J. B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **17**, 24–38 (2003).
145. Martinez, M. & Martinez, F. E. Spermatogenic Cycle Length and Spermatogenic Efficiency. *J. Androl.* **25**, 872–880 (2004).
146. McLellan, A. C., Thornalley, P. J., Benn, J. & Sonksen, P. H. Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. *Clin. Sci. (Lond).* **87**, 21–9 (1994).
147. McVicar, C. M. *et al.* Role of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in retinal vasodegenerative pathology during diabetes in mice. *Diabetologia* **58**, 1129–1137 (2015).
148. Meier, J. J. Therapie des Typ-2-Diabetes. *Internist (Berl).* **57**, 153–165 (2016).
149. Milne, R. & Brownstein, S. Advanced glycation end products and diabetic retinopathy. *Amino Acids* **44**, 1397–1407 (2013).
150. Mital, P., Hinton, B. T. & Dufour, J. M. The Blood-Testis and Blood-Epididymis Barriers Are More than Just Their Tight Junctions. *Biol. Reprod.* **84**, 851–858 (2011).
151. Miura, J. *et al.* AGE down-regulation of monocyte RAGE expression and its association with diabetic complications in type 1 diabetes. *J. Diabetes Complications* **18**, 53–59 (2004).
152. Monden, M. *et al.* Receptor for advanced glycation end products regulates adipocyte hypertrophy and insulin sensitivity in mice: Involvement of toll-like receptor 2. *Diabetes* **62**, 478–489 (2013).

153. Morcos, M. *et al.* Glyoxalase-1 prevents mitochondrial protein modification and enhances lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* **7**, 260–269 (2008).
154. Morimoto-Yamashita, Y. *et al.* Periodontal disease and type 2 diabetes mellitus: Is the HMGB1–RAGE axis the missing link? *Med. Hypotheses* **79**, 452–455 (2012).
155. Mueller, S. O. & Korach, K. S. Immortalized Testis Cell Lines From Estrogen Receptor (ER) alpha Knock-Out and Wild-Type Mice Expressing Functional ER alpha or ER beta. *J. Androl.* **22**, 652–664 (2001).
156. Mulholland, J., Mallidis, C., Agbaje, I. & McClure, N. Male diabetes mellitus and assisted reproduction treatment outcome. *Reprod. Biomed. Online* **22**, 215–219 (2011).
157. Murata-Kamiya, N., Kamiya, H., Kaji, H. & Kasai, H. Methylglyoxal induces G:C to C:G and G:C to T:A transversions in the supF gene on a shuttle vector plasmid replicated in mammalian cells. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **468**, 173–182 (2000).
158. Nakamura, B. N. *et al.* Knockout of the transcription factor NRF2 disrupts spermatogenesis in an age-dependent manner. *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 1368–1379 (2010).
159. Nakayama, M., Simmons, K. M. & Michels, A. W. Molecular Interactions Governing Autoantigen Presentation in Type 1 Diabetes. *Curr. Diab. Rep.* **15**, 1–7 (2015).
160. Nangaku, M. *et al.* Glyoxalase I deficiency is associated with an unusual level of advanced glycation end products in a hemodialysis patient. *Int. Congr. Ser.* **1245**, 357 (2002).
161. National Center for Biotechnology Information. Akt1 thymoma viral proto-oncogene 1 [Mus musculus (house mouse)]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11651>. (Accessed: 19th September 2018)
162. National Center for Biotechnology Information. Primer-Blast A tool for finding specific primers. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. (Accessed: 19th September 2018)
163. National Research Company. Guide for the care and use of laboratory animals-eighth edition. *National Academy of Science* 246 (2011). Available at: <https://grants.nih.gov/grants/olaw/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>. (Accessed: 22nd September 2018)
164. Nawroth, P. *Measurement of Dicarboxyls by Isotope Dilution Liquid Chromatography, Tandem Mass Spectroscopy (LC-MS/MS)*. (2014).
165. Nawroth, P. *Determination of D-Lactate Assay in physiological samples*. (2013).

166. Nawroth, P. *Assessing Glyoxalase I (GLOI) Activity*.
167. Nguyen, T., Nioi, P. & Pickett, C. B. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **284**, 13291–13295 (2009).
168. Nicholls, P. K. *et al.* Activin signaling regulates sertoli cell differentiation and function. *Endocrinology* **153**, 6065–6077 (2012).
169. Nishi, M. & Nanjo, K. Insulin gene mutations and diabetes. *J. Diabetes Investig.* **2**, 92–100 (2011).
170. Nogueira-Machado, J. A. & Chaves, M. M. From hyperglycemia to AGE-RAGE interaction on the cell surface : A dangerous metabolic route. *Expert Opin. Ther. Targets* **12**, 871–882 (2008).
171. Nogueira-Machado, J. A., Volpe, C. M. D. O., Veloso, C. A. & Chaves, M. M. HMGB1, TLR and RAGE: a functional tripod that leads to diabetic inflammation. *Expert Opin. Ther. Targets* **15**, 1023–35 (2011).
172. O'Donnell, L., Nicholls, P. K., O'Bryan, M. K., McLachlan, R. I. & Stanton, P. G. Spermiation. *Spermatogenesis* **1**, 14–35 (2011).
173. O'Neill, J. *et al.* Differences in mouse models of diabetes mellitus in studies of male reproduction. *Int. J. Androl.* **33**, 709–716 (2010).
174. Oakberg, E. F. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Biol. Div. Oak Ridge Natl. Lab. Oak Ridge, Tennessee* 507–516
175. Oliveira, M. I. A. *et al.* RAGE receptor and its soluble isoforms in diabetes mellitus complications. *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* **49**, 97–108 (2013).
176. Orman, D., Vardi, N., Ates, B., Taslidere, E. & Elbe, H. Tissue and Cell Aminoguanidine mitigates apoptosis, testicular seminiferous tubules damage, and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Tissue Cell* **47**, 284–290 (2015).
177. Ozaki, K. *et al.* Targeting the ERK signaling pathway as a potential treatment for insulin resistance and type 2 diabetes. *Am. J. Physiol. Metab.* **310**, E643–E651 (2016).
178. Parajuli, A. *et al.* Bone's responses to mechanical loading are impaired in type 1 diabetes. *Bone* **81**, 152–160 (2015).
179. Patterson, C. C. *et al.* Trends and cyclical variation in the incidence of childhood type 1 diabetes in 26 European centres in the 25 year period 1989–2013: a multicentre prospective registration study. *Diabetologia* **62**, 408–417 (2019).
180. Pellegrini, S., Cantarelli, E., Sordi, V., Nano, R. & Piemonti, L. The state of the art of islet transplantation and cell therapy in type 1 diabetes. *Acta Diabetol.* **53**, 683–691

- (2016).
181. Pentikäinen, V. *et al.* Nuclear factor-kappa B activation in human testicular apoptosis. *Am. J. Pathol.* **160**, 205–18 (2002).
 182. Perkins, N. D. & Gilmore, T. D. Good cop, bad cop: the different faces of NF- κ B. *Cell Death Differ.* **13**, 759–772 (2006).
 183. Phillips, S. A., Park, W. & Kingdom, U. Fluorimetric Assay of D-Lactate. *Anal. Biochem.* **206**, 12–16 (1992).
 184. Phillips, S. a & Thornalley, P. J. The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal. *Eur. J. Biochem.* **212**, 101–105 (1993).
 185. Pickup, J. C. & Crook, M. A. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia* **41**, 1241–1248 (1998).
 186. Piras, S. *et al.* RAGE Expression and ROS Generation in Neurons: Differentiation versus Damage. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 1–9 (2016).
 187. Poulsen, M. W. *et al.* Advanced glycation endproducts in food and their effects on health. *Food Chem. Toxicol.* **60**, 10–37 (2013).
 188. Queisser, M. A. *et al.* Hyperglycemia Impairs Proteasome Function by Methylglyoxal. *Diabetes* **59**, (2010).
 189. Rabbani, N. & Thornalley, P. J. Measurement of methylglyoxal by stable isotopic dilution analysis LC-MS/MS with corroborative prediction in physiological samples. *Nat. Protoc.* **9**, 1969–79 (2014).
 190. Rabbani, N. & Thornalley, P. J. Advanced glycation end products in the pathogenesis of chronic kidney disease. *Kidney Int.* **93**, 803–813 (2018).
 191. Ramasamy, R., Yan, S. F. & Schmidt, A. M. Receptor for AGE (RAGE): signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications Ravichandran. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1243**, 88–102 (2011).
 192. Rauvala, H. & Rouhiainen, A. Physiological and pathophysiological outcomes of the interactions of HMGB1 with cell surface receptors. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1799**, 164–170 (2010).
 193. Rauvala, H. & Rouhiainen, A. RAGE as a Receptor of HMGB1 (Amphoterin): Roles in Health and Disease. *Curr. Mol. Med.* **7**, 725–734 (2007).
 194. Rekittke, N. E., Ang, M., Rawat, D., Khatri, R. & Linn, T. Regenerative therapy of type 1 diabetes mellitus: From pancreatic islet transplantation to mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int.* **2016**, (2016).

195. Riddle, V. M. & Lorenz, F. W. Nonenzymic formation of toxic levels of methylglyoxal from glycerol and dihydroxyacetone in ringers's phosphate suspensions of avian spermatozoa. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **50**, 27–34 (1973).
196. ROBAIRE, B., HINTON, B. & ORGEBINCRIST, M. The Epididymis. in *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* 1071–1148 (Elsevier, 2006). doi:10.1016/B978-012515400-0/50027-0
197. Robert John Aitken, D, Zamira Gibb, Mark A. Baker, J. D. and P. G. Causes and consequences of oxidative stress in in spermatozoa. *Reproduction, Fertil. Dev.* **28**, 1–10 (2016).
198. Roessner, C., Paasch, U., Glander, H. & Grunewald, S. Sperm apoptosis signalling in diabetic men. *Reprod. Biomed. Online* **25**, 292–299 (2012).
199. Rogers, R. *et al.* Cross-talk between the Akt and NF- κ B signaling pathways inhibits MEHP-induced germ cell apoptosis. *Toxicol. Sci.* **106**, 497–508 (2008).
200. Romeo, J. H., Seftel, A. D., Madhun, Z. T. & Aron, D. C. Sexual function in men with diabetes type 2: association with glycemic control. *J. Urol.* **163**, 788–791 (2000).
201. Sandireddy, R., Yerra, V. G., Areti, A., Komirishetty, P. & Kumar, A. Neuroinflammation and oxidative stress in diabetic neuropathy: Futuristic strategies based on these targets. *Int. J. Endocrinol.* **2014**, (2014).
202. Schiavi, R. C., Stimmei, B. B., Mandeli, J. & Rayfield, E. J. Diabetes mellitus and male sexual function: a controlled study R. *Diabetologia* **36**, 745–751 (1993).
203. Schlegel, M. G. and P. N. Surgical and Medical Management of Male Infertility. *Anat. Physiol. Male Reprod. Syst.* 1–10 (2013).
204. Schmidt, G. A. W. *et al.* *Duale Reihe Anatomie.* (Georg Thieme Verlag KG, 2010).
205. Schmittgen, T. D. *et al.* Quantitative Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction to Study mRNA Decay: Comparison of Endpoint and Real-Time Methods. *Anal. Biochem.* **285**, 194–204 (2000).
206. Schoeller, E. L. *et al.* Leptin monotherapy rescues spermatogenesis in male akita type 1 diabetic mice. *Endocrinology* **155**, 2781–2786 (2014).
207. Schoeller, E. L., Albanna, G., Frolova, A. I. & Moley, K. H. Insulin rescues impaired spermatogenesis via the hypothalamic-pituitary- gonadal axis in Akita diabetic mice and restores male fertility. *Diabetes* **61**, 1869–1878 (2012).
208. Schulte, Erik, U. S. und M. S. *PROMETHEUS Lernatlas der Anatomie.* (Georg Thieme Verlag, 2005).
209. Schuppe, H. & Meinhardt, A. Immune Privilege and Inflammation. *Immunol. Male*

- Reprod. Syst. Male Infertil. Contracept. Markert* **88**, 1–14 (2005).
210. Sertoli, E. Historical tribute. *Hum. Reprod.* **2**, 83–84 (1987).
211. Sexton, W. J. & Jarow, J. P. Effect of diabetes mellitus upon male reproductive function. *Urology* **49**, 508–513 (1997).
212. SF, G. *Developmental Biology*. 6th edition. *Sinauer Associates, Inc.* (2000). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10095/>. (Accessed: 18th September 2018)
213. Shaw, J. E., Sicree, R. A. & Zimmet, P. Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **87**, 4–14 (2010).
214. Silink, M. Childhood Diabetes: A Global Perspective. *Horm. Res.* **57**, 1–5 (2002).
215. Sims, G. P., Rowe, D. C., Rietdijk, S. T., Herbst, R. & Coyle, A. J. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 367–388 (2010).
216. Singh, R., Barden, A., Mori, T. & Beilin, L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* **44**, 129–146 (2001).
217. Sjöberg, L., Pitkäniemi, J., Haapala, L. & Kaaja, R. Fertility in people with childhood-onset type 1 diabetes. *Diabetologia* **56**, 78–81 (2013).
218. Soudamani, S., Malini, T. & Balasubramanian, K. Effects of Streptozotocin-Diabetes and Insulin Replacement on the Epididymis of Prepubertal Rats: Histological and Histomorphometric Studies. *Endocr. Res.* **31**, 81–98 (2005).
219. Soulis, T. *et al.* Advanced glycation end products and their receptors co-localise in rat organs susceptible to diabetic microvascular injury. *Diabetologia* **40**, 619–628 (1997).
220. Sparvero, L. J. *et al.* RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts), RAGE Ligands, and their role in Cancer and Inflammation. *J. Transl. Med.* **7**, 17 (2009).
221. Spector, A. Review: Oxidative Stress and Disease. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **16**, 193–201 (2000).
222. Spinas G, F. S. *Endokrinologie und Stoffwechsel*. (Georg Thieme Verlag, 2011). doi:10.1055/b-002-6246
223. Stanton, P. G. Regulation of the blood-testis barrier. *Semin. Cell Dev. Biol.* **59**, 166–173 (2016).
224. Starkey, J. M. *et al.* Diabetes-induced activation of canonical and noncanonical nuclear factor- κ B pathways in renal cortex. *Diabetes* **55**, 1252–1259 (2006).
225. Steen, E. *et al.* Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease - is this type 3 diabetes? *J. Alzheimers. Dis.* **7**, 63–80 (2005).
226. Sun, W. *et al.* Immune complexes activate human endothelium involving the cell-

- signaling HMGB1-RAGE axis in the pathogenesis of lupus vasculitis. *Lab. Investig.* **93**, 626–638 (2013).
227. Szablewski, L. Glucose Homeostasis – Mechanism and Defects. in *Diabetes - Damages and Treatments Downloaded* (ed. Rigobelo, P. E.) 227–256 (IntechOpen, 2011).
228. Takeuchi, M. *et al.* Assessment of the concentrations of various advanced glycation end-products in beverages and foods that are commonly consumed in Japan. *PLoS One* **10**, 5–15 (2015).
229. Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* **140**, 805–820 (2010).
230. Tan, A. L. Y., Forbes, J. M. & Cooper, M. E. AGE, RAGE, and ROS in Diabetic Nephropathy. *Semin. Nephrol.* **27**, 130–143 (2007).
231. Tanaka, N. *et al.* The receptor for advanced glycation end products is induced by the glycation products themselves and tumor necrosis factor-alpha through nuclear factor-kappa B, and by 17beta-estradiol through Sp-1 in human vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 25781–25790 (2000).
232. Tarulli, G. A., Stanton, P. G. & Meachem, S. J. Is the adult Sertoli cell terminally differentiated? *Biol. Reprod.* **87**, 13, 1–11 (2012).
233. Thornalley, P. J. Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification--a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen. Pharmacol.* **27**, 565–573 (1996).
234. Thornalley, P. J. *et al.* Imidazopurinones are markers of physiological genomic damage linked to DNA instability and glyoxalase 1-associated tumour multidrug resistance. *Nucleic Acids Res.* **38**, 5432–5442 (2010).
235. Thornalley, P. J. Dicarbonyl Intermediates in the Maillard Reaction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1043**, 111–117 (2005).
236. Thornalley, P. J., Langborg, A. & Minhas, H. S. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem. J.* **344**, 109–116 (1999).
237. Thornalley, P. J. *et al.* Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem. J.* **375**, 581–592 (2003).
238. Thornalley, P. J. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems - role in ageing and disease. *Drug Metabol. Drug Interact.* **23**, 125–150 (2009).

-
239. Thornalley, P. J. Modification of glyoxalase system in human red blood cells by glucose in vitro. *Biochem. J.* **254**, 751–755 (1988).
240. Tung, C. & Diekmann, S. Definitions and Nomenclature of Nucleic Acid Structure Parameters. *J. Mol. Biol.* **205**, 787–791 (1989).
241. Ulfing, N. *Kurzlehrbuch Embryologie*. (Georg Thieme Verlag KG 2005, 2005).
242. La Vignera, S. *et al.* Reproductive function in male patients with type 1 diabetes mellitus. *Andrology* **3**, 1082–1087 (2015).
243. La Vignera, S., Condorelli, R., Vicari, E., D’Agata, R. & Calogero, A. E. Diabetes mellitus and sperm parameters. *J. Androl.* **33**, 145–153 (2012).
244. Vlassara, H. & Striker, G. E. AGE restriction in diabetes mellitus: a paradigm shift. *Nat. Rev. Endocrinol.* **7**, 526–539 (2011).
245. Vogel, C. & Marcotte, E. M. Insights into regulation of protein abundance from proteomics and transcriptomics analyses. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 227–232 (2013).
246. Wan, W. *et al.* The Emerging Role of HMGB1 in Neuropathic Pain: A Potential Therapeutic Target for Neuroinflammation. *J. Immunol. Res.* **2016**, (2016).
247. Wang, H., Qu, H. & Deng, H. Plasma HMGB-1 levels in subjects with obesity and type 2 diabetes: A cross-sectional study in China. *PLoS One* **10**, 1–10 (2015).
248. Wang, J. *et al.* A mutation in the insulin 2 gene induces diabetes with severe pancreatic β -cell dysfunction in the Mody mouse. *J. Clin. Invest.* **103**, 27–37 (1999).
249. Welsch, P. D. med. D. rer. nat. U. *Sobotta Lehrbuch Histologie*. (Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, 2006).
250. Wessel, G. M. Accessorizing the testis. Enrico Sertoli and the ‘mother cell’ of the testis. *Mol. Reprod. Dev.* **78**, 2005 (2011).
251. Wiedenmann, T. *et al.* Modulation of glutathione peroxidase activity by age-dependent carbonylation in glomeruli of diabetic mice. *J. Diabetes Complications* **32**, 130–138 (2018).
252. Wiedenmann, T. *et al.* Journal of Diabetes and Its Complications Modulation of glutathione peroxidase activity by age-dependent carbonylation in glomeruli of diabetic mice. *J. Diabetes Complications* **32**, 130–138 (2018).
253. Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R. & King, H. Global Prevalence of Diabetes Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* **27**, 1047–1053 (2004).
254. Wong, E. W. P., Mruk, D. D., Lee, W. M. & Cheng, C. Y. Regulation of blood-testis barrier dynamics by TGF-beta3 is a Cdc42-dependent protein trafficking event. *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 11399–11404 (2010).
255. World Health Organization. *Global Report on Diabetes*. (2016).
256. Wu, H. *et al.* High Mobility Group Box-1: A Missing Link between Diabetes and Its Complications. *Mediators Inflamm.* **2016**, 1–11 (2016).
257. Wygrecka, M. *et al.* Loss of RAGE in Pulmonary Fibrosis Molecular Relations to Functional Changes in Pulmonary Cell Types. *Am J Respir Cell Mol Biol Vol* **39**, 337–345 (2008).
258. Xu, B. *et al.* Testicular lumicrine factors regulate ERK, STAT, and NFκB pathways in the initial segment of the rat epididymis to prevent apoptosis. *Biol. Reprod.* **84**, 1282–1291 (2011).
259. Xue, J. *et al.* The Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Specifically Recognizes Methylglyoxal-Derived AGEs. *Biochemistry* **53**, 3327–3335 (2014).
260. Yamamoto, Y. & Yamamoto, H. Controlling the receptor for advanced glycation end-products to conquer diabetic vascular complications. *J. Diabetes Investig.* **3**, 107–114 (2012).
261. Yan, S. F., Ramasamy, R., Naka, Y. & Schmidt, A. M. Glycation, Inflammation, and RAGE. *Circ. Res.* **93**, 1159–1169 (2003).
262. Yang, H., Antoine, D. J., Andersson, U. & Tracey, K. J. The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis. *J Leukoc Biol* **93**, 865–73 (2013).
263. Yao, D. & Brownlee, M. Hyperglycemia-Induced Reactive Oxygen Species Increase Expression of the Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) and RAGE Ligands. *Diabetes* **59**, 249–255 (2010).
264. Yoshioka, M., Kayo, T., Ikeda, T. & Koizumi, A. A Novel Locus, Mody4, Distal to D7Mitl89 on Chromosome 7 Determines Early-Onset NIDDM in Nonobese C57BL/6 (Akita) Mutant Mice. *Diabetes* **46**, 887–894 (1997).
265. Yu, Y. *et al.* The role of high mobility group box 1 (HMGB-1) in the diabetic retinopathy inflammation and apoptosis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 6807–6813 (2015).
266. Zeleznik Tony, P. A. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction 4th Edition. in (ed. Zeleznik Tony, P. A.) 2684 (Academic Press, 2015).
267. Zhang, H. *et al.* Interleukin-6 disrupts blood-testis barrier through inhibiting protein degradation or activating phosphorylated ERK in Sertoli cells. *Sci. Rep.* **4**, 4260 (2014).
268. Zhang, W., Thompson, B. J., Hietakangas, V. & Cohen, S. M. MAPK/ERK Signaling Regulates Insulin Sensitivity to Control Glucose Metabolism in Drosophila. *PLoS Genet.*

- 7, e1002429 (2011).
269. Zhang, X. *et al.* Monitoring the formation of Maillard reaction products of glucosamine with fibrinogen and human serum albumin using capillary electrophoresis. *Anal. Biochem.* **325**, 255–259 (2004).
270. Zhao, S., Zhu, W., Xue, S. & Han, D. Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity. *Cell. Mol. Immunol.* **11**, 428–37 (2014).
271. Zierler, K. Whole body glucose metabolism. *Am. Physiol. Soc.* 409–426 (1999).
272. Methylglyoxal. Available at: <https://de.wikipedia.org/wiki/Methylglyoxal>. (Accessed: 16th February 2019)

11 Anhang

11.1 Materialien

Im Folgenden aufgelistet sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Kits, Puffer, Lösungen, Verbrauchsmaterialien, Instrumente und Software sowie genutzte Primer und AK.

11.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Bestellnummer
EDTA	Serva	11278.01
Ethanol (> 99.5%)	Roth	5054.3
Ethanol 100% (nicht denaturiert)	Chem-Supply	EL043-20L-P
Ethanol 100%		64-17-5
Hematoxyline	Merck	1051750500
Methylglyoxallösung (40% in H ₂ O)	Sigma	M0252
Pen./Strep.	Fa Gibco	15140-122
FBS	Biowest	S1810
Natriumpyruvat	Gibco	11360-039
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Roth	67-68-5
Trypsin/EDTA	Invitrogen Gibro	
2-β-Mercaptoethanol (min. 98%)	Sigma	M3148
RNase-freies Wasser	Invitrogen	
Acetic acid-n-butylester (EBE)	Roth	123-86-4
D(+) - Glucose	Roth	6780.1
Annexin V FITC	BD Biosciences	556419
Sodium-dodecyl-sulfate (SDS)	Bio-Rad	161-0301
Propodium Iodine	Sigma	P-4170
Paraffin	Medium-Histotechnologie	10-0005
Harris' Hämatoxylin	AppliChem	
Trypan blau 0,4%	Sigma	T8154
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma	9048-46-8
Tris-Puffer	AppliChem	77-86-1
Fuchsin	Serva	21916
Levamisol DAB #3021	DAKO	
Harris' Hämatoxylin	Sigma	HHS16

VectaMount AQ Aqueous Mounting Medium	Vector Laboratories	H-5501
H ₂ O ₂ (Hypdrogenperoxide) 30%	Merck	7722-84-1
Höchst	Sigma	33342
Prolong Gold	Invitrogen	
Fixogum	Marabu	
Aceton	Roth	67-64-1
HCl (37%)	Merck	K35557371 603

Die Chemikalien wurden von folgenden Firmen bereitgestellt:

Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), DAKO (Santa Clara, CA, USA) Life Technologies GmbH (Darmstadt, Germany), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland), VWR International (Leuven, Niederlande), BD Biosciences (CA, USA), AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland), ThermoScientific (MA, USA)

11.1.2 Kits

Name des Kits	Hersteller	Sitz des Hersteller
RNeasy Mini Kit	QIAGEN	Düsseldorf, Deutschland
Power SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystem	Darmstadt, Deutschland
RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN cat. No. 74804)	QIAGEN	Düsseldorf, Deutschland
Superskript III VILO Kit	Invitrogen AG	Carlsbad, CA, USA
IQ SYBR Green Supermix	Bio-Rad	München, Deutschland
Mouse-on-Mouse (M.O.M. TM) Elite Peroxidase Kit, #PK-2200	Vector Laboratories Inc	Burlingame, CA, USA
Roti [®] -Histokitt, #6640	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland

11.1.3 Puffer, Lösungen und Medien

Puffer/Lösung/Medium	Zusammensetzung
Kulturmedium: DMEM-F12 Medium (500ml) von Gibco (31331-022)	Medium + 10% fetales Rinderserum (FBS) + 1% Penicillin-Streptomycin (Pen.Strep.)
Glukosefreies Medium: DMEM (500ml) von Gibco (11870-020)	Medium + 10% FBS + 1% PenStrep und 1 mM Natriumpyruvat

HSB-Puffer(pH 7.2)	5 ml Bikarbonat-Puffer + 0.025 g BSA
Bikarbonat-Puffer	50 ml HS Puffer + 0.063 g NaHCO ₃
HS-Puffer	100 ml HS-Puffer-Stammlösung + 0.3 g Glukose + 4 ml HEPES (1 M, pH 7.4) + 0.5 ml Lactat + 0.022 g Pyruvat wird aufgefüllt auf 200 ml und auf pH 7.4 eingestellt
HS-Puffer-Stammlösung	270 mM NaCl (15.77 g) + 10 mM KCl (0.745g) + 2 mM MgSO ₄ + 4 mM CaCl ₂
SDS-Running-Puffer (10x)	250mM Tris (30,29 g), 2 M Glycin (150 g), 1 % SDS (100 ml von 10%iger SDS-Lösung) ad 1 L dH ₂ O pH 8,3
Trenngelpuffer (Tris pH 8,8)	1,5 M Tris mit HCl auf pH 8,8 einstellen
Sammgelpuffer (Tris 6,8)	1,5 M Tris mit HCl auf 6,8 einstellen
Transferpuffer (1 L) pH 8,0-8,5	48 mM Tris (2,93 g), 38 mM Glycin (5,82 g), 20 % (v/v) MeOH (200 nl), 0,0375 ml 10 % SDS) ad 1 L dH ₂ O
Odyssey-Blocking Puffer (OBP)	2:1 verdünnt in PBS
PBST (Waschpuffer) pH 7,4	1 L PBS-Puffer, 1 ml Tween-20 (0,1%)
SDS-Gel Färber	0,1% Coomassie, 10% Essigsäure, 20% MeOH ad 1 L dH ₂ O
SDS-Gel Entfärber	40% MeOH, 10% Essigsäure ad 1 L dH ₂ O
Annexin V binding buffer	10X (BD, #556454)
Mastermix für cDNS Synthese	4 μ l 5 x First Strand Puffer, 2 μ l 0,1 m DTT, 1 μ l 10 mM dNTP Mischung, 1 μ l 0,5 ng/ μ l Oligo dTs und 1 μ l Superscript III
EBE Lösung	I EBE (1 Part) + 99% Ethanol (2 Parts)
EBE Lösung II	EBE (2 Parts) + 99% Ethanol (1 Part)
EBE Lösung III & IV EBE	Pures EBE
Retrival Puffer (Zitratpuffer)	Dako REAL™ Target Retrival Solution (10x) 32031
10x PBS Stammlösung (pH 7.5)	28.8 g Na ₂ HPO ₄ + 4.8 g KH ₂ PO ₄ + 160 g NaCl + 4 g KCl + 1.8 L MilliQ H ₂ O, pH auf 7.5 einstellen und auf 2 L mit MilliQ H ₂ O einstellen
1x PBS	100 ml 10x PBS Stammlösung (pH 7.5) + 900 ml RO H ₂ O
RIPA-Puffer	0.438 g NaCl + 0.25 g Natriumdeoxychololat +0.05 g SDS + 0.5 ml Igepal CA 630 + 50 mL

3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium Bromide (MTT) (#M5655, Sigma)	2mg/ml Stammlösung in PBS
Ziegenserum (S2000-100)	BioWest
Trenngel	2,3 ml dH ₂ O, 5 ml Acrylamid (30%), 2,5 ml 1,5 M Tris (Ph 8,8), 100 µl SDS (10%), 100µl APS (10%), 4 µl TEMED
Sammelgel	2,1 ml dH ₂ O, 500 µl Acrylamid (30%), 380µl 1,5 M Tris (Ph 6,8), 30 µl SDS (10%), 30 µl APS (10%), 3 µl TEMED

11.1.4 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Behälter	Duran
96-Well Platten Zellkultur	Greiner Bio-One
Zellkultur Tubes	Greiner Bio-One
Zellkulturflaschen Cellstar cell culture Flasks (500 ml, 175 cm ²)	Greiner
Zellkulturschalen (60 mm x 15 mm)	Sarstedt
Erlenmeyer Flaschen	Duran
Glasflaschen	Duran
Messbecher (measuring cylinder)	Brand
Micro- und Reaktions Tubes (1,5 und 2 ml)	Sarstedt
Parafilm® M	Pechiney Plastic Packaging
Pasteurpipette (150 mm)	Carl Roth
Pipetten Spitzen (10, 200, 1000 µl)	Sarstedt
Zentrifugations- und Reagenz Tubes (15, 50 ml)	Sarstedt
Objektträger (Super Fast Ultra Plus)	R. Langenbrinck GmbH
Cellstar Tubes 15 ml, blue caps	Greiner
Rotilabo®-inoculating loops	Carl Roth
Skalpell	Carl Roth
Steristoppers®	Carl Roth
Glas Tubes	ThermoScientific
96-Wellplatte (Protein)	Thermo Fisher Scientific Inc.
GB002 gel-blotting-paper Schleicher	Schleicher & Schuell
Gefäß 120 ml	Sarstedt

Magpix Performance Verification Kit	EMD
Magpix Performance Calibration Kit	EMD
PAP Pen Immunostaining Pen - Spitzendicke: 2 mm	Kisker Biotech #N71310
PCR Tube 0,2 ml	Eppendorf
Reagenzgefäß SafeSeal 1,5 ml	Sartstedt
Kryoeinfrierröhrchen 1 ml (123263)	Greiner Bio-One
6-Well Platte (657 160)	Greiner Bio-One

Das Verbrauchsmaterial wurde von folgenden Firmen bereitgestellt:

Brand GmbH (Wertheim, Deutschland), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Duran Group GmbH (Wertheim/Main, Deutschland), Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland), ThermoScientific (MA, USA), Pechiney (Chicago, USA), Sarstedt AG & Co. (Nürnberg, Germany), Schleicher & Schuell (Dassel, Deutschland), und EMD Millipore (MS, USA), Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland), Kisker Biotech GmbH & Co. KG (Steinfurt, Deutschland)

11.1.5 Instrumente

Instrument	Firma (Hersteller)	Sitz der Firma
Zellzähler von Assistent Counter AC-15	P+W Medizintechnik	Berlin, Deutschland
Blutzuckermessgerät Accu-Check Aviva	Roche	Mannheim, Deutschland
Zentrifuge	Biofuge 13, ID: 1003821 Heraeus Instruments	Heidelberg, Deutschland
Vortex Mixer	neoLab Miggez	Hanau, Deutschland
Mikrowelle MW-17	AFK Germany	Heidelberg, Deutschland
Brutschrank CO ₂ Inkubator Heraeus B 5028	Haeraeus Holding GmbH	Hanau, Deutschland
Wasserbad	Bandelin	Berlin, Deutschland
Real-Time PCR System StepOnePlus	Applied Biosystems	Waltham, MA, USA
Thermocycler 173L	VWR International	Leuven, Niederlande
Sterile Arbeitsplatte	Thermo Scientific	Schwerte, Deutschland
Spectrometer NanoDrop 1000	Thermo Scientific	Schwerte, Deutschland
Reinstwasseranlage Milli-Q Biocel A 10	Merck Millipore	Billerica, MA, USA
Flüssigstickstoffcontainer LS6000	Cryo Tec	Wurzen, Deutschland
Pipetus	Gilson	
Kühlschrank	Bosch	
Waage Typ L610D	Satorius	

Zentrifuge Universal 32R	Hettich Zentrifugen	Tuttlingen, Deutschland
-80 °C Gefrierschrank (HFU 586 Top)	Thermo Scientific	Schwerte, Deutschland
Gefrierschrank	Bosch	
JuLI™ Br Cell counting module	Nano Entek	Seoul, Korea
Mikroplatten-Leser (Microplate Reader)	Mithras LB 940, Berthold Technologies GmbH & Co. KG	Bad Wildbad, Deutschland
BD FACSCalibur™	BD Biosciences	San Jose, CA, USA
Homogenisator B. BraunPotter	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Mikrotom	Reichert-Jung (2030)	Appeldoorn, Niederlande
Schüttelplatte	Ratek Instruments	Australien
Mikroplattenleser	Benchmark microplate reader, Bio-Rad Laboratories	

11.1.6 Software

Software	Hersteller	Sitz des Herstellers
Graph Pad Prism 6	GraphPad Software	San Diego, CA, USA
Step-One Software	Applied Biosystem	Darmstadt, Deutschland
Microsoft Excel	Microsoft	Redmond, WA, USA
Microsoft Word	Microsoft	Redmond, WA, USA
Microsoft Power Point	Microsoft	Redmond, WA, USA
ImageJ	Open Source	
OmniGraffle	The Omni Group	Seattle, WA, USA
FACS Software für Zellen	CellQuest Pro 5.2.1	

11.1.7 Primer

Tabelle 15: Sequenz und Effizienz der verwendeten Primer

Gen:	Primersequenz	Effizienz (%)
<i>β-Actin</i>	Forward: 5'-CACAGCCTGGATGGCTACGT-3'	77,5
	Reverse: 5'-CGTGAAAAGATGACCCAGATCA-3'	
<i>PPIA</i>	Forward: 5'-GCAAGCATGTGGTCTTTGGG-3'	64,2
	Reverse: 5'-TTGATGGGTAATAATGCCCGC-3'	
<i>RAGE</i>	Forward: 5'-CAAGTCCAACCTACCGAGTCC-3'	55
	Reverse: 5'-GCAGTGTAAGAGTCCCGTC-3'	

<i>HMGB1</i>	Forward: 5'-TGGCAAAGGCTGACAAGGCTC-3' Reverse: 5'-GGATGCTCGCCTTTGATTTTGG-3'	70
<i>HMGB2</i>	Forward: 5'-CCGCGAGGAGCACAAGAAGA-3' Reverse: 5'-TCCTGCTTCACTTTTGCCCTTG-3'	96
<i>ERK1</i>	Forward: 5'-CTTCAACCCAAACAAGCGCA-3' Reverse: 5'-CCATGTCGAAGGTGAATGGC-3'	74
<i>ERK2</i>	Forward: 5'-TCAGTTTGTCCCCTTCCATTG-3' Reverse: 5'-TCCACTCCCACAATGCACAC-3'	73
<i>Cdc42</i>	Forward: 5'-GCAAAAGGGAATGTGGTCTGG-3' Reverse: 5'-TCCACCTACGGCACAACAG-3'	104
<i>Akt1</i>	Forward: 5'-TTTGTCTCTCGGATGCGCTG-3' Reverse: 5'-CAGACCCATGAGCCCACATT-3'	53
<i>IκBα</i>	Forward: 5'-ACTCCAAAGTCCGGCAGAAG-3' Reverse: 5'-TCACGGGGTATGTGTGAACG-3'	74
<i>NFKBIA</i>	Forward: 5'-GGGTGATTCGGCTGTTGTCT-3' Reverse: 5'-CCACTGAACACCTGGCTCTT-3'	57
<i>RELA</i>	Forward: 5'-ATCATCGAACAGCCGAAGCA-3' Reverse: 5'-TGATGGTGGGGTGTGTCTTG-3'	52
<i>Nrf2</i>	Forward: 5'-AAGAATAAAGTCGCCGCCCA-3' Reverse: 5'-AGATACAAGGTGCTGAGCCG-3'	79
<i>IL-1α</i>	Forward: 5'-TTCTGCCATTGACCATCT-3' Reverse: 5'-AATCTTCCCGTTGCTTGA-3'	58
<i>IL-1β</i>	Forward: 5'-CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG-3' Reverse: 5'-GATCCACACTCTCCAGCTGCA-3'	91
<i>TNF-α</i>	Forward: 5'-CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA-3' Reverse: 5'-TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3'	59
<i>IL-10</i>	Forward: 5'-GCTCTTACTGACTGGCATGAG-3' Reverse: 5'-CGCAGCTCTAGGAGCATGTG-3'	84

11.1.8 Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Firma
Primärantikörper		
Anti-AGE	1:100	Abcam (ab23722)
Anti-RAGE	1:100	Abcam (ab3611)
Anti-CML	1:100	Biologo (011)

anti-Nf- κ B p65	1:100	((D14E12) XP® Rabbit mAb #8242)
Anti-Phospho-Nf- κ B p65 (ser276)	1:250	(Arigo biolaboratories, Cat no. ARG51515, 1:250)
Anti-Nf- κ B p65	1:100	sc-237, Santa Cruz
Anti-Phospho-Nf- κ B p65 (Ser536)	1:100	cell signalling
Sekundärantikörper		
Ziege anti Kanninchen AK IgG	1:400	Vector Laboratories, CA, USA
Rhodamine Red™-X (RRX) AffiniPure DonkeyAnti-Rabbit IgG	1:400	Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA)
Goat F(ab') ₂ Anti-Mouse IgG - (Fab') ₂ (HRP)	1:500	Abcam (ab5887)

11.2 Ergänzende Dokumente

Tabelle 13: Übersicht über Berechnung der normalisierten relativen Expression aus den Ct-Werten der qRT-PCR am Beispiel von RAGE

Alter	Proben Nr.	Mausmodell	Maus Nr.	Ct β -Actin	Ct MW β -Actin	Ct ppiA
12 Wo.	1	n.d. <i>Ins2</i> ^{Akita+/-}	1015	20,94 / 19,86 / 20,95	20,58	17,58 / 18,23 / 18,07
Ct MW ppiA	gepoolter Ct von β -Actin und ppiA	Ct Zielgen (hier RAGE)	Ct MW Zielgen	Δ Ct zu MW der HKG*	MW Δ Ct Kontrolle	$\Delta\Delta$ Ct
17,96	19,27	26,20 / 25,15 / 26,20	25,85	6,85	7,69	-1,11
2 $-\Delta\Delta$ Ct (relative Expression) - MW der HKG*	MW der relative Expression	Normalisierte relative Expression (dieser Wert wurde für die Statistik verwendet)	MW des normalisierte relative Expression	SD des normalisierte relative Expression	Grubbs G-Wert	
2,15	1,25	1,73	1,00	1,00	-0,73	

*House-keeping Gen

Tabelle 14: Übersicht über signifikante Veränderung der mit unterschiedlichen Konzentrationen an Glukose behandelten Sertoli-Zellen

Zeitpunkt	Behandlung	p-Wert
1 Std.	5,5 mM vs. 25 mM	0,0007
	5,5 mM vs. 50 mM	< 0,0001
	5,5 mM vs. 100 mM	< 0,0001
	10 mM vs. 25 mM	0,0008
	10 mM vs. 50 mM	< 0,0001
	10 mM vs. 100 mM	< 0,0001
	15 mM vs. 25 mM	0,0006
	15 mM vs. 50 mM	< 0,0001
	15 mM vs. 100 mM	< 0,0001
24 Std.	5,5 mM vs. 25 mM	< 0,0001
	5,5 mM vs. 50 mM	< 0,0001
	5,5 mM vs. 100 mM	< 0,0001
	10 mM vs. 25 mM	< 0,0001
	10 mM vs. 50 mM	< 0,0001
	10 mM vs. 100 mM	< 0,0001
	15 mM vs. 25 mM	< 0,0001
	15 mM vs. 50 mM	< 0,0001
	15 mM vs. 100 mM	< 0,0001

12 Publikationsverzeichnis

Constanze C. Maresch[#], **Dina C. Stute**[#], Thomas Fleming, Hans-Peter Hammes & Thomas Linn. Hyperglycemia induces spermatogenic disruption via major pathways of diabetes pathogenesis. *Scientific Reports*. March, 1-12 (2019)

(# beide Autoren haben sich gleichermaßen an der Arbeit beteiligt)

Constanze C. Maresch, **Dina C. Stute**, Helen Ludlow, Hans-Peter Hammes, David M. de Kretser, Mark P. Hedger & Thomas Linn. Hyperglycemia is associated with reduced testicular function and activin dysregulation in the *Ins2^{Akita+/-}* mouse model of type 1 diabetes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 446, 91–101 (2017)

Constanze C. Maresch, **Dina C. Stute**, Marco G. Alves, Pedro F. Oliveira, David M. de Kretser & Thomas Linn. Diabetes-induced hyperglycemia impairs male reproductive function: a systematic review. *Hum. Reprod. Update* 24, 1–22 (2017)

13 Ehrenwörtliche Erklärung

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

Gießen, den

Ort, Datum

Unterschrift

14 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Linn. Durch Sie hatte ich die Möglichkeit einen Einblick in das wissenschaftliche Arbeiten zu erlangen und meine Promotionsarbeit unter einer intensiven, kritischen und zuverlässigen Betreuung zu schreiben. Ich bin Ihnen dankbar, dass ich die Chance hatte zwei sehr interessante klinische Themen, Diabetes mellitus und Reproduktion, aus einer wissenschaftlichen Sicht zu durchleuchten.

Der Arbeitsgruppe von Dr. Fleming und Prof. Hammes der Universität Heidelberg/Mannheim danke ich sehr für das kritische Feedback zum Thema Methylglyoxal, CML und RAGE. Mit Ihren Ideen und Vorschlägen für Experimente wurde die Forschung vorangetrieben. Besonders danke ich hier auch der Wissenschaftlichen Mitarbeiterin Elisabeth Kliemank für die Verarbeitung der Zellproben in der LC-MS/MS. Danke für all das Pipettieren! Zudem danke ich der AG dafür, dass sie uns die Nebenhoden und Hoden der *Ins2^{Akita+/-}* Maus bereitgestellt haben.

Frau Dr. Constanze Maresch gilt mein größter Dank. Für das wissenschaftliche Arbeiten sowie die konstante Motivation und Supervision über all die Jahre. Danke für die Einführung ins wissenschaftliche Arbeiten und bei der Zusammenführung von losen Enden. Zudem hattest du stets ein offenes Ohr und die Geduld meine Daten bis ins kleinste Detail zu besprechen. Ich bin sehr glücklich dich nun Freundin nennen können, denn Fuchs sein fetzt!

Der Internationalen Research Training Group (IRTG) zum Thema „Molecular Pathogenesis of Male Reproductive Disorders“ möchte ich für die Förderung danken und dafür, dass ich als Mitglied einer internationalen Arbeitsgruppe die Chance hatte an wissenschaftlichen Trainingsprogrammen und Vorträgen teilzunehmen. Vielen Dank Pia Jürgens und Prof. Meinhardt, dass Sie dies für mich ermöglicht haben.

Gerade in Hinsicht auf das Erlernen diverser Methoden gilt ein besonderer Dank an die MTAs: Doris Erb, danke für all deine Unterstützung und deine Tipps in Bezug auf das Arbeiten mit Zellen. Ohne deine Beobachtungsgabe hätte ich die ein oder andere Kultur verunreinigt. Gundula und Birte danke ich sehr für ihre Expertise in der Histologie. Ohne euch wären mir niemals 7 μ m Schnitte gelungen. Zudem habt ihr zwei dafür gesorgt, dass sich die AG nicht nur über Arbeit austauscht, sondern auch einfach mal zusammen frühstückt und lacht. Vielen Dank dafür.

Ein Dank auch an die anderen Mitarbeiter und Doktoranden der AG (Nadine, Kui, Divija, Rahul und Christoph). Ohne eure Anwesenheit und Hilfe wäre das Arbeiten im Labor, v.a. während draußen die Sonne scheint, einseitig und einsam gewesen wäre. Qui, Rahul und

Divija danke ich ganz besonders für das regelmäßige Wechseln meiner PCR-Platten, ohne Euch hätte ich einige Vorlesungen verpasst.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken. Danke, dass ihr mich die ganze Zeit über unterstützt habt, euch meine Grübeleien angehört und meine Stimmungsschwankungen ausgehalten habt. Eure Liebe und euer Zusprechen gab mir die Kraft diese Arbeit zu dem zu machen, was sie jetzt ist. Dir Anne danke ich sehr für das Korrekturlesen, ohne dich wären nicht nur Kommata am falschen Platz. Ich danke dir Mama, dass du mich immer dazu ermutigt hast meinen Weg zu gehen, egal wie steil dieser auch war. Du und Papa habt mir hierfür viele Steine geräumt und mir Raum gegeben mich zu dem zu entwickeln was ich jetzt bin. Dir Papa war meine wissenschaftliche Karriere nie wichtig. Nein wichtig war dir, dass ich glücklich bin. Nun habe ich geschafft beides zu vereinen. Die Wissenschaft und mein persönliches Glück. Samuel Yoda du hast mir Kraft, für diese letzten Schritte gegeben, denn durch dich fühle ich mich wieder vollkommen. Ein bisschen Papa lebt in Dir schließlich weiter. Meinem Mann Milan gilt der wohl bedeutenste Dank, denn ohne ihn hätte ich die Arbeit das ein oder andere Mal in den Sand gesetzt. Du hast so viel ausgehalten, mich in der Erstellung der Graphiken unterstützt und mir meine Computer- und Wordprobleme so häufig gefixt. Ohne dich wäre nicht nur mein PC abgestürzt. Du hast mir Liebe gegeben und Neue geschenkt. Mich in jeder Hinsicht bereichert. Dir, meiner Familie, widme ich diese Arbeit.