

Glatte Muskelzellen im Nebenhoden – metabolische Aspekte

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Richarda Stengel, geb. Heiser

aus Braunschweig

Gießen 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität

Institut für Anatomie und Zellbiologie

Gutachter: Prof. Dr. Ralf Middendorff

Gutachter: Prof. Dr. Hans-Ulrich Schmelz

Tag der Disputation: 14.12.2023

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die männlichen Genitalorgane	
1.2	Anatomie des Nebenhodens	
1.3	Die Aufgaben des Nebenhodens	
1.4	Die Ductuli efferentes	
1.5	Der Ductus epididymidis	
1.6	Das Epithel des Ductus epididymidis	
1.7	Die Muskelschicht und die Kontraktilität des Ductus epididymidis	
1.8	Transport der Spermien im Nebenhoden	
1.9	Der Ductus deferens	
1.10	Die Nebenhodenentzündung (Epididymitis)	
1.11	Hypoxie im Nebenhoden	
1.12	Toll-like-Rezeptoren	
1.13	Toll-like-Rezeptor 4	
1.14	Lipopolysaccharid	
2	ZIEL DER ARBEIT.....	17
3	MATERIAL UND METHODEN.....	18
3.1	Material	
3.1.1	Geräte	
3.1.2	Kits	
3.1.3	Verbrauchsmaterialien	
3.1.4	Chemikalien und Substanzen	
3.1.5	Primärantikörper in der Immunhistochemie und Immunfluoreszenz	
3.1.6	Sekundärantikörper in der Immunhistochemie und Immunfluoreszenz	
3.2	Herkunft und Art des Untersuchungsmaterials	
3.2.1	Herkunft und Haltung der Tiere für das hypoxische Mausmodell	
3.2.2	Durchführung des hypoxischen Mausmodells	

3.2.3	Gewebe für molekularbiologische Untersuchungen und funktionelle Untersuchungen	
3.3	Methoden	
3.3.1	Azanfärbung	
3.3.2	Herstellung von Bouin'scher Lösung und Puffern für Immunhistochemie und Immunfluoreszenz	
3.3.3	Immunhistochemie	
3.3.4	Immunfluoreszenz	
3.3.5	Molekularbiologische Methoden	
3.3.5.1	RNA-Isolierung aus dem Nebenhodengewebe der Ratte	
3.3.5.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	
3.3.5.3	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	
3.3.5.4	Oligonukleotide (Primer)	
3.3.5.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	
3.3.5.6	Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese	
3.3.6	Funktionelle Untersuchungen	
3.3.6.1	Verwendete Substanzen	
3.3.6.2	Kontraktionsstudien mit LPS-Zugabe	
3.3.6.3	Durchführung der Kontraktionsstudien mit LPS-Zugabe	
3.3.6.4	Kontraktionsstudien am präinkubierten Nebenhodengang	
3.3.6.5	Durchführung der Kontraktionsstudien am präinkubierten Nebenhodengang	
4	ERGEBNISSE.....	44
4.1	Lichtmikroskopische Untersuchungen des Mausnebenhodens in einem Hypoxiemodell	
4.1.1	Azanfärbung nach Heidenhain	
4.2	Immunfluoreszenzfärbung am Mausnebenhoden in einem Hypoxiemodell	
4.2.1	Immunfluoreszenzfärbung für α -SMA und Calponin	

4.3	Immunhistochemische Färbung mit verschiedenen Antikörpern am Mausnebenhoden in einem Hypoxiemodell	
4.3.1	Immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen MYH-11 in der Cauda von Mausnebenhoden in einem Hypoxiemodell	
4.3.2	Immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen PKG1 in der Cauda von Mausnebenhoden in einem Hypoxiemodell	
4.3.3	Immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen PCNA in der Cauda von Mausnebenhoden in einem Hypoxiemodell	
4.4	Der TLR4-Rezeptor im Nebenhoden	
4.4.1	Expression des TLR4-Rezeptors im Nebenhoden der Ratte	
4.4.2	Expression des TLR4-Rezeptors in den verschiedenen Segmenten des Nebenhodens der Ratte	
4.5	LPS-Effekte auf die Kontraktionen im distalen Teil des Nebenhodenganges der Ratte	
4.6	Kontraktionsstudien am mit LPS präinkubierten Nebenhodengang (Segment 18) der Ratte	
5	DISKUSSION.....	65
5.1	Auswirkungen von chronischer Hypoxie auf die Gefäß- und Gangmuskelzellen des kaudalen Mausnebenhodens	
5.2	Chronische Hypoxie und Proliferation von Gefäß- und Gangmuskelzellen	
5.3	Chronische Hypoxie und Proliferation von Epithelzellen	
5.4	Wechselwirkung zwischen TLR4-Signalweg und HIF-1 α -Signalweg	
5.5	Expression des TLR4-Rezeptors in allen 19 Segmenten des Nebenhodens der Ratte	
5.6	LPS-Effekte auf die Kontraktionen im distalen Teil des Nebenhodenganges der Ratte	
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	74
7	SUMMERY.....	75

8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	76
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	81
10	TABELLENVERZEICHNIS.....	82
11	LITERATURVERZEICHNIS.....	83
12	DANKSAGUNG.....	92
13	ERKLÄRUNG.....	93
14	TABELLARISCHER LEBENS LAUF.....	94

1 Einleitung

1.1 Die männlichen Genitalorgane

Die männlichen Genitalorgane werden in äußere und innere Genitalorgane unterteilt. Zu den äußeren Genitalorganen rechnet man laut Definition das Glied (Penis), die Harnröhre (Urethra masculina) und den Hodensack (Skrotum) (Schulte 2007). Zu den inneren Genitalorganen des Mannes zählen die paarig angelegten Hoden (Testis/Orchis), Nebenhoden (Epididymis), Samenleiter (Ductus deferens), sowie die akzessorischen Geschlechtsdrüsen (Bläschendrüse, Vorsteherdrüse und Cowper-Drüsen) (Schulte 2007).

1.2 Anatomie des Nebenhodens

Der Nebenhoden ist ein circa 10 mm dickes und längliches Organ, welches dem Hoden an der Hilusseite anliegt, und vom kranialen bis zum kaudalen Hodenpol reicht (Holstein 2008). Der Hoden und der Nebenhoden sind über das Rete testis miteinander verbunden (Holstein 2008). Das Rete testis mündet an der Seite des oberen Hodenpols in die 8-12 Ductuli efferentes, diese vereinigen sich zum Nebenhodengang (Ductus epididymidis) und bilden den Anfang der ableitenden Samenwege (Holstein 1969). Der Nebenhoden besteht aus einem stark aufgeknauelten Kanälchen, welcher als Nebenhodengang bezeichnet wird (Holstein 2008). Im Bereich des Nebenhodenschwanzes geht der Nebenhodengang in den Ductus deferens über (Holstein 2008).

V. Lanz und Neuhäuser analysierten den menschlichen Nebenhoden im Jahr 1964 morphologisch und unterteilten ihn in drei Regionen: Kopf (Caput), Körper (Corpus) und Schwanz (Cauda) (v. Lanz und Neuhäuser 1964) (Abb. 1).

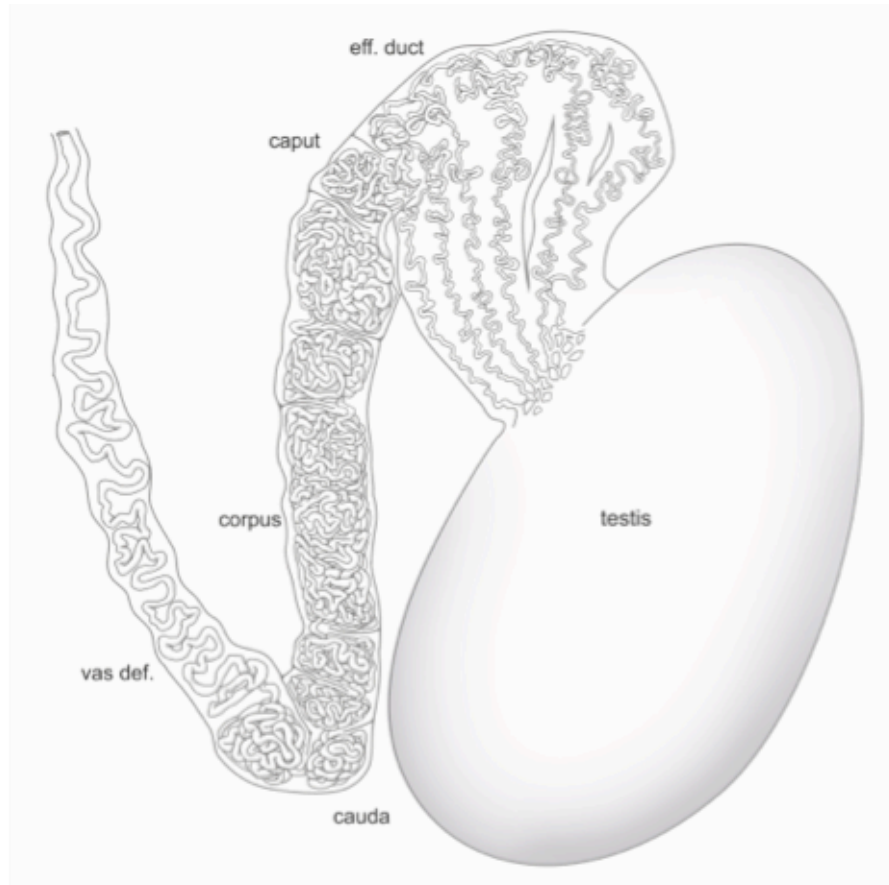


Abb. 1: Hoden mit Nebenhoden

In dieser Abbildung ist der Hoden (Testis) und der Nebenhoden (Epididymis) dargestellt. Der Nebenhoden wird unterteilt in den Nebenhodenkopf (Caput) mit den Ductuli efferentes, dem Nebenhodenkörper (Corpus) und dem Nebhodenschwanz (Cauda). Zusätzlich ist der Beginn des Samenleiters (Vas deferens) als Verbindung vom Nebenhoden zur Harnröhre dargestellt.

Weiter lässt sich der Nebenhoden in unterschiedliche Segmente unterteilen. Die Anzahl der Segmente ist abhängig von der Spezies (Holstein 1969; Turner et al. 2003; Holstein 2008; Domeniconi et al. 2016). Bei Ratten wird der Nebenhoden in 19 Segmente (Abb. 2) unterteilt, während sich der Nebenhoden der Maus nur in 10 Segmente (Abb. 2) unterteilen lässt (Turner et al. 2003; Hinton et al. 2011). Die einzelnen Segmente werden durch bindegewebige Septen begrenzt und durch den fortlaufenden Nebenhodengang miteinander verbunden (De Kretser et al. 1998; Itoh et al. 2005; Britan et al. 2006).

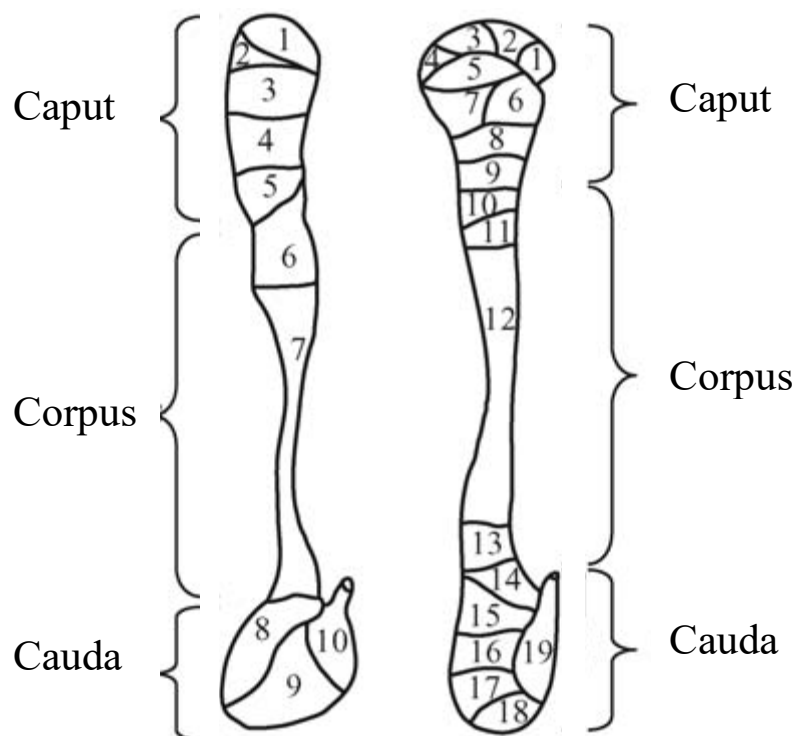


Abb. 2: Schematische Darstellung des Nebenhodens der Maus und der Ratte

Nebenhoden der Maus (links) mit 10 Segmenten und der Ratte (rechts) mit 19 Segmenten. Zusätzlich sind der Nebenhodenkopf (Caput), Nebenhodenkörper (Corpus) und der Nebenhodenschwanz (Cauda) eingezeichnet (Jelinsky et al. 2007).

1.3 Die Aufgaben des Nebenhodens

Die Aufgaben des Nebenhodens umfassen die Reifung, den aktiven Transport und die Speicherung der unbeweglichen Spermatozoen (Mersdorf et al. 2001). Für die Reifung der Spermatozoen benötigt der Nebenhodengang ein besonderes intraluminales, leicht saures Milieu (Shum et al. 2009). Dieses wird durch Sekretion und Resorption zwischen der Lumenflüssigkeit des Nebenhodenganges und den Epithelzellen des Nebenhodens erreicht (Shum et al. 2009). Ein gestörtes Milieu führt zu Infertilität, indem die Spermien keine aktive Motilität erwerben und sich nicht mehr durch den weiblichen Reproduktionstrakt fortbewegen können (Blomqvist et al. 2006). Auf Grund unterschiedlicher Sekretions- und Absorptionsaktivität des Nebenhodens variiert das Epithel und die Muskelzellschicht je nach Aufgabenbereich des Nebenhodengangabschnittes. Das Epithel wird vom Kopfbereich zum Schwanzbereich des Nebenhodens niedriger, die Muskelzellschicht wird von proximal nach distal dicker (Holstein 1969; Baumgartner et al. 1971). Insgesamt nimmt das Lumen des Nebenhodenganges zu und enthält die noch immobilen Spermien. Der unterschiedliche Aufbau des Nebenhodenganges wird benötigt, um in den einzelnen Gangabschnitten individuelle Funktionen zu erfüllen.

1.4 Die Ductuli efferentes

Die Ductuli efferentes bilden fast ausschließlich den Nebenhodenkopf (Holstein 1969). Das Epithel ist zu Beginn der Ductuli efferentes sowohl hoch als auch mehrreihig, niedrig oder fast kubisch (Holstein 1969). Im weiteren Verlauf wird das Epithel niedriger, dann zweireihig und kurz vor dem Nebenhodengang wieder mehrreihig (Holstein 1969). Im Epithel enthalten sind mehrere Zelltypen: die Hauptzellen, die Basalzellen und die Kinozilien tragenden Zellen (Abb. 3). Die Hauptzellen sind hochprismatische Zellen mit einem basalem Zellkern und einem Bürstensaum, dieser Bürstensaum ist zu einer hohen Prozentzahl an der Flüssigkeitsresorption aus dem Lumen beteiligt (Jones und Clulow 1987; Clulow et al. 1994). Durch die enorme Flüssigkeitsresorption entsteht eine Volumenreduktion des intraluminalen Inhalts mit Erhöhung der Spermienkonzentration. Zusätzlich zu den Hauptzellen befinden sich im Epithel der Ductuli efferentes die Basalzellen, diese sind anzusehen als Ersatzzellen für das Epithel, welche in Richtung Lumen wachsen können. Robaire und Hermo berichteten von flachen halbkugelförmigen Basalzellen, welche sich an der Basalmembran des Epithels befinden und keinen direkten Kontakt zum Lumen des Nebenhodenganges haben (Robaire und Hermo 1988). Die Kinozilien tragenden Zellen mit einem apikalem Zellkern sind bei dem Spermientransport behilflich, ihre Anzahl im Epithel steigt im Verlauf der Ductuli efferentes an (Holstein 2008). Umgeben sind die Ductuli efferentes von einer dünnen Muskelzellschicht (Baumgarten et al. 1971).

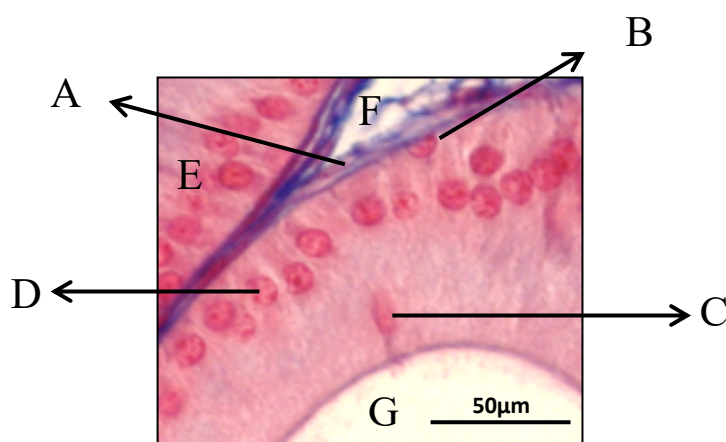


Abb. 3: In Paraffin eingebetteter Nebenhodenkopf, angefärbt mit Azan

A: Myofibroblast, B: Basalzelle, C: Apikale Zelle mit Kinozilien, D: Hauptzelle, E: Epithel des benachbarten Nebenhodenganges, F: Interstitium, G: Lumen des Nebenhodenganges

1.5 Der Ductus epididymidis

Der Ductus epididymidis (Nebenhodengang) ist beim Menschen ungefähr 6 m lang und wird aufgrund seines geschlängelten Verlaufes auf circa 6 cm komprimiert. Histologisches Merkmal des Nebenhodenganges sind sein hohes zweireihiges Zylinderepithel mit langen Stereozilien, zusätzlich ist er von einer Schicht glatter Muskelzellen umgeben, deren Dicke von proximal nach distal zunimmt (Abb. 4 und Abb. 5) (Holstein 1969; Kierszenbaum und Tres 2016). Der kaudale Nebenhoden ist für die Speicherung und anschließende Ausschüttung der reifen Spermien zuständig (Holstein 2008). Daher findet man in histologischen Anschnitten dieser Region eine große Ansammlung von Spermatozoen.

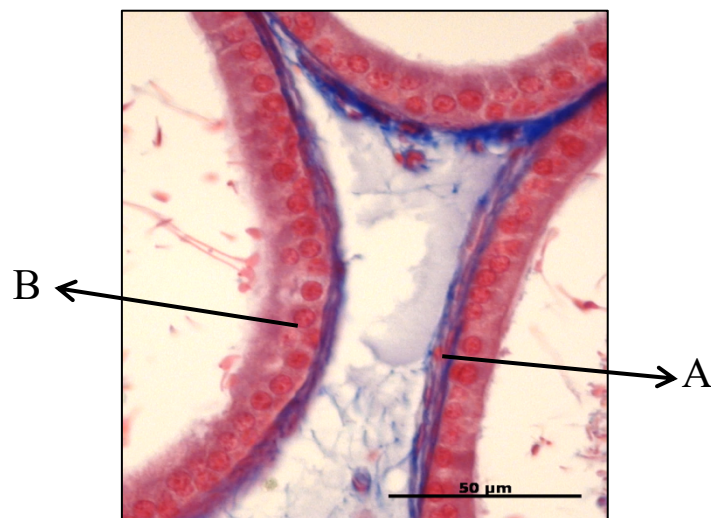


Abb. 4: In Paraffin eingebetteter Nebenhodenkörper, angefärbt mit Azan
A: Dem Epithel anliegende Muskelzellen; B: Epithel mit unterschiedlichen Zelltypen

1.6 Das Epithel des Ductus epididymidis

Im Epithel des Ductus epididymidis sind viele verschiedene Zelltypen anzutreffen. Bei Ratten und Mäusen befinden sich im distalen Nebenhodengang, am Übergang vom Hoden zum Nebenhodenkopf (Initialsegment und Zwischenzone), die Bleistiftzellen (Narrow Cells). Diese sind an Endozytoseprozessen und der Sekretion von H^+ -Ionen in das Lumen des Nebenhodenganges beteiligt (Adamali und Hermo 1996; Sun und Flickinger 1980; Hermo et al. 2000; Da Silva et al. 2010).

Der wichtigste Zelltyp im Nebenhodengepithel ist die Hauptzelle, sie befindet sich im gesamten Nebenhoden (Robaire und Hinton 2015; Trasler et al. 1988). Die Funktionen der Hauptzellen sind die Flüssigkeitsresorption aus dem Lumen, sowie die Sekretion von H^+ -Ionen und anderen Substanzen, in das Lumen des Ductus epididymidis (Holstein 2008; Adamali und Hermo 1996). Dies dient der Ausreifung der Spermien. Zusätzlich sind auch Basalzellen vorhanden, bei diesen handelt es sich vermutlich um Reserve- bzw. Stammzellen für die Epithelzellen. Die Basalzellen des Epithels befinden sich an der Basalmembran und besitzen keinen direkten Kontakt zum Lumen (Veri et al. 1993). Die sogenannten „Clear-Cells“ erhalten im Nebenhodengang das saure Milieu, sie erhöhen die Protonensekretion in das Lumen der Nebenhodenkanälchen (Breton et al. 1996). Die „Halo-Zellen“ befinden sich im gesamten Nebenhodenepithel, es sind kleine Zellen mit einem schmalen Rand von Zytoplasma, Kontakt zur Basalmembran und einer immunologischen Funktion (Robaire und Hinton 2015). Da Silva et al. konnten im Jahr 2011 mit spezifischen Markern dendritische Zellen im Nebenhoden nachweisen (Da Silva et al. 2011). Es sind spezialisierte antigenpräsentierende Zellen, welche für die Immunantwort in vielen Geweben zuständig sind (Steinman und Banchereau 2007; Helft et al. 2010).

1.7 Die Muskelschicht und die Kontraktilität des Ductus epididymidis

Die Schicht glatter Muskelzellen, welche das Epithel des Nebenhodenganges umgeben, wird von proximal nach distal dicker (Holstein 2008). Diese Muskelzellen sind spezielle Zellen und werden von einigen Autoren als Myofibroblasten bezeichnet (Mewe et al. 2006b). Diese Myofibroblasten besitzen eine spontane Kontraktionsaktivität (Holstein 2008). Frühere Studien am Rind (Mewe et al. 2006a; Mewe et al. 2006b) und an der Ratte (Mietens et al. 2012) zeigten in allen Bereichen des Ductus epididymidis Spontankontraktionen. Die Frequenz der spontanen rhythmischen Kontraktionen nimmt von Caput nach Cauda ab, während die Amplitude zunimmt (Talo et al. 1979; Mewe et al. 2006b). Diese Spontankontraktionen sind für den Spermientransport im Nebenhoden essentiell, da sich die Spermien in einer Säurestarre befinden und sie ihre Motilität erst durch die Reifung im Nebenhoden erlangen (Anderhuber et al. 2012).

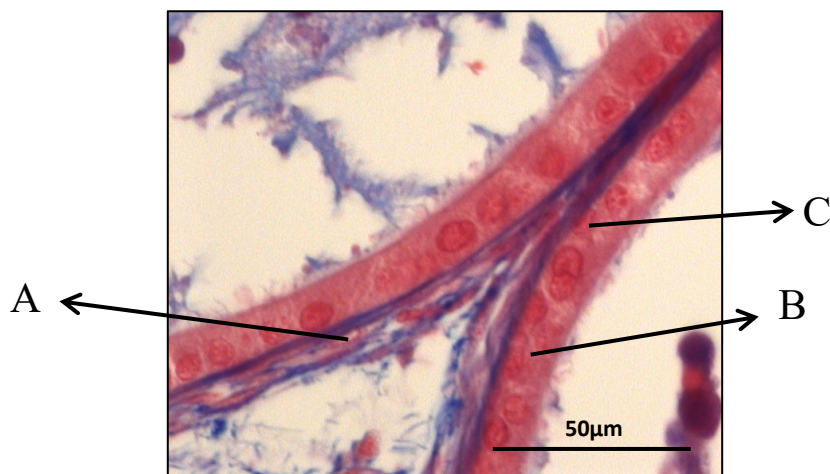


Abb. 5: In Paraffin eingebetteter Nebenhodenschwanz, angefärbt mit Azan
 A: Am Epithel anliegende glatte Muskulatur; B: Epithel (vorwiegend Hauptzellen)
 C: Basalzelle

1.8 Transport der Spermien im Nebenhoden

Die unbeweglichen Spermien werden durch die Zilien der Ductuli efferentes und über die Kontraktionen der Muskulatur des Nebenhodenkanals zum Samenleiter transportiert (Bedford 1975). Die Geschwindigkeit des Transports wird durch Faktoren wie z.B. Androgen beeinflusst, die Passagezeit der Spermatozoen bei verschiedenen Spezies liegt bei ungefähr 10 Tagen, unabhängig von der Länge des Nebenhodenkanals (Sujarit et al. 1985; Robaire und Hinton 2015; Hib und Ponzio 1977).

1.9 Der Ductus deferens

Der Samenleiter (Ductus deferens) verbindet den Nebenhoden mit der Urethra und dient dem raschen Transport der Spermien während der Emission. Er besteht aus einem komplexem Epithel, das absorptive und sekretorische Funktionen besitzt (Holstein 2008). Proximal trägt das zwei- oder mehrreihige Zylinderepithel Stereozilien (Kierszenbaum und Tres 2016). Das Epithel ist von einer dicken Muskelschicht umgeben, welche in Schichten längs- und spiralförmig angeordnet ist (Holstein 2008). Diese dicke Muskelschicht besitzt keine spontane Kontraktion, aber eine dichte noradrenerge Innervation, um die Emission der Spermien zu gewährleisten (Baumgartner et al. 1971).

1.10 Die Nebenhodenentzündung (Epididymitis)

Die Epididymitis (akut oder chronisch) ist eine Entzündung des Nebenhodens, welche von infektiösen und nicht-infektiösen Prozessen ausgelöst werden kann (Taylor 2015). In den meisten Fällen der bakteriellen Epididymitis ist der Infektionsmechanismus der retrograde Aufstieg der Keime, zusätzlich kann die Infektion auch über hämatogene Ausbreitung erfolgen (Taylor 2015). Patienten mit einer klassischen Epididymitis zeigen einen allmählich stärker werdenden posterioren Schmerz am Hoden, welcher für gewöhnlich unilateral auftritt, sowie in die Leisten und den Unterbauch ausstrahlt (Trojian et al. 2009; Jodl und Kohl 2003). Grundsätzlich kann die Nebenhodenentzündung in jedem Lebensalter auftreten. Vermutlich wird eine Nebenhodenentzündung bei Patienten unter 14 Jahren hauptsächlich durch eine Harnwegsinfektion mit dem Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) ausgelöst (Trojian et al. 2009). Das gram-negative Bakterium *E. coli* enthält in der Wand das Molekül Lipopolysaccharid (LPS) (Płóciennikowska et al. 2015). LPS bindet an den Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) (1.12 und 1.13), welcher eine Reihe von immunologischen Signalkaskaden aktiviert und die Entzündung des Nebenhodens auslöst.

Eine quantitative Reduktion der Spermienkonzentration lässt sich einerseits durch die direkte Störung der Spermatogenese aufgrund des Übergreifens der Epididymitis auf den Hoden erklären, dennoch sollte auch an eine (partielle) Obstruktion des Nebenhodengangs gedacht werden (Pilatz et al. 2016). Immer wieder tritt bei Nebenhodenbiopsien eine asymptomatische Epididymitis als Zufallsbefund auf (Hedinger und Dhom 1991). Vermutlich handelt es sich um eine autoimmunbedingte Schädigung, welche häufig zuerst asymptomatisch verlaufen kann und erst später in Form einer Fertilitätsstörung bemerkbar wird (Hedinger und Dhom 1991). Eine bedeutende Langzeitfolge bei einer Nebenhodenentzündung kann eine Sterilität sein (Jodl und Kohl 2003).

1.11 Hypoxie im Nebenhoden

Bei einer Hypoxie kommt es zu einem Sauerstoffmangel im Blut und in Organen. Je nach Organ oder Gewebe ist der Sauerstoffbedarf unterschiedlich (Semenza 2001). Sauerstoffmangel kann beim Menschen insbesondere zu Ischämien am Myokard oder Cerebrum führen, da diese Organe sehr gut durchblutet sind, sind sie am ehesten von einer Hypoxie betroffen. Zusätzlich kann eine Hypoxie z.B. auch zu einer sexuellen Funktionsstörungen beim männlichen Geschlecht führen (Semenza 2011; Vogelberg und König 1993). In Signalwegen von Infektionen scheint Hypoxie eine zentrale Rolle einzunehmen (Devraj et al. 2017). Nach einer Hypoxiephase im Gewebe kann eine Entzündung durch Zytokine ausgelöst werden (Eltzschig und Carmeliet 2011). Dafür sind die Prolyl-Hydroxylase-Domäne-Proteine (PHDs) verantwortlich, die als zelluläre Sensoren zur Kontrolle des Sauerstoffgehalts im Gewebe dienen. Eine der bekanntesten Funktionen der PHDs ist die Regulation des Hypoxie-induzierenden-Faktors (HIF) (Semenza 2012). HIF und der Nukleare Faktor- κ B (NF- κ B) wirken gemeinsam bei der Kontrolle der Genexpression (Oliver et al. 2009). Devraj et al. gehen davon aus, dass der Hypoxie-induzierende-Faktor-1 (HIF-1) als modulierende Substanz für alle Behandlungen von Infektionen bedeutend sein könnte, aber aktuell noch wenig erforscht ist (Devraj et al. 2017).

Über Hypoxie im Nebenhoden ist aktuell wenig bekannt. Farias et al. beschrieb, dass hypobare Hypoxie oxidativen Stress in Rattenhoden und Rattennebenhoden induziert, welcher Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Schäden verursacht (Farias et al. 2010). Der Sauerstoffmangel ist auch mit der überschießenden Anreicherung von freien Radikalen verbunden, welche die Proteine und die DNA in der Zelle zusätzlich belasten (Majmundar et al. 2010). Dies kann zu einer gestörten Spermatogenese sowie einer Spermiendysfunktion führen (Tang et al. 2020). Auch unter intermittierender hypobarer Hypoxie zeigte sich eine vermehrte Schädigung von Strukturen durch freie Radikale (Farias et al. 2010). Ikeda et al. beschrieben bereits 1999, dass Sauerstoffradikale die Apoptose von Zellen induziert (Ikeda et al. 1999).

1.12 Toll-like-Rezeptoren

Der Körper aktiviert das Immunsystem, um sich vor Infektionskrankheiten und Krebs zu schützen. Er erkennt Gefahrensignale in Form von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs), diese aktivieren direkt die Toll-like-Rezeptoren (TLRs), zu deren Liganden das bakterielle LPS, Lipoproteine, Flagellin sowie virale und bakterielle Nukleinsäuren zählen (Akira und Takeda 2004). Daneben bindet TLR4 aber auch körpereigene, endogene Liganden, die z.B. durch Schädigung von Zellen und Gewebe freigesetzt werden können und als damage-associated molecular patterns (DAMPs) bezeichnet werden (Niizeki et al. 2008). Darüber sind TLRs ein interessantes Target für viele Therapeutika, z.B. für Impfstoffe (Baldrige et al. 2004), Krebsimmuntherapien (Schön und Schön 2008) und Autoimmunerkrankungen (Marshak-Rothstein 2006; Kanzler et al. 2007). Bezeichnet werden die TLRs als Typ-I-Transmembranrezeptoren, welche extrazellulär aus leucinreichen Repeats (LRRs) und intrazellulären Toll / IL-1-Rezeptor (TIR)-Signaldomänen bestehen (Li et al. 2010). Sie erkennen beschädigtes oder entzündetes Gewebe sowie fremde mikrobielle Komponenten auf körpereigenem Gewebe (Li et al. 2010). Die humane TLR-Familie beinhaltet 10 funktionelle TLRs, welche auf der Zelloberfläche (TLR 1, 2, 4, 5 und 6) oder auf intrazellulären Membranen (TLR 3, 4, 7, 8 und 9) exprimiert werden (Iwasaki und Medzhitov 2004; Barton und Kagan 2009). Die unterschiedliche Lokalisierung der TLRs ist notwendig, da ihre Liganden entweder extrazellulärer oder intrazellulärer Herkunft sind.

1.13 Toll-like-Rezeptor 4

Der TLR4 (Abb. 6) war der erste und der am häufigste untersuchte menschliche TLR, welcher einen Liganden binden kann (Poltorak 1998; Hoshino et al. 1999). Liganden werden vom TLR4 mit Hilfe des myeloiden Differenzierungsfaktors 2 (MD2) gebunden, da der TLR4 den Liganden nicht direkt erkennen kann (Gioannini et al. 2005). Dafür bilden TLR4 und MD2 einen TLR4-MD2-Komplex (Park und Lee 2013). MD2 kann den lipophilen Teil vom LPS direkt binden und erkennen (Gioannini et al. 2005). Daraufhin bildet der Rezeptor das endgültige aktivierte Homodimer (LPS/MD2/TLR4) (Park et al. 2009). Dieses löst durch die Bindung von verschiedenen Adapterproteinen die intrazelluläre Signalkaskade aus (Akira et al. 2006; O'Neill und Bowie 2007). Der wichtigste Ligand vom TLR4 ist LPS, ein bakterielles Endotoxin, welches Bestandteil der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien ist (Barona et al. 2011; Park und Lee 2013).

Der TLR4 besteht im extrazellulären Teil aus LRRs (Kobe und Kajava 2001), diese sind mit den intrazellulären TIR-Domänen verbunden. Die Rezeptordimerisierung ermöglicht den intrazellulären TIR-Domänen in Wechselwirkung miteinander zu treten und TIR-TIR-Komplexe zu bilden. Diese Komplexe bilden die Schnittstelle zwischen extrazellulärer Ligandenbindung und nachgeschalteter Signalkaskade (Gay und Gangloff 2008). Die nachgeschaltete Signalkaskade führt zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (Shimazu et al. 1999).

Wie bereits unter 1.12 erwähnt befindet sich der TLR4 auf extra- und intrazellulären Membranen. Bindet ein Ligand an den TLR4, wird die Dimerisierung des Rezeptors und die nachfolgende Signalübertragung durch zwei verschiedene Signalwege vermittelt. Der TLR4 der extrazellulären Membran aktiviert den Myloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) / MyD88 Adapter-like (MAL) - abhängigen Signalweg, wohingegen der TLR4 der intrazellulären Membran den TIR-domain-containing adaptor inducing IFN- β (TRIF)/ TRIF-related adaptor molecule (TRAM)-abhängigen Signalweg aktiviert (Yamamoto et al. 2003; Akira und Takeda 2004). Dieses ermöglicht eine differenzierte Immunantwort, je nachdem, welcher Rezeptor aktiviert wird (Carter et al. 2016).

Aufgrund der Lokalisation von TLR4 auf Makrophagen, Monozyten und Endothelzellen ist die Hauptaufgabe von TLR4, Entzündungsreaktionen auszulösen, welche in

systemische Veränderungen wie Fieber, Kreislaufstörungen und in einzelnen Fällen in einen septischen Schock übergehen können (Wenzel et al. 1996; Rietschel et al. 1996).

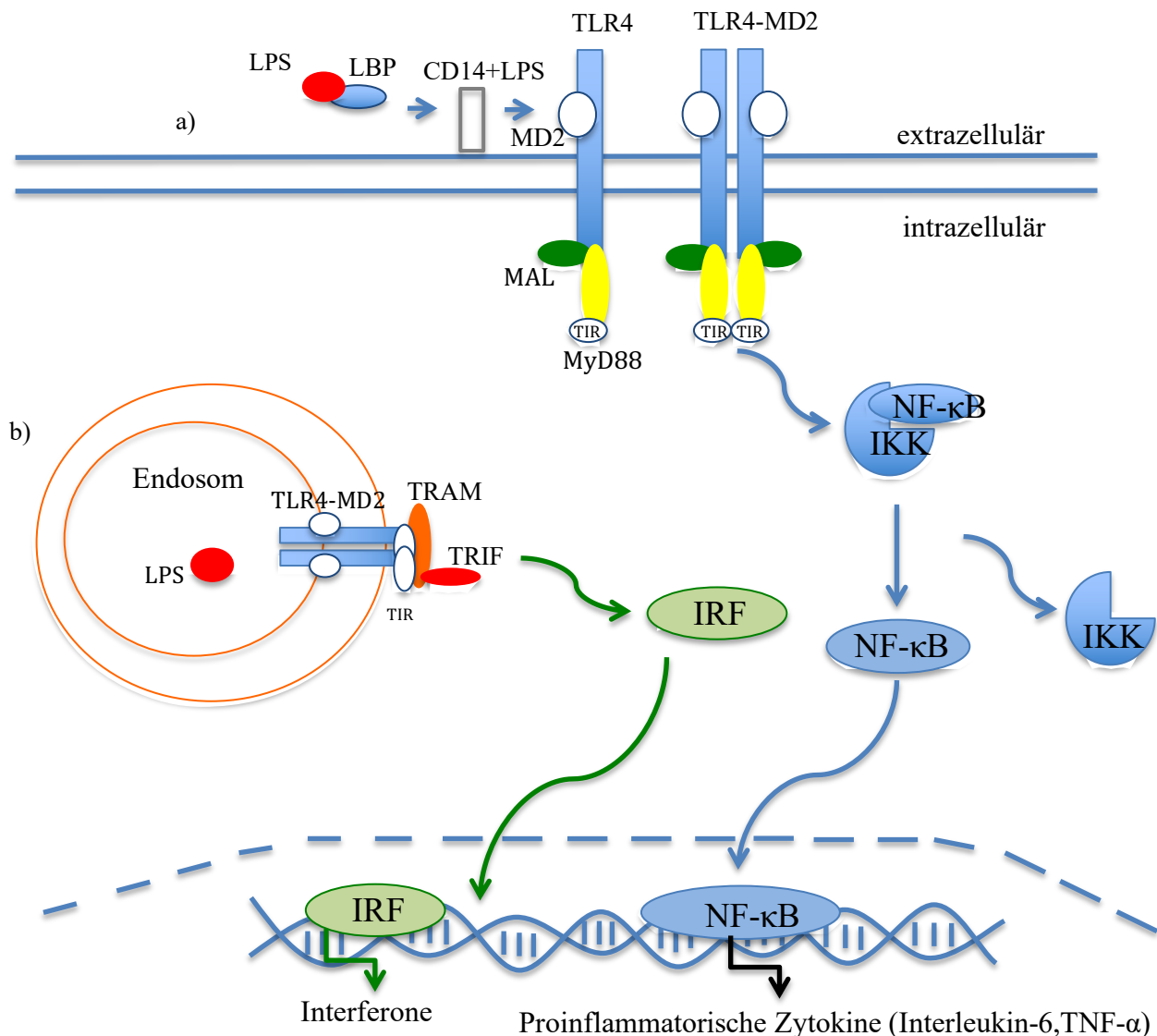


Abb. 6: TLR4-Rezeptor

a) Der LPS/TLR4-Signalweg an Zellmembranen: Extrazellulär bindet das LPS an das LBP, dieses transferiert LPS an Cluster of Differentiation 14 (CD14). Dann kann der MD2 das LPS binden. Für die Bindung von LPS bilden TLR4 und MD2 einen TLR4-MD2-Komplex. Das aktivierte Homodimer erzeugt intrazelluläre Wechselwirkungen zwischen den TIR-Domänen MyD88 und MAL. Diese aktivieren weitere Protein-Protein-Wechselwirkungen an deren Ende die Aktivierung des Inhibitor of NFκB-Kinase (IKK) steht. Durch Phosphorylierung an NFκB wird IKK dissoziiert. NFκB tritt durch die Kernmembran an die DNA und bewirkt die Transkription proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-6 (Il-6) oder Tumornekrosefaktor-α (TNF- α).

b) Der LPS/TLR4 Signalweg auf Membranen von Endosomen: LPS bindet wieder mit Hilfe von MD2 an den TLR4. Hier kommt es zu Wechselwirkungen der TIR-Domänen, TRIF und TRIF-related adaptor molecule (TRAM). Diese TIR-Domänen veranlassen durch Protein-Protein-Wechselwirkungen, die Bildung von Interferon (IRF). (Brikos und O'Neill 2008; Ryu et al. 2017; Karin und Ben-Neriah 2000; Kuzmich et al. 2017; Ignacio et al. 2018)

1.14 Lipopolysaccharid

Die Bezeichnung LPS geht auf die Arbeit von M.J. Shear und F.C. Turner zurück. Sie isolierten 1943 die zwei Hauptkomponenten (Lipid und Polysaccharid) aus gram-negativen Bakterien (Shear und Turner 1943). Das bakterielle Endotoxin LPS besteht aus einer Lipid- und Kohlenhydratverbindung (Abb. 7) (Ulvestad et al. 2018).

Rodrigues et al. zeigten, dass die Nebenhoden von Ratten nach LPS-Exposition eine inflammatorische Reaktion über eine Aktivierung des TLR4/NFκB-Signalwegs entwickelten (Rodrigues et al. 2008). NFκB aktiviert die Transkription von entzündungsfördernden Botenstoffen wie TNF-α, Il-1, Il-6. Außerdem werden auch Stickstoff, Metabolite der Arachidonsäure und der plättchen-aktivierte Faktor freigesetzt, diese sorgen für eine weitere Stimulation des Immunsystems (Dinarello 1996; Mayeux 1997)

Frühere Studien zeigten, dass LPS neben der bekannten Wirkung auf das Immunsystem auch einen inhibitorischen Einfluss auf die Kontraktionen glatter Muskelzellen hat. Rebollar et al. zeigten am Duodenum inhibitorische Effekte von LPS auf Acetylcholin-evozierte Kontraktionen (Rebollar et al. 2002).

Die Kontraktionen des Duodenums werden durch glatte Muskulatur ermöglicht. Auch der Nebenhoden besitzt glatte Muskulatur mit spontaner Kontraktionsaktivität. Es gibt unterschiedliche Mechanismen der Stimulation und Inhibierung der glatten Muskulatur im Nebenhoden (Elfgen et al. 2018). Ob ein direkter Einfluss von LPS auf die Nebenhodenkontraktion besteht, ist noch unklar (Elfgen et al. 2018). In Studien einer aufsteigenden Epididymitis im Mausmodell erreichten die eingesetzten Bakterien nach drei Tagen nur die Grenze des letzten Segmentes (Segment 10), wobei sich der Gangdurchmesser des nach proximal folgenden Segmentes (Segment 9) verengte (Stammler et al. 2015). Ähnliche Veränderungen zeigten Gangveränderungen bei Menschen mit Epididymitis (Stammler et al. 2015).

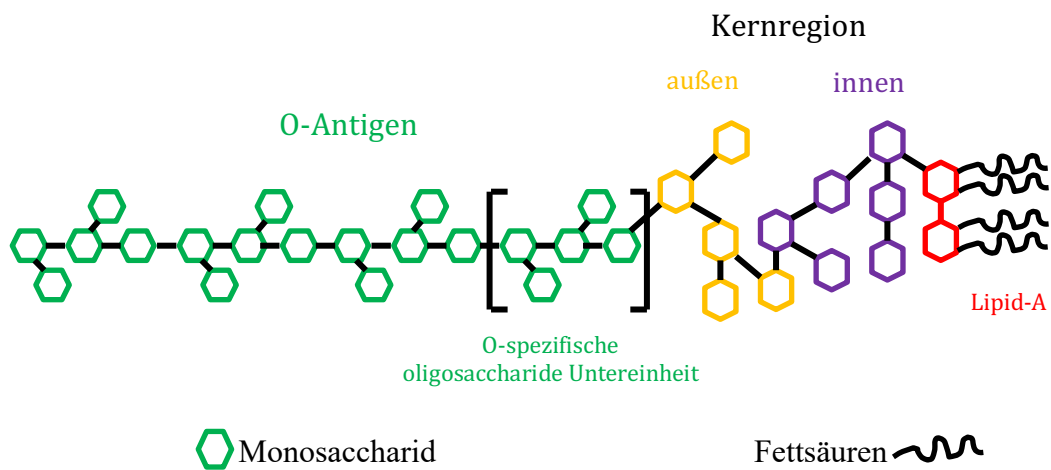


Abb. 7: Lipopolysaccharid

Dargestellt ist LPS mit der Kohlenhydratgruppe (grün), welche aus der äußeren Zellmembran der gram-negativen Bakterienzellwand herausragt. Diese Gruppe ist mit der äußeren (gelb) und der inneren (lila) Kernregion verbunden. Der Kernregion angeschlossen ist der Lipidanteil des LPSs (rot/schwarz). Dieser ist Teil der äußeren Membran der gram-negativen Bakterienwand und bindet direkt MD2.

2 Ziel der Arbeit

Die hier vorliegende Arbeit untersucht pathologische Einflüsse wie Sauerstoffmangel oder bakterielle Infektionen auf den Nebenhoden. LPS als Bestandteil der äußeren Zellmembran der Zellwand von gramnegativen Bakterien kann Entzündungsreaktionen auslösen. Eine Entzündung des Nebenhodens (Epididymitis) kann gravierende Folgen haben, welche zur Infertilität des Mannes führen kann. Diese Arbeit untersucht, ob der Rezeptor für LPS ubiquitär im Nebenhoden exprimiert wird und welchen Einfluss LPS auf die spontanen Kontraktionen der Nebenhodengangmuskulatur hat. Darüber hinaus werden in einem Mausmodell strukturelle Veränderungen im Nebenhoden unter chronischer Hypoxie analysiert.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Elektrophorese-Kammer (Agarose Gel)	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Fluoreszenz-Mikroskop, Axioskop 2 plus	Zeiss, München, Deutschland
Gel-Dokumentationssystem	Phase, Lübeck, Deutschland
High temperature Incubator	Heraeus, Hanau, Deutschland
Kugelmühle	Retsch, Haan, Deutschland
MasterCycler Gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrotom RM2255	Leica, Wetzlar, Deutschland
Nanodrop 2000 Spektrophotometer	Thermo Scientific, Waltham, USA
Organbad	Radnoti, Covina, USA
Stereomikroskop MS5	Leica, Wetzlar, Deutschland
Ultrazentrifuge (Sorvall ultra pro 80)	Sorvall, Hertfordshire, United Kingdom

3.1.2 Kits

Envision G 2 double staining-Kit	DAKO, Hamburg, Deutschland
GeneAmp [®] RNA PCR-Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
iScript [™] cDNA Synthese-Kit	BioRad, München, Deutschland
RNeasy Mini-Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Eppendorf-Gefäße (1,5 ml/ 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
SuperFrost Plus Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Pipettenspitzen (10; 20; 100; 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PCR-Gefäße (0,2 ml)	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Pipetten (10; 20; 100; 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

3.1.4 Chemikalien und Substanzen

β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
ABC-Elite-Kit Standard	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Agarose	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Ammoniumchlorid	Fluka, Buchs, Schweiz
Anilin	VWR, Darmstadt, Deutschland
Anilinblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ampuwa	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Azokarmin	Chroma, Münster, Deutschland
Rinderserum-Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DNaseI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Eisessig	Merck, Darmstadt, Deutschland
EnVision+ Systems HRP	Dako, Hamburg, Deutschland
Ethanol (EtOH)	Riedel de Haen, Seelze, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe oder Berkel AHK, Ludwigshafen, Deutschland
Eukitt	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Formaldehydlösung 37 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
GeneRuler™ 100bp DNA-Marker	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Glucose 10 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glucose-Oxydase	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycerol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Minimum Essential Medium (MEM)	Gibco, via Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
MuLV-reverse Transkriptase	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na ₂ HPO ₄)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Nickelsulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Normal Rabbit Serum	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Normal Goat Serum	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Noradrenalin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Orange-G	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Peroxidase Anti Peroxidase (PAP)	Dako, Hamburg, Deutschland
Peroxidase-markiertes Polymer	Dako, Hamburg, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pikrinsäure 33 %	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Salzsäure (HCL)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
SigmaMarker™ (Proteinmarker)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wolframatophosphorsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Xylol	Roth, Karlsruhe, Deutschland

3.1.5 Primärantikörper in der Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Alpha-Smooth Muscle Actin (α -SMA)-Antikörper:

- #A 5228 von Sigma (München, Deutschland)
- Monoklonal, aus Maus
- Verdünnung 1:1000 in PBS + 0,2 % BSA + 0,1 % NaN₃

Calponin-Antikörper:

- #ab46794 von Abcam (Cambridge, Vereinigtes Königreich)
- Monoklonal, aus Kaninchen
- Verdünnung 1:500 in PBS + 0,2 % BSA + 0,1 % NaN₃

Protein-Kinase-G (PKG) 1-Antikörper:

- #PK005 von Enzo Life Science (Lausen, Schweiz)
- Polyklonal, aus Kaninchen
- Verdünnung 1:1000 in PBS + 0,2 % BSA + 0,1 % NaN₃

Myosin Heavy chain (MYH)-11-Antikörper:

- sc-79079 von Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
- Polyklonal, aus Ziege
- Verdünnung 1:200 in PBS + 0,2 % BSA + 0,1 % NaN₃

Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA)-Antikörper:

- #2714-1 Epitomics via Abcam (Cambridge, Vereinigtes Königreich)
- Monoklonal, aus Kaninchen
- Verdünnung 1:500 in PBS + 0,2 % BSA + 0,1 % NaN₃

3.1.6 Sekundärantikörper in der Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Alexa488-goat-anti mouse

- A-11001 von Invitrogen via Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
- Verdünnung 1:500 in PBS

Rabbit-anti-goat-IgG Biotin

- #E0466 von Dako (Hamburg, Deutschland)
- Verdünnung 1:250 in PBS

Cy3-goat-anti-rabbit

- #111-166-045 von Jackson Immuno Research (Hamburg, Deutschland)
- Verdünnung 1:500 in PBS

3.2 Herkunft und Art des Untersuchungsmaterials

3.2.1 Herkunft und Haltung der Tiere für das hypoxische Mausmodell

Das Gewebe für die Azan-, Immunfluoreszenz- und immunhistochemischen Färbungen stammen von gekauften C57BL/6-Mäusen (8 Wochen) von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland). Die Tiere wurden unter der Tierversuchsnummer 17a-10c 20/15(1)-Gi20/10-3/95 und 25.3-19c 20/15(1)-Gi20/10-20/99 beantragt und gelistet. Die Tiere hatten beliebig Zugang zu Wasser und Nahrung. Sie wurden gemäß der Richtlinien für die Verwendung von Versuchstieren in einem kooperierenden Institut gehalten. Die Durchführung der Tierexperimente erfolgte unter Verwendung von Studienprotokollen der zuständigen lokalen Behörden (Regierungspräsidium Gießen, Hessen, Deutschland). Unsere Arbeitsgruppe führte eine Organentnahme der Nebenhoden durch.

3.2.2 Durchführung des hypoxischen Mausmodells

Der hypoxische Gewebezustand wurde induziert durch die Exposition von Mäusen gegenüber chronischer Hypoxie (Weissmann et al. 2003). Das konstante Niveau der Hypoxie wurde mit Hilfe einer autoregulatorischen Steuereinheit gehalten. Den Kammern wurde ein Gemisch aus Stickstoff und Sauerstoff zugeführt. Die Tiere wurden in einem anderen Institut unter hypoxischen Bedingungen (10 % inspirierte O₂-Fraktion) in einer normobaren Kammer für unterschiedliche Zeiträume (1 Tag bis 3 Wochen) gehalten. Übermäßige Feuchtigkeit im System wurde durch Kondensation in einem Kühlsystem verhindert. Anfallendes CO₂ wurde kontinuierlich mit Natronkalk aus den Kammern entfernt. Die hypoxischen Kammern wurden einmal am Tag zur Reinigung sowie zur Versorgung der Tiere mit Nahrung und Wasser geöffnet. Die Kammertemperatur lag bei 22-24 °C. Kontrolltiere wurden in ähnlicher Weise in Kammern mit normaler Sauerstoffumgebung (21 % inspirierte O₂-Fraktion) gehalten (Weissmann et al. 2003). Die Tiere wurden nach normoxischer / hypoxischer Behandlung mit Heparin und Ketanest in einem anderen Institut getötet und die entnommenen Organe wurden von unserer Arbeitsgruppe in Lösung nach Bouin (3.3.2) über Nacht fixiert.

Das fixierte Gewebe wurde anschließend in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert und in Paraffin eingebettet.

3.2.3 Gewebe für molekularbiologische und funktionelle Untersuchungen

Die Gewebeproben für die molekularbiologischen und funktionellen Untersuchungen wurden von Ratten des Stammes Wistar (12 Wochen) entnommen. Die Tiere kamen ohne Herz-Lungen-Paket aus dem Institut für Physiologie, der JLU. Die Tiere wurden dort unter der Tierversuchsnummer 469 M, 505 M, 506 M, 507 M und 510 M beantragt und gelistet. Sie wurden in der Physiologie durch CO₂-Inhalation betäubt sowie anschließend dekapitiert. Das Gewebe wurde für molekulargenetische Untersuchungen verwendet. Für diese Versuche wurden Caput, Corpus und Cauda des Nebenhodens, sowie kleine Gewebestücke aus allen einzelnen Segmenten des Nebenhodens entnommen und in Tubes bei -80 °C eingefroren. Außerdem wurden die Nebenhoden der Tiere für die funktionellen Experimente im Organbad verwendet.

3.3 Methoden

3.3.1 Azanfärbung

Anilinalkohol	100 ml 90 %iger EtOH + 0,1 ml Anilin
Anilinblau-Orange-Gemisch	0,5 g Anilinblau, 2 g Orange G in 100 ml Aqua dest. lösen + 8 ml Eisessig zugeben, kurz aufkochen und nach dem Erkalten filtrieren
Azokarminlösung	0,1 g Azokar G in 100 ml Aqua dest. aufschwemmen, kurz aufkochen und durch einen nicht gehärteten Filter abfiltrieren, dann 1 ml Eisessig je 100 ml Filtrat zugeben
Essigsaurer Alkohol	100 ml 96 %iger EtOH mit 1 ml Eisessig versetzen

Durchführung

Von den in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurde mit Hilfe eines Mikrotoms RM2255 (Leica) 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Proben wurden nach dem Strecken im Wasserbad auf Objektträger aufgezogen und auf eine Wärmeplatte gelegt. Anschließend wurden sie über Nacht im Inkubator bei 40 °C getrocknet. Die Färbung erfolgte per Hand. Der weitere Arbeitsablauf für die Azanfärbung nach Heidenhain ist tabellarisch dargestellt.

Lösung	Dauer	Anmerkung
1. Entparaffinieren (3 x Xylol, EtOH 100 %, 96 %, 70 %, Aqua dest.)	Je 5 Min.	
2. Anilinalkohol	5 Min.	

Material und Methoden

3. Vorgewärmte Azokarminlg. 12 Min. bei 56 °C im Wärmeschrank
4. Aqua dest. 1 Min. Spülen
5. Anilinalkohol 1 Min. Differenzieren
6. Aqua dest. 1 Min. Spülen
7. 5%ige Wolframatophosphorsäure 2 Std. Entfärben + Beizen des Bindegewebes
8. Aqua dest. 1 Min. Spülen
9. 1 Teil Anilinblau-Orange-Gemisch + 2 Teile Aqua dest. 1,5 Std.
10. Aqua dest. 5 Min. Spülen
11. Essigsaurer Alkohol 2 Min. Differenzieren, wenn nötig
12. absolutes Isopropanol 5 Min. Entwässern
13. 3 x Xylol Jeweils 5 Min.
14. Eindecken in Eukitt
15. Trocknen unter Abzug (Labor) über Nacht

3.3.2 Herstellung von Bouin'scher Lösung und Puffern für Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Bouin'sche Lösung

30 ml Pikinsäure gesättigt

10 ml Formalin 37 %

2 ml Eisessig

PBS, pH 7,4 (2 Liter)

0,163 M NaCl 15,9 g

0,05 M Na₂HPO₄ x 2 H₂O 17,8 g

aufgefüllt auf 2 Liter mit Aqua dest.

pH 7,4 mit 1 N HCl eingestellt + bei 4 °C gelagert

PBS + 0,2 % BSA + 0,1 % NaN₃

100 ml PBS (0,1 M) pH 7,4 (siehe oben)

200 mg BSA

100 mg NaN₃

bei 4 °C gelagert

PB 0,1 M, pH 7,4 (2 Liter)

4,9 g KH₂PO₄

29,2 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O

aufgefüllt auf 2 Liter mit Aqua dest.

pH 7,4 kontrolliert + bei 4 °C gelagert

Citratpuffer pH 6,0 für Mikrowellenbehandlung

Stammlösung A: 2,101 g Zitronensäure /100 ml Aqua dest.

Stammlösung B: 14,705 g Natriumcitrat x 2 H₂O / 500 ml Aqua dest

82 ml Lösung B auf 900 ml mit Aqua dest. auffüllen mit Lösung A auf
pH 6,0 einstellen, auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen.

Herstellung der Lösungen für die DAB-Entwicklung

Nickelsulfat (für Entwicklungspuffer)

130 mg Nickelsulfat

10 ml Aqua dest.

bei 4 °C gelagert

Entwicklungspuffer mit DAB und Nickelverstärkung

Für eine große Färbeküvette:

180 ml PB 0,1 M pH 7,4 (4 °C)

4 ml DAB (22,5 mg/ml)

400 µl Ammoniumchlorid (18 mg /100 µl)

3,6 ml Nickelsulfat (0,05 M)

3,6 ml Glucose (10 %)

Alle Komponenten mischen und anschließend filtrieren

Zum Starten der Reaktion Zugabe von 600 µl Glucose-Oxidase
(1,2 mg / 1 ml Aqua dest.)

3.3.3 Immunhistochemie

Durchführung für α -SMA, Calponin, PKG1, PCNA und MYH-11

Ähnlich der Azanfärbung wurden die im Paraffin eingebetteten Gewebe in 5 μ m dicke Proben geschnitten und mit Objektträgern aufgenommen. Die Schnitte wurden für 60 Min. auf dem Objektträger getrocknet und anschließend im Inkubator über Nacht bei 40 °C getrocknet. Danach wurden die Schnitte unter Verwendung von Xylol und Ethanol entparaffiniert. Mit Methanol / H₂O₂ (2 ml H₂O₂ 30 % + 50 ml Methanol) wurde die endogene Peroxidase blockiert.

Die weitere Durchführung für α -SMA, Calponin, PKG1 und PCNA wird schrittweise dargestellt:

1. Spülen in Aqua dest. und in PBS jeweils für 5 Min.
2. Zugabe des in PBS + 0,2 % BSA + 0,1 % NaN₃ verdünnten Primärantikörpers (3.1.5), Inkubation bei 4 °C über Nacht in feuchter Kammer
3. Spülen in PBS für 3 x 5 Min.
4. Zugabe des Peroxidase-markierten Polymers und anschließende Inkubation in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 30 Min.
5. Spülen in PBS und PB 0,1 M pH 7,4 jeweils für 10 Min.
6. DAB-Entwicklung je nach primärem Antikörper
Antikörper gegen α -SMA (5 Min.), Calponin (5 Min.), PKG1 (12 Min.), PCNA (8 Min.)
7. Spülen mit PB 0,1 M pH 7,4
8. In Aqua dest. bringen
9. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe (70 %; 96 %; 100 %),
anschließend 3 x 5 Min. in Xylol
10. Eindecken mit Eukitt
11. Trocken unter Abzug über Nacht

Die Vorbereitung der Färbung mit MYH-11 erfolgt wie unter 3.3.3.1 beschrieben. Die weitere Durchführung für MYH-11 wird schrittweise dargestellt:

1. Spülen in Aqua dest. für 5 Min.
2. Alle Schnitte in Citratpuffer 8 Min. bei 650 Watt in die Mikrowelle, anschließende Inkubation für 15 Min. bei 465 Watt in der Mikrowelle und 20 Min. abkühlen
3. Spülen in PBS für 15 Min.
4. Zugabe von PBS + 2 % Normal-Rabbit-Serum auf jeden einzelnen Schnitt, bei Raumtemperatur in feuchter Kammer 30 Min. inkubieren
5. Spülen in PBS für 2 Min.
6. Zugabe des in PBS + 0,2 % BSA + 0,1 % NaN_3 verdünnten Primärantikörpers (3.1.5), Inkubation bei 4 °C über Nacht in feuchter Kammer
7. Spülen in PBS für 3 x 8 Min.
8. Zugabe des Anti-Goat-IgG-Biotin (1:250), Inkubation in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 60 Min.
9. Spülen in PBS für 2 x 8 Min.
10. Zugabe des PAP (1:200), Inkubation in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 30 Min.
11. Spülen in PBS für 2 x 8 Min.
12. Zugabe des ABC-Komplex (1:250), Inkubation in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 30 Min.
13. Spülen in PBS und PB 0,1 M pH 7,4 jeweils für 8 Min.
14. Entwicklung des primären Antikörper MYH-11 für 30 Min.
11. Spülen mit PB 0,1 M pH 7,4 für 5 Min.
12. In Aqua dest. für 5 Min belassen.
13. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe (70 %; 96 %; 100 %), anschließend 3 x 5 Min. in Xylol

14. Eindecken mit Eukitt

15. Trocken unter Abzug über Nacht

3.3.4 Immunfluoreszenz

Durchführung

Das fixierte und in Paraffin eingebettete Nebenhodengewebe der Maus wurde wie für die Immunhistochemie (3.3.3) aufbereitet. Im Folgenden wird die schematische Darstellung des Arbeitsablaufes tabellarisch aufgelistet:

1. Schnitte entparaffinieren (3 x Xylol + 100 % EtOH für je 5 Min.)
2. Methanol (150 ml) + 30 % H₂O₂ (6 ml) für 30 Min.
3. 96 % EtOH, 70 % EtOH und Aqua dest. für je 5 Min.
4. Blockierung für 60 Min. mit 2 % Normal Goat Serum in PBS bei Raumtemperatur
5. Zugabe des in PBS + 0,2 % BSA + 0,1 % NaN₃ verdünnten Primärantikörpers (3.1.5), Inkubation bei 4 °C über Nacht
6. Spülen in PBS für 2 x 10 Min.
7. Zugabe des in PBS verdünnten Sekundärantikörpers (3.1.6), Inkubation eine Std. bei Raumtemperatur. Eine Lichtexposition der Objektträger wurde vermieden, weil die sekundären Antikörpern Alexa 488 und Cy3 lichtempfindlich sind.
8. Spülen in PBS für 2 x 10 Min.
9. 4 % PFA 10 Min.
10. Spülen in PBS für 2 x 10 Min.
11. Eindeckung mit Glycerol
12. Lagerung der Schnitte bei 4° C

Die Kontrollschnitte wurden anstelle des Primärantikörpers nur mit der Antikörperpufferlösung inkubiert.

Anschließend wurden die fertigen immunhistochemischen Färbungen und Immunfluoreszenzen mit dem Zeiss Axioskop 2 Mikroskops ausgewertet und in Bildern dokumentiert.

3.3.5 Molekularbiologische Methoden

3.3.5.1 RNA-Isolierung aus dem Nebenhodengewebe der Ratte

Die Vorbereitung der Gewebeproben wurde unter 3.2.3 beschrieben. Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus dem Nebenhodengewebe der Ratte wurde das RNeasy Mini-Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Gewebeproben wurden aus dem -80 °C-Gefrierschrank entnommen und auf Eis transportiert. Die weitere Durchführung wird schrittweise dargestellt:

1. Versetzen des Nebenhodengewebes mit Lysis-Puffer und β -Mercaptoethanol (10 μ l β -Mercaptoethanol pro 1 ml Lysis-Puffer)
2. Homogenisieren in einer Kugelmühle für 5 Min. bei 30.000 Hz
3. Zentrifugieren und entfernen der Zellüberreste 3 Min. bei Raumtemperatur und 13.000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5424)
4. Überstand in ein frisches 1.5 ml Eppendorf-Gefäß überführen
5. RNA mit 70 % EtOH fällen und nach Herstellerangaben isolieren

3.3.5.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der Nukleinsäureproben der 19 Segmente des Nebenhodens und von Nebenhodencaput, -corpus und -cauda wurden mit dem Nanodrop 2000-Spektrophotometer bestimmt. Für eine Messung wurde 1 μ l RNA (einer Lösung) verwendet. Als Leerwert diente RNase-freies Wasser.

3.3.5.3 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die cDNA-Synthese aus isolierter RNA von ganzen Geweben erfolgte mit dem iScript™ cDNA Synthese-Kit von BioRad. Bei diesem Protokoll wurde 1 μ g RNA umgeschrieben. Die weitere Durchführung wird schrittweise dargestellt:

1. Im Thermocycler wurde die genomische DNA mit DNaseI (Thermo Scientific) bei 25 °C für 18 Min. verdaut.
2. Zum Stoppen des Prozesses wurde bei 65 °C innerhalb von 10 Min. 1 μ l EDTA pro Probe zugegeben.
3. Das Reaktionsgemisch wurde 2 Min. bei 4 °C inkubiert.

4. Der Reaktionsmix wurde mit der modifizierten MuLV-reversen-Transkriptase (1 μ l/Probe) und dem 5 x iScript Mix versetzt.

Die Hexamer-Primer waren bereits im 5 x iScript-Mix enthalten. Die Angaben des Herstellers zur optimalen Synthese der cDNA wurden dabei eingehalten: 5 Min. 25 °C, 30 Min. 42 °C, 5 Min. 85 °C. Für die Negativkontrolle wurde Aqua dest. anstatt der reversen Transkriptase eingesetzt. Das entstandene Produkt konnte entweder bei -20 °C gelagert werden oder diente als Template für die Polymerase-Kettenreaktion (s. 3.3.5.5)

Tabelle 1: Pipettierschema zur cDNA-Synthese der isolierten RNA aus Geweben

Reaktionsmix	Volumen in μl
5 x iScript Reaktionsmix	4
iScript RT	1
Aqua dest.	abhängig vom Volumen der RNA
Gesamtvolumen	20

3.3.5.4 Oligonukleotide (Primer)

Alle Primersequenzen wurden mit dem Webprogramm Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) erstellt. Die Oligonukleotide für die Primer wurden von der Firma Eurofins MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen. Die Primerlösungen wurden in einer 200 pMol/µl Stammlösung angesetzt.

Für die Primer galt:

- intronspannend
- Länge etwa 20 Basenpaare (bp)
- Guanin/Cytosin-Gehalt ca. 50%
- nicht-komplementär

Um die Spezifität der Primer sicher zu stellen, wurden die Sequenzen mit dem Programm BLAST (Basic-Local-Alignment-Search-Tool / <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mit bereits vorhandenen Sequenzen in der Datenbank des Programmes verglichen.

Tabelle 2: Rattenspezifische Sequenzen intronspannender Oligonukleotide

Gen	Forward 5' → 3'	Reverse 5' → 3'	Accession number	Größe in bp
TLR4	TGCTCAGACATG GCAGTTTC	TCAAGGCTTTT CCATCCAAC	NM_2996506	206
RPS18 (ribosomales Protein 18) Housekeeping -Gen	GTGATCCCCGAG AAGTTTCA	TGGCCAGAACC TGGCTATAC	NM_213557.1	292

3.3.5.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR-Ansatz mit Template-cDNA von ganzen Geweben:

Die RT-PCR wird verwendet, um eine selektive Vervielfältigung von mRNA zu erreichen. Die Sequenzen werden durch zwei spezifische Oligonukleotide (Primer) bestimmt, welche jeweils an einem Strang komplementär binden. Als Template diente die cDNA, welche aus ganzen Geweben gewonnen wurde. Die Amplifikation der Zielsequenz wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt.

95°C	12 Min.	
95°C	30 Sec.	} 35 Zyklen
60°C	20 Sec.	
73°C	30 Sec.	
73°C	7 Min.	
4°C	kühlen	

In diesem Ansatz wurde die AmpliTaq® Gold DNA Polymerase von Applied Biosystems (USA) verwendet. Die Template-cDNA wurde in den 0,2 ml PCR-Gefäßen vorgelegt und anschließend mit dem Reaktionsmix versetzt.

Tabelle 3: Pipettierschema für PCR-Reaktionen von mRNA ganzer Gewebeproben

Reaktionsmix	Volumen in µl
10 x PCR-Puffer	2,5
2 mM MgCl ₂	2
10 mM dNTPs	0,5
0,4 pMol/µl Forward Primer	0,5
0,4 pMol/µl Reverse Primer	0,5

AT Gold Polymerase	0,1
Aqua dest.	17,9
Gesamtvolumen	24

Zur Kontrolle des PCR-Experiments wurden auch Negativproben ohne Template, aber mit DNA-Polymerase amplifiziert, welche als Wasserkontrollen bezeichnet wurden.

3.3.5.6 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

In der Gelelektrophorese entsteht ein elektrisches Feld. In diesem elektrischen Feld kommt es zur Wanderung der negativ geladenen DNA. Ein 2 % iges Gel aus Agarose und 1 x TAE (Tris-Acetat-EDTA) Puffer wurde hergestellt. Dem Gel wurde 0,5 mg/ml Ethidiumbromid zugeführt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA-Doppelstränge und kann so unter UV-Licht (245 nm) visualisiert werden. Als Längenstandard diente der 100 bp - Marker (GeneRuler™ 100 bp DNA-ladder, Thermo Scientific, USA). Der Lauf der Gelelektrophorese fand bei 150 V und 250 mA für ca. 30 Min. statt. Die Auswertung der PCR-Produkte erfolgte nach der Dokumentation mit einem Gel-Dokumentationssystem (Phase, Lübeck).

3.3.6 Funktionelle Untersuchungen

3.3.6.1 Verwendete Substanzen

- LPS (1 mg/ml)
1 mg LPS gelöst in 1 ml MEM, bei -20 °C gelagert
(nicht mischen auf dem Vortexmischer)
- Noradrenalin (10 mM)
1,7 mg/ml pro ml Aqua dest = 10 mM Stocklösung (Endkonzentration im Organbad 10 µM)

3.3.6.2 Kontraktionsstudien mit LPS-Zugabe

Bei den funktionellen Organbad-Studien wurden Kontraktionen und Relaxationen der Muskulatur des Ductus epididymidis der Ratte ex vivo untersucht. Dabei wurde der Nebenhodengang aus dem Segment 18 des kaudalen Nebenhodengangabschnittes präpariert. Frühere Studien am Rind (Mewe et al. 2006a; Mewe et al. 2006b) und an der Ratte (Mietens et al. 2012) zeigten an diesem Abschnitt Spontankontraktionen des Ductus epididymidis. Der entnommene Nebenhoden wurde sofort in MEM-Medium überführt und anschließend unter dem Stereomikroskop (Leica MS5, Wetzlar) präpariert. Ein kurzer Gangabschnitt des Segments 18 wurde zwischen 2 Metallklammern eingespannt und in die kraftaufnehmende Vorrichtung des Organbads eingehängt (Abb. 8A).

3.3.6.3 Durchführung der Kontraktionsstudien mit LPS-Zugabe

Maximal vier präparierte Nebenhodengangabschnitte konnten in einem Experiment parallel nebeneinander eingespannt werden. Im Organbad wurde das Gewebe konstant mit MEM-Medium umspült und mit einem Gasgemisch aus 5 % CO₂ und 95 % O₂ begast. Das Organbad wurde ständig mit vorgewärmtem Wasser umspült, um eine konstante Temperatur von 36°C zu gewährleisten. Zur Standardisierung der Versuchsbedingungen wurde die Einhängvorrichtung vor jedem Versuch mit einem Gewicht von 1 g kalibriert. Die in den Klammern eingespannten Nebenhodengangabschnitte wurden mittels Faden aufgehängt, das Gewebe wurde auf eine Vorspannung von 0,5 - 0,6 g gebracht. Somit wurde vor jedem Versuch eine ähnliche Vorspannung des Nebenhodengangabschnittes erreicht. Gewebeabschnitte, welche keine Spontankontraktionen zeigten, flossen nicht in die Bewertung ein, da hier von einer Gewebsverletzung ausgegangen werden konnte. Die Versuche mit Spontankontraktion wurden für ca. 5 Min. beobachtet und aufgezeichnet. Nach 5 Min. Spontankontraktion wurde in unterschiedlichen Konzentrationen die Substanz LPS hinzugegeben. Diese Substanz sollte über den TLR4-Rezeptor einen Einfluss auf die Kontraktionen zeigen. Die Messung wurde nach LPS-Zugabe noch 30 Min. fortgesetzt. Die Darstellung und Analyse der Frequenzen erfolgte über das Programm LabChart (AD Instruments, Colorado Springs, USA).

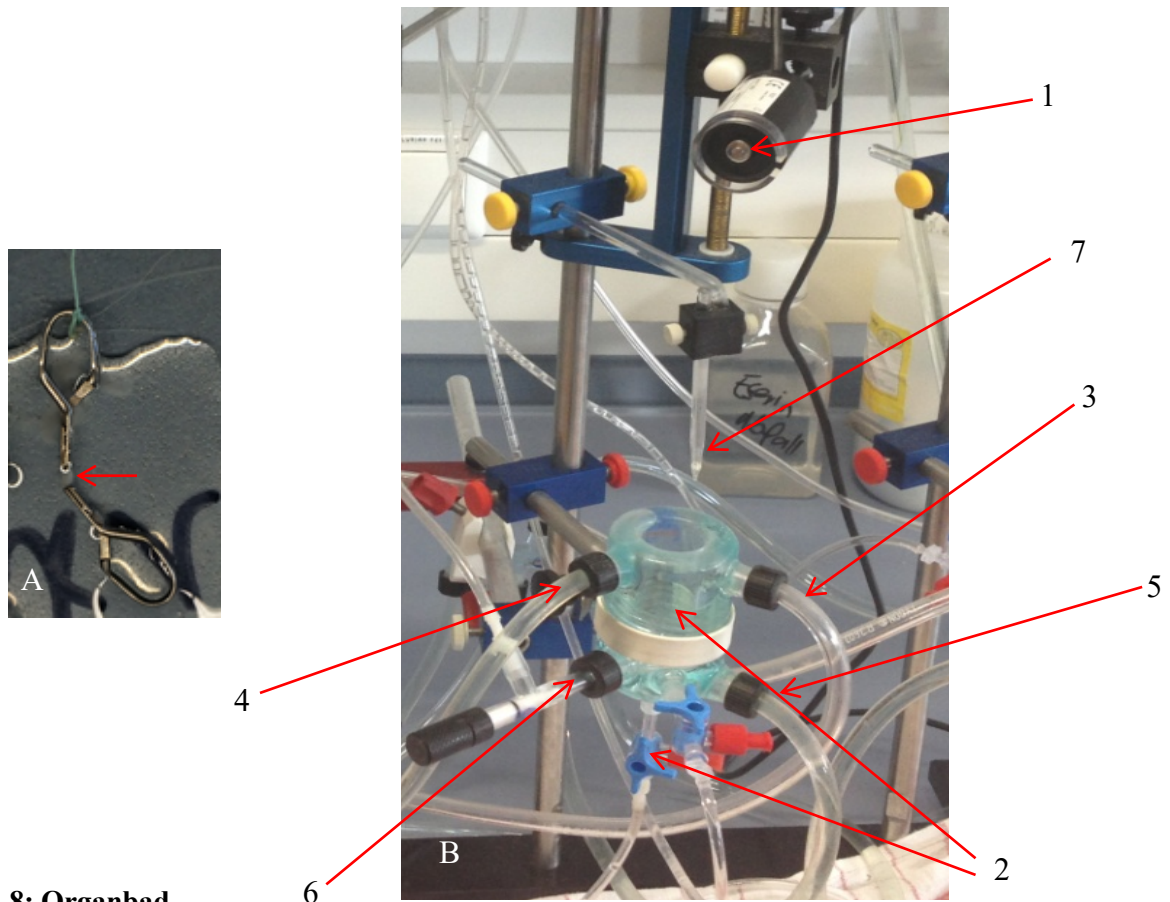


Abb. 8: Organbad

A: 2 Klammern fixieren einen Nebenhodengangabschnitt (Pfeil) in A. An der oberen Klammer ist eine dünne Schnur befestigt, welche am Kraftsensor (1 in B) befestigt wird und so die Kontraktionsmessung erlaubt.

B: Befestigung der oberen Klammer mittels Faden (1), Organbadkammer (15ml Fassungsvermögen) mit Ablaufschlauch der Kammer (2), Ablaufschlauch für Überschuss (3), Zulaufschlauch des warmen Wassers in die hohlwangige Kammer (4), Ablaufschlauch des warmen Wassers in die hohlwangige Kammer (5), Gaszulauf (6), Glashaken für die Befestigung (7).

3.3.6.4 Kontraktionsstudien am präinkubierten Nebenhodengang

Für die Inkubationsversuche wurden postmortal entfernte Nebenhoden der Ratte (3.2.3) entnommen. Beide Nebenhoden des Tieres wurde unter dem Stereomikroskop (Leica MS5, Wetzlar) präpariert. Der kaudale Nebenhodenabschnitt wurde abgetrennt, die Kapsel entfernt (Abb. 9) und der geknäulte Nebenhodengang mit Pinzetten aufgelockert. Damit sollte eine bessere Angriffsmöglichkeit für das anschließend hinzugefügte LPS geschaffen werden. In der Folge wurde der kaudale Nebenhodenteil in ein Tube mit 1 ml MEM und 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS überführt und bei 33 °C 90 Min. inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Nebenhodenteil in MEM gespült. Der Kontrollnebenhoden wurde analog behandelt mit dem Unterschied, dass die 90-minütige Inkubation in reinem MEM erfolgte. Danach wurden von LPS- und Kontroll-Nebenhoden Nebenhodengangabschnitte unter dem Stereomikroskop (Leica MS5, Wetzlar) aus vergleichbaren Bereichen präpariert, isoliert und im Organbad eingespannt (Abb. 8a).

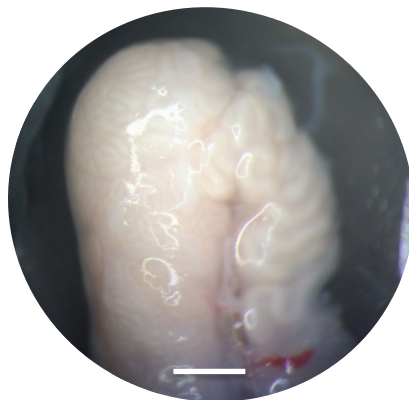


Abb. 9: Nebenhoden der Ratte

Kaudaler Abschnitt des Nebenhodens der Ratte nach Entfernung der Tunica albuginea

(Maßstab = 0,5 cm)

3.3.6.5 Durchführung der Kontraktionsstudien am präinkubierten Nebenhodengang

Der Versuchsaufbau ähnelt den zuvor beschriebenen Versuchen mit Zugabe von LPS ins Organbad. direkten Organbadversuche. Die 4 Kammern des Organbades wurden mit je 15 ml MEM gefüllt, konstant mit 36 °C vorgewärmtem Wasser umspült, mit einem Gasgemisch aus 5 % CO₂ und 95 % O₂ begast. Zur Standardisierung der Versuchsbedingungen wurde die Einhängvorrichtung vor jedem Versuch mit einem Gewicht von 1 g kalibriert. Die zwischen den Klammern eingespannten Nebenhodengangabschnitte (mit und ohne LPS-Präinkubation) wurden mittels Faden aufgehängt, das Gewebe wurde auf eine Vorspannung von 0,5 - 0,6 g gebracht. Somit wurde vor jedem Versuch eine ähnliche Vorspannung des Nebenhodengangabschnittes erreicht. Nach 30-minütiger Aufzeichnung wurde Noradrenalin (15 µl Stocklösung/15 ml MEM) in die Kammern gegeben. Die Darstellung und Analyse der Frequenzen erfolgte über das Programm LabChart (AD Instruments, Colorado Springs, USA).

4 Ergebnisse

4.1 Lichtmikroskopische Untersuchungen des Mausnebenhodens in einem Hypoxiemodell

Zur Frage, ob chronische Hypoxie Einfluss auf die Struktur des Nebenhodens hat, wurden Nebenhodenschnitte von normoxisch gehaltenen Mäusen (NOX), Mäusen, die 1 Woche unter hypoxischen Bedingungen gehalten wurden (HOX 1W), und Mäusen, die drei Wochen unter hypoxischen Bedingungen gehalten wurden (HOX 3W), untersucht. Um morphologische und strukturelle Unterschiede der Gefäßmuskulatur und der Nebenhodengangmuskulatur festzustellen, wurden Azanfärbungen nach Heidenhain erstellt.

4.1.1 Azanfärbung nach Heidenhain

Die Azanfärbung nach Heidenhain diente als Übersichtsfärbung, um morphologische und strukturelle Veränderungen an der Nebenhodengangmuskulatur des kaudalen Nebenhodens durch die Exposition gegenüber chronischer Hypoxie sichtbar zu machen. In den untersuchten Schnitten NOX, HOX 1 W und HOX 3 W zeigten sich lichtmikroskopisch keine morphologischen oder strukturellen Unterschiede der Muskulatur, des Epithels oder des Bindegewebes.

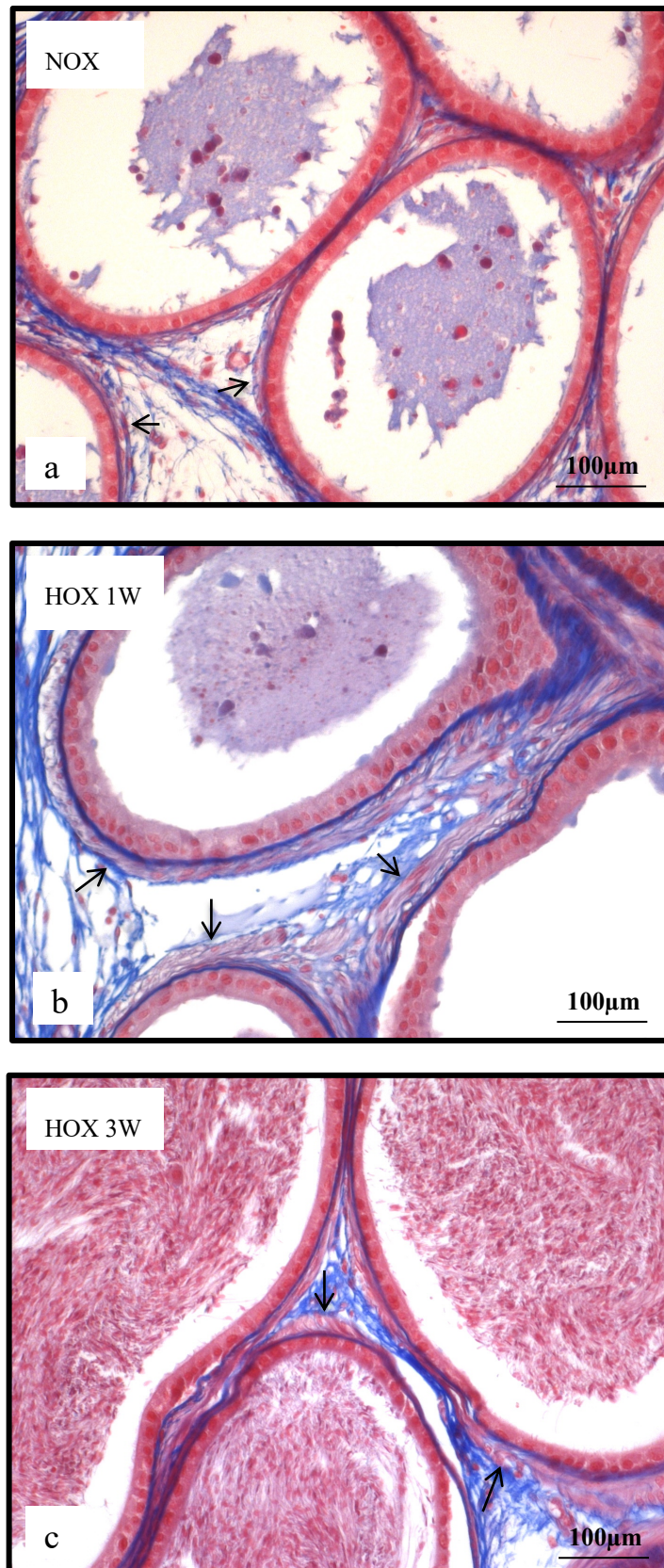


Abb. 10: Lichtmikroskopische Aufnahmen (Azanfärbung nach Heidenhain) der Cauda von Mausnebenhoden in einem Hypoxiemodell. Die Mäuse waren Normoxie (a), chronischer Hypoxie für eine Woche (b) oder chronischer Hypoxie für drei Wochen (c) ausgesetzt. Pfeile zeigen Gangmuskulatur

4.2 Immunfluoreszenzfärbung am Mausnebenhoden in einem Hypoxiemodell

4.2.1 Immunfluoreszenzfärbung für α -SMA und Calponin

Um Veränderungen der Gefäßmuskulatur und der Muskulatur des kaudalen Nebenhodenganges nach chronischer Hypoxie festzustellen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen α -SMA und Calponin durchgeführt (Abb. 11). Unter Normalbedingungen (Abb. 11 a-c) zeigte sich die Gefäßmuskulatur auf α -SMA positiv, war jedoch auf Calponin negativ. Im Gegensatz dazu war die Muskulatur der Nebenhodengänge der normoxisch gehaltenen Mäuse (Abb. 11 a-c) gegenüber α -SMA und Calponin positiv.

Das gleiche Färbemuster zeigte sich in den Nebenhoden der hypoxisch gehaltenen Mäuse (Abb. 11 d-f und g-i). Die Gefäßmuskulatur zeigte sich nur α -SMA positiv, während in der Muskulatur der Nebenhodengänge der hypoxisch gehaltenen Mäuse (Abb. 11 d-f und g-i) α -SMA und Calponin positiv war.

Insgesamt ergaben die Färbungen sowohl für α -SMA als auch für Calponin keinerlei Veränderungen in der Gefäß- und Nebenhodengangmuskulatur durch chronische Hypoxie.

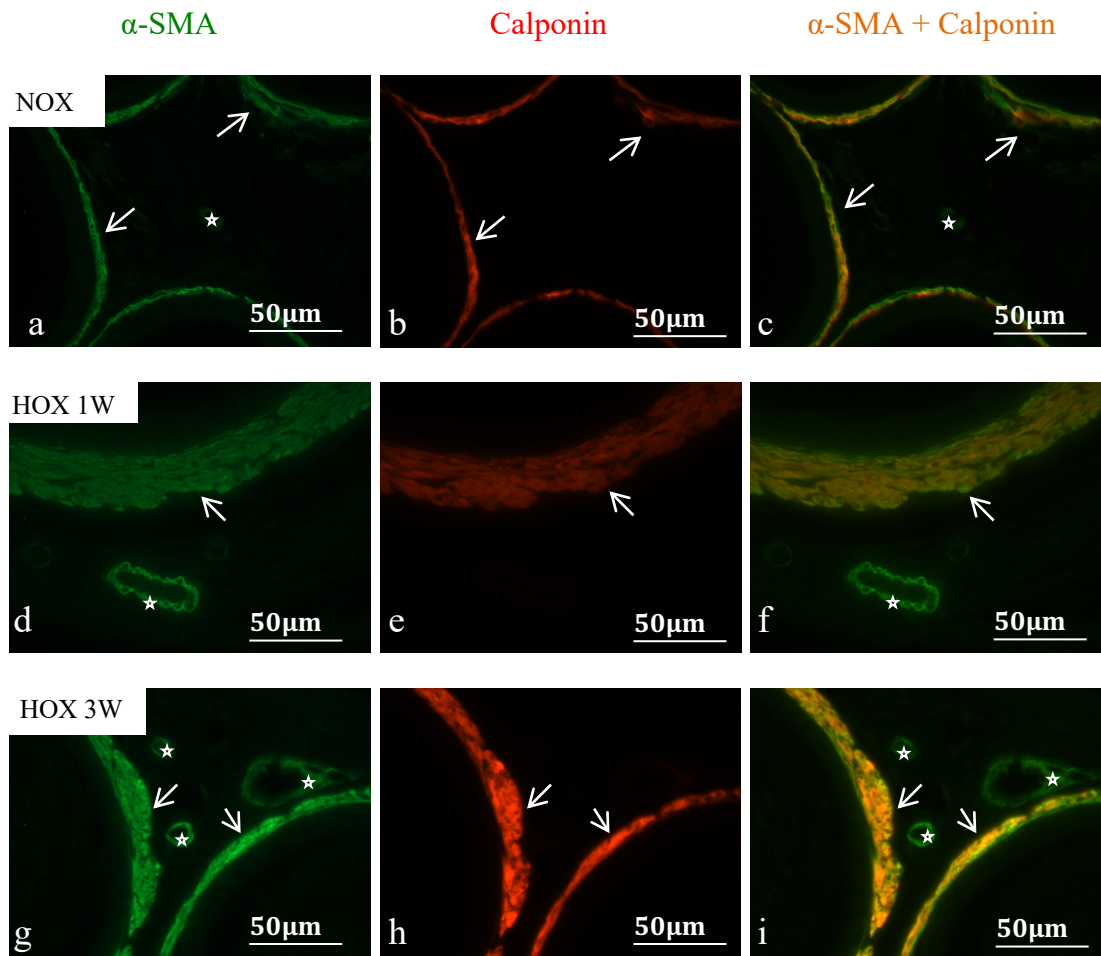


Abb. 11: Übersicht von Immunfluoreszenzfärbungen der Cauda von Mausnebenhoden in einem Hypoxiemodell. Die Mäuse waren Normoxie (a-c), chronischer Hypoxie für eine Woche (d-f) oder chronischer Hypoxie für drei Wochen (g-i) ausgesetzt. Es wurden Antikörper gegen α -SMA (a,d,g) und Antikörper gegen Calponin (b,e,h) gezeigt, sowie die Überlagerung der Kanäle (c,f,i). Sterne zeigen Gefäßmuskulatur, Pfeile zeigen Gangmuskulatur.

4.3 Immunhistochemische Färbung mit verschiedenen Antikörpern am Mausnebenhoden in einem Hypoxiemodell

4.3.1 Immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen MYH-11 in der Cauda von Mausnebenhoden in einem Hypoxiemodell

Zur immunhistochemischen Untersuchung der Gefäß- und Nebenhodengangmuskulatur des kaudalen Nebenhodenganges nach chronischer Hypoxie führte ich Färbungen mit einem Antikörper gegen MYH-11 durch (Abb. 12). Unter Normalbedingungen (Abb. 12 a) und in der Immunfärbung der über eine Woche unter Hypoxie gehaltenen Tiere (Abb. 12 b) zeigte sich sowohl die Gefäß- als auch die Nebenhodengangmuskulatur auf MYH-11 positiv. Interessanterweise zeigte die Immunfärbung der Gruppe HOX 3W (Abb. 12 c) weiterhin eine positive MYH-11-Färbung der Gangmuskulatur, während sich die Gefäßmuskulatur MYH-11 deutlich schwächer darstellte. Die Färbungen weisen darauf hin, dass eine längerfristige Hypoxie von drei Wochen keine Auswirkung auf die Nebenhodengangmuskulatur hat, während sich die Expression von MYH-11 in der Gefäßmuskulatur verändert.

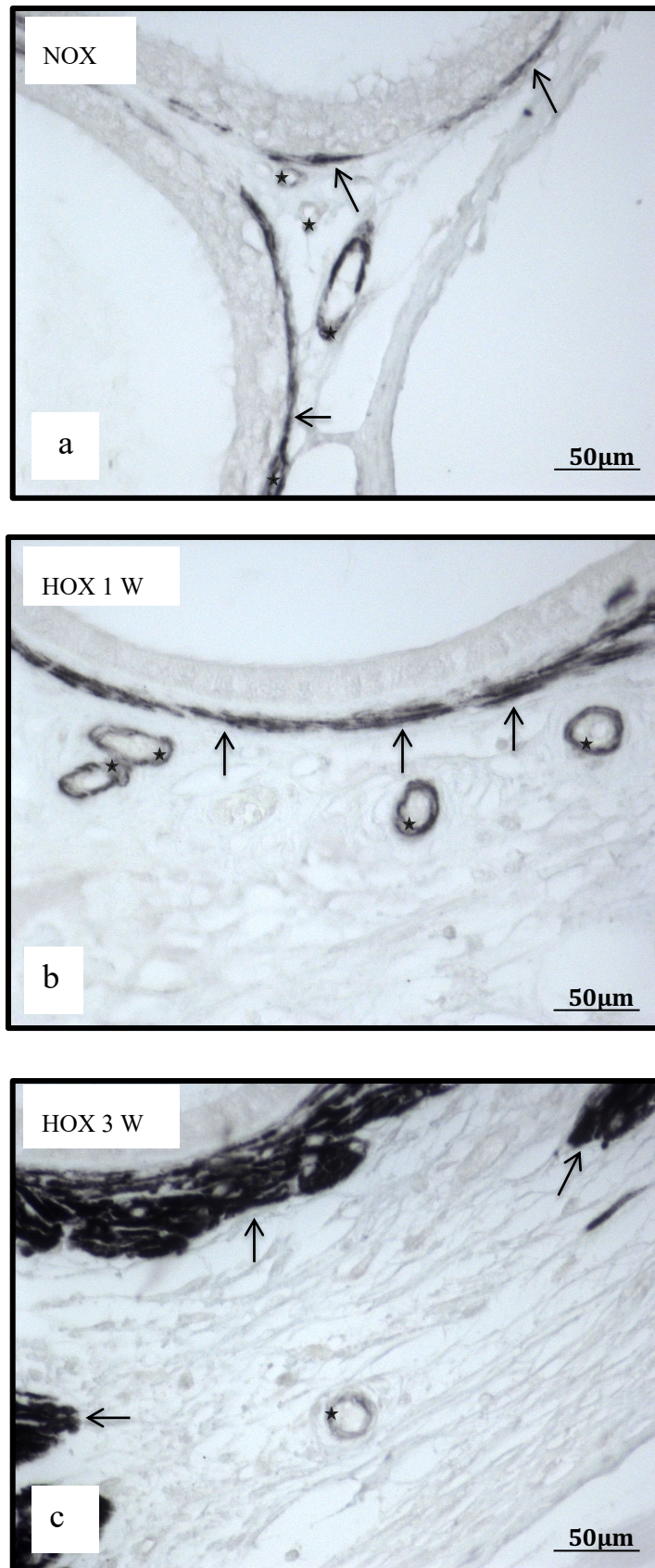


Abb. 12: Immunhistochemische Färbungen mit einem Antikörper gegen MYH-11 in der Cauda von Mausnebenhoden in einem Hypoxiemodell. Die Mäuse waren Normoxie (a-c), chronischer Hypoxie für eine Woche (d-f) oder chronischer Hypoxie für drei Wochen (g-i) ausgesetzt. Sterne zeigen Gefäßmuskulatur, Pfeile zeigen Gangmuskulatur.

4.3.2 Immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen PKG1 in der Cauda von Mausnebenhoden in einem Hypoxiemodell

Zur weiteren immunhistochemischen Untersuchung der Gefäß- und Nebenhodengangmuskulatur des kaudalen Nebenhodenganges nach chronischer Hypoxie wurden Färbungen mit einem Antikörper gegen PKG1 angefertigt (Abb. 13).

Unter Normalbedingungen (Abb. 13 a) und nach einer Woche Hypoxie (Abb. 13 b) zeigte sich die Gefäßmuskulatur stärker gefärbt als die Nebenhodengangmuskulatur. Im Vergleich war die Nebenhodengangmuskulatur in der Färbung der NOX-Proben (Abb. 13 a) schwächer gefärbt, als in der Färbung nach einer Woche Hypoxie (Abb. 13 b). Bei der Färbung nach drei Wochen Hypoxie (Abb. 13 c) ergab sich eine negative Immunreaktion in der Gefäßmuskulatur und eine, im Vergleich zu der NOX-Färbung (Abb. 13 a) und der Färbung nach einer Woche Hypoxie (Abb. 13 b), schwächere Immunreaktion in der Nebenhodengangmuskulatur. Somit beeinflusste eine längere Hypoxie die PKG1-Färbung bei beiden Muskulaturen (Gefäß- und Nebenhodengangmuskulatur).

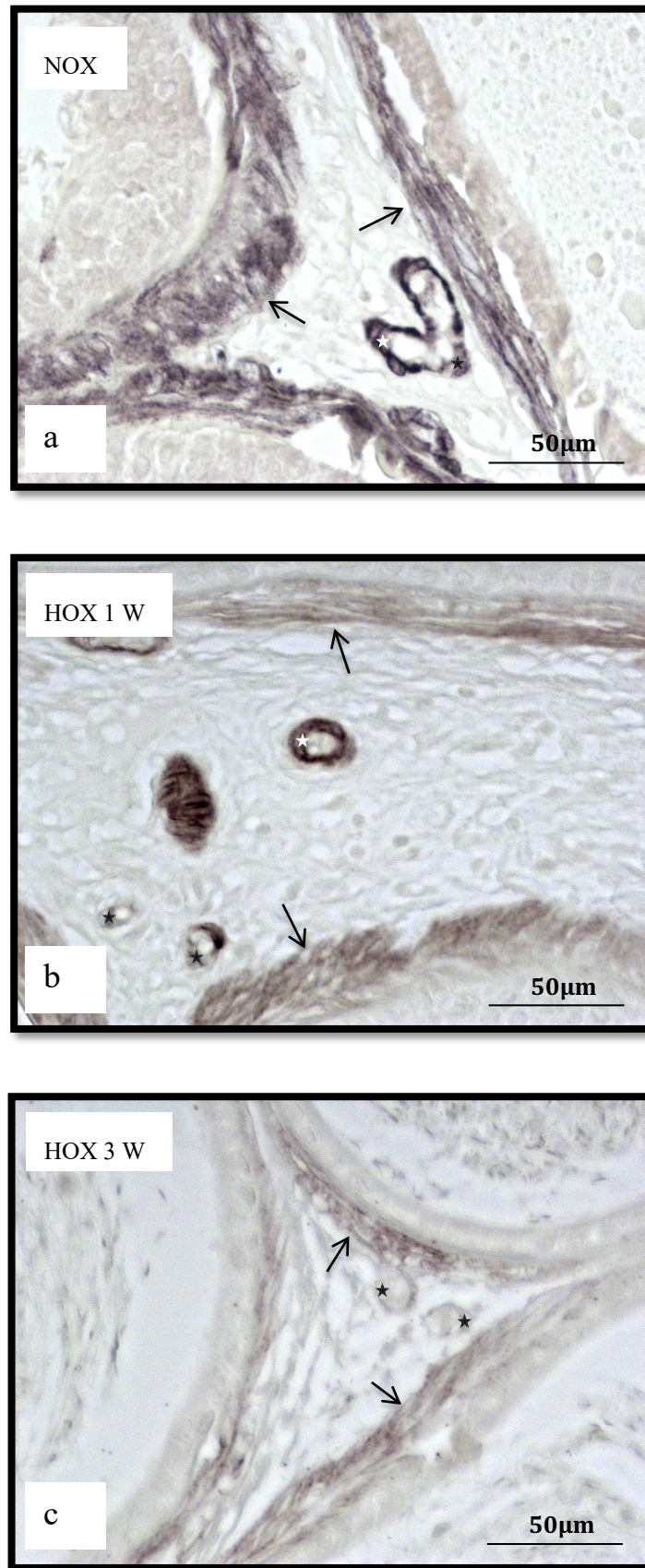
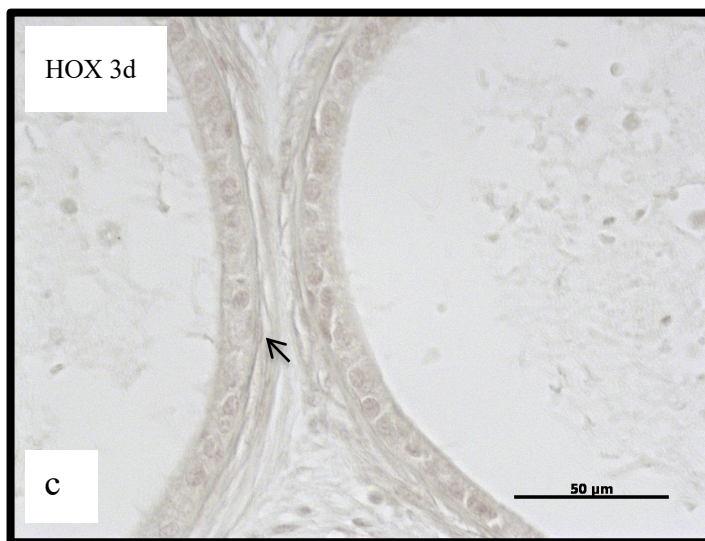
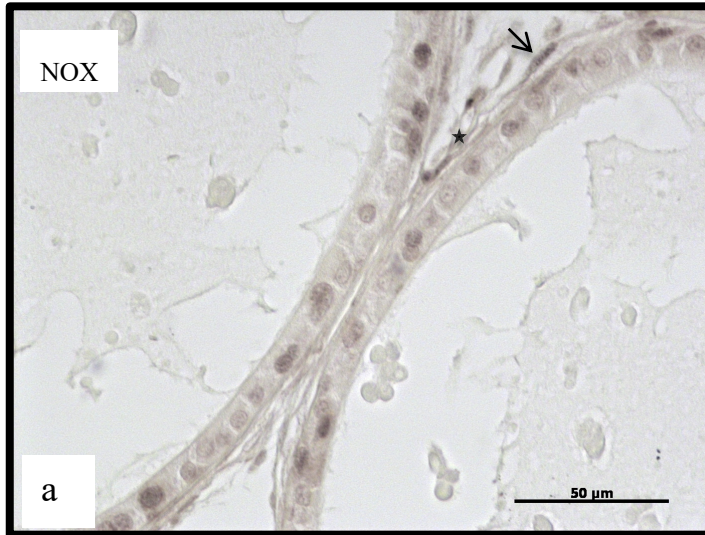


Abb. 13: Immunhistochemische Färbungen mit einem Antikörper gegen PKG1 in der Cauda von Mausnebenhoden in einem Hypoxiemodell. Die Mäuse waren Normoxie (a-c), chronischer Hypoxie für eine Woche (d-f) oder chronischer Hypoxie für drei Wochen (g-i) ausgesetzt. Sterne zeigen Gefäßmuskulatur, Pfeile zeigen Gangmuskulatur.

4.3.3 Immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen PCNA in der Cauda von Mause Nebenhoden in einem Hypoxiemodell

Zusätzlich zu den Untersuchungen der Gefäß- und Nebenhodengangmuskulatur wurde die Proliferation in diesen Strukturen, sowie des Nebenhodengangepithels unter chronischer Hypoxie untersucht. Dafür wurden immunhistochemische Färbungen mit einem Antikörper gegen das Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen erstellt (PCNA) (Abb. 14). Dieses Antigen ist ein wichtiger Cofaktor der DNA-Synthese während der Replikation. Unter Normalbedingungen (Abb. 14 a) war die Gefäßmuskulatur nicht angefärbt, dies änderte sich auch nicht unter einer dreiwöchigen Hypoxie (Abb. 14 b-e). Dagegen ließen sich in der Gruppe NOX (Abb. 14 a) einzelne proliferierende Zellen in den peritubulären Muskelzellen als auch im Epithel nachweisen. Bereits nach drei Tagen zeigte sich eine Abnahme der proliferierenden Zellen (Abb. 14 c). Der Nachweis der proliferierenden Zellen blieb bis zur dritten Woche (Abb. 14 e) auf niedrigem Niveau.



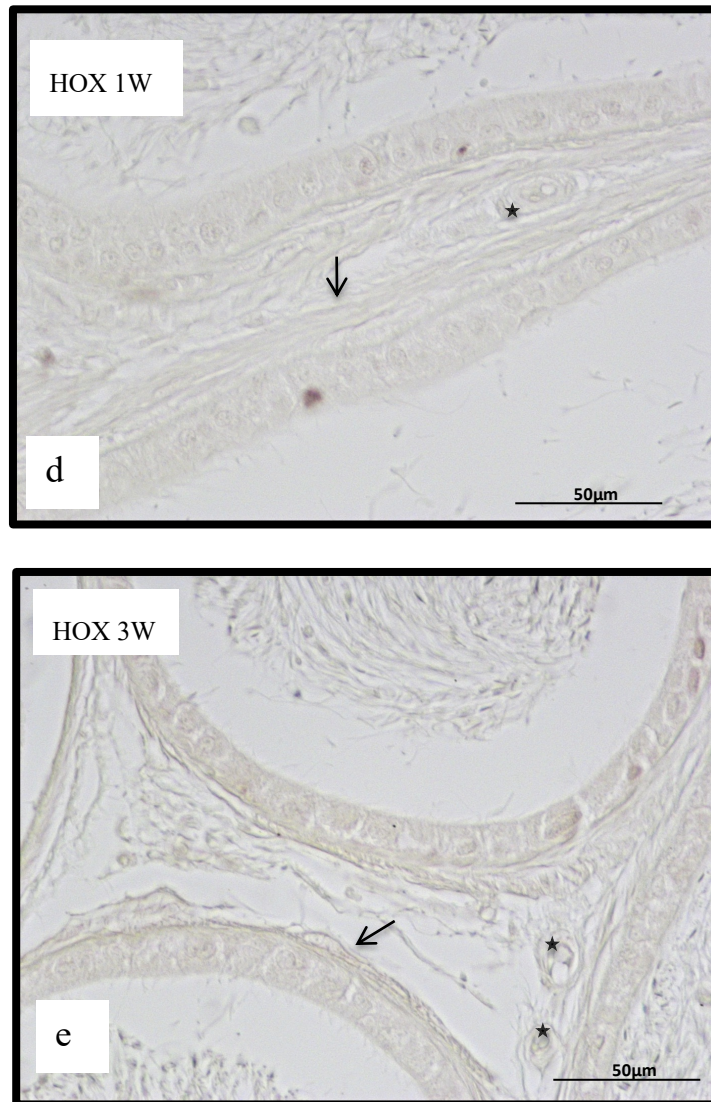


Abb. 14: Immunhistochemische Färbungen mit einem Antikörper gegen PCNA in der Cauda von Mausnebenhoden in einem Hypoxiemodell. Die Mäuse waren Normoxie (a), chronischer Hypoxie für 24 Stunden (b), 3 Tagen (c), eine Woche (d) und für drei Wochen (e) ausgesetzt. Sterne zeigen Gefäßmuskulatur, Pfeile zeigen Gangmuskulatur.

4.4 Der TLR4-Rezeptor im Nebenhoden

Neben den Untersuchungen am Hypoxie-Modell (s. 4.1 - 4.3) wurde der Einfluss von Entzündungsmediatoren auf die Nebenhodengangmuskulatur untersucht. Außerdem wurde die Expression des entsprechenden Rezeptors (TLR4) in den einzelnen Segmenten des Nebenhodens analysiert (s. 4.4.1). So wurden die Effekte von LPS auf die Kontraktionen des Nebenhodenganges betrachtet (s. 4.5). Interessanterweise können hypoxische Signale durch NF- κ B-Signalübertragung entzündliche Prozesse im Gewebe beeinflussen, da in beiden Signalwegen (TLR4-Rezeptor und HIF) der spezifische Transkriptionsfaktor NF- κ B eine Rolle spielt (Rodrigues et al. 2008; Oliver et al. 2009).

4.4.1 Expression des TLR4-Rezeptors im Nebenhoden der Ratte

Um die Wirkung von LPS am Nebenhoden in nachfolgenden funktionellen Untersuchungen in einem Folgeschritt analysieren zu können, wurde mittels RT-PCR zunächst die Expression des TLR4-Rezeptors in Caput, Corpus und Cauda des Nebenhodens der Ratte untersucht. Qualitativ ließen sich TLR4-Rezeptor-Transkripte (206bp) in allen drei Abschnitten des Nebenhodens der Ratte nachweisen (Abb. 15).

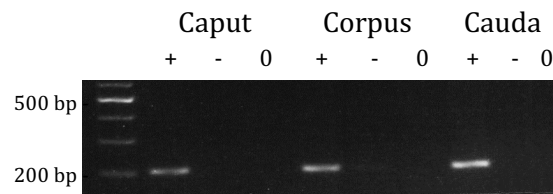
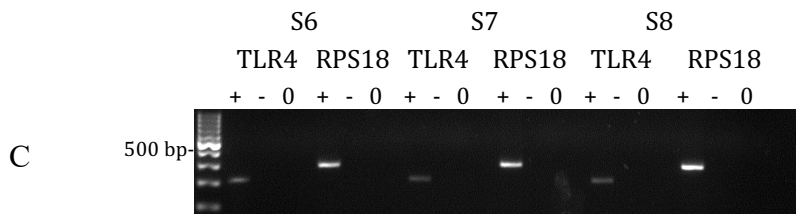
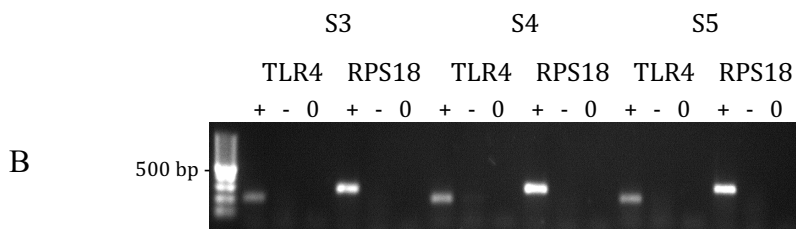
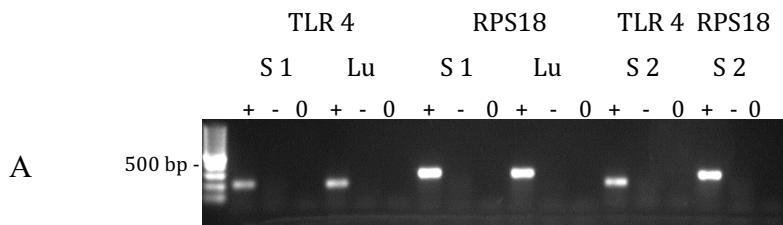


Abb. 15: Expression von TLR4 im Nebenhoden der Ratte

Expression von TLR4 (206 bp) aus einer Gesamt-RNA-Präparation von Nebenhodencaput, -corpus und -cauda der Ratte. Als Längenstandard diente ein 100 bp DNA-Marker.

4.4.2 Expression des TLR4-Rezeptors in den verschiedenen Segmenten des Nebenhodens der Ratte

Um die Wirkung von LPS am Segment 18 untersuchen zu können, testete ich zuerst, ob TLR4 in Segment 18 exprimiert wird. Vergleichend wurden die weiteren Segmente 1 bis 17 und 19 des Nebenhodens der Ratte hinsichtlich ihrer Expression des TLR4-Rezeptors qualitativ untersucht. Der TLR4-Rezeptor konnte in allen 19 Nebenhodensegmenten der Ratte nachgewiesen werden (Abb. 16 A-G).



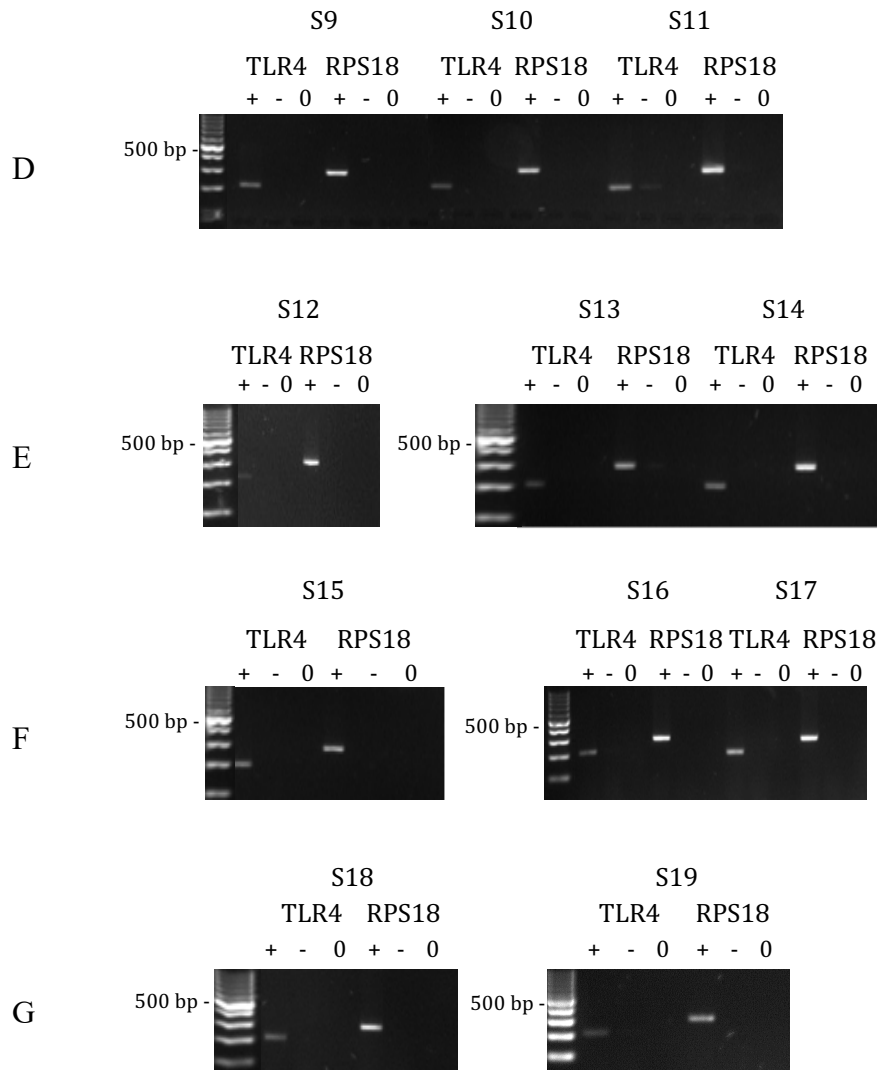


Abb. 16: Expression von TLR4 in den einzelnen Segmenten (S1-S19) vom Nebenhoden der Ratte

A: Expression von TLR4 (206 bp) einer Gesamt-RNA-Präparation von Gewebestücken aus dem Segment 1 und Segment 2. Die Lunge diente als Kontrollorgan. RPS18 (292 bp) wurde als Housekeeping-Gen verwendet.

B: Expression von TLR4 (206 bp) einer Gesamt-RNA-Präparation von Gewebestücken aus dem Segment 3, Segment 4 und Segment 5. RPS18 (292 bp) wurde als Housekeeping-Gen verwendet.

C: Expression von TLR4 (206 bp) einer Gesamt-RNA-Präparation von Gewebestücken aus dem Segment 6, Segment 7 und Segment 8. RPS18 (292 bp) wurde als Housekeeping-Gen verwendet.

D: Expression von TLR4 (206 bp) einer Gesamt-RNA-Präparation von Gewebestücken aus dem Segment 9, Segment 10 und Segment 11. RPS18 (292 bp) wurde als Housekeeping-Gen verwendet.

E: Expression von TLR4 (206 bp) einer Gesamt-RNA-Präparation von Gewebestücken aus dem Segment 12, Segment 13 und Segment 14. RPS18 (292 bp) wurde als Housekeeping-Gen verwendet.

F: Expression von TLR4 (206 bp) einer Gesamt-RNA-Präparation von Gewebestücken aus dem Segment 15, Segment 16 und Segment 17. RPS18 (292 bp) wurde als Housekeeping-Gen verwendet.

G: Expression von TLR4 (206 bp) einer Gesamt-RNA-Präparation von Gewebestücken aus dem Segment 18 und Segment 19. RPS18 (292 bp) wurde als Housekeeping-Gen verwendet.

Als Längenstandard diente jeweils ein 100 bp DNA-Marker.

4.5 LPS-Effekte auf die Kontraktionen im distalen Teil des Nebenhodenganges der Ratte

Zur Einschätzung bakterieller Effekte auf die Kontraktilität des Nebenhodenganges wurde der Einfluss von LPS an Gangabschnitten des Segments 18 mittels Organbad analysiert (Tabelle 4 + Abb. 17). Durch die vorangegangenen RT-PCR-Studien (s. 4.4.1) konnte der TLR4-Rezeptor im kaudalen Abschnitt und insbesondere im Segment 18 des Nebenhodens nachgewiesen werden. In den Organbadversuchen wurde LPS den Gangabschnitten in unterschiedlichen Konzentrationen (1 µg/ml, 2 µg/ml und 5 µg/ml) zugegeben. Insgesamt wurden 26 Nebenhodengangabschnitte untersucht. In Tabelle 4 und Abb. 17 ist die durchschnittliche Kontraktionsfrequenz für die Periode von jeweils 10 Minuten nach Zugabe von LPS dargestellt. Zusätzlich sind Nebenhodengangabschnitte dargestellt, welche keine LPS-Zugabe erhielten. Die Abnahme der durchschnittlichen Kontraktionsfrequenz war bei Nebenhodengangabschnitten mit LPS-Zugabe und bei 6 Nebenhodengangabschnitten ohne LPS-Zugabe ähnlich. Lediglich 2 Kontrollen (keine Zugabe von LPS) zeigten eine spontane gleichbleibende Kontraktionsfrequenz.

Tabelle 4: Nebenhodengangabschnitte ohne LPS-Zugabe und nach Zugabe von LPS (1, 2, 5 µg/ml)

	Anzahl der Versuche (n)	Durchschnittliche Kontraktionsfrequenz (Kontraktionen pro 10 Min.) Start bis 10 Min. Versuchsdauer	Durchschnittliche Kontraktionsfrequenz (Kontraktionen pro 10 Min.) 10 Min. bis 20 Min. Versuchsdauer	Durchschnittliche Kontraktionsfrequenz (Kontraktionen pro 10 Min.) 20 Min. bis 30 Min. Versuchsdauer
ohne LPS	8	28,63 = 100 %	19,75 = 69,79 %	11,87 = 41,85 %
1 µg/ml	11	23,63 = 100 %	16,27 = 68,85 %	10,72 = 45,37 %
2 µg/ml	7	31,14 = 100 %	24,28 = 77,97 %	14,71 = 47,24 %
5 µg/ml	8	24,75 = 100 %	16,13 = 65,17 %	9,5 = 38,38 %

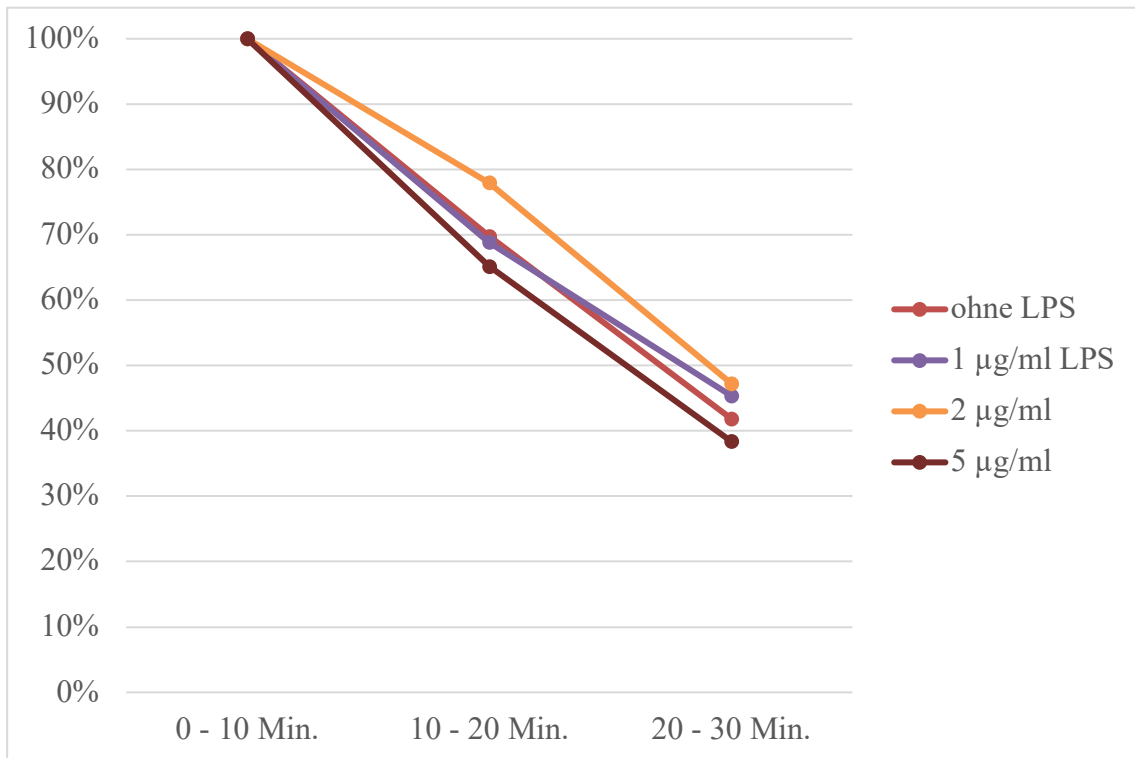


Abb. 17: Graphische Darstellung der Daten aus Tabelle 4.

In Abbildung 18 sind fünf isometrische Kontraktionsmessungen exemplarisch dargestellt (Abb. 18 A-E). Die Messungen Abb. 18 A-C zeigen exemplarisch Frequenzveränderungen der Kontraktionen an Nebenhodengängen aus dem Segment 18 unter Zugabe von unterschiedlichen LPS-Konzentrationen (1 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$ und 5 $\mu\text{g/ml}$). Beobachten lässt sich eine zeitlich verzögerte Abnahme der Kontraktionsfrequenz nach LPS-Zugabe (Abb. 18 A-C). Zusätzlich ist in der Abb. 18 E exemplarisch ein Nebenhodengangabschnitt ohne LPS-Zugabe (Kontrolle) und gleichbleibender spontaner Kontraktionsfrequenz dargestellt.

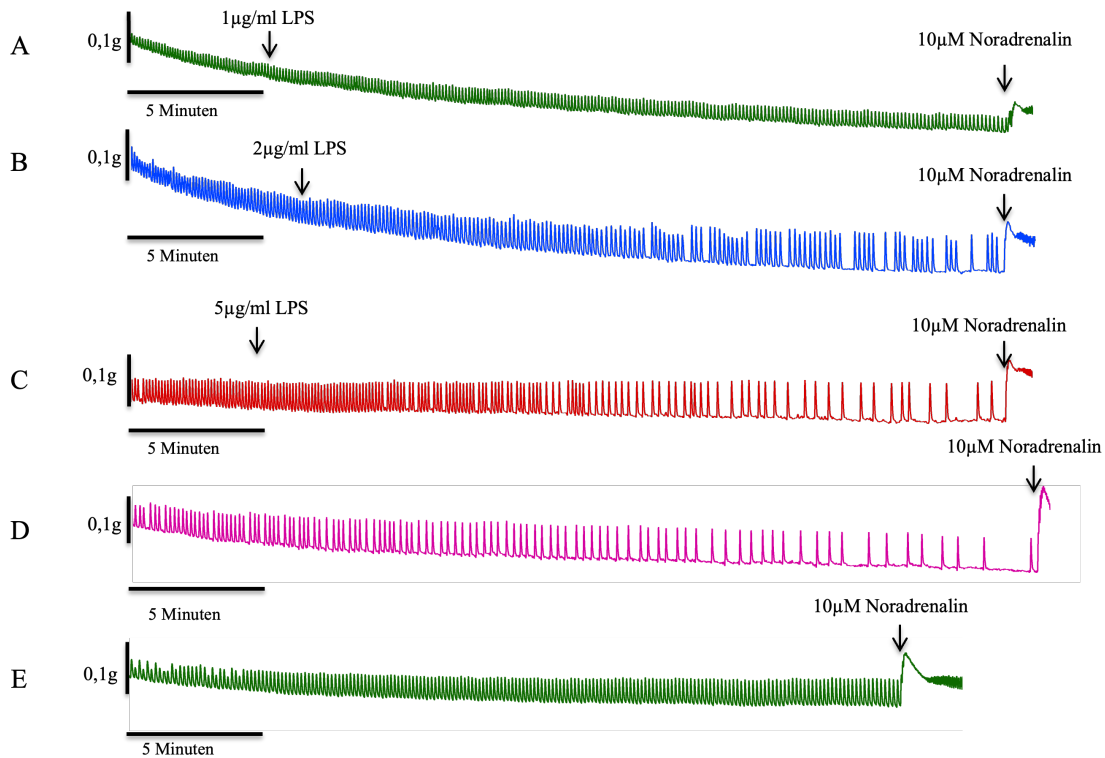


Abb. 18: Kontraktionsmessung mit und ohne Zugabe von LPS

Nach ungefähr 5 Min. wurden den Nebenhodengangabschnitten (Segment 18 / kaudaler Nebenhodengang) unterschiedliche LPS-Konzentrationen zugegeben (A: 1 $\mu\text{g/ml}$, B: 2 $\mu\text{g/ml}$, C: 5 $\mu\text{g/ml}$ Endkonzentration im Bad). Die Zugabe von Noradrenalin (NA) als Vitalitätskontrolle führte bei diesen Versuchen zu einem Anstieg der kontraktiven Aktivität. Zusätzlich wurden Nebenhodengangabschnitte des gleichen Segmentes als Kontrolle ohne LPS-Zugabe mit Kontraktionsveränderung (D), sowie ohne Kontraktionsveränderungen (E) exemplarisch dargestellt.

4.6 Kontraktionsstudien am mit LPS präinkubierten Nebenhodengang (Segment 18) der Ratte

In den vorangegangenen Untersuchungen konnte nicht sicher gezeigt werden, dass LPS die Kontraktionsfrequenz der Nebenhodengangabschnitte reduziert (s. 4.5 + s. Abb. 18). Um den verzögerten LPS-Effekt besser erfassen zu können, erfolgte die Durchführung von Präinkubationsversuchen. Für das Duodenum war bereits beschrieben wurden, dass eine 90-minütige Präinkubation eines Darmabschnittes mit LPS bei anschließend durchgeführten Organbadversuchen zu einer verminderten Spontankontraktion im Vergleich zur Kontrolle führte (Barona et al. 2011). In einem ähnlichen Versuchsaufbau inkubierte ich Nebenhodengangabschnitte aus dem Segment 18 für 90 Min. mit LPS (2 µg/ml) vor Beginn der Organbaduntersuchungen. In der überwiegenden Anzahl der Versuche zeigte sich beim präinkubierten Nebenhodengang eine signifikante komplette Aufhebung der Kontraktionsaktivität (Tabelle 5 und Abb. 20 A). Das Gewebe war jedoch noch vital, denn nach der Zugabe von Noradrenalin als Vitalitätskontrolle wurde eine deutliche kontraktile Aktivität mit einer für Noradrenalin typischen Kontraktionsfrequenz beobachtet. Die Kontrollen wurden im Medium ohne LPS präinkubiert (Abb. 20 B), sie zeigten typische Spontankontraktionen und reagierten mit erhöhter Frequenz auf Noradrenalin.

Tabelle 5: Reaktion von Nebenhodengangsabschnitte auf LPS-Präinkubation

	Anzahl der durchgeführten Versuche	Kontinuierliche spontane Kontraktion nach Präinkubation	Keine kontinuierliche spontane Kontraktion nach Präinkubation
Kontrolle ohne Zugabe von LPS	18	17	1
Zugabe von 2 µg/ml LPS	22	5	17

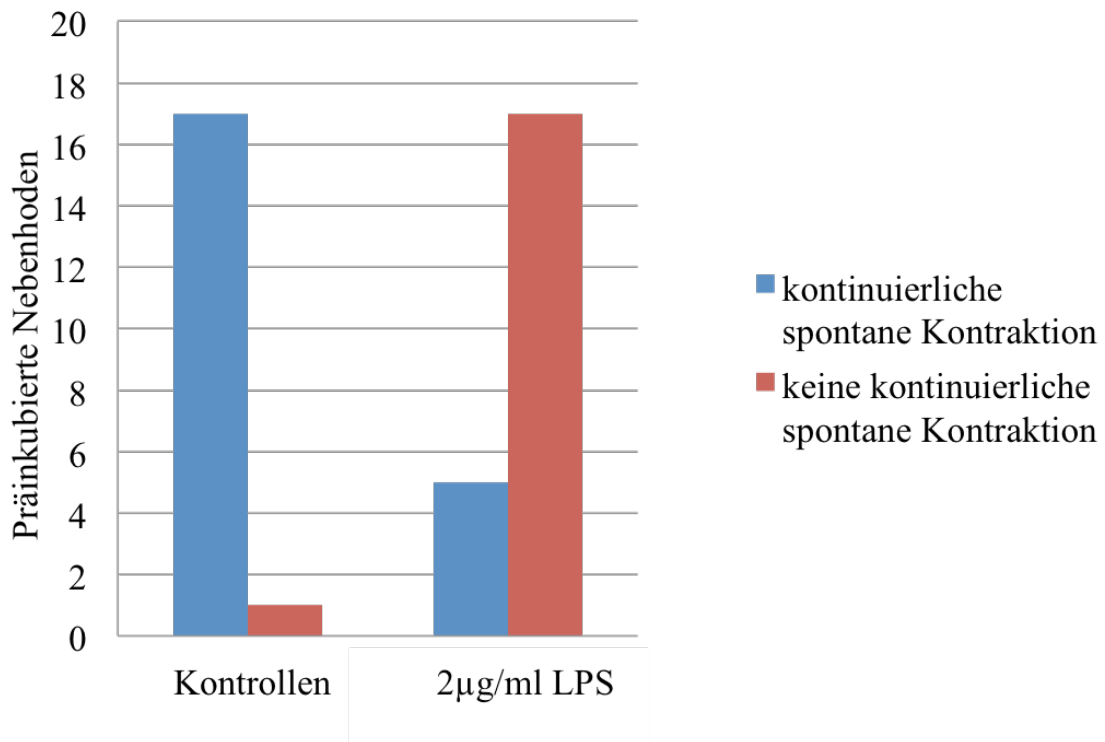


Abb.19: Graphische Darstellung der Daten aus Tabelle 5.

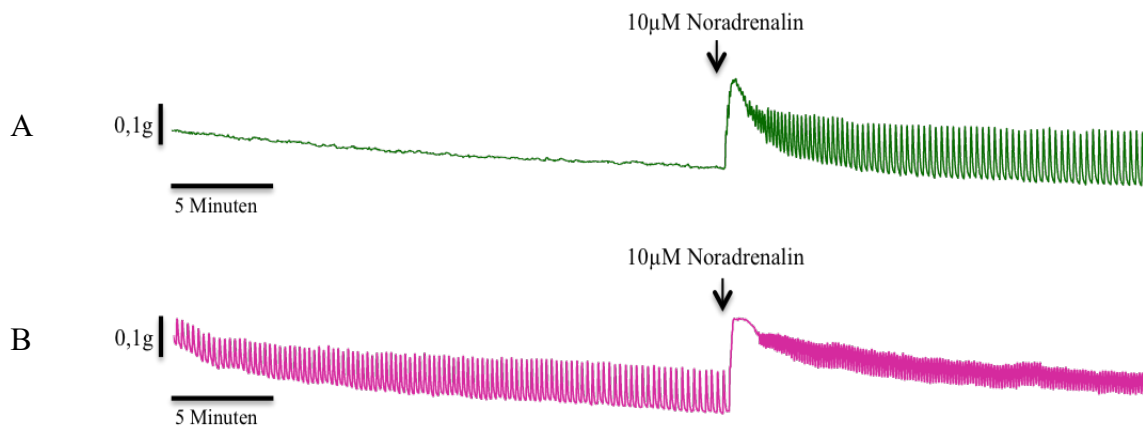


Abb. 20: Relaxierende Effekte auf die spontane Nebenhodengangkontraktion nach Präinkubation mit LPS im Organbad. Exemplarisch sind zwei Kurven dargestellt. A: Der Nebenhoden war vor Durchführung des Organbadexperiments 90 Min. in $2\mu\text{g/ml}$ LPS inkubiert wurden. B: Als Kontrolle dienten die Nebenhoden, welche vor Durchführung des Organbadexperiments 90 Min. in MEM inkubiert wurden. Beide Nebenhodengangschnitte wurden 30 Min. im Hinblick auf das Vorkommen von Spontankontraktionen beobachtet. Als Vitalitätskontrolle erfolgte die Zugabe von Noradrenalin (NA) nach diesem 30 Minuten-Intervall.

Von den 22 mit LPS präinkubierten Nebenhodengangschnitten aus dem Segment 18 zeigte sich in 17 Fällen eine Aufhebung der Spontankontraktion im anschließend durchgeführten Organbadversuch (exemplarisch in Abb. 20 A). Lediglich bei 5 Versuchen waren trotz LPS-Präinkubation noch Spontankontraktionen nachweisbar (exemplarisch in Abb. 20 B). Hingegen zeigten 17 der 18 Kontrollen eine gute Spontankontraktion nach Präinkubation, lediglich 1 Kontrolle zeigte eine verminderte Spontankontraktion.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss chronischer Hypoxie auf die kaudale Nebenhodengangmuskulatur der Maus histologisch analysiert. Hierzu wurden im Rahmen eines Hypoxiemodells Untersuchungen am Nebenhoden von Mäusen, welche unter normoxischen Bedingungen, beziehungsweise unter chronischer Hypoxie für 24 Stunden, drei Tage, einer oder drei Wochen gehalten wurden, durchgeführt. Es zeigten sich unter chronischer Hypoxie keinerlei Veränderungen in der Azanfärbung sowie in der Immunfluoreszenzfärbung mit α -SMA und Calponin. Die Färbungen mit einem Antikörper gegen MYH-11 ergaben, dass eine chronische Hypoxie zwar keine Auswirkung auf die Nebenhodengangmuskulatur hatte, aber es fand sich nach einer 3-wöchigen Hypoxie eine verringerte Expression von MYH-11 in der Gefäßmuskulatur. Interessanterweise zeigte auch die PKG1-Expression bei längerer Hypoxie eine abgeschwächte Immunreaktion sowohl in der Gefäß- als auch in der Nebenhodengangmuskulatur im kaudalen Mausnebenhoden. Diese Immunreaktion war nach 3-wöchiger Hypoxie in der Gefäßmuskulatur völlig aufgehoben.

Zusätzlich zu den Untersuchungen an der Muskulatur wurden ergänzende Färbungen mit einem Antikörper gegen PCNA erstellt, um die Proliferation der Zellen im kaudalen Nebenhoden zu untersuchen. Hierbei zeigte sich im Vergleich zwischen Normoxie und den unterschiedlichen Hypoxiezeiten eine schwächer werdende Proliferation in peritubulären Muskelzellen und Epithelzellen. Dagegen zeigte sich in den Gefäßmuskelzellen keine Proliferation.

Grundsätzlich ist Hypoxie mit Entzündungsprozessen verbunden. Das geschieht über die Transkriptionsfaktoren HIF-1 und NF- κ B, diese vermitteln eine Verbindung hypoxischer Signale mit LPS/TLR4-vermittelten Entzündungsprozessen (Zhang et al. 2019, Kyotani et al. 2019). In diesem Kontext konnte der TLR4-Rezeptor unter normoxischen Bedingungen mittels PCR in allen Nebenhodenabschnitten (Caput, Corpus, Cauda) und auch in allen 19 Segmenten der Ratte nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte in funktionellen Untersuchungen ein inhibierender Einfluss des TLR4-Liganden LPS auf das Kontraktionsmuster des Nebenhodenganges gezeigt werden.

5.1 Auswirkungen von chronischer Hypoxie auf die Gefäß- und Gangmuskelzellen des kaudalen Mause Nebenhodens

Mit der Frage, ob Hypoxie Einfluss auf Gefäß- und Gangmuskelzellen des Nebenhodens hat, wurde in der Übersichtsfärbung kein Hinweis auf offensichtliche strukturelle Veränderungen der Muskulatur, des Epithels oder des interstitiellen Bindegewebes sichtbar. Darüber hinaus wurde die Expression der Muskelmarker α -SMA, Calponin, MYH-11 sowie von PKG1 im Hypoxiemodell untersucht, um phänotypische Veränderungen der glatten Muskelzellen zu überprüfen. In der Literatur sind spezifische und detaillierte Untersuchungen zum Einfluss von Hypoxie auf den Nebenhoden spärlich, jedoch wird von diversen Schäden im Hoden berichtet. Unter anderem zeigte sich, dass es unter hypobarer Hypoxie und dem mit der Hypoxie verbundenem oxidativen Stress zu einem nachteiligen Einfluss auf die Hodenstruktur kommen kann, welche eine Veränderung der Spermienparameter verursachen kann (Poorhassan et al. 2018, Farias 2010). Farias et al. beschrieben außerdem eine signifikante Abnahme der Nebenhodenspermien und eine Abnahme der Blutgefäße im Hoden (Farias et al 2005). Zapeda et al. zeigten, dass in Hodengewebe, welches einer hypobaren Hypoxie ausgesetzt war, oxidativer Stress induziert wurde, welcher eine Abnahme der Hodenmasse, einen Stillstand der Spermatogenese und eine Zunahme der Apoptose verursachte (Zapeda et al. 2012). Bereits 2015 wurde die signifikante Abnahme der Hodenmasse unter Hypoxie bestätigt, zusätzlich wurden nachteilige Auswirkungen auf die Testosteronproduktion beobachtet (He et al. 2015). All diese Berichte zeigen eine gravierende Auswirkung von Hypoxie auf die Struktur und Funktion des Hodengewebes. Ähnliche Mechanismen sind auch im Nebenhoden denkbar.

Eine Hypoxie im Hoden ist verbunden mit einer reduzierten Spermatogenese beziehungsweise eingeschränkter Spermienfunktion. Klinische Beispiele dafür sind die Varikozele (Hu et al. 2015) oder auch die intermittierende Hypoxie im Rahmen eines obstruktiven Schlafapnoesyndroms (Torres 2014). Bislang lag dieser Aspekt nicht im Fokus, aber hypoxie-induzierte Störungen der Nebenhodenfunktion mit Reifungsstörung der Spermien könnte zu einer Infertilität beitragen. Im Vergleich zum Hoden scheint die Kapillardichte im Nebenhoden größer, obwohl der Durchmesser von Tubuli seminiferi und Nebenhodengang nahezu identisch sind (Kormano und Reijonin 1976). Dies könnte ein struktureller Hinweis auf einer relative Minderperfusion und Hypoxie des Hodens im Vergleich zum Nebenhoden sein. Möglicherweise erfordert die vergleichsweise dickere

Muskelschicht des Nebenhodenganges ein dichteres Kapillarnetz, um einen höheren Blutfluss zu gewährleisten, welcher die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sicherstellt. Denkbar ist daher auch, dass eine höhere Kapillardichte im Nebenhoden als Schutz vor Hypoxie fungiert.

Hoden und Nebenhoden sind androgen-abhängige Organe (Brooks 1983). Im Hoden-Nebenhoden-Stromgebiet ist eine höhere Konzentration von Testosteron als im systemischen Kreislauf messbar. Somit sind auch indirekte Effekte auf den Nebenhoden denkbar, welche über einen verminderten Testosteronspiegel vermittelt werden. Eine klinische Relevanz eines durch Hypoxie verminderten Testosteronspiegels zeigte sich bei der obstruktiven Schlafapnoe, wobei noch diskutiert wird, ob der verminderte Testosteronspiegel eine Folge der Hypoxie selbst oder der meist begleitenden Fettleibigkeit ist (Tančić-Gajić et al. 2021; Wittert 2014).

In meinen Untersuchungen zeigte sich, dass bei einer chronischen Hypoxie Veränderungen der Gefäß- und Nebenhodengangmuskulatur zu beobachten sind. Nach längerer Hypoxie trat eine Reduktion von MYH-11 in der Gefäßmuskulatur auf, welches Hinweise auf eine Veränderung der Kontraktilität der glatten Gefäßmuskulatur geben können. Dafür spricht auch der Verlust der PKG1-Expression nach längerer Hypoxie in der Gefäßmuskulatur, welche die Relaxation der Gefäßmuskulatur vermittelt. Zusätzlich zeigte sich auch eine Abnahme der PKG1-Expression in der Nebenhodengangmuskulatur. Dies gibt Hinweise darauf, dass auch in der Nebenhodengangmuskulatur Hypoxie-Effekte über eine veränderte Kontraktilität der Nebenhodengangmuskulatur vermittelt werden können.

5.2 Chronische Hypoxie und Proliferation von Gefäß- und Gangmuskelzellen

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Untersuchungen wurde der Einfluss von Hypoxie auf die Proliferation von Gefäß- und Gangmuskulatur, sowie des Nebenhodengepithels analysiert (s. 4.3.3). Hierzu wurde die PCNA-Expression im Nebenhoden von Mäusen, welche unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen gehalten wurden, verglichen. Die PCNA-Expression in der Gangmuskulatur des kaudalen Nebenhodens zeigte einzelne positive Zellen unter normoxischen Bedingungen, unter Hypoxie wurde keine PCNA-Expression detektiert (s. 4.3.3). In Gefäßmuskelzellen hingegen konnte weder unter Normoxie, noch unter Hypoxie PCNA nachgewiesen werden (s. 4.3.3). Im Gegensatz dazu wurde berichtet, dass eine intermittierende Hypoxie ein erhöhtes Interleukin-6 induzieren kann, welches über die Induktion einer Entzündungsreaktion die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen begünstigt (Kyotani et al. 2019). Dieser Mechanismus wurde auch für extravaskuläre glatte Muskelzellen angenommen (Kyotani et al. 2019). Die Ergebnisse erscheinen hier widersprüchlich. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass Kyotani et al. von der intermittierenden Hypoxie als Korrelat für die obstruktive Schlafapnoe ausgehen, während in der vorliegenden Arbeit eine chronische Hypoxie angewendet wurde. Unter chronischer Hypoxie entfallen potenzielle Regenerationsphasen, welche in der intermittierenden Hypoxie Reparaturvorgänge bzw. Proliferationen von Zellen zulassen würden. Andererseits könnte die fehlende PCNA-Expression im Nebenhoden eine Art Schutzmechanismus vor einer pathologischen Proliferation und deren Folgen sein. Dies kann zum Beispiel im Rahmen von Atherosklerose und hypoxiebedingter pulmonaler Hypertonie beobachtet werden. Eine pathologische Proliferation unter Hypoxiebedingungen konnte unsere Arbeitsgruppe in einer Vorgängerarbeit (Saboor et al. 2016) unter Nutzung desselben Mausmodells in der Lunge sicher nachweisen. Der Peak der Proliferation befand sich dort nach etwa drei Tagen chronischer Hypoxie. Dieser Unterschied könnte durch organspezifische Besonderheiten begründet sein, da pulmonale Zellen im kleinen Blutkreislauf lokalisiert sind und in der Lunge anderen Oxygenierungsverhältnissen ausgesetzt sind. Im Fokus dieser Studie stand der kaudale Nebenhoden, so dass eine Proliferation in den proximalen Abschnitten nicht ausgeschlossen werden kann. Außerdem wäre denkbar, dass in unterschiedlichen Abschnitten auch ein unterschiedliches Ausmaß an Proliferation auftreten könnte. Damit

im Einklang wird diskutiert, dass der Nebenhoden als eine Aneinanderreihung kleiner Organe betrachtet werden kann (Domeniconi et al. 2016). In den 19 bekannten Segmenten des Nebenhodens sind strukturelle und funktionelle Unterschiede sowohl im Epithel als auch auf muskulärer Ebene gut vorstellbar, da der Nebenhoden schon allein zwei verschiedene Hauptfunktionen (Reifung und Speicherung der Spermien) hat. Dies erfordert unterschiedliche strukturelle Voraussetzungen, beispielsweise variiert die Muskelzellschicht je nach Aufgabenbereich des Gangabschnittes, indem die Muskelzellschicht von proximal nach distal dicker wird (Holstein 1969; Baumgartner et al. 1971). Dies ermöglicht eine Spontankontraktion zum Transport der Spermien im proximalen Bereich, während im distalen Nebenhodengang Spermien bis zur Ejakulation gespeichert werden. Somit können die Proliferation und die Reparaturvorgänge in den verschiedenen Regionen unterschiedlich sein.

5.3 Chronische Hypoxie und Proliferation von Epithelzellen

In den für diese Dissertation durchgeführten histologischen Routinefärbungen konnten keine offensichtlichen strukturellen Veränderungen des Epithels nachgewiesen werden (s. 4.1.1). Eine Abnahme der Epithelzellproliferation unter Hypoxie zeigte sich jedoch bereits nach einer 24-stündigen Hypoxie (s. 4.3.3). Dies könnte, ebenso bei den Gefäß- und Gangmuskelzellen, ein Hinweis auf mangelnde Reparaturvorgänge unter Hypoxie mit einer nachfolgenden Funktionseinschränkung des Epithels sein. Darüber hinaus könnte die Abnahme der Proliferation im Epithel auch Auswirkungen auf die Blut-Nebenhoden-Schranke haben, die durch tight junctions im apikalen Bereich der Zellen gebildet wird. Durch Toxine und verschiedene Zytokine, die mit Entzündung assoziiert sind, kann eine Abnahme von tight junctions ausgelöst werden (Siu et al. 2009), so dass diese Schranke für Pathogene durchlässiger werden kann und Infektionen begünstigt werden können. Eine weitere Epithelfunktion neben der Aufrechterhaltung der Blut-Nebenhoden-Schranke ist die Proteinsynthese für die Reifung der Spermatozoen. Während dieses Reifungsprozesses werden proteintragende Membranfragmente über Exosomen an die Spermatozoen übertragen (Neyroud et al. 2021; Sullivan 2005).

Grundsätzlich ist anzunehmen, dass die Hauptfunktionen des Nebenhodens (Reifung und Speicherung der Spermien), die primär verbunden sind mit einem intakten, funktionsfähigen Epithel des Nebenhodenganges, durch Hypoxie gestört werden. In der vorliegenden Studie wurde die Abnahme der PCNA-Expression im Nebenhodenepithel

unter Hypoxie eindeutig nachgewiesen. Lei et al. unterstützen die Ergebnisse dieser Dissertation indem sie eine gleichzeitige Abnahme der PCNA-Expression zeigen, sowie eine Zunahme der Zellapoptose im Hoden (Lei et al. 2020).

5.4 Wechselwirkung zwischen TLR4- und HIF-1 α -Signalweg

Sowohl Hypoxie als auch die Entzündung spielen in einer Vielzahl von pathologischen Situationen eine wichtige Rolle und sind eng miteinander verbunden (Zhou et al. 2014). An entzündeten Stellen nimmt der Sauerstoffgehalt resultierend aus einer unzureichenden Gefäßperfusion ab, dies führt bei umgebenden Zellen zu stärkerem hypoxischen Stress, welcher Entzündungen und Gewebeschäden beschleunigt (Lewis et al. 1999). Die Veränderungen der Signalwege, die an pathologischen Prozessen beteiligt sein können, sind jedoch im Nebenhoden noch wenig untersucht. In dieser Studie wurde bereits der Einfluss von Hypoxie auf den kaudalen Nebenhoden der Maus nachgewiesen. Zur weiteren Untersuchung der Verbindung zwischen Hypoxie und Entzündung erfolgten qualitative Untersuchungen von TLR4-Rezeptor-Transkripten durch RT-PCR-Analysen (s. 4.4.1 + 4.4.2).

Der TLR4-Rezeptor ist der Mustererkennungsrezeptor, welcher LPS als Liganden erkennt. HIF-1 α ist ein Haupttranskriptionsfaktor der Sauerstoffhomöostase (Pugh und Ratcliffe 2003). Unter hypoxischen Bedingungen bindet HIF-1 α an die TLR4-Promotorregion. In der Literatur ist bereits beschrieben, dass die TLR4-Expression in Makrophagen über HIF-1 α als Reaktion auf hypoxischen Stress hochreguliert wird (Kim et al. 2010). Dies deutet darauf hin, dass hypoxischer Stress an Entzündungsherden die Anfälligkeit für nachfolgende Infektionen und Entzündungssignale durch Hochregulierung von TLR4 erhöht (Kim et al. 2010). Aber auch das Zusammenspiel von HIF-1 α und NF- κ B ist bei der Kontrolle der Genexpression ein entscheidender Mechanismus. Dieser kann durch die hypoxische Signalübertragung entzündliche Prozesse beeinflussen (Oliver et al. 2009; Dopeso et al. 2018). Bestätigt wurde dies durch die Studie von Zhang et al., welche eine gemeinsame Expressionssteigerung von TLR4 und HIF-1 α unter Hypoxie beschreiben (Zhang et al. 2016). Ein interessantes klinisches Beispiel ist die obstruktive Schlafapnoe (intermittierende Hypoxie). Eine Erkrankung, welche mit systemischer Entzündung und oxidativen Stress assoziiert ist. Es wurde bereits gezeigt, dass die obstruktive Schlafapnoe die männliche Fertilität und die antioxidative Kapazität im Hoden bei Mäusen reduziert (Torres et al. 2014).

Auswirkungen auf den Nebenhoden sind in ähnlicher Weise zu vermuten. Im Falle der obstruktiven Schlafapnoe ist eine konsequente Therapie nach Diagnosestellung für den Erhalt der Fertilität von Bedeutung (Torres et al. 2014).

5.5 Expression des TLR4-Rezeptors in allen 19 Segmenten des Nebenhodens der Ratte

In der hier vorgelegten Studie konnte der Nachweis von TLR4-Rezeptor-Transkripten durch RT-PCR-Analysen qualitativ in allen drei Abschnitten des Nebenhodens bestätigt, sowie nach unserem Wissenstand erstmalig in allen 19 Segmenten, gezeigt werden (s. 4.4.1 und 4.4.2). Ergebnisse anderer Autoren weisen in eine ähnliche Richtung. Die Expression von TLR1 bis TLR9 sowie TLR11 wurde bereits im Nebenhodenepithel nachgewiesen (Palladino et al. 2008). Der TLR4-Rezeptor konnte unter normalen physiologischen Bedingungen in epididymalen Epithel- und Interstitialzellen, in luminalen Spermatozoen (Palladino et al. 2007, Rodrigues et al. 2008, Palladino et al. 2008) und in Immun- als auch in Nicht-Immunzellen lokalisiert werden (Silva et al. 2013). Grundsätzlich sind 13 TLRs bisher beschrieben, diese können durch das angeborene Immunsystem eine Abwehrreaktion des Wirts auslösen. Die Erkennung von PAMPs erfolgt durch ihre Bindung an Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) wie die TLRs. Diese aktivieren die nachgeschalteten Signalwege, welche Entzündungen und andere Abwehrmechanismen auslösen. Unter den PRRs ist der TLR4 der am häufigsten untersuchte TLR bei Säugetieren (Takeuchi et al. 2010). Der TLR4-Rezeptor ist der Hauptrezeptor für den Liganden LPS. Im Nebenhoden wurde bereits gezeigt, dass nach der Stimulation durch LPS die Transkriptionsaktivität von NF- κ B ansteigt (Palladino et al. 2007, Muhlbauer et al. 2008, Palladino et al. 2008), da LPS die Aktivierung des Promotors in NF κ B und TLR4-abhängiger Weise stimuliert (Vora et al. 2004). Die in dieser Dissertation nachgewiesene TLR4-Expression in den 19 Segmenten des Nebenhodens deuten auf einen relevanten Signalweg hin, welcher in allen Segmenten des Nebenhodens konserviert ist. Auch in Segment 18, dass in dieser Arbeit für funktionelle Untersuchungen verwendet wurde (s. 4.5 und 4.6).

5.6 LPS-Effekte auf die Kontraktionen im distalen Teil des Nebenhodenganges der Ratte

Verschiedene Autoren berichten von einer verringerten Kraftproduktion der glatten Muskulatur von Uterus, Magen und Pfortader während eines veränderten Stoffwechsels, wie zum Beispiel unter Hypoxie (Wray et al 1992, Taggart und Wray 1998, Huang et al. 1993 und Sward et al. 1993). Ein einzelner Faktor (ATP, pH-Wert, Myosinphosphorylierungen, proteolytische Aktivität oder anorganisches Phosphat) konnte nicht für die krafthemmende Rolle als Ursache identifiziert werden, so dass die Kraft höchstwahrscheinlich aufgrund der Kombination verschiedener Faktoren abnimmt (Taggart und Wray 1998).

Die hier vorgelegte Studie ist von einem hypoxischen Einfluss auf die glatte Muskulatur im Nebenhoden ausgegangen, dieser Einfluss konnte in den für diese Dissertation erstellten immunhistochemischen und funktionellen Untersuchungen nachgewiesen werden. In den funktionellen Untersuchungen zu dieser Studie wurde der Effekt von LPS auf das Kontraktionsverhalten der Nebenhodengänge analysiert. Während sich in Gangabschnitten aus Segment 18 im überwiegenden Teil eine hohe Spontanfrequenz zeigte, ließ sich vereinzelt auch eine niedrige Spontanfrequenz beobachten, was für eine gewisse Varianz innerhalb eines Segments spricht. Somit wurde kein sicherer LPS-Effekt sichtbar (s. 4.5). Auffällig waren mehrere minutenlange verzögerte LPS-Effekte an Gangabschnitten mit hoher Spontanfrequenz (s. Abb 18). Diese zeitliche Verzögerung des LPS-Effektes deutet auf mögliche Transkriptions- und Translationsvorgänge und damit einer Wirkung auf den Zellstoffwechsel hin. Frühere Studien von Barona et al. zeigten inhibitorische Effekte von LPS nach 90 Minuten Präinkubation auf Acetylcholin-induzierte Kontraktionen am Duodenum (Barona et al. 2011), daher erfolgten vor diesem Hintergrund Präinkubationsversuche, um die durch LPS induzierten Kontraktionsveränderungen der Gangmuskulatur des Nebenhodens sicher beurteilen zu können. In der überwiegenden Anzahl der Versuche zeigte sich beim LPS-präinkubierten Nebenhodengang eine komplette Aufhebung der Kontraktionsaktivität (s. 4.6 + Tabelle 5 + Abb. 19). Die ursächlichen Faktoren für die wenigen Non-Responder sind bislang nicht ausreichend geklärt. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass LPS nicht in ausreichender Menge den an der Lumenseite des engen Nebenhodenganges lokalisierten TLR4-Rezeptor erreicht. Möglicherweise hat die LPS-Präinkubationszeit es

wahrscheinlicher gemacht hat, dass ausreichend viele LPS-Moleküle den Rezeptor erreichten. Bei den Experimenten in dieser Studie erfolgte die Wirkung von LPS von außen auf den Nebenhodengang, dies entspricht eher einer hämatogenen Infektion über das Interstitium. Eine andere experimentelle Möglichkeit wäre eine LPS-Injektion direkt in den Nebenhodengang, um die oberflächlichen Epithelzellen in denen der TLR4-Rezeptor lokalisiert ist leichter zu erreichen. Funktionelle Untersuchungen im Organbad wären im Anschluss aber schwieriger zu interpretieren gewesen, da Spermien vermutlich die Spontankontraktionen beeinflussen (Mewe et al. 2006b). Ein deutlicher Unterschied zu physikalischen Verhältnissen wäre anzunehmen. Dies zeigte sich bereits, wenn der Nebenhodengang bei der Präparation verletzt wurde und Spermien austraten. Diese verletzten Nebenhodengänge zeigten bereits eingeschränkte Kontraktionen und wurden daher in der vorliegenden Arbeit nicht eingeschlossen. Es gibt in der Literatur eine größere Zahl von *E.coli*-Injektionsversuchen, die als experimentelles Modell der Nebenhodenentzündung dienen (Vieler et al. 1993). Diese erlauben auch indirekte Aussagen über einen LPS-Effekt. Hierbei wurde die lokale Expression der Zytokine bei einer bakteriellen Epididymitis untersucht (Tanaka et al. 1995) und gezeigt, dass eine akute Nebenhodenentzündung zu einem Anstieg des oxidativen Stresses im benachbarten Hoden führt (Kaya et al. 2006). Bei diesen Injektionsversuchen wurden Hoden bzw. Nebenhoden nach mehreren Stunden (Vieler et al. 1993; Tanaka et al. 1995; Kaya et al. 2006), mehreren Tagen (Kuzan et al. 1989; Bhushan et al. 2008; Turner et al. 2011) oder sogar erst nach Monaten untersucht (Lucchetta et al. 1983; Hackett et al. 1988; Pilatz et al. 2015).

Elfgren et al. fassen zusammen, dass unterschiedliche Mechanismen der Stimulation und Inhibition von spontanen Kontraktionen im Nebenhoden diskutiert werden (Elfgren et al. 2018). Ob ein direkter Einfluss von *E.coli* auf die Nebenhodenkontraktion besteht, war derzeit aber noch unklar (Elfgren et al. 2018). Die vorliegende Dissertation kann eine reduzierte Frequenz der Spontankontraktionen des Nebenhodens nach Zugabe von LPS (welcher ein Bestandteil der Membran von gram-negativen Bakterien ist) nachweisen. Der Vergleich zwischen direkter, schneller LPS-Wirkung und der LPS-Wirkung durch Präinkubation spricht dafür, dass es sich beim LPS-Einfluss eher um einen langsamen, indirekten Einfluss handelt.

6 Zusammenfassung

Hypoxie und Entzündungen spielen bei einer Vielzahl von pathologischen Situationen eine wichtige Rolle und sind eng miteinander verbunden. In dieser Dissertation wurde der Einfluss von chronischer Hypoxie auf den kaudalen Mause Nebenhoden histologisch analysiert sowie LPS-Effekte auf die Kontraktilität der Muskulatur des Ratten Nebenhodenganges untersucht.

Im Nebenhoden der Maus konnten im Rahmen eines dreiwöchigen Hypoxie-Modells zunächst keine offensichtlichen strukturellen Veränderungen in den Übersichtsfärbungen gezeigt werden. Die Expression der Muskelmarker SMA und Calponin in Gefäß- und Nebenhodengangmuskulatur blieb gleichfalls unverändert. Als Hinweis auf hypoxie-induzierte Veränderungen nahm die Expression von MYH-11 als Marker für kontraktile glatte Muskelzellen lediglich in der Gefäßmuskulatur ab. Dagegen zeigt sich nach längerer Hypoxie sowohl in der Gefäß- als auch in der Nebenhodengangmuskulatur ein Verlust der PKG1-Expression, welche die Relaxation glatter Muskelzellen vermittelt. Ergänzende Färbungen mit einem Antikörper gegen PCNA zeigten in Gefäßmuskelzellen keine Proliferation und in peritubulären Muskelzellen sowie im Epithel eine deutliche Abnahme der Proliferation als Ausdruck mangelnder Regeneration. Das Fehlen von Reparaturvorgängen kann Funktionsstörungen begünstigen, welche mutmaßlich auch entzündliche Prozesse einleiten. Als Basis für funktionelle Untersuchungen wurde mit dem Entzündungsmediator LPS dessen Rezeptor TLR4 untersucht. Die Expression von TLR4-Transkripten konnte durch RT-PCR-Analysen qualitativ in allen drei Abschnitten und nach unserem Wissensstand erstmalig auch in allen 19 Segmenten des Ratten Nebenhodens nachgewiesen werden. Funktionelle Untersuchungen am kaudalen Ratten Nebenhoden zur Einschätzung bakterieller Effekte auf die Spontankontraktionen der Nebenhodengangmuskulatur zeigten zunächst keine unmittelbare Reaktion auf LPS. Erst eine verlängerte Einwirkzeit von LPS führte zu einem Ausbleiben der spontanen Gangkontraktion, möglicherweise wird so der epithelial lokalisierte TLR4-Rezeptor durch Diffusion besser erreicht. Weitere Erklärungen für eine verzögerte Wirkung wären durch LPS induzierte Veränderungen in der Transkription und Translation.

Insgesamt sprechen die Ergebnisse dafür, dass die Funktionen der Gefäß- und Gangmuskulatur im distalen Nebenhoden durch Hypoxie und Entzündungsprozesse beeinträchtigt werden.

7 Summary

Hypoxia and inflammation play an important role in a variety of pathological situations and are closely linked. In this dissertation, the influence of chronic hypoxia on the caudal mouse epididymis was analysed by histology and LPS effects on the contractility of the rat epididymal duct were investigated.

In the mouse epididymis, a model of hypoxia for three weeks did not reveal any obvious structural changes in the routine stainings. The expression of the muscle markers SMA and calponin in vascular and epididymal duct smooth muscle also remained unchanged. As an indication of hypoxia-induced changes, the expression of MYH-11, a marker for smooth muscle cells of contractile phenotype decreased only in vascular smooth muscle cells. In contrast, after prolonged hypoxia, both vascular and epididymal duct smooth muscle cells show a loss of PKG1 expression which mediates smooth muscle cell relaxation. Additional staining with an antibody against PCNA showed no proliferation in vascular smooth muscle, but a marked decrease in proliferation in peritubular smooth muscle and the epithelium as an expression of lack of regeneration. The lack of repair processes can promote functional disorders, which presumably also initiate inflammatory processes.

As a basis for functional investigations using the inflammatory mediator LPS, its receptor TLR4 was investigated. The expression of TLR4 transcripts could be qualitatively detected by RT-PCR analyses in all three sections and, to our knowledge, for the first time also in all 19 segments of the rat epididymis. Functional studies on the caudal rat epididymis to assess bacterial effects on spontaneous contractions of the epididymal duct muscles initially showed no immediate response to LPS. Only a prolonged exposure to LPS led to the abolishment of spontaneous ductal contractions; possibly the TLR4 receptor in the epithelium is reached by diffusion of LPS with a delay. Further explanations for this delayed effect could be LPS-induced changes in transcription and translation. Overall, the results suggest that function of the vascular and ductal smooth muscle in the distal epididymis are impaired by hypoxia and inflammatory processes.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CD14	<i>cluster of differentiation 14 (engl.)</i>
cDNA	Komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cy3	Cyanin-Farbstoff 3
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DAMPs	<i>damage-associated molecular patterns (engl.)</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dest.	<i>destillata (lat.)</i>
DNA	Desoxiribonukleinsäure
DNase I	Desoxyribonuklease I (Enzym)
dNTPs	Desoxiribonukleosidtriphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli (Bakterium)</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
g	Gramm
H ⁺ -Ionen	positiv geladene Wasserstoffionen
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxidase

Abkürzungsverzeichnis

HCl	Salzsäure
HIF	Hypoxie-induzierender-Faktor
HIF-1	Hypoxie-induzierender-Faktor-1
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter-Faktor-1-alpha
Hz	Hertz
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
IFN- β	Interferon beta
IgG	Immunglobulin G
IKK	<i>Inhibitor of NFκB-Kinase (engl.)</i>
IL-1	Interleukin-1
IL-1-Rezeptor	Interleukin-1-Rezeptor
IL-6	Interleukin-6
IRF	<i>induced interferon regulatory factor (engl.)</i>
LBP	LPS-Bindungs-Protein
LPS	Lipopolysaccharid
LRRs	<i>leucin-rich repeats (engl.)</i>
Lsg.	Lösung
Lu	Lunge
m	Meter
M	Molar Masse
mA	Milliamper
MAL	<i>myloid differentiation primary response gene adapter-like (engl.)</i>
MD2	myeloider Differenzierungsfaktor 2
MEM	Minimal Essential Medium
Min.	Minuten

Abkürzungsverzeichnis

mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mMol	Millimol
mRNA	<i>messenger RNA (engl.)</i>
MuLV	Moloney-Maus-Leukämie-Virus
MyD88	<i>myloid differentiation primary response gene (engl.)</i>
MYH-11	Myosin-Heavy-chain-11 (Antikörper)
N	Normale Lösung
nM	Nanometer
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid (NaOH)
Nm	Nanometer
NaN ₃	Natriumazid
NF-κB	Nuklearer Faktor κB
O ₂	Sauerstoff
PAMPs	Pathogen-assoziierten molekularen Mustern
PAP	Peroxidase Anti Peroxidase
PB	Phosphatpuffer
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	<i>Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (engl.)</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	Säuregrad

Abkürzungsverzeichnis

PHDs	Prolyl-Hydroxylase-Domäne-Proteine
PKG1	Proteinkinase 1
pMol	Pikomol
PRRs	Mustererkennungsrezeptoren
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	<i>revolutions per minute (engl.)</i>
RPS 18	ribosomales Protein 18
s.	siehe
S	Segment
Sec.	Sekunden
Std.	Stunden
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TIR	intrazellulären Toll/Interleukin-1-Rezeptor
TLR	Toll-like-Rezeptor
TLR4	Toll-like-Rezeptor-4
TLRs	Toll-like-Rezeptoren
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule (engl.)</i>
TRIF	<i>TIR- domain-containing adaptor inducing IFN-β (engl.)</i>
USA	<i>United States of America (engl.)</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
vs	versus
w	Woche
α -SMA	<i>α-smooth muscle-actin (engl.)</i>
μ g	Mikrogramm

Abkürzungsverzeichnis

μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
z.B.	zum Beispiel

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Hoden mit Nebenhoden.....	2
Abb. 2	Schematische Darstellung des Nebenhodens der Maus und der Ratte.....	3
Abb. 3	In Paraffin eingebetteter Nebenhodenkopf, angefärbt mit Azan.....	5
Abb. 4	In Paraffin eingebetteter Nebenhodenkörper, angefärbt mit Azan.....	6
Abb. 5	In Paraffin eingebetteter Nebenhodenkörper, angefärbt mit Azan.....	8
Abb. 6	TLR4-Rezeptor.....	14
Abb. 7	Lipopolysaccharid.....	16
Abb. 8	Organbad.....	41
Abb. 9	Nebenhoden der Ratte.....	42
Abb. 10	Lichtmikroskopische Aufnahmen (Azanfärbung nach Heidenhain) der Cauda von Mausnebenhoden in einem Hypoxiemodell.....	45
Abb. 11	Übersicht von Immunfluoreszenzfärbungen der Cauda von Mausnebenhoden in einem Hypoxiemodell	47
Abb. 12	Immunhistochemische Färbungen mit einem Antikörper gegen MYH-11 in der Cauda von Mausnebenhoden in einem Hypoxiemodell.....	49
Abb. 13	Immunhistochemische Färbungen mit einem Antikörper gegen PKG 1 in der Cauda von Mausnebenhoden in einem Hypoxiemodell.....	51
Abb. 14	Immunhistochemische Färbungen mit einem Antikörper gegen PCNA in der Cauda von Mausnebenhoden in einem Hypoxiemodell.....	53-54
Abb. 15	Expression von TLR4 im Nebenhoden der Ratte.....	56
Abb. 16	Expression von TLR4 in den einzelnen Segmenten (1-19) vom Nebenhoden der Ratte.....	57+58
Abb. 17	Graphische Darstellung der Daten aus Tabelle 4.....	60
Abb. 18	Kontraktionsmessungen mit und ohne Zugabe von LPS.....	61
Abb. 19	Graphische Darstellung der Daten aus Tabelle 5.....	63
Abb. 20	Relaxierende Effekte auf die spontane Nebenhodengangkontraktion nach Präinkubation mit LPS im Organbad.....	64

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Pipettierschema zur cDNA-Synthese der isolierten RNA aus Geweben.....	35
Tab. 2	Rattenspezifische Sequenzen intronspannender Oligonukleotide.....	36
Tab. 3	Pipettierschema für PCR-Reaktionen von mRNA ganzer Gewebeprobe.....	37
Tab. 4	Nebenhodengangabschnitte nach Zugabe von LPS (1, 2, 5 µg/ml).....	60
Tab. 5	Reaktion von Nebenhodengangabschnitte auf LPS-Präinkubation.....	63

10 Literaturverzeichnis

- Adamali HI, Hermo L 1996 Apical and narrow cells are distinct cell types differing in their structure, distribution, and functions in the adult rat epididymis. *J Androl.* 17 (3) 208–222
- Akira S, Takeda K 2004 Toll-like receptor signalling. *Nature reviews immunology* 4 499–511
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O 2006 Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 124 (4) 783–801
- Anderhuber F, Filler TJ, Pera F, Peuker ET 2012 Innere Organe in Thorax, Abdomen und Becken. In: Anderhuber F, Pera F, Streicher J (Hg.): *Anatomie des Menschen*, Walter de Gruyter, 19. vollständige überarbeitet und aktualisierte Auflage, 692–696
- Baldrige JR, McGowan P, Evans JT, Cluff C, Mossman S, Johnson D, Persing D 2004 Taking a Toll on human disease. Toll-like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents. *Expert Opin Biol. Ther.* 4 (7) 1129–1138
- Barona I, Fagundes DS, Gonzalo S, Grasa L, Arruebo MP, Plaza MÁ, Murillo MD 2011 Role of TLR4 and MAPK in the local effect of LPS on intestinal contractility. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 63 (5) 657–662
- Barton GM, Kagan JC 2009 A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat Rev Immunol.* 9 (8) 535–542
- Baumgarten HG, Holstein AF, Rosengren E 1971 Arrangement, ultrastructure, and adrenergic innervation of smooth musculature of the ductuli efferentes, ductus epididymidis and ductus deferens of man. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 120 37–79
- Bedford JM 1975 Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis. *Handbook of Physiology* 303–307
- Bhushan S, Tchatalbachev S, Klug J, Fijak M, Pineau C, Chakraborty T, Meinhardt A 2008 Uropathogenic *Escherichia coli* block MyD88-dependent and activate MyD88-independent signaling pathways in rat testicular cells. *J Immunol.* 180 5537–5547
- Blomqvist SR, Vidarsson H, Söder O, Enerbäck S 2006 Epididymal expression of the forkhead transcription factor Foxi1 is required for male fertility. *The EMBO journal* 25 4131–4141
- Breton S, Smith PJS, Lui B, Brown D 1996 Acidification of the male reproductive tract by a proton pumping (H⁺)-ATPase. *Nature Medicine* 2 470–472
- Brikos C, O'Neill LAJ 2008 Signalling of toll-like receptors. *Handb Exp Pharmacol.* 183 21–50
- Britan A, Maffre V, Tone S, Drevet JR 2006 Quantitative and spatial differences in the expression of tryptophan-metabolizing enzymes in mouse epididymis. *Cell Tissue Res* 324 301–310
- Brooks DE 1983 Epididymal Functions and their Hormonal Regulation. *Aust. J. Biol. Sci.* 36 205–221
- Carter D, Fox CB, Day TA, Guderian JA, Liang H, Rolf T, Vergara J, Sagawa ZK, Ireton G, Orr MT, Desbien A, Duthie MS, Coler RN, Reed SG 2016 A structure-function

- approach to optimizing TLR4 ligands for human vaccines. *Clin Transl Immunology*. 5 (11) e108
- Clulow J, Jones RC, Hansen LA 1994 Micropuncture and cannulation studies of fluid composition and transport in the ductuli efferentes testis of the rat: comparisons with the homologous metanephric proximal tubule. *Experimental physiology* 79 915–928
- Da Silva N, Pisitkun T, Belleannée C, Miller LR, Nelson R, Knepper MA, Brown D, Breton S 2010 Proteomic analysis of V-ATPase-rich cells harvested from the kidney and epididymis by fluorescence-activated cell sorting. *Am J Physiol. Cell Physiol.* 298 (6) C1326-C1342
- Da Silva N, Cortez-Retamozo V, Reinecker HC, Wildgruber M, Hill E, Brown D, Swirsk FK, Pittet MJ, Breton S 2011 A dense network of dendritic cells populates the murine epididymis. *Reproduction* 141 (5) 653–663
- De Krester DM, Huidobro C, Southwick GJ, Temple-Smith PD 1998 The role of the epididymis in human infertility. *J Report Fertil Suppl* 53 271-275
- Devraj G, Beerlage C, Brüne B, Kempf VAJ 2017 Hypoxia and HIF-1 activation in bacterial infections. *Microbes and Infection* 19 (3) 144–156
- Dinarello CA 1996 Thermoregulation and the pathogenesis of fever. *Infectious Disease Clinics* 10 (2) 433-449
- Dopeso H, Jiao HK, Cuesta AM, Henze AT, Jurida L, Kracht M, Acker-Palmer A, Garvalov BK, Acker T 2018 PHD3 controls lung cancer metastasis and resistance to EGFR inhibitors through TGF α . *Cancer Res.* 78 (7) 1805-1819
- Domeniconi RF, Souza ACF, Xu B, Washington AM, Hinton BT 2016 Is the epididymis a series of organs placed side by side? *Biology of Reproduction* 95 10
- Elfgén V, Mietens A, Mewe M, Hau T, Mittendorff R 2018 Contractility of the epididymal duct: function, regulation and potential drug effects. *Reproduction* 156 (4) R125-R141
- Eltzschig HK, Carmeliet P 2011 Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med.* 364 (7) 656-665
- Farias JG, Bustos-Obregón E, Orellana R, Bucarey JL, Quiroz E, Reyes JG 2005 Effects of chronic hypobaric hypoxia on testis histology and round spermatid oxidative metabolism. *Andrologia* 37 (1) 47–52
- Farias JG, Puebla M, Acevedo A, Tapia PJ, Gutierrez E, Zepeda A, Calaf G, Juantok C, Reyes JG 2010 Oxidative stress in rat testis and epididymis under intermittent hypobaric hypoxia: protective role of ascorbate supplementation. *J Androl.* 31 (3) 314–321
- Gay NJ, Gangloff M 2008 Structure of toll-like receptors. *Handbook of experimental pharmacology* (183) 181–200
- Gioannini TL, Teghanemt A, Zhang DS, Levis EN, Weiss JP 2005 Monomeric endotoxin: protein complexes are essential for TLR4-dependent cell activation. *Journal of Endotoxin Research* 11 (2) 117–123
- Hackett RA, Huang TW, Berger RE 1988 Experimental *Escherichia coli* epididymitis in rabbits. *Urology* 32 236–240
- He J, Cui J, Wang R, Gao L, Gao X, Yang L, Zhang Q, Cao J, Yu W 2015 Exposure to Hypoxia at High Altitude (5380 m) for 1 Year Induces Reversible Effects on Semen

- Quality and Serum Reproductive Hormone Levels in Young Male Adults. *High Alt Med Biol.* 16 (3) 216–222
- Hedinger CE, Dhom G 1991 Entzündung von Hoden, Nebenhoden, Samenstrang und Hodenhülle. In: Doerr W, Seifert G. *Pathologie des männlichen Genitale*. Springer, Band 21, 130-156
- Helft J, Ginhoux F, Bogunovic M, Merad M 2010 Origin and functional heterogeneity of non-lymphoid tissue dendritic cells in mice. *Immunological reviews* 234 (1) 55–75
- Hermo L, Adamali HI, Andonian S 2000 Immunolocalization of CA II and H⁺V-ATPase in Epithelial Cells of the Mouse and Rat Epididymis. *Journal of Andrology* 21 (3) 376–391
- Hib J, Ponzio RO 1977 Effects of cyproterone acetate on spontaneous contractility of the rat epididymis. *Andrologia.* 9 (4) 329-331
- Hinton BT, Galdamez MM, Sutherland A, Bomgardner D, Xu B, Abdel-Fattah R, Yang L 2011 How do you get six meters of epididymis inside a human scrotum? *Journal of Andrology* 32 558–564
- Holstein AF 1969 Morphologische Studien am Nebenhoden des Menschen. In: Bargmann W, Doerr W (Hg.): *Zwanglose Abhandlung aus dem Gebiet der normalen und pathologischen Anatomie*, Georg Thieme Verlag, Heft 20, 1-91
- Holstein AF 2008 Männliche Geschlechtsorgane. In: Benninghoff A, Drenckhahn D (Hg.): *Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. Urban und Fischer in Elsevier, Band 1, 17. Auflage, 799-837
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S 1999 Toll-like-Receptor 4 (TLR4)-Deficient Mice Are Hyporesponsive to Lipopolysaccharide: Evidence für TLR4 as the *LPS* Gene Product. *J Immunol.* 162 (7) 3749-3752
- Hu W, Zhou PH, Zhang XB, Xu CG, Wang W 2015 Roles of adre- nomedullin and hypoxia-inducible factor 1 alpha in patients with varicocele. *Andrologia* 47 951-957
- Huang S-M, Chowdhury JU, Kobayashi K, Tomita T 1993 Inhibitory effects of cyanide on mechanical and electrical activities in the circular muscle of gastric antrum of guinea-pig stomach. *Japanese Journal of Physiology* 43 229-238
- Ignacio BJ, Albin TJ, Esser-Kahn AP, Verdoes M 2018 Toll-like Receptor Agonist Conjugation; A Chemical Perspective. *Bioconjugate Chem.* 29 (3) 587–603
- Ikeda M, Kodama H, Fukuda J, Shimizu Y, Murata M, Kumagai J, Tanaka T 1999 Role of Radical Oxygen Species in Rat Testicular Germ Cell Apoptosis Induced by Heat Stress. *Biology of Reproduction* 61 393-399
- Itoh M, Terayama H, Naito M, Ogawa Y, Tainosho S 2005 Tissue microcircumstances for leukocytic infiltration into the testis and epididymis in mice. *J Reprod Immunol* 67 57-67
- Iwasaki A, Medzhitov R 2004 Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 5 (10) 987–995
- Jelinsky SA, Turner TT, Bang HJ, Finger JN, Solarz MK, Wilson E, Brown EL, Kopf GS, Johnston DS 2007 The rat epididymal transcriptome: comparison of segmental gene expression in the rat and mouse epididymides. *Biology of Reproduction* 76 (4) 561–570

- Jodl SJ, Kohl PK 2003 Infektionen des Genitaltraktes und sexuell übertragbaren Krankheiten. Akute infektiöse Epididymitis. In: Suttorp N, Mielke M, Kiehl W, Stück (Hg.): Infektionskrankheiten verstehen, erkennen, behandeln, Georg Thieme Verlag, 1. Auflage, 307-327
- Jones RC, Clulow J. 1987 Regulation of the elemental composition of the epididymal fluids in the tammar, *Macropus eugenii*. *Journal of reproduction and fertility* 81 583–590
- Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL 2007 Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nature Medicine* 13 552–559
- Karin M, Ben-Neriah Y 2000 Phosphorylation Meets Ubiquitination: The Control of NF- κ B Activity. *Annu. Rev. Immunol.* 18 621–663
- Kaya M, Boleken ME, Zeyrek F, Ozardali I, Kanmaz T, Erel O, Yucesan S 2006 Oxidative and antioxidative status in the testes of rats with acute epididymitis. *Urol Int.* 76 (4) 353–358
- Kierszenbaum AL, Tres LL 2016 *Histology and cell Biology: An Introduction to Pathology*. Philadelphia, PA Elsevier
- Kim SY, Choi YJ, Joung SM, Lee BH, Jung Y, Lee JY 2010 Hypoxic stress up-regulates the expression of Toll-like receptor 4 in macrophages via hypoxia-inducible factor. *Immunology.* 129 (4) 516-524
- Kobe B, Kajava AV 2001 The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Current Opinion in Structural Biology* 11 (6) 725–732
- Kormano M, Reijonen K 1976 Microvascular structure of the human epididymis. *Am Journal of Anatomie* 145 (1) 23-27
- Kuzan FB, Patton DL, Allen SM, Kuo CC 1989 A proposed mouse model for acute epididymitis provoked by genital serovar E, *Chlamydia trachomatis*. *Biol Reprod.* 40 165–172
- Kuzmich NN, Sivak KV, Chubarev VN, Porozov YB, Savateeva-Lyubimova TN, Peri F 2017 TLR4 Signaling Pathway Modulators as Potential Therapeutics in Inflammation and Sepsis. *Vaccines* 5 (4) 34
- Kyotani Y, Takasawa S, Yoshizumi M 2019 Proliferative Pathways of Vascular Smooth Muscle Cells in Response to Intermittent Hypoxia. *International Journal of Molecular Sciences* 20 (11) 2706
- Lanz T v., Neuhäuser G 1964 Morphometric analysis of the human Epididymis. *Z Anat. Entwicklungsgesch.* (124) 126-152
- Lei X, Huo P, Wang Y, Xie Y, Shi Q, Tu H, Yao J, Mo Z, Zhang S 2020 Lycium barbarum Polysaccharides Improve Testicular Spermatogenic Function in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Front Endocrinol (Lausanne).* 11 164
- Lewis JS, Lee JA, Underwood JC, Harris AL, Lewis CE 1999 Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. *J Leukoc Biol.* 66 (6) 889-900
- Li X, Jiang S, Tapping RI 2010 Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. *Cytokine* 49 (1) 1–9
- Lucchetta R, Clavert A, Meyer JM, Bollack C 1983 Acute experimental *E. coli* epididymitis in the rat and its consequences on spermatogenesis. *Urol Res.* 11 117–120

- Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC 2010 Hypoxia-Inducible Factors and the Response to Hypoxic Stress. *Molecular Cell* 40(2) 294-309
- Marshak-Rothstein A 2006 Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nature reviews. Immunology* 6 823–835
- Mayeux PR 1997 Pathobiology of lipopolysaccharide. *J Toxicol Environ Health.* 15 (5) 415-435
- Mersdorf A, Kramer W, Jonas D 2001 Anatomie und Physiologie. In: Hautmann R, Huland H. (Hg.): *Urologie*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2. Auflage, 13-26
- Mewe M, Bauer CK, Müller D, Middendorff R 2006a Regulation of Spontaneous Contractile Activity in the Bovine Epididymal Duct by Cyclic Guanosine 5'-Monophosphate-Dependent Pathways. *Endocrinology* 147 (4) 2051–2062
- Mewe M, Bauer CK, Schwarz JR, Middendorff R 2006b Mechanisms regulating spontaneous contractions in the bovine epididymal duct. *Biol Reprod.* 75 (4) 651–659
- Mietens A, Tasch S, Feuerstacke C, Eichner G, Volkmann J, Schermuly RT, Grimminger F, Müller D, Middendorff R 2012 Phosphodiesterase 5 (PDE5) inhibition, ANP and NO rapidly reduce epididymal duct contractions, but long-term PDE5 inhibition in vivo does not. *Molecular and Cellular Endocrinology* 349 (2) 145–153
- Muhlbauer M, Cheely AW, Yenugu S, Jobin C 2008 Regulation and functional impact of lipopolysaccharide induced Nod2 gene expression in the murine epididymal epithelial cell line PC1. *Immunology* 124 (2) 256–264
- Neyroud AS, Chiechio R, Yefimova M, Lo Faro MJ, Dejucq-Rainsford N, Jaillard S, Even-Hernandez P, Marchi V, Ravel C 2021 Extra-cellular vesicles of the male genital tract: new actors in male fertility? *Basic Clin Androl.* 31 25
- Niizeki T, Takeishi Y, Watanabe T, Nitobe J, Miyashita T, Miyamoto T, Kitahara T, Suzuki S, Sasaki T, Bilim O, Ishino M, Kubota I 2008 Relation of serum heat shock protein 60 level to severity and prognosis in chronic heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 102 (5) 606-610
- Oliver KM, Taylor CT, Cummins EP 2009 Hypoxia. Regulation of NFκB signalling during inflammation: the role of hydroxylases. *Arthritis Res Ther.* 11 (1) 215
- O'Neill LA, Bowie AG 2007 The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 7 (5) 353-364
- Palladino MA, Johnson TA, Gupta R, Chapman JL, Ojha P 2007 Members of the Toll-like receptor family of innate immunity pattern-recognition receptors are abundant in the male rat reproductive tract. *Biol Reprod.* 76 (6) 958–964
- Palladino MA, Savarese MA, Chapman JL, Dughi MK, Plaska D 2008 Localization of Toll-like receptors on epididymal epithelial cells and spermatozoa. *Am J Reprod Immunol.* 60 541–555
- Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO 2009 The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 458 (7242) 1191–1195
- Park BS, Lee JO 2013 Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Experimental & Molecular Medicine* 45 e66

- Pilatz A, Ceylan I, Schuppe HC, Ludwig M, Fijak M, Chakraborty T, Weidner W, Bergmann M, Wagenlehner F 2015 Experimental Escherichia coli epididymitis in rats: assessment of testicular involvement in a long-term follow-up. *Andrologia* 47 160–167
- Pilatz A, Boecker M, Schuppe HC, Diemer Th, Wagenlehner F 2016 Infektionen und Infertilität. *Der Urologe* 55 883–889
- Plóciennikowska A, Hromada-Judycka A, Borzęcka K, Kwiatkowska K 2015 Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences* 72 557–581
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B 1998 Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. *Science* 282 (5396) 2085–2088
- Poorhassan M, Navae F, Mahakizadeh S, Bazrafkan M, Nikmehr B, Abolhassani F, Ijaz S, Yamini N, Dashti N, Mehrannia K, Hassanzadeh G, Akbari M 2018 Flaxseed Can Reduce Hypoxia-Induced Damages in Rat Testes. *Int J Fertil Steril.* 12 (3) 235–241
- Pugh CW, Ratcliffe PJ 2003 Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nature Medicine* 9 677-684
- Rebollar E, Arruebo MP, Plaza MA, Murillo MD 2002 Effect of lipopolysaccharide on rabbit small intestine muscle contractility in vitro: role of prostaglandins. *Neurogastroenterology & Motility* 14 (6) 633–642
- Rietschel ET, Brade H, Holst O, Brade L, Müller-Loennies S, Mamat U, zähringer U, Beckmann F, Seydel U, Brandenburg K, Ulmer AJ, Mattern T, Heine H, Schletter J, Loppnow H, Schönbeck U, Flad HD, Hauschildt S, Schade UF, Padova FDi, Kusumoto S, Schumann RR 1996 Bacterial Endotoxin: Chemical Constitution, Biological Recognition, Host Response, and Immunological Detoxification. *Curr Top Microbiol. Immunol.* (216) 93-81
- Robaire B, Hermo L 1988 Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: struktur, function, and their regulation. In: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, New York: Raven Press 1988 999-1080
- Robaire B, Hinton BT 2015 The Epididymis. In: Plant TM, Zeleznik AJ (Hg.): Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Elsevier Science, 4. Auflage, 691-771
- Rodrigues A, Queiróz DBC, Honda L, Silva EJR, Hall SH, Avellar MCW 2008 Activation of toll-like receptor 4 (TLR4) by in vivo and in vitro exposure of rat epididymis to lipopolysaccharide from Escherichia coli. *Biol Reprod.* 79 1135–1147
- Ryu J-K, Kim SJ, Rah S-H, Kang JI, Jung HE, Lee D, Lee HK, Lee J-O, Park BS, Yoon T-Y, Kim HM 2017 Reconstruction of LPS Transfer Cascade Reveals Structural Determinants within LBP, CD14, and TLR4-MD2 for Efficient LPS Recognition and Transfer. *Immunity.* 46 (1) 38–50
- Saboor F, Reckmann AN, Tomczyk CUM, Peters DM, Weissmann N, Kaschtanow A, Schermuly RT, Michurina TV, Enikolopov G, Müller D, Mietens A, Middendorff R 2016 Nestin-expressing vascular wall cells drive development of pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 47 (3) 876-888
- Schön MP, Schön M 2008 TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy. *Oncogene.* 27 (2) 190–199

- Schulte E 2007 Männliche Genitale. In: Bob A, Bob K (Hg.): Duale Reihe Anatomie, Georg Thieme Verlag, 1. Auflage, 823
- Semenza GL 2001 Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol Med.* 7 (8) 345–350
- Semenza GL 2011 Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *N Engl J Med.* 365 (6) 537–547
- Semenza GL 2012 The Role of Hypoxia-Inducible Factors in Oxygen Sensing by the Carotid Body. *Adv Exp Med Biol.* 758 1-5
- Shear MJ, Turner FC 1943 Chemical treatment of tumours; isolation of hemorrhagic-producing fraction from *Serratia marcescens* (*Bacillus prodigiosus*) culture filtrate. *J Natl Cancer Inst.* 4 81-87
- Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M 1999 MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med.* 189 (11) 1777–1782
- Shum WWC, Da Silva N, Brown D, Breton S 2009 Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. *The Journal of experimental biology* 212 1753–1761
- Silva EJR, Queiróz DBC, Rodrigues A, Honda L, Avellar MCW 2013 Innate Immunity and Glucocorticoids: Potential Regulatory Mechanisms in Epididymal Biology. *J Androl.* 32 (6) 614-624
- Siu ER, Wong EWR, Mruk DD, Sze KL, Porto CS, Cheng CY 2009 An Occludin-Focal Adhesion Kinase Protein Complex at the Blood-Testis Barrier: A Study Using the Cadmium Model. *Endocrinology* 150 (7) 3336–3344
- Stammler A, Hau T, Bhushan S, Meinhardt A, Jonigk D, Lippmann T, Pilatz A, Schneider-Hüther I, Middendorff R 2015 Epididymitis: ascending infection restricted by segmental boundaries. *Hum. Reprod.* 30 (7) 1557-1567
- Steinman RM, Banchereau J 2007 Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 449 419–426
- Sujarit S, Pholpramool C 1985 Enhancement of sperm transport through the rat epididymis after castration. *J Reprod Fertil* 74 (2) 497–502
- Sullivan R, Saez F, Girouard J, Frenette G. 2005 Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Mol Dis.* 35 1-10
- Sun EL, Flickinger CJ 1980 Morphological characteristics of cells with apical nuclei in the initial segment of the adult rat epididymis. *Anat Rec.* 196 (3) 285–293
- Sward K, Josefsson M, Lydrup ML, Hellstrand P 1993 Effects of metabolic inhibition on cytoplasmic calcium and contraction in smooth muscle of rat portal vein. *Acta Physiologica Scandinavica* 148 265-272
- Taggart MJ, Wray S 1998 Hypoxia and smooth muscle function: key regulatory events during metabolic stress. *J Physiol.* 509 315–325
- Takeuchi O, Akira S 2010 Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 140 (6) 805–820
- Talo A, Jaakkola UM, Markkula-Viitanen M 1979 Spontaneous electrical activity of the rat epididymis in vitro. *J. Reprod. Fert.* 57 423-429

- Tanaka K, Fujisawa M, Arakawa S, Kamidono S 1995 Local expression of cytokine messenger RNA in rat model of Escherichia coli epididymitis. *J urol.* 154 (6) 2179-2184
- Tančić-Gajić M, Vukčević M, Ivočić M, Marina LV, Arizanović Z, Soldatović I, Soldatović M, Dogo A, Kendereški A, Vujović 2021 Obstructive Sleep Apnea Is Associated With Low Testosterone Levels in Severely Obese Men. *Front. Endocrinol.* 12 622496
- Tang W, Wu J, Jin S, He L, Lin Q, Luo F, He X, Feng Y, He B, Bing P, Li T, Yin Y 2020 Glutamate and aspartate alleviate testicular/epididymal oxidative stress by supporting antioxidant enzymes and immune defense systems in boars. *Sci China Life Sci.* 63 (1) 116-124
- Taylor SN 2015 Epididymitis. *Clin Infect Dis.* 61 770-773
- Torres M, Laguna-Barraza R, Dalmases M, Calle A, Pericuesta E, Montserrat JM, Navajas D, Gutierrez-Adan A, Farré R 2014 Male fertility is reduced by chronic intermittent hypoxia mimicking sleep apnea in mice. *Sleep* 37 1757-1765
- Trasler JM, Hermo L, Robaire B 1988 Morphological Changes in the Testis and Epididymis of Rats Treated with Cyclophosphamide: A Quantitative Approach. *Biology of Reproduction* 38 (2) 463-479
- Trojjan TH, Lishnak TS, Heiman D 2009 Epididymitis and orchitis: an overview. *Am Fam Physician.* 79 (7) 583-587
- Turner TT, Bomgardner D, Jacobs JP, Nguyen QAT 2003 Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. *Reproduction* 125 871-878
- Turner TT 2008 De Graaf's thread: the human epididymis. *J Androl.* 29 (3) 237-250
- Turner TT, Mammen T, Kavoussi P, Lysiak JJ, Costabile RA 2011 Cytokine responses to E. coli-induced epididymitis in the rat: blockade by vasectomy. *Urology* 77 e1509-e1514
- Veri JP, Hermo L, Robaire B 1993 Immunocytochemical localization of the Yf subunit of glutathione S-transferase P shows regional variation in the staining of epithelial cells of the testis, efferent ducts, and epididymis of the male rat. *J Androl.* 14 (1) 23-44
- Vieler E, Jantos C, Schmidts HL, Weidner W, Schiefer HG 1993 Comparative efficacies of ofloxacin, cefotaxime, and doxycycline for treatment of experimental epididymitis due to Escherichia coli in rats. *Antimicrob Agents Chemother.* 37 (4) 846-850
- Vogelberg KH, König M 1993 Hypoxia of diabetic feet with abnormal arterial blood flow. *Clin Investig.* 71 (6) 446-470
- Vora P, Youdim A, Thomas LS, Fukata M, Tesfay SY, Lukasek K, Michelsen KS, Wada A, Hirayama T, Arditi M, Abreu MT 2004 Beta-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells. *J Immunol.* 173 (9) 5398-5405
- Weissmann N, Nollen M, Gerigk B, Ghofrani HA, Schermuly RT, Günther A, Quanz K, Fink L, Hänze J, Rose F, Seeger W, Grimminger F 2003 Downregulation of hypoxic vasoconstriction by chronic hypoxia in rabbits: effects of nitric oxide. *J Physiol Heart Circ Physiol* 284 H931-H938
- Wenzel RP, Pinsky MR, Ulevitch RJ, Young L 1996 Current understanding of sepsis. *Clin Infect Dis.* 22 (3) 407-412

- Wittert G 2014 The relationship between sleep disorders and testosterone in men. *Asian J Androl* 16 (2) 262–265
- Wray S, Duggins K, Iles R, Nyman L, Osman VA 1992 The effects of metabolic inhibition and intracellular pH on rat uterine force production. *Experimental Physiology* 77 307-319
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S 2003 Role of Adaptor TRIF in the MyD88-Independent Toll-Like Receptor Signaling Pathway. *Science* 301 (5633) 640–643
- Zhang Z, Haimovich B, Kwon YS, Lu T, Fyfe-Kirschner B, Olweny EO 2016 Unilateral Partial Nephrectomy with Warm Ischemia Results in Acute Hypoxia Inducible Factor 1-Alpha (HIF-1 α) and Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Overexpression in a Porcine Model. *Ploss one* 11 (5) e0154708
- Zhang J, Dong C, Feng J, Li J, Li S, Feng J, Duan X, Sun G, Xu P, Li X 2019 Effects of dietary supplementation of three strains of *Lactococcus lactis* on HIFs genes family expression of the common carp following *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish & Shellfish Immunology* 92 590-599
- Zepeda A, Aguayo LG, Fuentealba J, Figueroa C, Acevedo A, Salgado P, Calaf GM, Fariás J 2012 Blueberry Extracts Protect Testis from Hypobaric Hypoxia Induced Oxidative Stress in Rats. *Oxid Med Cell Longev.* 975870
- Zhou Z, Zhu X, Chen J, Yang S, Sun R, Yang G 2014 The interaction between Toll-like receptor 4 signaling pathway and hypoxia-inducible factor 1 α in lung ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res.* 188 (1) 290-297

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denen bedanken, die mich durch die Zeit des Studiums und der Promotion begleitet haben und an der Fertigstellung dieser Arbeit beteiligt waren.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Ralf Middendorff, sowie Dr. med. Andrea Mietens für die ausgezeichnete Betreuung und tatkräftige Unterstützung.

Mein herzlicher Dank geht auch an Frau Sabine Tasch, Frau Ingrid Schneider-Hüther, Frau Dr. Daniela Weiser, Frau Dr. Caroline Feuerstacke und Herrn Dr. Thorben Hau für die Einarbeitung und die Unterstützung.

Weiter möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen der AG Middendorff für die nette Atmosphäre im Labor, die lustigen Betriebsausflüge und Weihnachtsfeiern bedanken.

Meinen herzlichsten Dank gilt meinen Eltern für die finanzielle Unterstützung, meinen Schwiegereltern für die kinderfreien Nachmittage, meinem Mann Dirk für den Rückhalt und die Motivation in dieser Zeit und meinem Sohn Henry, welcher mir in der Endphase die Motivation zur Fertigstellung dieser Dissertation gegeben hat.

Am Ende geht mein besonderer Dank an die Ratten und Mäuse, die für die vorliegende Arbeit ihr Leben lassen mussten.

12 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 mündliche Auskünfte 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 Grundgesetze 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 aus das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden“

Ort, Datum

Unterschrift