

**„Klassische und membranständige Androgenrezeptoren - testikuläre Expression
von ZIP-9, AR und GPRC6A unter physiologischen und pathologischen
Bedingungen sowie präinvasiver Keimzellneoplasie.“**

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

Vorgelegt von Constanze Marie-Luise Dalheimer
aus Pirmasens

Gießen

2024

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Aus dem Institut für Veterinär -Anatomie, -Histologie, -Embryologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter/in: Prof. Dr. Stefan Gattenlöhner
Gutachter/in: Prof. Dr. Daniele Fietz

Tag der Disputation:

19.02.2025

Für Hanns & Hermann

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Aufbau des Hodens	1
1.1.1 Makroskopie des Hodens	1
1.1.2 Schichten des Hodens	2
1.1.3 Aufbau des Keimepithels	5
1.1.4 Die Sertoli-Zellen	6
1.1.5 Die Leydig-Zellen	8
1.1.6 Stadien der Spermatogenese	9
1.1.7 Störung der Spermatogenese	14
1.1.8 Keimzelltumore	16
1.2 Steroidhormone, Rezeptoren und Transportwege	18
1.2.1 Steroidhormonbiosynthese und -Rezeptoren	18
1.2.2 Sekretion und Wirkungsweise der Androgene	19
1.2.3 Der Androgenrezeptor	20
1.2.4 Der G-Protein-gekoppelte Rezeptor	21
1.3 Die membrangebundenen Androgenrezeptoren ZIP-9 und GPRC6A	23
1.3.1 Übersicht von ZIP-9 und GPRC6A	23
1.3.2 Der ZIP-9-Rezeptor	24
1.3.3 Der GPRC6A-Rezeptor	26
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit	31
2. Material und Methoden	32
2.1 Materialien	32
2.1.1 Patientenproben	32
2.1.2 Arbeitsgeräte und Reagenzien	32
2.2 Methoden	32
2.2.1 Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung	32
2.2.2 RNA-Extraktion	33
2.2.3 DNase Behandlung	34
2.2.4 Reverse Transkription	35
2.2.5 Die reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	36
2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese	37
2.2.7 Nachweis von nAR und mAR mittels Immunhistochemie	38
3. Ergebnisse	40
3.1 H.E-Färbung	40
3.2 Qualitative Expressionsanalyse mittels RT-PCR	41
3.2.1 Der nukleäre Androgen-Rezeptor	41
3.2.2 Der mAR ZIP-9	42
3.2.3 Der GPRC6A-Rezeptor	44
3.3. Immunhistochemie zum Proteinnachweis von nAR, ZIP-9 und GPRC6A	45
3.3.1 Der nukleäre Androgen-Rezeptor	45
3.3.2 Der ZIP-9- Rezeptor	45
3.3.3 Der GPRC6A-Rezeptor	45
4. Diskussion	49

4.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse	49
4.2 Diskussion der Ergebnisse	50
4.3 Diskussion der Methoden	54
5. Zusammenfassung	56
6. Summary	57
7. Abkürzungsverzeichnis	58
8. Darstellungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	60
8.1 Abbildungsverzeichnis	60
8.2 Tabellenverzeichnis	61
8.2.1 Tabelle 1. Primer Sequenzen für RT-PCR	61
8.2.2 Tabelle 2. Primäre und sekundäre Antikörper für die Immunhistochemie	62
8.2.3 Tabelle 3. Zusammenfassung der RT-PCR Ergebnisse	63
8.2.4 Verwendete Reagenzien und Geräte	64
8.2.5 Chemikalien und Lösungen	67
9. Literaturverzeichnis	69
10. Ehrenwörtliche Erklärung	86
11. Persönliche Danksagung	87

1. Einleitung

1.1 Aufbau des Hodens

1.1.1 Makroskopie des Hodens

Der Hoden (Testis) ist ein paarig angelegtes Organ, dessen Hauptaufgaben die Keimzellentwicklung (Spermatogenese) und die Bildung der männlichen Geschlechtshormone (Steroidogenese) ist. Der Hoden, Nebenhoden und ein Teil des *Ductus deferens* gehören zu den äußeren männlichen Geschlechtsorganen, da sie während der Fetalentwicklung aus der Bauchhöhle in den Hodensack verlagert werden.

Die Hoden befinden sich extraabdominell im Hodensack (Skrotum) und sind eine exokrine (Spermatogenese) und endokrine (Steroidsynthese) Drüse [Simoni and Huhtaniemi 2017]. Die ungefähr pflaumengroßen Hoden werden von einer derben weißen Bindegewebskapsel (*Tunica albuginea*) umhüllt, von der aus Bindegewebssepten (*Septula testis*) nach innen ziehen und diese in ungefähr 250-370 Hodenläppchen (*Lobuli testis*) aufteilen [Drake et al. 2013].

Bis zur siebten Lebenswoche findet die geschlechtsunabhängige Entwicklung der Gonaden aus dem Mesenchym, primordialen Keimzellen und Zölomepithel statt. Erst durch das Vorhandensein eines Y-Chromosoms, welches die sogenannte *sex determining region on the Y chromosome* (SRY) enthält, kommt es zu einer männlichen Differenzierung [Moore et al. 2013; Sreenivasan et al. 2022]. Die Entwicklung des Hodens beginnt abdominal und zwischen der 11.-16. Entwicklungswoche kommt es zu einer Verlagerung des Hodens in den Bereich der Leistenregion (transabdominaler Deszensus). Ab dem siebten Entwicklungsmonat wandert der Hoden durch den Leistenkanal in das Skrotum. Dort verwächst er kaudal über dem Residuum des *Gubernaculum testis*, welches dem Hoden während der Wanderung in das Skrotum als Führungsstruktur dient, mit der Hodenhülle. Dieser komplette Vorgang wird *Descensus testis* (Hodenabstieg) genannt und beschreibt die physiologische Migration des fetalen Hodens vom dorsalen und extraabdominalen Stamm durch den *Canalis inguinalis* zum Hodensack zum Zeitpunkt der Embryogenese [Brand-Saberi and Ulfing 2017]. Dies führt zu der Bildung der Hodenhüllen aus den Bauchwandschichten, die den Eintritt in den Leistenkanal begleiten. Zusätzlich wird der Leistenkanal vom Samenstrang (*Funiculus*

spermaticus) ausgefüllt, da während des Deszensus des Hodens auch der Samenstrang, die Gefäße und die Nerven mitgezogen werden [Brand-Saberi and Ulfig 2017].

Der Nebenhoden (*Epididymis*) befindet sich topografisch ebenso im Hodensack und wird von Hodenhüllen umgeben. Er reicht vom kranialen zum kaudalen Hodenpol und ist zwischen fünf und zehn Millimeter dick. Der Nebenhoden wird in Kopf, Körper und Schwanz gegliedert. Am oberen Hodenpol (*Extremitas capitata*) befindet sich der Nebenhodenkopf (*Caput epididymis*), in den bis zu 10 *Ductuli efferentes* aus dem Hoden münden. Das *Corpus epididymidis* wird vom *Ductus epididymidis* gebildet, welcher eine Länge von fünf bis sechs Metern aufweist und anschließend in den *Ductus deferens*, welcher sich aus der *Cauda epididymidis* bildet, mündet. Die Spermatozoen aus dem Hoden erreichen den Nebenhodengang, in dem sie ausdifferenzieren und anschließend über den Samenleiter als reife Spermatozoen weitertransportiert werden [Schünke et al. 2022a].

Die arterielle Versorgung des Hodens und Nebenhodens wird über die *Arteria (A) testicularis* gewährleistet, die auf Höhe von L2 aus der *Aorta abdominalis* entspringt. Das venöse Blut wird über die *Vena testicularis*, die den *Plexus pampiniformis* bildet, abtransportiert. Sowohl die Blutversorgung als auch die Innervation durch den *Plexus testicularis* entstammen aus dem Oberbauch, was auf die intraabdominale Anlage des Hodens zurückzuführen ist [Schünke et al. 2022b]

1.1.2 Schichten des Hodens

Der Hodensack (*Scrotum*) gehört zu den sekundären Geschlechtsorganen des Mannes und ist entwicklungsgeschichtlich homolog zu den inneren und äußeren Schamlippen der Frau [Brand-Saberi and Ulfig 2017]. Die mehrschichtige Hauttasche schließt sich an die Bauchhaut an und beinhaltet Hoden, Nebenhoden und einen Teil des Samenleiters, sowie das Ende des Samenstrangs. Das innen liegende *Septum scroti* teilt das Skrotum in zwei Teile, was durch die *Raphe scroti* von außen erkennbar ist [Schünke et al. 2022b]. Die Außenhaut ist in der Regel dunkler pigmentiert als ihre Umgebung, enthält Schweiß- und Talgdrüsen sowie Schamhaare, sobald die Pubertät eingetreten ist [Schünke et al. 2022b]. Das modifizierte Unterhautgewebe der Skrotalhaut (*Tunica dartos*) besteht aus vielen glatten Muskelzellen (Dartos-Muskel), die wegen des fehlenden Unterhautfettgewebes für die Wärmeregulation von Bedeutung sind. Somit wird bei Kältereizen beispielsweise durch eine Kontraktion der Muskulatur der *Tunica*

dartos die Skrotalhaut runzlig und kann durch eine Verkürzung des *Musculus (M) cremaster* an die Dammregion angenähert werden [Krause et al. 2011]. Die *Fascia spermatica externa*, die dem *M. cremaster* außen aufliegt, bildet die tiefste Schicht des Hodensacks. Die Lage des Hodens und dessen Hüllen können Abb. 1 entnommen werden [Schünke et al. 2022b].

Der Scheidenhautfortsatz (*Processus vaginalis*) ist bei allen männlichen Säugetieren ausgebildet, bei denen ein Hodenabstieg stattfand. Er ist eine embryonal bedingte Aussackung des parietalen Peritoneums (*Tunica vaginalis*) sowie der inneren Rumpffaszie (*Fascia spermatica interna*) und verläuft durch den Leistenkanal in den Hodensack.

Das sackförmige Ende des *Processus vaginalis peritonei* besteht aus zwei Blättern. Die parietale Schicht (*Periorchium*), die von außen mit der *Fascia spermatica interna* verbunden ist und dem viszeralen Blatt (*Epiorchium*), welches die glatte Serosaschicht des Hodens bildet (s. Abb. 1) [Aumüller et al. 2020]. In dem serösen Spalt zwischen den beiden Schichten (*Cavum serosum scroti*) befindet sich eine Ansammlung an seröser Flüssigkeit [Schünke et al. 2022b].

In der Regel verschließt sich der *Processus vaginalis* zum Zeitpunkt der Geburt. Ein fehlender Verschluss kann sowohl der Grund für einen Leistenhernie im Kindesalter, als auch für angeborene Erkrankungen wie der Hydrozele (Ansammlung von Bauchwasser in den Hodenhüllen) sein [Schumpelick et al. 2015]. Dennoch ist ein offener *Processus vaginalis peritonei* nicht gleichzusetzen mit einer Entwicklung eines Leistenbruchs, da 31-94 % der Kinder im ersten Lebensjahr trotz offenem *Processus vaginalis peritonei* eine geringe Leistenbruchinzidenz haben [Von Schweinitz and Ure 2009].

Die *Tunica albuginea* ist eine kräftige Bindegewebsschicht, die hauptsächlich aus Kollagenfasern und glatten Muskelzellen besteht. Sie ist mit dem dünnen äußeren Plattenepithel des Epiorchiums eng verbunden und entsendet Bindegewebssepten (*Septula testis*) in das Hodenparenchym und bildet somit die *Lobuli testis*. Die *Septula testis* laufen radiär und konvergierend auf einen Bindegewebskeil (*Mediastinum testis*) zu. Das am dorsomedialen Rand gelegene *Mediastinum testis* dient als Ein- und Austrittspforte für die Leitungsbahnen [Aumüller et al. 2020]. Die Hodenläppchen enthalten zwei bis vier gewundene Samenkanälchen (*Tubuli seminiferi contorti*). Die Samenkanälchen werden von einem lockeren interstitiellen Bindegewebe (Interstitium) umgeben, welches circa 12-15 % des Hodenvolumens ausmacht. Innerhalb des interstitiellen Kompartiments befinden sich neben vielen Blut- und Lymphgefäßen

sowie Nervenfasern auch die Zellen des lymphatischen Systems und die Leydig-Zellen [Welsch et al. 2022; Wistuba et al. 2022].

Die *Tubuli seminiferi contorti* sind circa 30-70 cm lang, haben einen Durchmesser von 150-250 µm und gehen über kurze gerade Kanälchen (*Tubuli seminiferi recti*) in das *Rete testis* über, welches sich im *Mediastinum testis* befindet. Von dort entsteht die Verbindung zum *Ductus epididymidis* über 10-20 *Ductuli efferentes*, die jeweils circa 20 cm lang und mit einem Flimmerepithel zum Transport der unreifen Spermien ausgekleidet sind. [Lüllmann-Rauch and Asan 2019; Aumüller et al. 2020; Schünke et al. 2022a].

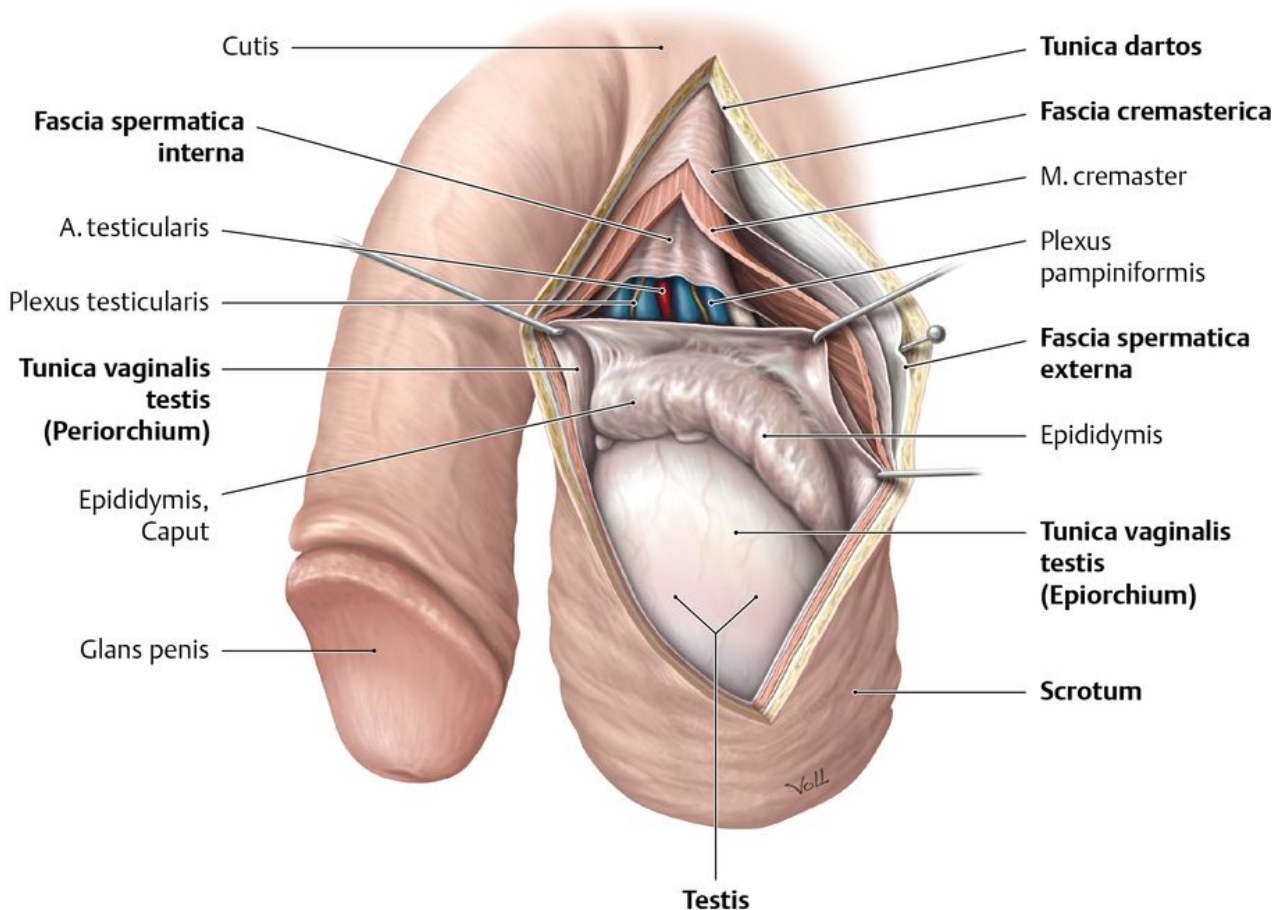


Abbildung 1: Aufbau des Hodens und der unterschiedlichen Hodenhüllen

Ansicht des Skrotums, schichtweise eröffnet zur besseren Darstellung der verschiedenen Hodenhüllen. Entnommen von [Schünke et al., 2022b].

1.1.3 Aufbau des Keimepithels

Die *Tubuli seminiferi contorti* werden von einem circa 80 µm hohen Keimepithel ausgekleidet, welches einen zweischichtigen Aufbau hat. Die schmale Lamina propria und die Basalmembran bilden die *Lamina limitans*. Die *Lamina propria* enthält Kollagenfasern und kontraktile Myofibroblasten, mit Hilfe derer durch Kontraktion die bewegungsunfähigen Spermatozoen in das *Rete testis* weitertransportiert werden.

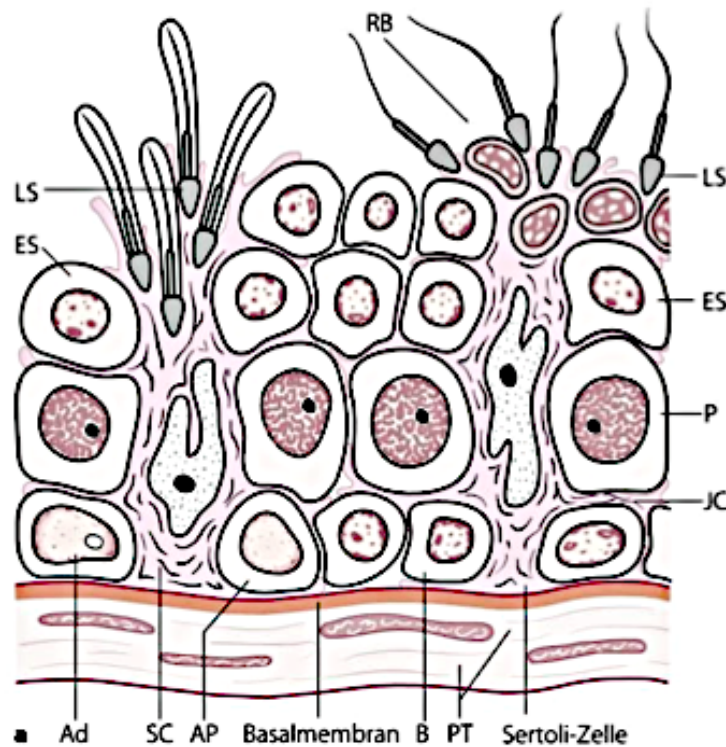


Abbildung 2: Aufbau des Keimepithels

Die Tubuluswand besteht aus der Basallamina und der Lamina propria (*Lamina limitans*) und den kontraktilen Myofibroblasten (PT), LS = elongierte Spermatozyten, P = Spermatozyte, Ad = A dark – Spermatogonien, AP = A pale-Spermatogonien, RB = Residualkörperchen, ES = runde Spermatozyten, B = B-Spermatogonien, SC = Sertoli-Zellen, JC = Junctions, Zell-Zell Kontakte zwischen SC (Bluthodenschranke). Entnommen von [Weinbauer et al. 2009].

Das Keimepithel (*Epithelium spermatogenicum*) enthält neben Sertoli-Zellen auch Keimzellen, die in unterschiedlichen Stadien der Spermatogenese zu beobachten sind [Lüllmann-Rauch and Asan 2019]. Die Stammzellen (Spermatogonien) liegen der Basalmembran direkt auf und befinden sich in einer von Sertoli-Zellen gebildeten Entwicklungsnische (s. Abb. 2). Ein Beispiel für eine normale Spermatogenese kann Abb. 3 entnommen werden.

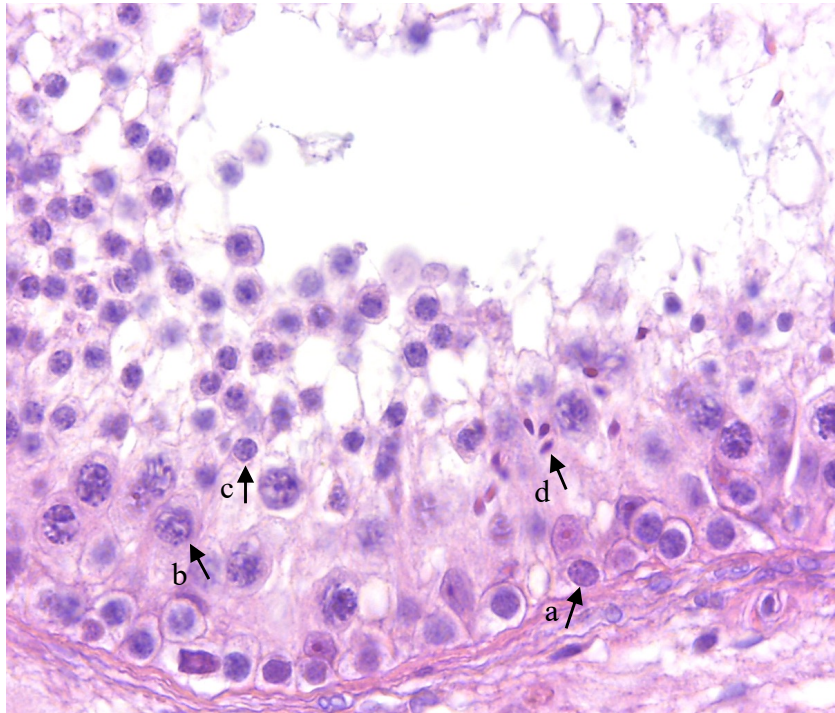


Abbildung 3: Normale Spermatogenese
 (Paraffin, HE, Original Vergrößerung x400)
 a= Spermatogonien, b= primäre pachytäne Spermatozyten, c= runde Spermatiden, d= elongierte Spermatiden

1.1.4 Die Sertoli-Zellen

Die Sertoli-Zellen wurden erstmals im Jahr 1865 von Enrico Sertoli als verzweigte Zellen beschrieben, welche die verschiedenen Keimzellstadien umgeben [Baratelli et al. 2002]. Sie dienen als Stützzellen und haben zusätzlich wichtige Ernährungsfunktionen. Die Sertoli-Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der Entwicklung des männlichen Phänotyps. Sie sind die ersten Zellen, die sich in der indifferenten fötalen Geschlechtsdrüse erkennbar als männlich differenzieren. Dieser Mechanismus ermöglicht die Bildung der Samenstränge, verhindert den Eintritt der Keimzellen in die Meiose und führt zur Differenzierung und Funktionsaufnahme der Keimzellen [Sharpe et al. 2003]. Nach der Pubertät kommt es zu einer Ausdifferenzierung von der ‚fötalen‘ zur ‚adulten‘ Sertoli-Zelle, die ebenfalls mit einer Änderung der Funktionen einhergeht. Die Hauptaufgabe der adulten Sertoli-Zellen besteht darin, die Keimzeldifferenzierung zu unterstützen und somit die Spermatogenese aufrechtzuerhalten [Sharpe et al. 2003]. Eine weitere wichtige Eigenschaft der adulten Sertoli-Zellen ist der Verlust der

proliferativen Aktivität und die Bildung der Blut-Hoden-Schranke (BHS). Lange galten adulte Sertoli-Zellen als terminal differenzierte, teilungsunfähige Zellen. Inzwischen widerlegen einige Studien allerdings diese Annahme, und man geht davon aus, dass die adulte Sertoli-Zellen in ihrer Größe und ihrem Reifungsstatus von Hormonen abhängig und somit keine terminal differenzierte Zelle ist [Tarulli et al. 2012].

Histologisch lassen sie sich die fötalen und adulten Sertoli-Zellen anhand ihrer Kernmorphologie gut von den Keimzellen unterscheiden:

Während unreife Sertoli-Zellen einen runden und dunklen Kern besitzen, der deutlich kleiner ist als die Urkeimzellen, erkennt man die adulten Sertoli-Zellen an den mehr dreieckigen Kernen und dem prominenten Nukleolus. Diese morphologische Veränderung dient als Erkennungsmerkmal für die Reifung der Sertoli-Zellen [Sharpe et al. 2003].

Nach der Pubertät entwickelt sich pro Sertoli-Zelle ein enger Kontakt mit etwa zehn Keimzellen und die Anzahl der Sertoli-Zellen im Hodenepithel korreliert mit der täglichen Spermienproduktion [Yang, Z. et al. 1998]. Die Anzahl einer Sertoli-Zellen zugeordneten Keimzelle dient höchstwahrscheinlich als Maß für die Qualität der Spermatogenese [Johnson et al. 2008]. Somit könnte auch, wie von Sharpe et al. vermutet, eine verminderte Anzahl von Sertoli-Zellen ein Grund für eine verminderte Fruchtbarkeit sein [Sharpe et al. 2003].

Die Sertoli-Zellen bilden essenzielle Hormone wie Inhibin, das Androgen-bindende-Protein (ABP) und das Anti-Müller-Hormon (AMH) und haben somit auch eine endokrine Funktion [Josso et al. 2001; Lucas-Herald and Mitchell 2022]. ABP bindet die Androgene Testosteron (T) und Dihydrotestosteron (DHT) und ist für die Androgen-Verteilung sowohl im Hoden als auch im gesamten Körper zuständig. Inhibin dient als negatives Feedbacksignal zur Regulation der Follikel-stimulierenden Hormon (FSH)-Sekretion in der Hypophyse [Weinbauer et al. 2009].

Wie die Keimzellen liegen Sertoli-Zellen der Basallamina auf und erstrecken sich über das gesamte Epithel bis zum Tubuluslumen. Jede Stützzelle ist mit der benachbarten Zelle über *Tight junctions* (TJ) verbunden und bildet somit ein basales Kompartiment, in dem die diploiden Spermatogonien sowie die präleptotänen Spermatozyten 1.

Ordnung lokalisiert sind, und ein adluminales Kompartiment, in dem die haploiden Keimzellen liegen [Krause et al. 2011]. Neben den TJ gibt es noch weitere Zellkontakte zwischen den benachbarten Sertoli-Zellen, wie die *Gap junctions* (GJ), *Adherens junctions* (AJ) und ein spezielles Aktin-Filament-Netzwerk.

Die BHS dient der immunologischen Kontrolle, da sie den Kontakt von Autoantigenen der meiotischen und postmeiotischen Keimzellen und dem adaptiven Immunsystem verhindert und somit eine Barriere für immunkompetente Zellen in die Hodenkanälchen bildet. Zusammen mit anderen Faktoren bauen die Sertoli-Zellen und die BHS so das Immunprivileg des adulten Hodens auf [Fijak and Meinhardt 2006]. Durch diese Kompartimentierung ist der freie Austausch von Molekülen und Metaboliten aus dem basalen Kompartiment und des Blutsystems zum adluminalen Kompartiment vom Molekulargewicht abhängig und stark eingeschränkt bzw. unmöglich [Pelletier 2011]. Durch gerichteten Stofftransport schaffen die Sertoli-Zellen eine spezielle Mikroumgebung, da die intratubuläre Flüssigkeit mehr Kaliumionen und weniger Natriumionen als das Plasma enthält. Dieses Mikromilieu ist für die Keimzellentwicklung essentiell [Fietz and Bergmann 2017]. Kurz vor Freisetzung der Keimzellen, dem *sperm release*, phagozytieren Sertoli-Zellen den Restkörper und sind auch in der Lage, degenerierte Keimzellen zu entfernen [Krause et al. 2011].

1.1.5 Die Leydig-Zellen

Die Leydig-Zellen machen 10-20 % des interstitiellen Kompartiments aus und kommen in Ansammlungen, sogenannten Aggregaten, vor. Leydig-Zellen sind endo-, auto- und parakrine Zwischenzellen, deren Hauptfunktion die Androgenbildung ist. Zusätzlich produzieren die Zellen auch in kleineren Mengen Östrogen und den Insulin-ähnlichen-Faktor 3 (INSL-3) [Fietz and Bergmann 2017]. Sie wurden erstmals 1850 von Franz Leydig beschrieben [Fietz and Bergmann 2017; Wistuba et al; 2022].

INSL-3 spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der frühen Phase des Hodenabstieges als Marker für die Differenzierung der Leydig-Zellen und den Beginn der Pubertät [Payne et al. 2004; Fietz und Bergmann 2017].

Die Testosteronbildung wird von Hypothalamus und Hypophyse gesteuert. Der Hypothalamus produziert das Gonadotropin-releasing Hormon (GnRH) und setzt dieses pulsatil frei, welches wiederum die Hypophyse zur Bildung von FSH und dem luteinisierende Hormon (LH) stimuliert. Das LH regt anschließend die Leydig-Zellen zur Bildung von Testosteron an, welches im Zusammenhang mit FSH die Reifung der Spermien positiv beeinflusst. Sobald genügend Testosteron vorhanden ist, bilden die Sertoli-Zellen Inhibin, welches dann im Rahmen der negativen Rückkopplung dem

Hypothalamus signalisiert, dass die Produktion von GnRH gestoppt werden kann [Wistuba et al. 2022].

Zusätzlich zu den bereits erklärten endokrinen Eigenschaften wurden in verschiedenen Studien auch neurale Eigenschaften der Leydig-Zellen untersucht. Es konnte eine vermehrte Expression von Antigenen beobachtet werden, die charakteristisch für Nerven- und Gliazellen sind, weshalb die genaue Herkunft der Zellen in Frage gestellt wird [Davidoff et al. 2002; Müller et al. 2006].

Man unterscheidet zwei verschiedene Generationen von Leydig-Zellen, die im pränatalen bzw. postnatalen Hoden vorkommen: Die fetalen Leydig-Zellen und die adulten Leydig-Zellen. Sie unterscheiden sich in ihren morphologischen und biochemischen Eigenschaften, haben jedoch dieselbe Hauptfunktion, nämlich die Bildung von Androgenen. Obwohl die funktionellen Unterschiede bereits gut beschrieben sind, ist die entwicklungsbedingte Beziehung noch nicht vollständig geklärt (für eine Übersicht s. [Shima 2019]).

In der pränatalen Periode dienen die fetalen Leydig-Zellen als primäre Quelle für Androgene, die nicht nur für die Maskulinisierung der inneren und äußeren männlichen Genitalien dient, sondern auch neuroendokrine Funktionen reguliert [Payne and Hales 2004; Fietz and Bergmann 2017; Suede et al. 2023]. Die adulten Leydig-Zellen stammen von peritubulär-ähnlichen Stammzellen ab und lösen im Zeitraum der Pubertät die fetalen Leydig-Zellen ab. Sie produzieren unter dem Stimulus von LH aus der Hypophyse Testosteron, welches für die pubertäre Entwicklung der äußeren Genitalien und für den Beginn und die Aufrechterhaltung der Spermatogenese durch seine Wirkung auf den Androgenrezeptor (AR) benötigt wird (Übersicht der Leydig-Zellen - Generationen bei [Svechnikov et al. 2010]).

1.1.6 Stadien der Spermatogenese

Unter dem Begriff der Spermatogenese versteht man die Bildung der männlichen Keimzellen. Unter physiologischen Bedingungen dauert die vollständige Entwicklung von Spermatogonien bis zu testikulären Spermien circa zehn Wochen, inklusive einer

zweiwöchigen Reifephase im Nebenhoden [Suede et al. 2023]. Bereits im fetalen Hoden finden im basalen Kompartiment Mitosen zur Vermehrung der Urkeimzellen (Gonozyten) statt. Die Gonozyten differenzieren sich zu Spermatogonien; diese besitzen einen runden Zellkern, sind diploid ($2n2C$), haben Kontakt zu der Basallamina und können in zwei Typen unterteilt werden. Typ A Spermatogonien bleiben als spermatogoniale Stammzellen ein Leben lang im Keimepithel erhalten und können die Spermatogenese auch nach Störungen der Keimzellentwicklung, z.B. durch fieberhafte Erkrankungen oder auch nach Tumorbehandlungen, wieder besiedeln. Anhand ihres Kerns lassen sich die Typ A Spermatogonien nochmals in *A_{dark}* und *A_{pale}* unterscheiden. Während erstere einen dunkleren Kern mit einem zentral helleren Bereich aufweisen, besitzen die hellen Spermatogonien einen runden, eher hellen Kern, der durch lose gepackte euchromatische Desoxyribonukleinsäure (DNA) gekennzeichnet ist [Fietz und Bergmann 2017]. Die *A_{dark}* Spermatogonien stellen dabei die ruhende Reserve dar, während die *A_{pale}* Spermatogonien als sich selbsterneuernde Stammzellen dienen [Waheeb und Hofmann 2011]. Bei dieser asymmetrischen Mitose entsteht zum einen wieder eine A-Spermatogonie sowie eine B-Spermatogonie. Die Spermatogonien vom Typ B besitzen einen runden Kern mit einem deutlich heterochromatischen Zellkern, sind mitotisch aktiv und lösen sich anschließend von der Basallamina ab, um in die Meiose einzutreten. Dort werden sie nach Verdopplung des Chromatins zu primären Spermatozyten [Krause et al. 2011]. Diese primären Spermatozyten sind dementsprechend diploid mit doppelten Schwesterchromatiden, die über ein Zentromer verbunden sind ($2n4C$). Die Entwicklung der primären Spermatozyten lässt sich weiter in verschiedene Stadien unterteilen, die alle zur Prophase I der Meiose I gehören. Mit Erreichen des leptotänen Stadiums durchtreten die primären Spermatozyten die BHS und befinden sich nun im adluminalen Kompartiment. In dieser Phase kondensiert das Chromatin und wird als Faden sichtbar. Anschließend erfolgt die zygotäne Phase, in der die Paarung der homologen Chromosomen stattfindet.

Im Pachytän befinden sich die primären Spermatozyten in der Phase der homologen Rekombination, in der es durch auftretende Chiasmata zu einem chromosomalen Austausch zwischen den homologen mütterlichen und väterlichen Chromosomen kommen kann. Die pachytänen Spermatozyten sind die größten Zellen im Epithel und besitzen aufgrund des Chromatins eine grobe Granulation im Zellkern. Die Kernmembran der primären Spermatozyten bricht am Ende der Prophase I, im Stadium der Diakinese, auf. Die Besonderheit dieser Mitose ist, dass es zu keiner vollständigen

Trennung der Chromatiden kommt und somit der Chromosomensatz zwar halbiert ist, aber der DNA-Gehalt noch $2C$ ist. Sie benötigen ungefähr drei Wochen, bis sie sich zu den sekundären Spermatozyten II durch die erste meiotische Reifeteilung weiterentwickeln [Krause et al. 2011]. Die sekundären Spermatozyten verfügen über einen haploiden Chromosomensatz, da die homologen Chromosomen getrennt sind, aber noch über zwei verbundene Schwesterchromatiden verbunden sind ($23,1n2C$). Sie besitzen einen sehr großen Zellkern mit einem feinem Chromatinmuster. Sie sind nur sehr selten im Keimepithel zu sehen, da sie die zweite meiotische Reifeteilung bereits nach wenigen Stunden durchlaufen und ohne weitere DNA-Synthese in die zweite Reifeteilung eintreten. Das Produkt der zweiten meiotischen Reifeteilung sind die Spermatisden, die einen haploiden Chromosomensatz mit einfachem Chromatid aufweisen ($1n1C$). Aus einer Typ B Spermato gonie sind so final vier runde Spermatisden entstanden [Nishimura and L'Hernault 2017]. Die verschiedenen Teilungen sind in Abb. 4 dargestellt.

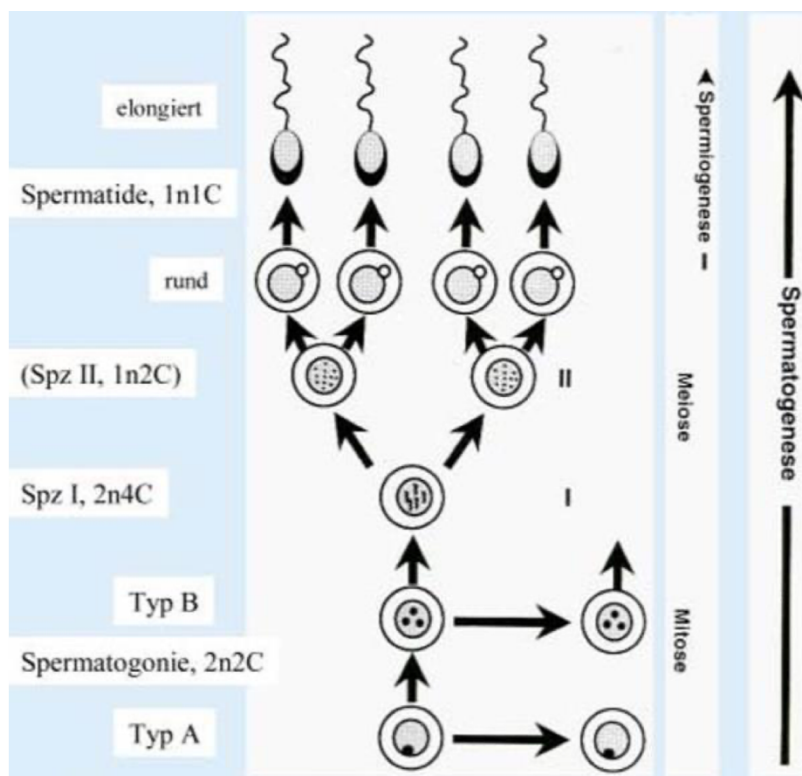


Abbildung 4: Zellteilung während der Spermatogenese mit DNA-Gehalt
 Spz I = Primäre Spermatozyte, Spz II = Sekundäre Spermatozyte
 nach [Bergmann 2005].

Im Laufe der Spermatogenese wandern die Keimzellen von der basal liegenden Tubuluswand in Richtung luminal, wo die elongierten Spermatozoen in das Tubuluslumen abgegeben werden (s. Abb. 5).

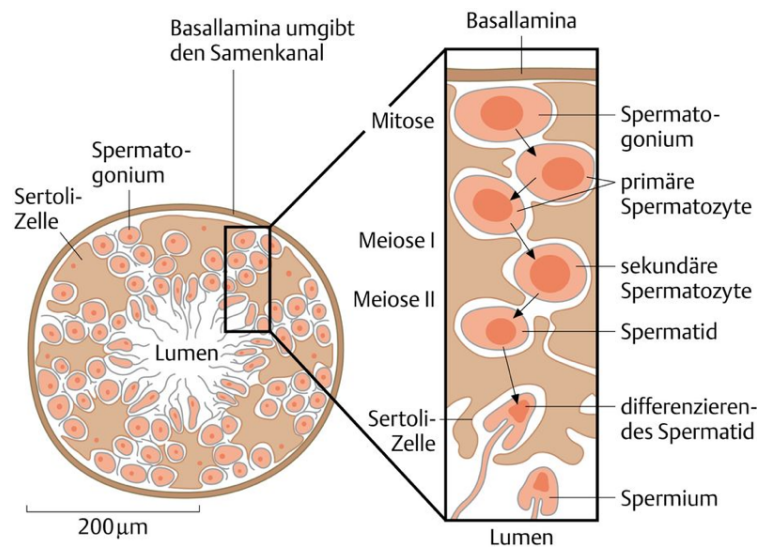


Abbildung 5: Die unterschiedlichen Keimzellstadien

Nach [Alberts et al. 2017]

Diese verschiedenen Stadien können bei intakter Spermatogenese anhand ihrer Kernform und ihrer Position im Hodenepithel leicht unterschieden werden. Der Begriff des Keimepithelzyklus beschreibt die zeitliche Abfolge aller Stadien und beträgt beim Menschen sechs Stadien [Clermont 1963; Krause et al. 2011; Waheeb and Hofmann 2011; Fietz and Bergmann 2017].

Im nun folgenden Abschnitt, der Spermio-genese, entwickeln sich aus den runden Spermato-zoöen die elongierten Spermato-zoöen (testikulären Spermien). Diese befinden sich im Sertoli-Zellzytoplasma, allerdings am luminalen Rand und haben sich gedreht, sodass die Geißeln in das Tubuluslumen ragen (s, Abb, 5.). Die Spermio-genese besteht aus drei Phasen, die nahezu gleichzeitig ablaufen.

I. Kondensation des Zellkerns

Bei der Kondensation des Zellkerns kommt es zu einer Verdichtung und Verkleinerung des Kerns auf 10 % des ursprünglichen Volumens. Es kommt zu einem Austausch der DNA-bindenden Histone durch Protamine. Durch diesen Histon-Protamin-Austausch liegt die DNA in einer sogenannten „Doughnut“-Struktur vor, durch die es zu der

Kondensation des Kernchromatins und einem Stopp der Genexpression kommt [Krause et al. 2011]. Durch die Verringerung des Kernvolumens wird auch der Platz- und Energiebedarf gesenkt, wodurch die Bewegungsgeschwindigkeit auf dem Weg zur Eizelle erhöht wird.

II. Die Akrosombildung

Diese Phase der Akrosombildung kann erneut in mehrere Phasen unterteilt werden. Der Golgi-Apparat bildet proakrosomale Vesikel, diese vereinigen sich zu einem einzelnen akrosomalen Bläschen, welches sich an der Kernmembran im Bereich des späteren Kopfbereichs anheftet. Dadurch werden die runden Spermatiden polarisiert. Am gegenüberliegenden Ende induziert das Zentriol die Geißelbildung [Hess and Renato de Franca 2009]. In der darauffolgenden Kappen-Phase findet eine Abflachung des akrosomalen Bläschens statt, während der Kern von einem Kappen-ähnlichen Akrosom-Vesikel umgeben ist. Daraus resultiert die Akrosomphase, in der die definitive Ausbildung des Akrosoms erfolgt. Das Akrosom enthält hydrolytische Enzyme, die bei der Besamung und Befruchtung benötigt werden.

III. Die Bildung der Geißel

Die Geißelbildung ist die längste der drei Phasen und beginnt zeitgleich mit der Kappen-Phase. Aus den beiden Zentriolen bildet sich am distalen Ende die axonemale Struktur. Diese besteht aus neun äußeren Doppeltubuli und zwei zusätzlichen zentralen Mikrotubuli (9x2+2 Axonem genannt). Die Geißelanlage entsteht auf der gegenüberliegenden Seite des Akrosoms. Die fertige Geißel besteht aus einem Halsstück, welches die beiden Zentriolen enthält, dem Mittelstück, in dem Mitochondrien lokalisiert sind, die die Energie zur Bewegung bereitstellen, dem Haupt- und dem Endstück. Letzteres besteht nur noch aus der 9+2 Struktur des Axonemas [Moore et al. 2013].

Sind alle Strukturen vollständig ausgebildet, lösen sich die elongierten Spermatiden aus dem Keimepithel und treten in das Lumen der Samenkanälchen ein.

Diese Stadien sind im Tubulus in Längsrichtung angeordnet und werden Spermatogenesewellen genannt. Im Gegensatz zu Nagetieren und größeren Säugetieren wie Hunden, Pferden, Schweinen und Kühen, bei denen diese Wellen longitudinal angeordnet sind, sind beim Menschen, beim Menschenaffen und bei einigen weiteren

Spezien immer mehrere Stadien auf einem Tubulusquerschnitt sichtbar. Diese Besonderheit nennt man ‚*multi-stage-arrangement*‘ [Bergmann 2005]. Die nun ausgereiften Spermatozoen (testikuläre Spermien) sind zwar morphologisch vollständig differenziert, aber funktionell unreif. Da sie die Fähigkeit zur Eigenbewegung noch nicht besitzen, können sie nur mit Hilfe der peristaltischen Aktivität der Myofibroblasten fortbewegt werden, um zum *Rete testis* zu gelangen. Die letzten Reifungsschritte finden im Nebenhoden und beim Aufstieg im weiblichen Genitaltrakt statt. So erlangen die Spermien während der Nebenhodenpassage ihre Bewegungs- und im weiblichen Genitale durch Kapazitation ihre Befruchtungsfähigkeit.

1.1.7 Störung der Spermatogenese

Nach der Definition der World Health Organization (WHO) liegt beim Menschen eine Infertilität vor, wenn es trotz regelmäßigen und ungeschützten Geschlechtsverkehrs nach einem Jahr zu keiner Schwangerschaft kommt. In ungefähr 40 % der Fälle liegt die Ursache für eine Unfruchtbarkeit auf der Seite des Mannes (*male factor infertility*), in 40% bei der Frau und in 20 % der Fälle liegen die Ursachen sowohl auf männlicher als auch weiblicher Seite [Kumar and Singh 2015]. Die Gründe für männliche Fruchtbarkeitsstörung können sehr vielfältig sein. Es wird zwischen endokrinen Störungen, Hodenschäden oder einer posttestikulären Erkrankung unterschieden, die zu einer mangelhaften Samenqualität führen. Des Weiteren können auch einige exogene Faktoren, wie Rauchen, Alkoholabusus oder Fettleibigkeit eine wichtige Rolle spielen (für eine Übersicht s. [Barratt et al. 2017]).

Defekte der Spermatogenese bedingen häufig eine Störung in der Anzahl der Spermien (Oligozoospermie mit < 15 Mio Spermien, Azoospermie mit keinen Spermien im Ejakulat), der Motilität (Asthenozoospermie) und der Spermienmorphologie (Teratozoospermie). Auch Kombinationen wie das Oligoasthenoteratozoospermie-Syndrom (OAT-Syndrom) treten häufig auf [Tüttelmann et al. 2011].

Eine quantitativ und/oder qualitativ verminderten Spermienqualität kann mittels Ejakulatanalyse nachgewiesen werden. Bei der Ejakulatdiagnostik ist eine Standardisierung und Qualitätssicherung der Analyse sowie die korrekte Beschreibung unerlässlich. Als Grundlage zur Untersuchung des menschlichen Ejakulats dient das WHO-Laborbuch [Schuppe, H. et al. 2022]. Als Ergebnis zeigt sich in 5-15 % eine Azoospermie, d.h. das Fehlen der Spermien im Ejakulat [Olesen et al. 2017]. Hierbei

muss zwischen einer obstruktiven und einer nicht-obstruktiven Form unterschieden werden. Während bei der obstruktiven Azoospermie (OA) ein Verschluss der samenleitenden Wege vorliegt, treten bei der nicht-obstruktiven Azoospermie (NOA) primäre Produktionsstörungen der Spermien im Hoden auf. Männer mit NOA können dennoch über Restbereiche mit Spermatogenese verfügen. Die Unterscheidung der beiden Formen ist nur durch eine invasive Hodenbiopsie möglich [Fietz und Kliesch 2022].

Die Hodenbiopsie liefert detaillierte Informationen über den Zustand des Hodengewebes. Bei der histologischen Untersuchung wird jeder Keimtubulus nach Auftreten der Spermatogonien, Spermatozyten, runden und elongierten Spermatischen, atypischen Keimzellen sowie Sertoli-Zellen einzeln beurteilt [Fietz und Kliesch 2022; Michel et al. 2023]. Hierbei wird eine Score-Count Analyse nach Bergmann und Kliesch von 1998 (Übersicht bei [Nieschlag et al. 2020]) durchgeführt [Bergmann und Kliesch 1998]. Im Gegensatz zur erstmals eingeführten Score-Count Analyse von Johnsen (1970) wird hier der Prozentsatz der Tubuli ausgerechnet, die elongierte Spermatischen aufweisen, wodurch sich die Erfolgsaussichten einer testikulären Spermienextraktion bestimmen lässt [Johnsen 1970; Fietz and Kliesch 2022]. Bei einer normalen Spermatogenese (NSP) liegt ein Score-Count von zehn vor, d.h. alle Tubulusanschnitte enthalten elongierte Spermatischen. Bei einer qualitativ intakten, aber quantitativ reduzierten Keimzellproduktion spricht man von einer Hypospermatogenese (Hyp). Diese kann einen Score-Count von 10-0,1 aufweisen. Die Diagnose einer NSP und der Hyp mit einem hohen Score-Count tritt vermehrt bei Patienten mit einer obstruktiven Azoospermie auf, bei denen die samenleitenden Wege blockiert sind, aber meist die Hodenfunktion erhalten ist [Bergmann and Kliesch 2010; Tüttelmann et al. 2010; Nieschlag et al. 2020; Caroppo and Colpi 2021; Fietz and Kliesch 2022; Michel et al. 2023].

Bei einer absoluten Keimzellaplasie, dem sogenannten Sertoli-cell-only-Phänotyp (SCO) sind keine Keimzellen mehr vorhanden, der Score-Count ist in diesem Fall 0 [Krisp and Krause 2002] (s. Abb. 6). Ein SCO kann angeboren oder durch endogene oder exogene Schädigungen erworben sein. Ebenso unterscheidet man die absolute Form, bei der eine totale Keimzellaplasie mit intakter Leydigzellfunktion vorliegt und einer daraus resultierenden vollständigen Infertilität, von der partiellen Form. Hier besteht die Möglichkeit, dass einige Tubuli mit elongierten Spermatischen vorhanden sind [Simoni and Huhtaniemi 2017].

Dies wird als bunte Atrophie der Spermatogenese bezeichnet [Rehnitz et al. 2020].

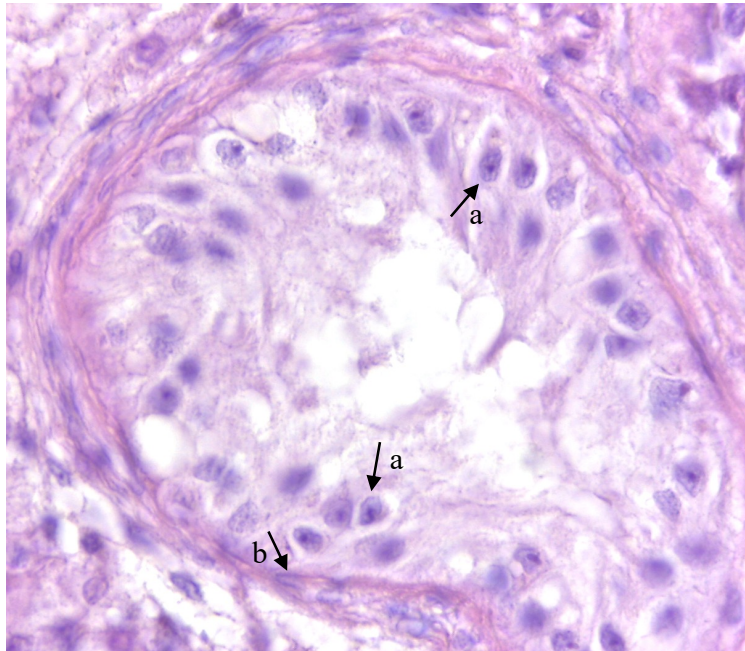


Abbildung 6: Sertoli-cell-only-Syndrom (SCO)
(Paraffin, HE, Originalvergrößerung x400)
a= Sertoli-Zellen, b= peritubuläre Myoidzellen

Gelegentlich kann es auch zu einer hyperplastischen Form der Leydig-Zellen, einer sogenannten Leydigzell-Hyperplasie kommen, deren Ursprung noch nicht genau erforscht ist. Weitere Zustände, die mit der Hyperplasie einhergehen, sind das Androgeninsensitivitäts-Syndrom, die testikuläre Feminisierung, Kryptorchismus oder auch verschiedene Formen der gestörten Spermatogenese, wie dem SCO-Syndrom. Ebenso wird vermutet, dass sich die hyperplastischen Ansammlungen allmählich zu Tumoren differenzieren können. Die genaue Entstehung und mögliche Ursachen werden derzeit noch genauer untersucht [Holm et al. 2003].

1.1.8 Keimzelltumore

Hodentumore sind im Alter zwischen 14 und 45 Jahren die häufigste Krebserkrankung des Mannes. Die Keimzelltumore entstehen durch eine fehlerhafte Differenzierung von primordialen Keimzellen und daraus resultierender ungehemmter Zellteilung und Vermehrung [Fietz et al. 2022, Michel et al. 2023]. Man vermutet, dass diese

sogenannten *germ cell neoplasia in situ* (GCNIS) Zellen (s. Abb. 7) u.a. durch endokrine Einflüsse, wie ein Östrogenüberschuss bei der Mutter, sowie genetische Faktoren, wie z.B. Mutationen im *KIT/KITL*-Gen entstehen und dann weiter proliferieren können [Berney et al. 2016]. Diese malignen vorgeprägten Keimzellen ruhen zunächst und proliferieren in vielen Fällen erst nach der Pubertät oder im Erwachsenenalter zu einem manifesten Keimzelltumor [Hoei-Hansen et al. 2005, Meyts et al. 2016].

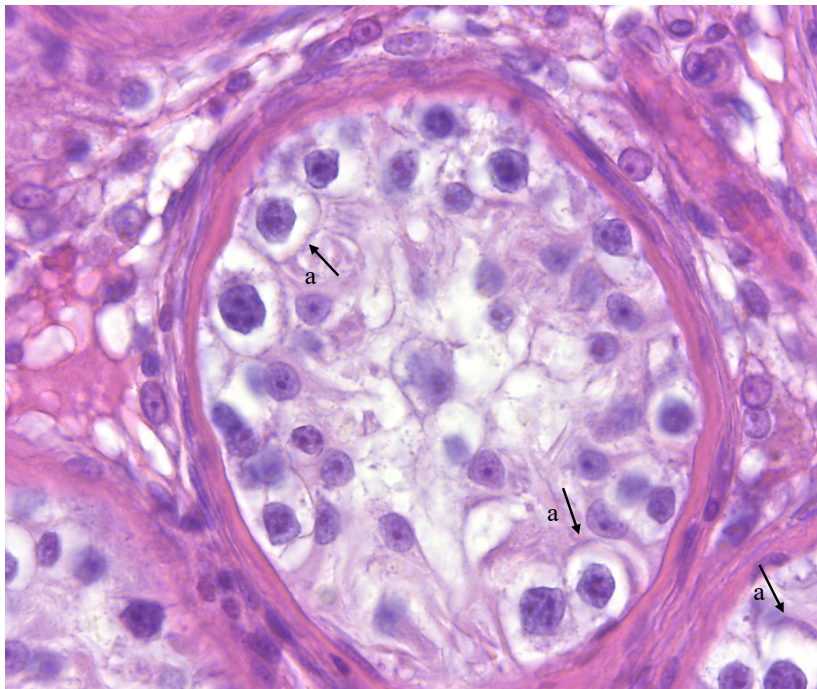


Abbildung 7: Keimzellneoplasie in situ (GCNIS)
(Paraffin, HE-Färbung, Originalvergrößerung x400)
a= GCNIS-Zellen

Keimzelltumore können weiter in Seminome und Nicht-Seminome eingeteilt werden [Berney et al. 2016, Moch et al. 2022]. Im Allgemeinen wird GCNIS als Vorläufer der meisten Keimzelltumore im Hoden betrachtet, mit Ausnahme von spermatozytären Tumoren bei Erwachsenen, sowie Dottersacktumoren und reifen Teratomen bei Säuglingen. Ursprünglich ging man davon aus, dass sich die GCNIS-Zellen allmählich in ein Seminom und anschließend in einen nicht-seminomatösen Keimzelltumor differenzieren. Mittlerweile liegen mehrere Studien vor, die darlegen, dass GCNIS auf zwei unterschiedliche Wege fortschreiten kann- entweder vom Seminom zum nicht-seminomatösen Keimzelltumor oder direkt zum nicht-seminomatösen Keimzelltumor

[Yang, X. et al. 2023]. Der Nachweis einer GCNIS erfolgt mit Hilfe einer immunhistochemischen Färbung der plazentaren alkalischen Phosphate (PLAP), eines fetalen Markers, der von den GCNIS-Zellen als Dedifferenzierungszeichen weiter exprimiert wird [Reiswich et al. 2021]. Weitere Tumormarker sind das alpha-Fetoprotein (AFP), das humanes Choriongonadotropin (hCG) und das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH). Die Unterschiede der Marker PLAP, AFP und hCG in ihrer Spezifität und Sensitivität sind nach Neumann et al. im klinischen Bereich nicht relevant [Neumann et al. 2011].

Das Seminom ist der häufigste Keimzelltumor, der aus einer GCNIS hervorgeht [Bode and Moch 2014]. Die Ursache(n) für das Fortschreiten der GCNIS zum Seminom ist noch weitgehend unbekannt. Hypothesen gehen davon aus, dass die Entwicklung zum Seminom aus dem Gewinn oder Verlust chromosomaler Regionen resultiert, wie zum Beispiel die Überexpression von p53, der Nachweis zusätzlicher Kopien des Isochromosoms i (12p), dem Expressionsverlust von c-Kit oder der Deregulierung des G1/S-Checkpoint des Zellzyklus [Winter et al. 2005; Leitlinienprogramm Onkologie 2020; Kliesch et al. 2021].

1.2. Steroidhormone, Rezeptoren und Transportwege

1.2.1 Steroidhormonbiosynthese und -Rezeptoren

Steroidhormone können in Glukokortikoide, Mineralkortikoide, Calcitriol und Sexualhormone eingeteilt werden. Die Synthese all dieser Substanzen geht von Cholesterin aus, welches in der Leber und in endokrinen Drüsen umgewandelt wird. Die Steroidhormone bestehen aus einem Sterangerüst ($C_{17}H_{28}$) mit drei C6-Ringen und einem C5-Ring, welches man durch eine Vielzahl chemischer Varianten in die oben genannten Untergruppen einteilen kann. Bei dem ersten Syntheseschritt entsteht aus Cholesterin Pregnenolon. Von dort an unterscheiden sich die Synthesewege der Gluko-, Mineralkortikoide und Sexualhormone. Die Synthese findet bei den meisten Hormonen in der Nebenniere statt. Da Steroidhormone nicht gespeichert werden können, werden sie nur bei Bedarf aus dem zellulären Cholesterinvorrat synthetisiert. Durch ihren lipophilen Charakter haben sie eine geringe Löslichkeit im Blut und benötigen daher

Transporterproteine, um an ihren Wirkungsort zu gelangen. Dort können sie die Plasmamembran der Zielzellen leicht über Diffusion passieren und an intrazytoplasmatische Rezeptoren binden [Tsai and O'Malley 1994].

Steroidhormonrezeptoren (SHR) waren die ersten bekannten Vertreter der Kernrezeptoren und können entsprechend ihrer Funktionsmechanismen in mehrere Gruppen unterteilt werden. Zu den SHR zählen die Östrogenrezeptoren α und β , die Glukokortikoidrezeptoren, der Mineralkortikoidrezeptor, der Progesteronrezeptor und der in dieser Arbeit untersuchte AR [Horn et al. 2020].

Man geht davon aus, dass Steroidhormone nicht nur unterschiedliche Rezeptoren, sondern auch verschiedene Wirkungswege nutzen, um Funktionen im zeitlichen Bereich von Millisekunden bis hin zu Tagen zu steuern [Moore and Evans 1999]. Neben der klassischen nukleären Wirkungsweise der Steroidhormone und ihrer Rezeptoren gibt es auch zahlreiche Studien, die sich mit der Wirkung der Steroide außerhalb des Zellkerns über die Interaktion von Steroiden mit Membranrezeptoren und einer damit einhergehenden schnelleren Signalantwort befassen [Valverde and Parker 2002].

Grundlage für die Entdeckung dieser nicht-genomischen Signalwege war die Beobachtung schneller Wirkungseintritte, die eine Involvierung der Transkriptionsaktivierung ausschließen. Dieser Mechanismus wird in eine spezifische und eine unspezifische nicht-genomische Wirkung unterteilt. Bei der ersten sind steroidselektive Membranrezeptoren vorhanden, die den gewünschten Effekt nach Bindung des Steroidhormons vermitteln. Bei der unspezifischen Wirkung dagegen erfolgt der Effekt durch eine direkte Wechselwirkung der Glucocorticoide mit der Zellmembran ohne Vorhandensein eines Membranrezeptors, wodurch die Zellfunktion durch Beeinflussung des Kationentransports über die Plasmamembran und durch Erhöhung des Protonenlecks der Mitochondrien verändert wird.

1.2.2 Sekretion und Wirkungsweise der Androgene

Androgene steuern neben der Geschlechtsdeterminierung und Fortpflanzung auch andere verschiedene Stoffwechselprozesse bei Mann und Frau, sollen aber in dieser Arbeit nur im Zusammenhang mit der männlichen Fertilität und Infertilität beschrieben werden. Beim Mann ist Testosteron neben dessen Metabolite DHT, Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Androstendion das Hauptandrogen. Während Testosteron eher die Zelldifferenzierung, das Wachstum und die Entwicklung des

männlichen Genitaltraktes fördert, beeinflusst DHT vor allem die Ausprägung der Muskelmasse, das Wachstum der Haarfollikel oder den Stimmbruch [Rassow et al. 2022]. Hauptsyntheseort ist der Hoden, hier werden Testosteron, DHT und DHEA vorwiegend in den Leydig-Zellen produziert. Der kleinere Anteil der zirkulierenden Androgene wird in der Nebennierenrinde (*Zona reticularis*) gebildet und im peripheren Gewebe zu Testosteron umgewandelt. Die Sekretion ist parakrin und wird hormonell durch die Freisetzung von GnRH im Hypothalamus und LH in der Hypophyse gesteuert. In den Samenkanälchen und im Nebenhoden bindet Testosteron zum Transport an ABP und im Blut an das Sexualhormon-bindende Globulin (SHBG). Wie alle Steroidhormone sind Androgene lipophil und können durch die Zellmembran diffundieren, um im Zytosol an nukleäre Steroidhormonrezeptoren zu binden. Die genomische Wirkung von Androgenen wird durch den nukleären AR (s. Kapitel 1.2.3) vermittelt [Lee and Chang 2003].

1.2.3 Der Androgenrezeptor

Der AR ist ein Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor (TF). Das AR-Protein enthält 4 funktionelle Domänen; die aminoternale Transaktivierungsdomäne, die DNA-Bindungsdomäne, die hinge-Region und die Ligandenbindungsdomäne [Bennett et al. 2010; Krause et al. 2011]. Zu Beginn befindet sich der AR inaktiv als Monomer im Zytoplasma, wo er von einem Komplex, bestehend aus Hitzeschock-Proteinen (HSP) und dem HSP-Organizing-Protein, umgeben und geschützt wird. Nach der Bindung von Androgen im Zytoplasma bildet sich ein Hormon-Rezeptor-Komplex (Homo-Dimer), der in den Zellkern verlagert wird. Dort binden die Komplexe an die *Androgen responding elements* der DNA und können aktivierend oder auch inhibierend auf die Genexpression wirken (*genomic action*) [Tsai and O'Malley 1994; Quigley et al. 1995; De Gendt and Verhoeven 2012, van Royen et al. 2012]. DHT, das biologisch wirksamste Androgen, hat eine höhere Affinität zum AR als Testosteron, weshalb Testosteron zum Großteil in DHT im Zytosol umgewandelt wird. Eine Mutation oder Funktionsstörung des AR kann zu einer teilweisen oder kompletten Androgenresistenz führen. Diese wiederum hat, je nach Schweregrad, eine gestörte männliche Genitalentwicklung bis hin zur testikulären Feminisierung zur Folge [Quigley et al. 1995].

In den letzten Jahren wurden vermehrt Membranrezeptoren für beispielsweise Progesteron, Östrogen oder Androgene untersucht, da sie für die Erforschung und Behandlung von verschiedenen Erkrankungen von großer Bedeutung sind bzw. sein können. Es ist zum Beispiel bekannt, dass der AR in Prostatazellen im Zusammenhang mit dem Prostatakarzinom steht. An den AR bindende zirkulierende Androgene können die Entwicklung, Differenzierung und das Wachstum der Prostata beeinflussen [Raynaud 2006]. Therapeutisch versucht man deswegen, die Menge an frei zirkulierendem Androgen zu minimieren oder mit Antagonisten die transkriptionelle Eigenschaft des AR zu blockieren. Ein eindeutiger Therapieerfolg konnte derzeit noch nicht verzeichnet werden [Krause et al. 2011]. Obwohl zu Beginn bereits Therapieerfolge beobachtet werden konnten, stellte sich heraus, dass einige AR Resistenzen aufbauten und sich zu einer metastasierten kastrations-resistenten Erkrankung (mCRPC) entwickelten. Die Molekularbiologie dieser mCRPC ist äußerst komplex und wird derzeit noch genauer untersucht [Tian et al. 2020]. Da eine Mehrzahl der mCRPC weiterhin auf Hormone ansprechen, ist der AR weiterhin ein klinisch relevantes, medikamentös zu behandelndes Ziel [Pelekanou and Castanas 2016].

1.2.4 Der G-Protein-gekoppelte Rezeptor

Unter dem Begriff des G-Protein-gekoppelten-Rezeptors (GPCR) versteht man eine Klasse von Rezeptoren, welche die Hormonwirkung über heterotrimere G-Proteine steuern. Es wurden mittlerweile über 800 unterschiedliche G-Protein-gekoppelte Rezeptoren beim Menschen beschrieben, die anhand der Sequenzhomologie, der Ligandenstruktur und Rezeptorfunktion in unterschiedliche Untergruppen unterteilt werden können [Horn et al. 2020]. Die Funktionen der GPCR sind sehr vielseitig und teilweise noch nicht genau erforscht. Oft besitzen die GPCR mehrere Bindungsstellen für unterschiedliche Liganden, die jeweils einen einzigartigen Effekt auf den Rezeptor besitzen. Diese ligandeninduzierte Konformationsheterogenität der GPCR ist der Grund für die vielfältige Funktionsweise der Rezeptoren [Ringel and Riemekasten 2021]. Unterschiedliche Moleküle wie Hormone, Lipide, Peptide, Chemokine, Geruchs- und Geschmacksstoffe und Neurotransmitter können an GPCRs binden und aktivieren verschiedene Signalwege, die das Wachstum, die Bewegung und die Angiogenese in normalen Zellen und Tumorzellen modulieren können [Premont and Gainetdinov 2007; Lappano and Maggiolini 2012]. Die klassische Struktur der Rezeptoren besteht aus

sieben Transmembranhelices und dient als Bindungsstelle für den Liganden (extrazellulär) und auch für das G-Protein (intrazellulär) (s. Abb. 8).

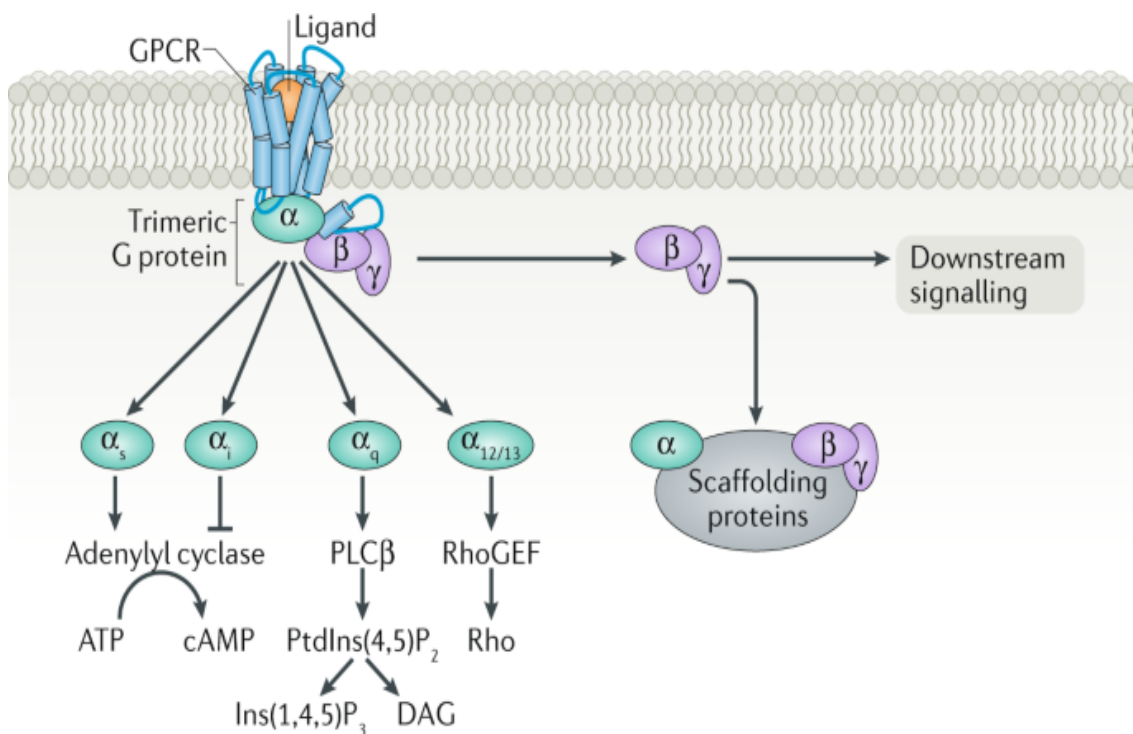


Abbildung 8: Struktur der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

ATP: Adenosintriphosphat, cAMP: zyklisches Adenosintriphosphat, Ga-Untereinheiten: Gas, Gai, Gaq, Ga12/13, GTP: Guanosintriphosphat, IP3: Inositol-Triphosphat, PLCβ: Phospholipase Cβ, DAG: Diacylglycerin (G-Protein-coupled receptor kinases as therapeutic target in the heart by [Pfleger et al. 2019])

Das G-Protein ist aus drei Untereinheiten aufgebaut (α , β und γ).

$G\alpha$ bindet je nach Zustand ein Guaninnucleotid und besitzt eine GTPase-Aktivität, durch die es in der Lage ist, Guanosintriphosphat (GTP) zu Guanosindiphosphat (GDP) und einem Phosphat zu hydrolysieren. Das intrazelluläre Signal wird maßgeblich von dem zellulären Effektormolekül und dem sekundären Botenstoff bestimmt, welches an die jeweilige α -Untereinheiten bindet [Luttrell 2006]. Insgesamt gibt es vier verschiedene $G\alpha$ -Untereinheiten, welche die heterotrimeren G-Proteine voneinander unterscheiden. G_s -Proteine führen zu einer Aktivierung und Stimulierung, wohingegen G_i einen inhibitorischen Effekt auf die Zelle hat. G_q -Proteine aktivieren durch die Bindung bestimmter Liganden das Effektormolekül Phospholipase Cβ, wodurch eine Erhöhung der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration resultiert.

Durch die Bindung bestimmter Liganden an die G_{12/13}-Proteine kommt es zu einer Aktivierung der RHO-GTPasen und Rho-Kinasen die eine Veränderung des Zytoskeletts bewirken [Ringel and Riemekasten 2021].

Die β- und γ-Untereinheit bilden zusammen einen stabilen Komplex und sind über einen Lipidanker in der Zellmembran befestigt. Kommt es zur Bindung eines Liganden, ändert sich die Konformation von Gα, wodurch das GDP durch GTP ersetzt wird.

Anschließend ist es Gγ möglich, sich von den restlichen Untereinheiten zu trennen und innerhalb der Membran zu diffundieren, bis es mit einem spezifischen Zielprotein interagiert. Die Aktivierung des Effektormoleküls, wie zum Beispiel die Adenylatcyclase (bei G_s oder G_i -Proteinen) oder Phospholipase C (bei G_q -Proteinen), hat zur Folge, dass weitere Signalstoffe (Second Messenger), wie zum Beispiel zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat (IP₃) aktiviert werden [Rassow et al. 2022]. Je nach Art des G-Proteins kann es zu einer Stimulierung oder zu einer Inhibierung kommen.

Der Hauptsignalweg der GPRC stellt die Signaltransduktion über die Adenylatcyclase dar. Dieses Enzym befindet sich in der inneren Zellmembran und sorgt mittels ihrer katalytischen Untereinheit für die Umwandlung von dem ubiquitär vorhandenen Adenosintriphosphat (ATP) zu cAMP. Ab einem gewissen cAMP-Spiegel kommt es zu einer ganzen Reihe verschiedener zellulären Reaktionen, wie auch zur Aktivierung/Inhibierung von Genexpressionen der Zelle. In den meisten Fällen führt der cAMP-Anstieg zu einer Aktivierung der Proteinkinase A, die nun in der Lage ist, spezifische Substrate zu binden und zu phosphorylieren. Damit wird eine spezifische Signalkaskade aktiviert, die letzten Endes weitere Effektorproteine modifiziert und zuletzt die gewünschte zelluläre Antwort induziert [Raynaud 2006; Ignatov et al. 2011; Ringel and Riemekasten 2021].

1.3 Die membrangebundenen Androgenrezeptoren ZIP-9 und GPRC6A

1.3.1 Übersicht von ZIP-9 und GPRC6A

Während die genomischen Effekte der klassischen Steroidhormonrezeptoren gut beschrieben und erforscht sind, ist das Wissen über die membrangebundenen Androgenrezeptoren, die eine schnelle, nicht primär genomische Steroidwirkung

initiiieren, begrenzt. Untersuchungen zeigen, dass Androgene einen raschen Anstieg von u.a. Kalzium, IP₃, cAMP oder Diacylglycerol verursachen können, was auf eine GPRC vermittelte Zellantwort hinweisen könnte [Sun et al. 2006; Foradori et al. 2008; Thomas et al. 2017]. Dies wurde bestätigt, indem z.T. GPRC-Inhibitoren eingesetzt wurden [Sun et al. 2006]. Ähnlich wie der nukleäre AR (nAR) wird die Expression und Aktivität der membran-assoziierten AR (mAR) hormonell reguliert, wodurch Unterschiede in den Expressionsniveaus resultieren.

ZIP-9 und GPRC6A gehören zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren, die erstmalig in Eizellmembranen von Pi et al. (GPRC6A) und Thomas et al. (ZIP-9) untersucht und nachgewiesen wurden [Pi et al. 2005, Berg et al. 2014; Thomas et al. 2014]. Beide können eine schnelle Androgen Wirkung initiieren [Pi et al. 2010; Buldan et al. 2016a; Toni et al. 2019]. Die membranassoziierten Steroidhormonrezeptoren konnten bereits im Hoden von Mensch und Tier nachgewiesen werden und zeigen keine Gewebespezifität [Pi et al. 2010; Thomas et al. 2018; Wang et al. 2022]. Da GPRC6A als potenzieller Bindungspartner für ZIP-9 fungiert, wurden beide mARs zusammenhängend und nicht einzeln beschrieben [Thomas et al. 2017].

Experimente mit BSA-konjugierten Steroidhormonen, die die Zellmembran nicht mehr über Diffusion durchdringen können, und die Verwendung von Zellsystemen mit fehlenden nARs oder nAR-Knockout-Zellmodellen lieferten Beweise für die nicht-genomische Signalwege, die an den Membranen von Keimzellen und Sertoli-Zellen initiiert werden können.

1.3.2 Der ZIP-9-Rezeptor

2014 wurde ZIP-9 erstmalig in Eierstockfollikelzellen des atlantischen Sägeblattfisches entdeckt, der Zinktransporter ZIP-9 Unterfamilie zugeordnet und als mAR identifiziert [Thomas et al. 2017]. Das ZIP-9-Membranprotein verfügt über eine einzelne Androgenbindungsstelle mit einer erhöhten Affinität für Testosteron [Berg et al. 2014]. Bei Untersuchungen mit Testosteron konnte eine Aktivierung von G-Proteinen und Second-Messenger-Signalwegen nach Bindung an ZIP-9 festgestellt werden, die wiederum zu einer erhöhten intrazellulären Konzentration von freiem Zink führten. Ebenfalls konnte bewiesen werden, dass ZIP-9 eine Testosteron-induzierte Apoptose in den Ovarfollikelzellen von Fischen und in menschlichen Krebszellen auslöst [Berg et al. 2014; Thomas et al. 2014]. Dies waren erste Hinweise auf eine direkte Wechselwirkung

zwischen nicht-klassischen Steroidhormonwirkungen und zinkabhängigen Signalwegen. ZIP-9 konnte vermehrt in entartetem Brust- und Prostatagewebe nachgewiesen werden, weshalb dieser Rezeptor von therapeutischer Bedeutung bei der Krebstherapien sein könnte [Hatzoglou et al. 2005; Thomas et al. 2014; Kalyvianaki et al. 2019; Thomas 2019]. In einer Studie von Buldan et al. konnte gezeigt werden, dass Testosteron in der humanen Prostatakrebs-Zelllinie LNCaP zu einer Zellproliferation führt und dass diese Effekte nicht durch den klassischen AR, sondern durch ZIP-9 vermittelt werden, da

des Weiteren wird vermutet, dass ZIP-9 zusammen mit anderen membranständigen Rezeptoren in viel höheren Konzentrationen vorliegt als der klassische nAR und somit erheblich zur geschlechtsspezifischen Pathobiologie von Melanomen oder auch anderen Tumorerkrankungen beitragen könnte. In der Studie aus dem Jahr 2017 von Thomas et al. wurde belegt, dass ZIP-9 sowohl in Brustkrebs- als auch in Prostatakrebs-Zelllinien als mAR und Zink-Transport fungiert und die Testosteron-induzierte Apoptose über MAPK- und Zink-abhängige Wege in diesen Zellen vermittelt wird [Thomas et al. 2017]. In einer weiteren Studie stellten Buldan et al. die Bedeutung des nAR in Bezug auf TJ und die BHS in Sertoli-Zellen in Frage [Buldan et al. 2016a; Kabbesh et al. 2022]. ZIP-9 vermittelt einen Testosteroneffekt, der die Expression von TJ-Proteinen und die TJ-Bildung in einer Sertoli-Zelllinie von Ratten fördert, bei denen der klassische AR fehlt [Kabbesh et al. 2022]. Durch die Bindung von Testosteron oder dem Peptid IAPG an ZIP-9 kommt es zu einer Phosphorylierung von CREB/ATF1 durch ERK1/2. Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei der Stimulierung der Expression von TJ-assoziiertem Claudin-11 und dem Junctional Adhesion Molecule 3 (JAM-3) gemacht werden [Buldan et al. 2016a; Kabbesh et al. 2022; Wang et al. 2022]. Claudin-11 befindet sich bei intakter Spermatogenese zwischen Sertoli-Zellen und ist eine Komponente der Sertoli-Zellkontakte. Bei gestörter Spermatogenese und prä-invasivem Keimzelltumor wurde jedoch festgestellt, dass sich die Menge an basal lokalisiertem Claudin-11 erhöht, jedoch der Zell-Zell-Kontakt stabil ist und die Bildung spezifischer paralleler TJ-Stränge der BHS nicht gestört ist [Fink et al. 2009; Stammler et al. 2016].

Zusammenfassend kann man also sagen, dass ZIP-9 eine wichtige Rolle bei der intakten Spermatogenese spielt, indem es die Expression von TJ-Proteinen fördert, und die TJ-Bildung positiv beeinflusst. Bei einem Versuch, die Expression von ZIP-9 in Ratten-Sertoli-Zellen durch siRNA Interferenz zu unterdrücken, konnte ein vollständiger

Ausfall von Erk1/2-, CREB und AFT-1-Phosphorylierung sowie so der Stimulation der Claudin-Expression und der TJ-Bildung nachgewiesen werden [Bulldan et al. 2016a]. Bei Hunden, die durch ein Gonadotropin-Implantat chemisch kastriert wurden, konnte gezeigt werden, dass die Expression von ZIP-9 im Hoden vermindert, die des nAR allerdings unverändert war. Das deutet darauf hin, dass ZIP-9 an der Testosteronwirkung im Hoden maßgeblich beteiligt ist [Bulldan et al. 2016b].

1.3.3 Der GPRC6A-Rezeptor

Der GPRC6A-Rezeptor ist ein weit verbreiteter Kalzium- und Aminosäure-sensitiver GPRC, der in den β -Zellen des Pankreas stark exprimiert wird, aber auch in anderen Geweben vorkommt (Pi et al. 2011). GPRC6A konnte bereits in Leberhepatozyten, im Skelettmuskel, in der Prostata, in Osteoblasten, in Hautkeratinozyten und in den Leydig-Zellen des Hodens nachgewiesen werden [Khonsari et al. 2011; Karsenty et al. 2014; Mera et al. 2017]. Im Vergleich zu ZIP-9 zeigt GPRC6A eine geringere Ligandenspezifität für Testosteron, sondern akzeptiert eine große Bandbreite an möglichen Liganden, wie zum Beispiel Osteocalcin (OCN), L-Aminosäuren, SHGB oder Calcium [Pi et al. 2010; Pi and Quarles 2012; Rueda et al. 2016; Jacobsen et al. 2017; Toni et al. 2019]. Aus diesem Grund konnten dem Rezeptor bisher unterschiedliche biologische Prozesse zugeschrieben werden und es besteht die Möglichkeit, dass GPRC6A auch eine Bedeutung bei der Tumorprogression hat [Wang et al. 2014].

GPRC6A wurde erstmals an Mäuse-Modellen genauer untersucht. Hierbei konnte festgestellt werden, dass der Rezeptor durch die Freisetzung von Hormonen und Botenstoffen, wie zum Beispiel Insulin, GLP-1, Testosteron und IL-6, einen direkten Einfluss auf den Fett- und Glucosestoffwechsel in Leber, Skelettmuskulatur und Fettgewebe hat. Die Knochen-, Herz-Kreislauf-, Immun- und Hautfunktion von GPRC6A wurde auch bei Mäusen bestätigt [Clemmensen et al. 2013; Smajilovic et al. 2012; Jacobsen et al. 2017; Jørgensen and Bräuner-Osborne 2020].

Man vermutet, dass GPRC6A ein Regulator des Glucosestoffwechsels und der Knochenhomöostase ist sowie an der Pathophysiologie verschiedener Krankheiten beteiligt sein könnte [Pi et al. 2011; Pi et al. 2021]. Es gibt auch viele Studien zur medikamentösen Manipulation von GPRC6A im Tiermodell. Eine Translation dieser

Studien auf den Menschen ist allerdings noch nicht erfolgt. Für diese Arbeit steht der Zusammenhang von OCN, Testosteron und dem GPRC6A-Rezeptor und dessen Lokalisierung im humanen Hoden im Vordergrund, weshalb die β -Zellfunktionen vernachlässigt wird.

Im Jahr 2007 wurde das Konzept des OCN/ GPRC6A-Netzwerkes veröffentlicht und beschäftigt sich mit der Beobachtung, dass es bei OCN-null-Mäusen zu einer erhöhten Knochenbildung und einem Phänotyp kommt, der dem metabolischen Syndrom ähnelt. [Lee et al. 2007; Pi et al. 2021]. GPRC6A ist nachweislich im ganzen Körper das einzige Ziel von hormonell aktivem OCN. Durch die Bindung von OCN an GPRC6A konnte in Mäusemodellen zum einen eine Regulierung der β -Zellfunktion nachgewiesen werden, die zu einer Insulinproduktion und -sekretion führte, als auch eine allgemeine Regulierung des Glukose- und Fettstoffwechsels durch die Freisetzung verschiedenen metabolisch aktiven Hormonen (für einen Überblick s. [Pi et al. 2005; Pi et al. 2016; Pi et al. 2021]).

Verschiedene Gruppen befassen sich mit der Verbindung zwischen OCN und der Testosteronsynthese [Moriishi et al. 2020; Pi et al. 2021]. Mit Hilfe einer Studie von Khonsari et al. konnte erstmalig bewiesen werden, dass der Knochenstoffwechsel und reproduktive Funktionen miteinander verknüpft sind [Khonsari et al. 2011].

In einer weiteren Studie von 2011 wurde der Zusammenhang bei pubertierenden Jungen zwischen den Serum-OCN und T-Spiegel untersucht. Die Ergebnisse stimmten mit den Ergebnissen aus Mäuse-Studien überein, die für OCN eine wichtige Rolle bei der Regulation der T-Produktion und indirekt der Fruchtbarkeit männlicher Mäuse gezeigt haben [Kirmani et al. 2011]. Zusätzlich vermutet man, dass OCN die T-Produktion vor allem während der Pubertät, auf Grund des erhöhten LH-Spiegels, steigern kann. Nach der Pubertät wird vermutet, dass die Wirkung von OCN nachlässt und die T-Produktion hauptsächlich von LH gesteuert wird, weshalb postpubertär kein Zusammenhang zwischen OCN- und T-Spiegel beobachtet werden kann. Da GPCR6A auch nicht-genomische Wirkungen von Testosteron zu vermitteln scheint, ist es möglich, dass durch einen steigenden T-Spiegel in der Spätpubertät eine negative Rückkopplung auf den Hoden auftritt. Somit wird die Stimulation der T-Produktion durch OCN abgeschwächt. Es ist jedoch klar, dass weitere Studien sowohl an Nagetieren als auch am Menschen erforderlich sind, um diese Hypothese zu prüfen und die mögliche(n) Wechselwirkung(en) zwischen LH und OCN und die Rolle von GPRC6A im Hoden zu bewerten [Kirmani et al. 2011].

2019 wurde in einer Studie von Çoşkun et al. der Zusammenhang zwischen OCN und der Testosteron-Synthese in Leydig-Zellen untersucht. Man konnte feststellen, dass durch die Unterdrückung von LH aufgrund eines GnRH-Antagonisten, eine Abnahme des T-Spiegels und damit auch eine negative Beeinflussung von OCN resultiert. Es wurde erstmals unter *in vivo*-Bedingungen die Beziehung zwischen OCN und Testosteron nach Leydig-Zellzahlen und Leydig-Zellfunktion während Entwicklung der adulten Leydig-Zellen untersucht.

Es wurde festgestellt, dass OCN die T-Synthese bei Patienten mit einem LH-Mangel moderat stimuliert, ein Haupteffekt jedoch konnte nur bei Probanden beobachtet werden, die einen normalen LH-Spiegel hatten. Resultat dieser Studie war, dass OCN die Funktion der Leydig-Zellen verbessert, aber nicht zu einem Anstieg der Leydig-Zellen führt [Çoşkun et al., 2019].

Andere Studien haben die Annahme in Frage gestellt, dass OCN/GPRC6A ein endokrines Netzwerk bildet und den Energiestoffwechsel beeinflussen kann, da mit OCN- und GPRC6A-Knockout-Tiermodellen keine Stoffwechselunterschiede beobachtet werden konnten [Wellendorph et al. 2009; Jørgensen and Bräuner-Osborne 2020; Pi et al. 2021]. Eine Ursache für die Diskrepanz könnte jedoch die zu niedrige Kalziumkonzentration während der Ligandenaktivierung sein. So konnten Pi et al. in ihrer Studie zeigen, dass die Anwesenheit von Kalzium eine zwingende Voraussetzung für die OCN- und T-gesteuerte Aktivierung von GPRC6A in kultivierten Zellen ist und das somit negative *in vivo*-Studien auf das Fehlen von Kalzium in den Kulturmedien zurückzuführen sein könnte [Pi et al. 2021]. Es sind Interventionsstudien beim Menschen erforderlich, um die Rolle von OCN bei der Regulation des Energiestoffwechsels und dessen hormonelle Funktion genauer zu untersuchen [Pi et al. 2021].

Andere Studien wiederum zeigten bei einer Ablation von GPRC6A in Mausmodellen eine Vielzahl verschiedener Stoffwechselanomalien, die mehrere Organsysteme betreffen. Durch das Fehlen des GPRC6A-Rezeptors im Hoden konnte eine Verweiblichung und primäre Hodeninsuffizienz der männlichen Mäuse beobachtet werden, die mit einer erhöhten Fettmasse, einem erhöhtem Östradiol- und einem reduzierten Testosteronspiegel einhergehen [Pi et al. 2008; Pi et al. 2010; Pi and Quarles 2012; Wang et al. 2014]. Eine weitere Studie von Jørgensen und Bräuner-Osborne konnte eine Feminisierung der männlichen Mäuse, gemessen an verringertem genito-analem Abstand, der Hodengröße und -gewicht sowie dem Gewicht der

Samenblase bei Exon-II-GPRC6A-KO-Modellen zeigen [Jørgensen and Bräuner-Osborne 2020]. Obwohl die Ergebnisse zwischen den Knockout-Mausmodellen variieren, deuten sie insgesamt auf eine Beteiligung von GPRC6A am Energiestoffwechsel und der endokrinen Regulation hin [Khonsari et al. 2011; Pi et al. 2011; Clemmensen et al. 2013]. Es besteht die Möglichkeit, dass der menschliche Rezeptor *in vivo* anders reagiert als der des Mauseklons, der für die Studien verwendet wurde.

Ebenfalls zeigt GPRC6A eine erhöhte Expression in kultivierten Prostatakrebszellen. Eine Hemmung des Rezeptors führte zu einer verminderten Proliferation dieser Zellkulturen [Pi et al. 2017; Kalyvianaki et al. 2019]. Es konnte in einer Studie von Jørgensen et al. festgestellt werden, dass durch die Deletion von GPRC6A die Überlebensrate von Mäusen mit dem transgenen Adenokarzinom (TRAMP) erhöht werden konnte. Durch die Deletion von GPRC6A bei TRAMP-Mausmodellen konnte nach 30 Wochen eine normale Prostatahistologie und eine verbesserte Überlebenswahrscheinlichkeit nachgewiesen werden. Dies bestärkt die Annahme, dass GPRC6A eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und dem Fortschreiten von Prostatakrebs spielt und dass der Verlust der GPRC6A-Funktionalität vor Prostatakrebs schützen kann [Jørgensen and Bräuner-Osborne 2020].

Die große Bandbreite an GPRC6A-Liganden sowie die Bindung mehrerer Liganden gleichzeitig erschwert die Interpretation von Ergebnissen. So kann nach bisherigen Erkenntnissen GPRC6A ein Hauptregulator verschiedener Stoffwechselprozesse sein (s. Abb. 9) – oder GPRC6A bzw. *loss-of-function* Varianten haben beim Menschen keine oder nur untergeordnete biologische Bedeutungen [Pi and Quarles 2012].

Weitere Untersuchungen werden zeigen, ob GPRC6A bei der Entwicklung von Tumorthérapien eine Rolle spielen kann [Pi et al. 2017]. Die Funktion und klinische Bedeutung von GPRC6A beim Menschen ist trotz einer Vielzahl von Studien weitestgehend unklar.

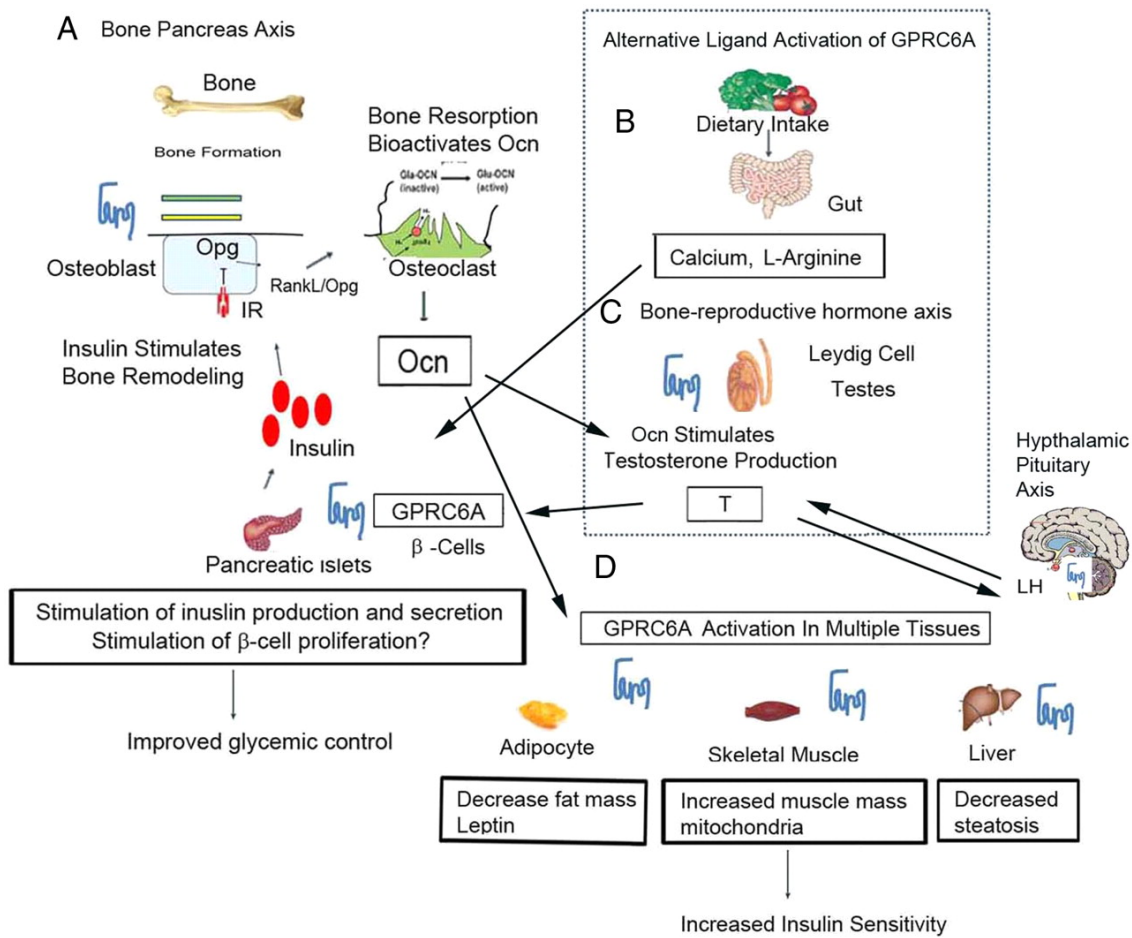


Abbildung 9: Die unterschiedlichen biologischen Aktivitäten des GPRC6A-Rezeptors nach Pi und Quarles 2012

(A) Bei der Knochenresorption wird OCN freigesetzt, welches GPRC6A aktiviert und somit die Insulinsekretion in den β -Zellen des Pankreas reguliert, den Glukose- und Fettstoffwechsel im Muskel und der Leber aktiviert und weitere stoffwechselregulierende Hormone freisetzt. Insulin wiederum stimuliert den Kalziumstoffwechsel und führt dadurch zu einer Freisetzung von bioaktiven OCN. GPRC6A ist auch ein gemeinsamer Rezeptor von Testosteron (C) und alternativen Liganden (B). Zusätzlich beeinflusst er auch mehrere endokrine Netzwerke (D).

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Expressionsmuster beider mARs auf mRNA- und Proteinebene zu untersuchen und Informationen über die zelluläre Lokalisation im humanen Hoden zu erhalten. Neben der Lokalisation sollten auch Zusammenhänge zwischen männlicher Infertilität und den mARs untersucht werden, indem die mARs bei azoospermen Patienten mit verschiedenen testikulären Phänotypen lokalisiert werden sollten. Während die meisten Studien mit Tier- oder Zellkulturmodellen arbeiten [Pi et al. 2008; Pi et al. 2010; Wang et al. 2014; Buldan et al. 2016b], wurde in dieser Arbeit ausschließlich humanes Hodengewebe verwendet, um eine potenzielle Bedeutung der mARs auf die Fertilität und Möglichkeiten der translationalen Forschung zu prüfen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Patientenproben

Die Hodenbiopsien wurden unter Vollnarkose und nach schriftlicher Einverständniserklärung im Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie der Universität Münster und in der Abteilung für Urologie, Kinderurologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität in Gießen entnommen. Indiziert waren die Hodenbiopsien nach Diagnose einer Azoospermie beziehungsweise bei Verdacht auf Keimzellneoplasie (Ethik-Votum Nr. 153/16 und 26/11). Die Hodenbiopsien wurden entweder für die histologische Analyse in Bouin'scher Lösung über Nacht fixiert und in Paraffin eingebettet bzw. für molekularbiologische Analysen in flüssigem Stickstoff gelagert. Verwendet wurden n=16 Biopsien, die mittels histologischer Beurteilung und Score-Count Analyse [Fietz und Kliesch, 2022] in Biopsien mit normaler Spermatogenese (Nsp, n=5), Sertoli-cell-only-Phänotyp (SCO, n=5) und GCNIS (n=6) klassifiziert wurden. Die dazu benötigte Herstellung der Schnitte und die histologische Übersichtsfärbung (s. 2.2.1 Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung) wurde am Institut für Veterinär Anatomie der Justus-Liebig-Universität Gießen von Frau Alexandra Hax durchgeführt.

2.1.2 Arbeitsgeräte und Reagenzien

Die verwendeten Reagenzien, Geräte und Lösungen sind im Anhang 8.2.3 und 8.2.4 aufgelistet.

2.2 Methoden

2.2.1. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) ist ein sehr verbreitetes Färbeverfahren zur Auswertung histologischer und zellulärer Strukturen. Sie ist die am häufigsten verwendete Übersichtsfärbung. Das Prinzip der Färbung beruht auf der Kombination von zwei unterschiedlichen Einzelfärbungen, anhand derer die morphologischen Strukturen untersucht werden können. Hämatoxylin ist ein aus dem Blauholzbaum,

Haematoxylum campechianum, gewonnener natürlicher Farbstoff. Durch die Oxidation des Hämatoxylin entsteht Hämatein, welcher der eigentliche Farbstoff für die HE-Färbung ist. Anschließend wird ein Beizmittel zugesetzt, welches die Kapazität des Hämateins zur Bindung von anionischen Gewebekomponenten erhöht. Das klassische und meistverwendete Beizmittel ist Aluminiumammoniumsulfat (Alaun oder Alum), welches eine Rotfärbung auslöst, der zusätzlich eine schwach basische Lösung zugesetzt wird und damit eine blaue Färbung auslöst. Allgemein werden alle basophilen/ sauren Strukturen somit blau gefärbt- hierzu gehören Strukturen wie der Zellkern, die darin enthaltene DNA und das mit Ribosomen angereicherte raue endoplasmatische Retikulum. Eosin dagegen ist ein saurer, gelbroter, synthetisch hergestellter Xanthinfarbstoff, der in den Zellen von den mehr basischen Plasmaproteinen gebunden wird. Somit werden azidophile Strukturen, wie das Zytoplasma oder die Kollagenfasern, rot gefärbt [Mulisch and Welsch 2015]. Vor Beginn der Färbung durchlaufen die Objektträger mit den 5 µm dicken Paraffinschnitten eine absteigende Alkoholreihe in Xylol (2x 15 Minuten) und Ethanol (100 %, 96 %, 90 % und 70 %, jeweils 5 Minuten). Bevor die Schnitte mit filtriertem Hämalan (nach Mayers s.Tab 8.2.5.) gefärbt wurden, wurden sie nochmals 5 Minuten in Aqua dest. rehydriert. Das filtrierte Hämalan wurde für circa 30 Sekunden auf die Schnitte gegeben. Danach erfolgte das sog. „Bläuen“ der Schnitte unter fließendem Leitungswasser für 15 Minuten. Die Schnitte wurden anschließend nochmal mit Aqua dest. gespült und dann in Erythrosin (0,5 %ig, s.Tab 8.2.5.) für 2-5 Minuten gefärbt. Abschließend wurden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol für circa 2 Minuten dehydriert und mit Permout (Eukitt, Faust) eingedeckelt.

2.2.2 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion wurde an Schnitten (NSP und SCO) oder an kryokonservierten Gewebeproben (GCNIS) durchgeführt. Die Extraktion von mRNA aus Schnitten wurde mit dem RNeasy Micro FFPE Kit gemäß der Herstellerempfehlung (Qiagen, Hilden, Germany) und wie in vorangegangenen Publikationen durchgeführt [Fietz et al., 2011; Fietz et al., 2014]. Vorbereitend auf die RNA-Extraktion wurde der RPE Puffer, der als Konzentrat geliefert wird, mit der vierfachen Menge an 96-100 % Alkohol verdünnt, um eine Arbeitslösung zu erhalten. Ebenso wurde in der DNase I-Stammlösung 550 µl RNase-free-water hinzugegeben. Diese wurde anschließend aliquotiert und bei -20 °C

eingefroren. Mittels eines Mikrotoms wurden 10 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt und je nach Größe der Biopsie wurden 2-10 Schnitte in ein 2ml-Tube überführt. In die Tubes wurde jeweils 1 ml Xylol gegeben und gevortext. Darauf folgte eine 2 minütige Zentrifugation bei 14.000 UpM, der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Es folgte die Zugabe von 1 ml 100% Ethanol auf das Zellpellet und die erneute Zentrifugation bei 14.000 UpM für 2 Minuten. Der Überstand wurde abpipettiert und der Restalkohol durch Inkubation der Probe bei 37 °C evaporiert. Im nächsten Schritt wurden die Pellets in 240 µl PKD-Puffer (RNeasy-Kit) und 10 µl Proteinkinase K resuspendiert um die Formalinverlinkungen im Gewebe zu lösen. Die Proben wurden nun für jeweils 15 Minuten bei 56 °C und 80 °C inkubiert. Nach 3 Minuten auf Eis wurden die Proben für 15 Minuten bei 13.500 UpM zentrifugiert. Der Überstand, der nun die gelöste RNA enthielt, wurde in ein neues 2,0 ml-Tube überführt und mit jeweils 25 µl DNase Booster Buffer und 10 µl DNase 1-Stammlösung aus dem FFP2 Kit vermennt. Die Proben wurden für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 500 µl RBC-Puffer und 1.200 µl 100% Alkohol hinzugeben und vorsichtig mit der Pipette vermischt. 700 µl der Probe wurden in ein RNeasy MinElute spin column überführt und für 15 Sekunden bei 10.000 UpM zentrifugiert. Dadurch band die RNA an die Membran. Die Flüssigkeit wurde verworfen und die Zentrifugation so lange wiederholt, bis die gesamte Flüssigkeit durch die Säule gefiltert war. Im Anschluss wurden 500 µl RPE-Puffer zum Waschen der RNA auf die Membran gegeben und erneut für 15 Sekunden bei 10.000 UpM zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt. Nachfolgend wurde die Säule in ein neues 2 ml collection tube überführt und mit offenem Deckel für 5 Minuten bei 14.000 UpM zentrifugiert. Das entstandene Filtrat und die Tubes wurden verworfen. Zuletzt wurden die Säule in ein 1,5 ml Tube überführt und 14-30 µl RNase-freies Wasser wurde direkt auf die Membran pipettiert. Im letzten Schritt wurde das Tube für 1 Minute bei Full-Speed zentrifugiert, die gelöste RNA aus dem Tube pipettiert und bei -80 °C eingefroren.

2.2.3 DNase Behandlung

Zu Beginn wurde der gesamte Arbeitsplatz mit Ethanol gereinigt. In einem 1,7 ml Tube wurde der DNase-Mix für 6 Proben zusammengemischt. Dieser setzte sich wie folgt zusammen:

DNase Mix		µl/Reaktion	Reaktionen + 1	Für Mix
DNaseI Puffer	10 x	2	7	14
DNaseI, RNase free	10 U/µl	1	7	7
RNase Inhibitor	40 U/µl	0,25	7	1,75

Danach wurden jeweils 1,65 µl RNA mit 5 µl bidestilliertem H₂O vermengt um ein Gesamtvolumen von 6,65 µl RNA/H₂O zu erhalten und mit 3,25 µl DNase-Mix vermischt. Der Verdau der genomischen DNA erfolgte in einem PCR Cycler unter folgenden Bedingungen:

37°	25 min
75°	5 min
4°	Pause

2.2.4 Reverse Transkription

Für die Herstellung von komplementärer DNA (cDNA) aus der RNA wurde das GeneAmp Gold RNA PCR Core Kit verwendet. Um auszuschließen, dass sich in der cDNA und der nachfolgenden PCR-Reaktion noch genomische DNA befindet, wurde bei der reversen Transkription ein RT⁺ und ein RT⁻ Ansatz gewählt. Während bei der RT⁺ das Enzym hinzugefügt wurde, wurde es bei der RT⁻ durch steriles Bidest ersetzt. Der Mix setzte sich zusammen aus:

Bestandteile	Stammlösung	Gesamt RT+	Gesamt RT-
MgCl ₂	25 mM	84	8,4
PCR Puffer	10 x	42	4,2
dNTP Mix	10 mM	42	4,2
Random Hexamer	50 mM	21	2,1
RNAse Inhibitor	20 U/μl	21	2,1
RNAse free H ₂ O		126	14,7
Multiscribe		21	/

Für die RT+ wurden 51 μl RT+-Mix mit 9 μl DNase-behandelter RNA, für die RT- dagegen 5,1 μl RT--Mix mit 0,9 μl DNase-behandelter RNA vermischt. Die reverse Transkription erfolgte im PCR-Cycler unter folgenden Bedingungen:

21°C	10 min
42°	15 min
99°	5 min
5°	5 min
4°	Pause

Die cDNA wurde nun bei -20 °C bis zum Einsatz in der RT-PCR aufbewahrt.

2.2.5 Die reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) dient der Vervielfältigung und dem Nachweis eines exprimierten Gens. Zur zyklischen Vervielfältigung wird eine thermostabile DNA-Polymerase benötigt, die ausgehend von zwei synthetischen DNA-Oligonucleotiden (Primern) den gewünschten DNA-Abschnitt synthetisiert. Je nach Zielgen wurden passende Forward- und Reverse-Primer entworfen (8.2.1 Tabelle 1). Die Primerpaare wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Neben den Primern, der Polymerase und der cDNA benötigt man auch ein Gemisch aus Desoxynucleotidtriphosphaten (dNTPs), PCR Puffer und Magnesiumchlorid (MgCl₂). Für diese Arbeit wurde die AmpliTaq Gold™ DNA

Polymerase, LD (Low DNA) mit Gold Buffer und MgCl₂ (Applied Biosystems, Katalognummer 4338856) verwendet. Je nach Anzahl der Proben wurde der Master-Mix angesetzt und auf die Reaktionsgefäße verteilt. Der RT-PCR Mix für eine Reaktion setzte sich wie folgt zusammen:

10* PCR Gold Puffer	2,5 µl
MgCl ₂ 25mM	2 µl
dNTP's	1 µl
Primer for.	1 µl
Primer rev.	1 µl
Taq Gold	0,15 µl
H ₂ O	12,35-16,35 µl
Mix	20-24 µl
cDNA, NTC	1-5 µl
Gesamt	25 µl

Anschließend wurde die cDNA hinzugefügt und gemischt. Der Erfolg der reversen Transkription und die Qualität der cDNA wurde durch Vervielfältigung des Referenzgens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) kontrolliert. Die Vervielfältigung der cDNA erfolgte im Thermocycler unter folgenden Parametern:

Denaturierung (zyklische Wiederholung)	95 °C
Annealing	60 °C
Elongation der Taq-Polymerase	72 °C
Abkühlung/Lagerung	4 °C

Nach Beendigung des Programmes wurden die Produkte entweder direkt gelelektrophoretisch analysiert oder bei 4 °C gelagert.

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Visualisierung der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Durch Anlegen einer Spannungsquelle entsteht ein elektrisches Feld, in dem die negativ geladenen cDNA-Amplifikate in Richtung der Anode wandern und sich ihrer Größe

nach auftrennen. Für den Nachweis im UV-Licht wurde ein fluoreszierender Farbstoff hinzugefügt. Das Agarosegel wurde je nach erwarteter Größe der DNA-Fragmente hergestellt. Für unsere Proben wurde ein 22-prozentiges Agarosegel verwendet, für das 2,4 mg Agarose mit 120 ml 10x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) in der Mikrowelle aufgeköcht wurde, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Zu der etwas abgekühlten Lösung wurden 1,2 µg GelGreen Nucleid Acid Stain (10.000x in Water) gegeben und in den zuvor zusammengesetzten Schlitten gegossen. Während das Gel auspolymerisiert, wurden zu den Proben 5 µl Ladepuffer gegeben. Dieser diente zur Erhöhung der Dichte der Proben, um somit ein leichteres Pipettieren in die Geltaschen zu gewährleisten. Nach vollständiger Verfestigung wurde der Schlitten in eine Elektrophorese-Kammer gegeben, welche mit 10x TAE Puffer gefüllt war und das gesamte Gel bedeckte. In die erste und letzte Geltasche wurden 5 µl eines 50 bp Markers gegeben. Das Gel wurde für 60 Minuten einer Spannung von 140 V ausgesetzt. Nach Ende des Prozesses wurde das Gel in eine UV-Kammer gegeben, um die Banden sichtbar zu machen und photographisch festzuhalten.

2.2.7 Nachweis von nAR und mAR mittels Immunhistochemie

Für die immunhistologische Untersuchung mussten die in Paraffin eingebetteten Biopsien auf einen Objektträger überführt werden. Hierfür wurden die zuvor gekühlten Paraffinblöcke auf ein Rotationsmikrotom eingespannt und 5µm dünne Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden in ein 40 °C warmes Wasserbad überführt und mit einem sialinisierten Objektträger aufgefangen. Auf jeden Objektträger wurden zwei Schnitte aufgezogen, einer für die Positiv- und einer für die Negativkontrolle (kein Primärantikörper). Anschließend wurden die Schnitte über Nacht zur Anheftung und Trocknung in einem Trockenschrank bei 37 °C gelagert.

Zum Nachweis von nAR und mARs wurden die Schnitte aller Proben mit dem jeweiligen Primärantikörper gegen ZIP-9, GPRC6A und nAR (8.2.2 Tabelle 2) inkubiert und das jeweilige Zielantigen mit dem AEC Substrat Kit (AE002-3, Biologo, Kronshagen, Deutschland) angefärbt. Vor dem Einsatz der Antikörper wurden die Schnitte in Xylol (2x 15 Minuten) und einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 96 %, 90 % und 70 %, jeweils 5 Minuten) entparaffiniert. Die Freisetzung der Antigene (antigen retrieval) erfolgte entweder mittels Kochens in Zitratpuffer (ZIP-9, GPRC6A) oder in Tris-EDTA-Puffer (nAR). Hierfür wurde das Gewebe für 15 Minuten in einer

Mikrowelle erhitzt. Nachdem die Schnitte für circa 20 Minuten abgekühlt wurden, wurden sie 5 Minuten mit Waschpuffer (TBST) gespült und 15 Minuten zur Blockierung der endogenen Peroxidase in 3 % H₂O₂ gelagert. Danach erfolgte ein weiterer Waschschrift mit dem Waschpuffer (3x 5 Minuten) und eine 30-minütige Inkubation in Bovinem Serumalbumin (BSA). Die Behandlung mit BSA dient der Blockierung von nicht-spezifischen Protein-Protein-Interaktionen zwischen den Antikörpern und unspezifischen Antigenen im Gewebe.

Die Primärantikörper wurden in folgenden Verdünnungen eingesetzt: ZIP-9 1:50, GPRC6A 1:150 und nAR 1:50 (8.2.2 Tabelle 2). Als Negativkontrolle diente die Inkubation mit BSA oder TBST. Die Inkubationszeit betrug 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank. Einen Einfluss auf die Ergebnisse hatte die Inkubationszeit nicht. Anschließend wurden die Proben erneut dreimal für 5 Minuten mit TBST gewaschen und der Sekundärantikörper aufgetragen (8.2.2 Tabelle 2). Bei ZIP-9 und nAR wurde der Goat anti Rabbit in einer Verdünnung von 1:400 und bei GPRC6A der Goat anti Rabbit in einer Verdünnung von 1:600 verwendet. Der Sekundärantikörper wurde sowohl auf die Negativ- als auch auf die Positivkontrolle aufgetragen. Im Anschluss an die einstündige Inkubationszeit wurden die Proben 3x 5 Minuten mit TBST gewaschen und unter dem Abzug mit AEC angefärbt. AEC ist ein Chromogen, welches ein rotes, unlösliches Farbprodukt bildet und somit die Visualisierung des Antigen-Antikörper-Komplexes ermöglicht. Sobald eine deutliche Färbung unter dem Mikroskop zu erkennen war, wurde die Farbreaktion durch Spülen mit destilliertem Wasser für 3x für 5 Minuten gestoppt. Zum Schluss erfolgte eine Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämatoxylin für circa 30 Sekunden. Die Schnitte wurden nun unter laufendem Leitungswasser gebläut. Zuletzt wurden die Objektträger unter dem Abzug getrocknet und mit Eindeckmedium und einem Deckgläschen verschlossen. Vor dem Mikroskopieren wurden die Präparate 24 Stunden getrocknet.

3. Ergebnisse

3.1 H.E-Färbung

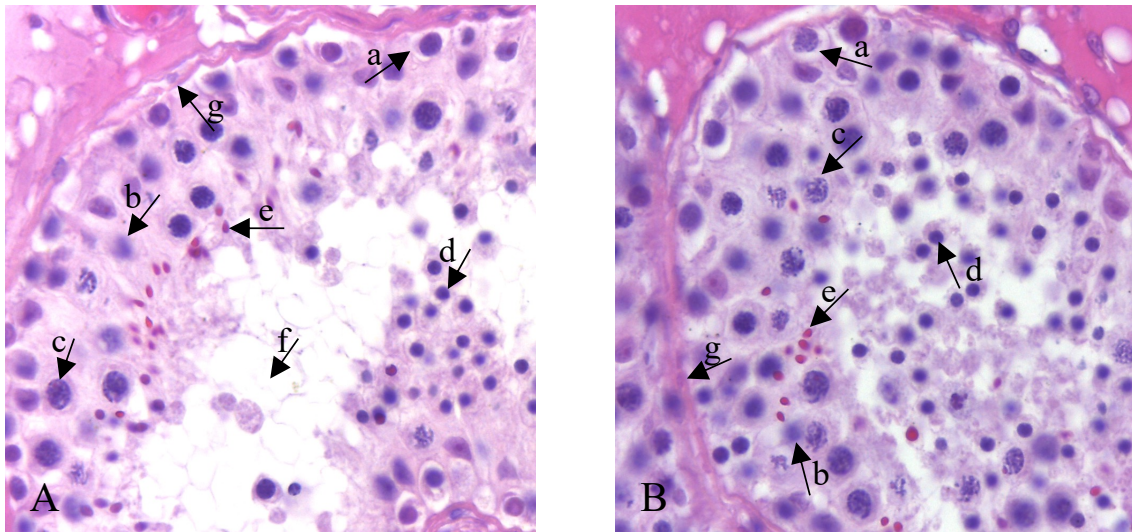


Abbildung 10: Lichtmikroskopische Darstellung NSP

A&B= NSP Lichtmikroskopische Darstellung Anschnitt Keimtubulus, H.E-Färbung,
Originalvergrößerung x400

a=Spermatogonie, b=Sertoli-Zelle, c=Primärer Spermatozyt, d=runde Spermatisden,
e=elongierte Spermatisde, f=Lumen, g=Myofibroblast

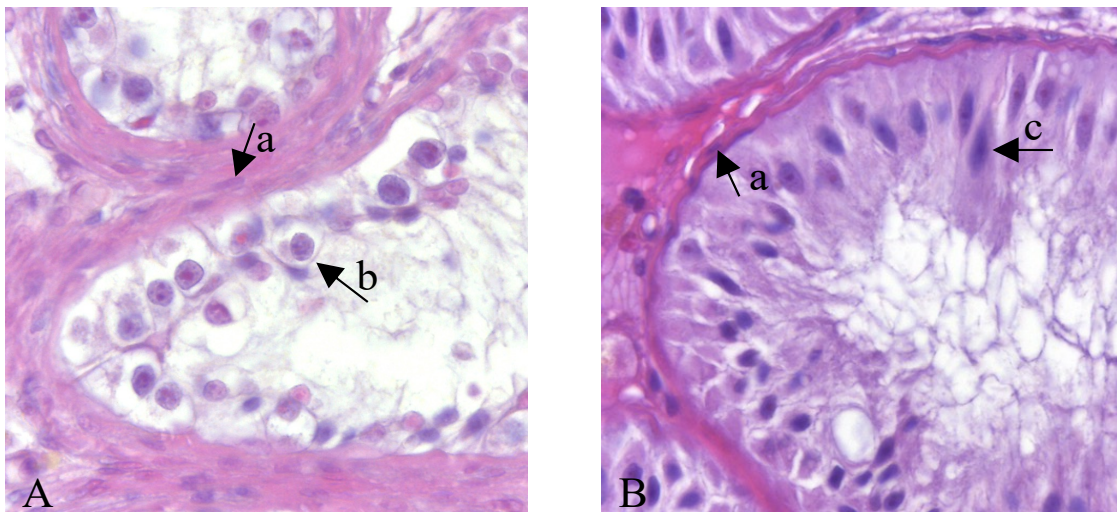


Abbildung 11: Lichtmikroskopische Darstellung GCNIS und SCO

A= GCNIS Lichtmikroskopische Darstellung Anschnitt Keimtubulus, B= SCO
Lichtmikroskopische Darstellung Anschnitt Keimtubulus, H.E-Färbung,
Originalvergrößerung x400

a=Myofibroblast, b=GCNIS-Zelle, c=Sertoli-Zelle

3.2 Qualitative Expressionsanalyse mittels RT-PCR

Alle RT+ Proben zeigten das Vorhandensein des Referenzgens GAPDH (s. Abb. 12), während die RT- Proben negativ waren (nicht gezeigt). Die cDNA konnte deswegen für den Nachweis der mAR und nAR verwendet werden.

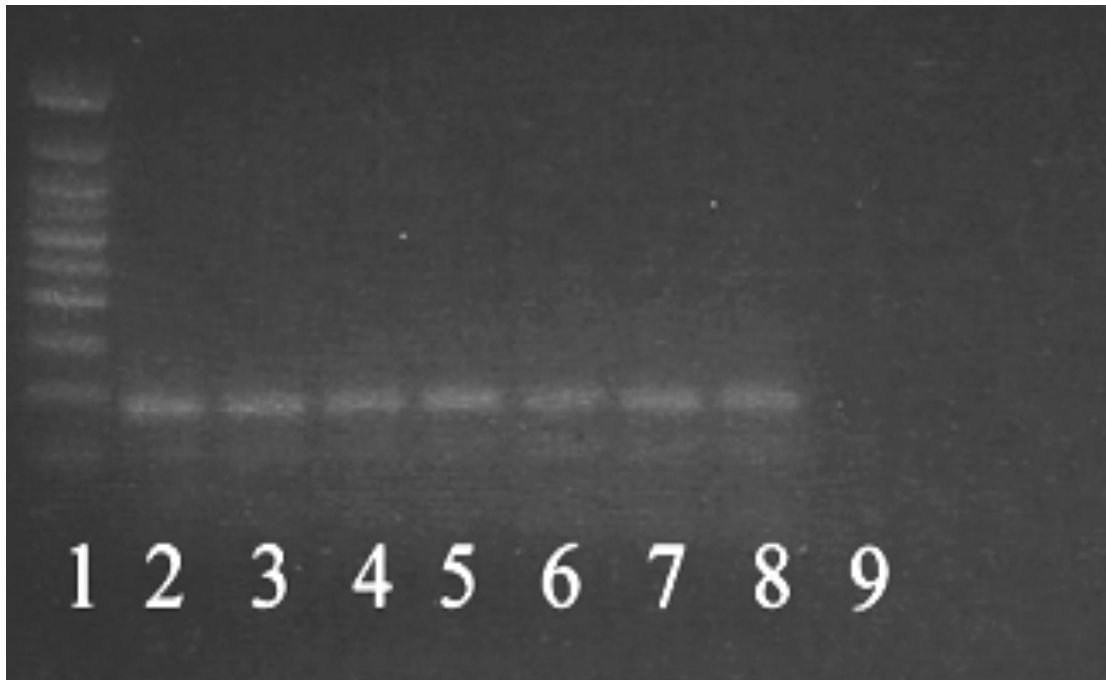


Abbildung 12: PCR mit dem Housekeeping-Gen GAPDH

1= 50 Basenpaarmarker (bp), 2-8= RT+ GCNIS-Proben, 9= *no template control* (NTC)

3.2.1 Der nukleäre Androgen-Rezeptor

Der nAR konnte in allen NSP- und SCO-Proben nachgewiesen werden (s. Abb. 13). Bei GCNIS hingegen konnte nur bei vier von insgesamt sechs Proben eine diskrete Bande beobachtet werden (s. Abb. 16).



Abbildung 13: RT-PCR-Nachweis des nAR bei NSP und SCO

Bande 1= 50 bp Basenpaarmarker, 2-6= NSP, 7= NTC, 8= 50 bp Basenpaarmarker, 9-13= SCO, 14=NTC, 15= 50 bp Basenpaarmarker

3.2.2 Der mAR ZIP-9

Für die Analyse der ZIP-9 Expression wurden zwei verschiedene Primer verwendet. Bei allen NSP-Proben sowie drei von vier SCO-Proben konnte das 139 bp PCR-Produkt nachgewiesen werden (s. Abb. 14). Bei der Verwendung eines Primerpaars, das zu einem 197 bp großen Produkt führt, konnte nur bei vier von fünf NSP-Proben eine Bande gezeigt werden (s. Abb.15). Bei den GCNIS-Proben konnte die ZIP-9 197 bp mRNA in drei von sechs Proben detektiert werden (s. Abb. 16).

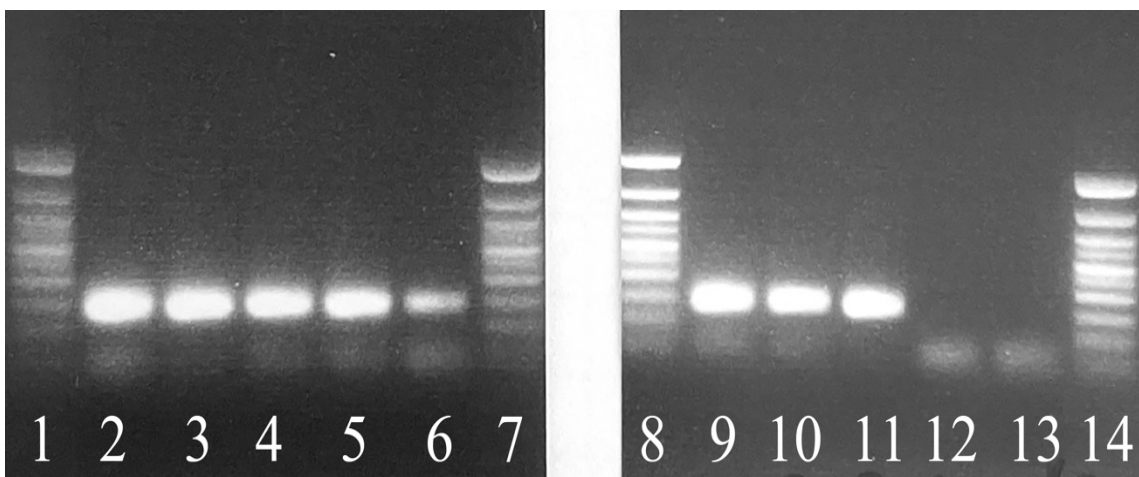


Abbildung 14: RT-PCR-Nachweis von ZIP-9 Rezeptor (139 bp) bei NSP und SCO

Bande 1= 50 bp Basenpaarmarker, 2-6= NSP, 7+8= 50 bp Basenpaarmarker, 9-12= SCO, 13= NTC, 14=50 bp Basenpaarmarker

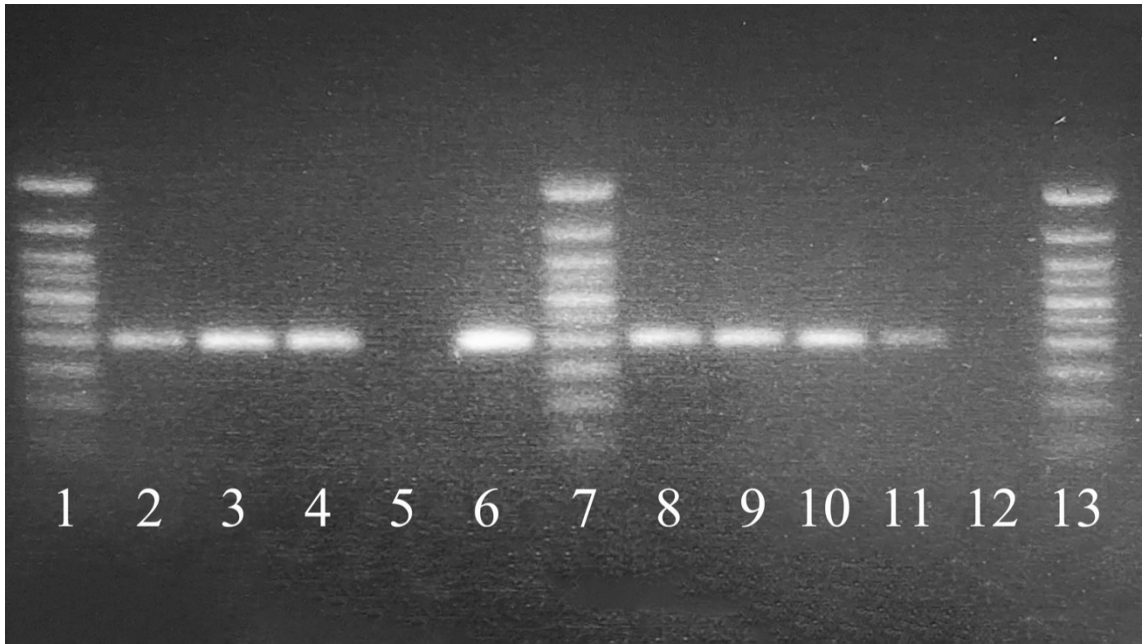


Abbildung 15: RT-PCR-Nachweis von ZIP-9 (197 bp) bei NSP und SCO

Bande 1= 50 bp Basenpaarmarker, 2-6 = NSP, 7= 50 bp Basenpaarmarker, 8-11= SCO, 12=NTC, 13= 50bp Basenpaarmarker



Abbildung 16: RT-PCR-Nachweis ZIP-9 (197 bp) und nAR bei GCNIS

1= 50 bp Basenpaarmarker, 2-7= ZIP-9, 8= NTC, 9= 50 bp Basenpaarmarker, 10-15=nAR, 16= NTC, 17= 50bp Basenpaarmarker

3.2.3 Der GPRC6A-Rezeptor

Die GPRC6A-mRNA konnte bei vier von fünf NSP-Proben nachgewiesen werden, während bei den SCO-Proben nur eine von fünf die mRNA enthielt (s. Abb. 17). Bei den GCNIS-Proben konnte GPRC6A nicht nachgewiesen werden (s. Abb. 18). Für die Versuche wurden zwei verschiedene Primerpaare (123bp und 107bp) verwendet (s. Tabelle 8.2.1). Da sich die Ergebnisse nicht voneinander unterschieden, wurde in dieser Arbeit nur das 123-bp PCR-Produkt dargestellt.

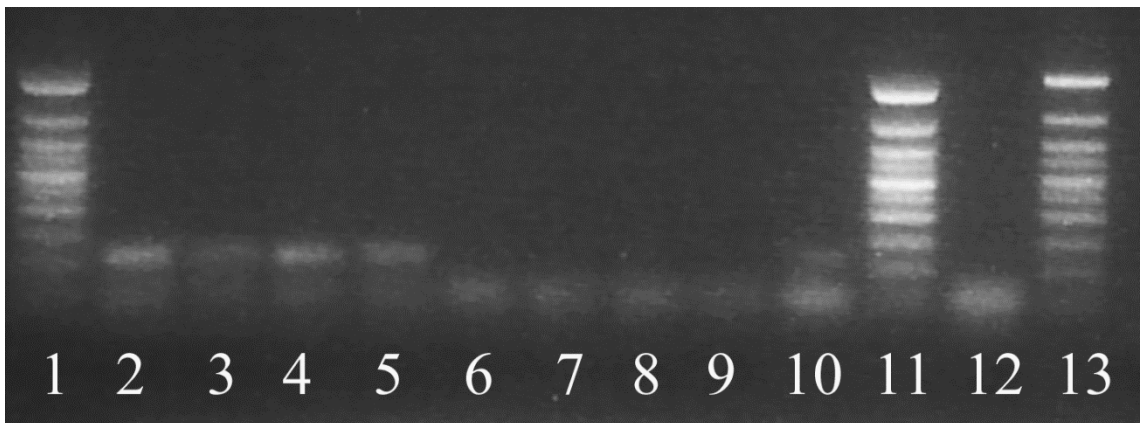


Abbildung 17: RT-PCR-Nachweis von GPRC6A in NSP und SCO

1= 50 bp Basenpaarmarker, 2-6= NSP, 6= NTC, 7-10= SCO, 11= 50 bp Basenpaarmarker, 12= SCO, 13= 50 bp Basenpaarmarker

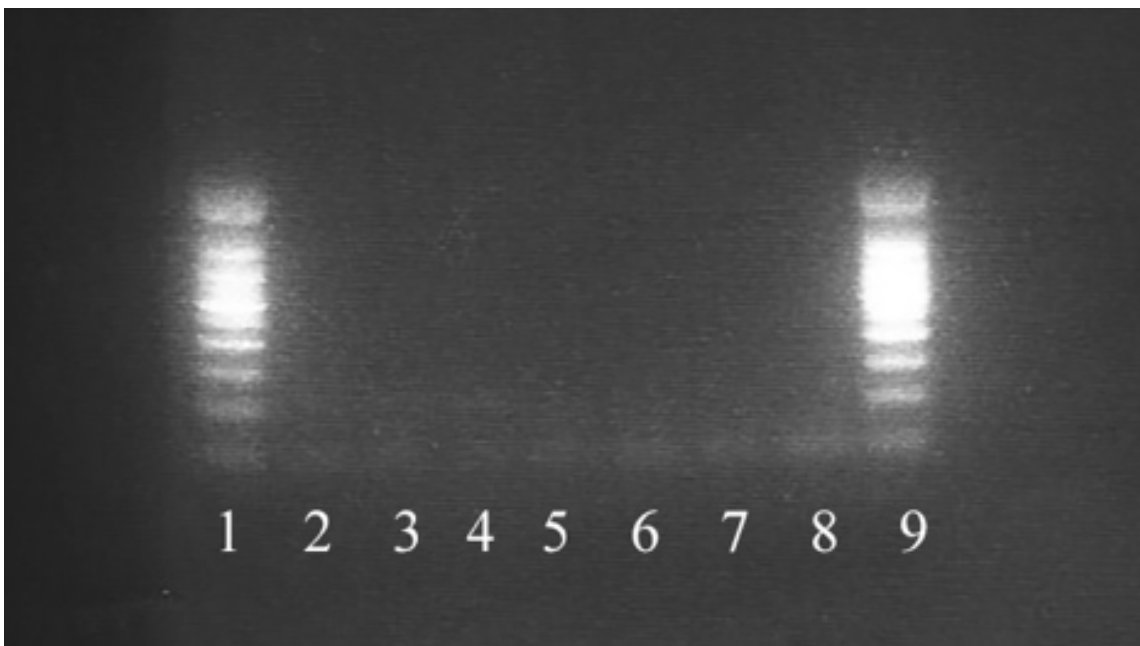


Abbildung 18: RT-PCR-Nachweis von GPRC6A bei GCNIS

1= 50 bp Basenpaarmarker, 2-7= GCNIS, 8=NTC, 9= 50 bp Basenpaarmarker

3.3. Immunhistochemie zum Proteinnachweis von nAR, ZIP-9 und GPRC6A

3.3.1 Der nukleäre Androgen-Rezeptor

Der nAR wird unter physiologischen Bedingungen nukleär in Sertoli-Zellen, peritubulären Myoidzellen und Leydig-Zellen exprimiert, allerdings nicht in den Keimzellen. In den SCO- und GCNIS-Proben war das Verteilungsmuster des nAR identisch (s. Abb. 19).

3.3.2 Der ZIP-9- Rezeptor

ZIP-9 konnte im Gegensatz zu nAR in Sertoli-Zellen, Leydig-Zellen und Keimzellen nachgewiesen werden. In den SCO-Proben, in denen keine Keimzellen vorkommen, konnte ZIP-9 dennoch in Sertoli-Zellen und Leydig-Zellen angefärbt werden. Bei den GCNIS-Proben fiel eine heterogene Färbung auf. (s. Abb. 20).

3.3.3 Der GPRC6A-Rezeptor

GPRC6A konnte in Sertoli-Zellen, Leydig-Zellen und peritubulären Myoidzellen, aber nicht in Keimzellen nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte auch eine Färbung der glatten Muskulatur sowie der Endothelzellen von kleineren Blutgefäßen beobachtet werden. Dasselbe Färbungsmuster wie in den NSP-Proben zeigte sich auch bei den SCO- und GCNIS-Proben (s. Abb. 21).

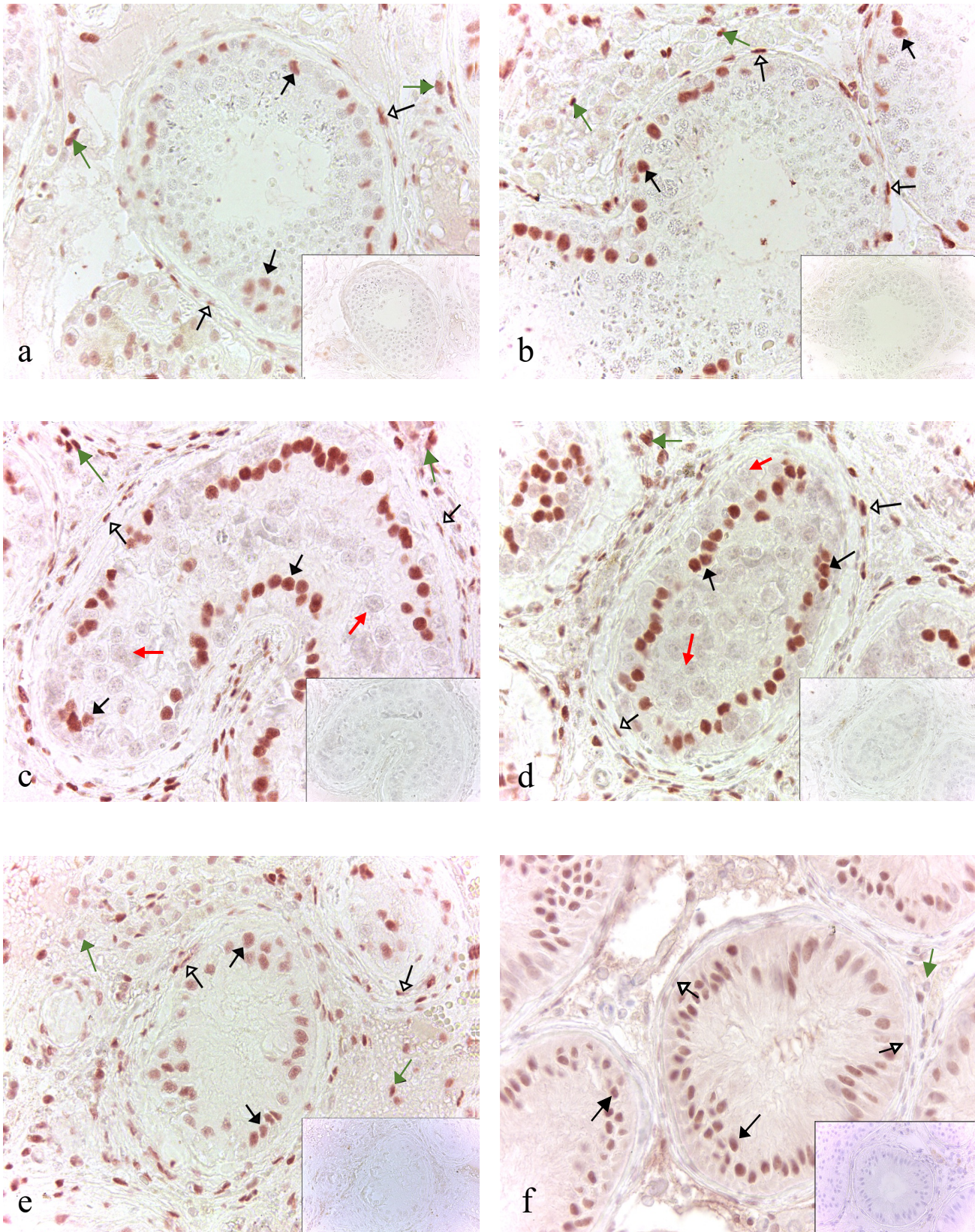


Abbildung 19: Immunhistochemischer Nachweis des nAR bei NSP, GCNIS und SCO

Paraffin, AEC-Färbung mit Negativkontrolle (rechts unten), Originalvergrößerung x400

a, b: NSP, c, d: GCNIS, e, f: SCO

Schwarzer Pfeil: Sertoli-Zellen, grüner Pfeil: Leydig-Zellen, weißer Pfeil: peritubuläre Myoidzellen, roter Pfeil: GCNIS-Zellen

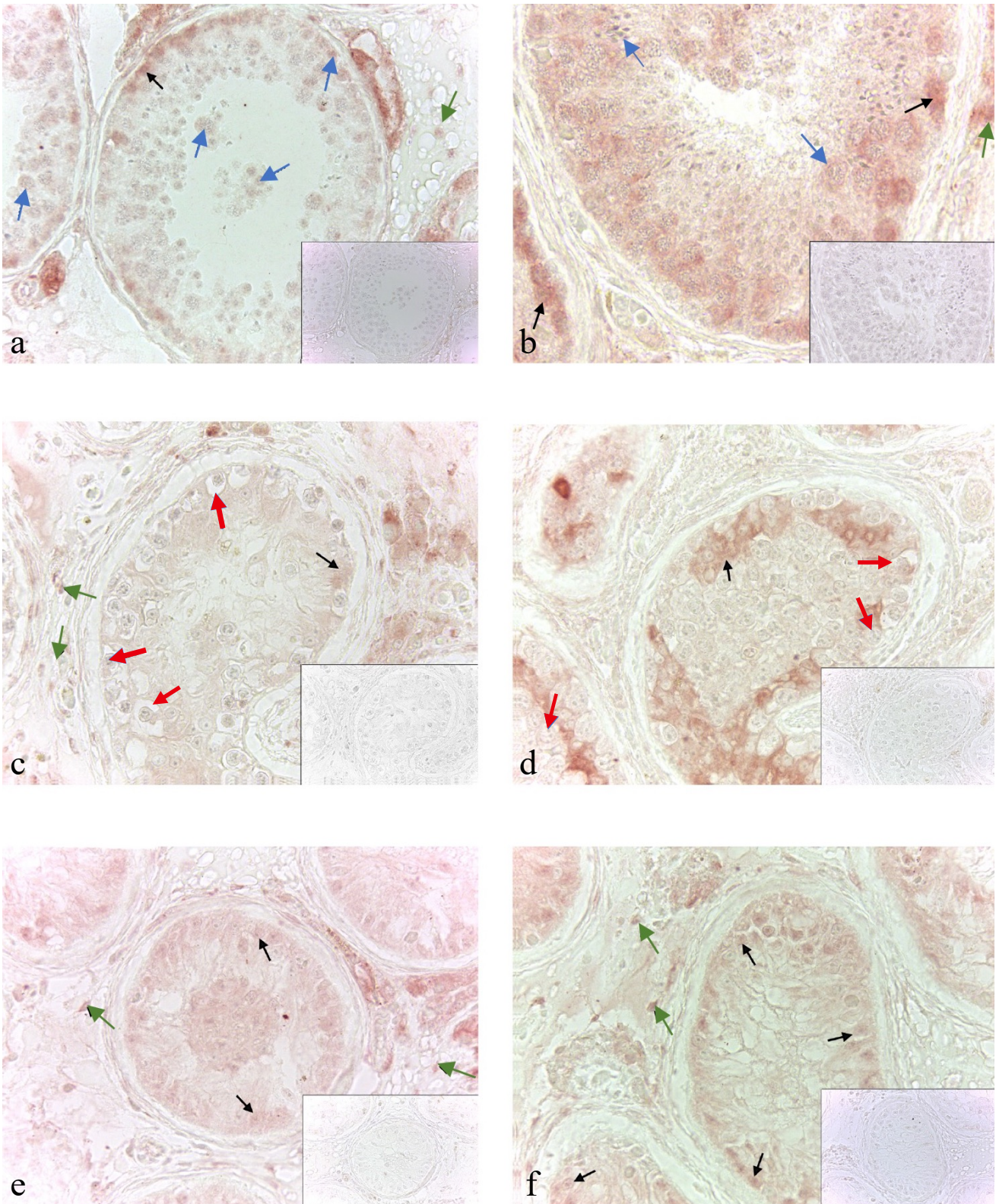


Abbildung 20: Immunhistochemischer Nachweis von ZIP-9 bei NSP, GCNIS und SCO

Paraffin, AEC-Färbung mit negativ-Kontrolle (rechts unten), Originalvergrößerung x400

a, b: NSP, c, d: GCNIS, e, f: SCO

Schwarzer Pfeil: Sertoli-Zellen, grüner Pfeil: Leydig-Zellen, roter Pfeil: GCNIS-Zellen, blauer Pfeil: Keimzellen

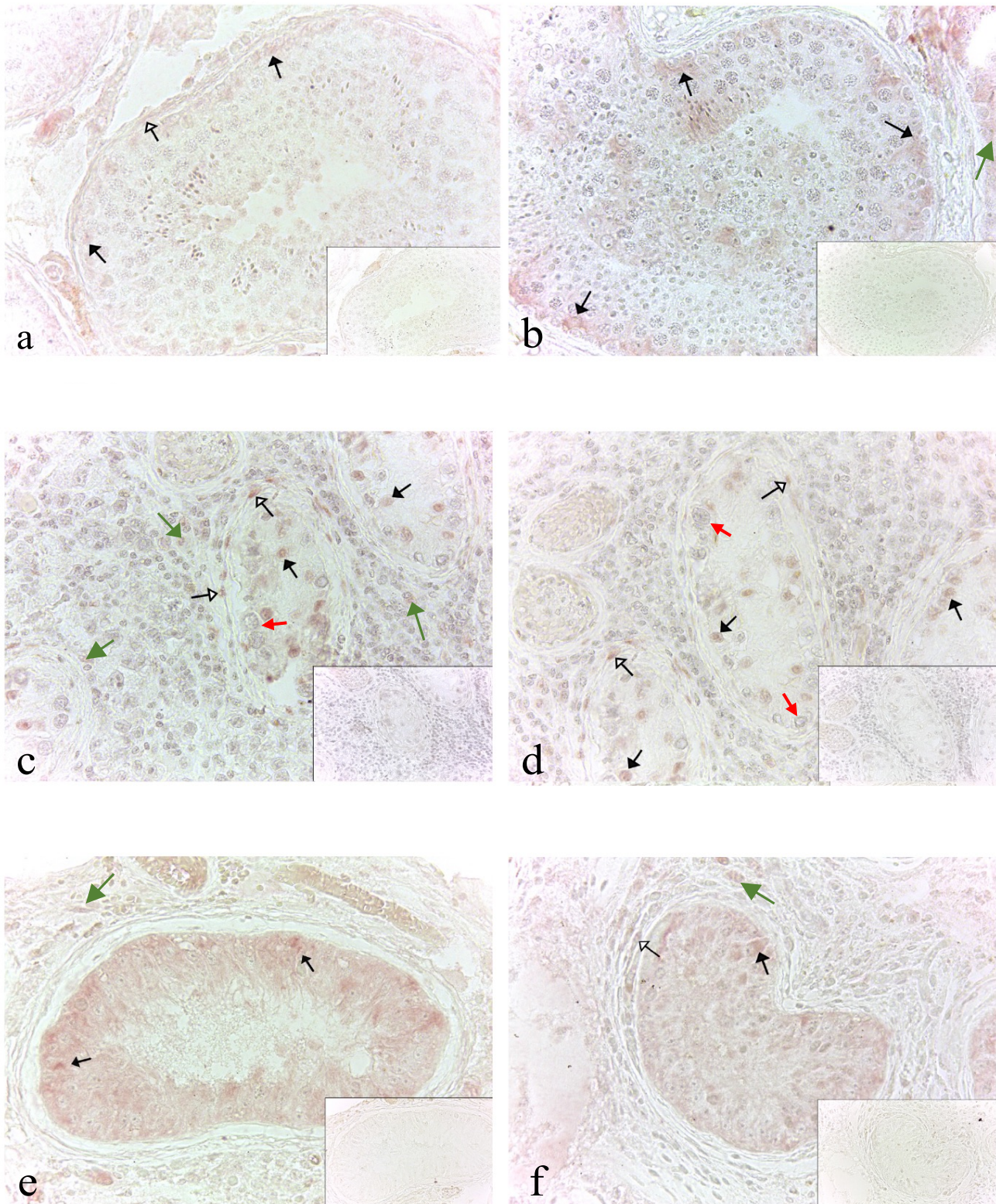


Abbildung 21: Immunhistochemischer Nachweis von GPRC6A bei NSP, GCNIS und SCO

Paraffin, AEC-Färbung mit negativ-Kontrolle (rechts unten), Originalvergrößerung x400

a, b: NSP, c, d: GCNIS, e, f: SCO

Schwarzer Pfeil: Sertoli-Zellen, grüner Pfeil: Leydig-Zellen, roter Pfeil: GCNIS-Zellen, weißer Pfeil: peritubuläre Myoidzellen

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, das Expressionsmuster der membranassoziierten Testosteronrezeptoren ZIP-9 und GPRC6A sowie des nARs im Hodengewebe unter physiologischen und pathologischen Bedingungen zu untersuchen. ZIP-9 und GPRC6A standen bereits im Fokus von *in vitro*- und *in vivo*-Studien an Wirbeltierzellen und -geweben, in denen erwiesen wurde, dass sie eine nicht-genomische Androgenaktion vermitteln [Pi et al. 2010; Thomas et al. 2014; Thomas et al. 2017]. Neben der genomischen Wirkung des klassischen AR, die langsam ist und zu einer Veränderung der Transkriptionsleistung einer Zelle führt, können Androgene auch schnelle, nicht-genomische Effekte vermitteln. Statt einer Wirkung auf Transkriptionsebene, können Androgene durch die Bindung an mARs intrazelluläre Signalwege aktivieren oder hemmen. Der rasche Anstieg von Botenstoffen, wie freiem Kalzium, IP₃, cAMP und Diacylglycerol, welcher durch die Bindung von Androgenen an die mAR initiiert wird, deutet auf das Vorliegen von G-Protein gekoppelten Rezeptoren hin [Sun et al. 2006; Foradori et al. 2008; Thomas et al. 2017].

Das Vorkommen und die Funktion der beiden mARs wurde bereits an Tieren, speziell an Mäusen, untersucht. Diese Arbeit diente der Untersuchung am humanen Hodengewebe unter physiologischen und pathologischen Bedingungen, um einen möglichen Einfluss der Rezeptorausstattung für die humane Spermatogenese und damit Fertilität zu untersuchen.

Die Expression von GPRC6A und ZIP-9 konnte sowohl bei normaler als auch gestörter Spermatogenese, sowie bei Patienten mit einer GCNIS nachgewiesen werden (Ergebnisse der PCR s. Tabelle 8.2.3), allerdings mit unterschiedlicher zellulärer Lokalisation: Während nAR und GPRC6A nur in Sertoli-, Leydig- und peritubulären Myoidzellen vorkommen, konnte ZIP-9 auch in den Keimzellen bei normaler Spermatogenese beobachtet werden. Unsere Ergebnisse für GPRC6A [Shihan et al. 2014; Pi et al. 2017; Jørgensen and Bräuner-Osborne 2020] und ZIP-9 [Bulldan et al. 2016a; Thomas et al. 2018; Kabbesh et al. 2022] stimmen mit anderen Studien überein. Um die genauere Funktion und therapeutische Wirksamkeit einschätzen zu können, sind allerdings weitere Versuche und Studien nötig.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

RT-PCR:

Auffällig bei den Ergebnissen war der häufige Ausfall des Nachweises aller drei Rezeptoren der letzten drei GCNIS-Proben in der RT-PCR, trotz mehrfach wiederholter RT-PCR und der Verwendung unterschiedlicher Primer. Für diese Proben konnte auch keine Expression von ZIP-9 und nAR gezeigt werden. Grund für diesen Diagnosefehler könnte eine mechanische Beschädigung der Biopsien sein. Da allerdings in der Immunhistochemie alle Proteine nachgewiesen werden konnten, könnte der Ausfall auch durch die unterschiedlichen Schnittstellen bei der Probenentnahme erklärt werden.

Immunhistochemie:

Während ZIP-9 in Keim-, Sertoli- und Leydig-Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde GPRC6A, sowie nAR, nur in Sertoli-, Leydig- und peritubulären Myoidzellen nachgewiesen. Der Nachweis aller Rezeptoren in Leydig-Zellen spricht für einen autokrinen Mechanismus, der somit beide mARs und den nAR an der Regulierung der Steroidhormonproduktion beteiligt.

Manche Proben unterschieden sich stark in der Färbeintensität von ZIP-9 in Sertoli- und Keimzellen, was auf eine geringere Proteinexpression in Sertoli-Zellen im Vergleich zur höheren Expression in benachbarten Keimzellen zurückzuführen sein kann. Die Expression von mRNA führt nicht immer zu einer Proteinproduktion, wie in kultivierten Sertoli-Zellen der Ratte gezeigt wurde [Konrad et al. 2000]. Diese Gruppe zeigten die mRNA-Expression für das Entactin-1-Gen sowohl in Sertoli-Zellen als auch in peritubulären Myoidzellen, aber nur peritubuläre Myoidzellen produzierten das entsprechende Protein. Abgesehen von diesen Faktoren ist die Verwendung von Zelllinien zur Erstellung von Expressionsprofilen eines bestimmten Phänotyps ein ständiger Diskussionspunkt. Die Zelllinien ähneln zwar den Zellen *in vivo*, weisen aber oft erhebliche Unterschiede in der Expression von mRNA und Proteinen auf. Im Falle der erwähnten Zelllinie von Buldan et al. (2016a) fehlte den dort verwendeten Sertoli-Zellen der nAR, der sonst ein charakteristisches Merkmal für reife Sertoli-Zellen *in vivo* ist.

Die Wirkung von Testosteron auf die Sertoli-Zellen ist essenziell für die Reifung männlicher Keimzellen zu Spermien. Jedoch ist der nAR nicht nur in Sertoli-Zellen

lokalisiert, sondern tritt auch in Leydig-Zellen und in peritubulären Muskelzellen auf. Die Existenz des klassischen ARs in Keimzellen bleibt derzeit noch umstritten. Obwohl einige Veröffentlichungen die Expression von nAR in den Keimzellen in Frage stellen, weisen andere auf nAR in menschlichen Spermien oder in menschlichen reifen Spermiengeißeln hin [Kimura et al. 1993; Arenas et al. 2001; Shihan et al. 2014].

Bei GPRC6A könnte die Expression in den Leydig-Zellen auf verschiedene Wege der T-Signalregulation hinweisen, wie zum Beispiel über T selbst oder über OCN [Pi et al. 2016; Toni et al. 2019; Pi et al. 2021]. Es liegt die Vermutung nahe, dass GPRC6A zusammen mit nAR vorliegt, da die Expression von nAR in genannten Zellen schon gezeigt wurde [Fietz et al. 2011]. GPRC6A kommt auch in kontraktile Zellen, wie der glatten Gefäßmuskulatur und den peritubulären Myoidzellen vor. Hierbei muss die besondere Natur der peritubulären Myoidzellen und ihre Anordnung in der Lamina propria berücksichtigt werden. Bei der Geburt ähneln die peritubulären Zellen mesenchymalen Zellen, die nach und nach kontraktile Elemente ausbilden. Ebenso ändert sich die Anordnung der Aktinfilamente in den Zellen während der postnatalen Entwicklung. Diese charakteristische Eigenschaft und die artspezifische Anzahl der peritubulären Zellschichten sollten bei der Auswertung der histologischen Schnitte berücksichtigt werden. In Anbetracht all dessen ist es offensichtlich, dass peritubuläre Myoidzellen nicht nur die strukturelle Integrität des Tubulus gewährleisten, sondern auch an der Regulierung der Spermatogenese und der Hodenfunktion beteiligt sind [Maekawa et al. 1996; Fakoya 2002]. Der Nachweis und die biologische Funktion von mARs in peritubulären Myoidzellen kann möglicherweise die Dynamik in der tubulären Kontraktion und in der Unterstützung des Spermientransports zum Nebenhoden fördern. Der Nachweis von GPRC6A ist oft mit Schwierigkeiten verbunden, da der menschliche Rezeptor im Gegensatz zu dem Ortholog der Maus aufgrund eines intrazellulären Retentionsmotivs in der dritten intrazellulären Schleife nur schlecht an der Zelloberfläche exprimiert wird [Stine Jørgensen 2014].

Diese Insertions-/ Deletionsvariante führt zu einer um zwei Aminosäuren kürzeren Version der Schleife und kann nur beim Menschen nachgewiesen werden. Dieser Genotyp kommt am häufigsten bei ostasiatischen Einwohnern (99 %) und der afrikanischen Bevölkerung (60 %) vor. In Europa oder Asien ist die lange Variante mit einem vorzeitigen Stopcodon an Position 57 am häufigsten vertreten, was zu einem verkürzten und nicht-funktionsfähigen Rezeptor führt. Es kommt hinzu, dass der

Rezeptor wichtige Veränderungen in seiner biologischen Funktion erfahren hat und es zu einer evolutionären Divergenz von GPRC6A kam. Moderne Menschen, Neandertaler und Denisovaner gleichen sich in einem gemeinsamen Polymorphismus von GPRC6A, der an der Position 744 eine "K..Y"-Aminosäuresequenz in der dritten intrazellulären Schleife durch eine evolutionär konservierte RKLP-Sequenz ersetzt. Diese ist in allen anderen Wirbeltieren auch vorhanden. Im 1.000 Humangenomprojekt ist das einzigartige menschliche "K..Y"-Allel bei 99,4 % der ostasiatischen Bevölkerung, 91,8 % der europäischen Bevölkerung, 83,4 % der hispanischen Bevölkerung und 59,9 % der Personen afrikanischer Abstammung vorhanden. Im Gegensatz dazu ist die angestammte "RKLP"-Sequenz in der dritten intrazellulären Schleife von GPRC6A, die bei allen vormenschlichen Spezies evolutionär konserviert ist, nur bei einer Minderheit der Menschen vorhanden und gilt als eine Variante (rs386705086), die am häufigsten in Afrika-stämmigen Populationen vorkommt. Die ausschließliche Existenz des "K..Y"-Polymorphismus bei Hominiden und seine Erhaltung im Laufe der Evolution deutet auf einen Selektionsdruck hin, der die physiologische Funktion dieses Allels verändert. Andererseits legt die Persistenz der angestammten RKLP-Sequenz und ihre vorherrschende Expression bei Menschen afrikanischer Abstammung nahe, dass dieses Allel mit Krankheiten wie dem Melanom und dem Prostatakarzinom assoziiert sein könnte (s. Abb. 22) [Pi et al. 2017].

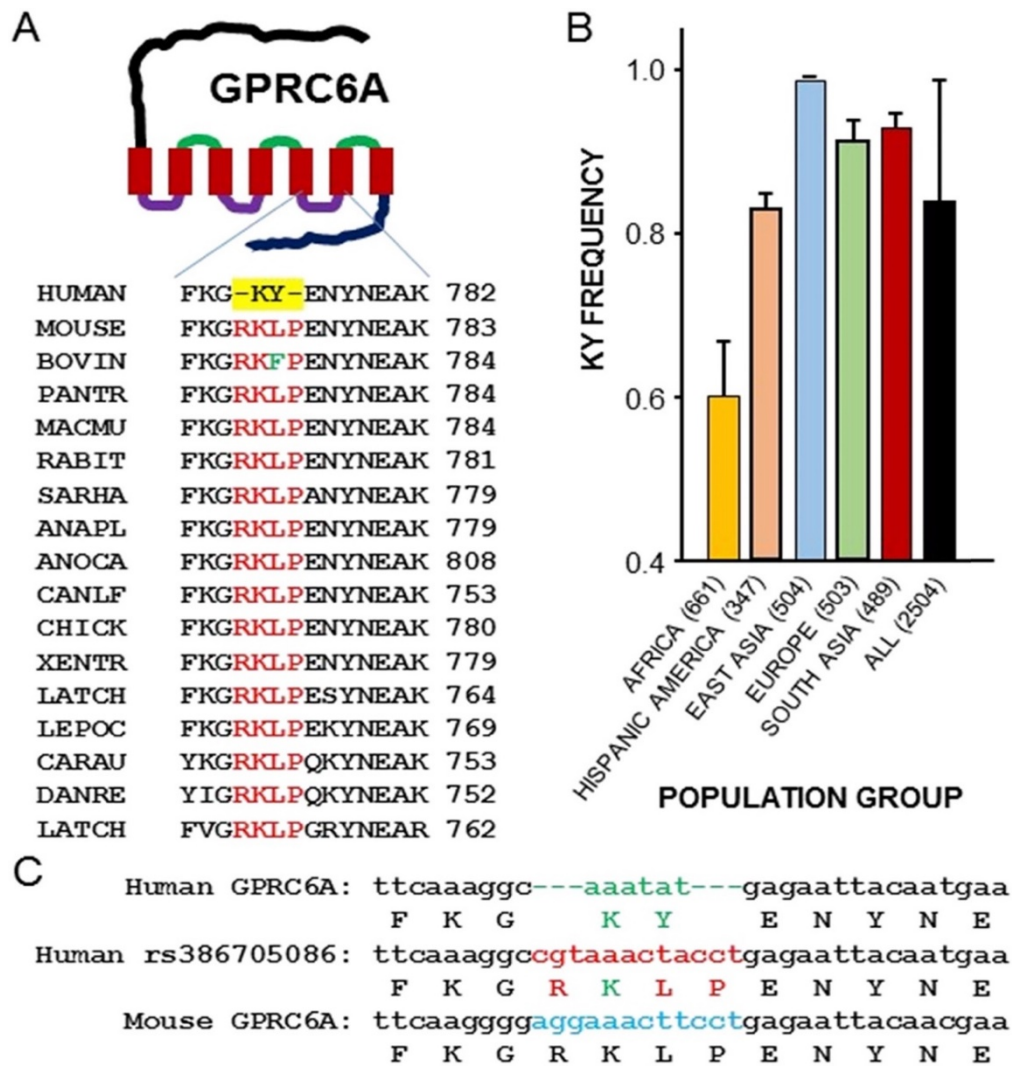


Abbildung 22: Evolutionäre Divergenz von GPRC6A beim Menschen nach Pi und Nishimoto

(A) Vergleich der dritten intrazellulären Schleife bei unterschiedlichen Spezies, wie zum Beispiel dem Menschen (Human), der Maus (Mouse), Rind (Bovin), Schimpanse (Pantr), Rhesusaffe (Macmu), Kaninchen (Rabbit), Tasmanischer Teufel (Sarha), Stockente (Anapl), Grüne Anolis (Anoca), Hund (Canlf), Huhn (Chick), Xenopus tropicalis (Xentr), Tüpfelgarnele (Lepoc), Goldfisch (Carau), Zebrafisch (Danre) und der Quastenflosse (Latch).

(B) Je nach geografischen Gebieten, wurden die Menschengruppen gruppiert und deren Verteilung der KY- und RKLP-Allele untersucht. Jeweils jede Bevölkerungsgruppe enthält mindestens 4 und höchstens 7 Subpopulationen.

Die Daten stammen von www.1000genoms.org
 (<http://www.1000genoms.org/>)

(C) Vergleich der intrazellulären dritten Schleife von GPRC6A auf Aminosäureebene beim Menschen und der Maus. Das K.Y-Allel ist die menschliche Referenzsequenz, und die RKLP-Ahnensequenz bei der Maus wird als der rs386705086-Polymorphismus beim Menschen betrachtet [Pi et al. 2017]

Dies könnte der Grund dafür sein, weshalb der GPRC6A-Rezeptor schwach, bis gar nicht bei GCNIS und SCO in der RT-PCR nachgewiesen werden konnte.

Auffällig bei den Untersuchungen war auch, dass bei der immunhistologischen Untersuchung der GCNIS-Proben auf das ZIP-9-Protein noch intakte Keimzellen in den Tubuli nachgewiesen werden konnten. Im besten Fall sollten bei GCNIS-Proben Schnitte gewählt werden, die nur noch wenige intakte Keimzellen besitzen. Eine solche Probenentnahme ist oft mit Schwierigkeiten verbunden, da, wie in diesem Fall, noch ein Restbestandteil von gesundem Gewebe vorhanden sein könnte, dass je nach Entnahmeort und Schnitt im Material enthalten ist.

4.3 Diskussion der Methoden

Die RT-PCR besitzt im Gegensatz zu anderen Nachweisverfahren eine hohe Sensitivität, die es theoretisch möglich macht, bereits einzelne DNA-Moleküle nachzuweisen. Jedoch können Faktoren, wie zum Beispiel die reverse Transkription, die Art der RNA-Extraktion oder die Qualität des Probenmaterials die Effizienz zwischen 10 % und 90 % beeinflussen [Rappolee, D.A. 1990]. So können zum Beispiel falsch-negative Ergebnisse erklärt werden, auch wenn die Expression des Gens in der untersuchten Zell- oder Gewebeprobe aus anderen Quellen bekannt ist und es sich nur um Bestätigungsversuche handelt. Beispielsweise kann eine fehlerhafte Basenpaarung am 3'-Ende des Primers eine mögliche Fehlerquelle darstellen, durch die es dann nicht zur Verlängerung des komplementären Stranges kommen kann. Auch Verunreinigungen des Probenmaterials mit Substanzen, die in der Probenvorbereitung eingesetzt werden, können die Ergebnisse der RT-PCR verfälschen. So zeigten zum Beispiel Rossen et al., dass organische Lösungsmittel, wie zum Beispiel Ethanol oder Phenol, die für die Extraktion verwendet werden, sowie Harnstoff, Dimethylsulfoxid und Formamid die Amplifikation der Nukleinsäuren behindern und damit die RT-PCR-Reaktion inhibieren können [Rossen et al. 1992]. Ein weiterer, häufiger Grund für falsch-negative Ergebnisse kann auch durch die Kontamination des Probenmaterials mit einer RNase sein, die dazu führt, dass die RNA noch vor der reversen Transkription abgebaut wird und somit nicht mehr nachgewiesen werden kann. Zusätzlich können auch durch Fehler

beim Ansetzen der Mixtur fehlerhafte Ergebnisse entstehen. Um solche Methodenfehler oder eine mögliche Kontamination bei unseren Untersuchungen ausschließen zu können, wurde immer eine Negativkontrolle mitgeführt. Zum Ausschluss falsch-negativer Ergebnisse wären dennoch Positivkontrollen nötig gewesen, um die Effizienz und Sensitivität der Amplifikationsreaktion zu testen.

Für die histologische Untersuchung wurde die HE-Färbung gewählt. Diese Methode zählt zu den Routinemethoden in den meisten histologischen Laboren und gewährleistet eine generell gute Beurteilung der Morphologie. Alternativ hätte man auch die Periodic-Acid-Schiff-Färbung wählen können, die insbesondere kohlenhydrathaltige Komponente wie Glykoproteine, Muzine oder Glykolipid anfärbt. Sie ist sehr gut dazu geeignet, Stadien der Spermatogenese in den Tubuli seminiferi darzustellen und sie zu unterscheiden. Da die Bestimmung der Stadien der Spermatogenese und die Unterschiede der Stadien-spezifischen Färbintensivität kein Teil dieser Arbeit war, wurde zur generellen Übersicht der Strukturen des Hodenepithels die HE-Färbung als Goldstandard gewählt.

5. Zusammenfassung

Ziel:

Ziel dieser Dissertation war es, die zelluläre Lokalisation der mARs ZIP-9 und GPRC6A im Vergleich zum nAR im humanen Hodengewebe unter physiologischen und pathologischen Bedingungen inklusive der Präkanzerose GCNIS zu untersuchen. So sollte nicht nur die zelluläre Lokalisation ermittelt werden, sondern auch ein eventueller Zusammenhang zwischen der Expression der Rezeptoren und einem Spermatogenese Schaden und somit der Infertilität untersucht werden.

Methodik:

Die Expression von nAR, GPRC6A und ZIP-9 wurde sowohl mit Hilfe der Immunhistochemie als auch der RT-PCR untersucht. Es wurden Proben mit erhaltener Spermatogenese, Proben mit einem SCO-Syndrom sowie GCNIS-Proben untersucht.

Ergebnisse:

Insgesamt konnte mit dieser Studie gezeigt werden, dass die Rezeptoren nAR, GPRC6A und ZIP-9 im Hodengewebe bei sowohl physiologischer als auch pathologischer Spermatogenese sowie GCNIS exprimiert sein können. ZIP-9 wurde hierbei spezifisch in Keimzellen, Sertoli-Zellen und Leydig-Zellen nachgewiesen, während GPRC6A und nAR dagegen in Sertoli-Zellen, Leydig-Zellen und peritubulären Myoidzellen nachgewiesen werden konnten. Anhand der Ergebnisse könnten folgende Annahmen getroffen werden: Es könnte eine relevante biologische Funktion der nicht-genomischen Wirkung von T auf Keimzellen über ZIP-9 möglich sein. ZIP-9, welches sowohl in Sertoli-Zellen als auch überwiegend in Keimzellen exprimiert wird, könnte ein vielversprechender Rezeptor für die direkte bzw. Keimzellübertragung von Testosteronsignalen sein, es ist jedoch auch eine indirekte Testosteronübertragung von Sertoli-Zellen zu Keimzellen möglich. Für GPRC6A zeigte sich, dass die Funktion des Rezeptors im physiologischen Hoden nur schwer definiert werden kann, da er parallel mit nAR exprimiert wird und zudem viele verschiedene Liganden neben den Androgenen binden kann.

6. Summary

Objective:

The aim of this dissertation was to investigate the cellular localization of two mARs (ZIP-9 and GPRC6A) in comparison to the nAR in human testicular tissue under both physiological and pathological conditions including pre-invasive GCNIS. Those samples were selected not only to investigate the cellular localization but also the relationship between expression of the receptors and spermatogenesis damage, leading to infertility

Methodology:

The expression of nAR, GPRC6A and ZIP-9 was determined using both immunohistochemistry and RT-PCR in samples with preserved spermatogenesis, samples with a SCO syndrome, and GCNIS samples were investigated.

Results:

Overall, this study demonstrated that the receptors nAR, GPRC6A, and ZIP-9 are expressed in male testicular tissue during both physiological and pathological spermatogenesis as well as GCNIS. Specifically, ZIP-9 was detected in germ cells, Sertoli cells, and Leydig cells, whereas GPRC6A and nAR were detected in Sertoli, Leydig, and peritubular myoid cells only. Based on the results, the following assumptions could be made: There might be a relevant biological function of the non-genomic effects of testosterone on germ cells via ZIP-9. ZIP-9, which is expressed in both Sertoli and predominantly in germ cells, could be a promising receptor for direct and germ cell transmission of testosterone signals, respectively, but indirect testosterone transmission from Sertoli to germ cells is also possible. For GPRC6A, it was observed that defining the receptor's function in the physiological testis is challenging, as it is expressed in parallel with nAR and can bind to many different ligands besides androgens.

7. Abkürzungsverzeichnis

A	Arteria
AFP	Alpha-Fetoprotein
AJ	Adherens Junctions
AMH	Anti-Müller-Hormon
AR	Androgenrezeptor
ARE	Androgen responding element
ATP	Adenosintriphosphat
BHS	Blut-Hoden-Schranke
BSA	Bovinem Serumalbumin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA
DAG	Diacylglycerin
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHT	Dihydrotestosteron
DNA	Desoxyribonukleinsäure, Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynucleotidtriphosphat
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCNIS	Germ-cell-neoplasia in situ
GDP	Guanosindiphosphat
GJ	Gap Junctions
GnRH	Gonadotropin-releasing-Hormon
GPCR	G-Protein-gekoppelter-Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
hCG	Humanes Choriongonadotropin
HE	Hämatoxylin-Eosin
HSP	Hitzeschock-Proteine
hyp	Hypospermatogenese
INSL 3	Insulin-ähnlichen-Faktor 3
IP ₃	Inositoltriphosphat
JAM-3	Junctional Adhesion Molecule 3
KO	Knock-out
LDH	Laktadehydrogenase
LH	luteinisierendes Hormon
M	Musculus
mAR	membran-assoziiertes Androgenrezeptor
mCRPC	metastasiertes kastrationsresistente Prostatakarzinom
nAR	Nukleäre Androgen-Rezeptoren
NOA	Nicht-obstruktive Azoospermie
NSP	Normale Spermatogenese
NTC	No template control
OA	Obstruktive Azoospermie
OCN	Osteocalcin
PLAP	Plazentare alkalische Phosphate
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SHBG	Sexualhormon-bindendes Globulin

SCO
SHR
T
TAE-Puffer
TF
TJ
TRAMP
WHO

Sertoli-cell-only-Syndrom
Steroidhormonrezeptor
Testosteron
Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Transkriptionsfaktor
Tightjunctions
transgenes Adenokarzinom
World Health Organization

8. Darstellungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des Hodens und der unterschiedlichen Hodenhüllen	<u>4</u>
Abbildung 2: Aufbau des Keimepithels	<u>5</u>
Abbildung 3: Normale Spermatogenese	<u>6</u>
Abbildung 4: Zellteilung während der Spermatogenese mit DNA-Gehalt	<u>11</u>
Abbildung 5: Die unterschiedlichen Keimzellstadien	<u>12</u>
Abbildung 6: Sertoli-cell-only-Syndrom (SCO)	<u>16</u>
Abbildung 7: Keimzellneoplasie in situ (GCNIS)	<u>17</u>
Abbildung 8: Struktur der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren	<u>22</u>
Abbildung 9: Die unterschiedlichen biologischen Aktivitäten des GPRC6A-Rezeptors nach Pi und Quarles 2012	<u>30</u>
Abbildung 10: Lichtmikroskopische Darstellung NSP	<u>40</u>
Abbildung 11: Lichtmikroskopische Darstellung GCNIS und SCO	<u>40</u>
Abbildung 12: PCR mit dem Housekeeping-Gen GAPDH	<u>41</u>
Abbildung 13: RT-PCR-Nachweis des nAR bei NSP und SCO	<u>42</u>
Abbildung 14: RT-PCR-Nachweis von ZIP-9 (139bp) bei NSP und SCO	<u>42</u>
Abbildung 15: RT-PCR-Nachweis von ZIP-9 (197bp) bei NSP und SCO	<u>43</u>
Abbildung 16: RT-PCR-Nachweis ZIP-9 (197bp) und nAR bei GCNIS	<u>43</u>
Abbildung 17: RT-PCR-Nachweis von GPRC6A in NSP und SCO	<u>44</u>
Abbildung 18: RT-PCR-Nachweis von GPRC6A bei GCNIS	<u>44</u>

Abbildung 19: Immunhistochemischer Nachweis des nAR bei NSP, GCNIS und SCO _____ 46

Abbildung 20: Immunhistochemischer Nachweis von ZIP-9 bei NSP, GCNIS und SCO _____ 47

Abbildung 21: Immunhistochemischer Nachweis von GPRC6A bei NSP, GCNIS und SCO _____ 48

Abbildung 22: Evolutionäre Divergenz von GPRC6A beim Menschen nach Pi und Nishimoto _____ 53

8.2 Tabellenverzeichnis

8.2.1 Tabelle 1. Primer Sequenzen für RT-PCR

Primer	RefSeq./ Spezies (NCBI Datenbank)	Sequenz (5' -> 3')	Amplikonlänge
GPRC6A1 Mensch	NM_148963.3	F-ACTGGATTGGCATCATAACC R-AAGAAAGGCTGGAAGAACC	123
GPRC6A1 Mensch	NM_148963.3	F-ACCCCTGATGACTTTGTGG R-GGTCGTGGAGAGTCTTC	107
ZIP-9 Mensch	NM_018375.4	F- GGAAAACACCACCAAGCAAC R- CCAGAACGAGGGAAACACC	139
ZIP-9 Mensch	NM_018375.4	F- GCTGTCTCTGGCTATGTTGG R- TTGCTTGGTGGTGTTTTCC	197
AR Mensch	NM_000044.2	F- GCTTCTACCAGCTCACCAAGCT R- CTTGATTAGCAGGTCAAAGTGAAC	85
GAPDH	NM_002046.3	F CCA GGT GGT CTC CTC TGA CTT C R- GTG GTC GTT GAG GGC AAT G	81

8.2.2 Tabelle 2. Primäre und sekundäre Antikörper für die Immunhistochemie

Primärer Antikörper	Verdünnung	Sekundärer Antikörper	Verdünnung
GPRC6A (THERMOFISHER, PA 33808), Polyclonal, rabbit anti-human	1:150	Goat anti rabbit (Dako, E0432)	1:600
ZIP-9 (Atlas Antibody, HPA 007921) Polyclonal, rabbit anti-human	1:50	Goat anti rabbit (Dako, E0432)	1:400
AR (Biozol) monoclonal, rabbit antihuman	1:50	Goat anti rabbit (Dako,E0432)	1:400

8.2.3 Tabelle 3. Zusammenfassung der RT-PCR Ergebnisse

Patienten	AR	ZIP-9	C6A
<u>NSP</u>			
1	positiv	positiv	positiv
2	positiv	positiv	positiv
3	positiv	positiv	positiv
4	positiv	negativ	positiv
5	positiv	positiv	negativ
<u>SCO</u>			
11	positiv	positiv	negativ
12	positiv	positiv	negativ
13	positiv	positiv	positiv
14	positiv	positiv	positiv
15	positiv	/	/
<u>GCNIS</u>			
21	positiv	negativ	negativ
22	positiv	positiv	negativ
23	positiv	positiv	negativ
24	positiv	positiv	negativ
25	negativ	negativ	negativ
26	negativ	negativ	negativ

8.2.4 Verwendete Reagenzien und Geräte

Geräte	Hersteller
Automatisierter Vakuum-Gewebeprozessor TP1050	Leica, Nussloch, Deutschland
Axio Observer.Z1 inverses Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Biosphere-Filterspitzen, 0,5µl-1250µl	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
C1000™ Thermocycler, CFX96™ Echtzeit-System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Eppendorf Research ® plus Pipetten, 2,5µl-1000µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Flachprofil-Mikrotomklingen DB80 LS	Leica, Nussloch, Deutschland
Magnetrührer, Typ MR 1000, fab n° 503.02000.00 0	Leica microsystems, Wetzlar, Deutschland
MembraneSlide 1.0 PEN, Nr. 415101-4401-000	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München, Deutschland
Menzel-Gläser Deckgläser 22x40mm, 22x50mm	Gerhard Menzel GmbH, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Micro-Tubes, Röhrchen 2ml SafeSeal	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Mikroskop Leica DM750 mit Kamerasystem Leica ICC50 HD	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG Schwabach, Deutschland
Mikro 22R Zentrifuge, Typ 1110, Nr. 0000929-30-00	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Modulares Gewebeeinbettungszentrum EG1150 H PowerPack 200 Netzgerät	Leica, Nussloch, Deutschland
Rotationsmikrotom: RM 2125RT, fab.n° 8439/09.2004	Leica, Nussloch, Deutschland

Saphir PCR-Gefäße, 0,5ml, Nr. 682281	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Schlittenmikrotom: SM 2000R, Fertigungsnr. 1705/11.1999	Leica, Nussloch, Deutschland
Standard Power Pack P25, Bestellnummer 040-800	Biometra, GmbH, Göttingen, Deutschland
SuperFrost® Plus Objekthalter	VWR, Leuven, Belgien
TProfessional TRIO 30 Thermocycler 846-070-720, Seriennummer 3412307	Biometra, GmbH, Göttingen, Deutschland
T3 Thermocycler, Seriennummer 3505327	Biometra, GmbH, Göttingen, Deutschland
UltraCut Mikrotom, Typ 70 17 01	Reichert-Jung, Wien, Österreich
UVsolo-Transilluminator	Biometra, Göttingen, Deutschland
XCell Sure Lock™ Elektrophoresezelle, Seriennummer 1236099-1559	Invitrogen, Carlsbad, USA

Reagenzien	Kits
100% reines Ethanol, Nr 9065.4	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure, 1.00063.1011	Merck, Darmstadt, Deutschland
AEC-Substrat-Kit, AE002-3	Biologo, Kronshagen, Deutschland
Ambion™ RNase-Inhibitor (geklont) 40U/μl, Nr. AM2682	Invitrogen Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA
AmpliTaq Gold® DNA Polymerase mit Goldpuffer und MgCl ₂ , Nr. 4311806	Applied Biosystems von Thermo Fisher Scientific, Foster City, USA
Zitronensäure, C ₆ H ₈ O ₇ x H ₂ O, Nr. 243	Merck, Darmstadt, Deutschland
DNase I rekombinant RNase-frei, Nr. 04716728001 mit Inkubationspuffer (10x)	Roche, Basel, Schweiz
EDTA 0,5M, Nr. E7889-100ml	Sigma, ST. Louis, USA

Eukitt schnellhärtendes Montagemedium, Nr, 03989-500ml	Sigma, St. Luis, USA; Sigma, Steinheim, Deutschland
EvaGreen qPCR Mix II, Nr. BS76.590.1000	Bio& Sell, Feucht, Deutschland
Gel Green Nukleinsäure-Gelfärbemittel, Nr. 41005	Biotium Inc., Fremont, USA
GeneAmp® dNTP-Mix mit dTTP, 10mM, Nr. N8080260	Applied Biosystems von Thermo Fisher Scientific, Foster City, USA
Salzsäure (HCl), Nr. 6331.3	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid, 30% H ₂ O ₂ , 9681.1	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Invitrolon™ PVDF/Filterpapier-Sandwiches, 0,45 µm, 8,3 x 7,3 cm, Nr. LC2005	Novex by life technologie, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA
Ladepuffer (Orange G), Nr. BS85.111.050	Bio& Sell, Feucht, Deutschland
MultiScribe™ Reverse Transkriptase, Nr. 4311235	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Foster City, USA
Paraffin, Roti®-Plast, 6642.6	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PeqGold Universal Agarose, Nr. 35-1099	Peglab, Erlangen, Deutschland
Kaliumchlorid, KCl, Nr. 104936	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat, KH ₂ PO ₄ , Nr. 104873	Merck, Darmstadt, Deutschland
Random Hexamers, Nr. N8080127	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA
RNAse Inhibitor 20U/µl, Nr. N8080119	Applied Biosystems by Thermo Fisher, Scientific, Foster City, USA
RNAse Inhibitor Ambion™, 40U/µl, Cloned, Nr. AM2682	Invitrogen by Thermo Fisher, Carlsbad, USA
RNeasy® FFPE Kit, Nr. 73405	Qiagen, Hilden, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl), Nr. 1.06404.0500	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphatdihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O), Nr. 13472-35-0	Merck, Darmstadt, Deutschland
TRIS (C ₄ H ₁₁ NO ₃), Nr. 4855.2	Roth, Karlsruhe, Deutschland

TRITON® X-100 Detergens, Nr. 648462	EMD Chemicals, San Diego, USA
Xylol, Nr. 4436.2	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylole 98%, 28l, 9713.4	Roth, Karlsruhe, Deutschland

8.2.5 Chemikalien und Lösungen

TRIS-Stammlösung	60,5 g TRIS ($C_4H_{11}NO_3$, Roth) in 900ml dest. Wasser verdünnen. Durch Zugabe von Salzsäure (HCl, Roth) auf pH 7,6 bringen. Mit Aqua dest. auf 1 Liter auffüllen und 90 g Natriumchlorid (NaCl, Merck) hinzugeben.
TRIS-Waschpuffer	100 ml der TRIS-Stammlösung mit 900 ml Aqua Dest. und 1000 μ l Triton-X-100 vermischen.
Zitratpuffer-Stammlösung	Stammlösung A: 4,2 g Zitronensäure ($C_6H_8O_7 \times H_2O$, Merck) verdünnen in 200 ml Aqua. Dest. Stammlösung B: 29,41 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat ($C_6H_5O_7Na_3 \times 2 H_2O$, Merck) verdünnen in 1l Aqua dest.
Zitrat-Puffer	7 ml Stammlösung A mit 41 ml Stammlösung B vermengen und mit Aqua dest. Auf 500 ml auffüllen
3% Wasserstoffperoxid	6ml 30% H_2O_2 (Roth) mit 54 ml TBS-Puffer auf 60 ml auffüllen

BSA-Puffer	1g BSA (8076.2, Roth) mit 70 ml TBS-Pufferlösung auffüllen und mit Hilfe eines Magnetrührers auflösen
TAE-Puffer	Stammlösung: 48,4 g TRIZMA-Base (Sigma) und 20 ml 0,5M EDTA (Sigma) mit 1l Aqua dest. vermengen und den pH-Wert mittels Essigsäure auf 8,0 kalibrieren. Pufferlösung: 100ml 10x TAE zu 900ml Aqua dest. hinzufügen
Hämalaun nach Mayers	1g Hämatoxylin (Merck), 0,2g Natriumjodat, 50g Kaliumalaun, 50g Chloraldehydrat, 1g krist. Tironensäure und 1l Aqua dest.
Erythrosin	1%ige Stocklösung ansetzen aus Erythrosin (Fluka) auf 0,5%ige Lösung mit Aqua dest. verdünnen

9.Literaturverzeichnis

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2017). *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH.
- Arenas, M. I., Royuela, M., Lobo, M. T., Alfaro, J. M. E., Fraile, B. & Paniagua, R. (2001). Androgen receptor (AR), estrogen receptor-alpha (ER- α) and estrogen receptor-beta (ER- β) expression in the testis of the newt, *Triturus marmoratus marmoratus* during the annual cycle. *Journal Of Anatomy*, 199(4), 465–472. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2001.19940465.x>
- Aumüller, G., Engele, J., Kirsch, J. & Mense, S. (2020). *Duale Reihe Anatomie*. 4.2.1 Hoden (Testis/Orchis/Didymis) 827; 4.3. Äußere männliche Genitalorgane 835-842
- Baratelli, G., Lanzani, A. & Sacco, R. (2002). Biography of Enrico Sertoli. *Urology*, 60(1), 196–198. [https://doi.org/10.1016/s0090-4295\(01\)01328-0](https://doi.org/10.1016/s0090-4295(01)01328-0)
- Barratt, C. L., Björndahl, L., De Jonge, C. J., Lamb, D. J., Martini, F. O., McLachlan, R. I., Oates, R. D., Van der Poel, S., St John, B., Sigman, M., Sokol, R. Z. & Tournaye, H. (2017). The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance—challenges and future research opportunities. *Human Reproduction Update*, 23(6), 660–680. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx021>
- Bennett, N. C., Gardiner, R. A., Hooper, J. D., Johnson, D. W. & Gobé, G. C. (2010). Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(6), 813–827. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.11.013>
- Berg, A., Rice, C. D., Rahman, M. S., Dong, J. & Thomas, P. (2014). Identification and Characterization of Membrane Androgen Receptors in the ZIP9 Zinc Transporter Subfamily: I. Discovery in Female Atlantic Croaker and Evidence

- ZIP9 Mediates Testosterone-Induced Apoptosis of Ovarian Follicle Cells. *Endocrinology*, 155(11), 4237–4249. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1198>
- Bergmann, M. (2005) Spermatogenese. Physiologie und Pathophysiologie. *Der Urologe A*44, 10, 1131-2, 1134-8
- Bergmann, M. & Kliesch, S. (1998). Hodenbiopsie. In *Krause w., Weidner W. Andrologie*. 66-71
- Bergmann, M. & Kliesch, S. (2010). Testicular Biopsy and Histology. In *Springer eBooks* (S. 155–167). https://doi.org/10.1007/978-3-540-78355-8_11
- Berney, D. M., Looijenga, L. H. J., Idrees, M. T., Oosterhuis, J. W., Meyts, E. R., Ulbright, T. M. & Skakkebaek, N. E. (2016). Germ cell neoplasia in situ (GCNIS): evolution of the current nomenclature for testicular pre-invasive germ cell malignancy. *Histopathology*, 69(1), 7–10. <https://doi.org/10.1111/his.12958>
- Bode, P. & Moch, H. (2014). Seminome des Hodens. *Pathologe*, 35(3), 224–231. <https://doi.org/10.1007/s00292-014-1898-y>
- Bulldan, A., Bartsch, J. W., Konrad, L. & Scheiner-Bobis, G. (2018). ZIP9 but not the androgen receptor mediates testosterone-induced migratory activity of metastatic prostate cancer cells. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1865(12), 1857–1868. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.09.004>
- Bulldan, A., Dietze, R., Shihan, M. & Scheiner-Bobis, G. (2016a). Non-classical testosterone signaling mediated through ZIP9 stimulates claudin expression and tight junction formation in Sertoli cells. *Cellular Signalling*, 28(8), 1075–1085. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.04.015>
- Bulldan, A., Shihan, M., Goericke-Pesch, S. & Scheiner-Bobis, G. (2016b). Signaling events associated with gonadotropin releasing hormone-agonist-induced hormonal castration and its reversal in canines. *Molecular Reproduction and Development*, 83(12), 1092–1101. <https://doi.org/10.1002/mrd.22751>

- Caroppo, E. & Colpi, G. M. (2021). Hormonal Treatment of Men with Nonobstructive Azoospermia: What Does the Evidence Suggest? *Journal Of Clinical Medicine*, 10(3), 387. <https://doi.org/10.3390/jcm10030387>
- Clemmensen, C., Smajilovic, S., Madsen, A. N., Klein, A. B., Holst, B. & Bräuner-Osborne, H. (2013). Increased susceptibility to diet-induced obesity in GPRC6A receptor knockout mice. *Journal Of Endocrinology*, 217(2), 151–160. <https://doi.org/10.1530/joe-12-0550>
- Clermont, Y. (1963). The cycle of the seminiferous epithelium in man. *American Journal of Anatomy*, 112(1), 35–51. <https://doi.org/10.1002/aja.1001120103>
- Çoşkun, G., Sencar, L., Tuli, A., Şaker, D., Alparslan, M. M. & Polat, S. (2019). Effects of Osteocalcin on Synthesis of Testosterone and INSL3 during Adult Leydig Cell Differentiation. *International Journal Of Endocrinology*, 2019, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2019/1041760>
- Davidoff, M., Middendorff, R., Köföncü, E., Müller, D., Ježek, D. & Holstein, A. F. (2002). Leydig cells of the human testis possess astrocyte and oligodendrocyte marker molecules. *Acta Histochemica*, 104(1), 39–49. <https://doi.org/10.1078/0065-1281-00630>
- De Gendt, K. & Verhoeven, G. (2012). Tissue- and cell-specific functions of the androgen receptor revealed through conditional knockout models in mice. *Molecular And Cellular Endocrinology*, 352(1–2), 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.08.008>
- De Toni, L., Guidolin, D., De Filippis, V., Peterle, D., Rocca, M. S., Di Nisio, A., De Rocco Ponce, M. & Foresta, C. (2019)a. SHBG141–161 Domain-Peptide Stimulates GPRC6A-Mediated Response in Leydig and β -Langerhans cell lines. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55941-x>
- Deller, T. & Welsch, U. (2022). *Histologie - Lehrbuch und Atlas: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie*.
13.2.1 Hoden 503-515

- Drake, R. L., Mitchell, A. W. M. & Vogl, A. W. (2021). *Gray's Atlas der Anatomie: Deutsche Bearbeitung von Lars Bräuer.* 224-226
- Fakoya, F. A. (2002). Reticulin fibres in the tunica albuginea and peritubular tissue of seminiferous tubules of adult male wistar rats. *Acta Histochemica*, 104(3), 279–283. <https://doi.org/10.1078/0065-1281-00646>
- Fietz, D. & Bergmann, M. (2017). Functional Anatomy and Histology of the Testis. In *Endocrinology* (S. 1–29). https://doi.org/10.1007/978-3-319-29456-8_9-1
- Fietz, D., Geyer, J., Kliesch, S., Gromoll, J. & Bergmann, M. (2011). Evaluation of CAG repeat length of androgen receptor expressing cells in human testes showing different pictures of spermatogenic impairment. *Histochemistry And Cell Biology*, 136(6), 689–697. <https://doi.org/10.1007/s00418-011-0871-6>
- Fietz, D., Ratzenböck, C., Hartmann, K., Raabe, O., Kliesch, S., Weidner, W., Klug, J. & Bergmann, M. (2014). Expression pattern of estrogen receptors α and β and G-Protein-coupled estrogen receptor 1 in human testis. *Histochemistry And Cell Biology*, 142(4), 421-431. <http://doi.org/10.1007/s00418-014-1216-z>
- Fietz, D., Schuppe, H. & Loveland, K. (2022). Immunobiology of Testicular Cancer. In *Springer eBooks*. https://doi.org/10.1007/16833_2022_7
- Fietz, D and Kliesch .S. (2022). Testicular biopsy and histology. *Andrology: Male Reproductive Helth and Dysfunction*
- Fijak, M. & Meinhardt, A. (2006). The testis in immune privilege. *Immunological Reviews*, 213(1), 66–81. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.2006.00438.x>
- Fink, C., Weigel, R., Fink, L., Wilhelm, J., Kliesch, S., Zeiler, M., Bergmann, M. & Brehm, R. (2009). Claudin-11 is over-expressed and dislocated from the blood–testis barrier in Sertoli cells associated with testicular intraepithelial neoplasia in men. *Histochemistry And Cell Biology*, 131(6), 755–764. <https://doi.org/10.1007/s00418-009-0576-2>

- Foradori, C. D., Weiser, M. & Handa, R. J. (2008). Non-genomic actions of androgens. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 29(2), 169–181. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2007.10.005>
- Hatzoglou, A., Kampa, M., Kaiser, C., Charalampopoulos, I., Theodoropoulos, P. A., Anezinis, P., Dambaki, C., Papakonstanti, E. A., Stathopoulos, E. N., Stournaras, C., Gravanis, A. & Castanas, E. (2005). Membrane Androgen Receptor Activation Induces Apoptotic Regression of Human Prostate Cancer Cells in Vitro and in Vivo. *The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(2), 893–903. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0801>
- Hess, R. A. & França, L. R. (2009). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (S. 1–15). https://doi.org/10.1007/978-0-387-09597-4_1
- Hoei-Hansen, C. E., Meyts, E. R., Daugaard, G. & Skakkebaek, N. E. (2005). Carcinoma in situ testis, the progenitor of testicular germ cell tumours: a clinical review. *Annals Of Oncology*, 16(6), 863–868. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdi175>
- Holm, M., Meyts, E. R., Andersson, A. & Skakkebaek, N. E. (2003). Leydig cell micronodules are a common finding in testicular biopsies from men with impaired spermatogenesis and are associated with decreased testosterone/LH ratio. *The Journal Of Pathology*, 199(3), 378–386. <https://doi.org/10.1002/path.1309>
- Horn, F. (2020). *Biochemie des Menschen: das Lehrbuch für das Medizinstudium*. 20.3 Typ-III-Rezeptor (G-protein-gekoppelt) 428-430, 24.2 Androgene- die männlichen Sexualhormone 508-510
- Ignatov, A., Ignatov, T., Weißenborn, C., Eggemann, H., Bischoff, J., Semczuk, A., Roessner, A., Costa, S. D. & Kalinski, T. (2011). G-protein-coupled estrogen receptor GPR30 and tamoxifen resistance in breast cancer. *Breast Cancer Research And Treatment*, 128(2), 457–466. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1584-1>

- Jacobsen, S. E., Ammendrup-Johnsen, I., Jansen, A. M., Gether, U., Madsen, K. L. & Bräuner-Osborne, H. (2017). The GPRC6A receptor displays constitutive internalization and sorting to the slow recycling pathway. *Journal Of Biological Chemistry*, 292(17), 6910–6926. <https://doi.org/10.1074/jbc.m116.762385>
- Johnsen, S. G. (1970). Testicular Biopsy Score Count – A Method for Registration of Spermatogenesis in Human Testes: Normal Values and Results in 335 Hypogonadal Males. *Hormone Research in Paediatrics*, 1(1), 2–25. <https://doi.org/10.1159/000178170>
- Johnson, L., Thompson, D. L. & Varner, D. (2008). Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. *Animal Reproduction Science*, 105(1–2), 23–51. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.11.029>
- Jørgensen, C. V. & Bräuner-Osborne, H. (2020). Pharmacology and physiological function of the orphan GPRC6A receptor. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 126(S6), 77–87. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13397>
- Josso, N., Di Clemente, N. & Gouédard, L. (2001). Anti-Müllerian hormone and its receptors. *Molecular And Cellular Endocrinology*, 179(1–2), 25–32. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(01\)00467-1](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(01)00467-1)
- Kabbesh, H., Bulldan, A., Konrad, L. & Scheiner-Bobis, G. (2022). The Role of ZIP9 and Androgen Receptor in the Establishment of Tight Junctions between Adult Rat Sertoli Cells. *Biology*, 11(5), 668. <https://doi.org/10.3390/biology11050668>
- Kalyvianaki, K., Panagiotopoulos, A. A., Malamos, P., Moustou, E., Tzardi, M., Stathopoulos, E. N., Ioannidis, G., Marias, K., Notas, G., Theodoropoulos, P. A., Castanas, E. & Kampa, M. (2019). Membrane androgen receptors (OXER1, GPRC6A AND ZIP9) in prostate and breast cancer: A comparative study of their expression. *Steroids*, 142, 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2019.01.006>
- Karsenty, G. & Khonsari, R. (2014). Regulation of male fertility by the bone-derived hormone osteocalcin. *Molecular And Cellular Endocrinology*, 382(1), 521–526. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.10.008>

- Khonsari, R., Sumara, G., Sumara, O., Ferron, M., Chang, H., Smith, C. E., Hermo, L., Suárez, S. S., Roth, B. L., Ducy, P. & Karsenty, G. (2011). Endocrine Regulation of Male Fertility by the Skeleton. *Cell*, *144*(5), 796–809. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.004>
- Kimura, N., Mizokami, A., Oonuma, T., Sasano, H. & Nishimura, H. (1993). Immunocytochemical localization of androgen receptor with polyclonal antibody in paraffin-embedded human tissues. *Journal Of Histochemistry And Cytochemistry*, *41*(5), 671–678. <https://doi.org/10.1177/41.5.8468448>
- Kirmani, S., Atkinson, E. J., Melton, L. J., Riggs, B. L., Amin, S. & Khosla, S. (2011). Relationship of testosterone and osteocalcin levels during growth. *Journal Of Bone And Mineral Research*, *26*(9), 2212–2216. <https://doi.org/10.1002/jbmr.421>
- Kliesch, S., Schmidt, S., Wilborn, D., Aigner, C., Albrecht, W., Bedke, J., Beintker, M., Beyersdorff, D., Bokemeyer, C., Busch, J., Claßen, J., De Wit, M., Dieckmann, K., Diemer, T., Dieing, A., Göckel, M., Göckel-Beining, B., Hakenberg, O. W., Heidenreich, A., . . . Albers, P. (2021). Management of Germ Cell Tumours of the Testis in Adult Patients. German Clinical Practice Guideline Part I: Epidemiology, Classification, Diagnosis, Prognosis, Fertility Preservation, and Treatment Recommendations for Localized Stages. *Urologia Internationalis*, *105*(3–4), 169–180. <https://doi.org/10.1159/000510407>
- Konrad, L., Albrecht, M., Renneberg, H., Ulrix, W., Hoeben, E., Verhoeven, G. & Aumüller, G. (2000). Mesenchymal entactin-1 (nidogen-1) is required for adhesion of peritubular cells of the rat testis in vitro. *European Journal of Cell Biology*, *79*(2), 112–120. [https://doi.org/10.1078/s0171-9335\(04\)70013-8](https://doi.org/10.1078/s0171-9335(04)70013-8)
- Krause, W. (2011). *Andrologie: Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane; 115 Tabellen*.
1.1 Endokrine Organe 2-5, 1.2 Spermatogenese 9-12, 1.7 Skrotum, Hodenhüllen und Samenstrang 25-26

- Krisp, A. & Křause, W. (2002). Das Sertoli-cell-only-Syndrom (Germinalzellaplasie) als Ursache männlicher Infertilität. *Reproduktionsmedizin*, 18(3), 101–104. <https://doi.org/10.1007/s00444-002-0338-2>
- Kumar, N. & Singh, A. K. (2015). Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *Journal Of Human Reproductive Sciences*, 8(4), 191. <https://doi.org/10.4103/0974-1208.170370>
- Lappano, R. (2012). GPCRs and cancer. *Acta Pharmacologica Sinica*, 33(3), 351–362. <https://doi.org/10.1038/aps.2011.183>
- Lee, H. & Chang, C. (2003). Recent advances in androgen receptor action. *Cellular And Molecular Life Sciences*, 60(8), 1613–1622. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-2309-3>
- Lee, N. K., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J. S., Confavreux, C., Dacquin, R., Mee, P. J., McKee, M. D., Jung, D. Y., Zhang, Z., Kim, J. K., Mauvais-Jarvis, F., Ducy, P. & Karsenty, G. (2007). Endocrine Regulation of Energy Metabolism by the Skeleton. *Cell*, 130(3), 456–469. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.047>
- Leitlinienprogramm Onkologie. S-3 Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Keimzelltumore des Hodens. (2020). <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/hodentumoren>.
- Lucas-Herald, A. K. & Mitchell, R. T. (2022). Testicular sertoli cell hormones in differences in sex development. *Frontiers in Endocrinology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.919670>
- Lüllmann-Rauch, R. (2019). *Taschenlehrbuch Histologie*.
20.1 Hoden 567, 20.2 Samenwege und akzessorische Drüsen 579
- Luttrell, L. M. (2006). Transmembrane Signaling by G Protein-Coupled Receptors. In *Humana Press eBooks* (S. 1–50). <https://doi.org/10.1385/1-59745-048-0:1>
- Maekawa, M., Kamimura, K. & Nagano, T. (1996). Peritubular Myoid Cells in the Testis: Their Structure and Function. *Archives Of Histology And Cytology*, 59(1), 1–13. <https://doi.org/10.1679/aohc.59.1>

- Mera, P., Laue, K., Ferron, M., Confavreux, C., Wei, J., Galán-Díez, M., Lacampagne, A., Mitchell, S. J., Mattison, J. A., Chen, Y., Bacchetta, J., Szulc, P., Kitsis, R. N., De Cabo, R., Friedman, R. A., Torsitano, C., McGraw, T. E., Puchowicz, M. A., Kurland, I. J. & Karsenty, G. (2016). Osteocalcin Signaling in Myofibers Is Necessary and Sufficient for Optimum Adaptation to Exercise. *Cell Metabolism*, 23(6), 1078–1092. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.05.004>
- Meyts, E. R., McGlynn, K. A., Okamoto, K., Jewett, M. A. & Bokemeyer, C. (2016). Testicular germ cell tumours. *The Lancet*, 387(10029), 1762–1774. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(15\)00991-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(15)00991-5)
- Michel, M. S., Thüroff, J. W., Janetschek, G. & Wirth, M. (2023). *Die Urologie*. Springer.
149. Hodentumor: Epidemiologie und Ätiologie 1663, 212. Andrologische Diagnostik bei Fertilitätsstörungen 2243-2247, 216. Obstruktive Azoospermie 2279, 217. Nichtobstruktive Azoospermie 2284
- Moch, H., Amin, M. B., Berney, D. M., Compérat, E., Gill, A. J., Hartmann, A., Menon, S., Raspollini, M. R., Rubin, M. A., Srigley, J. R., Tan, P. H., Tickoo, S. K., Tsuzuki, T., Turajlic, S., Cree, I. A. & Netto, G. J. (2022). The 2022 World Health Organization Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *European Urology*, 82(5), 458–468. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2022.06.016>
- Moore, F. L. & Evans, S. J. (1999). Steroid Hormones Use Non-Genomic Mechanisms to Control Brain Functions and Behaviors: A Review of Evidence. *Brain Behavior And Evolution*, 54(1), 41–50. <https://doi.org/10.1159/000006610>
- Moore, K. L. & Persaud, T. V. N. (2007). *Embryologie: Entwicklungsstadien, Frühentwicklung, Organogenese, Klinik*. Elsevier, Urban&FischerVerlag.
- 2.1.2 Spermatogenese 24, 5.2.4 Siebte Woche 98.
- Moriishi, T., Ozasa, R., Ishimoto, T., Nakano, T., Hasegawa, T., Miyazaki, T., Liu, W., Fukuyama, R., Wang, Y., Komori, H., Qin, X., Amizuka, N. & Komori, T. (2020). Osteocalcin is necessary for the alignment of apatite crystallites, but not

- glucose metabolism, testosterone synthesis, or muscle mass. *PLOS Genetics*, 16(5), e1008586. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008586>
- Mulisch, M. & Welsch, U. (2015). *Romeis - Mikroskopische Technik*. Springer Spektrum.
- 12.1.12 Bearbeitung (Fixierung, Einbettung und z.T. Färbung) spezieller Organe 300-309
- Müller, D., Davidoff, M., Bargheer, O., Paust, H. J., Pusch, W., Koeva, Y., Ježek, D., Holstein, A. F. & Middendorff, R. (2006). The expression of neurotrophins and their receptors in the prenatal and adult human testis: evidence for functions in Leydig cells. *Histochemistry And Cell Biology*, 126(2), 199–211. <https://doi.org/10.1007/s00418-006-0155-8>
- Neumann, A., Keller, T., Jocham, D. & Doehn, C. (2011). Die humane plazentare alkalische Phosphatase (hPLAP) ist der am häufigsten erhöhte Serummarker beim Hodentumor. *Aktuelle Urologie*, 42(05), 311–315. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1271545>
- Nieschlag, E., Behre, H. M. & Nieschlag, S. (2009). *Andrologie: Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. Springer.
- 11.3.3 Score-count-Evaluation 168-170
- Nishimura, H. & L'Hernault, S. W. (2017). Spermatogenesis. *Current Biology*, 27(18), R988–R994. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.07.067>
- Olesen, I. A., Andersson, A., Aksglæde, L., Skakkebaek, N. E., Meyts, E. R., Joergensen, N. & Juul, A. (2017). Clinical, genetic, biochemical, and testicular biopsy findings among 1,213 men evaluated for infertility. *Fertility And Sterility*, 107(1), 74-82.e7. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.09.015>
- Payne, A. H. & Hales, D. B. (2004). Overview of Steroidogenic Enzymes in the Pathway from Cholesterol to Active Steroid Hormones. *Endocrine Reviews*, 25(6), 947–970. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0030>
- Pelekanou, V. & Castanas, E. (2016). Androgen control in prostate cancer. *Journal Of Cellular Biochemistry*, 117(10), 2224–2234. <https://doi.org/10.1002/jcb.25572>

- Pelletier, R. (2011). The blood-testis barrier: the junctional permeability, the proteins and the lipids. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 46(2), 49–127. <https://doi.org/10.1016/j.proghi.2011.05.001>
- Pfleger, J., Gresham, K. S. & Koch, W. J. (2019). G protein-coupled receptor kinases as therapeutic targets in the heart. *Nature Reviews Cardiology*, 16(10), 612–622. <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0220-3>
- Pi, M., Chen, L., Huang, M., Zhu, W., Ringhofer, B., Luo, J., Christenson, L. K., Li, B., Zhang, J., Jackson, P. D., Faber, P., Brunden, K. R., Harrington, J. & Quarles, L. D. (2008). GPRC6A Null Mice Exhibit Osteopenia, Feminization and Metabolic Syndrome. *PLOS ONE*, 3(12), e3858. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003858>
- Pi, M., Faber, P., Ekema, G., Jackson, P. D., Ting, A. E., Wang, N., Fontilla-Poole, M., Mays, R. W., Brunden, K. R., Harrington, J. & Quarles, L. D. (2005). Identification of a Novel Extracellular Cation-sensing G-protein-coupled Receptor. *Journal Of Biological Chemistry*, 280(48), 40201–40209. <https://doi.org/10.1074/jbc.m505186200>
- Pi, M., Kapoor, K., Ye, R., Nishimoto, S. K., Smith, J. C., Baudry, J. & Quarles, L. D. (2016). Evidence for Osteocalcin Binding and Activation of GPRC6A in β -Cells. *Endocrinology*, 157(5), 1866–1880. <https://doi.org/10.1210/en.2015-2010>
- Pi, M., Nishimoto, S. K. & Quarles, L. D. (2017). GPRC6A: Jack of all metabolism (or master of none). *Molecular Metabolism*, 6(2), 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2016.12.006>
- Pi, M., Nishimoto, S. K. & Quarles, L. D. (2021). Explaining divergent observations regarding Osteocalcin/GPRC6A endocrine signaling. *Endocrinology*, 162(4). <https://doi.org/10.1210/endo/bqab011>
- Pi, M., Parrill, A. L. & Quarles, L. D. (2010). GPRC6A Mediates the Non-genomic Effects of Steroids. *Journal Of Biological Chemistry*, 285(51), 39953–39964. <https://doi.org/10.1074/jbc.m110.158063>

- Pi, M. & Quarles, L. D. (2012). Multiligand Specificity and Wide Tissue Expression of GPRC6A Reveals New Endocrine Networks. *Endocrinology*, *153*(5), 2062–2069. <https://doi.org/10.1210/en.2011-2117>
- Pi, M., Wu, Y. & Quarles, L. D. (2011). GPRC6A mediates responses to osteocalcin in β -cells in vitro and pancreas in vivo. *Journal Of Bone and Mineral Research*, *26*(7), 1680–1683. <https://doi.org/10.1002/jbmr.390>
- Premont, R. T. & Gainetdinov, R. R. (2007). Physiological Roles of G Protein–Coupled Receptor Kinases and Arrestins. *Annual Review of Physiology*, *69*(1), 511–534. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.022405.154731>
- Quigley, C. A., De Bellis, A., Marschke, K. B., El-Awady, M. K., Wilson, E. M. & French, F. S. (1995). Androgen Receptor Defects: Historical, Clinical, and Molecular Perspectives*. *Endocrine Reviews*, *16*(3), 271–321. <https://doi.org/10.1210/edrv-16-3-271>
- Rappolee, D.A. (1990). Optimizing the sensitivity of RT-PCR. *Amplifications A Forum for PCR Users*, *4*, 5-7
- Rassow, J., Netzker, R. & Hauser, K. (2022). *Duale Reihe Biochemie*.
2.2.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptor 591-601, 3.6.1 Androgene 650
- Raynaud, J. (2006). Prostate cancer risk in testosterone-treated men. *The Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology*, *102*(1–5), 261–266. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2006.09.032>
- Rehnitz, J., Rösner, S., Harsch, J., Dietrich, J. E., Brückner, T., Capp, E., Strowitzki, T. & Germeyer, A. (2020). Factors Influencing Success Rate of Intracytoplasmic Sperm Injection with Azoospermic Male Patients. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, *80*(07), 713–722. <https://doi.org/10.1055/a-1180-9094>
- Reiswich, V., Gorbokon, N., Luebke, A. M., Burandt, E., Menz, A., Kluth, M., Hübner, C., Wittmer, C., Weidemann, S., Fraune, C., Möller, K., Lebok, P., Sauter, G., Simon, R., Uhlig, R., Wilczak, W., Jacobsen, F., Minner, S., Krech, R., . . . Krech, T. (2021). Pattern of placental alkaline phosphatase (PLAP)

- expression in human tumors: a tissue microarray study on 12,381 tumors. *The Journal Of Pathology*, 7(6), 577–589. <https://doi.org/10.1002/cjp2.237>
- Ringel, E. & Riemekasten, G. (2021). Signalwege in der Immunologie. *Trillium Immunologie*, 5(1), 39–47. <https://doi.org/10.47184/ti.2021.01.04>
- Rossen, L., Nørskov, P., Holmstrøm, K. & Rasmussen, O. F. (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology*, 17(1), 37–45. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(92\)90017-w](https://doi.org/10.1016/0168-1605(92)90017-w)
- Rueda, P., Harley, E. A., Lu, Y., Stewart, G. D., Fabb, S. A., Diepenhorst, N., Cremers, B., Rouillon, M., Wehrle, I., Géant, A., Lamarche, G., Leach, K., Charman, W. N., Christopoulos, A., Summers, R. J., Sexton, P. M. & Langmead, C. J. (2016). Murine GPRC6A Mediates Cellular Responses to L-Amino Acids, but Not Osteocalcin Variants. *PLOS ONE*, 11(1), e0146846. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146846>
- Schumpelick, V. (2015). *Hernien*.
10.1 Leistenhernie des Kindes Allgemeines 130
- Schuppe, H., Behre, H. And Köhne F. (2022). Das neue WHO-Laborhandbuch zur Ejakulatdignostik: Ändern sich Befundinterpretation und Beratung der Patienten? *J. Reproduktionsmed. Endokrinol* 2022; 19 (4), 194-199
- Schünke, M., Schulte, E. & Schumacher, U. (2022a). *Prometheus Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem: LernAtlas der Anatomie*.
5.15 Hoden und Nebenhoden 228-230
- Schünke, M., Schulte, E. & Schumacher, U. (2022b). *Prometheus Innere Organe: LernAtlas Anatomie*.
6.12 Männliche Genitale 358-362
- Sharpe, R. M., McKinnell, C., Kivlin, C. & Fisher, J. S. (2003). Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*, 125(6), 769–784. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1250769>

- Shihan, M., Bulldan, A. & Scheiner-Bobis, G. (2014). Non-classical testosterone signaling is mediated by a G-protein-coupled receptor interacting with Gn α 11. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843(6), 1172–1181. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.03.002>
- Shima, Y. (2019). Development of fetal and adult Leydig cells. *Reproductive Medicine and Biology*, 18(4), 323–330. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12287>
- Simoni, M. & Huhtaniemi, I. T. (2017). *Endocrinology of the Testis and Male Reproduction*. Springer.
- Smajilovic, S., Clemmensen, C., Johansen, L. D., Wellendorph, P., Holst, J. J., Thams, P., Ogo, E. & Bräuner-Osborne, H. (2012). The l- α -amino acid receptor GPRC6A is expressed in the islets of Langerhans but is not involved in l-arginine-induced insulin release. *Amino Acids*, 44(2), 383–390. <https://doi.org/10.1007/s00726-012-1341-8>
- Sreenivasan, R., Gonen, N. & Sinclair, A. (2022). SOX Genes and Their Role in Disorders of Sex Development. *Sexual Development*, 16(2–3), 80–91. <https://doi.org/10.1159/000524453>
- Stammler, A., Lüftner, B. U., Kliesch, S., Weidner, W., Bergmann, M., Middendorff, R. & Konrad, L. (2016). Highly Conserved Testicular Localization of Claudin-11 in Normal and Impaired Spermatogenesis. *PLOS ONE*, 11(8), e0160349. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160349>
- Stine Jørgensen LDJ (2014). The third intracellular loop of the human L-amino acid receptor GPRC6A controls cell surface expression and receptor function. *Joint scientific meeting*.
- Suede, S.H., Malik, A., Sapra, A. (2023) Histology, Spermatogenesis. *StatPearls, Treasure Island (FL)*
- Sun, Y., Gao, X., Tang, Y., Xu, C. & Wang, L. (2006). Androgens Induce Increases in Intracellular Calcium Via a G Protein—Coupled Receptor in LNCaP Prostate Cancer Cells. *Andrology*, 27(5), 671–678. <https://doi.org/10.2164/jandrol.106.000554>

- Svechnikov, K., Izzo, G., Landreh, L., Weisser, J. & Söder, O. (2010). Endocrine Disruptors and Leydig Cell Function. *Journal Of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2010/684504>
- Tarulli, G. A., Stanton, P. G. & Meachem, S. J. (2012). Is the Adult Sertoli Cell Terminally Differentiated?1. *Biology Of Reproduction*, 87(1). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.095091>
- Thomas, P. (2019). Membrane Androgen Receptors Unrelated to Nuclear Steroid Receptors. *Endocrinology*, 160(4), 772–781. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00987>
- Thomas, P., Converse, A. & Berg, A. (2018). ZIP9, a novel membrane androgen receptor and zinc transporter protein. *General And Comparative Endocrinology*, 257, 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.04.016>
- Thomas, P., Pang, Y. & Dong, J. (2017). Membrane androgen receptor characteristics of human ZIP9 (SLC39A) zinc transporter in prostate cancer cells: Androgen-specific activation and involvement of an inhibitory G protein in zinc and MAP kinase signaling. *Molecular And Cellular Endocrinology*, 447, 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.02.025>
- Thomas, P., Pang, Y., Dong, J. & Berg, A. (2014). Identification and Characterization of Membrane Androgen Receptors in the ZIP9 Zinc Transporter Subfamily: II. Role of Human ZIP9 in Testosterone-Induced Prostate and Breast Cancer Cell Apoptosis. *Endocrinology*, 155(11), 4250–4265. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1201>
- Tian, J., Chi, C., Bian, G., Guo, F., Wang, X. & Yu, B. (2020). A novel GPCR target in correlation with androgen deprivation therapy for prostate cancer drug discovery. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 128(2), 195–203. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13499>
- Tsai, M. & O'Malley, B. W. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. Annual review of biochemistry. *Annual Review*

- Of Biochemistry*, 63(1), 451–486. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.63.070194.002315>
- Tüttelmann, F., Werny, F. M., Cooper, T. G., Kliesch, S., Simoni, M. & Nieschlag, E. (2010). Clinical experience with azoospermia: aetiology and chances for spermatozoa detection upon biopsy. *Andrology*, 34(4pt1), 291–298. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2010.01087.x>
- Ulfig, N. & Brand-Saberi, B. (2017). *Kurzlehrbuch Embryologie*. 8.3 Die Genitalorgane 120- 128
- Valverde, M.A., Parker, M.G. (2002). Classical and novel steroid actions: a unified but complex view. *Trends in Biochemical Sciences* 27, 4, 172-173
- Van Royen, M. E., Van Cappellen, W. A., De Vos, C., Houtsmuller, A. B. & Trapman, J. (2012). Stepwise androgen receptor dimerization. *Journal Of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.096792>
- Von Schweinitz, D. & Ure, B. (2019). *Kinderchirurgie: Viszerale und allgemeine Chirurgie des Kindesalters*. Springer Science & Business Media.
- Waheeb, R. & Hofmann, M. (2011). Human spermatogonial stem cells: a possible origin for spermatocytic seminoma. *Andrology*, 34(4pt2). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2011.01199.x>
- Wang, C., Liu, Y. & Cao, J. (2014). G Protein-Coupled Receptors: Extracellular Mediators for the Non-Genomic Actions of Steroids. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(9), 15412–15425. <https://doi.org/10.3390/ijms150915412>
- Wang, J., Li, Z. & Yang, W. (2022). What does androgen receptor signaling pathway in sertoli cells during normal spermatogenesis tell us? *Frontiers in Endocrinology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.838858>
- Weinbauer, G. F., Gromoll, J., Simoni, M. & Nieschlag, E. (2009). Physiologie der Hodenfunktion. In *Springer eBooks* (S. 15–61). https://doi.org/10.1007/978-3-540-92963-5_2

- Winter, E., Kliesch, D., Souchon, R., Wit, M. de. (2005). Serie: Diagnostik des Hodentumors, Diagnosis of testicular cancer. *Das deutsche Ärzteblatt*, 44, 3021-3025.
- Wellendorph, P. & Bräuner-Osborne, H. (2009). Molecular basis for amino acid sensing by family C G-protein-coupled receptors. *British Journal of Pharmacology*, 156(6), 869–884. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2008.00078.x>
- Wistuba, J., Neuhaus, N. & Nieschlag, E. (2022). Physiologie der Hodenfunktion. In *Springer Reference Medizin* (S. 1–44). https://doi.org/10.1007/978-3-662-61904-9_2-1
- Yang, Z., Wreford, N. G., Royce, P., De Kretser, D. M. & McLachlan, R. I. (1998). Stereological Evaluation of Human Spermatogenesis after Suppression by Testosterone Treatment: Heterogeneous Pattern of Spermatogenic Impairment¹. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(4), 1284–1291. <https://doi.org/10.1210/jcem.83.4.4724>
- Yang, X. J., Richie, J. P. (2023). Testicular germ cell neoplasie innsitu. *UpToDate* <https://www.uptodate.com/contents/testicular-germ-cell-neoplasia-in-situ>.

10.Ehrenwörtliche Erklärung

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

Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Datum:

Unterschrift:

11. Persönliche Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich bei der Forschungsgruppe des Institutes für Veterinär - Anatomie, -Histologie und -Embryologie am Universitätsklinikum der Justus-Liebig-Universität in Gießen bedanken, dass sie es mir ermöglicht haben, diese Arbeit durchzuführen.

Ein besonderer Dank geht hierbei an Frau Prof. Dr. Daniela Fietz und Dr. Katja Hartmann für ihre hervorragende Betreuung während meiner Doktorarbeit. Sowohl eure Kompetenz als auch eure Unterstützung haben meine Zeit im Institut bereichert. Es war für mich eine große Bereicherung, unter eurer Anleitung zu forschen.

Ein besonderer Dank geht auch an Frau Alex Hax, für ihre außergewöhnliche Unterstützung im Labor.

Vielen Dank für die ganze Unterstützung und dafür, dass eure Türen immer für mich offenstanden.

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern, Dr. Andreas Dalheimer und Christine Flory-Dalheimer, sowie meiner Schwester, dr. Johanna Dalheimer, die für mich immer ein großes Vorbild war und auch immer noch ist, bedanken. Sie haben mir nicht nur mein Studium ermöglicht, sondern waren auch eine wichtige Unterstützung während meiner Dissertation.

Auch meinem Partner Gregor Pavlitzek möchte ich für seine Geduld und Motivation danken.

Ohne euch wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen.

