

Histologische Veränderungen im Hoden bei vom  
Klinefelter-Syndrom betroffenen, männlichen Individuen  
(Mensch und transgene Maus)  
Untersuchung möglicher vaskulärer Umbauprozesse

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

vorgelegt von Parkitny, Stefanie Barbara

aus Meerbusch

Gießen (2018)

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie,  
unter der Leitung von Prof. Dr. Ralf Middendorff,  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Middendorff

2. Gutachter: PD Dr. Lutz Konrad

Tag der Disputation: 03.06.2019

Für meine Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>7</b>
1.1 Das Klinefelter-Syndrom .....	7
1.2 Anatomie und Funktion des Hodens beim Menschen .....	12
1.2.1 Die Testosteron produzierenden und sezernierenden Leydig-Zellen .....	13
1.2.2 Hormonachse des männlichen Reproduktionstraktes.....	13
1.2.3 Die Spermatogenese .....	14
1.2.4 Bestandteil der Tubuli seminiferi testis: Die Lamina propria.....	17
1.2.5 Gefäßversorgung des Hodens .....	17
1.3 Das Klinefelter Maus-Modell .....	19
1.4 Spezielle Histopathologie des Hodens im Fall des Klinefelter-Syndroms .....	21
1.4.1 Die fibrotische Lamina propria.....	22
1.4.2 Hyperplasie der Leydig-Zellen.....	24
1.4.3 Veränderungen der Gefäßstruktur im Hoden bei Infertilität unter Einbeziehung des Klinefelter-Syndroms .....	25
1.5 Das Neurofilament Nestin und sein Vorkommen im Hoden.....	27
<b>2 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG .....</b>	<b>30</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>31</b>
3.1 Herkunft und Auswahl des humanen Untersuchungsmaterials.....	31
3.2 Herkunft des Mausegewebes.....	31
3.3 Vorbereitung der Paraffinschnitte .....	31
3.4 Azanfärbung nach Heidenhain .....	32
3.5 Immunhistochemische Färbungen .....	32
3.6 Immunfluoreszenz .....	34
3.7 Aufnahmen am Lichtmikroskop .....	34
3.8 Proteinpräparation und Western Blot .....	35
3.8.1 Verwendete Lösungen, Puffer, Reagenzien und Materialien .....	35
3.8.2 Proteinpräparation aus Hoden der XY*- und XX <sup>Y*</sup> -Maus.....	36
3.8.3 Proteinbestimmung .....	37
3.8.4 Versuchsdurchführung Western Blot.....	37
3.8.5 Densitometrie.....	38

3.9 Clarity .....	39
3.9.1 Verwendete Lösungen, Puffer und Reagenzien .....	39
3.9.2 Versuchsdurchführung Clarity .....	39
3.10 Quantitative Auswertung der Hodenbiopsien nach Gefäßkategorien.....	41
3.10.1 Messungen der Biopsiegrößen und Auszählen der Gefäße.....	41
3.10.2 Statistikerhebung .....	41
3.11 Molekularbiologische Methoden .....	42
3.11.1 Primer .....	42
3.11.2 Quantitative Real-Time-PCR (qPCR).....	42
3.11.3 Statistische Auswertung der PCR-Ergebnisse .....	44
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>45</b>
4.1.1 Größere Gefäße in humanen Klinefelter-Syndrom Hodenbiopsien.....	45
4.1.2 Dreidimensionale Darstellung von Hodengefäßen mittels Clarity .....	45
4.2 Nestin-Expression im Hodengewebe von Klinefelter-Patienten in Gefäßwandzellen bei fehlender Expression in peritubulären Zellen .....	51
4.3 Nestin-positive Gefäßwandzellen in größeren Gefäßen .....	57
4.4 Nestin-positive, kleinere Gefäße in Klinefelter-Hodenbiopsien .....	59
4.5 Nestin-positive Gefäße bei Männern mit Infertilität, die nicht vom Klinefelter- Syndrom betroffen sind.....	61
4.6 Expressionsanalyse und Quantifizierung von Nestin im Hoden von Klinefelter- Syndrom-Patienten, SCO-Syndrom-Patienten anderer Genese und Kontroll-Patienten ohne Keimzellschädigung mittels qPCR .....	63
4.7 Nestin-Expression im Hoden des 41,XXY*-Maus-Modells während der postnatalen Entwicklung .....	65
4.8 Proliferation von Keimzellen und peritubulären Zellen des Hodens im Maus- Modell.....	70
4.9 Western-Blot-Analysen der Maus-Hoden .....	74
4.9.1 Nachweis von Nestin im adulten Hoden der XY*- und XX <sup>Y</sup> *-Maus .....	74
4.9.2 Nachweis von Cytochrom P450scc im adulten Hoden der XY*- und XX <sup>Y</sup> *-Maus.....	75
<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>77</b>
5.1.1 Vorkommen größerer Gefäße in Hodenbiopsien von Klinefelter-Patienten.....	77
5.1.2 Gefäßanalysen bei der 41,XXY*-Maus .....	79
5.1.3 Nestin-Expression in Gefäßwandzellen innerhalb des humanen Hodens beim Klinefelter-Syndrom .....	80

5.2 Relative Nestin-Expression bei Klinefelter-Syndrom-Patienten im Vergleich zu anderen Patientenkohorten.....	81
5.3 Nestin-Expression im Hoden des 41,XX <sup>Y*</sup> -Maus-Modells während der postnatalen Entwicklung .....	82
5.4 Cytochrom P450 <sub>scc</sub> -Expression im Hoden bei XXY*-Mäusen .....	83
5.5 Gegenüberstellung des XX <sup>Y*</sup> -Maus-Modells mit dem Klinefelter-Syndrom beim Menschen im Hinblick auf Gefäßvorkommen und peritubuläre Zellschicht.....	84
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>86</b>
<b>7 SUMMARY .....</b>	<b>88</b>
<b>8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS IN ALPHABETISCHER REIHENFOLGE.....</b>	<b>89</b>
<b>9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>91</b>
<b>10 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>93</b>
<b>11 ERKLÄRUNG.....</b>	<b>104</b>
<b>12 DANKSAGUNG.....</b>	<b>105</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Klinefelter-Syndrom

Das Klinefelter-Syndrom, bei dem erkrankte männliche Individuen überwiegend den Karyotyp 47,XXY besitzen, ist mit einer Inzidenz von einem Betroffenen bei 500 bis 600 männlichen Neugeborenen (Bojesen et al., 2003) die häufigste Chromosomenaberration bei Männern. Während der Karyotyp 47,XXY zu 80-90% auftritt, sind bei 10-20% der Erkrankten Mosaikformen vorhanden, was bedeutet, dass nicht alle Zellen denselben Karyotyp besitzen (47,XXY/46 XY) oder es finden sich höhergradige x-chromosomale Aneuploidien (48,XXY oder 49,XXX). Es sind aber auch weitere Y-Chromosomen oder strukturell abnorme, zusätzliche X-Chromosomen möglich (Bonomi et al., 2016). Erstmals wurde es im Jahr 1942 von Harry F. Klinefelter, einem Endokrinologen, beschrieben (Klinefelter et al., 1942). Der Karyotyp 47,XXY wurde 1959 von der Humangenetikerin Patricia A. Jacobs identifiziert. Ursächlich für die numerische Abweichung vom Chromosomensatz, der beim Mann normalerweise 46,XY beträgt, ist ein Non-disjunction während der Meiose (MacDonald et al., 1994). Dabei kann das zusätzliche X-Chromosom sowohl von der Mutter (zu 50%) als auch vom Vater (zu 46%) stammen (MacDonald et al., 1994). Bei der paternalen Vererbung tritt der Fehler während der ersten meiotischen Teilung, der Reduktionsteilung, auf, dessen Resultat es ist, dass aus einer diploiden Zelle zwei haploide Tochterzellen entstehen (MacDonald et al., 1994). Falls das überzählige X-Chromosom maternal vererbt wird, so wie es auch bei vom Triple-X-Syndrom betroffenen Frauen vorkommt, ist der Zeitpunkt des Meiosefehlers beim Klinefelter- und Triple-X-Syndrom zu 68% ebenfalls während der ersten meiotischen Teilung, zu 22% während der zweiten meiotischen Teilung (Äquationsteilung) und zu 9% postzygotisch festzustellen (MacDonald et al., 1994). Beim Zurückführen der fehlerhaften Meiose auf den Vater ist in Hinblick auf dessen Alter keine Besonderheit auffallend, wenn allerdings mütterlicherseits ein X-Chromosom zu viel vererbt wird, so geht dies, wie auch bei der häufigsten vorkommenden numerischen Chromosomenaberration, der Trisomie 21, einher mit einem erhöhten Alter der Mutter und der Fehler tritt während der Meiose I auf (Jacobs et al., 1988).

Der klinische Phänotyp der Erkrankten ist davon abhängig, wie alt dieser bei Erstmanifestation von Symptomen ist (Lanfranco et al., 2004). Präpubertär fallen milde körperliche Veränderungen auf, wie ein leicht vermindertes Hodenvolumen und lange Extremitäten, insbesondere die Beine, wobei die sexuelle Entwicklung altersgerecht

sein kann (Lanfranco et al., 2004). Im Jugendalter sind kleine, feste Hoden und eine verschieden ausgeprägte Symptomatik des das Syndrom charakterisierenden Androgenmangels ein typisches Merkmal der Betroffenen (Lanfranco et al., 2004). Das Volumen beider Testes, das beim Gesunden normalerweise 24-60ml beträgt, kann dabei auf im Mittel 5,5ml reduziert sein (Lanfranco et al., 2004). Man spricht in diesem Zusammenhang ab einem Testosteronspiegel von  $>12$  mmol/L von Hypogonadismus, unter dem mehr als die Hälfte der Patienten leiden. Die erniedrigten Androgenspiegel führen zu einem durch die Hypophyse gebildeten ansteigenden Follikel stimulierenden Hormon (FSH) und luteinisierenden Hormon (LH), sowie einem relativen Anstieg des Östrogens (Chang et al., 2015), wodurch auch von hypergonadotropem Hypogonadismus gesprochen wird. Weitere kennzeichnende Attribute sind Gynäkomastie, eine eunuchoiden Statur mit geringer viriler Körperbehaarung und die meist eine Infertilität verursachende Azoospermie (Aksglæde et al., 2005). Das Klinefelter-Syndrom fällt in der Klassifizierung des männlichen Hypogonadismus unter die primäre testikuläre Insuffizienz (hypergonadotroper Hypogonadismus), genauer die tubuläre Insuffizienz (Hedinger et al., 1991).

Histopathologisch zeigt sich dementsprechend ein Verlust an Keimzellen, der bereits beim Fetus festzustellen ist (Aksglæde et al., 2005), eine ausgeprägte Fibrose und Hyalinisierung der Tubuli seminiferi und die Hyperplasie des Interstitiums, insbesondere der Testosteron produzierenden Leydig-Zellen. Oft liegt ein Sertoli-cell-only (SCO)-Syndrom vor, jedoch können einzelne Herde mit erhaltener Spermatogenese gefunden werden, die für reproduktionsmedizinische Verfahren wie die testikuläre Spermienextraktion (TESE) in Kombination mit der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) genutzt werden können und so einem Klinefelter-Syndrom-Patienten zur Vaterschaft verhelfen können (Wikström et al., 2010). Eine detaillierte Darstellung der Histopathologie erfolgt unter 1.4.

Die chromosomale Veränderung hat allerdings nicht nur Auswirkungen auf den Reproduktionstrakt der Männer, sondern auch auf andere Organsysteme. In diesem Zusammenhang wird auf eine erhöhte Mortalität aufgrund verschiedener Erkrankungen hingewiesen, wie beispielsweise solcher, die das kardiovaskuläre System betreffen (Pasquali et al., 2013). Verursacht wird dies durch metabolische und hämostatische Veränderungen wie Diabetes mellitus und Lipidstoffwechselstörungen, jedoch konnte eine arterielle Hypertonie als Vertreter des metabolischen Syndroms nicht kausal mit dem Klinefelter-Syndrom verknüpft werden (Salzano et al., 2016). Im Vordergrund stehen dabei kongenitale Fehler des Herzens, Anomalien der linksventrikulären

Funktion sowie des Endothels und ebenso eine Einschränkung der kardiopulmonalen Leistung (Salzano et al., 2016). Zudem sind Patienten einem erhöhten Risiko für Veneninsuffizienz und rezidivierende venöse und arterielle Thromboembolien (tiefe Venenthrombose, Lungenembolie) ausgesetzt (Salzano et al., 2016).

In Bezug auf die endotheliale Dysfunktion wurde beschrieben, dass zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen vermindert vorkommen sollen (Di Mambro et al., 2010), was mit Arteriosklerose (Schmidt-Lucke et al., 2005) und einem Risiko für die koronare Herzkrankheit (Vasa et al., 2001) assoziiert wird. Klinefelter-Patienten haben im Vergleich zu Patienten, deren hypergonadotroper Hypogonadismus beispielsweise aufgrund eines Traumas, eines Tumors oder einer Hodentorsion, präpubertär erworben ist, trotz identischer Testosteron-Ersatztherapie höhere Apoptoseraten der Endothelzellen. Der Zelltod der Endothelzellen ruft eine Gefäßverletzung hervor, die wiederum bekannterweise für Arteriosklerose verantwortlich gemacht werden kann (Condorelli et al., 2013). Unter 1.4.3 werden Gefäßveränderungen im Hoden näher beschrieben, wobei die bisherige Datenlage noch keine eindeutigen Aussagen darüber erlaubt, ob solche zu den Ursachen der Infertilität gezählt werden können.

Eine weitere Ursache für die Tatsache, dass Menschen mit Klinefelter-Syndrom eine geringere Lebenserwartung haben könnten, ist, dass bei ihnen möglicherweise gehäuft Neoplasien auftreten. Eher seltene extragonadale, mediastinale Keimzelltumore werden häufiger bei ihnen beobachtet, aber auch von Brustkrebs, Hodenkrebs, Lymphomen und Leukämien wird berichtet (Aguirre et al., 2006).

Darüber hinaus gehört zu den klinischen Merkmalen auch die Assoziation mit Osteoporose bei vermindertem Vitamin D und geringerer Knochenmineraldichte (Ferlin et al., 2015).

Der Phänotyp wird zudem dadurch charakterisiert, dass kognitive Störungen, Verhaltensauffälligkeiten und psychiatrische Erkrankungen bestehen. Patienten weisen verbale Einschränkungen (Bender et al., 1993), Gedächtnisstörungen und Schwächen hinsichtlich hemmender exekutiver Funktionen, zu denen beispielsweise das Treffen von Entscheidungen, die Selbst- und Aufmerksamkeitskontrolle und das Arbeitsgedächtnis gezählt werden (Kompus et al., 2011), auf. Pro zusätzliches X-Chromosom lässt sich eine Verminderung des Intelligenzquotienten um ca. 10 bis 15 Punkte feststellen. Durchschnittlich liegt dieser z.B. bei einem Mann des seltenen Karyotypen 48,XXXY bei 60 (Linden et al., 1995), wobei ein Wert zwischen 85 und 115 im Normbereich liegt. Schizophrenien, Autismus, Psychosen, Angststörungen,

Depressionen sowie wahnhaftige Störungen sind bei Klinefelter-Patienten mit erhöhter Prävalenz zu diagnostizieren (Boks et al., 2007).

Zusammenfassend muss allerdings betont werden, dass der klinische Phänotyp eines Erkrankten sehr variabel ausgeprägt sein kann. Er reicht vom klassischen Erscheinungsbild, das viele typische Merkmale erfüllt, bis hin zu Phänotypen, bei denen sich Symptome in relativierter Form äußern (Simpson et al., 2003). Dementsprechend führt die Vielfalt dieser dazu, dass noch großer Bedarf an Ermittlung und Aufdecken von Hintergründen besteht. Der heutige Erkenntnisstand hält fest, dass sich der Phänotyp unweigerlich in Abhängigkeit vom genetischen Muster (X-Inaktivierung, CAG-Polymorphismus im Androgenrezeptor-Gen, genetisches Mosaik, Anzahl an zusätzlichen X-Chromosomen), vom Androgenmangel und vom Alter des Mannes verhält (Bonomi et al., 2016).

Dementsprechend liegt auch nahe, dass eine Vielzahl aller geschätzten Klinefelter-Patienten unwissend bezüglich ihrer genetischen Veränderung ist. Es existieren epidemiologische Studien aus Dänemark, die wiedergeben, dass nur knapp 25% die Diagnose erhalten und dies im mittleren 3. Lebensjahrzehnt (Groth et al., 2013). Die deutsche Klinefelter-Syndrom Vereinigung e.V. gibt statistische Angaben von ca. 80.000 in Deutschland lebenden Betroffenen an.

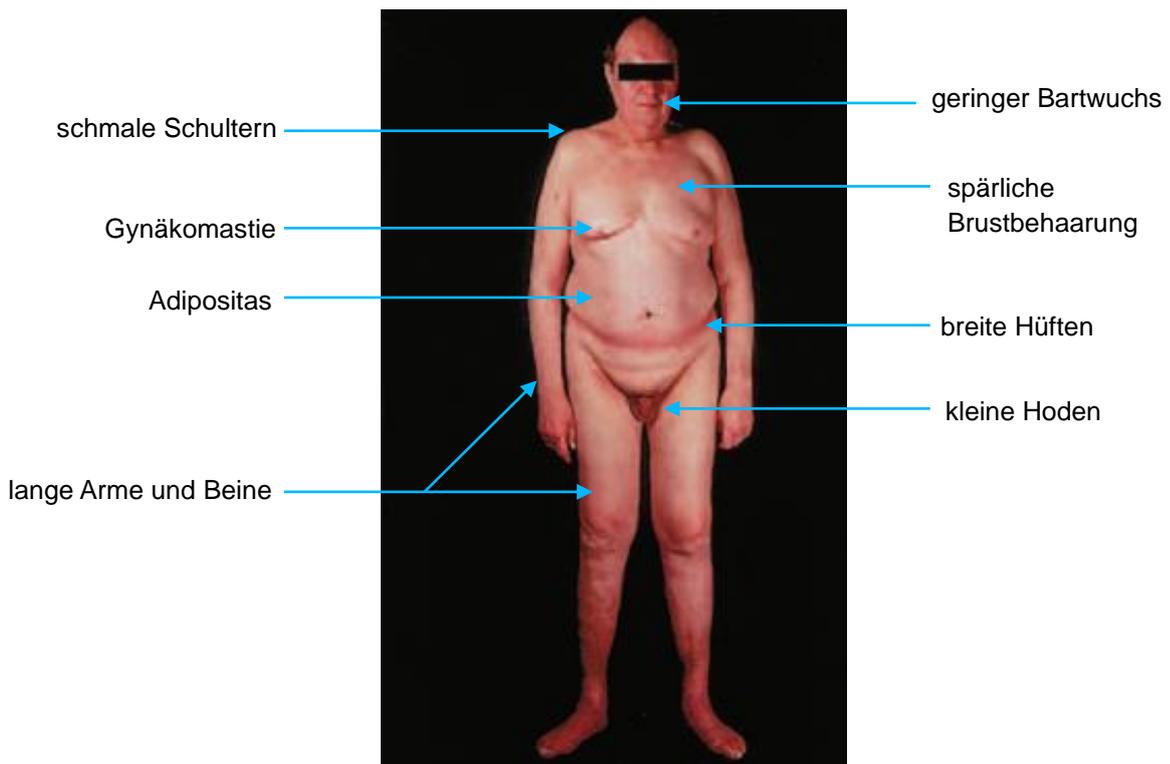


Abb. 1: **Mann mit Klinefelter-Syndrom** (Abbildung modifiziert nach Dissemmond et al., 2003)

## 1.2 Anatomie und Funktion des Hodens beim Menschen

Der Hoden (Testis), der paarig angelegt ist, ist von einer Bindegewebskapsel (Tunica albuginea) umschlossen und enthält ein Volumen von ungefähr 20 bis 25ml bei einem Durchmesser von ca. 30mm. Von der Kapsel ausgehend trennen Bindegewebssepten das Gewebe des Hodens in über 300 Hodenläppchen (Lobuli testis), wobei in ihnen Blut- und Lymphgefäße verlaufen. Diese orientieren sich zulaufend auf das sich auf der dorsalen Seite des Hodens befindliche Rete testis, das aus Spalträumen mit in diese mündende Samenkanälchen besteht. Die Samenkanälchen (Tubuli seminiferi contorti) sind mehrfach aufgeknaeuelt und bilden zusammen mit einem extensiven Interstitium das Parenchym der Lobuli testis. Die Tubuli seminiferi tragen das Keimepithel und sind im Durchmesser 230µm groß. Es konstituiert sich aus den sich zu Samenzellen entwickelnden Keimzellen, die sich jeweils in unterschiedlichen Stadien befinden und den Stütz- (Sertoli-) zellen. Zahlreiche Funktionen werden diesen zugeschrieben, wie eine Ernährungs- und Stützfunktion der Keimzellen, einen hormonell gesteuerten Einfluss auf diese, sowie die Bildung der Blut-Hoden-Schranke. Außerdem obliegt ihnen die Kontrolle des lumenwärts gerichteten Stofftransports im Samenkanälchen und sie geben ebenfalls die reifen Samenzellen ab. Umfasst werden die Tubuli seminiferi von der Lamina propria. Dem Hoden liegt der Nebenhoden an, in dem die aus der Rete testis führenden Ductuli efferentes, die wiederum in den Nebenhodengang (Ductus epididymis) münden, vorzufinden sind. Dort werden die Spermatozoen ausgereift und gespeichert (Holstein, 2008).

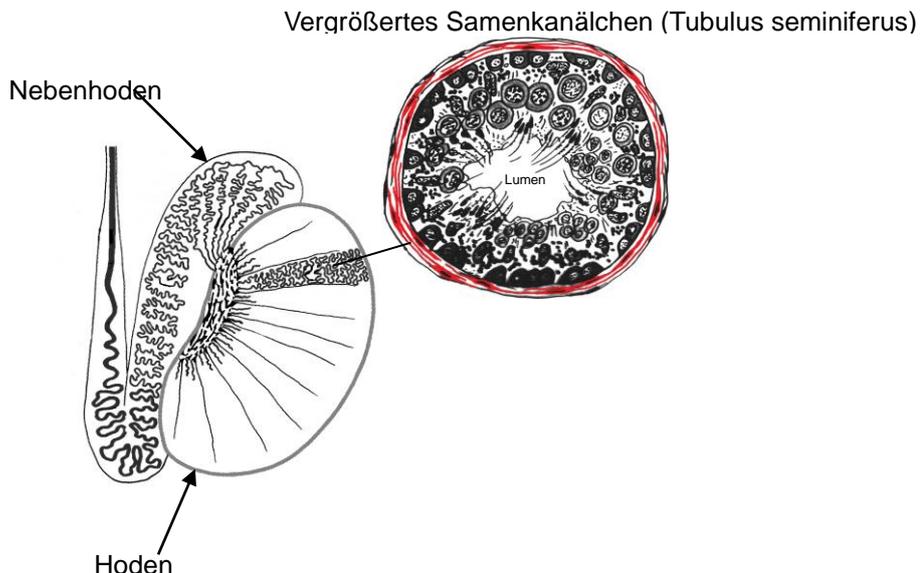


Abb. 2: **Anatomischer Aufbau des Hodens** (Abbildung modifiziert nach Holstein, 2008)

### **1.2.1 Die Testosteron produzierenden und sezernierenden Leydig-Zellen**

Im Interstitium des Hodengewebes liegen intertubulär, meist gruppenartig angeordnet, die Testosteron produzierenden Leydig-Zellen. Es existieren zwei unterschiedliche Generationen der Leydig-Zellen, die voneinander differenziert werden, die unreifen und reifen (Rey et al., 1996). Unreife Leydig-Zellen, die vom Neugeborenenalter bis zur frühen Pubertät 7-fach ansteigen, sind länglich und haben einen eher heterochromatischen (transkriptionsarmen) Zellkern. Reife Leydig-Zellen haben einen polygonalen Zellkörper, viel Zytoplasma und einen runden, euchromatischen (transkriptionsaktiven) Zellkern. Bis zur frühen Pubertät bleibt ihre Anzahl konstant, in der späten steigt sie stark an (Rey et al., 1996). Typisch für adulte Leydig-Zellen ist ein Reichtum an Zellorganellen, die auch bei anderen Steroidhormon produzierenden Zellen (beispielsweise der Nebenniere) vorkommen, glattes endoplasmatisches Retikulum und Mitochondrien mit tubulären Cristae. Im Zytoplasma befinden sich Lipofuszin Granula, die während endozytischen und lysosomalen Vorgängen anfallen. In Lipid Tropfen befinden sich Synthesestufen des Testosterons und auch „Reinke“ Kristalle sind klassische Merkmale der Leydig-Zelle (Nieschlag et al., 2013). Diese sind hexagonale Prismen, deren Funktion allerdings noch nicht geklärt ist. Bekannt ist nur, dass sie eine Immunreaktion auf anti-3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase zeigen (Mesa et al., 2015), einem für die Steroidhormonsynthese bedeutsamen Enzym, und in Hoden mit reduzierten Keimzellen, wie im Fall des SCO-Syndroms, gehäuft vorkommen, ebenso bei Kryptorchismus (Soerensen et al., 2016).

Neben Testosteron bilden Leydig-Zellen auch Neuropeptide und Katecholamine, haben gliale und neuronale Eigenschaften und können daher als pluripotent angesehen werden (Holstein, 1999). Sie nehmen wesentlichen Einfluss auf die Spermatogenese, den Spermientransport und die Durchblutung des Hodens.

### **1.2.2 Hormonachse des männlichen Reproduktionstraktes**

Unter dem Einfluss der hypophysären Proteohormone FSH und LH, die im Hoden eine Anregung der Androgenproduktion bewirken, proliferieren, entwickeln und differenzieren sich die Keimzellen. Diese Hormone, aufgrund ihrer Wirkung auf die Keimzellen als Gonadotropine bezeichnet, werden im Hypophysenvorderlappen gebildet. Gonadotropin-Releasing-Hormone (GnRH), die wiederum in Neuronen im medialen basalen Hypothalamus und der Area praeoptica hergestellt und gelagert werden, gelangen in einem pulsatilen Rhythmus über Nervenenden der Eminentia mediana in den hypothalamo-hypophysären Portalkreislauf und auf diese Weise zum

Hypophysenvorderlappen. Die Rezeptoren für GnRH sind G-Protein gekoppelt und vermitteln deren Wirkung auf die Synthese von FSH und LH, die dieselbe  $\alpha$ -Glykoproteinuntereinheit besitzen und sich durch ihre  $\beta$ -Untereinheit unterscheiden (McArdle & Roberson, 2015).

LH führt zu einer Stimulation der Testosteron produzierenden Leydig-Zellen, FSH hingegen wirkt auf die Sertoli-Zellen und somit die Keimzellbildung. Über eine negative Feedbackschleife beeinflusst Testosteron die GnRH Sekretion sowie die Empfänglichkeit der Gonadotropine auf diese (Holstein, 2008).

### **1.2.3 Die Spermatogenese**

Ausgangspunkt der Keimzellbildung aus pränatal und pubertär gebildeten Urkeimzellen sind die Spermatogonien ( $2n$ ), die der Basalmembran eines jeden Samenkanälchen aufsitzen und von denen verschiedene Typen, Typ A und Typ B, unterschieden werden können.

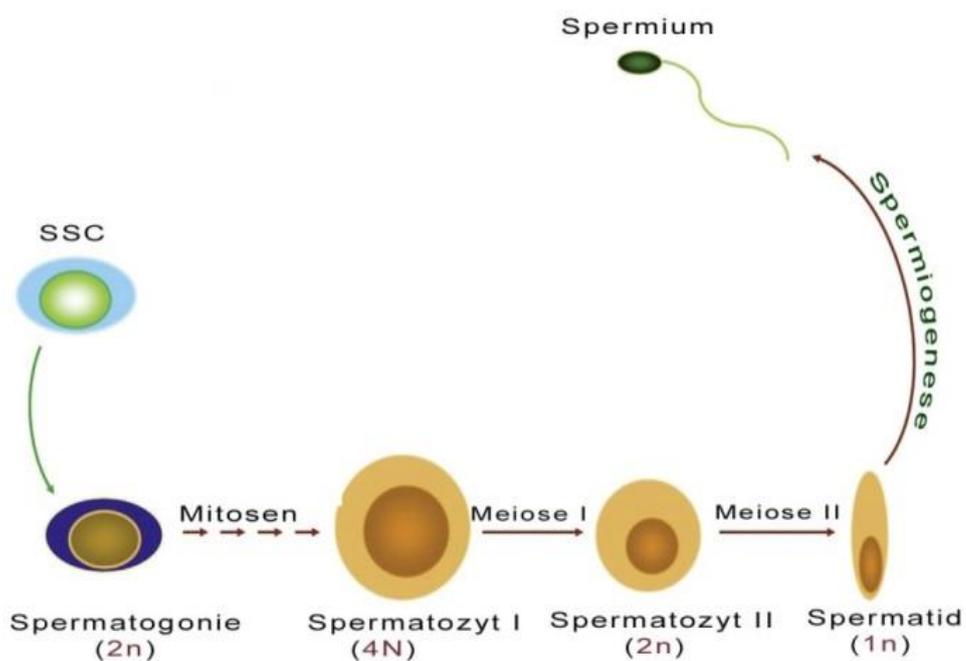
Die Kerne der Typ A dark (A1) Spermatogonien, die als spermatogoniale, unipotente Stammzellen (SSC) anzusehen sind, erscheinen wegen ihrer stärkeren Anfärbbarkeit dunkler. Aus ihnen treten Typ pale (A2) Spermatogonien mit blass wirkenden Kernen hervor. Beide Zelltypen sind in etwa gleicher Anzahl vorhanden, wobei noch keine genauen Daten darüber zur Verfügung stehen, inwiefern die Kernunterschiede Auswirkungen auf die Klongröße haben.

Einige der A-pale-Spermatogonien bleiben Stammzellen, andere differenzieren sich zu Typ B Spermatogonien, Zellen eines höheren Entwicklungsstadiums mit mehreren Nucleoli. Sie befinden sich nicht nur direkt auf der Basalmembran, sondern auch, über Zytoplasma mit dieser verbunden, über ihr.

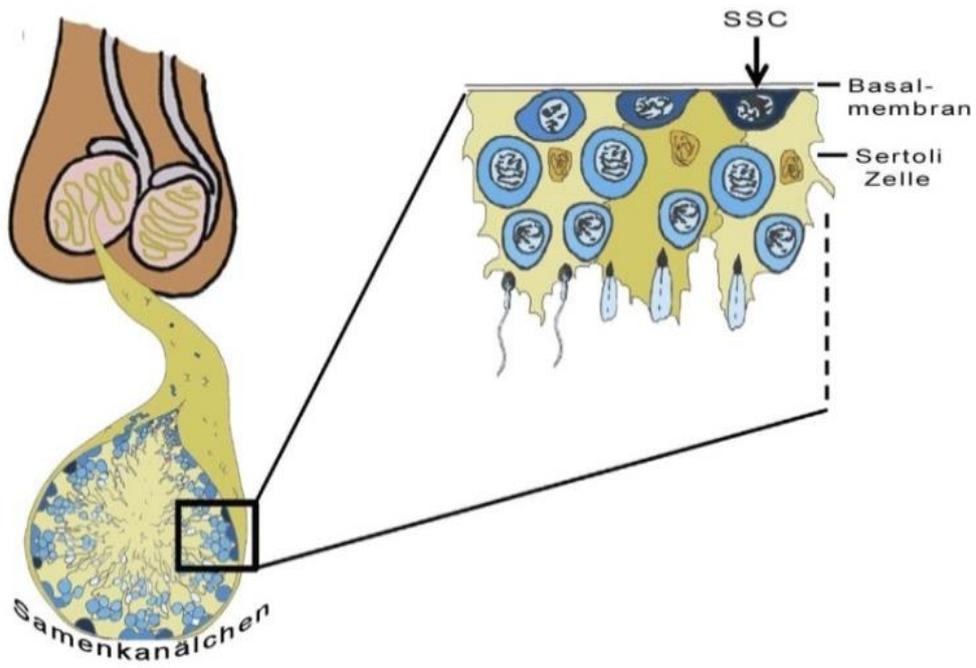
Finden Mitosen der Typ B Spermatogonien statt, so entstehen Spermatozyten I mit diploidem Chromosomensatz ( $4n$ ), der 46 beträgt und sich aus jeweils  $2 \times 22$  Autosomen und 2 Gonosomen zusammensetzt. Befinden sich die Spermatozyten I in der Prophase I der Meiose, fallen sie innerhalb des Keimepithels durch die charakteristischen Chromosomenkonfigurationen auf (Holstein, 2008). Sind Metaphase, Anaphase und Telophase vollendet, liegen zwei Spermatozyten II vor, deren Chromosomensatz haploid ( $2n$ ) ist und die im Folgenden in die Meiose II eintreten. Die nächste Entwicklungsstufe stellen die zum Tubulus lumenwärts gerichteten Spermatischen ( $1n$ ) dar, aus denen schließlich Spermatozoen entstehen, täglich rund  $4,4 \times 10^6/g$  Hodenparenchym (Valli et al., 2015).

Die Spermiogenese beschreibt dabei Reifungsprozesse, die ein Spermatid abschließen muss, um als vollendete Transportform der Keimzellen zu agieren. Zu ihr gehört die Bildung des Akrosoms durch den Golgi-Apparat, das während der Befruchtung durch seine Enzyme wie Akrosin elementar für die Durchdringung der Eizelle ist. Des Weiteren sind die Kernkondensation, bei der der zuvor abgerundete Kern durch Karyoplasmareduktion eine längliche Gestalt annimmt und ein Verlust an Histonen stattfindet, die Ausbildung eines Flagellums sowie, dass Zytoplasmareste (Residualkörper) abgestoßen und von den Sertoli-Zellen durch Phagozytose eliminiert werden, der Spermiogenese zuzuordnen (Nieschlag und Behre, 2000).

Sofern alle Prozesse abgeschlossen sind, werden die reifen Spermatozoen (Spermien) in das Tubuluslumen freigesetzt (Spermiatio).



A



B

Abb. 3: **A Die Spermatogenese. B Querschnitt eines Tubulus mit dem Keimepithel**  
 (Abbildung modifiziert nach Valli et al., 2015)

#### **1.2.4 Bestandteil der Tubuli seminiferi testis: Die Lamina propria**

Die Lamina propria liegt dem Keimepithel an und bildet mit diesem das Samenkanälchen (Tubulus seminiferus). Sie setzt sich aus 5 bis 7 Zellschichten zusammen. Dabei sind die äußeren 1-2 Schichten Fibroblasten, die inneren 3-5 Schichten Myofibroblasten (Davidoff et al., 1990). Diese Zellart, auch peritubuläre Zellen genannt, vereint Eigenschaften des Bindegewebes und glatter Muskelzellen, die sie zur Kontraktilität befähigen. Daher exprimieren Myofibroblasten Vimentin (Intermediärfilament der Fibroblasten) sowie alpha-smooth muscle actin (SMA), Pan-actin, Desmin, GB 42 und smooth muscle myosin (Holstein et al., 1996). Die äußeren Schichten sind Vimentin-positive Fibroblasten und wahrscheinlich mit dem Interstitium verwandt (Davidoff et al., 1990). Zwischen diesen Zellschichten liegt extrazelluläre Matrix, die aus Heparan- und Chondroitinsulfat als Vertreter der Proteo- und Glykosaminoglykane (Holstein et al., 1996), im Übrigen aus kollagenem Bindegewebe der Typen 1 und 3 (Takaba, 1990) besteht.

Die Lamina propria der Maus besteht im Gegensatz zu der des Menschen nur aus einer Schicht (Christl et al., 1990). Diese Schicht sehr dünner, glatter Muskelzellen (peritubuläre Zellen, Myoidzellen) sitzt der Basalmembran des Keimepithels auf.

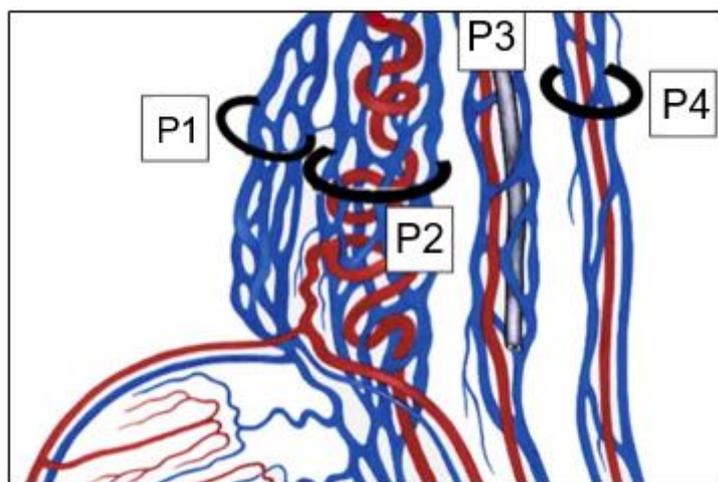
#### **1.2.5 Gefäßversorgung des Hodens**

Die Arteria testicularis (A. testicularis) geht aus der Aorta abdominalis hervor und verläuft gemeinsam mit der Vena testicularis retroperitoneal bis zum Anulus inguinalis profundus (innerer Leistenring). Dort tritt sie durch den Canalis inguinalis (Leistenkanal) und verlässt so die Bauchhöhle, um dann Bestandteil des Funiculus spermaticus (Samenstrang), der außerdem den Ductus deferens (Samenleiter) und Nervenfasern führt, zu werden. Im weiteren Verlauf anastomosiert die A. testicularis mit der A. ductus deferentis, die wiederum aus einem Ast der A. iliaca interna, der A. umbilicalis, entspringt. Sie ist stark verflochten und wird umgeben von Venen des Plexus pampiniformis, der der wichtigen Thermoregulation dient, da er das wärmere, arterielle Blut der A. testicularis abkühlt. Anastomosen existieren außerdem zwischen der A. ductus deferentis und der A. cremasterica (aus der A. epigastrica inferior, einem Ast der A. iliaca externa), (Schiebler und Korf, 2007; Holstein, 2008).

Die A. testicularis, im Hoden in der Tunica albuginea liegend, die diesen als Kapsel bindegewebig umschließt, gibt Äste in Bindegewebssepten ab. Diese unterteilen das testikuläre Gewebe. Sie laufen annähernd bis zum Rete testis, das eine Verbindung der Samenkanälchen mit den Ductuli efferentes schafft. Dort ziehen die Arterien als

Arteriae recurrentes zurück zu den Lobuli testis, wo sie die einzelnen Samenkanälchen versorgen und die Arteriae segmentales abgeben, die in das Kapillarnetz fortschreiten. Somit besteht eine enge Wechselbeziehung zwischen dem anatomischen Aufbau des Hodens und der Architektur der vaskulären Versorgung (Ergün et al., 1994). Das kapillare Bett vereint sowohl venöse und arterielle Inter-Leydig-Zell-Kapillare als auch Intramuralkapillaren, die zwischenliegend vorkommen und sich in der Lamina propria befinden. Sie sind mit Fenestrations versehen (Ergün et al., 1996), damit ein Stoffaustausch mit den Keimzellen stattfinden kann. Sertoli- und Leydig-Zellen bestimmen durch ihre Bildung des Wachstumsfaktors VEGF (vascular endothelial growth factor), wie stark das Endothel dieser Kapillaren fenestriert ist. Das Keimepithel selbst jedoch ist nicht vaskularisiert, was dadurch begründet sein könnte, dass die peritubulären Zellen der Lamina propria den Wachstumsfaktor PEDF (pigment epithelium-derived factor) sezernieren (Windschützl et al., 2015), der eine Anti-Angiogenese bewirkt (Bouck, 2002).

Um die drei Arterien, A. testicularis, A. ductus deferentis und A. cremasterica, befinden sich venöse Plexus (Plexus pampiniformis). Sie sind aufgebaut aus groß- und kleinlumigen Venen, die miteinander und mit den Arterien anastomosieren. Durch diese veno-arteriöse Anastomosen gelangt Testosteron über die Venen wieder in die A. testicularis und kann so dem Hoden zurückgeführt werden, um die Spermatogenese aufrecht zu erhalten (Holstein, 2008).



**Abb. 4: Gefäßversorgung des Hodens: Venöse Plexus (Plexus Pampiniformis)**

P1: venöser Plexus ohne Begleiterarterie; P2: venöser Plexus, der die A. testicularis umgibt; P3: venöser Plexus, der die A. ductus deferentis umgibt (im Funiculus spermaticus); P4: venöser Plexus, der die A. cremasterica umgibt. (Abbildung modifiziert nach Holstein, 2008)

### 1.3 Das Klinefelter Maus-Modell

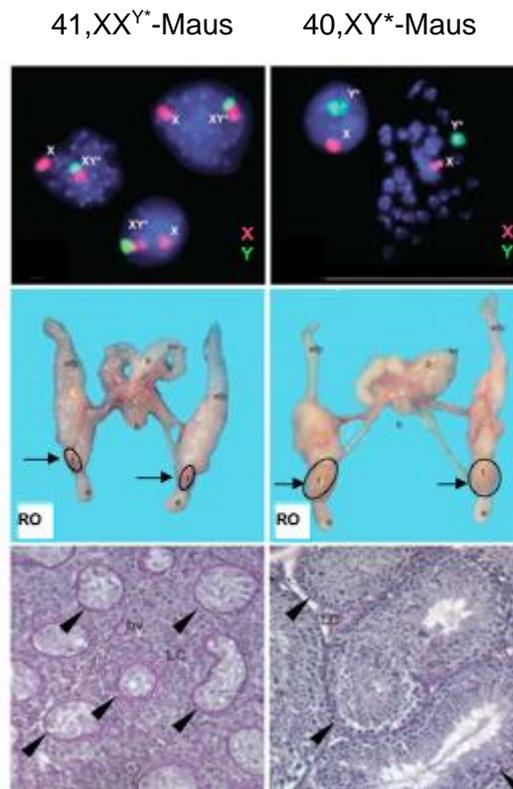
Dadurch, dass das Klinefelter-Syndrom die beim Mann häufigste chromosomale Aneuploidie ist, bei der die Gonosomen hyperploid vorkommen, besteht ein hohes wissenschaftliches Interesse daran, pathophysiologische Zusammenhänge, insbesondere auf molekularer Ebene, zu eruieren. Im Bereich der Grundlagenforschung stellen zu diesem Zweck Tiermodelle unverzichtbare Werkzeuge dar.

Vorab muss allerdings die Problematik betont werden, solche Tiere überhaupt heranzuzüchten, da das beinahe bedeutsamste klinische Charakteristikum beim überzähligen X-Chromosom die Infertilität ist.

Erstmalig konnten 1991 mit Hilfe eines 4-Generationen-Brutschemas, XXY-Mäuse produziert werden, die sich auf 25% der Nachkommenschaft beliefen. Maßgeblich war dabei die Integration eines strukturell umorganisierten Y\*-Chromosoms, dessen Zentromer durch eine spontane Mutation an das distale Ende eines normalen Y-Chromosoms gesetzt wurde. Der kurze Arm befindet sich am Ende des Y\*-Chromosoms und die pseudoautosomale Region im Zwischenraum, distal des neuen Zentromers (Eichner et al., 1991). Findet nun die genetische Rekombination einer fertilen, männlichen 40,XY\*-Maus mit einer weiblichen 40,XX-Maus statt, kann ein Non-disjunction der Geschlechtschromosomen während der Meiose auftreten, sodass 41,XXY\*-Mäuse entstehen (Wistuba et al., 2010). Bei Mäusen mit diesem Karyotyp wurde bei Untersuchungen des Hodens bereits während der Entwicklung ein vermindertes Keimzellaufreten entdeckt, sie sind infertil (Hunt et al., 1998).

2001 wurde von Lue et al. ein weiteres Modell vorgestellt, mit der Absicht, die Hoden adulter Tiere phänotypisch zu beschreiben und im juvenilen Alter herauszufinden, wie sich die Entwicklung des Keimzellverlusts vollzieht. Dazu wurden männliche Wildtyp-Mäuse mit weiblichen Chimären, die wiederum männliche embryonale Stammzellen trugen, gepaart und anschließend 41,XXY-Mäuse durch das Southern Blot-Verfahren oder Karyotypisierung ermittelt. Das Gewicht der Hoden der adulten transgenen Mäuse war stark vermindert, histologisch zeigten sich verkleinerte Tubuli seminiferi, in denen keine Keimzellen vorzufinden waren und ebenso, dem menschlichen Phänotyp entsprechend, eine Hyperplasie und Hypertrophie der sich im Interstitium befindlichen Leydig-Zellen. Hingegen traten bei den juvenilen Männchen Spermatogonien auf, die dem Erscheinungsbild zufolge zwar regelrecht erschienen, jedoch innerhalb von 10 Tagen nachgeburtlich verloren gingen (Lue et al., 2001, 2005).

Ein weiteres Maus-Modell wurde von Lewejohann et al. 2009 vorgestellt und dazu genutzt, Verhaltensauffälligkeiten bei den genetisch veränderten Mäusen zu präsentieren, die Rückschlüsse auf eine eingeschränkte Hirnfunktion erlauben. Dazu wurden Tiere des B6Ei.Lt-Y\* Stamms genutzt. Bei diesem Modell tragen die Väter der 41,XX<sup>Y\*</sup>-Mäuse ein Y-Chromosom, das dadurch modifiziert wurde, dass sein bedeutsamer Teil an ein X-Chromosom im Sinne einer Translokation angehängt wurde, die verknüpften X<sup>Y\*</sup>-Chromosomen erscheinen so als ein Chromosom.



**Abb. 5: 41,XX<sup>Y\*</sup>-Maus und 40,XY\*-Maus im Vergleich**

Oben: Interphase Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, Mitte: RO = Reproduktionsorgane: auffällig ist das stark verminderte Hodenvolumen bei der 41,XX<sup>Y\*</sup>-Maus (Hoden sind eingekreist und Pfeile zeigen auf diese), Unten: Histologie, PAS- Färbung. Die Tubuli der 41,XX<sup>Y\*</sup>-Maus enthalten nur Sertoli-Zellen, es liegt eine Leydig-Zell-Hyperplasie (Leydig-Zellen mit „LC“ markiert) vor. Bei der 40,XY\*-Maus ist das Keimepithel regelrecht konstituiert. Pfeilspitzen deuten auf die Tubuli. (Abbildung modifiziert nach Wistuba et al., 2010)

#### **1.4 Spezielle Histopathologie des Hodens im Fall des Klinefelter-Syndroms**

Das histologische Erscheinungsbild des Hodens beim Klinefelter-Syndrom kann stark variieren. Während bei milderer Ausprägung kaum auffallende Veränderungen hinsichtlich der Gewebsstruktur auftreten, lassen sich auch Histologien beschreiben, bei denen kaum noch intakte Samenkanälchen vorzufinden sind.

Ein Hauptmerkmal ist sicherlich das reduzierte Keimzellvorkommen, sodass meist von einer Azoospermie mit Tubulusfibrose und -hyalinisierung gesprochen wird, wodurch ein Hypogonadismus resultiert, der durch eine frühzeitige Testosteronsubstitution behandelt werden kann (Høst et al., 2014). Zu welchem Zeitpunkt genau die Keimzellen schwinden, kann aufgrund der inkongruenten Studienlage noch nicht hinreichend festgelegt werden. Einigen Ergebnissen zufolge treten bereits neonatal weniger Keimzellen auf, andere dementieren diese These und berichten von regelrechten histologischen Verhältnissen zum vorgeburtlichen Entwicklungsstand (Werler et al., 2014). Jedoch wurden bei einigen Untersuchungen kryptorchide Patienten nicht ausgeschlossen, sodass möglicherweise die Deszensusstörung verantwortlich für den Keimzellschwund war.

Eine weitere Vermutung ist, dass die Keimzellen zum Zeitpunkt steigenden Testosterons zu Beginn der Pubertät verloren gehen und zudem auf dem Stadium der Typ A Spermatogonie stagnieren (Wikstrom et al., 2004). Diese diploiden Zellen treten nicht in die Meiose ein und verursachen daher eine Keimzellstörung.

Ursächlich für die fehlerhafte Meiose und Mitose beim überzähligen X-Chromosom im Fall des Klinefelter-Syndroms könnte sein, dass die Keimzelle während der Teilung nicht mit dem abnormalen, ungeraden Chromosomensatz umgehen kann und darüber hinaus die Population der spermatogonialen Stammzellen gestört ist. Werler et al. (2014) konnten in diesem Zusammenhang nachweisen, dass Keimzellen von 41,XX<sup>Y\*</sup>-Mäusen am 1. und 3. postpartalen Tag für den Stammzellmarker Lin28a nur noch gering immunopositiv sind, ab dem 5. Tag nach der Geburt zeigen diese gar kein Signal mehr. Bei den Kontrollmäusen hingegen ist Lin28a während des ganzen Lebens zu detektieren (Werler et al., 2014).

Schon im Jahr 1957 beschrieben Ferguson-Smith et al. histologische Unterschiede zwischen von chromatin-positiven und chromatin-negativen Patienten abstammenden Biopsien. Als chromatin-positiv werden Individuen bezeichnet, die nur ein X-Chromosom haben, wobei es sich dabei um das Geschlechtschromatin oder den Barr-Körper handelt, das in 40-80% der Zellkerne bei Frauen vorkommt und epigenetisch

inaktiviert wird, damit nicht zu viele x-chromosomale Genprodukte entstehen (Dosiskompensation), (Linß et al., 1999).

Die einzige Gemeinsamkeit beider Formen ist, dass im Interstitium des Hodengewebes übermäßig viele Leydig-Zellen, aber weniger Tubuli vorliegen. Gewebe mit Abstammung chromatin-negativer Patienten wird charakterisiert durch diffuse Leydig-Zell-Hyperplasie und normal große Tubuli, nur wenige davon mit intaktem Keimepithel, die meisten sind nur mit Sertoli-Zellen ausgekleidet oder es treten „ghost“ Tubuli auf (Ferguson-Smith et al., 1957), mit Fibrose der Lamina propria (auch Tubulusschatten genannt). Diese pathologische Besonderheit, die Tubulusschatten, wurden auch im Gewebe chromatin-positiver Fälle entdeckt. Interstitiell befinden sich teils Kernpleomorphe Zellkonglomerate mit guter Vaskularisierung. Zudem gibt es große, fast Tubulus-freie Bereiche oder nur kleine Tubulusschatten sind vorzufinden. Eine intakte Spermatogenese fehlt fast vollständig, wenn überhaupt Keimzellen gefunden werden können, dann sind es Spermatogonien oder Spermatozyten (Ferguson-Smith et al., 1957; Sulser et al., 1970).

#### **1.4.1 Die fibrotische Lamina propria**

Eine Fibrose der das Keimepithel tragenden Lamina propria eines Samenkanälchens, das die Funktion seiner Kontraktilität erfüllt und somit den Spermientransport gewährleistet, wird in Zusammenhang mit Infertilität beim Mann gebracht (Albrecht et al., 2009). Unter diesen Umständen erhöht sich die Anzahl der Myofibroblasten (peritubuläre Zellen) bei gleichzeitiger Zunahme der extrazellulären Matrix. Myofibroblasten zeigen eine Immunreaktion auf Zellmarker, die sowohl für Fibroblasten als auch glatte Muskelzellen typisch sind, wie CD34 (Kuroda et al., 2004), CD90/Thy-1 (Albrecht et al., 2006), Vimentin, Desmin, Myosin (Virtanen et al., 1986), SMA (Tung et al., 1990) und Calponin.

Bei infertilen Patienten konnte herausgefunden werden, dass Marker, die für die Kontraktilität verantwortlich sind, wie Myosin heavy chain (MHC) und Calponin und Marker der Relaxation der glatten Muskelzellen, wie die zyklische Guanosinmonophosphat abhängige Proteinkinase 1 (cGKI), in Myofibroblasten im Vergleich zu Kontrollen mit ungestörter Spermatogenese reduziert exprimiert werden. In dieser Untersuchung wurden jedoch Proben von Patienten mit Infertilität genetischer Ursache ausgeschlossen und nur solche herangezogen, bei denen eine gemischte tubuläre Hodenatrophie („mixed atrophy“) vorlag, bei der die Samenkanälchen unterschiedlich stark atrophiert sind. Bei einem Vergleich zwischen Myofibroblasten

gesunder Männer und solcher von Männern mit Klinefelter-Syndrom haben Martin et al. 1992 zunächst eine Einteilung der Samenkanälchen in 5 verschiedene Typen je nach Sklerosegrad vorgenommen. Dieser wurde festgelegt anhand der gemessenen Dicke der Lamina propria.

Typ a: Normale Lamina propria ( $< 7 \mu\text{m}$ )\*

Typ b: leichte Verdickung (7-10  $\mu\text{m}$ )\*

Typ c: initiale Sklerose (10-15  $\mu\text{m}$ )

Typ d: fortgeschrittene Sklerose (15-20  $\mu\text{m}$ )

Typ e: vollständige Sklerose ( $> 20 \mu\text{m}$ )

Bei den Kontrollhodenbiopsien waren ausschließlich Typ a und b mit intakter Spermatogenese zu identifizieren, die Klinefelter-Proben waren den Typen b, c, d und e zuzuordnen, wobei die Samenkanälchen Sertoli-Zellen, teilweise Spermatogonien und im Falle des b Typs gelegentlich auch Spermatozyten oder auch Spermatisden enthielten. In der Ultrastruktur, die durch Elektronenmikroskopie begutachtet werden konnte, waren bei Typ a und b zahlreiche Mikrofilamentbündel mit elektronendichten dense-bodies (in der glatten Muskelzelle als Verdichtungszone des Zytoskeletts) zu erkennen, die hingegen bei Typ c weniger geordnet waren und keine dense-bodies aufwiesen. Zudem trennten die inneren und äußeren Schichten der Myofibroblasten Kollagenfasern und es gab Invaginationen der Basallamina. Typ d und e kennzeichneten sich durch eine unterbrochene Basallamina und fehlenden mehrschichtigen Aufbau der Lamina propria, der durchzogen war von vielen unregelmäßig angeordneten Kollagenfasern, zwischen denen sich amorphes Material befand. Die peritubulären Zellen selbst formten nur zwei Schichten und zeigten morphologische Veränderungen, ebenso zeigten Zellorganellen der Membran eine Schwellung, die als Degeneration angesehen werden konnte. Der mittlere Durchmesser der Samenkanälchen reduzierte sich außerdem von Typ a zu den anderen 4 Typen hin stetig, wie auch die Anzahl der Desmin-positiven Zellen, die Anzahl der Vimentin-positiven Zellen allerdings stieg, sodass Martin et al. (1992) die Hypothese erhoben, dass im Falle des Klinefelter-Syndroms peritubuläre Zellen die für sie charakteristischen Eigenschaften nach und nach verlieren und eher Fibroblasten ähnlicher werden.

Eine weitere Untersuchung der fibrotischen Lamina propria Infertiler wurde von Volkmann et al. 2011 veröffentlicht. Darunter waren Proben von Patienten mit Kryorchismus, Orchitis, testikulärer Feminisierung, Prostata Karzinom, mit Zustand

nach Vasektomie, mit Seminomen sowie von Transsexuellen. In sämtlichen Proben wurde SMA innerhalb der Lamina propria gefunden. Diese wurde in 3 verschiedene Verdickungstypen eingeteilt, wobei sich beim 1. Verdickungstyp (definiert als Gruppe 2; Gruppe 1 ist die normale Lamina propria) lediglich mehr extrazelluläre Matrix zwischen den Myofibroblastenschichten befindet. In Gruppe 3 gibt es nur 3 Zellschichten, die erste ist die dem Keimepithel anliegende innere Myofibroblastenschicht, dann folgt eine Schicht extrazellulärer Matrix, die unterschiedlich dick sein kann und außen, dem Interstitium hin gerichtet, folgt eine weitere Myofibroblastenschicht. Die Gruppe 4 unterscheidet sich dadurch von Gruppe 3, dass die innere Schicht, aus Myofibroblasten gebildet, fehlt. Dennoch exprimierten alle Myofibroblasten, unabhängig welcher Verdickungsgruppe zugehörig, SMA, MHC, Calponin, cGMP-abhängige-Proteinkinase I und Phosphodiesterase 5. Von Gruppe 2 zu 4 nahm allerdings der Durchmesser des Samenkanälchens und der Grad an uneingeschränkter Spermatogenese ab. Laut Volkmann et al. (2011) besteht demnach kein Hinweis darauf, dass die Ursache eines Spermatogenesedefekts darin liegt, dass Myofibroblasten ihre kontraktile Eigenschaften verlieren.

Insgesamt liefern alle diese Forschungsarbeiten allerdings keine Antwort auf die Fragestellung, ob eine Lamina propria-Verdickung als Ursache oder Folgeerscheinung einer Keimzellstörung angesehen werden kann. In diesem Kontext wäre eine weitere Charakterisierung solcher Samenkanälchen aufschlussreich, die bereits Anzeichen einer Fibrose aufweisen und gleichzeitig Keimzellen enthalten.

#### **1.4.2 Hyperplasie der Leydig-Zellen**

Beim typischen Klinefelter-Syndrom sind die Leydig-Zellen übermäßig vorhanden, sodass man von einer Hyperplasie spricht. Sie bilden knotige Ansammlungen und wenn der Hoden eines Klinefelter-Syndrom-Patienten geschnitten wird, wird daher aufgrund der starken Pigmentierung eine Braunfärbung sichtbar. Im Hodengewebe von diesen Patienten höheren Alters nimmt die Leydig-Zell-Vermehrung eine wuchernde, adenomartige Gestalt an. Die Leydig-Zellen imponieren durch ihre uneinheitliche Größe und teilweise durch ihre Helligkeit, in ihren Zellkernen ist am Rande das normalerweise nur bei Zellen der Frau auftretende Geschlechtschromatin (Barr-Körperchen) zu sehen, das z.B. mit der Feulgen-Färbung, die als histochemische Methode der Anfärbung der Desoxyribonukleinsäure dient, dargestellt werden kann. In Arealen, in denen sie diffus-hyperplastisch erscheinen, haben die Leydig-Zellen eine polygonale Form. Dort, wo sie im Knoten angesammelt sind, sind sie spindelförmig. In ihrem Zytoplasma liegt viel glattes endoplasmatisches Retikulum, „Reinke“ Kristalle

sind wenige vorhanden, außerdem fallen Riesenmitochondrien auf (Hedinger et al., 1991). Solche wurden auch beim nephrotischen Syndrom im Tubulusepithel der Niere beobachtet (Thoenes, 1966) oder in der durch Alkohol geschädigten Leber (Yokoo et al., 1978).

Lange Zeit wurde angenommen, dass das Testosterondefizit von Klinefelter-Syndrom Patienten bedingt sei durch eine Fehlfunktion der Leydig-Zellen. Neuere Studien haben jedoch nachgewiesen, dass die Leydig-Zellen auf eine Stimulation mit humanem Chorion Gonadotropin ansprechen (Wistuba et al., 2010) und, dass die ersten Schritte der Steroidogenese intakt sind. Daher wurde vorgeschlagen, dass die Testosteronproduktion möglicherweise durch eine reduzierte 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Aktivität, die ihrerseits metabolische Ursachen haben könnte, beeinträchtigt wird (Belli et al., 2017).

#### **1.4.3 Veränderungen der Gefäßstruktur im Hoden bei Infertilität unter Einbeziehung des Klinefelter-Syndroms**

Durch die Tatsache, dass es bei Varikozelen aufgrund der venösen Stase mit einhergehender Temperatursteigerung des Hodens zur eingeschränkten Fertilität kommen kann, wird der Gedanken aufgeworfen, dass bei Infertilität möglicherweise auch Gefäßveränderungen innerhalb des Hodengewebes vorliegen könnten.

Ein Symptom des keimzellarmen Hodens, die Verdickung der Lamina propria, wird nachweislich begleitet von Gefäßveränderungen. So liegt bei älteren Männern, bei denen die A. testicularis von einer Arteriosklerose betroffen ist, ebenfalls eine eingeschränkte Funktion der kleineren Arterien vor und genau in diesen Bereichen eine Fibrose der Lamina propria und des Interstitiums (Regadera et al., 1985). Die Lumina der kleineren Blutgefäße können verengt sein und deren Gefäßwände verdickt (Holstein, 1994).

In einer Untersuchung von Jezek et al., 1996 wurde gezeigt, dass in Hoden, die eine Hyalinisierung des Gewebes aufweisen, kleine Gefäße dennoch Vimentin und Aktin exprimieren. Arteriolen Infertiler wiesen enge Lumina auf, was darauf zurückgeführt wurde, dass die Endothelzellen vergrößert waren, außerdem waren sie subendothelial und innerhalb der Adventitia (Zunahme an Grundsubstanz und Bindegewebsfasern) in ihrer Struktur verändert. Letztere Veränderung der subendothelialen Zone zeigten auch Venolen. Die Kapillaren jedoch waren im Vergleich zu Kontrollgewebeproben unverändert, sodass Jezek et al. (1996) schlussfolgerten, dass sich eine Hyalinisierung des Hodens lediglich auf die Arteriolen und Venolen, nicht aber das Kapillarnetz,

auswirke. Im Speziellen sei die Oberflächenzunahme der Arteriolen vor allem in der Intima und Adventitia gegeben, die der Venolen beschränke sich auf die Tunica media.

Weiteren vaskulären Veränderungen im Falle einer hereditären Infertilitätsursache, dem Klinefelter-Syndrom, sind Tüttelmann et al. 2014 nachgegangen. Nachdem sowohl bei der transgenen 41,XX<sup>Y\*</sup>-Maus als auch bei Patienten verifiziert werden konnte, dass intratestikuläre Testosteronspiegel erhöht sind, das Serumtestosteron aber erniedrigt, wurde eine vaskuläre Begründung für dieses Phänomen gesucht. Bei Analyse der Gesamt-Gefäßfläche der Maushoden wurde bestätigt, dass die der 41,XX<sup>Y\*</sup>-Mäuse im Vergleich zu der der gesunden 40,XY\*-Mäuse, vermindert war.

Unabhängig vom Hoden wurden bei Klinefelter-Patienten Dysfunktionen der Körpergefäße, makro- und mikrovaskulärer Art, bestätigt, die in 1.1 dargestellt wurden.

## 1.5 Das Neurofilament Nestin und sein Vorkommen

Nestin ist ein Intermediärfilament der Klasse 6 und somit Bestandteil des Zytoskletts, das die strukturelle Beschaffenheit einer jeden Zelle definiert.

Hauptsächlich ist es im zentralen und peripheren Nervensystem vorzufinden (Lendahl et al., 1990), aber auch in anderen Organen, wie z.B. dem Muskel (Sahlgren et al., 2001). Es wird überwiegend in aktivierten Stamm- und Progenitorzellen und proliferierenden Zellen während der Entwicklung exprimiert. Dabei kommt es in allen drei Keimblättern, dem Ektoderm, dem Mesoderm und dem Entoderm vor und dementsprechend auch in deren Derivaten. Diese sind das Epithel der Haut und das des Nervensystems, das Binde- und Stützgewebe, Blutgefäße und Muskeln, und das Epithel des Darms und anderer innerer Organe. Postnatal wurde es auch in den dentinproduzierenden Odontoblasten in Zähnen von Ratten beobachtet (Terling et al., 1995).

Beim Menschen ist die Nestin-Expression im Gewebe Erwachsener bei Regeneration nach Verletzungen wie der Wundheilung (Cheng et al., 2017) und bei Tumoren hochreguliert (Lobo et al., 2004). Solche können beispielsweise Rhabdomyosarkome (Kobayashi et al., 1998), Melanome (Flørenes et al., 1994), gastrointestinale Stromatumoren (Tsujiura et al., 2001), hepatozellulärem Karzinome (Nogueira et al., 2015) oder Tumorgefäße bei Brustkrebs sein (Nowak et al., 2017). Das Wachstum und die Prognose dieser Tumore ist abhängig von der Gefäßneubildung, der Angio(neo)genese innerhalb dieser. Dazu haben Nowak et al. (2017) bei der Bestimmung der Nestin-positiven Mikrogefäß-Dichte zeigen können, dass eine hohe Expression in Korrelation zu einem aggressiveren Tumor mit schlechterer Prognose, wie Lymphmetastasierung und höherem histologischen Differenzierungsgrad (Grading) steht.

In einem Nestin-GFP-Maus-Modell zur Untersuchung beeinflussender Faktoren der pulmonalen Hypertension und in humanen Patientenproben mit dieser Erkrankung konnten Nestin-positive proliferierende vaskuläre glatte Muskelzellen in Lungengefäßen aufgefunden werden, die als ein Charakteristikum des pulmonalen Gefäßumbaus bei Hypoxie angesehen werden können. Die Nestin-Expression war jedoch nur in einem frühen Stadium der Entwicklung der pulmonalen Hypertension erhöht, bei klinischer Manifestation der Erkrankung war diese wieder im Bereich der Kontrollproben (Saboor et al., 2016).

Ein weiteres Organ, in dem Nestin von Bedeutung ist, haben Davidoff et al. 2004 nachgewiesen. Im Hoden der Ratte zeichnen sich Vorläufer der Leydig-Zellen ebenfalls durch das Vorhandensein von Nestin aus. Im Experiment wurde zunächst Ratten Ethan-Dimethan-Sulfonat (EDS) verabreicht, das gezielt alle Leydig-Zellen eliminiert, sodass 3 Tage nach Injektion dieser Substanz keine Cytochrom P450<sub>scc</sub>-positive Zellen mehr vorhanden waren. Anschließend erfolgte eine Regeneration dieser, die mit einem Anstieg von Nestin einherging. Ab Tag 14 nach Ausschalten der Leydig-Zellen wurden einzelne Zellbündel solcher nahe intertubulärer Gefäße gefunden, sowie einzelne spindelförmige Zellen, die peritubulär angeordnet waren, Nestin nahm gleichzeitig wieder ab. Zu diesem Zeitpunkt war die Cytochrom P450<sub>scc</sub>-Expression allerdings noch so gering, dass sie kaum im Western Blot zu einem Signal führte. Erst ab Tag 21 nach dem Einbringen von EDS in den Organismus der Ratte waren wieder zahlreiche Leydig-Zellen vorhanden. Bei immunhistochemischer Untersuchung konnte dargestellt werden, dass Nestin vornehmlich den Gefäßen des Hodens zuzuordnen ist, wobei die Expression sich auf die vaskulären glatten Muskelzellen beschränkt und im Endothel kein Nestin detektiert werden konnte. Diesen Ergebnissen zufolge steigt Nestin immer dann rapide an, wenn Testosteron sinkt, da die Leydig-Zellen, die es produzieren, fehlen. Sobald der Testosteronspiegel wieder steigt, wird Nestin im erwachsenen Organismus nur noch rudimentär exprimiert (Davidoff et al., 2004),

Beim Menschen existiert ebenfalls eine Arbeit von Lobo et al. (2004), bei der humane Hoden auf das Vorhandensein von Nestin untersucht wurden. Es waren normale Hoden verschiedenen Alters, von präpubertären, erwachsenen und älteren Patienten, bei denen bereits eine eingeschränkte Spermatogenese vorlag. Bei diesen konnte Nestin in Leydig-Zellen und vaskulären Endothelzellen gefunden werden. Demnach scheint die Datenlage in Bezug darauf, ob reife Endothelzellen Nestin exprimieren oder nicht, kontrovers. Darüber hinaus wurde Hodengewebe kryptorchider, infertiler Patienten auf Nestin getestet, bei dem Sertolizellen hauptsächlich keine Immunreaktion auf das Protein zeigten, vereinzelt jedoch schon. Testikuläre Proben mit intratubulärer Keimzellneoplasie, die ein Carcinoma in situ darstellen, deuteten in dieser Untersuchung ebenfalls auf immunpositive Sertolizellen hin, dort aber regelmäßig, wobei die betroffenen Hodentubuli eine verdickte Lamina propria hatten und außerdem interstitielle Gefäßendothelzellen und hyperplastische Leydig-Zellen Nestin-positiv waren. Bei Seminomen, den häufigsten aller Hodentumoren, die von den Spermatogonien ausgehen, hatten ebenfalls die Endothelzellen der Gefäße eine Immunoreaktivität auf Nestin. In Teratomen, Keimzelltumoren hervorgehend aus

pluripotenten Stammzellen, die vermutlich während der embryonalen Entwicklung versprengt wurden und im Hoden meist maligne, im Ovar jedoch oftmals benigne sind, waren mesenchymähnliche Teratomzellen und im Gewebe vorliegendes Neuroepithel Nestin exprimierend.

Im Nebenhoden konnten entwicklungsabhängige und hormonabhängige Veränderungen der Nestin-Expression in Gefäßwandzellen beschrieben werden (Reckmann et al., 2018). Dabei wurden erhöhte Expressionswerte während der postnatalen Entwicklung und bei niedrigen Testosteronspiegeln ermittelt. Die Endothelzellen des Nebenhodens zeigten keine Immunreaktion auf Nestin.

## 2 Fragestellung und Zielsetzung

Der Verlust von Keimzellen und der Mangel an Testosteron gelten als Ursachen der beim Klinefelter-Syndrom im Vordergrund stehenden Infertilität. Der Stand der Forschung liefert zwar Aussagen darüber, in wie weit das Keimzell-Vorkommen sich während der Entwicklung verändert, jedoch wurde bislang eine Verknüpfung zu vaskulären Faktoren noch nicht ausreichend untersucht. Eine eingeschränkte Durchblutung des Hodens, die verantwortlich sein kann für geringe Serumspiegel von Testosteron und demzufolge die Spermatogenese negativ beeinflusst, wurde zudem nicht als maßgeblicher Pathogenesefaktor im Fall des Klinefelter-Syndroms in Betracht gezogen. Vorliegende Forschungsergebnisse liefern Anhaltspunkte dafür, dass das systemische Testosterondefizit allerdings im Hoden selbst nicht auftritt. Aus diesem Grund konzentriert sich diese Studie darauf, in wie weit vaskuläre Unterschiede zwischen Individuen mit der genetischen Erkrankung im Vergleich zu gesunden bzw. zwar infertilen, aber chromosomal unauffälligen Individuen vorliegen. Die Untersuchung des Intermediärfilaments Nestin, dessen Lokalisation im Hoden den Gefäßwandzellen zugeordnet werden konnte und das im Zusammenhang zu sich entwickelnden Leydig-Zellen steht, war dabei von besonderem Interesse.

Diese Arbeit hat zum Ziel, das Verstehen von Gefäßveränderungen beim Klinefelter-Syndrom zu erweitern und dabei die Rolle von Nestin zu definieren. Insbesondere für die Beurteilung von Entwicklungsaspekten ist das Heranziehen des Maus-Modells zwingend nötig.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Herkunft und Auswahl des humanen Untersuchungsmaterials**

Das Hodengewebe wurde im Rahmen der Infertilitätsdiagnostik als Biopsie oder als TESE entnommen und ist dem Bestand des Instituts für Anatomie und Zellbiologie, Gießen und des Instituts für Veterinär Anatomie, -histologie und -embryologie, Gießen zugehörig. Es wurde laut der Zustimmung der lokalen Ethikkommission für den Nutzen zu wissenschaftlichen Zwecken (DFG: KFO 181) freigegeben. Insgesamt wurde das Gewebe von 22 Patienten mit gesichertem Klinefelter-Syndrom Befund im Alter von 14 bis 42 Jahren verwendet. Außerdem wurden 17 Biopsien von 15 weiteren Patienten mit Fertilitätsstörungen untersucht. Morphologische Untersuchungen der Hoden zeigten verschiedene Grade gestörter Spermatogenese und Leydig-Zell-Hyperplasie.

Das den PCR-Untersuchungen zugrunde liegende Hodengewebe entstammt der Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie (Universitätsklinikum Gießen). Es wurden jeweils 6 Proben von Klinefelter-Syndrom-Patienten, 6 von Patienten mit SCO-Syndrom anderer Genese und 6 weitere, die als Kontrollen dienten, aufbereitet. Für die PCR-Untersuchung wurde uns cDNA der o.g. Patienten zur Verfügung gestellt.

### **3.2 Herkunft des Mausgewebes**

Das Hodengewebe der insgesamt 96 untersuchten Mäuse mit den Karyotypen 40,XY\* (50 Versuchstiere) und 41,XX<sup>Y\*</sup> (46 Versuchstiere) stammt aus Beständen des Centrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie (CeRA), Münster. Genaue Informationen zum Klinefelter Maus-Modell sind 1.4 zu entnehmen. Die Bewilligung der Tierexperimente erfolgte durch die Behörde LANUV NRW, Recklinghausen (Versuchsnummer 84-02.05.20.13.115, Genehmigung seit 2013).

Die Tiere wurden bei 24°C gehalten und einem zirkadianen, 12-stündigen Licht/Dunkelheit Rhythmus ausgesetzt. Um Proben unterschiedlicher Entwicklungsstadien zu generieren, wurde eine Tötung der Tiere an Tag 1, Tag 3, Tag 5, Tag 7, Tag 10, Tag 14 und Tag 21 postpartum vorgenommen. Bei den adulten Tieren betrug das Alter im Durchschnitt 69 bis 106 Wochen.

### **3.3 Vorbereitung der Paraffinschnitte**

Nach intraoperativer Entnahme des Biopsats beim Patienten bzw. Entnahme der Hoden bei der Maus wurde eine Fixierung des Gewebes mit Bouin oder Paraformaldehyd (PFA), (Roth, Karlsruhe, Deutschland) und eine Dehydratation in aufsteigender Alkoholreihe durchgeführt. Danach wurde das Gewebe in Paraffin

eingebettet. Die Gewebeschnitte, die 5µm dick waren, wurden mit Hilfe des Mikrotoms (Leica RM 2255, Wetzlar, Deutschland) angefertigt und auf Objektträger (Super Frost® Plus, R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland) gebracht.

### **3.4 Azanfärbung nach Heidenhain**

Nach Vorbereitung der Paraffinschnitte wie unter 3.3 beschrieben, wurden diese in Xylol und 100%igem, 96%igem und 70%igem Ethanol entparaffiniert und in Wasser überführt. Daraufhin wurden sie 5 min in Anilinalkohol (auf 100ml 90%igen Ethanol 0,1ml Anilin) gebracht und für 10 bis 15 min im Wärmeschrank bei 56°C in vorgewärmter Azokarminlösung (auf 100ml Aqua dest. 0,1g Azokarmin G aufgeschwemmt und aufgekocht, abfiltriert, 1ml Eisessig zu 100ml Filtrat gegeben) gefärbt. Es folgte eine Spülung der Schnitte in Aqua dest. und im Weiteren eine Differenzierung in Anilinalkohol, bis nur noch eine Färbung der Zellkerne festzustellen war. Erneut wurden die Schnitte mit Aqua dest. abgespült, als Nächstes für 2 Stunden in 5%ige Phosphorwolframsäure gebracht, um das Gewebe zu entfärben sowie das Bindegewebe zu beizen und wieder mit Aqua dest. abgespült. Ein Anilinblau-Orange-Gemisch (bestehend aus 0,5g Anilinblau, 2g Orange G [Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland] in 100ml Aqua dest. und 8ml Eisessig) und Aqua dest. in einem Verhältnis von 1:3 diente der Blaufärbung von kollagenem und retikulärem Bindegewebe und Schleim, die über einen Zeitraum von 1 bis 2 Stunden vorgenommen wurde. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde das Gewebe in 96%igem Ethanol bis zum Hervortreten seiner Bestandteile differenziert. Im letzten Schritt fand eine Entwässerung in absolutem Isopropanol (Sigma-Aldrich) und Xylol statt, sodass die Schnitte mit einem Harzeinschluss (Eukitt, Sigma-Aldrich) und einem Deckglas versehen werden konnten.

### **3.5 Immunhistochemische Färbungen**

Abhängig vom Antikörper wurden verschiedene Techniken zur immunhistochemischen Darstellung eingesetzt. Zum einen wurde das DakoCytomation EnVision-System (Dako, Hamburg, Deutschland) verwendet, außerdem die Peroxidase-Antiperoxidase-Technik (PAP) kombiniert mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex. Bei beiden Methoden wurden die Paraffinschnitte zunächst in absteigendem Alkohol (Xylol, 100% Ethanol, [Methanol mit 1,2% Wasserstoffperoxid 30 min], 96% Ethanol und 70% Ethanol, jeweils 5 min) zum Entparaffinieren vorbehandelt und dann für 5 min in Aqua

dest., für weitere 15 min in PBS Puffer (0,136 M NaCl; 0,05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; mit HCl auf pH 7,4 eingestellt) gebracht.

Bei späterer Anwendung des polyklonalen Antikörpers Nestin (sc-21248, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland; Ziege, Verdünnung 1:100 bzw. 1:50; Verwendung für das Maus-Gewebe) wurde der Histoschnitt vor Einbringen in PBS mit einem Natriumcitratpuffer (pH 6,0) in der Mikrowelle (für 12 min bei 650W, für 15 min bei 464W) behandelt, um dann mit 2% Kaninchenserum in PBS für 30 min inkubiert zu werden.

Der mit einer Verdünnung bestehend aus PBS, 0,2% bovinem Serumalbumin (BSA), (Sigma-Aldrich) und 0,1% NaN<sub>3</sub> versetzte primäre Antikörper wurde zur Inkubation über Nacht auf die Gewebeschnitte appliziert, welche dann bei 4°C im feuchten Milieu gelagert wurden.

Am Folgetag wurden die Schnitte 3x 5 min bzw. 10 min in PBS gewaschen. War nun ein monoklonaler Antikörper wie Anti-PCNA (ab 92552, abcam, Cambridge, UK; Kaninchen, 1:750 bzw. 1:500) der Primärantikörper, wurde auf die Schnitte zur 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur Peroxidase-markiertes Polymer (EnVision+System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit/Mouse, Dako, Hamburg, Deutschland) gegeben. Die Vorgehensweise war dieselbe bei dem Einsetzen des Nestin-Antikörpers für humanes Gewebe (10c2, sc-23927, Santa Cruz Biotechnology; Maus, Verdünnung 1:50). Im Falle von Nestin (Ziege) für das Maus-Gewebe wurde der Sekundärantikörper Kaninchen-anti-Ziege-IgG-Biotin (in einer Verdünnung 1:250 mit PBS) für eine Stunde aufgetragen, daraufhin 2x für 10 min mit PBS gespült, mit Ziege-PAP (DakoCytomation B0157, 1:200 mit PBS, 30 min) behandelt, erneut 2x 10 min in PBS gespült und ABC-Komplex (1:250 mit PBS, 30 min) zugegeben.

Allen verwendeten Antikörpern gemeinsam war im Anschluss ein 10-minütiges Waschen, zuerst in PBS, dann in 0,1 M PB mit einem pH von 7,4.

Zur Entwicklung der Peroxidase-Aktivität wurden die Gewebe in eine Lösung aus 0,1 M PB (pH 7,4), 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (22,5mg/ml), Ammoniumchlorid (18mg/100µl), Nickelsulfat (0,05 M), 10% Glucose und Glucose-Oxidase (Typ VII aus *Aspergillus niger*, Sigma-Aldrich; 2mg/1ml Aqua dest.) gebracht, mit antikörperspezifischen Entwicklungszeiten zwischen 5 und 30 min.

Nachdem nochmals mit 0,1 M PB und Aqua dest. gespült und in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert wurde, wurden die Schnitte im letzten Schritt mit Eukitt eingedeckt.

### **3.6 Immunfluoreszenz**

Die Paraffinschnitte wurden als Erstes 3x 5 min in Xylol, dann für je 5 min in 100%, 96% und 70% Ethanol entparaffiniert und in Wasser gebracht. Im Folgenden wurden die Schnitte 3x 10 min in PBS gewaschen. Es erfolgte eine einstündige Blockung bei Raumtemperatur mit 2% Normal Goat Serum, wobei zur Verdünnung PBS genommen wurde.

Als Primärantikörper wurden in Verdünnung mit PBS, 0,2% BSA und 0,1%  $\text{NaN}_3$  genutzt:

- Monoklonal Anti-Actin,  $\alpha$ - Smooth Muscle FITC (F3777, Sigma-Aldrich; Maus, 1:500)
- Anti-PCNA (ab 92552, abcam; Kaninchen, 1:500)

Die Schnitte wurden mit diesen (Immun-Doppelfärbung) über 2 Nächte bei 4°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurde 2x 10 min mit PBS gewaschen.

Folgende Sekundärantikörper wurden nach Verdünnung mit PBS und 5-minütiger Zentrifugation für eine Stunde bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz aufgetragen:

- Alexa Fluor 488nm Ziege-anti-Maus, Roche, Mannheim, Deutschland, (1:500)
- Cy3 550nm Ziege-anti-Kaninchen, Jackson ImmunoResearch Hamburg, (1:500)

Erneut wurden die Schnitte 2x 10 min mit PBS gewaschen und mit 4% PFA behandelt. Nach abermaliger PBS Waschung wurden sie mit PBS/Glycerol (Roth), (1:3) eingedeckelt und bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt.

### **3.7 Aufnahmen am Lichtmikroskop**

Die Bilder der histologischen Schnitte wurden mit dem Axioskop 2 plus Mikroskop von Carl Zeiss Vision (München, Deutschland) aufgenommen.

### 3.8 Proteinpräparation und Western Blot

#### 3.8.1 verwendete Lösungen, Puffer, Reagenzien und Materialien

Homogenisierungspuffer (HOPU):

*50 mM Tris-Cl [pH 7,5]; 1 mM EDTA (Thermo Scientific, Waltham, USA); 1 mM Dithiothreitol (DTT), (Invitrogen, Karlsruhe); 0,1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)*

*50 mM Tris-Puffer [pH 7,5]*

Lysis Puffer:

*50µl Tris/HCl 1 M; 30µl NaCl 5 M; 20µl EDTA 250 mM; 100µl Triton X-100 (Sigma-Aldrich) 10%; 100µl Na-Deoxycholat 5% und je 20µl PMSF 100 mM; Aprotinin 50 mM; Leupeptin 50 mM; sowie 640µl Aqua dest. → 1ml Gebrauchslösung*

3xStopp-Mix:

*0,375 M Tris-HCl [pH 6,8]; 0,2 M DTT; 15% (w/v) SDS; 20% (v/v) Glycerin; 0,6mg/dl Bromphenolblau (Sigma-Aldrich)*

30% Acrylamid:

*150g Acrylamid (Roth); 4g Bisacrylamid in 500ml Aqua dest. lösen; 29:1*

TEMED (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)

10% Ammoniumpersulfat (APS), (Roth)

4xSammelpuffer:

*0,5 M Tris-HCl [pH 6,8]; 0,1% (w/v) SDS*

4xTrennpuffer:

*0,375 M Tris-HCl [pH 8,8]; 0,1% (w/v) SDS*

Sammelpuffer:

*5ml Sammelgelpuffer (4x); 2,6ml 30% Acrylamid; ad 20ml mit Aqua dest. +100µl 10% APS+25µl TEMED*

Trennpuffer 8%:

*15ml Trennpuffer (4x); 14ml 30% Acrylamid; ad 60ml mit Aqua dest. +250µl 10% APS+50µl TEMED*

Längenstandard Page Ruler Prestained (Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland)

Längenstandard SigmaMarker wide range (Sigma-Aldrich)

10xPAGE-Puffer:

*0,025 M Tris-HCl [pH 8,4]; 0,192 M Glycin; 0,1% (w/v) SDS*

10xTransferpuffer [pH 8,3]:

*100 mM Tris; 193 mM Glycin*

Ponceau-Rot:

*0,1% Ponceau S (w/v), (Sigma-Aldrich) in 5% Essigsäure*

Blockierungspuffer:

*1% Blocking Reagenz, (Roche); 0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl [pH 7,5], 0,005% Thimerosal*

10xTBS-Puffer:

*200 mM Tris; 1,37 M NaCl [pH 7,6]*

1xTBST-Puffer:

*1000 ml TBS; 500 µl Tween 20 [0,05% Tween 20, Sigma-Aldrich]*

Antikörper-Inkubations-Puffer (AIP):

*90% TBST; 10% Blockierungslösung; 0,005% Thimerosal*

Chemilumineszenz-Reagenz (Amersham ECL, RP 2106, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland)

Blotmembranen aus Nitrozellulose (GE Healthcare, 0,2µm, München)

Blottingpapier: Chromatographie-Papier (Whatman, Dassel, Deutschland)

Röntgen-Fixier- und Röntgen-Entwickler-Konzentrat (Adefo-Chemie, Dietzenbach, Deutschland)

Röntgenfilme (Fujifilm Medical, Düsseldorf, Deutschland)

### **3.8.2 Proteinpräparation aus Hoden der XY\*- und XX<sup>Y</sup>\*-Maus**

Die bei -80°C gefrorenen, zuvor abgewogenen Gewebeproben der Mäusehoden wurden unter Zugabe von flüssigem Stickstoff mit Hammerschlägen zerkleinert und in ein 2ml Eppendorf-Gefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt. Sie wurden mit auf Eis gelagertem Lysis-Puffer im Verhältnis 1:10 versetzt. Jede Probe wurde zum mechanischen Zellaufschluss abhängig vom Gewicht 1-2 min mit dem Ultraschallhomogenisator (SONOPULS, Bandelin, Berlin, Deutschland) bearbeitet.

Anschließend wurde das Homogenat zur Entfernung der Zellkerne, Membrantrümmer und schweren Mitochondrien bei 4°C für 8 min mit 3000 g (2000 rpm) zentrifugiert. Der Überstand, als Gesamtlisat zu verwenden, wurde abpipetiert und bei -80°C eingefroren.

### **3.8.3 Proteinbestimmung**

Es folgte eine Bestimmung der Gesamtproteinkonzentrationen der Maushodenextrakte mit Hilfe des BioRad-Protein-Assay (BioRad, München, Deutschland) nach der Methode nach Bradford (Bradford, 1976), wobei BSA (Sigma-Aldrich, 0,25µg/µl) als Referenz hinzugezogen wurde. Dazu wurde der Elisa-Reader (Dynatech Laboratories, Chantilly, VA, USA) genutzt.

### **3.8.4 Versuchsdurchführung Western Blot**

Am Vorabend der eigentlichen Versuchsdurchführung wurde die Gel-Vorrichtung aufgebaut und das Trenngel gegossen, das über Nacht auspolymerisierte. Auf dieses wurde, nachdem der Kamm zur Ausformung der Geltaschen eingebracht wurde, das Sammelgel pipettiert, das 2 Stunden bis zur vollständigen Polymerisation benötigte.

Den Proteinproben wurde, im Verhältnis 2 Teile Probe und 1 Teil Stopp-Mix, 3xStopp - Mix beigefügt, im Thermoblock wurden sie 2 min bei 100°C erhitzt und dann in die Taschen des SDS-Gels (8%) aufgetragen. Zum Einsatz kamen jeweils 50µg Protein pro Probe. In die erste Geltasche wurde der Längenstandard Page Ruler, in die letzte hinter den Proben, der Längenstandard SigmaMarker, appliziert. Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde mit dem Elektrophorese-Gerät von Hoefer Scientific Instruments (SE 600; MA, USA) durchgeführt.

Die Laufzeit in der mit PAGE-Puffer befüllten Kammer (TE 42, Hoefer, MA, USA) betrug bei 13W im Sammelgel eine Stunde, im Trenngel wurde für 2 Stunden bei 17W aufgetrennt.

Nachdem die Proteine im SDS-Gel getrennt wurden, wurden sie über Nacht bei 0,6 A Stromstärke, 29,0 V Spannung und 4°C Temperatur in einer Transferkammer, die mit Transferpuffer gefüllt war, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Um die Auftrennung und den Transfer der Proteine sowie deren Mengen zu überprüfen, wurde die Membran 10 min mit Ponceau-Rot inkubiert. Markerproteine zur Ermittlung der Längenstandards wurden markiert und eine Spülung in Aqua dest. wurde vorgenommen. Für 2 Stunden wurde der Blot im Folgenden bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer blockiert, dann für 5 min in TBST-Puffer gewaschen.

In der Western Blot-Analyse der Mäusehoden sollte untersucht werden, ob und wie ausgeprägt Nestin und Cytochrom P450scc exprimiert werden. Dazu wurde eine einstündige Inkubation mit dem Primärantikörper (in Verdünnung mit AIP), der im Fall von Nestin (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland; 1:800) bei 220 kDa eine Bande detektiert, vollzogen. Cytochrom P450scc (Chemicon, 1:1000) wurde in einem weiteren Versuch ebenfalls als Primärantikörper verwendet. Dieser Antikörper detektiert bei 52 kDa.

Zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper wurde die Membran 3x 5 min in TBST-Puffer gewaschen.

Als Nächstes wurde eine Stunde mit dem Sekundärantikörper (für den Primärantikörper Nestin: Ziege-anti-Maus, Pierce, Thermo Scientific, Waltham, USA, 1:2000, in Verdünnung mit AIP; für den Primärantikörper Cytochrom P450scc: Kaninchen-anti-Ratte, Pierce, 1:2000, in Verdünnung mit AIP) inkubiert und nochmals 2x 5 min und 1x 20 min in TBST, dann in Aqua dest. gespült.

Durch Behandlung des Blots mit Chemilumineszenz-Reagenz für 1-2 min konnte das Signal auf einem Röntgenfilm dargestellt werden. Die Detektion wurde in einer Dunkelkammer durchgeführt.

Um die Membran für eine weitere Antikörper-Behandlung nutzen zu können, wurde sie einem Stripping unterzogen, das sich aus folgenden Schritten zusammensetzte:

- 30 min in 5% Magermilch inkubieren
- 5 min in Aqua dest. waschen
- 30 min in 0,5 M NaCl; 0,5 M Essigsäure (Merck) inkubieren
- 5 min in Aqua dest. waschen
- 2 min in 1,5 M Tris stoppen
- 3x 5min in Aqua dest. waschen

Um zu kontrollieren, ob gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden, wurde die Blotmembran außerdem mit dem Ladungskontrollprotein Vinculin (Sigma-Aldrich, 1:6000; 116 kDa) behandelt.

### **3.8.5 Densitometrie**

Die densitometrische Quantifizierung der Western Blots wurde unter Verwendung der Image-J Software (NIH, Bethesda, MD, USA) vorgenommen. Dabei wurde die Proteinexpression von Nestin und Cytochrom P450scc durch Vinculin als Ladekontrolle

normalisiert. Die statistische Auswertung der densitometrischen Ergebnisse erfolgte durch das Programm GraphPad Prism Software 7.02 (CA, USA). Dabei wurden die Daten durch den ungepaarten t-Test ausgewertet, eine statistische Signifikanz ergab sich bei  $p < 0,05$ . Alle Daten werden angezeigt als Mittelwerte  $\pm$  SD.

### **3.9 Clarity**

#### **3.9.1 Verwendete Lösungen, Puffer, Reagenzien und Antikörper:**

4% PFA:

*40g PFA in 1000ml PBS (pH 7,4) auf ca. 70°C erhitzen, einige Tropfen 2 M NaOH zum Klären dazugeben, erkalten lassen, pH kontrollieren*

Acrylamidlösung (A3P0) Hydrogel:

*3% Acrylamid (6g); 0,25% Initiator VA-044 (0,5g); 0,05% Bis-Acrylamid (0,1g) auf 200ml mit eisgekühltem PBS (pH 7,4) auffüllen, zügig auf Eis aliquotieren, bei -20°C einfrieren*

Clearing-Solution:

*10% SDS (200g); 200 mM Borsäure (24,732g) auf 2000ml mit PBS auffüllen, pH 8,5 mit NaOH einstellen*

RIMS (refractory index matching solution)-Puffer:

*88% w/v Histodenz (Sigma-Aldrich) (20g); 0,1% v/v Tween-20 (23 $\mu$ l); 0,01% w/v NaAzid (2,3mg); 15ml 0,02 M PB (pH 7,5)*

Monoklonal Calponin (Epitomics, Burlingame, USA; Kaninchen)

Monoklonal CD90 (Dianova, Hamburg; Maus)

Monoklonal SMA (Sigma-Aldrich; Maus)

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), (Sigma-Aldrich)

Alexa Fluor 488nm Ziege-anti-Maus

Cy3 550nm Ziege-anti-Kaninchen

#### **3.9.2 Versuchsdurchführung Clarity**

Die Clarity-Methode bietet eine neuartige Möglichkeit, intaktes Gewebe in seiner Gesamtheit, beispielsweise unter der Anwendung der Immunfluoreszenz, im dreidimensionalen Raum darzustellen. Sie wurde erstmalig an Mäusehirnen zu strukturellen Analysezwecken getestet (Chung et al., 2013). Die Herausforderung besteht bei dieser Methode darin, Lipide so aus dem Gewebe herauszulösen, dass

eine optische Transparenz entsteht, die eine Permeabilität für Licht und Makromoleküle bietet, ohne seine strukturelle Integrität zu gefährden. Auf diese Weise können zudem einzelne Zelltypen innerhalb eines ganzen Organs phänotypisiert werden (Yang et al., 2014). Abgesehen vom bereits dazu verwendeten ZNS wurde die Anwendung auch auf andere Organe der Maus, wie der Niere, dem Herzen oder der Lunge erweitert. Zur Darstellung von Gefäßen in Lungen von Nestin-GFP-Mäusen, die Veränderungen unter pulmonaler Hypertonie beschreiben sollen, haben Saboor et al. (2016) diese Methode, die modifiziert wurde, ebenfalls angewandt.

Der Klärungsprozess, der für diese Zielsetzung notwendig ist, setzt eine gewisse Vorbehandlung der Gewebeproben voraus. Es wurden menschliche Gewebeproben untersucht. Nachdem Hodenbiopsien im Zusammenhang mit der Infertilitätsdiagnostik entnommen wurden, konnten nicht benötigte Biopsieanteile zunächst für 24 Stunden in 4% PFA fixiert werden. Anschließend wurden die Proben folgendermaßen weiterbehandelt:

- Einbettung in Tissue-Tek (Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlanden)
- Waschen in PBS
- 24h-Inkubation in Acrylamidlösung-Hydrogel bei 4°C
- Polymerisation des Hydrogels für 2-3 h bei 56°C
- 72-stündiges Klären in Clearing-Solution bei Raumtemperatur
- mehrmaliges Waschen (5x für je 1h) in PBS-Triton 0,1%
- Inkubation über 5 Tage mit dem in PBS-Triton verdünnten Primärantikörper (1:100), abwechselnd bei Raumtemperatur und 4°C, wobei die Antikörperlösung 2-3x gewechselt werden sollte
- erneutes Waschen (5x für je 1h) in PBS-Triton 0,1%
- lichtgeschützte Inkubation über 5 Tage mit dem in PBS-Triton verdünnten Sekundärantikörper (1:100), abwechselnd bei Raumtemperatur und 4°C, wobei die Antikörperlösung 2-3x gewechselt werden sollte
- abschließendes mehrmaliges Waschen (5x für je 1h) in PBS-Triton 0,1%
- mindestens 24-stündige, lichtgeschützte Inkubation in RIMS-Puffer bei Raumtemperatur (bis das Gewebe transparent ist)

- Einbettung mit RIMS-Puffer auf Objektträger (Super Frost® Plus, R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik) mit Hilfe von Blu Tack (Bostik, Borgholzhausen, Deutschland), lichtgeschützte Aufbewahrung
- Aufnahmen am Zeiss LSM 710 konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss, München)

### **3.10 Quantitative Auswertung der Hodenbiopsien nach Gefäßkategorien**

#### **3.10.1 Messungen der Biopsiegrößen und Auszählen der Gefäße**

Zur Bestimmung der Gesamtfläche der vorhandenen Hodenbiopsien von Klinefelter- und anderen infertilen Patienten, die als Kontrollen dienten, wurden diese am Zeiss Laser-Capture-Microdissection-Mikroskop vermessen. Dieses ist auf das PALM-Micro-Beam-System (Zeiss) abgestimmt. Pro Biopsie wurde ein Schnitt ausgewertet, gelegentlich lagen 2 Biopsien eines Patienten vor. Dabei wurden die Gefäßkategorien folgendermaßen definiert:

Subtyp 1: Gefäße mit 1-2 Muskelschichten

Subtyp 2: Gefäße mit 3 oder mehr Muskelschichten

Alle Gefäße wurden, mit direkter Zuordnung zum jeweiligen Subtyp, pro Schnitt ausgezählt. Anschließend wurde die Zahl der Gefäße pro Subtyp durch die gemessene Biopsiefläche dividiert und somit erhielt man die Zahl der Gefäße von Subtyp 1 bzw. 2 pro mm<sup>2</sup>. Der Durchmesser der Gefäße wurde in diesem Zusammenhang nicht berücksichtigt, da die wenigsten eindeutig quer oder längs angeschnitten waren.

#### **3.10.2 Statistikerhebung**

Zur Auswertung der Daten wurde das Programm GraphPad Prism Software 7.02 (CA, USA) verwendet. Dabei wurde zunächst die Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test bestimmt. Es zeigte sich bei Gefäß-Subtyp 1 eine Normalverteilung beider untersuchter Gruppen (Klinefelter-Patienten und andere infertile Patienten, als Vergleichs-Patienten bezeichnet), bei Gefäß-Subtyp 2 lag keine Normalverteilung vor. Die Daten für beide Gefäß-Subtypen wurden dem Mann-Whitney-Test (unpaired two-tailed nonparametric) unterzogen.

### 3.11 Molekularbiologische Methoden

#### 3.11.1 Primer

Das Erstellen aller Primersequenzen erfolgte mit dem Webprogramm Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>). Die für die quantitative Real-Time-PCR verwendeten Primersequenzen sind im Folgenden aufgelistet. Die Primerlösungen wurden als 200 pMol/µl Stammlösung angesetzt. Zur Sicherstellung der Spezifität der Primer wurden ein Vergleich der Sequenzen mit dem Programm BLAST (Basic-Local-Alignment-Search-Tool) mit bereits bekannten Sequenzen in der Datenbank durchgeführt.

Menschspezifische Sequenzen intronüberspannender Primer:

Gen:	Größe in bp:	Accession number:	Forward 5' → 3'	Reverse 5' → 3'
Nestin	261	NM_006617.1	GGAAGAGAACCT GGGAAAGG	ACCTCCTCTGT GGCATT CAG
RPL 30	158	NM_000989.3	ACAGCATGCGGAA AATACTAC	AAAGGAAAATTTT GCAGGTTT

#### 3.11.2 Quantitative Real-Time-PCR (qPCR)

Durch eine klassische Real-Time (RT)-PCR wurde überprüft, dass die eingesetzten Primerpaare eine DNA-Sequenz der der in dem o.g. Programm errechneten Größe amplifizieren. Anschließend wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Diese dient der Vervielfältigung von Nukleinsäuren und gleichzeitiger Quantifizierung mittels Fluoreszenzmessung. Durch Fluoreszenzfarbstoffe wie SYBR-Green kann die Akkumulation des PCR-Produktes über eine Software (Biorad iQ™ 5 Optical System [BioRad]) in Echtzeit dargestellt werden. Es findet dabei eine Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffs mit der doppelsträngigen DNA statt, dieser ist jedoch nicht in der Lage, zwischen spezifischen und unspezifischen PCR-Produkten zu unterscheiden. Zum Ausschluss falsch-positiver Produkte erfolgte eine Überprüfung der Amplikons in der Schmelzkurvendarstellung und ebenfalls im 2%igen Agarosegel („klassische“ RT-PCR, s.o.). Idealerweise verdoppelt sich in der exponentiellen Phase der RT-PCR die Menge der Zielsequenz mit jedem Zyklus, was einer optimalen PCR-Effizienz (Effizienz=2) entspricht. Zur relativen Quantifizierung der PCR-Amplifikate wird der Beginn der exponentiellen Phase genutzt. Der Zyklus, bei dem die Fluoreszenz jeder einzelnen Probe erstmalig einen signifikanten Anstieg über die Hintergrundfluoreszenz

erzielt, wird dabei als Ct-Wert (Threshold Cycle) bezeichnet. Es besteht eine indirekte Proportionalität des Ct-Wertes mit dem mRNA- Ausgangsniveau.

Die relative Quantifizierung der Gene wurde über den Expressionsunterschied (Ratio) mit der  $\Delta$ Ct-Methode berechnet, d.h. es erfolgt eine Bestimmung der Zielsequenz relativ in ihrer Expression zu einer zweiten Sequenz (Bustin, 2005). Housekeeping-Gene wie z.B. das ribosomale Gen RPL30 dienen dabei als Standards. Die Expression dieser Gene in der Zelle ist in der Regel konstitutiv und nicht reguliert.

$$\text{Ratio (relative Expression)} = 2^{-\Delta Ct}$$

$$\text{Ratio (relative Expression)} = 2^{-(Ct_{\text{Gen}} - Ct_{\text{Housekeeping-Gen}})}$$

Die relative Expression ist gleich eins, wenn das Zielgen genauso stark exprimiert wird wie das Housekeeping-Gen.

$$2^0 = 1$$

Alle Gene, bei denen die relative Expression mehr als 1 beträgt, sind mit der Festlegung dieses Wertes in höherer Kopienzahl, in Bezug auf das Housekeeping-Gen, in der Zelle vorhanden.

In dieser Arbeit wurde die relative Expression von Nestin im Hodengewebe verschiedener Patienten in Bezug auf das Housekeeping-Gen RPL30 ermittelt. Diese waren 6 Klinefelter-Patienten, 6 Patienten mit SCO-Syndrom anderer Genese und 6 Kontroll-Patienten ohne eine Keimzellschädigung. Es fand ein Vergleich der Transkriptmenge des Referenz-Gens mit Transkripten von Nestin statt. Raumtemperatur-Negativkontrollen der Hoden-cDNA sowie Kontrollen mit Wasser für die Real-Time-PCR wurden ebenfalls in den Versuch integriert. Diese Kontrollen hatten für alle untersuchten Gene ein negatives Ergebnis.

Für die Versuchsdurchführung wurde das iCycler iQ™ Real Time PCR-System (BioRad) und das Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UGD (Invitrogen, Karlsruhe) genutzt. Jeweils 4µl cDNA wurden pro PCR-Ansatz eingesetzt.

#### **Pipettierschema für die qPCR (Reaktionsmix):**

- 4µl cDNA
- SYBR green Mix (12,5µl)
- 0,4 pMol/µl Forward Primer (0,375µl)
- 0,4 pMol/µl Reverse Primer (0,375µl)

- Steriles Wasser (7,75µl)

→ Gesamtvolumen: 25µl

**Die PCR wurde folgendermaßen programmiert:**

- 95°C 3 min
  - 95°C 20 sec
  - 60°C 20 sec
  - 72°C 20 sec
- } 40 Zyklen
- 55°C 30 sec
  - 20°C ∞

### **3.11.3 Statistische Auswertung der PCR-Ergebnisse**

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism Software 7.02 (CA, USA). Dabei wurde zunächst die Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test bestimmt. Dieser zeigte, dass keine Normalverteilung vorlag. Daraufhin wurde die ANOVA mit darauffolgendem post-hoc Vergleich von Paaren angewandt, sodass Unterschiede zwischen den einzelnen Patienten-Gruppen herausgestellt werden konnten.

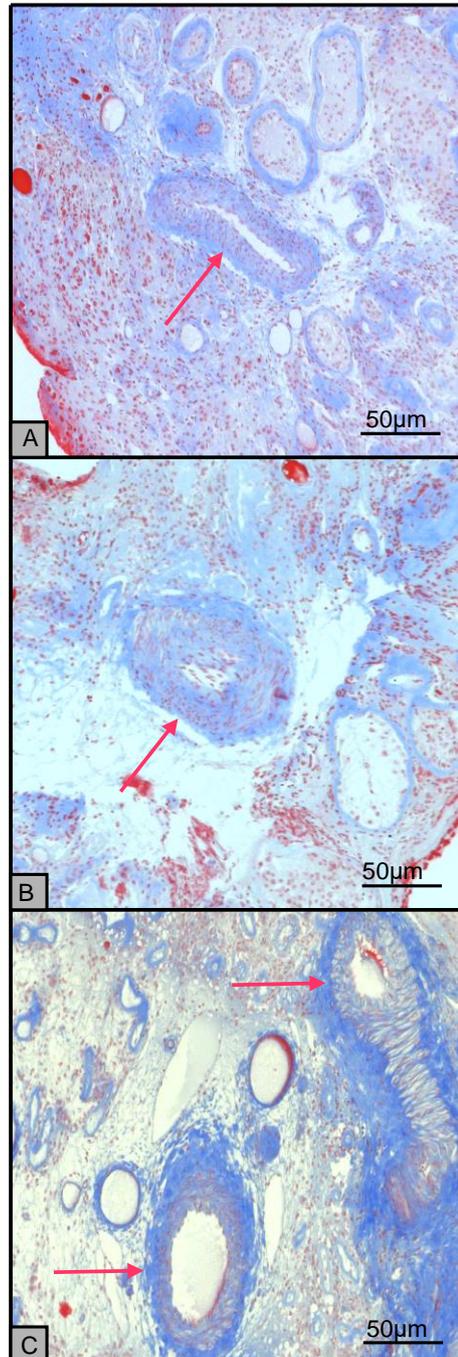
## 4 Ergebnisse

### 4.1.1 Größere Gefäße in humanen Klinefelter-Syndrom Hodenbiopsien

Im Vergleich zu Hodenbiopsien, die von Männern mit einer idiopathischen oder einer Infertilität anderer Genese abstammten, fiel bei Betrachtung der Biopsien der Klinefelter-Patienten auf, dass eine erhöhte Anzahl größerer Gefäße gefunden werden konnte. Besonders auffällig waren Arterien mit mehreren (bis zu 5) Muskelschichten innerhalb der Tunica media (Abb. 6), die in dieser Ausprägung in Vergleichsbiopsien von infertilen Patienten anderer Ursache kaum gefunden werden konnten. Um diesen subjektiven Eindruck quantifizieren zu können, wurde eine Einteilung in zwei verschiedene Gefäßkategorien vorgenommen (Abb. 7), sodass eine Quantifizierung der Gefäße in Bezug auf die Gesamtfläche der Biopsieschnitte pro Patient erstellt werden konnte. Dabei wurden kleinere Gefäße (1-2 Muskelschichten), als Subtyp 1 (Abb. 7 A-C) definiert. Gefäße mit 3 oder mehr Muskelschichten innerhalb der Gefäßwand wurden als Subtyp 2 (Abb. 7 D-G) eingeordnet. Die Auswertung aller untersuchten Biopsieschnitte der Klinefelter-Patienten und der Vergleichsbiopsien bestätigt, dass insbesondere ein erhöhtes Gefäßvorkommen des Typs 2, jedoch ebenfalls von Typ 1 bei Klinefelter-Hodenbiopsien festzustellen ist (Abb. 8). Der ermittelte Quotient aus Biopsiegröße und Gefäßanzahl liegt bei Subtyp 1 im Fall des Klinefelter-Syndroms bei 5,2; bei der infertilen Vergleichsgruppe mit normalem Karyotyp hingegen bei 3,8; sodass ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) vorliegt. Die Diskrepanz zwischen beiden Gruppen ist bei Betrachtung von Gefäßtyp 2 noch deutlicher: der ermittelte Quotient beträgt bei den Klinefelter-Patienten 1; bei den Kontrollen bei lediglich 0,2. Das Verhältnis unterscheidet sich demnach mit einem hochsignifikanten Unterschied ( $p < 0,0001$ ).

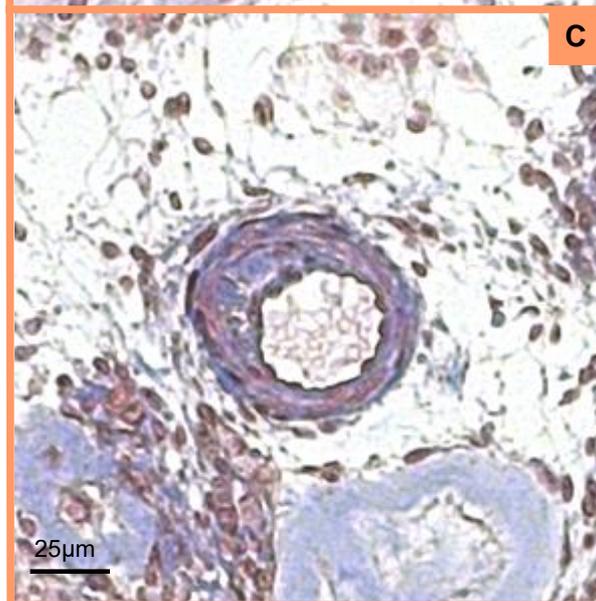
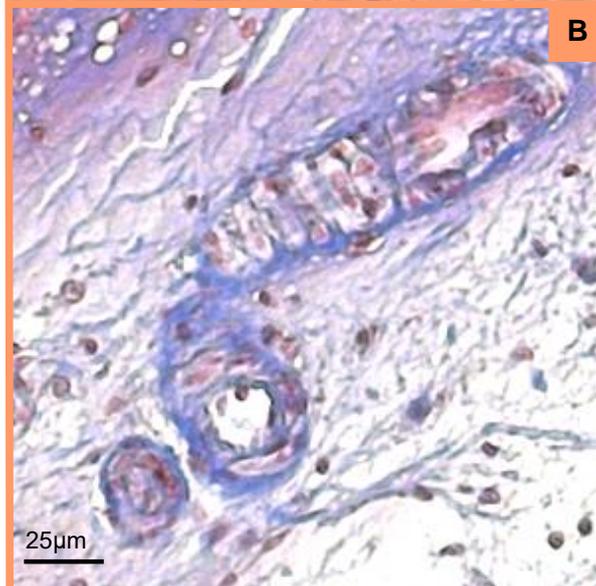
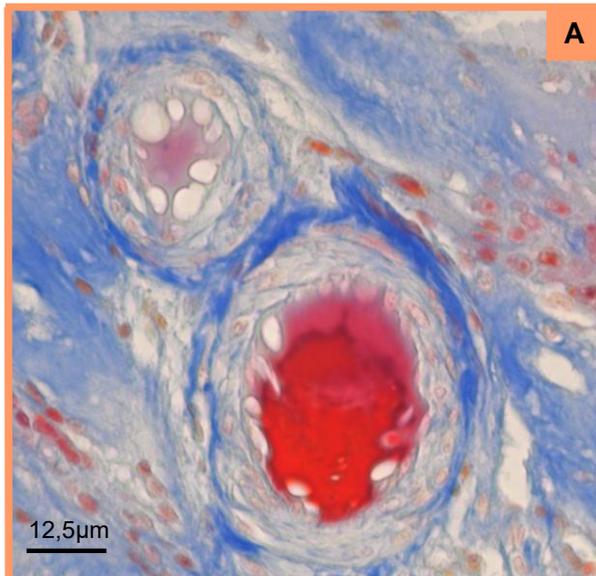
### 4.1.2 Dreidimensionale Darstellung von Hodengefäßen mittels Clarity

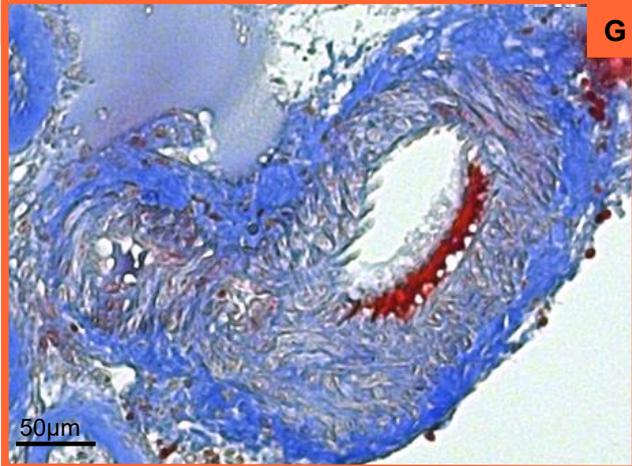
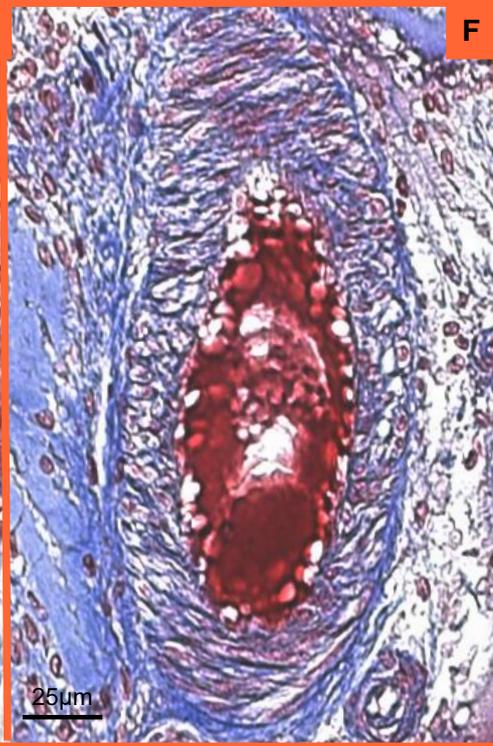
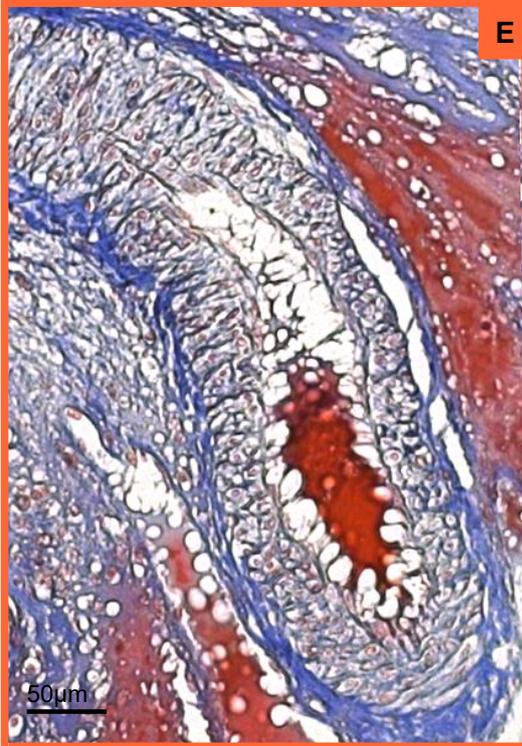
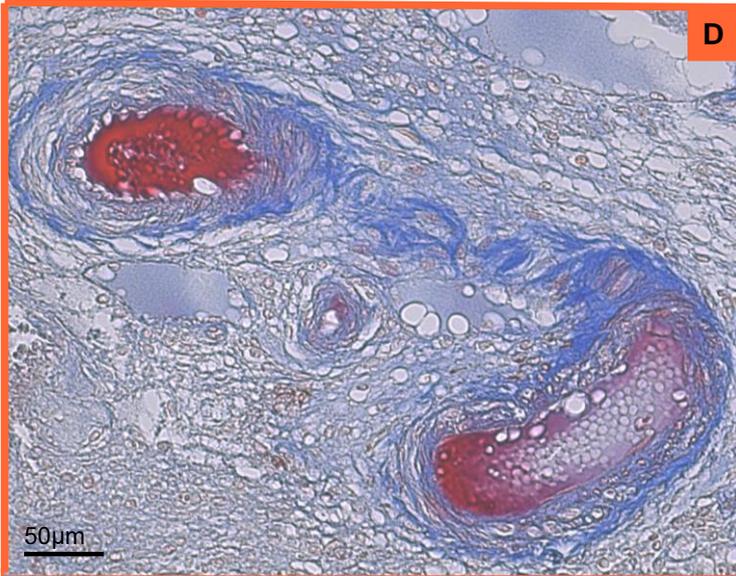
Das Vorhandensein auffälliger Gefäße bei Klinefelter-Patienten konnte durch die Clarity-Methode bei weiteren Hodenbiopsien bestätigt werden (Abb. 9). Hierbei konnte eine Calponin-Immunfluoreszenz als genereller Marker für muskelstarke Gefäße etabliert werden (Abb. 9). Folgerichtig fand sich eine besonders starke Calponin-Färbung bei Klinefelter-Patienten (Abb. 9 B).



**Abb. 6: Große Gefäße (mit bis zu 5 Muskelschichten) im Hodengewebe von Klinefelter-Patienten (Azan-Färbung)**

A: Der rote Pfeil zeigt ein großes Gefäß bei SCO-Histologie. B: Eine besonders dicke Muskelwand einer Arterie wird durch einen roten Pfeil markiert. C: Rote Pfeile deuten auf zwei große Gefäße umgeben von Tubulusschatten und Venen.





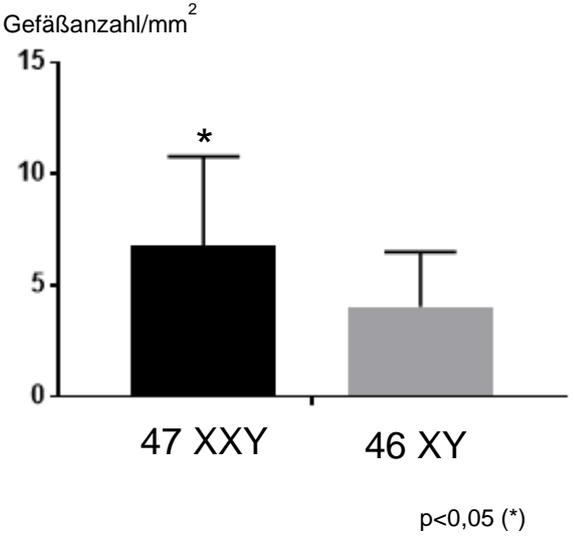
**Abb. 7: Subtypen der testikulären Gefäße beim Klinefelter-Patienten**

(Azan-Färbung)

A,B,C: Beispiele für Subtyp 1. D,E,F,G: Beispiele für Subtyp 2.

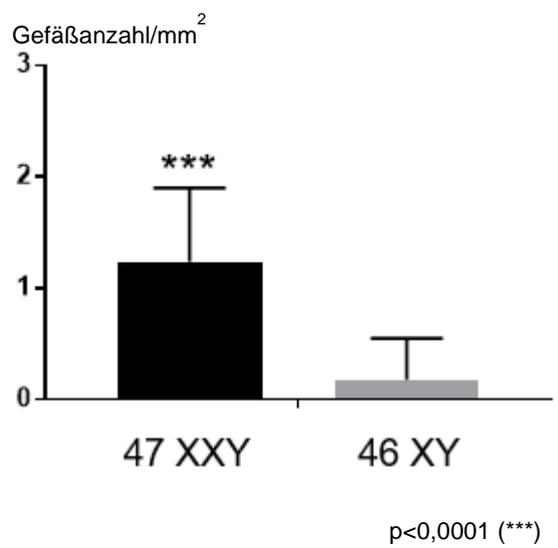
**A**

	Klinefelter-Patienten	Vergleichs-Patienten (infertil)
n	16	16
Mittleres Alter	26,1	34,8
+/- SD	+/- 8,4	+/- 5,4
Mittelwert	6,8	4,0
SD	4,0	2,5
p	<0,05	



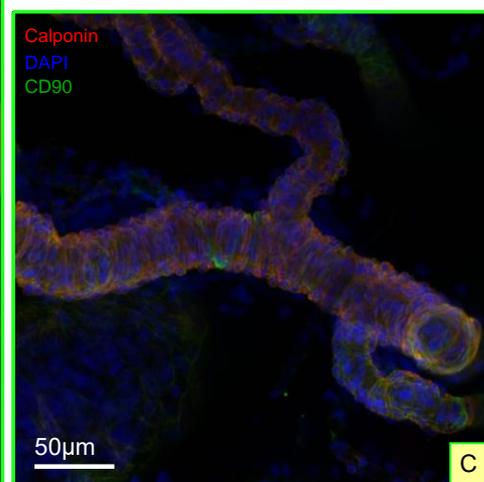
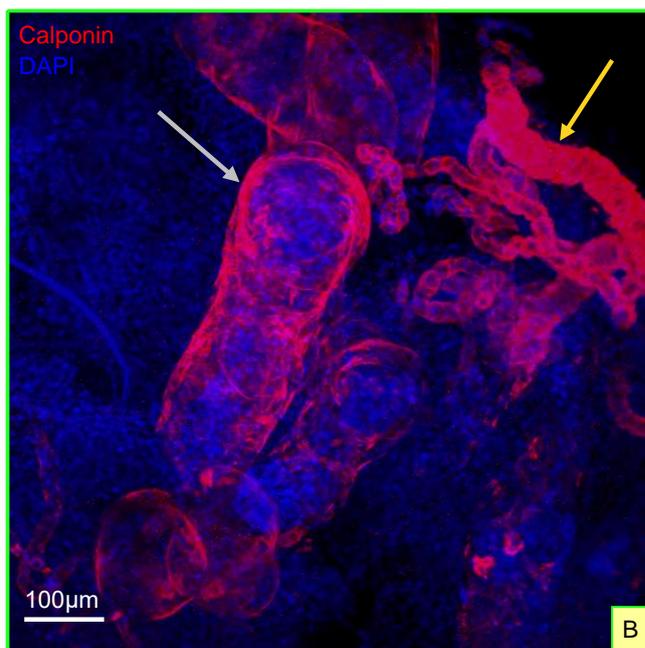
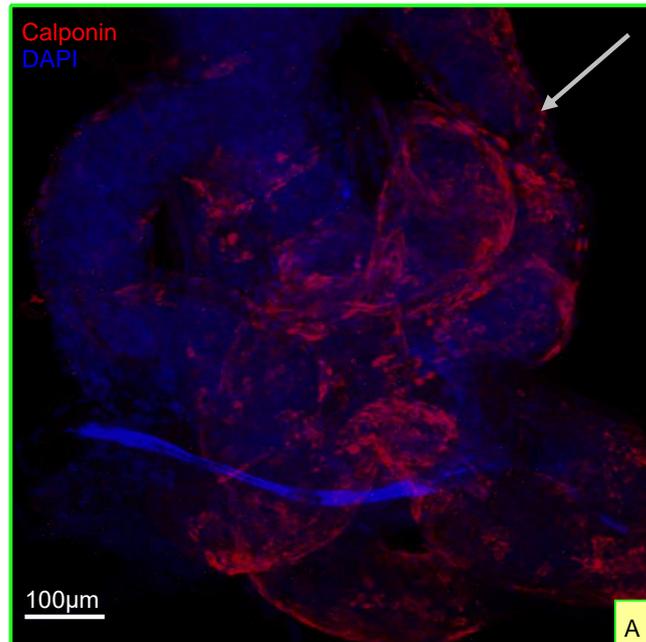
**B**

	Klinefelter-Patienten	Vergleichs-Patienten (infertil)
n	16	16
Mittleres Alter	26,1	34,8
+/- SD	+/- 8,4	+/- 5,4
Mittelwert	1,2	0,2
SD	0,7	0,4
p	<0,0001	



**Abb. 8: Darstellung des Gefäßtyp-Vorkommens bei Klinefelter-Patienten (47 XXY) und infertiler Vergleichsgruppe (46 XY)**

A: In Bezug auf den Gefäßtyp 1 lässt sich im statistischen Vergleich der beiden Patientengruppen aufgrund eines p-Wertes <0,05 eine Signifikanz (\*) feststellen. B: Bei Analyse von Gefäßtyp 2 ist das Verhältnis mit p<0,0001 hochsignifikant (\*\*\*)

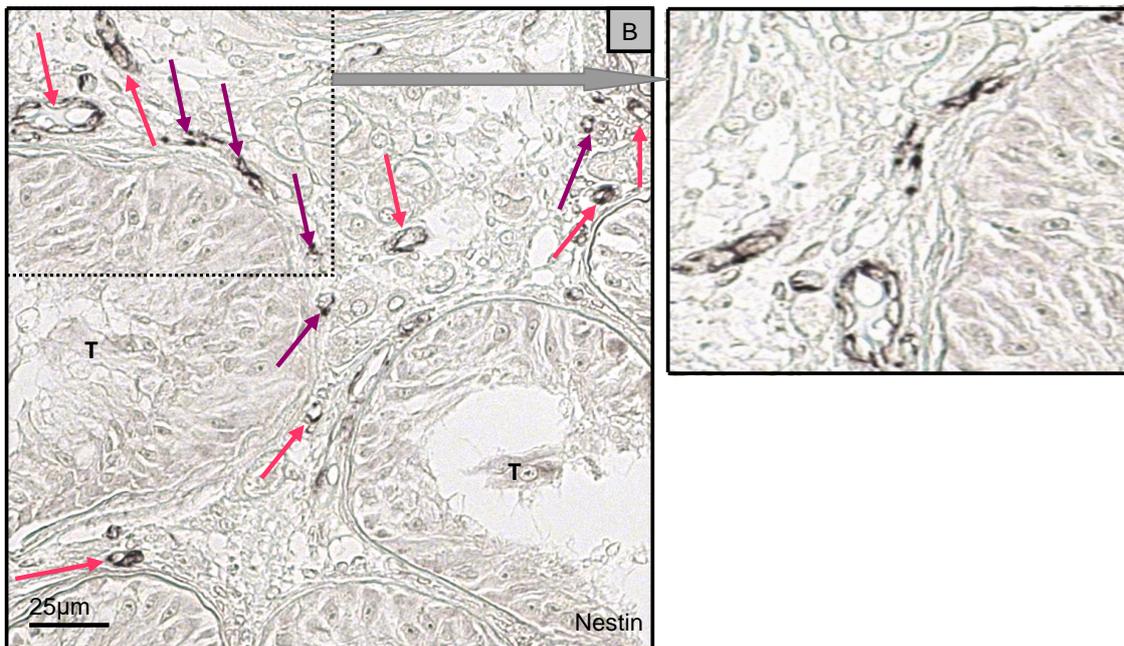
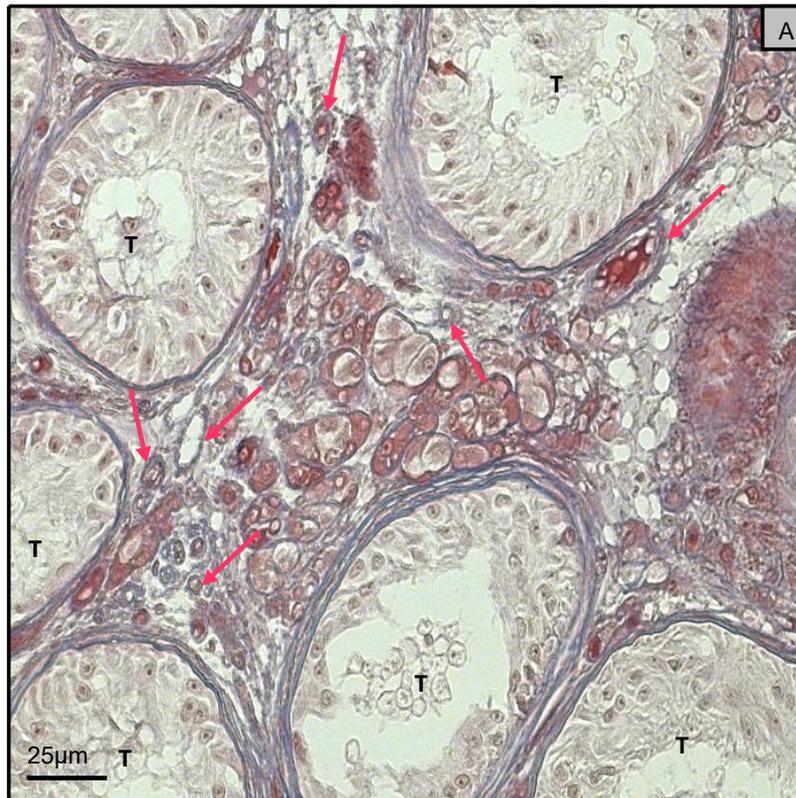


### Abb. 9: Clarity von humanem Hodengewebe

Eine Fluoreszenz-Kernfärbung mit DAPI (in der Farbe blau dargestellt) ermöglicht die Identifikation aller Zellen. Die Charakterisierung aller Calponin exprimierenden Zellen ist durch eine rote Immunfluoreszenz dargestellt. CD90-positive Zellen erscheinen grün in der Immunfluoreszenz. A: Patient mit idiopathischer Infertilität ohne genetische Ursache. B: Patient mit Klinefelter-Syndrom. Der graue Pfeil deutet auf einen Tubulus seminiferus, der gelbe Pfeil auf ein Gefäß. C: vergrößerte Darstellung eines Gefäßes eines Klinefelter-Syndrom-Patienten.

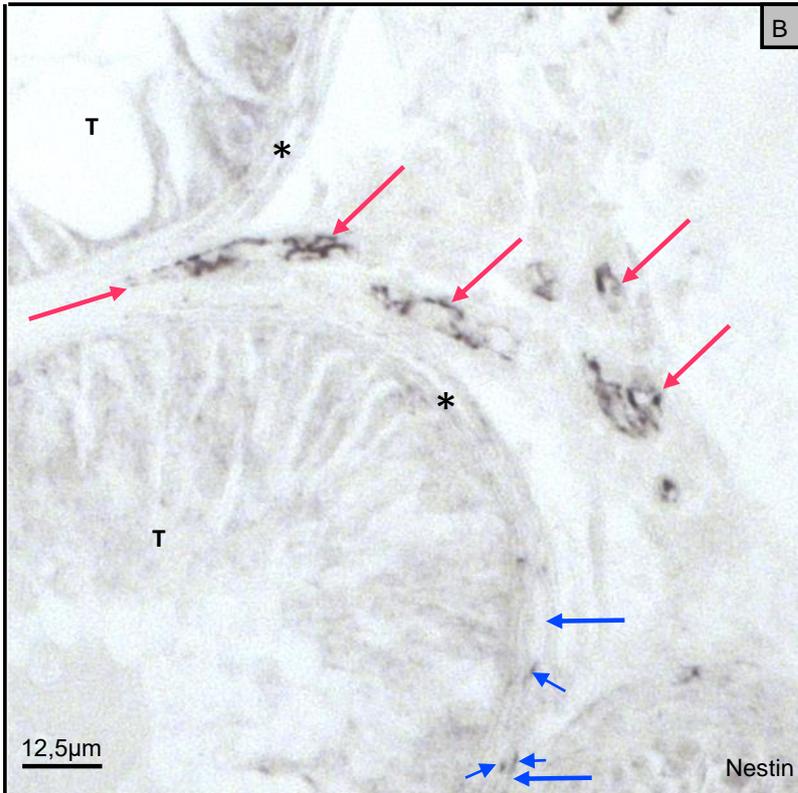
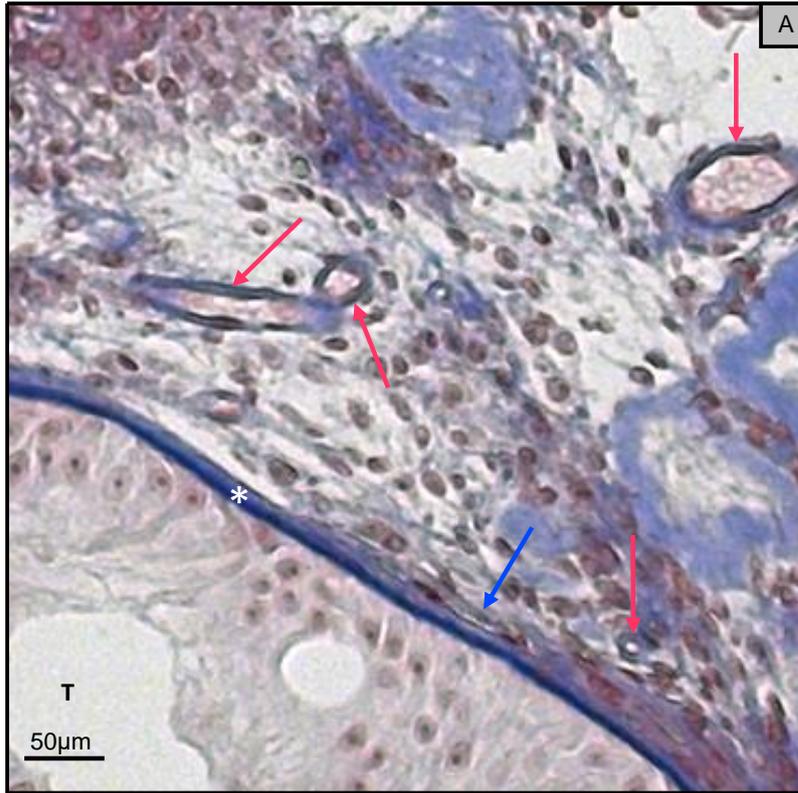
#### **4.2 Nestin-Expression im Hodengewebe von Klinefelter-Patienten in Gefäßwandzellen bei fehlender Expression in peritubulären Zellen**

In allen untersuchten Hodenbiopsien von Klinefelter-Patienten konnten in den Gefäßen, die auch in Übersichtsfärbungen deutlich erkennbar waren (Abb. 10 A und 11 A), Nestin-exprimierende Gefäßwandzellen detektiert werden (Abb. 10 B, 11 B, 12 A und B). Diese sind hauptsächlich Kapillaren (Abb. 10 B, 11 B, 12 A und B) und Arterien (Abb. 10 B und 12 A) zugehörig. Im Unterschied zu den glatten Muskelzellen von Gefäßen, in denen sich Nestin befindet (Abb. 10 B, 11 B, 12 A und B, rote und violette Pfeile), wurde in kontraktile Zellen (Myofibroblasten) des peritubulären Segments (Abb. 11 A, Stern), bei regulärer (Abb. 10 B, 11 B, 12 A) und verdickter (Abb. 12 B) Lamina propria, eindeutig keine Nestin-Expression nachgewiesen (Abb. 10 B, 11 B, 12 A und B). Eine Nestin-Färbung ist in der Tubuluswand ausschließlich durch sich dort befindliche kleine Gefäße bedingt (Abb. 11 B, blauer Pfeil). In Nachbarschaft zu Leydig-Zellen werden vor allem Nestin-positive Gefäße gefunden, die aufgrund ihrer Morphologie der Histologie von Kapillaren entsprechen (Abb. 12 B). Eine detailliertere Charakterisierung dieses Nestin-Vorkommens folgt in 4.3 und 4.4. In Abhängigkeit vom Gefäßanschnitt ließ sich in einigen Fällen sicher eine Nestin-Färbung der Endothelzellen ausschließen (Abb. 12 A, dunkelroter Pfeil).



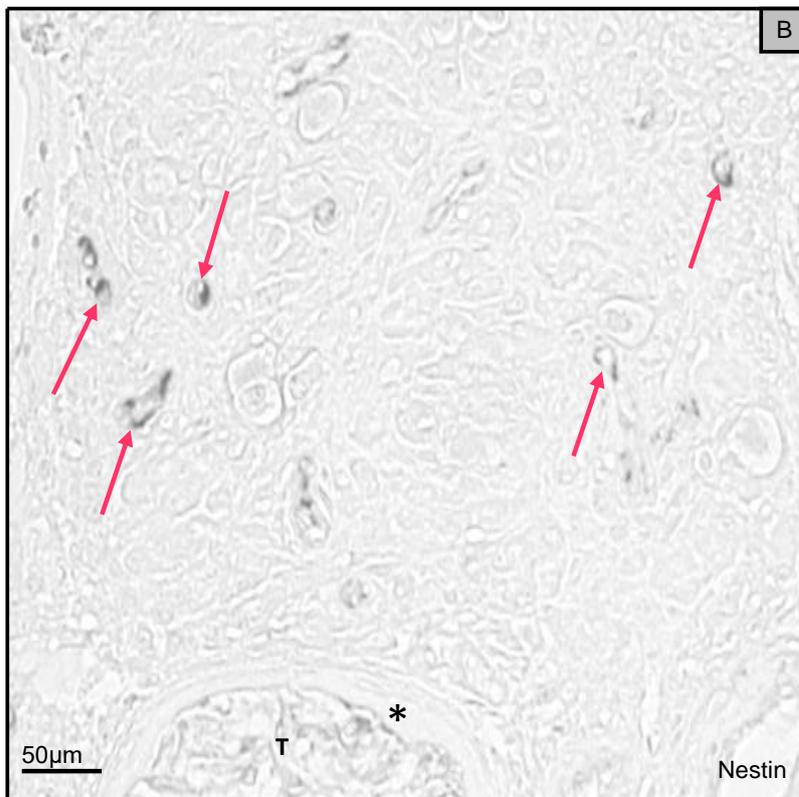
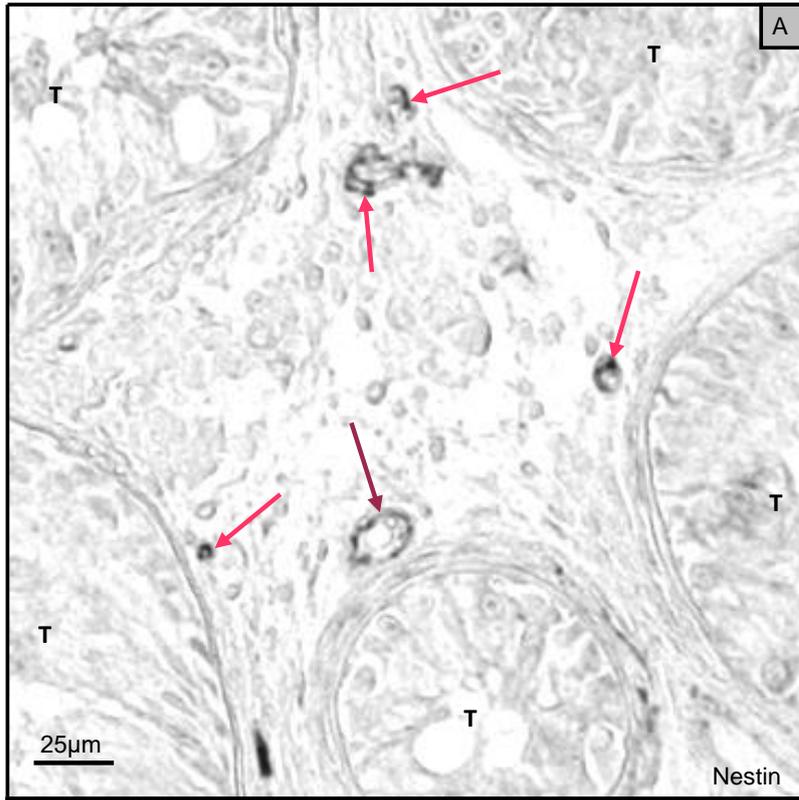
**Abb. 10: Gefäße im Hoden eines Klinefelter-Patienten**

A: In der Azan-Färbung sind Gefäße verschiedenen Lumens und verschiedener Gefäßwandstärke erkennbar, die sich im intertubulären Raum befinden. B: Gefäßwandzellen von Kapillaren und kleinen Arterien, die sich im Interstitium befinden, sind in der Immunhistochemie Nestin-positiv. Rote Pfeile weisen auf Gefäße im Allgemeinen hin, violette Pfeile zeigen im Speziellen Kapillaren. Ein „T“ markiert die Tubuli.



**Abb. 11: Nestin in interstitiellen und peritubulären Gefäßen beim Klinefelter-Syndrom**

A: Bei Vorliegen einer regelrechten Lamina propria (Markierung durch einen Stern) sind in der Übersichtsfärbung mit Azan Gefäße gut darstellbar. B: Die immunhistochemische Färbung mit Nestin veranschaulicht, dass sich peritubulär (Markierung durch einen Stern) keine Zellen befinden, die Nestin exprimieren. Eine Ausnahme ist, dass sich ein Gefäß direkt innerhalb der Lamina propria befindet, dessen Zellen Nestin-positiv sind. Der Hinweis auf diesen Fall wird durch einen blauen Pfeil gegeben, kleine blaue Pfeile deuten auf die positiven Zellen. Tubuli seminiferi werden durch ein „T“ gekennzeichnet.

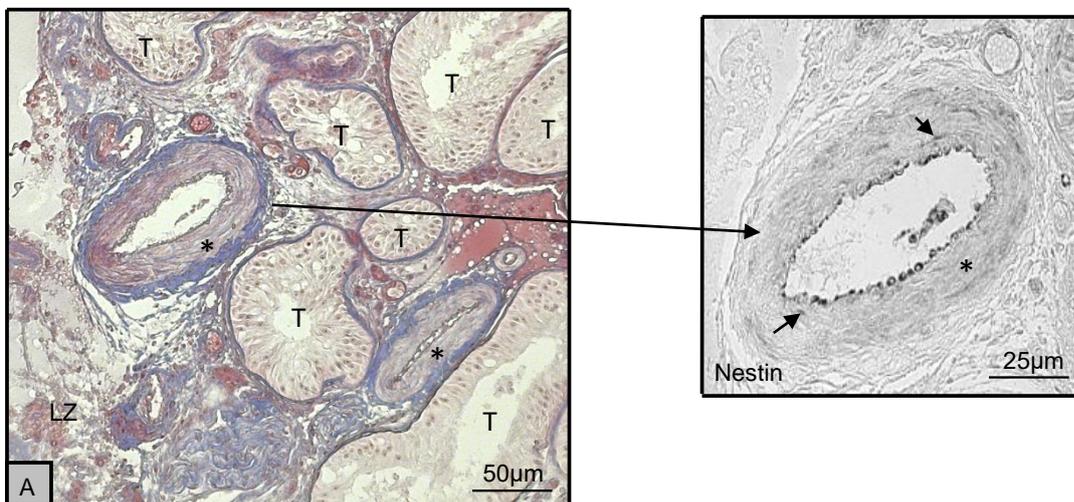


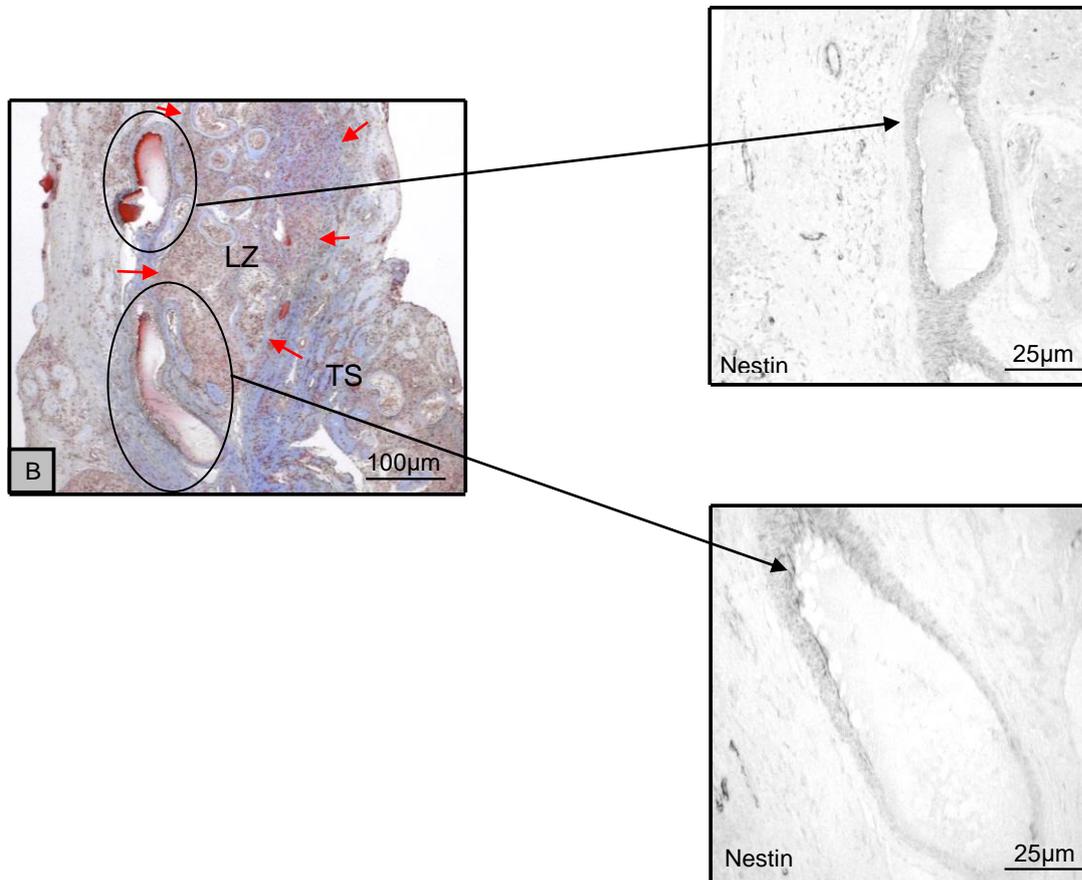
**Abb. 12: Lokalisation von Nestin innerhalb arterieller Gefäße und Kapillaren bei unauffälligem Interstitium und bei Leydig-Zell-Hyperplasie**

A: Immunhistochemische Färbung mit dem Nestin-Antikörper, bei der Arterien und Kapillaren als positiv zu bewerten sind. Im Falle der gezeigten Arteriole, die durch den dunkelroten Pfeil markiert wird, wird eine Nestin-Expression des Endothels eindeutig nicht nachgewiesen. B: Nestin-positive Gefäße im interstitiellen Kompartiment des Hodens in der unmittelbaren Nachbarschaft zu Leydig-Zellen bei fehlender Expression von Nestin innerhalb der fibrotischen Lamina propria eines Tubulus. Auf Gefäße wird durch rote Pfeile hingewiesen, auf die Lamina propria durch einen Stern. Der Tubulus seminiferus wird durch ein „T“ gekennzeichnet.

### 4.3 Nestin-positive Gefäßwandzellen in größeren Gefäßen

In größeren Gefäßen, meist Arterien mit mehreren Muskelschichten in der Tunica media (Subtyp 2), fanden sich ebenfalls Zellen, die eine deutliche Immunreaktion für den Nestin-Antikörper zeigten (Abb. 13). Solche Gefäße lagen weiter entfernt von Leydig-Zellen vor (Abb. 13 A), jedoch auch benachbart zu Tubulusschatten und Leydig-Zell-Adenomen (Abb. 13 B). Innerhalb des Adenoms befinden sich allerdings nur kleinere Gefäße, die Nestin-positive Gefäßwandzellen enthalten (Abb. 13 B). Auffällig ist die starke Nestin-Endothelfärbung bei gleichzeitig vereinzelt positiven Muskelzellen in der Media (Abb. 13 A und B, Insets).



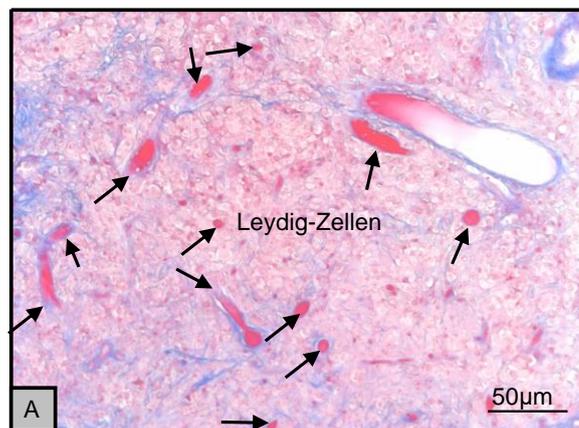


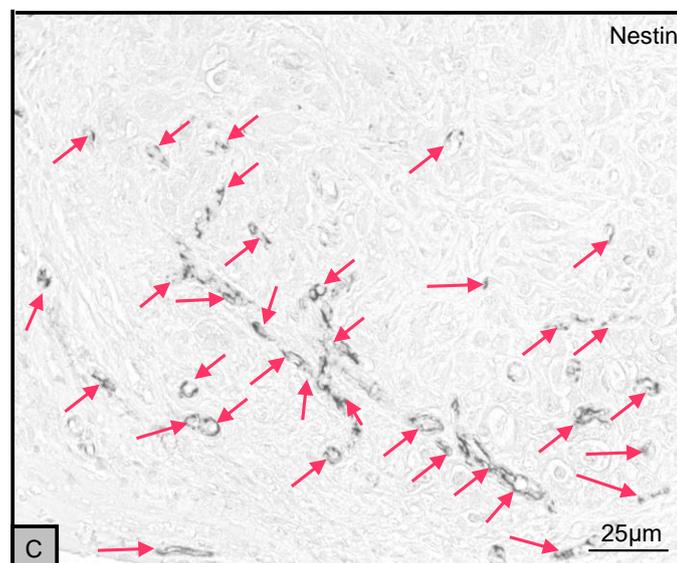
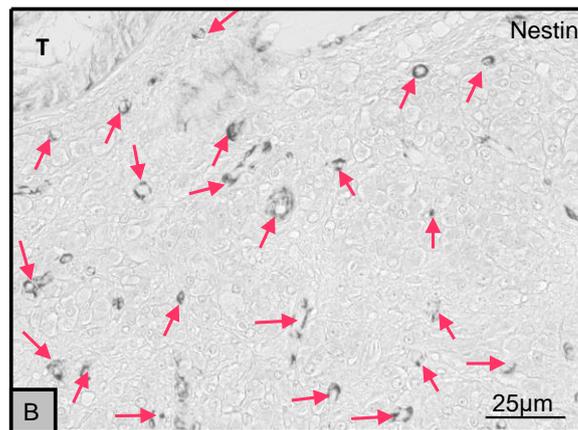
**Abb. 13: Nestin-positive GefäÙe innerhalb des Hodengewebes von Klinefelter-Patienten mit SCO-Histologie**

A: Große GefäÙe (muskelstarke Arterien, Subtyp 2, gekennzeichnet mit \*) in weiter Entfernung von Leydig-Zellen („LZ“). Tubuli („T“) mit sco (Azan-Färbung); Inset größtes GefäÙ mit Nestin-Färbung im Endothel und in einigen Muskelzellen (Pfeile) der Media. B: Große GefäÙe in Nachbarschaft zu Leydig-Zellen und Tubulusschatten („TS“). Die roten Pfeile begrenzen eine adenomartige Ansammlung von Leydig-Zellen in direkter Nachbarschaft zu GefäÙen, die Nestin exprimieren; Insets der großen GefäÙe mit Nestin-positiven Endothel- und Media-Zellen.

#### 4.4 Nestin-positive, kleinere Gefäße in Klinefelter-Hodenbiopsien

Die untersuchten Hodenbiopsien der Klinefelter-Syndrom-Patienten zeigten als bekanntes, histologisches Merkmal die Leydig-Zell-Hyperplasie (Abb. 14 A). Innerhalb dieser Bereiche von Leydig-Zell-Clustern konnten kleinere Gefäße, hauptsächlich Kapillaren, aber auch Venen und Arterien, beobachtet werden (Abb. 14 A, Pfeile). In diesen Arealen waren Nestin-positive Gefäßwandzellen zu erkennen (Abb. 14 B und C, rote Pfeile). Deren räumliche Nähe zu Tubuli seminiferi war kein Kriterium für ihr Vorkommen. So wurden Gefäßwandzellen, die Nestin-positiv waren, sowohl in geringem Abstand zu diesen gefunden (Abb. 14 B) als auch weiter entfernt von Tubuli (Abb. 14 C). Nestin-exprimierende Gefäßwandzellen wurden als Vorläuferzellen der Leydig-Zellen beschrieben (Davidoff et al., 2004), die bei Vorliegen des Klinefelter-Syndroms im Sinne einer Hyperplasie vermehrt vorkommen. Damit übereinstimmend ist die Zahl der Nestin-exprimierenden Gefäße in diesen Bereichen besonders hoch.





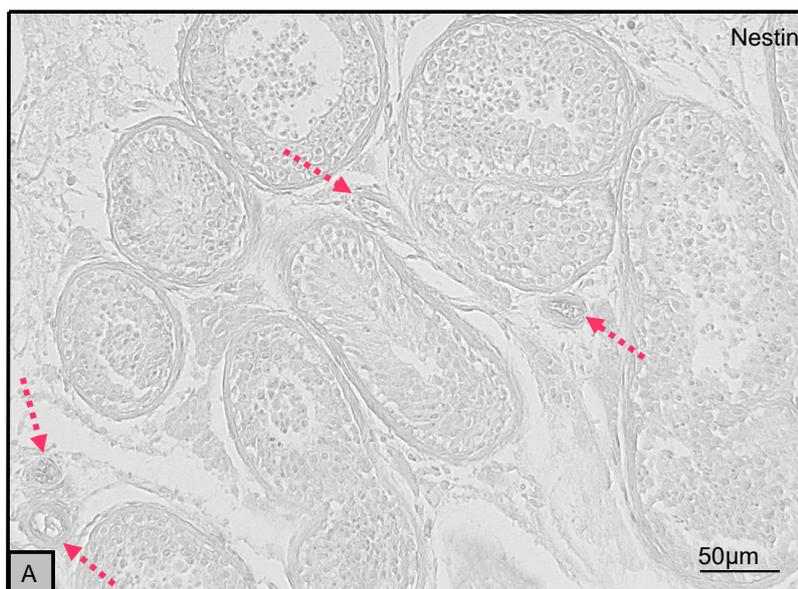
#### Abb. 14: Lokalisation Nestin-positiver Kapillaren

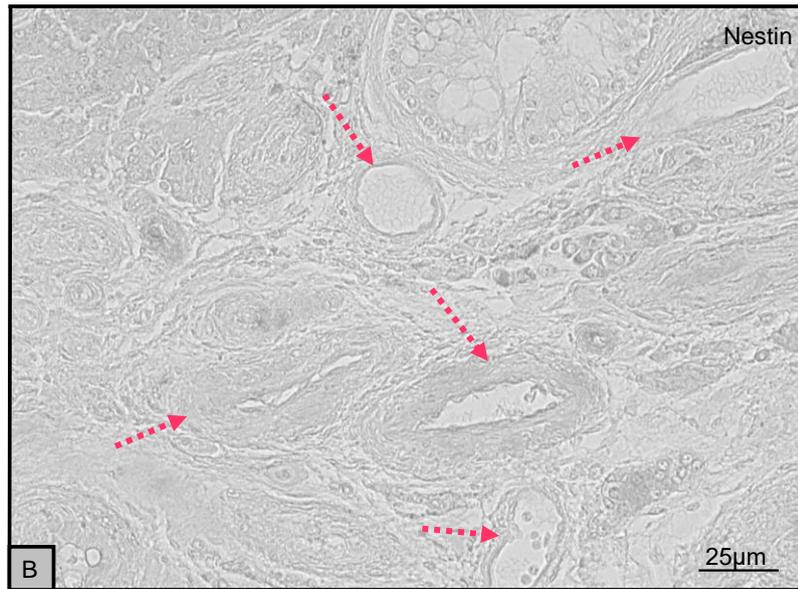
A: In der Azanfärbung sind Gefäße, insbesondere zahlreiche kleineren und mittleren Lumens, erkennbar, die sich inmitten von hyperplastischen Leydig-Zellen befinden (gekennzeichnet durch schwarze Pfeile).  
 B: Nestin-Färbung: Rote Pfeile deuten auf positive Kapillaren in der Umgebung zahlreicher Leydig-Zellen und eines keimzellfreien Tubulus seminiferus (durch ein „T“ markiert). C: Nestin-positive Gefäße (überwiegend Kapillaren, rote Pfeile dienen der Markierung) inmitten von ausschließlich Leydig-Zellen.

#### 4.5 Nestin-positive Gefäße bei Männern mit Infertilität, die nicht vom Klinefelter-Syndrom betroffen sind

Bei den meisten Hodenbiopsien infertiler Männer, die nicht am Klinefelter-Syndrom leiden, konnte in den Gefäßen kaum Nestin nachgewiesen werden (Abb. 15 A und B, rote gestrichelte Pfeile). Wenn größere Gefäße vorhanden waren, enthielten diese in der Regel maximal 3 Muskelschichten (Abb. 15 B). Dieser Fall war allerdings eine Seltenheit (siehe 4.1 und Abb. 8).

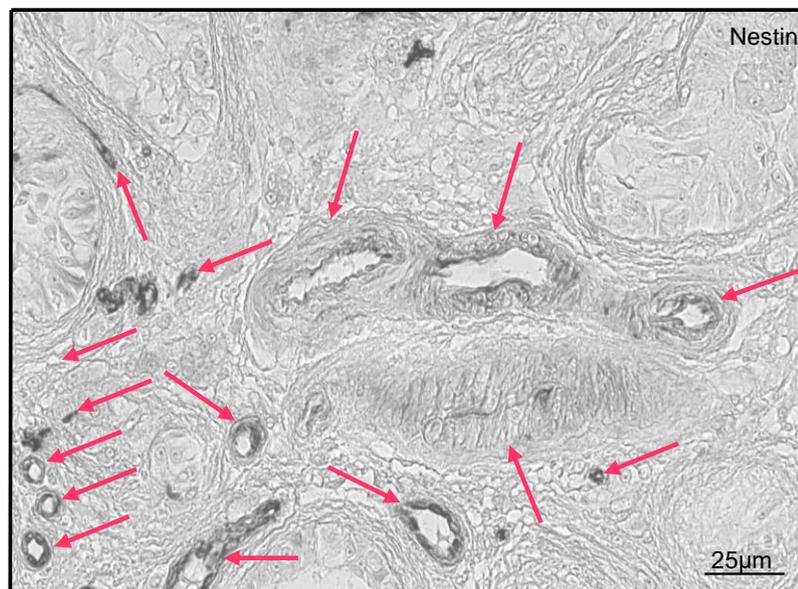
Hodenbiopsien infertiler Patienten mit vermehrt Nestin-positiven großen Gefäßen (Abb. 16, rote Pfeile), waren die Ausnahme. Nestin fand sich hier in sowohl kleineren als auch größeren Gefäßen. Ein Unterschied zur Klinefelter-Gruppe war, dass alle Biopsien der infertilen Vergleichsgruppe mit Nestin-positiven Gefäßen höchstens 3 Muskelzellschichten besaßen. Demzufolge ist die Nestin-Expression in Gefäßen kein Alleinstellungsmerkmal von Klinefelter-Patienten. Im Hoden infertiler Männer anderer Ursachen können ebenfalls, wenn auch nicht regelmäßig, Gefäße gefunden werden, in denen Nestin vorhanden ist.





**Abb. 15: Hodengewebe von infertilen Vergleichs-Patienten mit kaum nachweisbarer Nestin-Färbung**

A Rote gestrichelte Pfeile deuten auf interstitielle Gefäße, die kein Nestin exprimieren. B Es lagen auch größere Gefäße im Hoden vor, jedoch selten aus mehr als 3 Muskelschichten.

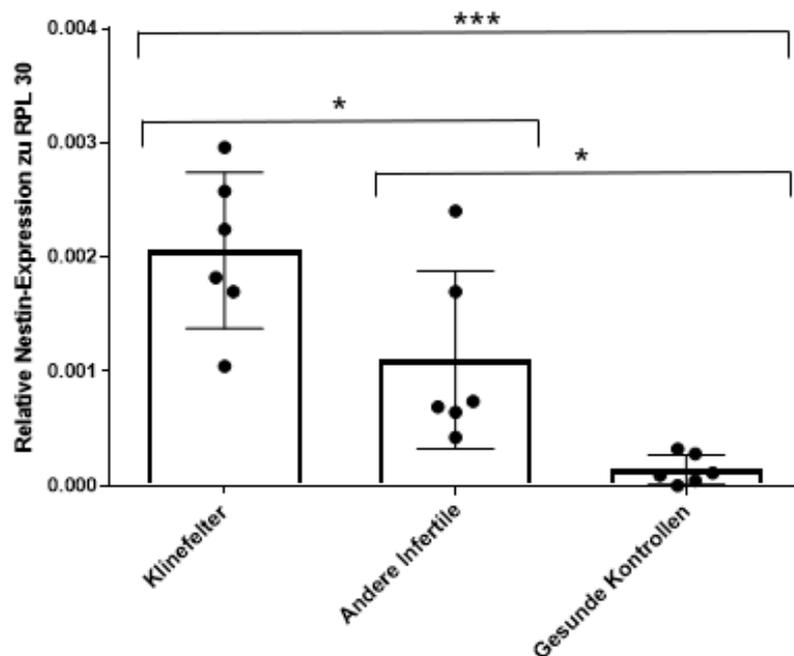


**Abb. 16: Nestin-positive Gefäße im Hoden infertiler Vergleichs-Patienten**

Pfeile markieren kleinere und größere testikuläre Gefäße infertiler Patienten, die Nestin exprimieren.

#### 4.6 Expressionsanalyse und Quantifizierung von Nestin im Hoden von Klinefelter-Syndrom-Patienten, SCO-Syndrom-Patienten anderer Genese und Kontroll-Patienten ohne Keimzellschädigung mittels qPCR

Die Expression des Nestin-Gens aller drei untersuchten Gruppen, der Klinefelter-Gruppe, der SCO-Gruppe anderer Genese (andere Infertile) und der Kontroll-Gruppe ohne Keimzellschädigung (gesunde Kontrollen), wurde bezogen auf die Expression von RPL 30, das als Housekeeping-Gen verwendet wurde. Abbildung 17 zeigt die relative Nestin-Expression im Hoden aller drei untersuchten Gruppen, von denen jeweils 6 Proben zur Verfügung standen. Die höchste Nestin-Expression fand sich bei der Klinefelter-Gruppe. Diese war deutlich höher als die Expression bei der SCO-Patienten-Gruppe anderer Genese (andere Infertile) und die der gesunden Kontroll-Patienten. Das geringste Nestin-Expressionsniveau wurde für die gesunde Kontroll-Gruppe ermittelt. Die statistische Auswertung ergab, dass das Verhältnis der Nestin-Expression zwischen Klinefelter-Gruppe und SCO-Gruppe (andere Infertile) mit einem p-Wert von  $<0,05$  signifikant (\*) ist. Im Vergleich der Klinefelter-Gruppe zu der gesunden Kontroll-Gruppe ( $p<0,0005$ ) war der Unterschied hochsignifikant (\*\*\*). Bei Betrachtung der SCO-Gruppe (andere Infertile) gegenüber der gesunden Kontroll-Gruppe ( $p<0,05$ ) wurde auch ein signifikanter Unterschied (\*) festgestellt.



n=6 je Patientengruppe  
Mittelwerte  $\pm$  SD  
p<0,05 (\*)  
p<0,0005 (\*\*\*)

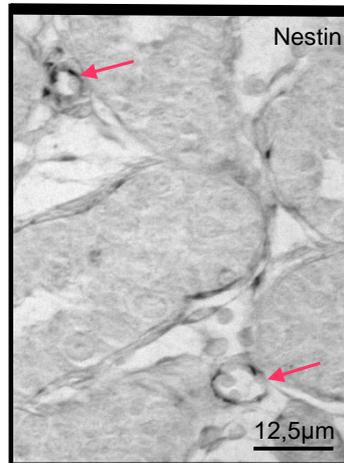
**Abb. 17: Relative Expression von Nestin bei Klinefelter-Syndrom-Patienten, Patienten mit SCO-Syndrom (andere Infertile) und Kontroll-Patienten ohne Keimzellschädigung (gesunde Kontrollen)**

Durch die  $\Delta$ Ct-Methode wurde die relative Nestin-Expression quantifiziert, RPL 30 diente dabei als Housekeeping-Gen zur Normierung. Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden durch die ANOVA auf ihre statistische Signifikanz überprüft. Bei signifikanten Unterschieden (p-Wert  $<0,05$ ) wurde ein Stern (\*) zur Markierung verwendet, bei hochsignifikanten (p-Wert  $<0,0005$ ) waren es drei Sterne (\*\*\*)

#### **4.7 Nestin-Expression im Hoden des 41,XX<sup>Y\*</sup>-Maus-Modells während der postnatalen Entwicklung**

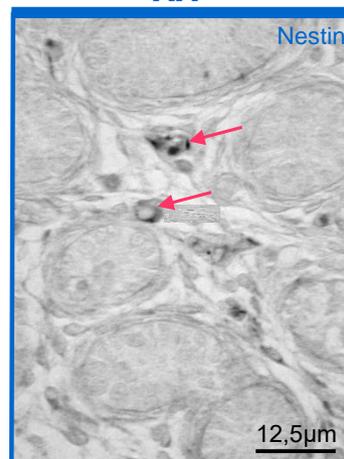
Zur Ermittlung des Zeitpunktes, ab welchem Nestin im Hodengewebe der transgenen Maus erstmalig nachgewiesen werden kann und zur Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Nestin-Expression, wurden immunhistochemische Färbungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten angefertigt (Abb. 18-20). Dabei war von besonderem Interesse, inwiefern die Expression von Nestin im Gefäß mit der Expression proliferationsaktiver Gefäßwandzellen übereinstimmt und ob diese bei der genetisch veränderten Maus abweichend ist. Die ersten Nestin-positiven Zellen konnten ab Tag 3 postpartum (pp) beobachtet werden, sowohl bei der Maus mit normalem Karyotyp als auch bei der transgenen Maus mit dem Karyotyp 41,XX<sup>Y\*</sup>. Diese Zellen befinden sich in der Gefäßwand von im Interstitium liegenden Gefäßen (Abb. 18-20, rote Pfeile), vor allem von Kapillaren und Arterien, die außerdem proliferierende Zellen enthalten, die durch den Nachweis mit dem PCNA-Antikörper detektiert wurden (Abb. 19 und 20, blaue Pfeile). An Tag 7 und 10 pp sieht man ebenfalls testikuläre Gefäße intertubulär, die bis zu 2 Muskelschichten aufweisen (Abb. 19, Azan-Färbung). Diese sind unabhängig vom Karyotyp der Maus Nestin-positiv (Abb. 19, rote Pfeile) und PCNA-positiv (Abb. 19, blaue Pfeile). Ab Entwicklungsstadium Tag 14 pp konnten im Hoden der 40,XY\*-Maus keine Nestin- und PCNA-positiven Gefäße mehr gefunden werden (Abb. 20, rote und blaue gestrichelte Pfeile). PCNA-positiv bleiben aber die Keimzellen (magentafarben eingerahmt und mit „K“ beschriftet), die zahlreich vorhanden sind (Abb. 20). Im Hoden der 41,XX<sup>Y\*</sup>-Maus jedoch sind Zellen in Gefäßen weiterhin Nestin- und PCNA-exprimierend (Abb. 20, rote und blaue Pfeile). Wahrscheinlich enthalten Tubuli bei der Klinefelter-Maus aber bereits zu diesem Zeitpunkt keine Keimzellen mehr, da in diesen keine PCNA-Expression nachgewiesen werden kann (Abb.20, gestrichelter, magentafarbener Rahmen). Die einzigen Zellen innerhalb der Tubuli sind Sertoli-Zellen, von denen allerdings keine Proliferation ausgeht. Ab Tag 21 pp sind die Nestin-positiven Gefäße auch bei dem Karyotyp 41,XX<sup>Y\*</sup> nicht mehr vorhanden (gestrichelte, rote Pfeile). Die Gefäßwandzellen sind weiter PCNA-positiv (blaue Pfeile), die peritubulären Zellen ebenso (grüne Pfeile). Zu keinem Entwicklungsstadium enthielten Gefäße beider Maustypen mehr als 3 Muskelschichten.

XY\*



Tag 3 pp

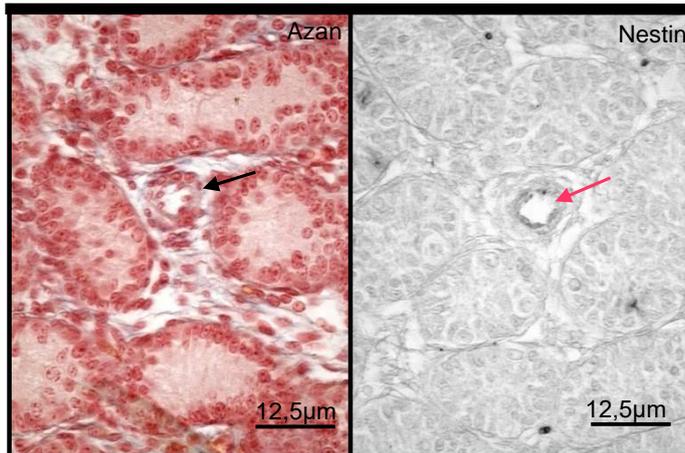
XX<sup>Y\*</sup>



**Abb. 18: Postnatal erste Nestin-positive Zellen im Hoden der Maus**

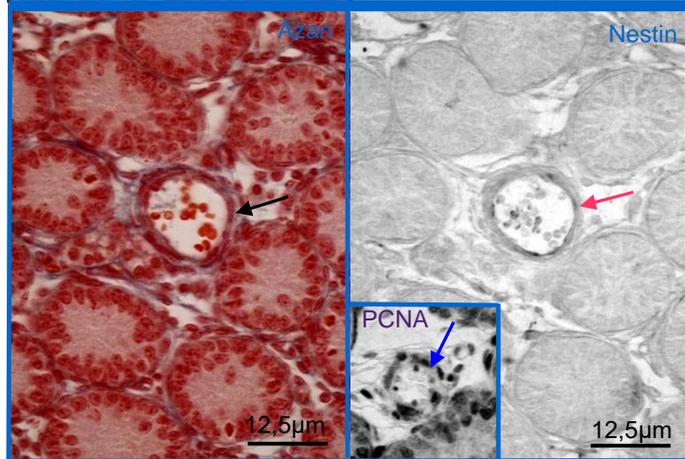
Ab Tag 3 pp können sowohl bei der XY\*- als auch bei der XX<sup>Y\*</sup>-Maus Nestin-positive Gefäßwandzellen nachgewiesen werden. Diese werden durch rote Pfeile markiert.

Tag 7 pp

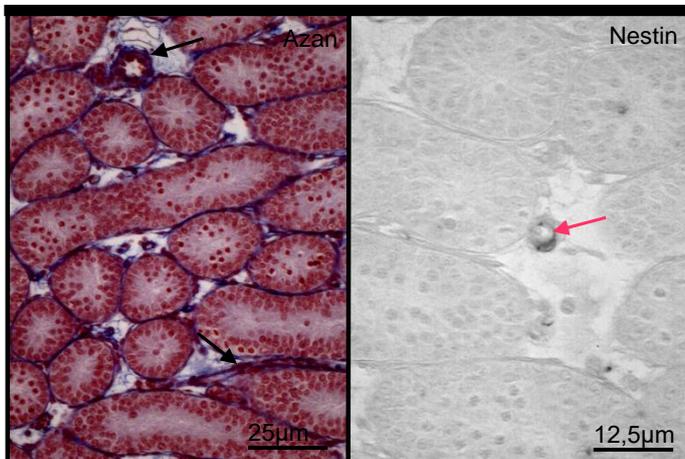


XY\*

XXY\*



Tag 10 pp



XY\*

XXY\*

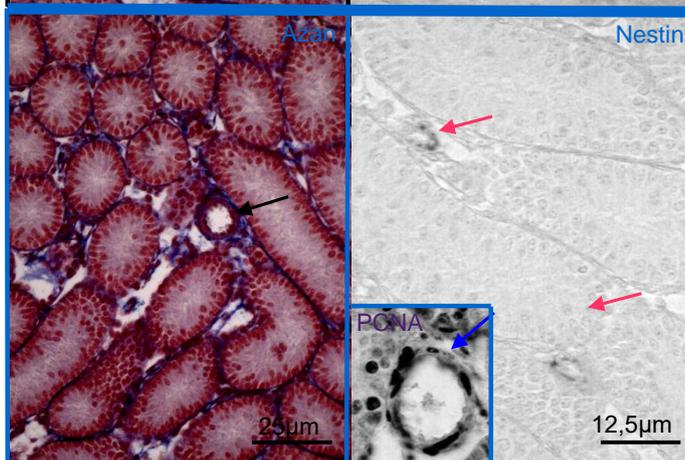
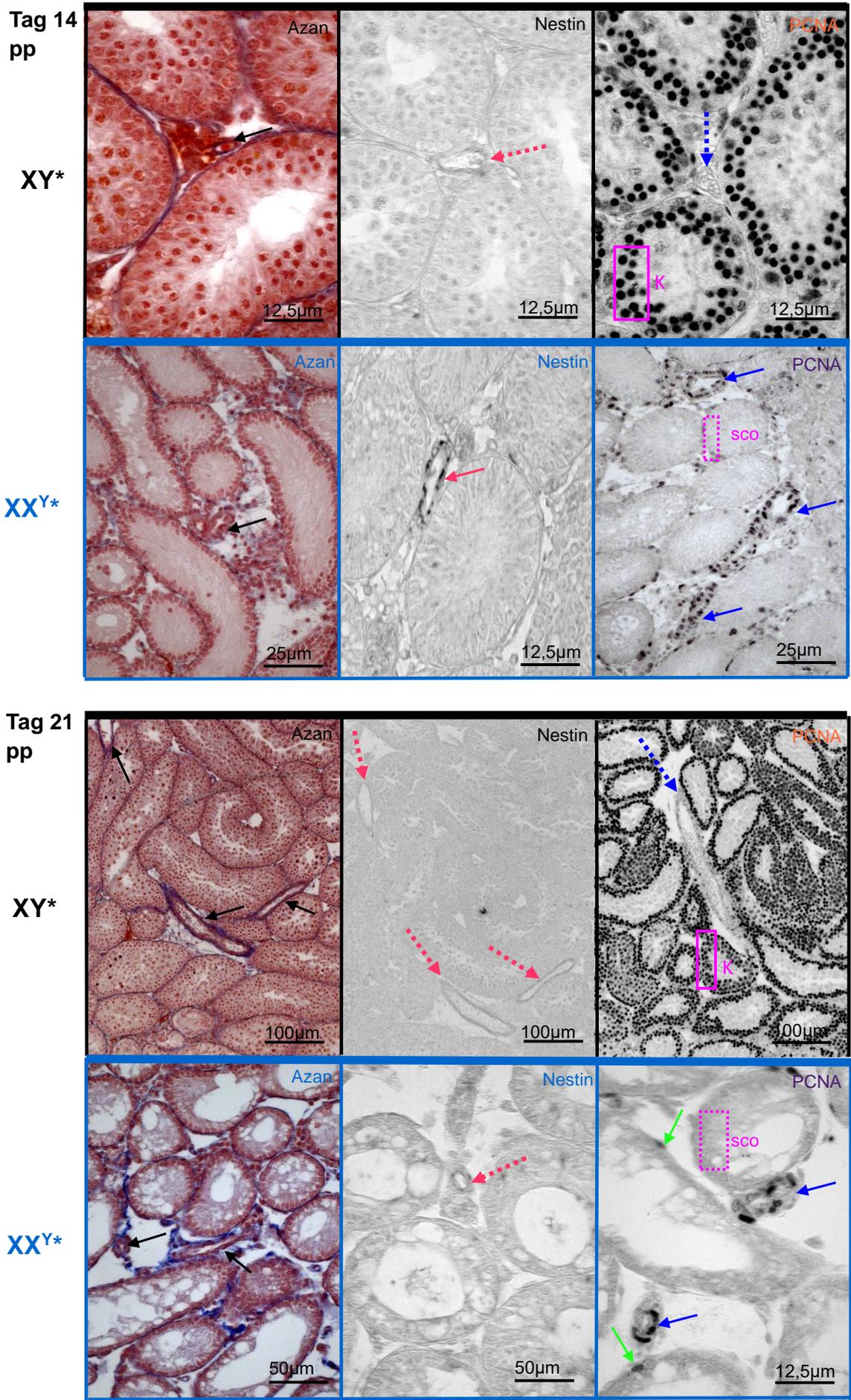


Abb. 19: **Gefäße im Hoden der Maus zu den Zeitpunkten Tag 7 und Tag 10 pp**

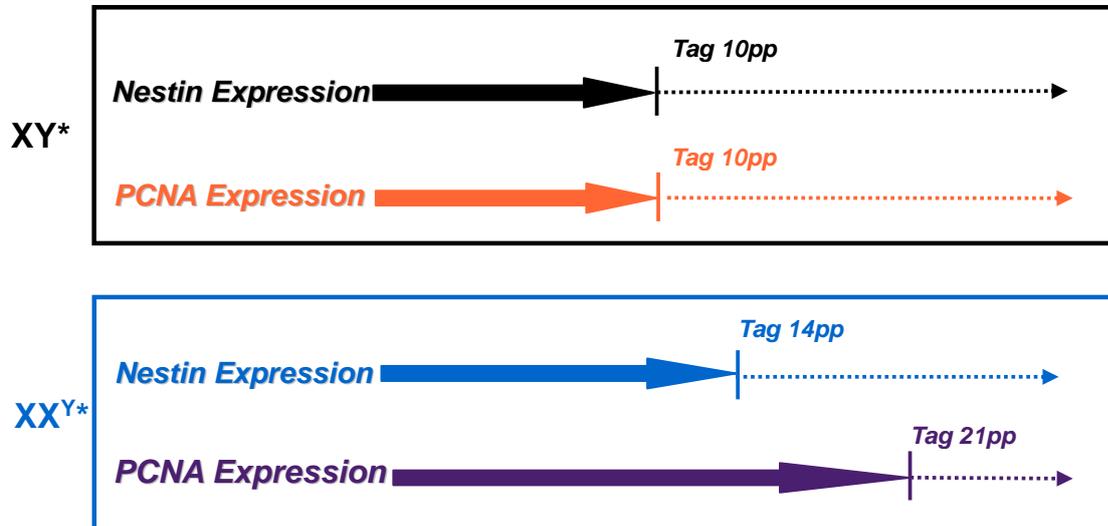
Am 7. und 10. Tag pp liegt nach wie vor eine Nestin-Expression in den Gefäßen beider Maus-Karyotypen vor (rote Pfeile). Gefäße der XXY\*-Maus sind PCNA-positiv (blaue Pfeile). Schwarze Pfeile deuten in der Azan-Färbung ebenfalls auf Gefäße hin, die sich im Interstitium befinden und in ihrer Größe variieren.



### Abb. 20: Histologie des Hodens der XY\*- und XX<sup>Y\*</sup>-Maus zu Tag 14 und Tag 21 pp

Am 14. Tag pp unterscheidet sich die Expression von PCNA und Nestin bei der XY\*-Maus von der der XX<sup>Y\*</sup>-Maus: die Gefäße der XY\*-Maus zeigen keine Expression dieser Marker mehr. Die Immun-negativen Gefäße werden durch gestrichelte Pfeile demonstriert. Magentafarben eingerahmt und mit einem „K“ versehen sind Keimzellen innerhalb der Tubuli, die deutlich PCNA-positiv sind und in einer Vielzahl vorkommen. Bei der XX<sup>Y\*</sup>-Maus hingegen können fortwährend Gefäße gefunden werden, die positiv auf Nestin und PCNA reagieren (rote und blaue Pfeile). Jedoch wird in der PCNA-Färbung sichtbar, dass von dem Keimepithel der Tubuli keine Proliferation ausgeht (PCNA-negativ, hingewiesen durch gestrichelten magentafarbenen Rahmen). Das Vorliegen ausschließlich von Sertoli-Stützzellen wird durch „sco“ vermerkt. An Tag 21 pp gibt es bei der XY\*-Maus keinen Unterschied mehr zu Tag 14 pp, Gefäße bleiben Nestin- und PCNA-negativ. Die Gefäße im Hodengewebe der XX<sup>Y\*</sup>-Maus sind nun Nestin-negativ (rote, gestrichelte Pfeile). Allerdings zeigen sie immer noch eine PCNA-Expression (blaue Pfeile). Zudem können PCNA-positive peritubuläre Zellen gefunden werden, die eine Markierung mit grünen Pfeilen tragen.

Der Verlauf der Nestin-Expression korreliert teilweise mit der Expression von PCNA. Bis zu Tag 10 pp gibt es keinen Unterschied in der Expression Nestin- und PCNA-positiver Gefäße bei beiden Maustypen. Jedoch ist ab Tag 14 pp das Auftreten von Gefäßen, die Nestin und PCNA exprimieren, bei der 41,XX<sup>Y\*</sup>-Maus nicht im zeitlichen Einklang mit dem der 40,XY\*-Maus (Abb. 21).



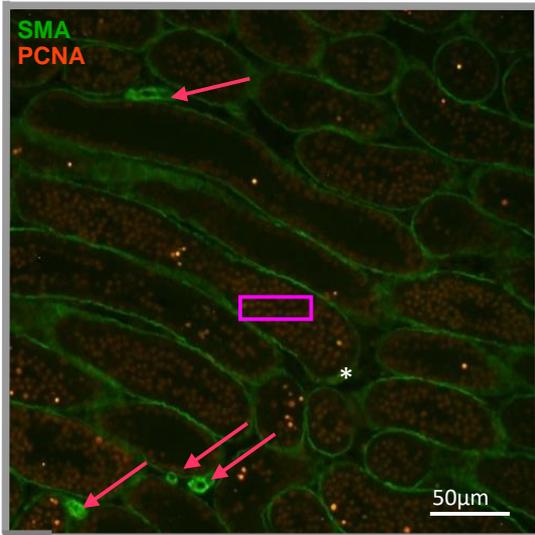
### Abb. 21: Zeitlicher Verlauf der vaskulären Nestin- und PCNA-Expression in Hodenbiopsien der XY\*- und XX<sup>Y\*</sup>-Maus

Bei der XY\*-Maus treten die Expression von Nestin und PCNA in Gefäßen des Hodens zeitgleich auf und enden exakt am 10. Tag nach der Geburt. Die Nestin-Expression bei der XX<sup>Y\*</sup>-Maus hält bis zum 14. Tag pp an und verschwindet dann (zunächst). Die Expression von PCNA in Gefäßen bleibt bis Tag 21 pp erhalten.

#### **4.8 Proliferation von Keimzellen und peritubulären Zellen des Hodens im Maus-Modell**

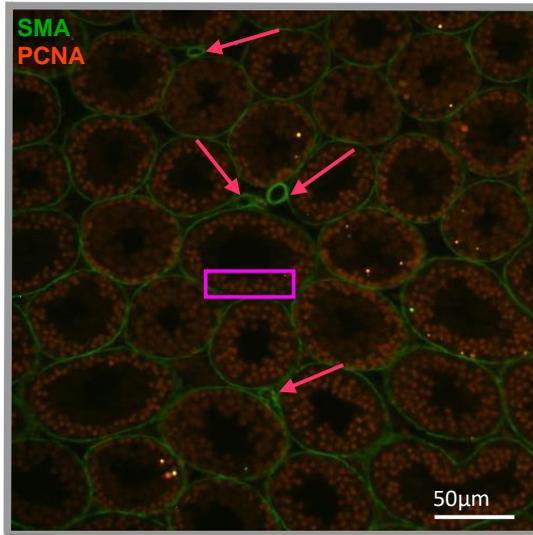
Anhand der PCNA-Immunfärbung konnte dargestellt werden, dass die Keimzellen der 41,XX<sup>Y\*</sup>-Maus im Gegensatz zur 40,XY\*-Maus nicht in allen Fällen proliferieren (Abb. 19 und 20). Es konnten bei den 41,XX<sup>Y\*</sup>-Mäusen allerdings Tubuli gefunden werden, bei denen mit Hilfe der Immunfluoreszenz eine Keimzellproliferation nachgewiesen werden konnte (Abb. 22 E-H, magentafarbene Pfeilspitzen). Dementsprechend sind bereits zu einem frühen Stadium nach der Geburt signifikante histologische Unterschiede, insbesondere in Bezug auf die Spermatogenese-Entwicklung und das Gefäßbett zwischen den beiden Maus-Karotypen festzustellen. Während bei der 40,XY\*-Maus bereits zu einem frühen Zeitpunkt nach der Geburt PCNA-positive Keimzellen nachgewiesen werden können (Abb. 22 A-D, exemplarisch: magentafarbene Rahmen) sind vor allem an Tag 10 pp nur vereinzelt PCNA-positive Zellen in den Tubuli der 41,XX<sup>Y\*</sup>-Maus zu beobachten (Abb. 22 E und F, magentafarbene Pfeilspitzen). Erst ab Tag 21 pp treten vermehrt Keimzellen in Erscheinung, die PCNA exprimieren (Abb. 22 G und H, magentafarbene Pfeilspitzen). Eine bedeutsame Proliferation geht bei der Maus mit überzähligem X-Chromosom allerdings von den peritubulären Zellen aus (Abb. 22 E und F, orangene Pfeile), was mit der Lamina propria-Fibrose assoziiert sein könnte. Peritubuläre Zellen von 40,XY\*-Mäusen zeigten keine proliferativen Eigenschaften (Abb. 22 A-D). Die Gefäße dieser exprimierten zudem lediglich SMA, kein PCNA (Abb. 22 A-D, rote Pfeile). 41,XX<sup>Y\*</sup>-Mäuse hingegen wiesen Gefäßwandzellen auf, die eine positive Immunreaktion auf PCNA zeigten (Abb. 22 E und H, roter doppelter Pfeil). Dies konnte durch Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen mit SMA und PCNA bestätigt werden. Zum adulten Stadium, bei dem bei der Maus ohne überzähliges X-Chromosom eine regelrechte Spermatogenese zu erkennen ist (Abb. 22 C), sind bei der 41,XX<sup>Y\*</sup>-Maus kaum noch intakte histologische Strukturen erkennbar; vereinzelte Gefäße, die SMA-positiv sind, dominieren das Gewebe des Hodens (Abb. 22 I, rote Pfeile). Diese Gefäße weisen nie mehr als 2 Muskelschichten auf.

**40,XY\***



**A**

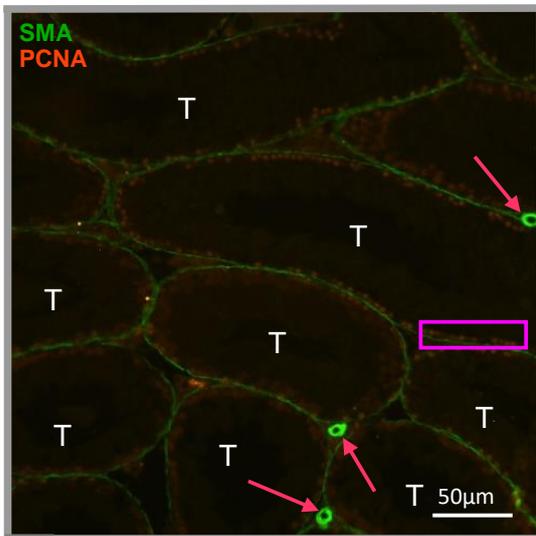
Tag 10 pp



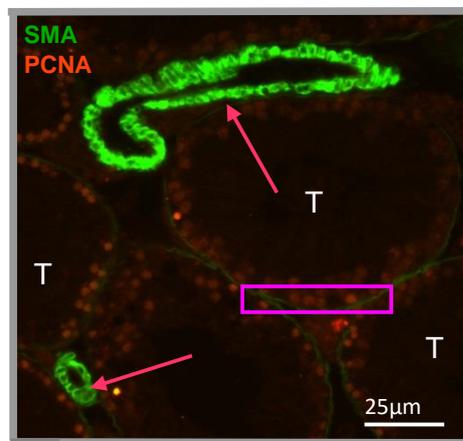
**B**

Tag 21 pp

**40,XY\*adult**

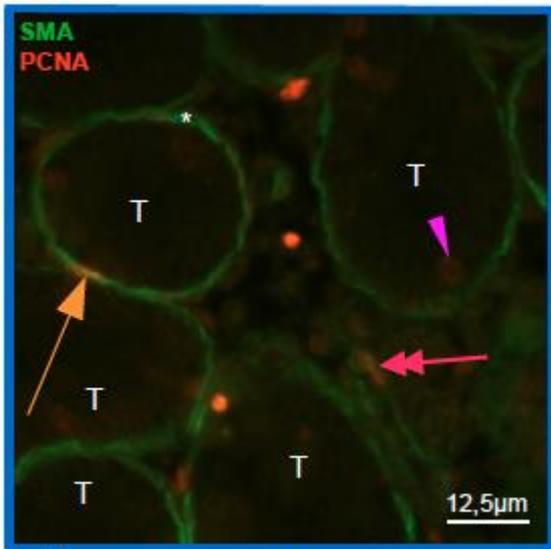


**C**

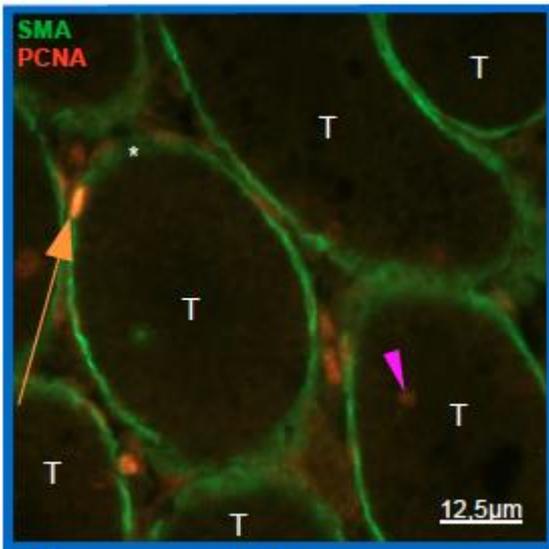


**D**

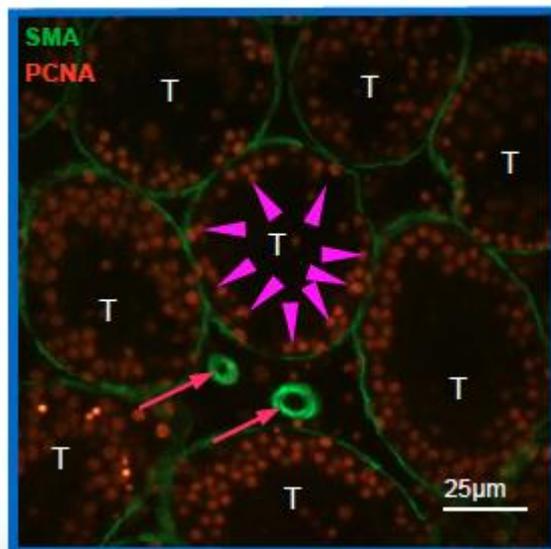
41,XX<sup>Y\*</sup>



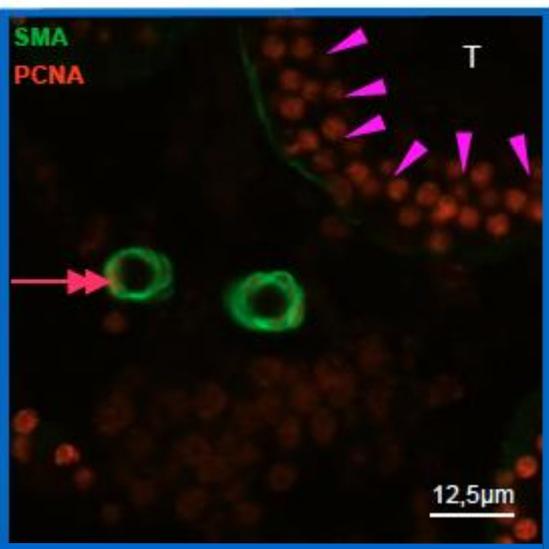
**E** Tag 10 pp



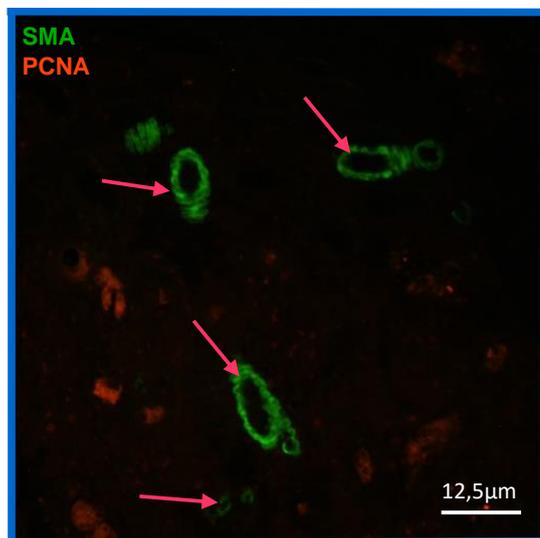
**F** Tag 14 pp



**G** Tag 21 pp



**H** Tag 21 pp



**I** adult

**Abb. 22: Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen zur Darstellung der Gefäße und der Proliferation von Gefäßwandzellen und peritubulären Zellen von XY\*- und XX<sup>Y\*</sup>- Hoden**

Grüne Zellen sind **SMA**-positiv, orangene sind **PCNA**-positiv; A: Am 10. Tag pp werden bei der 40,XY\*-Maus zahlreiche Keimzellen (exemplarisch markiert durch einen magentafarbenen Rahmen), die der SMA-positiven Lamina propria (gekennzeichnet mit einem Stern) aufliegen, sichtbar. Vereinzelt treten Gefäße auf, deren Wände ebenfalls SMA exprimieren (rote Pfeile). B-D: Von Tag 14 pp bis zum adulten Stadium ändern sich die Expressionen von PCNA und SMA nicht: Keimzellen exprimieren PCNA, die Lamina propria und Gefäße SMA. Tubuli seminiferi sind mit einem „T“ versehen. E und F: Bei der 41,XX<sup>Y\*</sup>-Maus sind zu den Zeitpunkten Tag 10 und 14 pp innerhalb der SMA-exprimierenden Lamina propria (Markierung durch einen Stern), PCNA-positive peritubuläre Zellen vorzufinden (orangene Pfeile). Einzelne Zellen der Tubuli (auf diese ist durch magentafarbene Pfeilspitzen hingewiesen) exprimieren ebenfalls PCNA. Der rote Doppelpfeil in E und H zeigt ein Gefäß, in dem sich sowohl SMA-positive Gefäßwandzellen als auch eine PCNA-positive Zelle befindet. G: Zu Tag 21 pp scheint sich die Anzahl PCNA-positiver Keimzellen im Gegensatz zu Tag 10 pp erhöht zu haben, magentafarbene Pfeilspitzen deuten auf diese. Rote Pfeile: Gefäße. H: Der rote Doppelpfeil markiert die Kolo-kalisation von SMA und PCNA in einem Gefäß des Hodens der 41,XX<sup>Y\*</sup>-Maus. I: Im adulten Stadium findet sich eine gestörte Histologie bei der Klinefelter-Maus: Tubuli fehlen vollständig, einzelne Gefäße, die weiterhin positiv für SMA sind, können gefunden werden (rote Pfeile).

## 4.9 Western Blot-Analysen der Maus-Hoden

### 4.9.1 Nachweis von Nestin im adulten Hoden der XY\*- und XX<sup>Y\*</sup>-Maus

Zur Beurteilung des quantitativen Unterschiedes der Nestin-Expression im Hoden adulter Mäuse wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Grundsätzlich ist zu erwarten, dass bei abgeschlossener Entwicklung relativ niedrige Nestin-Spiegel auftreten, da eine Expression des Proteins vorwiegend von proliferierenden Zellen ausgeht, zum Zeitpunkt der Entwicklung (Lendahl et al., 1990). Es konnte anhand des Western-Blots gezeigt werden, dass im Hoden adulter Mäuse mit XX<sup>Y\*</sup>-Karyotyp eine höhere Nestin-Expression vorhanden ist (Abb. 23 A). Bei Tieren mit normalem zytogenetischen Befund (XY\*) ist ein geringeres Proteinlevel von Nestin vorzufinden. Als Kontrollorgane dienten Gehirne von Mäusen während der postnatalen Entwicklung (Tag 1 und Tag 10 pp) sowie adulte (nicht gezeigt). Die Banden sind dem Molekulargewicht von Nestin entsprechend bei ca. 220 kDa zu finden (Müller et al., 2009). Die Vinculin-Färbung demonstriert, dass das stärkere Nestin-Signal bei den XX<sup>Y\*</sup>-Maus-Hoden nicht durch eine größere Proteinmenge der aufgetragenen Proteine begründet ist (Abb. 23 B).

Die quantitative Analyse der Nestin-Expression mittels Densitometrie ergab einen hochsignifikanten Unterschied zwischen den XX<sup>Y\*</sup>- und den XY\*-Mäusen ( $p < 0.0001$ ; Abb. 24).

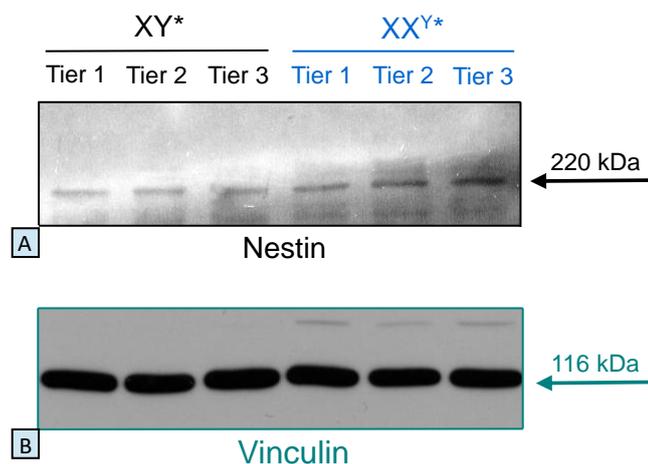
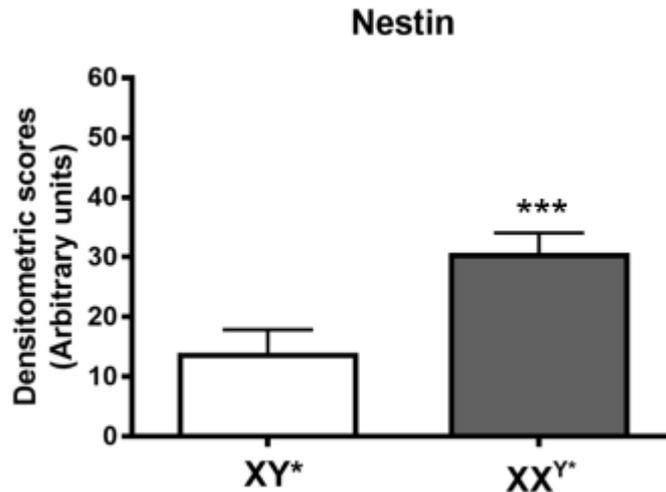


Abb. 23: Nachweis der Nestin-Expression auf Proteinebene bei adulten 40,XY\*- und 41,XX<sup>Y\*</sup>-Mäusen mittels Western Blot

A: Erhöhte Nestin-Expression der  $XX^{Y^*}$ -Maus gegenüber der  $XY^*$ -Maus für gleiche Proteinmengen (50  $\mu$ g)  
B: Vinculin-Färbung als Ladungskontrolle für gleiche Proteinmengen (50  $\mu$ g) der untersuchten Proteine.



$p < 0.0001$  (\*\*\*)  
 $n = 6$  bei  $XY^*$  und  $XX^{Y^*}$   
Mittelwerte  $\pm$  SD

Abb. 24: Densitometrische Quantifizierung der Nestin-Expression bei 40, $XY^*$ - und 41, $XX^{Y^*}$ -Mäusen

Die Balken zeigen die mittleren Nestin-Spiegel bei beiden Maus-Karotypen. Die Sterne (\*\*\*) weisen darauf hin, dass  $p < 0.0001$  ist.

#### 4.9.2 Nachweis von Cytochrom P450<sub>scc</sub> im adulten Hoden der $XY^*$ - und $XX^{Y^*}$ -Maus

Zur indirekten Bewertung des Leydig-Zell-Vorkommens im Hoden adulter  $XX^{Y^*}$ -Mäuse im Vergleich zu  $XY^*$ -Mäusen wurde die Expression der Monooxygenase Cytochrom P450<sub>scc</sub> (Youngblood et al., 1991) untersucht, die als wichtiges Enzym der Steroidsynthese Cholesterin zu Pregnenolon katalysiert, im Western Blot bei ca. 54 kDa detektiert wird und als Leydig-Zell-Marker genutzt werden kann (Davidoff et al., 2004). In der vorliegenden Untersuchung konnte im Western Blot gezeigt werden, dass die Cytochrom P450<sub>scc</sub>-Expression bei  $XX^{Y^*}$ -Mäusen im Gegensatz zu  $XY^*$ -Mäusen deutlich vermehrt ist (Abb. 25 A). Durch den zusätzlichen Nachweis von Vinculin wurden gleiche Proteinmengen aller Proben nachgewiesen (Abb. 25 B).

Die quantitative Analyse der Cytochrom P450<sub>scc</sub>-Expression mittels Densitometrie zeigte einen hochsignifikanten Unterschied zwischen den beiden Maus-Stämmen ( $p < 0.0001$ ; Abb. 26).

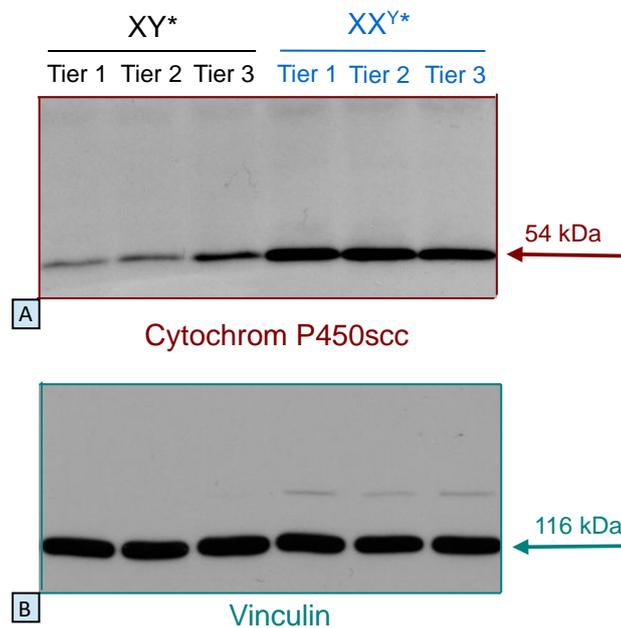


Abb. 25: **Nachweis der Cytochrom P450<sub>scc</sub>-Expression auf Proteinebene bei adulten 40,XY\*- und 41,XX\*Y\*-Mäusen mittels Western-Blot**

A: Stärkeres Cytochrom P450<sub>scc</sub>-Signal bei den Hodenproben der XX\*Y\*-Mäuse, schwächeres Signal bei denen der XY\*-Mäuse für gleiche Proteinmengen (50 µg) B: Vinculin-Färbung als Ladungskontrolle für gleiche Proteinmengen (50 µg) der untersuchten Proteine.

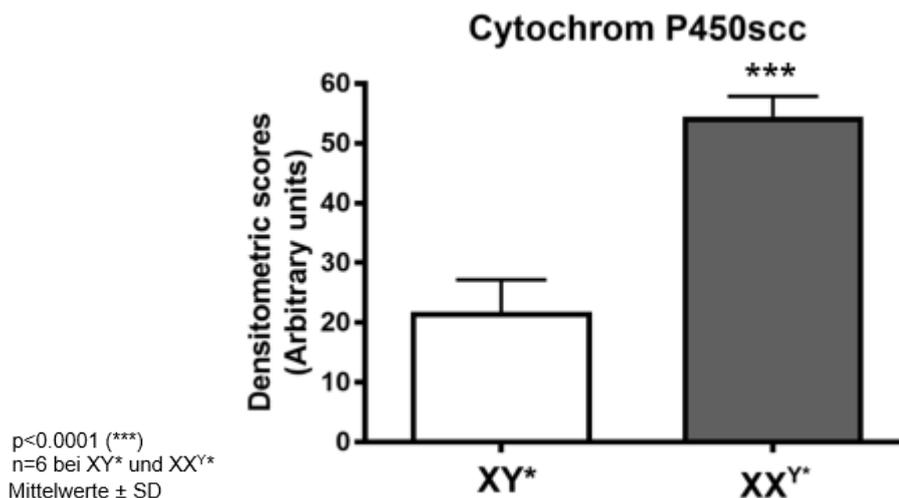


Abb. 26: **Densitometrische Quantifizierung der Cytochrom P450<sub>scc</sub>-Expression bei 40,XY\*- und der 41,XX\*Y\*-Mäusen**

Die Balken zeigen die mittleren Cytochrom P450<sub>scc</sub>-Spiegel bei beiden Maus-Karotypen. Die Sterne weisen darauf hin, dass  $p < 0.0001$  ist.

## 5 Diskussion

Die Frage, welche Pathomechanismen genau dem Keimzellschwund und der dadurch bedingten Infertilität bei Klinefelter-Syndrom-Patienten zugrunde liegen, ist nach wie vor ungeklärt. Die Vielfalt an symptomatischen Ausprägungsgraden der Betroffenen mit zahlreichen Komorbiditäten (Kanakakis et al., 2018) erschwert zudem eine Charakterisierung der Ursachen für den geringen Serum-Testosterongehalt und für die Beeinflussung der Hodenhistologie. Bislang ist lediglich die Tatsache bestätigt, dass es im Laufe der Entwicklung zu einem Untergang der Keimzellen kommt. Daher tritt die Definition eines Zeitpunktes zur Fertilitätserhaltung immer mehr in den Vordergrund. Daten zeigen, dass bei präpubertären Klinefelter-Patienten bereits sehr geringe Zahlen an Spermatogonien vorzufinden sind, sich die Keimzell-Zahlen im fetalen Alter jedoch nicht verringert darstellen und sich zu diesem Zeitpunkt außerdem noch keine Anzeichen einer Fibrose in Hodenbiopsien feststellen lassen (Van Saen et al., 2018, Heckmann et al., 2018). Diese wird besonders während der Pubertät sowie bei erwachsenen Klinefelter-Patienten manifest, sodass eine Möglichkeit der Fertilitätserhaltung darin gesehen wird, spermatogoniale Stammzellen einer Kryokonservierung zu unterziehen (Van Saen et al., 2012). Bedeutsam für das Verständnis der Erkrankung und für die Gegebenheiten, die dazu führen, dass eine „Keimzell-feindliche Umgebung“ entsteht, ist allerdings weiterhin die grundlagenwissenschaftliche Analyse des Hodens von Klinefelter-Patienten. In diesem Kontext sollte anhand der vorliegenden Arbeit das Auftreten von testikulären Gefäßveränderungen näher untersucht werden, die bereits in der Literatur sowohl innerhalb des Hodens (Tüttelmann et al., 2014, Ekerhovd et al., 2002) als auch außerhalb des Hodens (Foresta et al., 2012) beschrieben wurden.

### 5.1.1 Vorkommen größerer Gefäße in Hodenbiopsien von Klinefelter-Patienten

In der vorliegenden Arbeit wurden Hodenbiopsien von Klinefelter-Patienten mit Biopsien verglichen, die von Männern stammten, die ebenfalls infertil sind, jedoch aufgrund anderer Ursachen. Dabei wurde der Fokus auf Gefäße gesetzt und eine statistische Auswertung des Gefäßvorkommens unter Berücksichtigung zuvor definierter Gefäßtypen (differenziert anhand der Muskelschichten) vorgenommen, die zeigte, dass insbesondere Gefäße mit 3 oder mehr (definiert als Subtyp 2) Muskelschichten bei Klinefelter-Patienten wesentlich häufiger sind als bei anderen infertilen Männern. In der Literatur existieren nur wenige Arbeiten über Gefäßuntersuchungen bei Klinefelter-Syndrom-Patienten, noch weniger dieser

beziehen sich auf Gefäße des Hodens. Eine Untersuchung von Foresta et al. (2012) ergab auch Hinweise auf Gefäßveränderungen beim Klinefelter-Syndrom. Bei jener Arbeit wurden aber extratestikuläre Gefäße von Klinefelter-Patienten Gefäßen gesunder, vom Alter her angepassten Kontrollen gegenübergestellt und es zeigten sich reduzierte arterielle Gefäßdurchmesser bei Männern mit Klinefelter-Syndrom. Durchmesser der A.brachialis, A.carotis communis, A.femoralis und der Aorta abdominalis waren bei Klinefelter-Patienten alle signifikant geringer als bei der Kontrollgruppe. Jedoch ließ sich bei Betrachtung der Intima-Media-Dicke, dessen Messung zur frühzeitigen Erkennung von Arteriosklerose durchgeführt wird (Ludwig et al., 2003), kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen feststellen (Foresta et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit wurden nur intratestikuläre Gefäße untersucht und es konnte nachgewiesen werden, dass bei Klinefelter-Patienten insbesondere muskelstarke Arterien vermehrt vorkommen. Eine Aussage darüber, ob es sich im Vergleich zu der Gruppe infertiler Patienten anderer Genese um eine pathologische Verdickung der Media handelt, kann aus unseren Daten nicht direkt getroffen werden. Ein wesentlicher methodischer Unterschied ist, dass in der Arbeit von Foresta et al. (2012) Messwerte mittels Farbdoppler-Sonographie direkt am Patienten erhoben wurden, in der aktuellen Arbeit hingegen Gefäßanalysen am histologischen Biopsie-Präparat erstellt wurden, wobei der Gefäßdurchmesser nicht berücksichtigt wurde. Zudem wurden in der vorliegenden Untersuchung zwei Gruppen infertiler Männer miteinander verglichen. Wir wählten unser Studien-Design um die Frage zu klären, ob die Klinefelter-Gruppe bezüglich der testikulären Gefäße im Vergleich zu anderen infertilen Patienten ein Sonderfall ist. Insgesamt sprechen beide Studien dafür, dass bei Klinefelter-Patienten offensichtlich Gefäßveränderungen vorliegen. Dies konnte ebenfalls in einer Untersuchung am Auge durch Brand et al. (2017) dargestellt werden. Demnach liegt bei Klinefelter-Patienten an der Netzhaut des Auges eine kleinere foveale avaskuläre Zone vor, außerdem war die Gefäßdichte in den tiefen Schichten der Netzhaut im Gegensatz zu (weiblichen) Vergleichs-Patienten geringer, was als eine schlechtere Durchblutung gedeutet wurde. Aus sonographischen Untersuchungen am Hoden geht hervor, dass beim Klinefelter-Syndrom eine andere Echogenität als bei Männern ohne Spermatogenesestörung zu beobachten ist und der intratestikuläre Blutfluss einen höheren Widerstand besitzt (Ekerhovd et al., 2002). Die durch den Ultraschall diagnostizierten ungeordneten hyper- und hypoechogenen Bereiche wurden im Zusammenhang mit der abweichenden histologischen Struktur mit Charakteristika wie tubulären Fibrosierung und Leydig-Zell-Hyperplasie gesehen. Normalerweise ist

der diastolische Fluss in testikulären Arterien vorwärtsgerichtet und hoch, was einem niedrigen Gefäßwiderstand entspricht und nur der Blutfluss der supratestikulären Arterien ist unterschiedlich (Ekerovd et al., 2002). Bei Klinefelter-Patienten hingegen ist laut dieser Studie der Blutfluss der Arterien im Hoden durch einen Schwingungsverlauf mit starkem Widerstand und kurzen Peaks in der Systole gekennzeichnet, der Fluss in der Diastole ist gering. Ekerovd et al. (2002) können allerdings auch nicht festlegen, ob der veränderte Blutfluss bereits vor der Atrophie des Hodens auftritt oder ob er im Zuge dieser bzw. nachfolgend entsteht. Es wird aber vorgeschlagen, dass ein hoher Gefäßwiderstand unter Umständen negativ auf die Spermatogenese wirkt. In diesem Kontext wurde bereits durch Sonographie entdeckt, dass bei infertilen Patienten mit Azoospermie weniger intratestikuläre Gefäße vorliegen als bei Männern, bei denen operativ Spermien gewonnen werden konnten (Foresta et al., 1998). Andererseits wurde bei Klinefelter-Patienten, bei denen eine Spermengewinnung erfolgreich war, im intratestikulären Blutfluss kein Unterschied zu fertilen Kontrollen beobachtet (Westlander et al., 2001). In der Gesamtheit dieser Studien sowie der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann festgehalten werden, dass das Gefäßvorkommen im Hoden bei Klinefelter-Patienten nicht dem von gesunden Männern entspricht.

Aufgrund der im Detail nicht in allen Punkten korrespondierenden Aussagen sollten zukünftige Untersuchungen, vorzugsweise die bereits vorgestellten nicht invasiven, sonographisch gesteuerten in Ergänzung mit Untersuchungen von Probiopsien durchgeführt werden. Hilfreich wäre es dabei aber, auch komplette Hoden von Klinefelter-Patienten bei den histologischen Untersuchungen mit einzubeziehen, um differenziertere Aussagen darüber treffen zu können, inwiefern genau vaskuläre Umbauprozesse stattfinden. Darüber hinaus sollten die Ursachen der Gefäßveränderungen Gegenstand der künftigen Analysen sein.

### **5.1.2 Gefäßanalysen bei der 41,XX<sup>Y\*</sup>-Maus**

Das Gefäßvorkommen im Hoden der 41,XX<sup>Y\*</sup>-Maus wurde auch von Tüttelmann et al. (2014) untersucht. Dabei wurden Gefäßflächen in Relation zur Gesamtfläche des Hodens ausgewertet und mit den ebenso erstellten Werten von 40,XY\*-Maus-Hoden verglichen. Ergebnis dieser Untersuchung war, dass trotz Einbeziehens eines Korrekturfaktors hinsichtlich der kleineren XX<sup>Y\*</sup>-Maus-Hoden diese eine insgesamt reduzierte Gefäßfläche aufzeigen. Tüttelmann et al. (2014) argumentierten in Bezug auf die Tatsache, dass sie Gefäßanalysen nur bei Mäusen und nicht bei menschlichen Hodenbiopsien durchgeführt haben, damit, dass solche schon zum Zeitpunkt der Biopsie-Entnahme dadurch beeinflusst würden, dass man bei dieser stets versuche,

größere Gefäße aufgrund der Blutungsgefahr zu umgehen. In der vorliegenden Arbeit jedoch wurden die Biopsieflächen ohne Korrekturfaktor ausgewertet, allerdings befanden sich in der Kontroll-Patienten-Gruppe auch keine fertilen, gesunden Patienten, sondern infertile ohne Klinefelter-Syndrom. Daher kann davon ausgegangen werden, dass das Verhältnis zwischen der Fläche des Interstitiums, in dem sich hauptsächlich Gefäße befinden und den Tubuli seminiferi annähernd gleich war. Dies lässt den Gedanken zu, dass das Gefäßvorkommen beim Menschen mit Klinefelter-Syndrom ein anderes Verteilungsmuster aufweist als jenes bei der 41,XXY\*-Maus.

### **5.1.3 Nestin-Expression in Gefäßwandzellen innerhalb des humanen Hodens beim Klinefelter-Syndrom**

Bisherige Daten berichten darüber, dass Nestin-exprimierende Gefäßwandzellen im Hoden von Ratten nach Eliminierung der Leydig-Zellen entdeckt werden konnten, die als Leydig-Zell-Vorläufer angesehen wurden (Davidoff et al., 2004). Im Detail fand sich Nestin bei jener Arbeit in vaskulären glatten Muskelzellen und Perizyten. Diese Lokalisation zeigte sich auch bei Nestin-GFP-Mäusen (Davidoff et al., 2004). Ein Auftreten von Nestin im Hoden Menschen wurde bei gesunden Männern und bei an Hodentumoren erkrankten Männern auch von Lobo et al. (2004) beschrieben. Im Unterschied zu der Davidoff Arbeit sprechen Lobo et al. die Nestin-Expression den Endothelzellen, einigen peritubulären Zellen und Leydig-Zellen zu, bei Keimzell-Neoplasien außerdem den Sertoli-Zellen und hyperplastischen Leydig-Zellen. Außerdem zeigte sich, dass Nestin bei menschlichen Leydig-Stammzellen, die positiv für den P75-Neurotrophin-Rezeptor sind und zur Behandlung von Hypogonadismus vorgesehen waren, nachgewiesen werden kann (Zhang et al., 2017). Die vorliegende Arbeit zeigt auf, dass Nestin im Hoden des Menschen im Falle des Klinefelter-Syndroms in Gefäßwandzellen vorkommt. Ein Vorliegen Nestin-positiver peritubulärer Zellen und Nestin-positiver Leydig-Zellen konnte durch immunhistochemische Methoden ausgeschlossen werden. Dem Endothel im Hoden allerdings konnte bei genauerer Betrachtung in einigen Fällen eine Nestin-Färbung beigemessen werden. Das Vorkommen Nestin-positiver Gefäßwandzellen in kleineren und größeren Gefäßen, vor allem Arterien, gleichermaßen spricht dafür, dass beim Klinefelter-Patienten wahrscheinlich von vaskulären, pathologischen Umbauprozessen ausgegangen werden muss. Es wurde bereits berichtet, dass Endothelzellen und glatte Muskelzellen von Gefäßwänden des Herzens eine Nestin-Expression zeigen und dass eine Hochregulation von Nestin mit einer vaskulären Strukturveränderung und Fibrose in Zusammenhang gebracht werden kann (Calderone 2018). Durch die vorliegenden

Ergebnisse wird das unweigerliche Zusammenspiel von Nestin-Expression und erkranktem Organismus dargestellt und es kann erneut festgehalten werden, dass ein gesteigertes Nestin-Vorkommen außerhalb der Entwicklung abnorme Veränderungen, insbesondere der Gefäßstruktur, widerspiegelt.

## **5.2 Relative Nestin-Expression bei Klinefelter-Syndrom-Patienten im Vergleich zu anderen Patientenkohorten**

Vergangene Studien haben dargestellt, dass eine hohe Nestin-Expression mit vaskulärem Umbau (Saboor et al., 2016) sowie mit geringem Testosteron (Davidoff et al., 2004; Reckmann et al., 2018) in Verbindung stehen kann. Im Vergleich zu infertilen Patienten anderer Genese fand sich bei Klinefelter-Syndrom-Patienten eine höhere Zahl großer Gefäße, für die auch eine erhöhte Nestin-Expression gefunden wurde, sowie viele kleine Nestin-positive Leydig-Zell-nahe Gefäße. Während Nestin in den großen Gefäßen mit vaskulärem Umbau (Saboor et al., 2016) in Verbindung stehen dürfte, sind die Nestin-positiven Zellen kleinerer Gefäße, die bereits als Leydig-Zell-Vorläufer beschrieben wurden (Davidoff et al., 2004) als mit dem niedrigen Testosteron-Spiegel der Klinefelter-Patienten assoziiert anzusehen. Insgesamt kann die erhöhte Nestin-Expression beim Klinefelter-Syndrom somit auf die großen und kleinen Gefäße zurückgeführt werden. Über das Klinefelter-Syndrom ist als eines der Hauptcharakteristika bekannt, dass bei Betroffenen das Testosteron im Blut erniedrigt ist (Klinefelter et al., 1942; Aksglaede et al., 2006; Aksglaede et al., 2008; Forti et al., 2010). Hormonuntersuchungen bei Männern mit SCO-Syndrom haben gezeigt, dass bei diesen ein verringerter Testosteronspiegel (Lei et al., 2015) oder ein erhöhter (Abdalla et al., 1979) vorliegen kann. Wahrscheinlich ist in diesem Zusammenhang von Bedeutung, welche Ursachen dem SCO-Syndrom zugrunde liegen und diese können verschiedene sein, wie z.B. ein Maldenszensus testis, verschiedene Mikrodeletionen auf dem langen Arm des Y-Chromosoms oder Tumorerkrankungen (Tüttelmann et al., 2011), wobei auch ein idiopathischer Ursprung vorkommt (Aponte et al., 2013). Die der vorliegenden Arbeit zugehörigen qPCR-Untersuchungen von Hoden-cDNA drei verschiedener Patientengruppen haben nachgewiesen, dass das höchste Nestin-Expressionsniveau bei Männern mit Klinefelter-Syndrom vorliegt. Dieses ist signifikant höher als das bei SCO-Patienten anderer Genese. Eine nur geringe Nestin-Expression lässt sich bei der Kontroll-Patienten-Gruppe ohne Keimzellschädigung feststellen. Bei Zurückführen der ermittelten Nestin-Werte auf vermutliche Testosteron-Werte ist das Ergebnis mit den zuvor genannten Studien übereinstimmend, da die Klinefelter-Gruppe mit ihrem sehr niedrigen Serum-Testosteron die höchste Nestin-Expression aufzeigt.

Unter den Patienten der SCO-Gruppe anderer Genese gibt es unter Umständen auch solche, deren Serum-Testosteron nicht erniedrigt ist, daher ist die Nestin-Expression zwar höher als bei den Kontroll-Patienten, aber nicht so hoch wie bei den Klinefelter-Patienten. Bei den Kontroll-Patienten ohne Keimzellschädigung kann von normalen Testosteron-Spiegeln ausgegangen werden, demnach ist die Nestin-Expression nur gering. Dadurch, dass Klinefelter-Syndrom-Patienten durch diese Arbeit auch auf Transkriptionsebene vermehrt Nestin zugeordnet werden kann, wird abermals ersichtlich, dass Nestin bei dieser Erkrankung eine außergewöhnliche Rolle zugesprochen werden kann.

### **5.3 Nestin-Expression im Hoden des 41,XX<sup>Y\*</sup>-Maus-Modells während der postnatalen Entwicklung**

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Nestin-Expression von testikulären Gefäßwandzellen bei Mensch und Maus lässt die Schlussfolgerung zu, dass Nestin als besonderer Marker für Gefäße des Hodens angesehen werden kann, der bei pathologischen Zuständen unter Umständen Auskunft über vaskuläre Unterschiede zu gesunden Phänotypen geben kann. Das Vorkommen von Nestin in Abhängigkeit zum Leydig-Zell-Vorkommen stellt darüber hinaus eine Verbindung zwischen Nestin und Testosteronmangel her. Studien über eine Nestin-Expression im Hoden transgener 41,XX<sup>Y\*</sup>-Mäuse existierten bislang nicht. Jedoch wurden von Davidoff et al. (2004) und von Reckmann et al. (2018) Untersuchungen durchgeführt, die bestätigen, dass im normalen Hoden und Nebenhoden die Nestin-Expression bei Ratten und Mäusen während der Entwicklung hoch ist und wieder geringer wird, wenn der Testosteronspiegel im Erwachsenenalter ansteigt. Falls jedoch Leydig-Zellen massenhaft untergehen, wie beispielsweise durch das Verabreichen von EDS, so kommt es zu einem enormen Anstieg von Nestin (Davidoff et al., 2004, Reckmann et al., 2018). Unter diesen Bedingungen herrscht ein extremer Mangel an Testosteron. Demgemäß deuten die vorliegenden Ergebnisse erneut darauf hin, dass Nestin und Testosteron in einer wechselseitigen Beziehung zueinander stehen, denn für adulte 41,XX<sup>Y\*</sup>-Mäuse ist bekannt, dass sie geringe Testosteronspiegel im Serum bei signifikant höherer Leydig-Zell-Anzahl (bei 41,XX<sup>Y\*</sup>-Mäusen 5.3-fach höher als bei 40,XY<sup>\*</sup>-Mäusen) aufweisen (Wistuba et al., 2010). 41, XX<sup>Y\*</sup>-Mäuse zeigten in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu den 40,XY<sup>\*</sup>-Mäusen mehr Nestin, was durch immunhistochemische Färbungen und Western-Blot-Analysen bekräftigt werden konnte. Eine weitere Überlegung bezüglich Nestin und Leydig-Zellen bei der 41,XX<sup>Y\*</sup>-Maus, ist, dass Tiere mit dem veränderten Karyotyp eine höhere Nestin-Expression

besitzen, weil dieser Zelltyp in ausgeprägterem Maß vorliegt. Glatte Muskelzellen von Hodengefäßen, die durch eine Nestin-Expression charakterisiert werden können, sind erwiesenermaßen Vorläufer der Leydig-Zellen (Davidoff et al., 2004). Weiterhin schilderten Klein et al. (2003) in einer Untersuchung von Nestin im Pankreas, dass Zellen, die Nestin exprimieren, endokrine Inselzellen und Endothelzellen von Kapillaren im exokrinen Organabschnitt sind. In dieser Arbeit wurde zudem vorgeschlagen, dass Nestin Zellen zugehörig ist, die als Vorläufer von endokrinen Zellen angesehen werden können. So liegen mehrfache Hinweise darauf vor, dass aus Nestin-positiven Zellen Zelltypen hervorgehen können, die Hormone bilden. Daher sind Nestin-Analysen in Bezug auf Erkrankungen wie das Klinefelter-Syndrom, bei dem für den Organismus bedeutsame Hormone wie Testosteron nicht ausreichend vorhanden sind, von Interesse, da sie möglicherweise Hinweise auf Zeitpunkt und Verlauf eines gestörten Gefäß- und Leydig-Zell-Vorkommens liefern.

#### **5.4 Cytochrom P450<sub>scc</sub>-Expression im Hoden bei XX<sup>Y\*</sup>-Mäusen**

Durchgeführte Western Blot-Analysen von 41,XX<sup>Y\*</sup>- und 40,XY\*-Maus-Hoden zeigten, dass das für die Testosteronsynthese notwendige Enzym Cytochrom P450<sub>scc</sub> bei 41,XX<sup>Y\*</sup>-Mäusen stark vermehrt exprimiert wird. Dieser Befund deutet entweder darauf hin, dass bei 41,XX<sup>Y\*</sup>-Mäusen mehr Leydig-Zellen vorliegen als bei 40,XY\*-Mäusen oder aber darauf, dass die Leydig-Zellen der 41,XX<sup>Y\*</sup>-Mäuse eine gesteigerte Testosteronproduktion aufweisen. Eine Leydig-Zell-Hyperplasie ist ein bekanntes Attribut des Klinefelter-Syndroms, das auch im Maus-Modell auftritt (Lue et al., 2005; Wistuba et al., 2010a). Morphologische Auswertungen durch Zellzählung mittels optischer Dissektion bei Hodenproben von jungadulten und alten Mäusen (adult: 30-40 Wochen alt, ältere: 80-90 Wochen alt) ergaben insbesondere bei den jungadulten 41,XX<sup>Y\*</sup>-Mäusen 32-fach höhere Werte für Leydig-Zellen (Wistuba et al., 2010b). Außerdem waren Genexpressionsprofile von Leydig-Zell-Markergenen bei den XX<sup>Y\*</sup>-Mäusen 3 bis 20-fach höher (1b Wistuba et al., 2010). Dabei waren bei den postnatalen Tieren die Genmarker für fetale Leydig-Zellen weniger stark erhöht als bei den adulten Tieren jene Marker für adulte Leydig-Zellen, sodass in diesem Zusammenhang von Wistuba et al. (2010b) von einer Hyperaktivierung der Leydig-Zellen bei 41,XX<sup>Y\*</sup>-Mäusen ausgegangen worden ist. Zudem konnten Wistuba et al. (2010b) anhand von Messungen des intratestikulären Testosteron-Gehalts beider Maus-Stämme feststellen, dass diese Werte ähnlich sind, was wiederum dafür spricht, dass die viel kleineren Hoden der XX<sup>Y\*</sup>-Mäuse mit ihrer erhöhten Leydig-Zell-Zahl trotzdem fast gleich viel Testosteron wie die Hoden der XY\*-Mäuse produzieren. Unsere Cytochrom P450<sub>scc</sub>-

Ergebnisse im Western Blot deuten darauf hin, dass die Testosteronproduktion bei den 41,XX<sup>Y\*</sup>-Mäusen sogar deutlich gesteigert sein muss. In unserer Untersuchung waren es adulte Hoden, die analysiert wurden. Folgerichtig liegt eine Übereinstimmung mit den Daten von Wistuba et al. (2010b) vor, da der in der vorliegenden Arbeit aufgezeigte signifikante Expressionsunterschied von Cytochrom P450<sub>scc</sub> bei 41,XX<sup>Y\*</sup>-Maus- und 40,XY\*-Maus-Hoden im Western-Blot dazu passt, dass bei Wistuba et al. besonders die Genmarker adulter Leydig-Zellen bei 41,XX<sup>Y\*</sup>-Mäusen im Gegensatz zu 40,XY\*-Mäusen erhöht waren. Ursachen dafür, warum offenbar Leydig-Zellen bei 41,XX<sup>Y\*</sup>-Mäusen in mehr als ausreichendem Maß imstande sind, die Synthese von Testosteron durchzuführen, aber trotzdem ein Mangel an Testosteron im Blutserum besteht (Tüttelmann et al., 2014) sind noch nicht hinreichend aufgedeckt worden. Vergleichbaren Studien beim Menschen zufolge (Belli et al., 2017) könnte eine metabolisch verursachte, reduzierte 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Aktivität dafür verantwortlich sein. Weiterführende Untersuchungen sollten allerdings herausstellen, ob metabolische Ursachen dadurch bedingt sein können, dass vaskuläre Störungen, wie sie in der vorliegenden Arbeit beim Menschen aufgezeigt wurden, einen entscheidenden Faktor der Pathogenese darstellen.

### **5.5 Gegenüberstellung des XX<sup>Y\*</sup>-Maus-Modells mit dem Klinefelter-Syndrom beim Menschen im Hinblick auf Gefäßvorkommen und peritubuläre Zellschicht**

Unsere Daten belegen, dass im Hoden von 41,XX<sup>Y\*</sup>-Mäusen Gefäße gefunden werden können, die nicht nur SMA-positiv sind wie jene, die auch bei 40,XY\*-Mäusen nachgewiesen werden können, sondern auch Gefäße mit PCNA-positiven Zellen, von denen somit eine Proliferation ausgeht. Allerdings sind diese nie aus mehr als 2 Muskelschichten aufgebaut. Bei untersuchten Hodenbiopsien des Menschen mit Klinefelter-Syndrom hingegen konnten wir große Gefäße mit bis zu 5 Muskelschichten (definiert als Subtyp 2) beobachten. Darüber hinaus konnten wir anhand der Gefäßanalysen bei humanen Hoden von Klinefelter-Patienten im Vergleich zu Biopsien von Männern mit Infertilität anderer Genese feststellen, dass die Gefäßanzahl pro mm<sup>2</sup> Biopsiefläche bei den Klinefelter-Patienten signifikant erhöht war. Am deutlichsten waren die Unterschiede bei Gefäßtyp 2. Unter 5.1.1 wurde bereits erwähnt, dass Gefäßveränderungen beim Klinefelter-Syndrom auch außerhalb des Reproduktionstraktes vorkommen können. Bei der Untersuchung der Maus-Hoden sah man keine Veränderung der Gefäßzahl pro Hodenfläche, wobei auf eine Quantifizierung verzichtet wurde. Tüttelmann et al. (2014) sprechen in ihrer Studie sogar von einem reduzierten Gefäßbett des Hodens in Bezug auf dessen

Gesamtfläche bei 41,XX<sup>Y\*</sup>-Mäusen. Wir können bei unserer Analyse des XX<sup>Y\*</sup>-Hodens aber bislang nicht ausschließen, dass der unauffällige Eindruck der Gefäße doch eine leichte Reduktion verbirgt. Auffällig war auch, dass die Lamina propria-Verdickung, die beim Menschen in einigen Fällen sehr stark ausgeprägt war, in den Proben der 41,XX<sup>Y\*</sup>-Mäuse nur gering war. Demnach scheint eine Analogie zwischen Gefäßwanddicke und Ausprägungsgrad der Lamina propria-Verdickung zu bestehen. In der Literatur ist bekannt, dass beim Menschen ein Zusammenhang zwischen Infertilität und Veränderungen der Lamina propria besteht (Albrecht, 2009; Volkmann et al., 2011), die auch beim Klinefelter-Syndrom auftritt (Martin et al., 1992). Gefäßuntersuchungen waren aber nicht Bestandteil dieser Arbeiten. Es konnten bei 40,XY\* und 41,XX<sup>Y\*</sup>-Mäusen Tubuli seminiferi entdeckt werden, die PCNA-positive peritubuläre Zellen zeigten, jedoch waren ab Tag 10 pp diese bei den 40,XY\*-Mäusen nicht mehr vorhanden (Werler et al., 2014). Eindeutig sichtbare Anzeichen einer Lamina propria-Verdickung bei der Maus gibt es allerdings auch in der Arbeit von Werler et al. (2014) nicht. In unserer Arbeitsgruppe liegen noch Forschungsergebnisse vor, die belegen, dass eine dezente Verdickung der peritubulären Zellschicht bei 41,XX<sup>Y\*</sup>-Mäusen vorkommen kann. Diese hat jedoch nicht denselben Charakter wie die Lamina propria-Fibrose beim Menschen, sondern es zeigen sich 1-2 Schichten eher kubischer peritubulärer Zellen, die damit dicker wirken als jene bei 40,XY\*-Mäusen, mit einer dazwischenliegenden, feinen Kollagenschicht. Die Schicht der peritubulären Zellen ist vom Interstitium durch eine feine, aber deutlich sichtbare Kollagenschicht getrennt. Dennoch ist die klassische Lamina-propria-Verdickung lediglich ein Merkmal von Infertilität beim Menschen, die sich in Kombination mit größeren Gefäßen innerhalb des Hodens darstellt, wie es unsere Daten beschreiben.

## 6 Zusammenfassung

Das Klinefelter-Syndrom ist eine der häufigsten chromosomalen Aneuploidien des männlichen Geschlechts, mit dem Karyotyp 47,XXY. Betroffene zeigen neben vielen Morbiditäten kardiovaskulärer, metabolischer und kognitiver Art als Hauptmerkmal einen Hypogonadismus mit gestörter Spermatogenese und Androgenmangel.

Diese Arbeit befasst sich besonders mit Untersuchungen der Gefäßstruktur innerhalb des Hodens beim Klinefelter-Syndrom. Durch zusätzliche Analysen anhand des 41,XX<sup>Y\*</sup>-Maus-Modells, das sich für Forschungszwecke etabliert hat, konnten zudem testikuläre Veränderungen während der postnatalen Entwicklung untersucht werden. In diesem Kontext waren Untersuchungen von Nestin, einem Intermediärfilament, das vorwiegend im Nervensystem vorkommt, jedoch auch den vaskulären Leydig-Vorläuferzellen zugeordnet wurde, Hauptgegenstand dieser Arbeit.

Biopsien von Männern mit Klinefelter-Syndrom zeigten eine im Gegensatz zu infertilen Vergleichs-Patienten erhöhte Zahl von Gefäßen, vornehmlich von denen mit 3 oder mehr Muskelschichten. Bei diesen größeren Gefäßen und testikulären Kapillaren konnten Nestin-exprimierende Zellen identifiziert werden. In Zusammenschau mit Vorarbeiten dürfte Nestin in den größeren Gefäßen an vaskulärem Umbau beteiligt sein und in den kleineren als Marker für Progenitor-Leydig-Zellen anzusehen sein. Ein Auftreten von Nestin in den kontraktile Zellen des peritubulären Segmentes konnte durch Immunhistochemie ausgeschlossen werden.

Durch qPCR-Untersuchungen zeigte sich ergänzend, dass die testikuläre Nestin-Expression bei Klinefelter-Patienten höher ist als bei infertilen Patienten anderer Genese und fertilen Kontrollen.

In Bezug auf den zeitlichen Verlauf der Nestin-Expression in Gefäßen konnte im Maus-Hoden dargestellt werden, dass die Nestin-Lokalisation gehäuft mit dem Nachweis des Proliferationsmarkers PCNA einhergeht, wobei Nestin bei der 41,XX<sup>Y\*</sup>-Maus im Unterschied zu der 40,XY\*-Maus postnatal länger vorhanden ist. Auf Proteinebene zeigte sich im Western Blot, dass Nestin bei den 41,XX<sup>Y\*</sup>-Mäusen stärker exprimiert wird. Korrelierend damit war auch die Expression des für die Markierung von Leydig-Zellen verwendbaren Enzyms Cytochrom P450<sub>scc</sub> bei 41,XX<sup>Y\*</sup>-Mäusen stark erhöht. Dies könnte darauf hindeuten, dass trotz verringertem Serum-Testosteron wahrscheinlich ein intratestikulär erhöhter Testosteron-Gehalt vorliegt, worauf bereits andere Studien hindeuteten.

Schlussfolgernd liefert die vorliegende Dissertation erstmalig Hinweise auf die Bedeutung von Nestin beim Klinefelter-Syndrom und 41,XX<sup>Y\*</sup>-Maus-Modell und unterstützt die Hypothese einer vaskulär-metabolischen Ursache für die bis heute nicht vollständig aufgeklärte Infertilität bei einer Erkrankung, die oftmals noch viel zu spät diagnostiziert wird.

## 7 Summary

Klinefelter syndrome is one of the most common chromosomal aneuploidies of the male gender, with the karyotype 47,XXY. Beside cardiovascular, metabolic and cognitive morbidities, affected men exhibit hypogonadism with impaired spermatogenesis and androgen deficiency as key features.

This work particularly deals with investigations of the vascular structure in the testis in case of Klinefelter syndrome. Further analyses comprised the 41,XX<sup>Y\*</sup> mouse model, that was established for research. In this model testicular changes during postnatal development could be examined. The characterization of nestin expression, an intermediate filament protein that primarily occurs in the nervous system, but was also assigned to vascular Leydig cell progenitors, was the main subject of this work. Biopsies of Klinefelter syndrome patients showed an increased number of vessels, especially of those with 3 or more smooth muscle cell layers, in contrast to infertile male controls. Nestin-expressing cells could be identified in these larger vessels and also in testicular capillaries. As can be deduced by this and previous investigations, in larger vessels nestin might be involved in vascular remodeling, whereas nestin in smaller vessels might indicate Leydig cell progenitors. As shown by immunohistochemistry, Nestin staining was absent in contractile cells of the peritubular segment.

Additional qPCR results demonstrated higher testicular nestin expression in Klinefelter syndrome patients in comparison to other infertile patients and fertile controls.

Developmental studies in the mouse model revealed a co-localization of nestin and the proliferation marker PCNA. Reduction of nestin expressing cells towards adulthood was delayed in 41,XX<sup>Y\*</sup> mice compared to controls. Western Blot analyses indicated higher nestin expression in the testis of 41,XX<sup>Y\*</sup> mice. In agreement, the expression of the enzyme Cytochrome P450<sub>scc</sub>, used as marker for Leydig cells, was also higher in 41,XX<sup>Y\*</sup> mice. This data might reflect increased intratesticular testosterone (despite low serum testosterone) confirming previous findings.

For the first time this study provides evidence for a special significance of nestin in Klinefelter syndrome and the 41,XX<sup>Y\*</sup> mouse model, thereby supporting the hypothesis of a vascular-metabolic reason of the infertility in this disease.

## 8 Abkürzungsverzeichnis in alphabetischer Reihenfolge

APS	Ammoniumpersulfat
AIP	Antikörper-Inkubations-Puffer
BSA	Bovines Serumalbumin
cGKI	zyklische Guanosinmonophosphat abhängige Proteinkinase 1
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DTT	Dithiothreitol
EDS	Ethan-Dimethan-Sulfonat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
GFP	green fluorescent proteine
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormone
ISCI	intrazytoplasmatischen Spermieninjektion
LH	Luteinisierendes Hormon
LZ	Leydig-Zellen
MHC	Myosin heavy chain
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCNA	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEDF	pigment epithelium-derived factor)
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pp	post partum
RIMS	refractory index matching solution

SCO	sertoli cell only
SDS	sodium dodecyl sulfate
SMA	alpha-smooth muscle actin
SSC	spermatogoniale Stammzelle
T	Tubulus seminiferus
TBS	Tris-buffered saline
TESE	testikuläre Spermienextraktion
TS	Tubulusschatten
VEGF	vascular endothelial growth factor

## 9 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Mann mit Klinefelter-Syndrom.....	11
<b>Abb. 2:</b> Anatomischer Aufbau des Hodens.....	12
<b>Abb. 3:</b> A Die Spermatogenese. B Querschnitt eines Tubulus mit dem Keimepithel....	16
<b>Abb. 4:</b> Gefäßversorgung des Hodens: Venöse Plexus (Plexus Pampiniformis).....	18
<b>Abb. 5:</b> 41,XXY*-Maus und 40,XY*-Maus im Vergleich.....	20
<b>Abb. 6:</b> Große Gefäße (mit bis zu 5 Muskelschichten) im Hodengewebe von Klinefelter-Patienten.....	46
<b>Abb. 7:</b> Subtypen der testikulären Gefäße beim Klinefelter-Patienten.....	47,48
<b>Abb. 8:</b> Darstellung des Gefäßtyp-Vorkommens bei Klinefelter-Patienten und infertiler Vergleichsgruppe.....	49
<b>Abb. 9:</b> Clarity von humanem Hodengewebe.....	50
<b>Abb. 10:</b> Gefäße im Hoden eines Klinefelter-Patienten.....	52
<b>Abb. 11:</b> Nestin in interstitiellen und peritubulären Gefäßen beim Klinefelter-Syndrom.....	53,54
<b>Abb. 12:</b> Lokalisation von Nestin innerhalb arterieller Gefäße und Kapillaren bei unauffälligem Interstitium und bei Leydig-Zell-Hyperplasie.....	55,56
<b>Abb. 13:</b> Nestin-positive Gefäße innerhalb des Hodengewebes von Klinefelter-Patienten mit SCO-Histologie.....	57,58
<b>Abb. 14:</b> Lokalisation Nestin-positiver Kapillaren.....	59,60
<b>Abb. 15:</b> Hodengewebe von infertilen Vergleichs-Patienten mit kaum nachweisbarer Nestin Färbung.....	61,62
<b>Abb. 16:</b> Nestin-positive Gefäße im Hoden infertiler Vergleichs-Patienten.....	62
<b>Abb. 17:</b> Relative Expression von Nestin bei Klinefelter-Syndrom-Patienten, Patienten mit SCO-Syndrom und Kontroll-Patienten ohne Keimzellschädigung.....	63,64
<b>Abb. 18:</b> Postnatal erste Nestin-positive Zellen im Hoden der Maus.....	66
<b>Abb. 19:</b> Gefäße im Hoden der Maus zu den Zeitpunkten Tag 7 und Tag 14 pp.....	67

<b>Abb. 20:</b> Histologie des Hodens der XY*- und XX <sup>Y*</sup> -Maus zu Tag 14 und Tag 21 pp.....	68,69
<b>Abb. 21:</b> Zeitlicher Verlauf der vaskulären Nestin- und PCNA-Expression in Hodenbiopsien der XY*- und XX <sup>Y*</sup> -Maus.....	69
<b>Abb. 22:</b> Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen zur Darstellung der Gefäße und der Proliferation von Gefäßwandzellen und peritubulären Zellen von XY* und XX <sup>Y*</sup> Hoden.....	71-73
<b>Abb. 23:</b> Nachweis der Nestin-Expression auf Proteinebene bei adulten 40,XY*- und 41,XX <sup>Y*</sup> -Mäusen mittels Western Blot.....	74
<b>Abb. 24:</b> Densitometrische Quantifizierung der Nestin-Expression bei 40,XY*- und 41,XX <sup>Y*</sup> -Mäusen.....	75
<b>Abb. 25:</b> Nachweis der Cytochrom P450scc-Expression auf Proteinebene bei adulten 40,XY*- und 41,XX <sup>Y*</sup> -Mäusen mittels Western Blot.....	76
<b>Abb. 26:</b> Densitometrische Quantifizierung der Cytochrom P450scc-Expression bei 40,XY*- und der 41,XX <sup>Y*</sup> -Mäusen.....	76

## 10 Literaturverzeichnis

- Abdalla MI, Ibrahim II, Rizk AM, El Agouz WT, Girgis SM, Etriby AA, El Daghly R** (1979) Endocrine studies of azoospermia. I. Serum steroid levels in Sertoli cell only syndrome. *Arch Androl* 2:253-256.
- Albrecht M, Räämsch R, Köhn FM, Schwarzer JU, Mayerhofer A** (2006) Isolation and cultivation of human testicular peritubular cells: a new model for the investigation of fibrotic processes in the human testis and male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 91:1956-1960.
- Albrecht M** (2009) Insights into the nature of human testicular peritubular cells. *Ann Anat* 191:532-540.
- Aksglæde L, Wikström AM, Rajpert-De Meyts E, Dunkel L, Skakkebak NE, Juul A** (2006) Natural history of seminiferous tubule degeneration in Klinefelter syndrome. *Hum Reprod Update* 12:39-48.
- Aksglæde L, Skakkebak NE, Juul A** (2008) Abnormal sex chromosome constitution and longitudinal growth: serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, luteinizing hormone, and testosterone in 109 males with 47,XXY, 47,XYY, or sex-determining region of the Y chromosome (SRY)-positive 46,XX karyotypes. *J Clin Endocrinol Metab* 93:169-176.
- Aponte PM, Schlatt S, De Franca LR** (2013) Biotechnological approaches to the treatment of aspermatogenic men. *Clinics (Sao Paulo)* 68:157-167.
- Belli S, Santi D, Leoni E, Dall'Olio E, Fanelli F, Mezzullo M, Pelusi C, Roli L, Tagliavini S, Trenti T, Granata AR, Pagotto U, Pasquali R, Rochira V, Carani C, Simoni M** (2016) Human chorionic gonadotropin stimulation gives evidence of differences in testicular steroidogenesis in Klinefelter syndrome, as assessed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Eur J Endocrinol* 174:801-811.
- Bender BG, Linden MG, Robinson A** (1993) Neuropsychological impairment in 42 adolescents with sex chromosome abnormalities. *Am J Med Genet* 48:169-173.
- Bojesen A, Juul S, Gravholt CH** (2003) Prenatal and postnatal prevalence of Klinefelter Syndrome: A National Registry Study. *J Clin Endocrinol Metab* 88:622-626.

- Boks MPM, De Vette MHT, Sommer IE, Van Rijn S, Giltay JC, Swaab H, Kahn RS** (2007) Psychiatric morbidity and X-chromosomal origin in a Klinefelter sample. *Schizophr Res* 93:399-402.
- Bonomi M, Rochira V, Pasquali D, Balercia G, Jannini EA, Ferlin A, Klinefelter ItaliaN Group (KING)** (2017) Klinefelter syndrome (KS): genetics, clinical phenotype and hypogonadism. *J Endocrinol Invest* 40:123-134.
- Bouck N** (2002) PEDF: anti-angiogenic guardian of ocular function. *Trends Mol Med* 8:330-334.
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Brand C, Zitzmann M, Eter N, Kliesch S, Wistuba J, Alnawaiseh M, Heiduschka P** (2017) Abberant ocular architecture and function in patients with Klinefelter syndrome. *Sci Rep* 7:13130.
- Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW** (2005) Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J Mol Endocrinol* 34:597-601.
- Calderone A** (2018) The Biological Role of Nestin<sup>(+)</sup>-Cells in Physiological and Pathological Cardiovascular Remodeling. *Front Cell Dev Biol* 6:15.
- Chang S, Skakkebaek A, Gravholt CH** (2015) Klinefelter Syndrome and medical treatment: hypogonadism and beyond. *Hormones (Athens)* 14:531-548.
- Cheng F, Eriksson JE** (2017) Intermediate Filaments and the Regulation of Cell Motility during Regeneration and Wound Healing. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9 pii: a022046.
- Chung K, Wallace J, Kim SY, Kalyanasundaram S, Andalman AS, Davidson TJ, Mirzabekov JJ, Zalocusky KA, Mattis J, Denisin AK, Pak S, Bernstein H, Ramakrishnan C, Grosenick L, Gradinaru V, Deisseroth K** (2013) Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature* 497:332-337.
- Condorelli RA, Calogero AE, La Vignera S** (2013) Different profile of endothelial cell apoptosis in patients with Klinefelter's syndrome. *J Endocrinol Invest* 36:84-91.

- Christl HW** (1990) The lamina propria of vertebrate seminiferous tubules: a comparative light and electron microscopic investigation. *Andrologia* 22:85-94.
- Davidoff MS, Breucker H, Holstein AF, Seidl K** (1990) Cellular architecture of the lamina propria of human seminiferous tubules. *Cell Tissue Res* 262:253-261.
- Davidoff MS, Middendorff R, Enikolopov G, Riethmacher D, Holstein AF, Müller D** (2004) Progenitor cells of the testosterone-producing Leydig cells revealed. *J Cell Biol* 167:935-944.
- Di Mambro A, Ferlin A, De Toni L, Selice R, Caretta N, Foresta C** (2010) Endothelial progenitor cells as a new cardiovascular risk factor in Klinefelter's syndrome. *Mol Hum Reprod* 16:411-417.
- Dissemond J, Schultewolter T, Brauns TC, Goos M, Wagner SN** (2003) Venous leg ulcers in a patient with Klinefelter's syndrome and increased activity of plasminogen activator inhibitor-1. *Acta Derm Venereol* 83:149-150.
- Eichner EM, Hale DW, Hunt PA, Lee BK, Tucker PK, King TR, Epping JT, Washburn LL** (1991) The mouse Y\* chromosome involves a complex rearrangement, including interstitial positioning of the pseudoautosomal region. *Cytogenet Cell Genet* 57:221-230.
- Ekerhovd E, Westlander G** (2002) Testicular sonography in men with Klinefelter syndrome shows irregular echogenicity and blood flow of high resistance. *J Assist Reprod Genet* 19:517-522.
- Ergün S, Stingl J, Holstein AF** (1994) Segmental angioarchitecture of the testicular lobule in man. *Andrologia* 26:143-150.
- Ergün S, Stingl J, Holstein AF** (1994) Microvasculature of the human testis in correlation to Leydig cells and seminiferous tubules. *Andrologia* 26:255-262.
- Ergün S, Davidoff M, Holstein AF** (1996) Capillaries in the lamina propria of human seminiferous tubules are partly fenestrated. *Cell Tissue Res* 286:93-102.
- Ferguson-Smith MA, Lennox B, Mack WS, Stewart JS** (1957) Klinefelter's syndrome; frequency and testicular morphology in relation to nuclear sex. *Lancet* 273:167-169.

- Flørenes VA, Holm R, Myklebost O, Lendahl U, Fodstad O** (1994) Expression of the neuroectodermal intermediate filament nestin in human melanomas. *Cancer Res* 54:354-356.
- Foresta C, Garolla A, Bettella A, Ferlin A, Rossato M, Candiani F** (1998) Doppler ultrasound of the testis in azoospermic subjects as a parameter of testicular function. *Hum Reprod* 13:3090-3093.
- Foresta C, Caretta N, Palego P, Ferlin A, Zuccarello D, Lenzi A, Selice R** (2012) Reduced artery diameters in Klinefelter syndrome. *Int J Androl* 35:720-725.
- Forti G, Corona G, Vignozzi L, Krausz C, Maggi M** (2010) Klinefelter's syndrome: a clinical and therapeutical update. *Sex Dev* 4:249-258.
- Groth KA, Skakkebak A, Høst C, Gravholt CH, Bojesen A** (2013) Klinefelter Syndrome-A Clinical Update. *J Clin Endocrinol Metab* 98:20-30.
- Heckmann L, Langenstroth-Röwer D, Pock T, Wistuba J, Stukenborg JB, Zitzmann M, Kliesch S, Schlatt S, Neuhaus N** (2018) A diagnostic germ cell score for immature testicular tissue at risk of germ cell loss. *Hum Reprod* 33:636-645.
- Hedinger CE, Dhom G** (1991) *Pathologie des männlichen Genitale*. Springer (Berlin Heidelberg, Deutschland), 1. Auflage, 171.
- Holstein AF** (1999) Spermatogenese beim Menschen: Grundlagenforschung und Klinik *Ann Anat* 181:427-436.
- Holstein AF, Schulze W, Breucker H** (1994) Histopathology of Human Testicular and Epididymal Tissue (Chapter 5). In: *Male Infertility* (Hargreave T.B., eds). Springer (London, Großbritannien), 2. Auflage, 105-148.
- Holstein AF, Maekawa M, Nagano T, Davidoff MS** (1996) Myofibroblasts in the lamina propria of human seminiferous tubules are dynamic structures of heterogeneous phenotype. *Arch Histol Cytol* 59:109-125.
- Holstein AF** (2008) Männliche Geschlechtsorgane (Kapitel 8.5). In: *Anatomie, Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. Benninghoff A, Drenckhahn D, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH (München, Deutschland), 17. Auflage, 799-837.
- Høst C, Skakkebak A, Groth KA, Bojesen A** (2014) The role of hypogonadism in Klinefelter syndrome. *Asian J Androl* 16:185-191.

- Hunt PA, Worthman C, Levinson H, Stallings J, LeMaire R, Mroz K, Park C, Handel MA** (1998) Germ cell loss in the XXY male mouse: altered X-chromosome dosage affects prenatal development. *Mol Reprod Dev* 49:101-111.
- Jacobs PA, Bacino C, Hassold T, Morton NE, Keston M, Lee M** (1988) A cytogenetic study of 47,XXY males of known origin and their parents. *Ann Hum Genet* 52:319-325.
- Jacobs PA, Hassold TJ, Whittington E, Butler G, Collyer S, Keston M, Lee M** (1988) Klinefelter's syndrome: an analysis of the origin of the additional sex chromosome using molecular probes. *Ann Hum Genet* 52:93-109.
- Jezek D, Schulze W, Rogatsch H, Hittmair A** (1996) Structure of small blood vessels in the testes of infertile men. *Int J Androl* 19:299-306.
- Kanakis GA, Nieschlag E** (2018) Klinefelter syndrome: more than hypogonadism. *Metabolism*. pii: S0026-0495(18)30028-3.
- Klinefelter HF, Reifenstein EC, Albright F** (1942) Syndrome characterized by gynecomastia, aspermatogenesis, without A-Leydigism and increased excretion of follicle stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 2:615-627.
- Kompus K, Westerhausen R, Nilsson LG, Hugdahl K, Jongstra S, Berglund A, Arver S, Savic I** (2011) Deficits in inhibitory executive functions in Klinefelter (47, XXY) syndrome. *Psychiatry Res* 189:135-140.
- Kuroda N, Nakayama H, Miyazaki E, Hayashi Y, Toi M, Hiroi M, Enzan H** (2004) Distribution and role of CD34-positive stromal cells and myofibroblasts in human normal testicular stroma. *Histol Histopathol* 19:743-751.
- Lei B, Lv D, Zhou X, Zhang S, Shu F, Ding Y, Zhang Y, Mao X** (2015) Biochemical hormone parameters in seminal and blood plasma samples correlate with histopathologic properties of testicular biopsy in azoospermic patients. *Urology* 85:1074-1078.
- Lanfranco F, Kamischke A, Zitzmann M, Nieschlag E** (2004) Klinefelter's syndrome. *Lancet* 364:273-283.
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD** (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60:585-595.

- Lewejohann L, Damm OS, Luetjens CM, Hämäläinen T, Simoni M, Nieschlag E, Gromoll J, Wistuba J** (2009) Impaired recognition memory in male mice with a supernummary X chromosome. *Physiol Behav* 96:23-29.
- Linß W, Fanghänel J** (1998) *Histologie: Zytologie, Allgemeine Histologie, Mikroskopische Anatomie*. Walter de Gruyter (Berlin, Deutschland), 1. Auflage, 16.
- Lobo MV, Arenas MI, Alfonso FJ, Gomez G, Bazán E, Paíno CL, Fernández E, Fraile B, Paniagua R, Moyano A, Caso E** (2004) Nestin, a neuroectodermal stem cell marker molecule, is expressed in Leydig cells of the human testis and in some specific cell types from human testicular tumours. *Cell Tissue Res* 316:369-376.
- Ludwig M, von Petzinger-Kruthoff A, von Buquoy M, Stumpe KO** (2003) [Intima Media Thickness of the Carotid Arteries: Early Pointer to Arteriosclerosis and Therapeutic Endpoint]. *Ultraschall Med* 24:162-174.
- Lue Y, Rao PN, Sinha Hikim AP, Im M, Salameh WA, Yen PH, Wang C, Swerdloff RS** (2001) XXY male mice: an experimental model for Klinefelter syndrome. *Endocrinology* 142:1461-1470.
- Lue Y, Jentsch JD, Wang C, Rao PN, Sinha Hikim AP, Salameh W, Swerdloff RS** (2005) XXY mice exhibit gonadal and behavioral phenotypes similar to Klinefelter syndrome. *Endocrinology* 146:4148-4154.
- MacDonald M, Hassold T, Harvey J, Wang LH, Morton NE, Jacobs P** (1994) The origin of 47,XXY and 47,XXX aneuploidy: heterogeneous mechanisms and role of aberrant recombination. *Hum Mol Genet* 3:1365-1371.
- Martin R, Santamaría L, Nistal M, Fraile B, Paniagua R** (1992) The peritubular myofibroblasts in the testes from normal men and men with Klinefelter's syndrome. A quantitative, ultrastructural, and immunohistochemical study. *J Pathol* 168:59-66.
- McArdle CA, Roberson MS** (2015) Gonadotropes and Gonadotropin-Releasing Hormone Signaling (Chapter 10). In: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Plant TM, Zeleznik AJ, Albertini DF, Goodman RL, Herbison AE, McCarthy MM, Muglia LJ, Richards JS, Elsevier (Boston, USA), 4. Auflage, 335-337.

- Mesa H, Gilles S, Smith S, Dachel S, Larson W, Manivel JC** (2015) The mystery of the vanishing Reinke crystals. *Hum Pathol* 46:600-606.
- Müller D, Hida B, Guidone G, Speth RC, Michurina TV, Enikolopov G, Middendorff R** (2009) Expression of guanylyl cyclase (GC)-A and GC-B during brain development: evidence for a role of GC-B in perinatal neurogenesis. *Endocrinology* 150:5520-5529.
- Nieschlag E, Behre H** (2009) *Andrologie Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. Springer (Heidelberg, Deutschland), 3. Auflage, 35.
- Nogueira AB, Nogueira AB, Costa AL, Lima FR, Siqueira SA, Teixeira MJ** (2015) Hepatocellular carcinoma may display elevated nestin expression in endothelial cells: experimental study. *Sao Paulo Med J* 133:135-140.
- Nowak A, Grzegorzolka J, Paprocka M, Piotrowska A, Rys J, Matkowski R, Dziegiel P** (2017) Nestin-positive microvessel density is an independent prognostic factor in breast cancer. *Int J Oncol* 51:668-676.
- Pasquali D, Arcopinto M, Renzullo A, Rotondi M, Accardo G, Salzano A, Esposito D, Saldamarco L, Isidori AM, Marra AM, Ruvolo A, Napoli R, Bossone E, Lenzi A, Baliga RR, Sacca L, Cittadini A** (2013) Cardiovascular abnormalities in Klinefelter syndrome. *Int J Cardiol* 168:754-759.
- Reckmann AN, Tomczyk CU, Davidoff MS, Michurina TV, Arnhold S, Müller D, Mietens A, Middendorff R** (2018) Nestin in the epididymis is expressed in vascular wall cells and is regulated during postnatal development and in case of testosterone deficiency. *PLoS One* 13:e0194585.
- Regadera J, Nistal M, Paniagua R** (1985) Testis, epididymis, and spermatic cord in elderly men. Correlation of angiographic and histologic studies with systemic arteriosclerosis. *Arch Pathol Lab Med* 109:663-667.
- Rey RA, Nagle CA, Chemes H** (1996) Morphometric study of the testicular interstitial tissue of the monkey *Cebus apella* during postnatal development. *Tissue Cell* 28:31-42.
- Saboor F, Reckmann AN, Tomczyk CU, Peters DM, Weismann N, Kaschtanow A, Schermuly RT, Michurina TV, Enikolopov G, Müller D, Mietens A, Middendorff R** (2016) Nestin-expressing vascular wall cells drive development of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 47:876-888.

- Salzano A, Arcopinto M, Marra AM, Bobbio E, Esposito D, Accardo G, Giallauria F, Bossone E, Vigorito C, Lenzi A, Pasquali D, Isidori AM, Cittadini A** (2016) Klinefelter syndrome, cardiovascular system, and thromboembolic disease: review of literature and clinical perspectives. *Eur J Endocrinol* 175:R27-R40.
- Schiebler TH, Korf HW** (2007) Abdomen und Pelvis (Kapitel 11). In: *Anatomie Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*. Steinkopff Springer (Heidelberg, Deutschland), 10. Auflage, 440.
- Schmidt-Lucke C, Rössig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kämper U, Dimmeler S, Zeiher AM** (2005) Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation* 111:2981-2987.
- Simpson JL, de la Cruz F, Swerdloff RS, Samango-Sprouse C, Skakkebaek NE, Graham JM Jr, Hassold T, Aylstock M, Meyer-Bahlburg HF, Willard HF, Hall JG, Salameh W, Boone K, Staessen C, Geschwind D, Giedd J, Dobs AS, Rogol A, Brinton B, Paulsen CA** (2003) Klinefelter syndrome: expanding the phenotype and identifying new research directions. *Genet Med* 5:460-468.
- Soerensen RR, Johannsen TH, Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E** (2016) Leydig cell clustering and Reinke crystal distribution in relation to hormonal function in adult patients with testicular dysgenesis syndrome (TDS) including cryptorchidism. *Hormones (Athens)* 15:518-526.
- Sulser H, Hedinger C** (1970) Tubulusveränderungen der Hoden bei über 50jährigen Patienten mit sexchromatinpositivem Klinefelter-Syndrom. *Virchows Arch A Pathol Pathol Anat* 350:1-8.
- Takaba H** (1990) [A morphological study of the testes in patients with idiopathic male infertility--immunohistochemical analysis of collagens and laminin in human testes]. *Hinyokika Kiyo* 36:1173-1180.
- Terling C, Rass A, Mitsiadis TA, Fried K, Lendahl U, Wroblewski J.** (1995) Expression of the intermediate filament nestin during rodent tooth development. *Int J Dev Biol* 39:947-956.

- Thoenes W** (1966) Ueber matrixreiche Riesenmitochondrien. Elektronenmikroskopische Beobachtungen am Tubulusepithel der menschlichen Niere bei nephrotischem Syndrom. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 75:422-433.
- Tung PS, Fritz IB** (1990) Characterization of rat testicular peritubular myoid cells in culture: alpha-smooth muscle isoactin is a specific differentiation marker. *Biol Reprod* 42:351-365.
- Tüttelmann F, Werny F, Cooper TG, Kliesch S, Simoni M, Nieschlag E** (2011) Clinical experience with azoospermia: aetiology and chances for spermatozoa detection upon biopsy. *Int J Androl* 34:291-298.
- Tüttelmann F, Damm OS, Luetjens CM, Baldi M, Zitzmann M, Kliesch S, Nieschlag E, Gromoll J, Wistuba J, Simoni M** (2014) Intratesticular testosterone is increased in men with Klinefelter syndrome and may not be released into the bloodstream owing to altered testicular vascularization– a preliminary report. *Andrology* 2:275-281.
- Tsujimura T, Makiishi-Shimobayashi C, Lundkvist J, Lendahl U, Nakasho K, Sugihara A, Iwasaki T, Mano M, Yamada N, Yamashita K, Toyosaka A, Terada N** (2001) Expression of the intermediate filament Nestin in gastrointestinal stromal tumors and interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol* 158:817-823.
- Valli H, Phillips BT, Orwig KE, Gassei K, Nagano MC** (2014) Spermatogonial Stem Cells and Spermatogenesis (Chapter 15). In: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Plant TM, Zeleznik AJ, Albertini DF, Goodman RL, Herbison AE, McCarthy MM, Muglia LJ, Richards JS, Elsevier (Boston, USA), 4. Auflage, 595-596.
- Van Saen D, Gies I, De Schepper J, Tournaye H, Goossens E** (2012) Can pubertal boys with Klinefelter syndrome benefit from spermatogonial stem cell banking? *Hum Reprod* 27:323-330.
- Van Saen D, Vloeberghs V, Gies I, Mateizel I, Sermon K, De Schepper J, Tournaye H, Goossens E** (2018) When does germ cell loss and fibrosis occur in patients with Klinefelter syndrome? *Hum Reprod* 33:1009-1022.
- Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S** (2001) Number and migratory activity of circulating endothelial

progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 89:e1-e7.

**Virtanen I, Kallajoki M, Närvänen O, Paranko J, Thornell LE, Miettinen M, Lehto VP** (1986) Peritubular myoid cells of human and rat testis are smooth muscle cells that contain desmin-type intermediate filaments. *Anat Rec* 215:10-20.

**Volkman J, Müller D, Feuerstacke C, Kliesch S, Bergmann M, Mühlfeld C, Middendorff R.** (2011) Disturbed spermatogenesis associated with thickened lamina propria of seminiferous tubules is not caused by dedifferentiation of myofibroblasts. *Hum Reprod* 26:1450-1461.

**Welter H, Kampfer C, Lauf S, Feil R, Schwarzer JU, Köhn FM, Mayerhofer A** (2013) Partial loss of contractile marker proteins in human testicular peritubular cells in infertility patients. *Andrology* 1:318-324.

**Werler S, Demond H, Damm OS, Ehmcke J, Middendorff R, Gromoll J, Wistuba J** (2014) Germ cell loss is associated with fading Lin28a expression in a mouse model for Klinefelter's syndrome. *Reproduction* 147:253-264.

**Westlander G, Ekerhovd E, Granberg S, Hanson L, Hanson C, Bergh C** (2001) Testicular ultrasonography and extended chromosome analysis in men with nonmosaic Klinefelter syndrome: A prospective study of possible predictive factors for successful sperm recovery. *Fertil Steril* 75:1102-1105.

**Wikström AM, Raivio T, Hadziselimovic F, Wikström S, Tuuri T, Dunkel L** (2004) Klinefelter Syndrome in Adolescence: Onset of Puberty Is Associated with Accelerated Germ Cell Depletion. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2263-2270.

**Wikström AM, Dunkel L** (2011) Klinefelter syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 25:239-250.

**Windschüttl S, Kampfer C, Mayer C, Flenkenthaler F, Fröhlich T, Schwarzer JU, Köhn FM, Urbanski H, Arnold GJ, Mayerhofer A** (2015) Human testicular peritubular cells secrete pigment epithelium-derived factor (PEDF), which may be responsible for the avascularity of the seminiferous tubules. *Sci Rep* 5:12820.

**1a Wistuba J** (2010) Animal models for Klinefelter's syndrome and their relevance for the clinic. *Mol Hum Reprod* 16:375-385.

- 1b Wistuba J, Luetjens CM, Stukenborg JB, Poplinski A, Werler S, Dittmann M, Damm OS, Hämäläinen T, Simoni M, Gromoll J** (2010) Male 41, XXY\* mice as a model for klinefelter syndrome: hyperactivation of leydig cells. *Endocrinology* 151:2898-2910.
- Yang B, Treweek JB, Kulkarni RP, Deverman BE, Chen CK, Lubeck E, Shah S, Cai L, Gradinaru V** (2014) Single-cell phenotyping within transparent intact tissue through whole-body clearing. *Cell* 158:945-958.
- Yokoo H, Singh SK, Hawasli AH** (1978) Giant mitochondria in alcoholic liver disease. *Arch Pathol Lab Med* 102:213-214.
- Youngblood GL, Sartorius C, Taylor BA, Payne AH** (1991) Isolation, characterization, and chromosomal mapping of mouse P450 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase. *Genomics* 10:270-275.
- Zhang M, Wang J, Deng C, Jiang MH, Feng X, Xia K, Li W, Lai X, Xiao H, Ge RS, Gao Y, Xiang AP** (2017) Transplanted human p75-positive stem Leydig cells replace disrupted Leydig cells for testosterone production. *Cell Death Dis* 8:e3123.

## 11 Erklärung zur Dissertation

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

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## 12 Danksagung

An erster Stelle gilt mein herzlicher Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Ralf Middendorff für das Ermöglichen dieser Arbeit und seine perfekte Betreuung. Von Beginn an bis zur Fertigstellung hat er mich stets motivierend unterstützt. Beeindruckend war vor allem sein Wissen in vielerlei Fragestellungen und seine uneingeschränkte Erreichbarkeit auch nachdem ich Gießen verlassen habe.

Bei allen Mitarbeitern der AG Signaltransduktion möchte ich mich ebenfalls bedanken, besonders bei Sabine Tasch, die bei Fragen rund um die Laborarbeit immer ein offenes Ohr hatte und mir tatkräftig und geduldig zur Seite stand. Bei Daniela Beyer bedanke ich mich vielmals für ihre Unterstützung bei den statistischen Auswertungen. Vielen lieben Dank auch an Ingrid Schneider-Hüther, die mich eingearbeitet hat und an Andrea, Ansgar, André, Robert, Chrissi, Claudia, Thorben, Mathias und Vera für eure Hilfsbereitschaft und vielen Anregungen zu meinen Versuchen. Ich habe mich in der AG wirklich sehr wohl gefühlt!

Dr. Dieter Müller danke ich für seine freundliche und kompetente Hilfe bei den Western Blot-Analysen.

Einen weiteren Dank möchte ich an das Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie Münster aussprechen, vor allem an Dr. Joachim Wistuba für das Bereitstellen des Maus-Materials und Cristin Brand für die Organisation des Austauschs.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Dr. Daniela Fietz und Prof. Dr. Martin Bergmann, die mir das humane Untersuchungsmaterial zur Verfügung gestellt haben.

Prof. Dr. Hans-Christian Schuppe, Prof. Dr. Klaus Steger sowie Tania Bloch, Barbara Fröhlich und Kerstin Wilhelm danke ich ebenfalls für die Mensch-Proben.

Abschließend ein großes Dankeschön an meine liebe Familie und meine Freunde. Aus der tollen Zeit mit euch konnte ich immer wieder Kraft und Motivation schöpfen.