

**Untersuchungen zur Expression von Connexin (Cx)43  
und Connexin (Cx)45 in Sertoli Zellen und Keimzellen  
in der normalen Spermatogenese, Sertoli Zelltumoren  
und Seminomen des Hundes**

**CHRISTINA RÜTTINGER**



**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

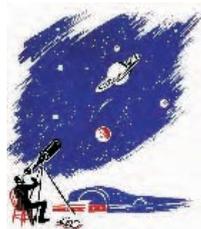
Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

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

Betreuer: Prof. Dr. M. Bergmann

**Untersuchungen zur Expression von Connexin (Cx)43 und  
Connexin (Cx)45 in Sertoli Zellen und Keimzellen in der  
normalen Spermatogenese, Sertoli Zelltumoren und  
Seminomen des Hundes**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**CHRISTINA RÜTTINGER**

Tierärztin aus Simmern

Gießen 2008

gefördert durch die Justus-Liebig-Universität, Gießen

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Bergmann

2. Gutachter: Prof. Dr. G. Schuler

Tag der Disputation: 02. Juni 2008

Meiner Familie



<b>1</b>	<b>EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNGEN .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Histologie des Hodens und normale Spermatogenese.....</b>	<b>3</b>
2.1.1	Aufbau der Samenkanälchen (Tubuli seminiferi) .....	3
2.1.1.1	Keimzellen .....	3
2.1.1.2	Sertoli Zellen .....	4
2.1.1.2.1	Differenzierung der Sertoli Zellen .....	4
2.1.1.2.2	Regulation der Differenzierung und Proliferation der Sertoli Zellen .....	5
2.1.1.2.3	Funktionen und Eigenschaften terminal differenzierter, adulter Sertoli Zellen.....	6
2.1.1.2.4	Differenzierungsmarker der Sertoli Zellen .....	8
2.1.1.2.5	Morphologische Veränderungen der Sertoli Zelle .....	10
2.1.2	Aufbau des Interstitiums .....	10
<b>2.2</b>	<b>Störungen der Spermatogenese.....</b>	<b>10</b>
2.2.1	Hodentumore .....	11
2.2.1.1	Das Mehrstufenmodell der Kanzerogenese.....	11
2.2.1.1.1	Humane Hodentumore .....	12
2.2.1.1.2	Canine Hodentumore.....	13
<b>2.3</b>	<b>Zell-zu-Zell-Verbindungen.....</b>	<b>16</b>
2.3.1	Gap junctions (GJ) .....	16
2.3.1.1	Aufbau und Funktion der GJ .....	16
2.3.1.2	Connexone.....	18
2.3.1.3	Connexine (Cx) .....	18
2.3.1.3.1	Nomenklatur.....	18
2.3.1.3.2	Proteinstruktur und Lokalisation .....	19
2.3.1.3.3	Cx-Gene .....	20
2.3.1.3.4	Expression .....	20
2.3.1.3.5	Connexin(Cx)43 .....	21
2.3.1.3.6	Connexin(Cx)45 .....	22
2.3.1.4	Lebenszyklus der GJ .....	22
2.3.1.5	Öffnungszustand der GJ-Kanäle .....	24
2.3.1.6	„Knock-out“ und „knock-in“ Mäuse.....	26
2.3.1.7	Funktionen von GJ-Kanälen.....	29
2.3.1.8	GJ, Cx und Tumor.....	30
2.3.2	GJ und Cx im Hoden .....	32
2.3.2.1	GJ und Cx im Hoden mit normaler Spermatogenese.....	32
2.3.2.1.1	Zellspezifische Expression.....	33
2.3.2.1.2	Zeitliche Expression.....	34
2.3.2.1.3	Vertreter der Cx-Gen und Proteinfamilie im Hoden.....	35
2.3.2.2	GJ, Cx und ihre Funktion im Hoden .....	36
2.3.2.3	Cx43 im Hoden .....	36
2.3.2.4	Cx45 im Hoden .....	39
2.3.2.5	GJ und Cx im Hoden bei Störungen der Spermatogenese .....	40
2.3.2.5.1	Mensch .....	40
2.3.2.5.2	Hund.....	41

<b>3</b>	<b>ZIELE DER ARBEIT .....</b>	<b>42</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1</b>	<b>Material/Gewebe .....</b>	<b>43</b>
4.1.1	Canine Hodengewebeproben.....	43
4.1.1.1	Gewebeentnahme und Konservierung .....	43
4.1.1.2	Klinische Daten .....	43
<b>4.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>44</b>
4.2.1	Herstellung histologischer Schnittpräparate für die Immunhistochemie (IHC)...	45
4.2.1.1	Paraffinmaterial .....	45
4.2.1.1.1	Vorbemerkung.....	45
4.2.1.1.2	Fixation in Bouin'scher Lösung .....	46
4.2.1.1.3	Entwässerung der Proben .....	46
4.2.1.1.4	Einbettung der Proben .....	47
4.2.1.1.5	Beschichtung der Objektträger (OT).....	47
4.2.1.1.6	Herstellung von Paraffinschnitten .....	47
4.2.1.1.7	Hämatoxylin-Eosin (H.E.)-Färbung.....	48
4.2.1.2	Gefriermaterial .....	49
4.2.1.2.1	Vorbemerkung.....	49
4.2.1.2.2	OT.....	49
4.2.1.2.3	Aufblocken des Gewebes .....	50
4.2.1.2.4	Herstellung von Gefrierschnitten für die IHC (Immunfluoreszenz) .....	50
4.2.1.2.5	Hämatoxylin-Färbung .....	50
4.2.1.2.6	Fixation der Gefrierschnitte .....	50
4.2.2	Immunhistochemie (IHC) .....	51
4.2.2.1	Allgemeine Vorbemerkung zur IHC .....	51
4.2.2.2	Immunhistochemischer Nachweis von Sertoli Zellen (Vimentin-Färbung) an Paraffinmaterial .....	52
4.2.2.3	Androgenrezeptor-IHC an Paraffinmaterial.....	55
4.2.2.4	Cx43-IHC an Gefriermaterial.....	56
4.2.2.5	Cx45-Immunfluoreszenz (IF) an Gefriermaterial .....	58
4.2.2.5.1	Doppelfärbung Cx45-Aktin/ Cx45-Vimentin .....	59
4.2.2.6	Lichtmikroskopie und Auswertung der Immunreaktion .....	60
4.2.2.7	Fluoreszenzmikroskopie und Auswertung der Immunreaktion .....	60
4.2.3	Extraktion und Isolation von RNA und Protein aus Gefriermaterial .....	61
4.2.3.1	Allgemeine Vorbemerkung zur Extraktion und Isolation .....	61
4.2.3.2	Allgemeine Vorbereitungen .....	61
4.2.3.3	Extraktion .....	62
4.2.3.4	Isolation der RNA .....	62
4.2.3.5	Isolation der Proteine .....	64
4.2.4	Nachweis der Cx43-Expression und Cx45-Expression auf Proteinebene mittels Western Blot (WB).....	65
4.2.4.1	Allgemeine Vorbemerkung zum WB.....	65
4.2.4.2	Allgemeine Vorbereitungen .....	66
4.2.4.3	Probenvorbereitung .....	66
4.2.4.4	Gelelektrophorese.....	66
4.2.4.5	Elektroblotting.....	67
4.2.4.6	Nachweisreaktion .....	68
4.2.4.7	Dokumentation .....	71

4.2.5	Nachweis der Cx43-Expression und Cx45-Expression auf mRNA-Ebene mittels Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) .....	71
4.2.5.1	Allgemeine Vorbemerkung zur RT-PCR .....	71
4.2.5.2	RT-PCR am Hodenhomogenat .....	72
4.2.5.3	RT-PCR nach UV-LACP .....	77
4.2.5.4	Vorbereitungen .....	78
4.2.5.5	Ablauf der UV-LACP .....	78
4.2.5.6	Extraktion der RNA .....	80
4.2.5.7	RT-PCR .....	82
4.2.6	In-situ-Hybridisierung (ISH) .....	84
4.2.6.1	Allgemeine Vorbemerkungen zur ISH .....	84
4.2.6.2	Herstellung der Sonden .....	84
4.2.6.3	Cx43-ISH an Paraffinmaterial .....	91
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>96</b>
<b>5.1</b>	<b>Immunhistochemie .....</b>	<b>96</b>
5.1.1	Vimentin .....	96
5.1.1.1	Präpubertäre Hoden .....	96
5.1.1.2	Normale Spermatogenese .....	97
5.1.1.3	Sertoli Zelltumor .....	97
5.1.1.4	Seminom .....	98
5.1.2	Androgenrezeptor .....	99
5.1.2.1	Präpubertäre Hoden .....	99
5.1.2.2	Normale Spermatogenese .....	100
5.1.3	Cx43 .....	101
5.1.3.1	Präpubertärer Hoden .....	101
5.1.3.2	Normale Spermatogenese .....	102
5.1.3.3	Sertoli Zelltumor .....	103
5.1.3.4	Seminom .....	104
5.1.4	Immunfluoreszenz (IF) Cx45 .....	105
5.1.4.1	Normale Spermatogenese .....	106
<b>5.2</b>	<b>Western Blot (WB) .....</b>	<b>108</b>
5.2.1	Cx43 WB .....	108
5.2.2	Cx45 WB .....	110
<b>5.3</b>	<b>Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) .....</b>	<b>110</b>
5.3.1	Hodenhomogenat .....	111
5.3.2	UV-Laser assistierte Mikrodissektion .....	114
<b>5.4</b>	<b>In-situ-Hybridisierung (ISH) .....</b>	<b>117</b>
5.4.1	Cx43 .....	117
5.4.1.1	Präpubertäre Hoden .....	117
5.4.1.2	Normale Spermatogenese .....	118
5.4.1.3	Sertoli Zelltumor .....	119
5.4.1.4	Seminom .....	120
<b>5.5</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse für Cx43 .....</b>	<b>122</b>
<b>5.6</b>	<b>Zusammenfassung der vorläufigen Ergebnisse für Cx45 .....</b>	<b>122</b>

<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>124</b>
<b>6.1</b>	<b>Cx43 in der normalen Spermatogenese des präpubertären und adulten Hundes.....</b>	<b>124</b>
<b>6.2</b>	<b>Cx43 in caninem Sertoli Zelltumor und Seminom.....</b>	<b>127</b>
<b>6.3</b>	<b>Cx45 in der normalen Spermatogenese des adulten Hundes .....</b>	<b>132</b>
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>135</b>
<b>8</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>137</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>139</b>
<b>10</b>	<b>BEZUGSQUELLEN .....</b>	<b>169</b>
<b>10.1</b>	<b>Stoffe und Reagenzien.....</b>	<b>169</b>
<b>10.2</b>	<b>Geräte .....</b>	<b>171</b>
<b>10.3</b>	<b>Sonstiges Material .....</b>	<b>172</b>
<b>10.4</b>	<b>Software.....</b>	<b>173</b>
<b>11</b>	<b>VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>174</b>

Publikationsverzeichnis:

In die mit „\*“ markierten Veröffentlichungen sind Teile dieser Arbeit miteingegangen bzw. wurden bereits veröffentlicht:

**Artikel**

Brehm R, **Rüttinger C**, Fischer P, Gashaw I, Winterhager E, Kliesch S, Bohle RM, Steger K, Bergmann M. Transition from preinvasive carcinoma in situ to seminoma is accompanied by a reduction of connexin43 expression in Sertoli cells and germ cells. *Neoplasia* 2006; 8, 499-509.

Brehm R, Zeiler M, **Rüttinger C**, Herde K, Kibschull M, Winterhager E, Willecke K, Guillou F, Lécureuil C, Steger K, Konrad L, Biermann K, Failing K, Bergmann M. A Sertoli cell-specific knockout of connexin43 prevents initiation of spermatogenesis. *Am J Pathol* 2007; 171, 19-31.

\***Rüttinger C**, Bergmann M, Fink L, Pesch S, Seitz K, Trautmann A, Steger K, Konrad L, Brehm R. Expression of Connexin 43 in normal canine testis and canine testicular tumors. *Histochem Cell Biol* 2008, (im Druck).

**Abstracts**

Brehm R, **Rüttinger C**, Kibschull M, Winterhager E, Willecke K, Guillou F, Steger K, Bergmann M. Effects of a Sertoli cell specific knockout of the connexin43-gene on the regulation of spermatogenesis in transgenic mice using the Cre/loxP-recombination system. *Andrologia* 2005; 37, 235.

\***Rüttinger C**, Bergmann M, Pesch S, Seitz K, Trautmann A, Brehm R. Expression of different connexins in Sertoli and germ cells of normal and impaired canine spermatogenesis. *Reprod Domest Anim* 2006; 41, 30.

Brehm R, **Rüttinger C**, Kibschull M, Winterhager E, Willecke K, Guillou F, Steger K, Bergmann M. Effects of a Sertoli cell specific knockout of the connexin43-gene on the regulation of spermatogenesis in transgenic mice using the Cre/loxP-recombination system. *Reprod Domest Anim* 2006; 41, 7.

**\*Rüttinger C**, Bergmann M, Pesch S, Seitz K, Trautmann A, Brehm R. Expression of different connexins in Sertoli and germ cells of normal and impaired canine spermatogenesis. *Ital J Anat Embryol* 2006; 111, 183.

Brehm R, **Rüttinger C**, Kibschull M, Winterhager E, Willecke K, Guillou F, Steger K, Bergmann M. Effects of a Sertoli cell specific knockout of the connexin43-gene on the regulation of spermatogenesis in transgenic mice using the Cre/loxP-recombination system. *Ital J Anat Emryol* 2006; 111, 7.

**\*Rüttinger C**, Bergmann M, Pesch S, Seitz K, Trautmann A, Brehm R. Expression verschiedener Connexine in Sertoli- und Keimzellen in der normalen und gestörten Spermatogenese des Hundes. *J Reproduktionsmed Endokrinol* 2006;3, 245-246.

## 1 Einleitung und Fragestellungen

Gap junctions (GJ) sind interzelluläre Verbindungen und liegen in der Plasmamembran benachbarter Zellen. Sie sind bei adulten Säugetieren in fast allen Zelltypen normaler Gewebe zu finden, mit Ausnahme einiger weniger terminal differenzierter Zellen wie Spermien, Erythrozyten und Skelettmuskelzellen. Über GJ-Kanäle ist direkte interzelluläre Kommunikation per Diffusion von Ionen, Stoffwechselmetaboliten und sekundären Botenstoffen möglich.

Ein GJ-Kanal besteht aus zwei Halbkanälen (Connexonen), die jeweils aus sechs Proteinuntereinheiten, den sogenannten Connexinen (Cx) aufgebaut sind. Sie sind beteiligt an wichtigen Prozessen, wie der Regulation der Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Tumorgenese. Bislang wurden 21 verschiedene Cx im Menschen und 20 Vertreter dieser Familie in Nagern gefunden. Im Hund konnten bisher fünf unterschiedliche Cx detektiert werden, darunter auch Cx43 und Cx45, welche im Rahmen dieser Arbeit auf ihr Vorkommen im Hoden des Hundes untersucht wurden. Verschiedene Cx zeigen eine sich überlappende zellspezifische zeitliche und räumliche Expression. Das gleiche Cx kann in unterschiedlichen Zellen unterschiedlich reguliert sein. Die meisten Gewebe exprimieren verschiedene Cx und auch in einzelnen Zellen ist die Expression von unterschiedlichen Cx bekannt. So können zum Beispiel in caninen ventrikulären Myozyten Cx40, Cx43 und Cx45 identifiziert werden.

Im Hoden finden zwischen den unterschiedlichen Zellpopulationen verschiedene Formen der Zell-Zell-Kommunikation bzw. -Interaktion statt. Die interzelluläre Kommunikation über GJ-Kanäle spielt in diesem Organ neben parakriner und endokriner Kommunikation eine große Rolle. Testikuläre GJ und deren Cx bilden nicht nur die Grundlage der direkten Zell-Zell-Kommunikation zwischen Sertoli Zellen und zwischen Sertoli Zellen und Keimzellen, sondern sie sind über die Regulation der terminalen Differenzierung der Sertoli Zellen und über die Differenzierung und Proliferation der Keimzellen essentiell an der Regulation der Spermatogenese beteiligt. Cx43 wird von Sertoli Zellen, Spermatogonien, Spermatozyten, interstitiellen Leydig Zellen und peritubulären Zellen synthetisiert und repräsentiert das vorherrschende Cx im Hoden verschiedener Spezies.

Beim Meerschweinchen und beim Nerz konnte gezeigt werden, dass Cx43 erstmals mit Beginn der Spermatogenese und mit Bildung der funktionellen Blut-Hoden-Schranke exprimiert wird und in diesen Tierarten als pubertärer Differenzierungsmarker der Sertoli Zelle angesehen werden kann.

Veränderungen der Cx43-Expression in verschiedenen Spezies konnten mit männlicher Infertilität in Verbindung gebracht werden. Sertoli Zellen adulter Männer zeigen in Keimtubuli mit Spermatogonienarrest oder Sertoli-Cell-Only (SCO)-Syndrom, in Keimtubuli mit Carcinoma in situ (CIS) und in Sertoli Zelltumoren und Seminomen eine deutliche Reduktion oder einen Verlust der Cx43-Expression.

GJ, die Cx45 enthalten, werden ebenfalls im Hoden gebildet. Im Herzen schließen Cx43 und Cx45 sich zu heteromerischen GJ-Kanälen zusammen, wobei es assoziiert mit ventrikulären Arrhythmien zu einer Herunterregulierung von Cx43 und einer Hochregulierung von Cx45 kommt.

Es gibt bisher keine Arbeiten über die Expression von Cx und GJ im Hoden des Hundes und ihre Rolle für die Spermatogenese und bei der Entstehung testikulärer Tumore.

Im Rahmen des geplanten Forschungsprojektes sollen daher folgende Fragen geklärt werden:

1. Wird Cx43 im Hoden des präpubertären Hundes und des adulten Hundes in der normalen Spermatogenese exprimiert und wenn ja, wie ist die räumliche und zeitliche Verteilung dieses Proteins?
2. Welche Veränderungen der Cx43-Expression treten bei Sertoli Zelltumoren auf?
3. Welche Veränderungen der Cx43-Expression treten bei Keimzelltumoren auf?
4. Wird Cx45 im Hoden des adulten Hundes in der normalen Spermatogenese exprimiert und wenn ja, wo ist die Lokalisation dieses Proteins?
5. Existiert eine Co-Expression von Cx43 und Cx45 im normalen Keimepithel bzw. Hoden und wenn ja, in welchem Verteilungsmuster tritt diese auf?

Die Untersuchungen an verschiedenen Hodengeweben des Hundes erfolgten auf Proteinebene mittels Immunhistochemie (IHC) und Western Blot (WB), auf mRNA-Ebene mittels Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR), sowohl am Gesamthomogenat als auch an mittels UV-Laser-assistierter Mikrodissektion isolierten Zellen, und mittels In situ-Hybridisierung (ISH).

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Histologie des Hodens und normale Spermatogenese

Die Funktion adulter Hoden besteht zum einen in der Produktion und Bereitstellung der männlichen Keimzellen und zum anderen in der Synthese des Sexualhormons Testosteron. Die Samenzellbildung (Spermatogenese) und die Androgensynthese finden in getrennten Kompartimenten statt, die sich morphologisch und funktionell in das tubuläre Kompartiment, das aus den Samenkanälchen (Tubuli seminiferi) besteht, und das interstitielle Kompartiment (Interstitium), dem Raum zwischen den Samenkanälchen, einteilen lassen (Überblicke bei Weinbauer et al., 2000; Bergmann, 2006).

#### 2.1.1 Aufbau der Samenkanälchen (Tubuli seminiferi)

In den Samenkanälchen werden die männlichen Keimzellen gebildet. Sie bestehen aus dem innen gelegenen Keimepithel und einer äußeren Wand, der Lamina propria. Diese setzt sich aus Basalmembran, Kollagenfaserschicht und den kontraktilen peritubulären Zellen zusammen. Das Keimepithel besteht aus den somatischen Sertoli Zellen sowie den unterschiedlichen Keimzellgenerationen.

##### 2.1.1.1 Keimzellen

Die Keimzellen liegen im Keimepithel zwischen Sertoli Zellen und deren Zytoplasmaausläufern. Ihr Entwicklungszyklus mit Reifeteilung und terminaler Differenzierung zur Samenzelle verläuft von basal nach adluminal. Zu den Keimzellen zählen die peripher an der Basalmembran liegenden Stammzellen (Spermatogonien), die man in Typ A und Typ B Spermatogonie unterscheidet, die lumenwärts folgenden primären und sekundären Spermatozyten sowie die lumennahen runden und schließlich ausdifferenzierten elongierten Spermatischen (Spermatozoen). Die Differenzierung der zunächst runden Spermatische bis zum fertigen Spermium (Spermatozoon) bezeichnet man als sogenannte Spermio-genese. Diese wird in vier Phasen unterteilt: Golgiphase, Kappenphase, Akrosomenphase und Reifungsphase. Während diesen findet die Kondensation des Zellkerns,

die Akrosomenbildung und die Ausbildung der Geißel statt (Weinbauer et al., 2000; Bergmann, 2006; Wrobel und Bergmann, 2006).

Charakteristische Keimzelloassoziationen, die sich in einem histologischen Schnitt unterscheiden lassen, werden als „Stadien der Spermatogenese“ bezeichnet. Sie kommen bei verschiedenen Tierarten und dem Menschen in unterschiedlicher Anzahl vor. Man unterscheidet beim Hund 8 und beim Menschen 6 Stadien (Clermont, 1963; Russell et al., 1990). Die sequentielle Abfolge der einzelnen Stadien im Verlauf eines Keimtubulus bezeichnet man als „Welle der Spermatogenese“, die Dauer dieser Welle als „Zyklus des Keimepithels“ (Übersicht bei Bergmann, 2006).

#### 2.1.1.2 Sertoli Zellen

Die somatischen Sertoli Zellen sitzen auf der Basalmembran auf und reichen bis zum Lumen des Keimtubulus. Entlang ihres Zellkörpers, der sich über die gesamte Höhe des Keimepithels erstreckt, verlaufen die morphologische und physiologische Differenzierung und Reifung der Keimzellen bis zu Spermatozoen. Ihr großer ellipsoider und euchromatischer Zellkern liegt im basalen Drittel der Zelle und besitzt bei differenzierten Zellen tiefe Einkerbungen und einen deutlichen Nucleolus. Das Sertoli Zellzytoplasma umschließt mit lappen- und fingerförmigen Fortsätzen allseitig die Keimzellen, mit Ausnahme der basalen Stammzellen. Sertoli Zellen werden deshalb auch als das Stützgerüst des Keimepithels angesehen (Bergmann, 2006).

##### 2.1.1.2.1 Differenzierung der Sertoli Zellen

Das erste histologische Zeichen der testikulären Differenzierung innerhalb der indifferenten Gonadenanlage ist das Erscheinen prämordialer Sertoli Zellen. Diese stehen mit fetalen Keimzellen (Gonozyten), die in die Gonaden einwandern, von Beginn der Entwicklung an in einer engen wechselseitigen Beziehung (Griswold, 1998; Griswold und McLean, 2002).

Der Differenzierungsprozess somatischer Sertoli Zellen während ihrer fetalen, postnatalen und pubertären Entwicklung ist sehr komplex und es finden eine Vielzahl morphologischer und metabolischer Veränderungen statt (Pelliniemi et al., 1993; Gondos und Berndston, 1993; Griswold und McLean, 2006). Mit Beginn der Pubertät kommt es zur terminalen Differenzierung der Sertoli Zellen und somit unter anderem zum Ende ihrer mitotischen

Zellteilung bzw. ihrer Proliferationsphase und zur Bildung der funktionellen Blut-Hoden-Schranke in Form von „tight junctions“, „adherens junctions“ und „gap junctions“ zwischen benachbarten Sertoli Zellen im basalen Drittel des Keimepithels (Dym und Fawcett, 1970). Ihre vollständige Ausdifferenzierung und Reifung während der Pubertät ist eine wichtige Voraussetzung für den Beginn und die Aufrechterhaltung der normalen Spermatogenese, also die normale Entwicklung präpubertärer Keimstränge zu funktionellen, adulten Keimtubuli. Eine störungsfreie Spermatogenese scheint Garant dafür zu sein, dass Sertoli Zellen ihren terminalen, adulten Differenzierungszustand behalten (Steger et al., 1999b).

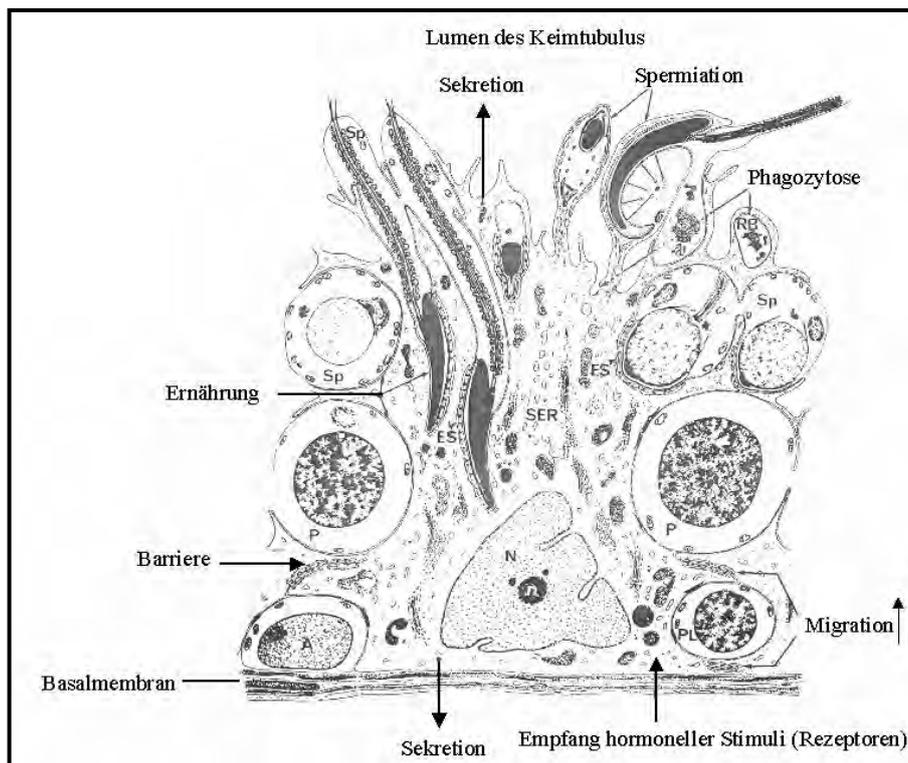
#### 2.1.1.2.2 Regulation der Differenzierung und Proliferation der Sertoli Zellen

Verschiedene Studien beschäftigen sich mit der Untersuchung chemischer Faktoren oder Signale, die an der Regulierung der Proliferation und Differenzierung von Sertoli Zellen beteiligt sind (Übersichten bei Skinner, 1993a,b; Griswold, 1993). Intra- und extratestikuläre Faktoren spielen hierbei eine bedeutende Rolle. FSH und Testosteron gehören zu den wichtigsten Hormonen, die direkten Einfluß auf die Entwicklung, Differenzierung und Reifung der Sertoli Zellen nehmen (Pelliniemi et al., 1993; Griswold, 1993; Gondos und Berndston, 1993). Auch andere Hormone, Wachstumsfaktoren, Metalloproteine, Vitamine sowie parakrine Faktoren und Zellen (Leydig Zellen, peritubuläre Zellen, Keimzellen) können auf direktem oder indirektem Wege für das Wachstum von Sertoli Zellen und den Erhalt ihrer verschiedenen Funktionen verantwortlich gemacht werden (Skinner, 1993a,b; Griswold, 1993; Griswold und McLean, 2006).

Die Proliferation der Sertoli Zellen beginnt früh in der fetalen Entwicklungsphase, erreicht dort ihren Höhepunkt, setzt sich postnatal fort und ist vor der Pubertät abgeschlossen. Das konnte z.B. an Ratten gezeigt werden. (Orth, 1982; Pelliniemi et al., 1993). Somit ist die Population der somatischen Sertoli Zellen im erwachsenen Tier festgelegt. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass eine Hemmung der Sertoli Zell Proliferation in neonatalen Ratten zu einer reduzierten Population von Sertoli Zellen, einer verringerten Anzahl von Keimzellen und damit zur Abnahme der Spermatogeneseleistung führt (Pelliniemi et al., 1993). Das Ende der Sertoli Zell Proliferation vor der Pubertät wurde auch in anderen Spezies nachgewiesen. Bei der Maus endet die Proliferationsphase am zwölften Tag nach der Geburt (Kluin et al., 1984). Terminal differenzierte Sertoli Zellen in normalem adulten Keimepithel teilen sich nicht mehr, d.h. sie sind mitotisch inaktiv. Die Proliferationsaktivität der postmitotischen, adulten Sertoli Zelle kann somit als präpubertärer Marker verwendet werden.

### 2.1.1.2.3 Funktionen und Eigenschaften terminal differenzierter, adulter Sertoli Zellen

Bei der adulten Sertoli Zelle handelt es sich um eine multifunktionelle Zelle. Die wichtigsten Funktionen (Bildung der Blut-Hoden-Schranke, Sekretion und Ernährung der Keimzellen, Phagozytose, Spermiation und endokrinen Aufgaben) werden im folgenden kurz zusammengefasst (Clermont, 1993; Gondos und Berndson, 1993; Sinowatz, 1999) (Abb. 1).



**Abb. 1:** Keimepithel des Hodens mit Sertoli Zelle und Keimzellen sowie verschiedener Sertoli Zellfunktionen (modifiziert nach Clermont, 1993)

#### a. Bildung der Blut-Hoden-Schranke

Benachbarte Sertoli Zellen sind in ihrem basalen Drittel durch komplexe Interzellularkontakte aus Zonulae occludentes bzw. „tight junctions“, Aktinfilamenten und Zisternen des endoplasmatischen Retikulum eng miteinander verbunden und unterteilen das Keimepithel in ein basales und ein adluminales Kompartiment. Diese Zell-zu-Zell-Verbindungen verschließen den Interzellularspalt vollständig und bilden die sogenannten Blut-Hoden-Schranke. Diese bildet eine effektive Diffusionsbarriere zwischen dem basalen Kompartiment des Keimepithels, in dem sich Spermato gonien und präleptotäne Spermatozyten I befinden, und dem adluminalen Kompartiment, mit den weiter fortgeschrittenen Keimzellstadien der

Meiose und Spermio-genese. Da die Keimzellen im Verlauf der Meiose und Spermio-genese an der Zellmembran neue Oberflächenantigene exprimieren, dient die Blut-Hoden-Schranke als immunologische Barriere, durch die der Stofftransport im interzellulären Raum zum adluminalen Kompartiment stark eingeschränkt wird. Sie stellt somit sicher, dass die Keimzellen vor möglichen Autoimmunreaktionen des Körpers geschützt sind.

b. Stützfunktion, Ernährung der Keimzellen, Sekretion

Die somatischen Sertoli Zellen durchziehen das gesamte Keimepithel von der Basalmembran bis zum Lumen des Tubulus. Ihre seitlichen Fortsätze füllen die Räume zwischen den Keimzellen vollständig aus. Somit übernehmen sie als Stützzellen eine rein mechanische Aufgabe, indem sie als Gerüst der Stabilität der Keimzellen im Keimepithel dienen. Die zahlreichen Zell-Zell-Kontakte unterstützen diese Funktion. Sertoli Zellen stellen in erster Linie FSH- und testosteronsensitive „Ammenzellen“ der Spermato-genese dar. In diesem Zusammenhang stehen sie zum Steroidstoffwechsel und zu interstitiellen Leydig Zellen in enger Beziehung. Außer den Spermato-gonien, die der Basalmembran der Keimtubuli noch aufsitzen können, sind alle anderen Keimzellpopulationen von Sertoli Zellen umgeben. Sertoli Zellen produzieren und sezernieren eine intratubuläre Flüssigkeit, die sich in ihrer Zusammensetzung vom Blutplasma unterscheidet und bilden somit ein spezielles Mikromilieu für die Entwicklung der Keimzellen im adluminalen Kompartiment. Die Versorgung der Keimzellen des adluminalen Kompartiment erfolgt durch selektiven Transport oder durch Eigensynthese und vektorielle Sekretion.

c. Übertragung hormoneller Stimuli auf die Keimzellen

Die pulsatile Sekretion des im Hypothalamus gebildeten Gonadotropin Releasing Hormons (GnRH) bewirkt die Freisetzung der Gonadotropine Luteinisierendes Hormon (LH) und Follikelstimulierendes Hormon (FSH) aus der Adeno-hypophyse. LH bewirkt in den interstitiell gelegenen Leydig-Zellen die Sekretion von Testosteron. FSH wirkt auf die Sertoli Zellen. Die Wirkung des FSH auf die Sertoli Zellen führt zusammen mit der Wirkung des Testosterons aus den Leydig Zellen über den kernständigen Androgenrezeptor zu einer Stimulation der Spermato-genese (Böckers et al., 1994). Der kernständige Androgenrezeptor wird von somatischen Sertoli Zellen, Leydig Zellen und peritubulären Zellen, nicht aber von Keimzellen exprimiert (Rajpert-DeMeyts und Skakkebaek, 1992; Suarez-Quian et al., 1999; Regadera et al., 2001). Man nimmt daher an, dass hormonelle Stimuli über parakrine Mechanismen der somatischen Zellen auf die Keimzellen übertragen werden.

d. Phagozytose

Sertoli Zellen besitzen absorptive Fähigkeiten. Sie phagozytieren vor allem im Verlauf der Spermiogenese anfallende Residualkörper bzw. Zytoplasmareste der Spermatozyten, sowie degenerierende Spermatozyten und Spermatozoen, die sie mit Hilfe lysosomaler Enzyme abbauen.

e. Spermiation

Die periodische Freisetzung der zunächst noch durch spezielle Zellverbindungen an der Sertoli Zelle gebundenen Spermien in das Tubuluslumen wird als Spermiation bezeichnet. Die Auflösung dieser Verbindungen zwischen Spermatozoen bzw. Spermien und Sertoli Zellen scheint unter aktiver Mitwirkung der Sertoli Zellen abzulaufen (Russell, 1993a,b).

2.1.1.2.4 Differenzierungsmarker der Sertoli Zellen

**2.1.1.2.4.1 Vimentin**

Wie in zahlreichen Studien gezeigt, können Intermediärfilamente als zellspezifische Marker für normales und tumorös verändertes Gewebe und als Marker der Zelldifferenzierung eingesetzt werden. Weiterhin werden sie zur Identifikation des Ursprungs von Zellen oder von Geweben verwendet (Franke et al., 1982; Osborn und Weber, 1983; Peters et al., 2001). Das Intermediärfilament Vimentin wird überwiegend von Zellen mesenchymalen Ursprungs exprimiert. Humane Sertoli Zellen exprimieren während ihrer Entwicklung verschiedene Intermediärfilamente, unter anderem Vimentin. Es ist das vorherrschende Intermediärfilament und wird im Zytoplasma von präpubertären bis hin zu terminal differenzierten adulten Sertoli Zellen stetig exprimiert. (Franke et al., 1979; Aumüller et al., 1988; Aumüller et al., 1992; Rogatsch et al., 1996; Steger et al., 1996). In normalen, adulten und terminal differenzierten Sertoli Zellen ist es das einzige nachweisbare Intermediärfilament. Zudem wird Vimentin in interstitiellen Leydig Zellen und peritubulären Zellen nachgewiesen (Davidoff et al., 1990; Steger et al., 1994; Peters et al., 2001).

Sertoli Zellen humaner und caniner Sertoli Zelltumore exprimieren Vimentin (Nielsen und Jacobsen, 1988; Sasano et al., 1992; McCluggage et al., 1998; Peters et al., 2001; Brehm et al., 2006a). Im Hoden des Hundes werden Antikörper gegen Vimentin immunhistochemisch eingesetzt, um in komplexen histologischen Fällen Sertoli Zelltumore zu identifizieren (Peters

et al., 2001; 2003). Manche Sertoli Zelltumore zeigen histologisch Bereiche, die der Morphologie von Seminomen gleichen. Außerdem treten Sertoli Zelltumore und Seminome im gleichen Hoden oftmals ohne klare histologisch zu erkennende Begrenzung auf. Antikörper gegen Vimentin färben Sertoli Zellen und Leydig Zellen, aber keine Keimzellen und werden daher zur Unterscheidung zwischen Sertoli Zelltumoren und Seminomen verwandt (Patnaik und Mostofi, 1993). Zum Vorkommen von Vimentin in peritubulären Zellen des caninen Hodens mit normaler Spermatogenese gibt es bisher keine Studien.

#### **2.1.1.2.4.2 Androgenrezeptor**

Der Androgenrezeptor gehört zur Familie der Kernrezeptoren. Er bindet spezifisch Testosteron und Dihydrotestosteron. Die erste bekannte Funktion des Androgenrezeptors war die Liganden-abhängige Regulation der Gentranskription von für die männliche pubertäre Entwicklung und Fertilität wichtigen Zielgenen (Chang et al., 1988; Collins et al., 2003). Die nukleäre Expression des Androgenrezeptors ist eine Eigenschaft maturer Sertoli Zellen in verschiedenen Spezies wie zum Beispiel Mensch und Marmoset-Affe (Suarez-Quian et al., 1999; Sharpe et al., 2003) und konnte zudem auch in Leydig Zellen, peritubulären Zellen und glatten Gefäßmuskelzellen des Hodens gezeigt werden (Ruizeveld de Winter et al., 1991; Zhou et al., 2002). Dennoch fällt die Androgenrezeptor-Expression nicht genau mit der endgültigen Reifung der Sertoli Zellen in der Pubertät zusammen, sondern tritt bereits präpubertär auf (Al-Attar et al., 1997; Rajpert-DeMeyts et al., 1999; Chemes et al., 2005). Sertoli Zellen von Mensch, Ratte und Marmoset zeigen keine Expression während der fetalen und frühen neonatalen Periode (McKinnell et. al., 2001; Williams et al., 2001; Sharpe et al., 2003) und Störungen der Sertoli Zellreifung können mit fehlender oder schwacher Androgenrezeptor-Expression assoziiert werden (Regadera et al., 2001). Androgenrezeptor-mRNA konnte in caninen Hoden mit normaler Spermatogenese und verschiedenen caninen Hodentumoren mittels RT-PCR (Peters et al., 2003) und auf mRNA- und Proteinebene in caniner Prostata mittels RT-PCR und Immunhistochemie nachgewiesen werden (Lu et al., 2001).

#### 2.1.1.2.5 Morphologische Veränderungen der Sertoli Zelle

Zahlreiche morphologische Veränderungen der Sertoli Zellen zu Beginn der Pubertät geben Hinweise auf deren Differenzierungszustand. Dazu gehören die Zunahme der Zellgröße mit Ausbildung der stadienspezifischen hochprismatischen Zellform, die Ausbildung zytoplasmatischer Fortsätze, die Verschiebung des Zellkerns von luminal nach basal bzw. intermediär und die Dreiteilung des Nucleolus (Nistal und Paniagua, 1983; Gondos und Berndston, 1993; Kerr et al., 2006). Der oberhalb der Spermatogonien lokalisierte Zellkern vergrößert sich, seine Membran zeigt eine bis mehrere Einfaltungen und seine Form ändert sich von rund-oval zu ovoid-dreieckig (Hadziselimovic, 1977; Nistal und Paniagua, 1983; Bruning et al., 1993). Somit kann die Struktur der Zellkerne von Sertoli Zellen als morphologischer Differenzierungsmarker bei normaler und gestörter Spermatogenese verwendet werden.

#### 2.1.2 Aufbau des Interstitiums

Im Interstitium befinden sich die Testosteron produzierenden und sezernierenden Leydig Zellen, lockeres Bindegewebe, Zellen des Immunsystems, Blutgefäße, Nerven und Lymphgefäße (Weinbauer et al., 2000; Sinowatz, 1999).

### 2.2 Störungen der Spermatogenese

Spermatogenesestörungen führen zu einer sowohl qualitativ als auch quantitativ verminderten oder gar fehlenden Produktion von Samenzellen. Dabei unterscheidet man zwischen prätestikulären und testikulären Ursachen. Störungen der Hormonproduktion und/oder – ausschüttung im Hypothalamus-/Hypophysenbereich zählen zu den prätestikulären Ursachen und resultieren in einer Unterfunktion der Hormonproduktion der Hoden, bedingt durch fehlende LH und FSH-Ausschüttung. Störungen der Spermatogenese, die ihre Ursache primär im Hoden selbst haben und dort morphologische Defekte verursachen zeigen verschiedene Krankheitsbilder und können sowohl angeboren als auch erworben sein (Übersichten bei Krause, 1998; Nieschlag, 2000). Dazu zählen unter anderem die Hodentumore.

## 2.2.1 Hodentumore

### 2.2.1.1 Das Mehrstufenmodell der Kanzerogenese

Die Kanzerogenese bzw. Karzinogenese ist ein komplexer Vorgang, die bei Mensch und Tier die gleichen Mechanismen aufweist und auch auf Hodentumore übertragbar ist (Damjanov, 1991; Reinacher, 2002). Man unterscheidet bei der Kanzerogenese drei Phasen: Initiation, Promotion und Progression.

Bei der Transformation zu einer Tumorzelle durchläuft eine Zelle verschiedene Übergangsstadien, bis schließlich durch die schrittweise Ansammlung genetischer Defekte die endgültig malignen Eigenschaften erreicht werden. Eine Überstimulation durch Wachstumshormone oder die verminderte Aktivität von inhibitorischen Faktoren, wie z.B. der Tumorsuppressorgene (z.B. p53-Gen) können mögliche Auslöser einer Transformation sein.

Der erste Schritt der Kanzerogenese wird als Initiation bezeichnet und findet meist in einem kleinen Anteil der Zellen des exponierten Organs statt. Die Phase der Initiation ist irreversibel und kann mit Mutationen (z.B. in Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen) einhergehen. Initiierte Zellen können in einem Ruhezustand verbleiben oder durch klonales Wachstum proliferieren. Die klonale Expansion kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden, die Auswirkungen auf die Kanzerogenese haben. So werden tumorfördernde Faktoren als Promotoren, hemmende als Anti-Karzinogene bezeichnet. Promotoren beeinflussen die Genregulation durch wiederholte oder fortwährende Stimulation. Eine erfolgreiche klonale Expansion und mitogene Prozesse erhöhen die Wahrscheinlichkeit, dass initiierte Zellen eine zweite, spezifische Wandlung erfahren.

Aus den resultierenden Zellen kann sich wiederum ein neuer Zellklon entwickeln, der häufig einen selektiven Wachstumsvorteil aufweist. Somit können nach und nach neue Eigenschaften entstehen, wie z.B. die Fähigkeit zur Metastasierung. Promotoren sind für ihre Wirkung auf das Vorhandensein initiiertes Zellen angewiesen. Sie alleine führen nicht zur Tumorentstehung. Unter Promotion versteht man somit einen Prozeß, der nach erfolgter Initiation die Entstehung eines Tumors verstärkt oder beschleunigt.

Unter der Progression eines Tumors versteht man schließlich irreversible Veränderungen einer oder mehrerer seiner Charakteristika. Bezeichnend für die Tumorprogression ist oftmals

ein zunehmend aggressives Verhalten des Tumors bei gleichzeitiger Abnahme spezifischer Differenzierungsmerkmale und Funktionen. Die Progression bezeichnet somit die Umwandlung von durch Initiation und Promotion entstandenen „gutartigen“ Geschwülsten in bösartig wuchernde Tumore. Diese zeichnen sich durch ungehemmtes Zellwachstum, erhöhte Invasivität und die Fähigkeit zur Metastasenbildung aus (Misdorp, 2000).

#### 2.2.1.1.1 Humane Hodentumore

Die häufigste maligne Erkrankung bei Männern zwischen dem 20. bis 45. Lebensjahr ist der Hodentumor (Nicholson und Harland, 1995). In den westlichen Industrieländern ist die Inzidenz von Hodentumoren in den letzten Jahren deutlich gestiegen (Adami et al., 1994; Moller, 1998). Das Risiko, an einem Hodentumor zu erkranken, ist insbesondere bei Männern mit einem Maldescensus testis (Giwerzman et al., 1987), kontralateralem Hodentumor (Berthelsen et al., 1979; von der Maase et al., 1986) und Gonadendysgenesien (Müller et al., 1985) erhöht.

Keimzelltumore übernehmen mit ihrem Anteil von 90 % aller Hodentumore des Mannes die wichtigste Rolle im Hinblick auf ihre Häufigkeit und Malignität. Als Seminom bezeichnet man Tumore, die aus weitgehend uniformen Zellen mit hellem Zytoplasma und deutlichen Zellgrenzen bestehen. Charakteristisch für diese Tumorform ist eine wechselnd starke lymphozytäre Infiltration (Mostofi und Sobin, 1977). Seminome sind in der Gruppe der Keimzelltumore am häufigsten vertreten. Mit Ausnahme des spermatozytären Seminoms stammen die humanen Keimzelltumore (Seminome und Nicht-Seminome) von einer gemeinsamen präinvasiven Läsion, dem Carcinoma in situ (CIS) ab (Berthelsen und Skakkebaek, 1981; Dieckmann et al., 1993). Diese wird synonym als Testikuläre intraepitheliale Neoplasie (TIN) bezeichnet (Loy und Dieckmann, 1990).

Sertoli Zelltumore gehören zur Gruppe der Keimstrang- bzw. Stromatumoren. Sie kommen beim Mann sehr selten vor (ca. 1 % der humanen testikulären Neoplasien) und können mit einer Gynäkomastie einhergehen (Mostofi und Price, 1973; Nielsen und Jacobsen, 1988; Young et al., 1998). Diese Tumorform tritt am häufigsten im Alter zwischen 40 und 50 auf (Nielsen und Jacobsen, 1988; Young et al., 1998).

Sertoli Zelltumore sind größtenteils gutartig, ca. 10 % der Tumore zeigen eine maligne Entartung. Die histologische Unterscheidung der beiden Formen ist schwierig, das eindeutige Kriterium für die bösartige Form stellt der Nachweis von Metastasen dar (Talerman, 1971).

Charakteristisches histologisches Erscheinungsbild der gutartigen humanen Sertoli Zelltumore ist häufig der Erhalt tubulärer Strukturen. In diesen sind Zellen zu erkennen, die das Aussehen von Sertoli Zellen sowohl des adulten als auch des präpubertären Typs haben (Collins und Symington, 1964). Die Histologie benigner Sertoli Zelltumore des Menschen erinnert an den Aufbau eines undifferenzierten Hodens mit präpubertären Keimsträngen (Nielsen und Jacobsen, 1988). Bei malignen Sertoli Zelltumoren zeigt sich histologisch dagegen häufig das Bild einer anaplastischen Proliferation. Die tubulären Strukturen sind aufgelöst, diffuses Wachstum atypischer Zellen mit polymorphen Zellkernen sowie vermehrte mitotische Aktivität treten auf (Terayama et al., 1998). Die Ätiologie und Pathogenese humaner Sertoli Zelltumore ist noch weitgehend unbekannt.

#### 2.2.1.1.2 Canine Hodentumore

Testikuläre Neoplasien kommen beim Hund, verglichen mit anderen Spezies und dem Menschen, sehr häufig vor (Reifinger, 1988; Grootenhuis et al., 1990). Hodentumore haben einen Anteil von 5-15 % an den Tumoren männlicher Hunde (Theilen und Madwell, 1987; Grootenhuis et al., 1990; O'Keefe, 1995). Mit ungefähr gleicher Häufigkeit treten Sertoli Zelltumore, Seminome und Leydig Zelltumore auf (Cotchin, 1960; Nielsen und Lein, 1974; Hayes und Pendergrass, 1976; Nieto et al., 1989; Nielsen und Kennedy, 1990; Kennedy et al., 1998; Köhler und Reinacher, 2000). Kombinationen dieser Tumortypen in einem Hoden sind möglich (Peters et al., 2000) und auch das Auftreten von Neoplasien in beiden Hoden ist nicht ungewöhnlich. Metastasen sind bei caninen Hodentumoren selten (Nielsen und Lein, 1974; Peters and Van Sluijs, 1996). Ein wichtiger prädisponierender Faktor für die Ausbildung testikulärer Neoplasien ist der Kryptorchismus. Bei diesen intraabdominalen Hoden erhöht sich das Risiko zur tumorösen Entartung im Mittel verschiedener Tumoren annähernd um den Faktor 14 (Hayes und Pendergrass, 1976; Prange et al., 1987; Kennedy et al., 1998). Das Auftreten von Hodentumoren steigt beim Rüden mit zunehmendem Alter an und das Durchschnittsalter liegt für alle genannten Tumorformen zwischen 9 und 11 Jahren (Cotchin, 1960; Kennedy et al., 1998; Peters et al., 2000).

Canine Hodentumore werden nach der histologischen Klassifikation und Nomenklatur der Hodentumore der World Health Organisation (WHO) nach Nielsen und Lein (1974) eingeteilt und beurteilt (Tabelle 2):

**Tabelle 1:** Ausschnitt aus der WHO-Klassifikation der Hodentumore (modifiziert nach Nielsen und Lein, 1974)

<b>1. Keimzelltumore</b>	
1.1 Seminom	- <i>intratubulär, mit und ohne Invasion</i> - <i>diffuser Typ</i>
1.2 Embryonales Karzinom	
1.3 Teratom	
<b>2. Keimleisten- und Gonadenstromatumore</b>	
2.1 Sertoli Zelltumor	- <i>intratubulär, mit und ohne Invasion/Infiltration</i> - <i>diffuser Typ (selten bei Hund)</i>
2.2 Leydig Zelltumor	- <i>solid-diffuser Typ</i> - <i>zystisch-vaskulärer Typ</i> - <i>pseudoadenomatöser Typ</i>
2.3 Tumore mit intermediärer Sertoli- und Leydig Zelldifferenzierung	

#### 2.2.1.1.2.1 Sertoli Zelltumor

Sertoli Zelltumore entstehen häufig in kryptorchiden, atrophischen Hoden. Histologisch zeigen sich lange, schlanke Zellen mit undeutlichen Zellgrenzen, die oft palisadenartig senkrecht zur Basalmembran stehen. Es finden sich auch Tubuli, in denen die basale Zellschicht palisadenartig angeordnet ist, während die übrigen adluminal gelegenen Zellen unregelmäßig geformt sind. In den Tumorzellen können Vakuolen nachgewiesen werden. Die Zellkerne der neoplastischen Sertoli Zellen sind langgestreckt und chromatinarm, mit kleinen Kernkörperchen. Im Gegensatz zum diffusen Typ sind beim intratubulären Typ noch tubuläre Strukturen zu erkennen, während der diffuse Typ nur von vaskulärem Stroma oder fibrösen Septen durchzogen wird (Nielsen and Lein, 1974; von Sandersleben et al., 1989; Nielsen and Kennedy, 1990; Kennedy et al., 1998). Häufig zeigen die neoplastischen Zellen in frühen Sertoli Zelltumoren histologische und zelluläre Eigenschaften, die an präpubertäre Sertoli Zellen erinnern (von Bomhard et al., 1978; Thilander et al., 1987; Pelliniemi et al., 1993; Chakraborty, 1993).

Die von den Sertoli Zellen abstammenden Sertoli Zelltumore zeigen üblicherweise ein langsames Wachstum und können hormonell aktiv sein. Durch eine Östrogenproduktion der

Tumorzellen treten bei ca. 30 % der betroffenen Rüden Anzeichen einer Feminisierung (z.B. Haut- und Haarveränderungen, Knochenmarksdepression, Prostataveränderungen, kontralaterale Hodenatrophie) auf (Peters und van Sluijs, 1996; Kennedy et al., 1998; Meurer et al., 2000).

Sertoli Zelltumore sind verglichen mit Seminomen langsam wachsende Neoplasien. In der Regel sind Mitosen histologisch in intratubulären Formen seltener zu finden als in Sertoli Zelltumoren vom diffusen Typ. In beiden histologischen Formen caniner und humaner Sertoli Zelltumore konnten vereinzelt proliferierende Sertoli Zellen anhand ihrer Ki-67 Expression immunhistochemisch nachgewiesen werden (Sarli et al., 1994; Benazzi et al., 1995; Kratzer et al., 1997; Brehm et al., 2006a).

#### **2.2.1.1.2.2 Seminom**

Das Seminom entwickelt sich aus den germinativen Zellen des Hodens. Ebenso wie der Sertoli Zelltumor wird es häufiger im kryptorchiden Hoden beobachtet. Histologisch zeigt sich das Bild dicht beieinander liegender, homogener Tumorzellen. Diese sind rund oder polygonal, mit großen, rundlichen, bläschenförmigen Kernen mit prominentem Kernkörperchen. Die Zellgrenzen sind deutlich, man findet häufig Mitosen und gelegentlich treten mehrkernige Riesenzellen auf. Zwischen den Tumorzellen können herdförmige Lymphozytenansammlungen nachgewiesen werden. Der diffuse Typ ist die häufigste Form der Seminome, nur die frühesten Stadien zeigen intratubuläre Struktur mit intakter Basalmembran, die jedoch schnell von den Tumorzellen durchwandert und aufgelöst wird. Anzeichen für eine hormonelle Aktivität der Seminome fehlen (Nielsen and Lein, 1974; von Sandersleben et al., 1989; Nielsen and Kennedy, 1990; Kennedy et al., 1998). Looijenga et al. (1994) kommen nach histopathologischen und molekulargenetischen Untersuchungen an Seminomen von Hunden und Menschen zu dem Ergebnis, dass das canine Seminom weniger dem klassischen, als vielmehr dem spermatozytären Seminom des Menschen entspricht.

## 2.3 Zell-zu-Zell-Verbindungen

Zellmembranen benachbarter Zellen gehen untereinander spezialisierte Verbindungen ein. Die Zwischenzellverbindungen lassen sich nach Struktur und Funktion in drei verschiedene Formen einteilen:

Der Verschlusskontakt (Zonula occludens, „tight junction“), der den Durchtritt von Stoffen zwischen Epithelzellen über den extrazellulären Spalt verhindert, die Zellhafte (Zonula adhaerens, „adherens junction“), welche über Verankerung intrazellulärer Filamente eine feste interzelluläre Verbindung sichert und der Nexus („Gap junction“), der einen direkten zellulären Stoffaustausch und damit die interzelluläre Kommunikation und Signalübertragung ermöglicht (Wolfe, 1993; Chung et al. 1999).

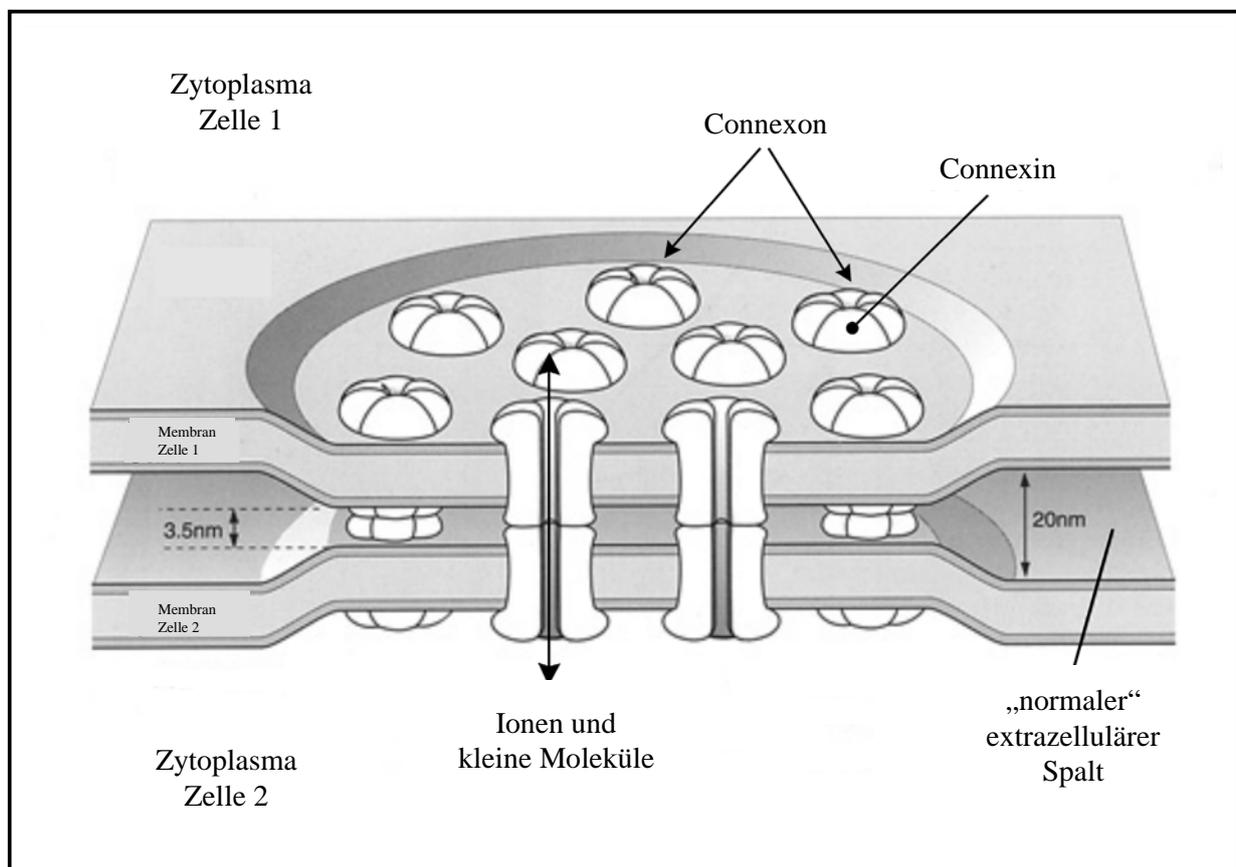
### 2.3.1 Gap junctions (GJ)

#### 2.3.1.1 Aufbau und Funktion der GJ

Gap junction Kanäle sind interzelluläre Verbindungen und liegen in der Plasmamembran benachbarter Zellen. Sie verbinden die Zytoplasmata der Zellen miteinander und ermöglichen so den direkten Austausch von Ionen und kleinen Molekülen bis zu einer relativen Molekülmasse von 1000 Da. GJ stellen durch elektrische und metabolische Kopplung die Grundlage für die direkte interzelluläre Kommunikation dar (Bennett et al., 1991; Kumar und Gilula, 1996; Cruciani und Mikalsen, 2005). Sie sind bei adulten Säugetieren in fast allen Zelltypen normaler Gewebe zu finden, mit Ausnahme weniger terminal differenzierter Zellen, wie Spermien, Erythrozyten und Skelettmuskelzellen (Loewenstein, 1981; Bruzzone et al., 1996a; Kumar und Gilula, 1996; Willecke et al., 2002; Saez et al., 2003). Gap junctions können einzeln oder in Ansammlungen von bis zu mehreren tausend auftreten. Ab einer Dichte von ca.  $10^4$  Kanälen pro  $\mu\text{m}^2$  spricht man von einem Gap junction-Plaques (Loewenstein, 1981).

Die kleinste funktionelle Einheit des GJ, die GJ-Kanäle, bestehen aus zwei Halbkanälen (Connexonen), die jeweils aus sechs Proteinuntereinheiten, den sogenannten Connexinen (Cx) aufgebaut sind. Die Cx als kleinste Einheit eines GJ-Kanals lagern sich als Transmembranproteine zu einer ringförmigen Struktur mit einer zentralen, hydrophilen Pore zusammen (Bennett et al., 1991; White et al., 1995; Bruzzone et al., 1996a). Den Austausch

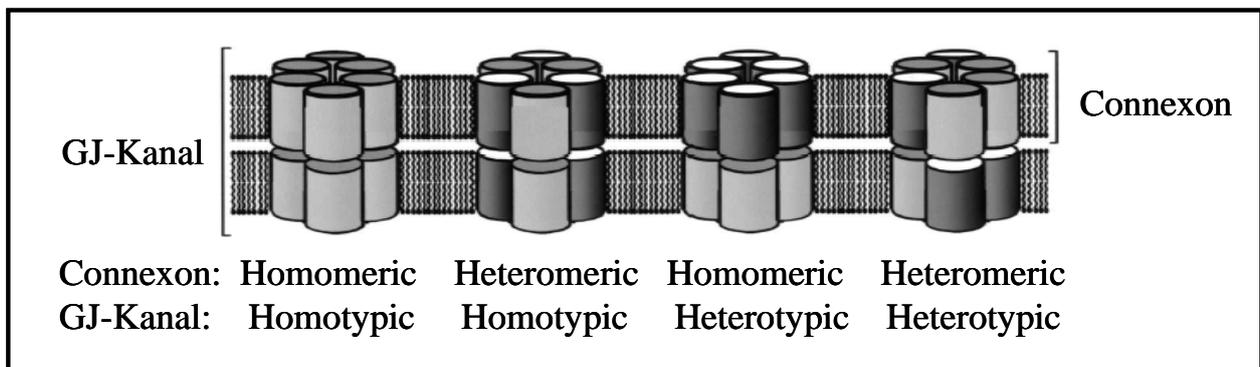
von Stoffen über GJ-Kanäle bezeichnet man als GJ-vermittelte interzelluläre Kommunikation (Trosko und Ruch, 1998). Mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse konnte die GJ-Kanalstruktur aufgedeckt werden (Makowski et al., 1977). Im Bereich eines GJ-Kanal verringern die Zellmembranen benachbarter Zellen ihren normalen Abstand von 20-30 nm auf einen kleinen Spalt („gap“) von 2-4 nm (Caspar et al., 1988) (Abb. 2). GJ-Kanäle sind beteiligt an wichtigen Prozessen wie der Regulation der Zelldifferenzierung und Zellproliferation (Bruzzone et al., 1996a; Krutovskikh und Yamasaki 1997), sowie der Tumorgenese (Yamasaki, 1990; Bennett et al., 1991). Verschiedene Subtypen von Cx zeigen eine sich überlappende, zellspezifische zeitliche und räumliche Expression (Söhl und Willecke, 2003). Bislang wurden 21 verschiedene Cx im Menschen und 20 Vertreter dieser Familie in Nagern gefunden (Söhl und Willecke, 2004).



**Abb 2:** Aufbau eines GJ-Plaques (modifiziert nach Kandel et al., 1995)

### 2.3.1.2 Connexone

Ein einzelner GJ-Kanal besteht aus zwei sich gegenüberliegenden Halbkanälen, den Connexonen. Halbkanäle, die aus sechs identischen Cx bestehen, werden als homomer bezeichnet. Connexone, die aus mehr als nur einem Cx aufgebaut sind, werden als heteromer bezeichnet. Ein GJ-Kanal wird als homotypisch bezeichnet, wenn er aus zwei identischen Connexonen besteht und wird heterotypisch genannt, wenn er aus zwei unterschiedlichen Connexonen zusammengesetzt ist (Kumar und Gilula, 1996; Willecke et al., 2002) (Abb.3). Interessanterweise bilden nur bestimmte heterotypische Connexone funktionelle GJ-Kanäle aus. So formen Connexone aus Cx43 und Cx45 permeable GJ-Kanäle, Connexone aus Cx43 und Cx32 jedoch nicht (Bruzzone et al., 1996a).



**Abb. 3:** Mögliche Kombinationen von Cx in einer GJ-Kanal-Einheit (modifiziert nach Evans und Martin 2002)

### 2.3.1.3 Connexine (Cx)

Ein Connexon besteht aus sechs Untereinheiten, den Cx. Diese bilden eine Gruppe von Transmembranproteinen mit hoher genetischer Homologie, die man zu einer multigenen Proteinfamilie zusammenfasst (Beyer et al., 1990; Bruzzone et al., 1996a).

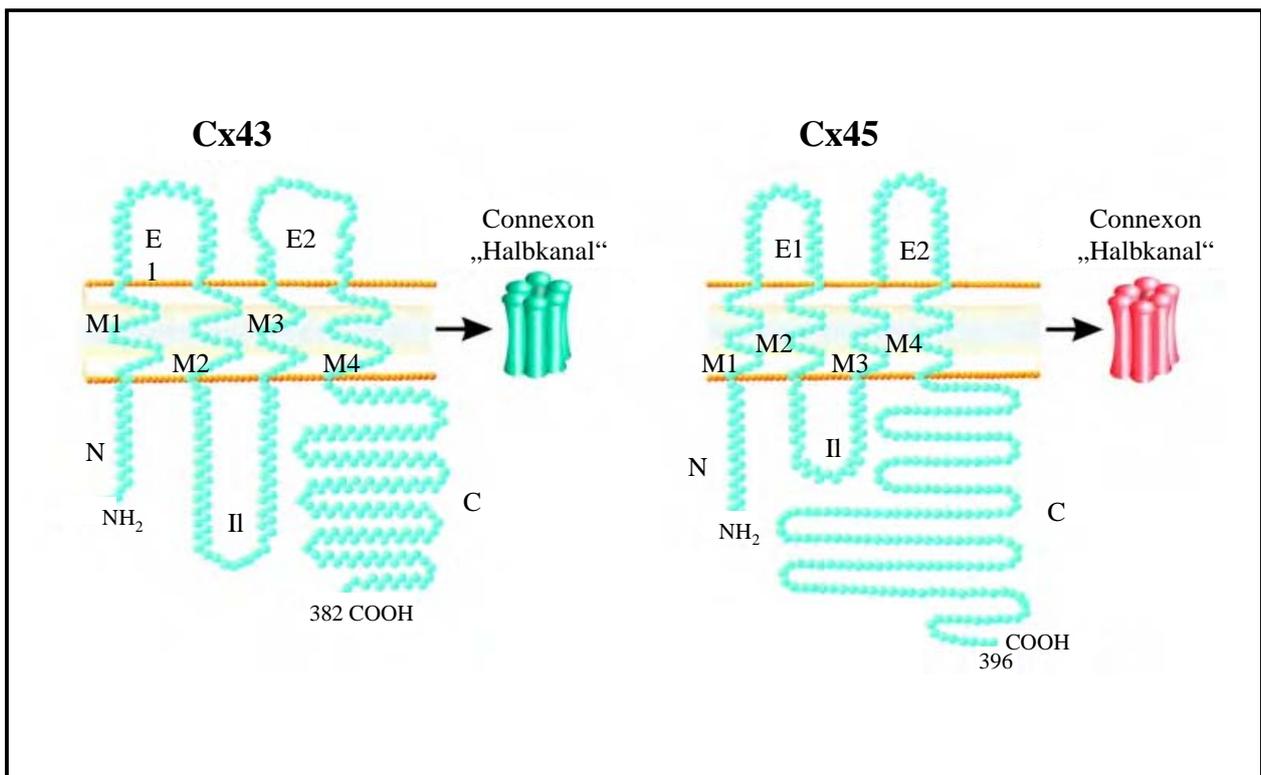
#### 2.3.1.3.1 Nomenklatur

Die Grundlage der verwendeten Cx-Nomenklatur richtet sich nach der von Beyer vorgeschlagenen Einteilung (Beyer et al., 1988). Dementsprechend setzt sich der Name eines Cx aus der Abkürzung Cx und der aus der cDNA-Sequenz abgeleiteten ungefähren relativen

Molekülmasse in kDa zusammen. So besitzt z.B. humanes Cx43 ein Molekulargewicht von 43 kDa.

### 2.3.1.3.2 Proteinstruktur und Lokalisation

Ein einzelnes Cx besteht aus vier als M1 bis M4 bezeichneten Transmembrandomänen, die durch zwei extrazelluläre Schleifen (E1 und E2) und eine intrazelluläre Schleife (II) verbunden werden, und dem Amino (N)- und Carboxy(C)-Terminus, die beide im Zytoplasma lokalisiert sind (Abb. 4). Die beiden extrazellulären Schleifen E1 und E2 sowie die Transmembrandomänen M1 bis M4 stellen die am stärksten konservierten Regionen der Cx dar. Im Gegensatz dazu weisen die zytoplasmatische Schleife und der C-Terminus die höchste Sequenzvariabilität auf. Die Ursache der Größenunterschiede der Cx liegt hauptsächlich in den verschiedenen Längen dieser Regionen des Moleküls (Bennett et al., 1991; Kumar and Gilula, 1996; Willecke et al., 2002) (Abb. 4).

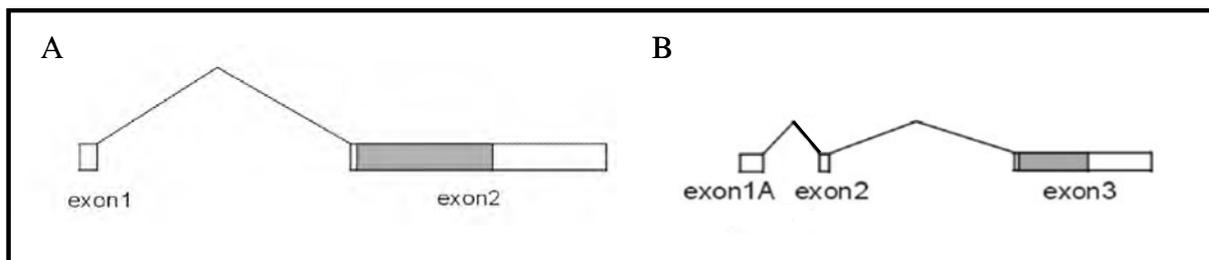


**Abb. 4:** Cx43 und Cx45 Proteinstruktur und Lokalisation in der Zellmembran (modifiziert nach Laird, 2006)

## 2.3.1.3.3 Cx-Gene

Viele Cx-Gene besitzen eine sehr große Ähnlichkeit in ihrer Struktur. Die meisten Cx-Gene bestehen aus zwei Exons, einem kurzen, untranslatierten Exon 1, dem ein Intron variabler Länge und dann das zweite größere Exon folgt, das sowohl die gesamte kodierende Sequenz als auch verbleibende nichtkodierende Sequenzen enthält (Willecke et al., 2002; Saez et al., 2003). (Abb. 5).

Bisher werden drei Ausnahmen von dieser Gen-Struktur beschrieben, Cx32, Cx36 und Cx45. Bei Cx32 kann die kodierende Sequenz gewebespezifisch unter die Kontrolle unterschiedlicher Promotoren gestellt werden (Neuhaus et al., 1996). Darüber hinaus kommt es durch alternatives Spleißen zu drei verschiedenen Transkripten, die sich in der 5'-untranslatierten Region von Exon 1 unterscheiden. Bei Cx36 beinhaltet das Exon 1 bereits einen Teil der kodierenden Sequenz. Das Cx45-Gen besteht dagegen aus drei Exons, den untranslatierten Exon 1 und Exon 2 und dem folgenden Exon 3, das die gesamte kodierende Sequenz enthält (Baldrige et al., 2001) (Abb. 5).



**Abb. 5:** Struktur von Cx Genen. **A:** Allgemeine Genstruktur (u.a. Cx43), mit untranslatiertem Exon 1, Intron variabler Länge und kodierender Sequenz (graue Markierung) auf Exon 2; **B:** Genstruktur von Cx45 mit untranslatierten Exons 1 und 2 und gesamter kodierender Sequenz auf Exon 3 (graue Markierung) (modifiziert nach Söhl und Willecke 2004).

## 2.3.1.3.4 Expression

Die verschiedenen Subtypen der Cx zeigen eine sich überlappende, zellspezifische zeitliche und räumliche Expression (Söhl und Willecke, 2003). Verschiedene Cx können wiederum unterschiedlich reguliert werden und das gleiche Cx (z.B. Cx43 oder Cx45) kann in unterschiedlichen Zellen unterschiedlich reguliert sein (Bruzzone et al., 1996a). Die meisten Gewebe exprimieren mehr als nur ein Mitglied der Cx-Familie und auch einzelne Zellen können verschiedene Cx, z.B. Cx43 und Cx45, exprimieren (Bruzzone et al., 1996a,b).

Die Cx-Expression kann sowohl auf transkriptionaler als auch auf posttranskriptionaler Ebene zellspezifisch reguliert werden. Eine Verstärkung der Transkription erfolgt durch verschiedene Stoffe, wie z.B. cAMP, Glukokortikoide, Phorbolester, auf transkriptionaler Ebene, während auf posttranskriptionaler Ebene die mRNA Stabilität verändert wird (Saez et al., 2003). Zu den Faktoren, die die Cx-Genexpression beeinflussen gehören verschiedene Hormone, wie z.B. Geschlechtshormone und auch Glukokortikoide, außerdem cAMP, Phorbolester, Retinoide, Carotinoide und Vitamin D (Mehta et al., 1992; Ren et al., 1994; Trosko und Ruch, 1998; Saez et al., 2003).

Es kann vermutet werden, dass die zeitliche und räumliche Expression eines bestimmten Cx in einer Zelle bzw. Zellpopulation des Körpers von einem spezifischen Genprogramm der Zelldifferenzierung gesteuert und koordiniert wird (Butterweck et al., 1994b; Grümmer et al., 1999). Welche Cx wo und wann von einer Zelle exprimiert werden, hängt somit von ihrem Entwicklungs- und Differenzierungszustand ab. Die Cx können daher als spezifische Differenzierungsmarker verwendet werden (Krutovskikh et al., 2000).

Es gibt Cx, die in fast allen Organen bzw. Zellen der Körpers exprimiert werden. Hierzu zählt Cx43. Es gibt jedoch auch andere Cx, wie Cx33, das bislang nur in Hoden von Mäusen und Ratten gefunden wurde. Derzeit sind zwanzig Mitglieder der Cx-Familie in der Maus bekannt und im humanen Genom hat man bisher einundzwanzig verschiedene Cx-Gene mit einem Molekulargewicht von 25 bis 57 kDa identifiziert (Söhl und Willecke, 2003). In der Genbank findet man bei der Spezies Hund fünf Cx (Cx26, Cx36, Cx40, Cx43, Cx45) (Cruciani und Mikalsen, 2005). Beim Hund wurden bisher vor allem, Cx26, Cx40, Cx43 und Cx45 in verschiedenen Organen, außer Hoden, auf mRNA und Proteinebene untersucht (Kanter et al., 1993; Kwong et al., 1998; Torres et al., 2005; Gotoh et al. 2006).

#### 2.3.1.3.5 Connexin(Cx)43

Das bisher am häufigsten vorkommende Cx in Säugetieren ist Cx43. Es ist bekannt, dass Cx43 in wenigstens 35 verschiedenen Geweben und somit über 35 Zelltypen, wie z.B. Kardiomyozyten, Keratinozyten, Astrozyten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Leydig Zellen und Sertoli Zellen verschiedener Spezies, exprimiert wird (Laird, 2006). Das Cx43-Protein wurde im Jahr 1987 zum ersten Mal von Beyer et al. in Herzmuskelzellen der Ratte beschrieben. In caninen Geweben konnte Cx43 bisher in Herzmuskelzellen (Kanter et al.,

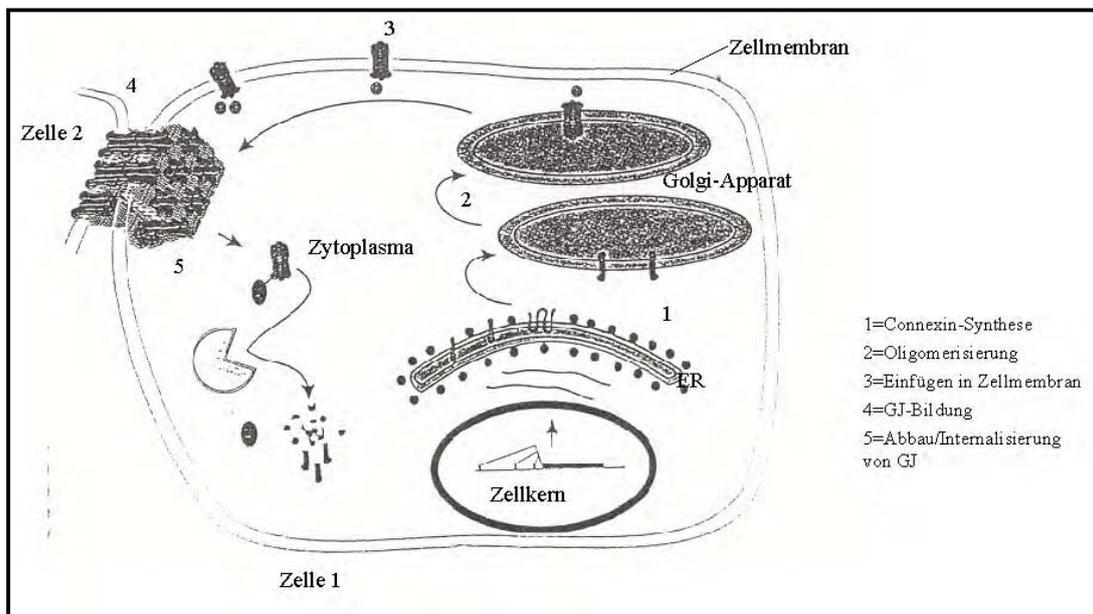
1993), in Muskelzellen des Gastrointestinaltraktes (Wang und Daniel, 2001), in Epithelzellen und mesenchymalen Zellen normaler und neoplastischer Milchdrüse (Torres et al., 2005; Gotoh et al., 2006) und in Thekazellen, Granulosazellen und Corona radiata-Zellen von Sekundärfollikeln des Ovars (Willingham-Rocky et al., 2007) detektiert werden.

#### 2.3.1.3.6 Connexin(Cx)45

Cx45 wurde bisher im Vergleich zu Cx43 in weniger Studien untersucht. Es konnte auf Proteinebene in verschiedenen Geweben von Nagern, wie Glomeruli und Tubuli der Mäuseniere (Butterweck et al., 1994a), in Zellen des Stratum basale der Haut der embryonalen Maus (Butterweck et al., 1994b), einer Osteoblasten-Zelllinie der Ratte (Steinberg et al., 1994), Granulosazellen des Rattenovars (Okuma et al., 1996), Oligodendrozyten der Ratte (Kunzelmann et al., 1997), in Zellen des tiefen Muskelplexus des Rattendünndarms (Nakamura et al., 1998), in Motoneuronen des Rattenrückenmarks (Chang, 1999), embryonalen und adulten Kardiomyozyten von Nagern (Alcoléa et al., 1999; Coppen et al., 1998; Coppen et al., 1999) und in Gefäßendothelzellen der Maus (Krüger et al., 2000) detektiert werden. Untersuchungen auf mRNA-Ebene zeigten, dass im Vergleich zu adultem Gewebe der mRNA-Gehalt in korrespondierendem embryonalen Gewebe ca. 40fach höher ist (Hennemann et al., 1992). Cx45 konnte auf Proteinebene bei Hunden bisher in Herzmuskelzellen (Kanter et al., 1992; Kanter et al., 1993), in Schrittmacherzellen des Sinusknotens (Kwong et al., 1998) und in Zellen des tiefen Muskelplexus des Dünndarms (Nakamura et al., 1998; Wang und Daniel, 2001) lokalisiert werden.

#### 2.3.1.4 Lebenszyklus der GJ

Die Bildung eines GJ-Kanals setzt sich aus mehreren Einzelschritten zusammen. (Abb. 6; Schritte 1-5) (Kumar und Gilula, 1996, Bruzzone et al., 1996a,b; Laird, 1996).



**Abb. 6:** Darstellung der verschiedenen Einzelschritte bei Bildung und Abbau von GJ-Kanälen (modifiziert nach Bruzzone et al., 1996b).

Cx werden als Monomere von Ribosomen synthetisiert, die an das ER gebunden sind (1 = Cx-Synthese). Im ER bilden die Cx ihre korrekte Struktur aus (Evans, 1994). Die Zusammenlagerung von sechs Cx zu einem Connexon (2 = Oligomerisierung) erfolgt im Gegensatz zu den meisten anderen integralen Membranproteinen nicht im ER, sondern findet erst im trans-Golgi-Netzwerk statt (Musil und Goodenough, 1993). Der Transport der gebildeten Connexone zur Zellmembran erfolgt wahrscheinlich über vom trans-Golgi-Netzwerk abgeschnürte Vesikel. Eine weitere Route des Transportes vom ER direkt zur Zellmembran scheint in einigen Zelltypen für Cx26 zu existieren. Die Oligomerisierung erfolgt in diesem Fall auf dem Weg zwischen ER und Zellmembran (Evans und Martin, 2002). Bei Ankunft der Connexone in der Plasmamembran (3 = Einfügen in die Zellmembran), bilden sie zunächst einen Pool frei diffundierender Halbkanäle, die in einen GJ-Plaque einwandern und sich mit einem Halbkanal benachbarter Zellen zu einem funktionsfähigen GJ-Kanal verbinden können (4 = GJ-Bildung). Dies geschieht durch die Ausbildung von nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen den extrazellulären Schleifen der beteiligten Cx (Manjunath et al., 1984; Unger et al., 1999). Zelladhäsionsmoleküle spielen in diesem Prozess eine wichtige Rolle (Kanno et al., 1984; Musil et al., 1990). Zum Zeitpunkt des Einbaus der Connexone in die Plasmamembran sind diese geschlossen, um den Verlust von intrazellulären Stoffen sowie den unkontrollierten Eintritt von extrazellulären Stoffen zu verhindern (Musil und Goodenough, 1991, 1993; Trosko und Ruch, 1998).

GJ-Plaques unterliegen einem dynamischen Umbau, wobei „verbrauchte“ Kanäle z.B. über Vesikel aus dem Plaque entnommen und dem Abbau zugeführt werden können (Laird, 1996). Larsen und Mitarbeiter (1979) konnten als erste annuläre GJ beobachten. Dabei handelt es sich um intrazelluläre Strukturen, die von einer Doppelmembran umgeben sind. Es wurde angenommen, dass annuläre GJ Zwischenstufen einer Internalisierung der GJ durch Endozytose und der anschließenden Verdauung durch Lysosomen darstellen (Larsen et al., 1979; Bennett et al., 1991). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Möglichkeit lysosomalen Abbaus ohne eine Beteiligung von annulären GJ besteht (Jordan et al., 2001). Weitere Untersuchungen konnten eine Beteiligung von Proteasomen als alternativen Abbauweg von Cx43 nachweisen (Laing und Beyer, 1995).

Mit der Ausnahme von Cx26 handelt es sich bei allen bekannten Cx um Phosphoproteine. Die Phosphorylierung der Cx an ihrem C-terminalen Ende ist ein wichtiger Bestandteil der Regulation des Auf- und Abbaus von GJ (Saez et al., 2003; Bruzzone et al., 1996a), der Kommunikation über GJ Kanäle während bestimmter Stadien des Zellzyklus, der Regulation des Lebenszyklus der Cx und spielt eine Rolle bei der Verbindung funktionierender GJ Kanäle (Solan und Lampe; 2005). Zudem ist bekannt, dass die Phosphorylierung die interzelluläre Kommunikation über GJ beeinflussen kann (Berthoud et al., 1993; Saez et al., 1993).

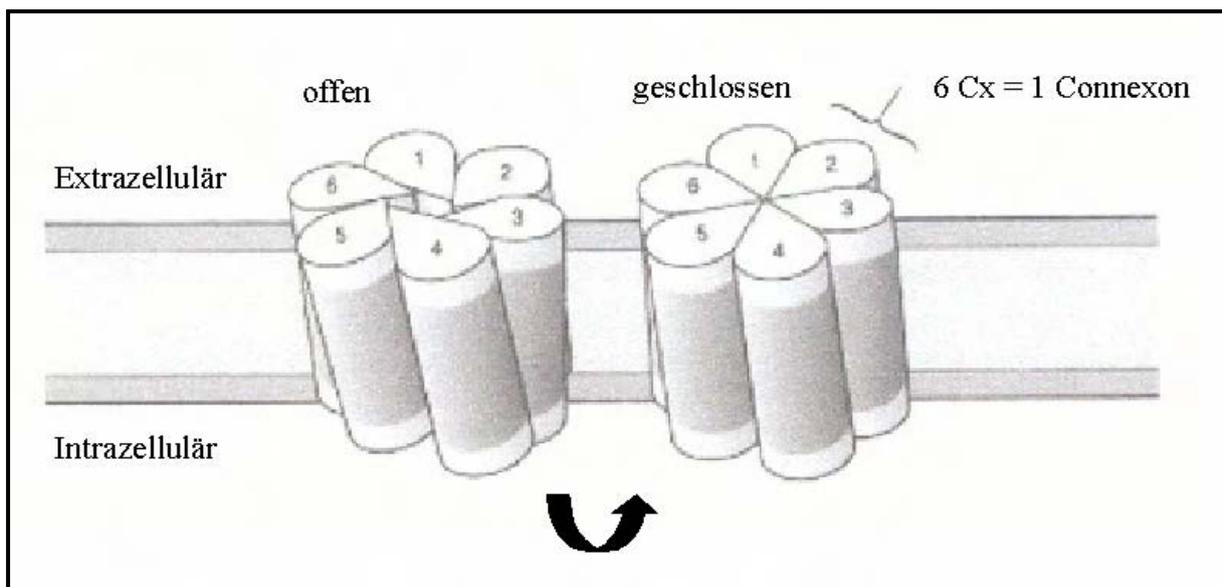
Die Phosphorylierung von Cx43 findet hauptsächlich vor dessen Eintritt in die Zellmembran statt. Darüber hinaus ist sie mit der Verschmelzung von Connexonen zu GJ-Plaques in Verbindung zu bringen (Musil und Goodenough, 1991). Gewebe- und zellspezifische Phosphorylierungsmuster von Cx43 lassen sich mit Hilfe von Western Blots durch Detektion zusätzlicher Banden nachweisen (Kadle et al., 1991; Musil und Goodenough, 1991; Laird et al., 1995). Weitere Studien haben gezeigt, dass auch Cx43 und Cx45 GJ-Kanäle durch Phosphorylierung moduliert werden können (Hertlein et al., 1998; van Veen et al., 2000).

#### 2.3.1.5 Öffnungszustand der GJ-Kanäle

Der Öffnungszustand bzw. die Öffnungswahrscheinlichkeit eines GJ-Kanals kann durch verschiedene Parameter beeinflusst werden (Bruzzone et al., 1996a). GJ-Kanäle können z.B. durch Ionen reguliert werden, für die sie permeabel sind, so z.B.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{+}$  und  $\text{H}^{+}$ . Zu hohe intrazelluläre Kalziumkonzentrationen (über  $10^{-6}$  mol/l) können zu einer Entkopplung der Zellen führen (Loewenstein, 1981; Kumar und Gilula, 1996). Die Erniedrigung des

intrazellulären pH-Wertes kann zu einem Verschluss der GJ-Kanäle führen (Saez et al., 1990; Bruzzone et al., 1996a) und viele Zweitbotenstoffe wie z.B. cAMP, IP3 und DAG können Einfluss auf die interzelluläre Kommunikation durch eine Veränderung der Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals nehmen. Diese Regulation erfolgt zumeist über die Phosphorylierung einzelner Cx-Proteine durch verschiedene Proteinkinasen, die entsprechende Abschnitte bzw. Aminosäuren im C-Terminus phosphorylieren können. Dabei gibt es jedoch erhebliche Spezies- und Gewebeunterschiede sowie Unterschiede je nach Cx-Isoform, sodass durch diese Stoffe die Kopplung sowohl gesteigert als auch verringert werden kann (Bennett et al., 1991; Bruzzone et al., 1996a,b; Dhein, 1998).

Als Mechanismus für die Regulation der GJ-Kanäle durch Öffnen und Schließen werden zwei Modelle diskutiert. Nach dem Rotationsmodell soll eine Drehung der Connexone bzw. der dritten Transmembrandomäne zu einer Änderung des Neigungswinkels der Cx führen, wobei die Kanalpore verschlossen wird (Abb. 7) (Unwin und Zampighi, 1980; Unwin und Ennis, 1983).



**Abb. 7:** Modell eines Connexons und Regulation des Öffnungszustandes nach dem Rotationsmodell (modifiziert nach Kandel et al., 1995)

Das zweite „Ball-an-der-Kette“-Modell beinhaltet den Verschluss der Kanalpore durch den C-Terminus als „Ball“, welcher an einer flexiblen Verbindungsdomäne, als Kette bezeichnet, befestigt, mit der zytoplasmatischen Schleife interagiert und so die Kanalpore wie ein Flaschenkorken verschließt (Ek et al., 1994; Ek-Vitorin, 1996; Calero et al., 1998). Beide

Modelle zur Regulation des Öffnungszustandes eines GJ-Kanals können nebeneinander realisiert werden (Barrio et al., 1997).

### 2.3.1.6 „Knock-out“ und „knock-in“ Mäuse

In den letzten Jahren sind verschiedene Cx-„knock-out“-Mäuse generiert worden, was verschiedene Störungen bzw. pathologische Zustände bei diesen Tieren zur Folge hatte (Yamasaki et al., 1999; Willecke et al., 2002). Eine der ersten Cx-„knock-out“-Mäuse bzw. Mausmutanten war die Cx43-„knock-out“-Maus. Homozygot Cx43-defiziente (-/-) Mäuse entwickelten sich bis zur Geburt normal, verstarben jedoch unmittelbar post partum. Als Ursache wurde eine Herzmißbildung festgestellt, die zur Blockierung der Pulmonalarterie und somit zum fehlenden pulmonalen Gasaustausch führte (Reaume et al., 1995). Histologische Untersuchungen an fetalen Hoden homozygoter Cx43-defizienter Mäuse haben ergeben, dass das Fehlen von Cx43 in dieser frühen Phase der Gonadenentwicklung zu Störungen der Migration und Proliferation der primordialen Keimzellen führt. Diese Tiere zeigen, verglichen mit heterozygot Cx43-defizienten Mäusen (+/-) und mit Wildtyp-Tieren (+/+), sowohl ein vermindertes Hoden- und Körpergewicht als auch eine deutliche Reduktion der Keimzellzahl ab Tag 11,5 post coitum. Somit scheint die Expression von Cx43 eine wichtige Rolle in der fetalen Entwicklung der murinen Keimzelllinie zu spielen und sein Fehlen zu Störungen in dieser frühen Phase der Hodenentwicklung beizutragen (Juneja et al., 1999).

In zwei weiteren Studien wurde, zur Untersuchung der postnatalen Gonadenentwicklung und zur Untersuchung der Leydig Zellfunktion, fetales Hodengewebe von Cx43-„knock-out“-Mäusen unter die Nierenkapsel adulter, normaler männlicher und kastrierter Mäuse transplantiert. (Roscoe et al., 2001, Kahiri et al., 2006). Fehlt die codierende Sequenz von Cx43, so findet postnatal bzw. präpubertär keine weitere Proliferation und/oder Differenzierung der verbliebenen Keimzellen statt. In den transplantierten Hoden bzw. Keimtubuli wurden histologisch 90 % weniger Keimzellen im Vergleich zu Hoden von Wildtyp-Mäusen und fast ausschließlich somatische Sertoli Zellen nachgewiesen. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass die Expression von Cx43 auch an der postnatalen Entwicklung der murinen Keimzelllinie beteiligt ist, bei der Initiierung der Spermatogenese eine wichtige Rolle spielt und sein Fehlen als eine mögliche Ursache für die Entstehung von Spermatogenesestörungen, hier dem Sertoli cell only- (SCO) Syndrom, interpretiert werden kann (Roscoe et al., 2001). Leydig Zellen, denen Cx43 fehlt, bleiben interzellulär gekoppelt und auch der Androgengehalt im Blutserum der Wirte mit Cx43-„knock-out“-Hodengewebe

ist vergleichbar mit dem von Wirten, denen normales Hodengewebe von Wildtyp-Mäusen implantiert wurde. Obwohl Cx43 bislang das einzige bekannte Cx in Leydig Zellen ist, scheint es nicht essentiell für die Androgenproduktion zu sein und wird vielleicht durch ein anderes Cx ersetzt (Kahiri et al., 2006).

Cx45-defekte Mäuse sterben hingegen bereits um den 10. Tag post coitum in der embryonalen Phase der Trächtigkeit an Herzversagen (Kumai et al., 2000). Es ist bekannt, dass Cx45-mRNA und Cx45-Protein in Herzmuskelzellen bereits nach 8,5 Tagen post coitum, vor der ersten Kontraktion, exprimiert wird und somit eine entscheidende Rolle bei der embryonalen Herzentwicklung spielt und wahrscheinlich die ersten Kontraktionen des Herzmuskels koordiniert. Cx43-Protein wird erst 10,5 Tage post coitum im embryonalen Herzvorhof synthetisiert (Alcolea et al., 1999). Die Cx45-defekten Mausembryonen zeigten Defekte in der Herz- und Gefäßentwicklung (Krüger et al., 2000; Kumai et al., 2000).

Ventrikuläre Kardiomyozyten exprimieren Cx43 und Cx45, wobei die Expression von Cx45 im adulten Herzen schwächer ist. Untersuchungen am Herzen von Cx43 „knock-out“-Mäusen zeigen, dass Cx45-Protein in diesem Gewebe nicht hochreguliert wird und somit nicht zur Kompensation von Cx43-Protein beiträgt (Johnson et al., 2002).

Neuere Technologien beschäftigen sich mit konditionalen „knock-outs“, auch als gewebespezifisches Gene Targeting bezeichnet, bei denen Gene gezielt in Teilen eines Organs, bestimmten Zelltypen oder Entwicklungsstadien ausgeschaltet oder inaktiviert werden. Der konditionale „knock-out“ ist präziser und erlaubt zellspezifische „knock-outs“ von Genen zu wichtigen und interessanten Zeitpunkten. Außerdem weisen konditionale „knock-out“-Mäuse im Vergleich zu generalisierten „knock-out“-Mäusen eine höhere Lebenserwartung auf. So konnte in zwei Studien eine Sertoli Zell-spezifische Cx43 „knock-out“-Maus generiert werden, der das Cx43 Gen in Sertoli Zellen fehlt (Brehm et al., 2007; Sridharan et al., 2007). Die homozygoten Mäuse zeigen einen normalen Descensus testis und normale Entwicklung des Urogenitaltraktes, doch die Größe und das Gewicht der Hoden sind sehr viel geringer im Vergleich zu normalen und heterozygoten Mäusen. Histologisch zeigt sich das Bild von Arresten der Spermatogenese auf der Stufe der Spermatogonien und SCO-Tubuli. Nur einige wenige Tubuli zeigen normale Spermatogenese. Cx43 scheint somit essentiell für die normale Hodenentwicklung und Spermatogenese zu sein (Brehm et al., 2007). Die Sertoli Zell Proliferation in den homozygoten Mäusen dauert länger an als in

vergleichbaren Wildtypmäusen und die terminale Differenzierung der Sertoli Zellen wird verhindert, wie durch starke Thyroidhormon Rezeptor alpha Expression gezeigt werden konnte. Thyroidhormon Rezeptor alpha wird in proliferierenden Sertoli Zellen exprimiert und ist ein sensibler Indikator für den Reifungsgrad dieser Zellen. Dies lässt darauf schließen, dass Cx43 für die normale Reifung von Sertoli Zellen von Bedeutung ist und deren morphologische und funktionelle Differenzierung durch den Verlust von Cx43 nicht stattfindet (Sridharan et al., 2007).

In verschiedenen „knock-in“-Mausmutanten wurde die kodierende Region von Cx43 entweder gegen die kodierende Region von Cx32 oder von Cx40 ausgetauscht. Mit Hilfe dieser Tiere gelang es, Mäuse ohne Cx43-Gen postnatal am Leben zu erhalten und zu untersuchen, ob die Funktion eines Cx (Cx43) durch Expression anderer Cx (Cx32 oder Cx40) kompensiert werden kann. Beide Mausmutanten sind zwar lebensfähig, aber nicht fertil. Auch diese Tiere zeigten ein vermindertes Hodengewicht und histologisch ein SCO-Syndrom. Eine Reduktion der Keimzellzahl konnte bis zum Tag 14,5 post coitum zurückverfolgt werden. Die Hoden adulter Wildtyp-Böcke und die Hoden der männlichen Tiere der heterozygoten Mauslinien zeigten hingegen keine histologischen Veränderungen. Diese Tiere waren fertil. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass Cx43 im Hoden eine besondere Funktion besitzt. Es spielt wohl bereits mit Beginn der Hodenentwicklung eine wichtige Rolle und kann als Bestandteil intratubulärer GJ-Kanäle durch Cx32 oder Cx40 nicht vollständig ersetzt werden (Plum et al., 2000).

In einer weiteren Studie wurde die kodierende Region von Cx43 durch die kodierende Region von Cx26 ersetzt. Nur 17 % der homozygoten Tiere wurden geboren und nur 6 % wurden älter als 21 Tage. Neonatale und adulte Cx26 knock-in Mäuse weisen eine verlangsamte ventrikuläre Leitfähigkeit im Herzen auf. Die Jungtiere von heterozygoten Cx26 knock-in Müttern zeigten eine hohe postnatale Mortalität. Die Ursache dafür lag in einer unzureichenden Ernährung aufgrund einer gestörten Milchdrüsenfunktion während der Laktation. Zudem sind die homozygoten männlichen und weiblichen Tiere infertil und die Geschlechtsorgane hypotroph. Histologisch zeigt sich im Hoden das Bild von entwickelten Samenkanälchen mit Spermatogonien und wenigen primären Spermatozyten. Weiter entwickelte Spermatogenesestadien fehlen. Viele Tubuli enthielten nur Sertoli Zellen. Daraus wurde geschlossen, dass Cx26 funktionell also nur teilweise Cx43 im Mäusegenom ersetzen kann (Winterhager et al., 2007).

### 2.3.1.7 Funktionen von GJ-Kanälen

GJ-Kanäle erlauben die elektrische und metabolische Kopplung von Zellen miteinander (Loewenstein, 1981; Bennett et al., 1991). Sie sind für die meisten niedermolekularen Metabolite und Signalmoleküle permeabel. Physiologisch wirksame Substanzen bis 1000Da, wie verschiedene Ionen ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , etc), Aminosäuren, Zucker, Nucleotide und sekundäre Botenstoffe wie cAMP und  $\text{Ca}^{2+}$  aber auch Karzinogene und Morphogene können passiv über GJ-Kanäle direkt von einer Zelle in die nächste gelangen (Loewenstein, 1966, 1981, 1987; Caveney, 1985; Trosko und Ruch, 1998; Willecke et al., 2002). Da bestimmte Gewebe bzw. bestimmte Zellen nur bestimmte Cx exprimieren, ergibt sich hieraus die Möglichkeit, dass bestimmte Zellen und Gewebe miteinander funktionsfähige GJ ausbilden können, andere aber nicht (White et al., 1994; Bruzzone et al., 1996a).

Zu den ersten Funktionen, die der interzellulären Kommunikation durch GJ zugeschrieben wurden, gehörte neben der Steuerung des Zellwachstums, die Kontaktinhibition bzw. Kontakthemmung und die Kontrolle der Zelldifferenzierung durch Austausch von Botenstoffen, die für die Differenzierung der Zellen von Bedeutung sind (Stoker et al., 1966; Loewenstein und Kanno, 1966; Stoker, 1967; Loewenstein, 1979; Budunova, 1994). Es wird seitdem vermutet, dass den GJ eine proliferationsbeendende Wirkung zukommt, in dem sie den Vorgang der sogenannten Kontakthemmung steuern. Dabei stellen normale Zellen, sobald sie sich gegenseitig berühren, ihre proliferative Tätigkeit ein. Dementsprechend ist es denkbar, dass eine vorübergehende Auflösung der Zellkontakte als Voraussetzung für Proliferationsvorgänge gedeutet werden kann.

Die molekulare Kommunikation über GJ-Kanäle spielt somit eine Rolle bei der Regulation der Zelldifferenzierung, der Wachstumskontrolle, der Zellproliferation, der Erhaltung der Gewebshomöostase (Bruzzone et al., 1996a,b; Krutovskikh und Yamasaki, 1997), aber auch bei der Tumorgenese und der onkogenen Transformation von Zellen (Yamasaki, 1990; Bennett et al., 1991; Bruzzone et al., 1996a,b; Trosko und Ruch, 1998). Weiterhin reguliert, steuert und koordiniert sie die Antwort terminal differenzierter Zellen eines Zellverbandes auf externe Stimuli wie z.B. Hormone (Budunova, 1994; Trosko und Ruch, 1998).

## 2.3.1.8 GJ, Cx und Tumor

Die Anzahl von GJ, die Cx-Expression und die Zell-Zell-Kontakte sind bereits in vielen neoplastischen Zellen und Tumoren untersucht worden. Es konnte festgestellt werden, dass in der Mehrzahl dieser Fälle tumorös veränderte Zellen weniger GJ besitzen, weniger Cx exprimieren und über eine reduzierte (z.B. SV-40 transformierte humane Zelllinien) oder gar keine interzelluläre Kommunikation (z.B. Morris's und Novikoff's transplantierte Lebertumoren bei der Ratte) über diesen Zellverbindungstyp verfügen (Loewenstein und Kanno, 1966; Corsaro und Migeon, 1977; Loewenstein, 1981; Dhein 1998; Trosko und Ruch, 1998; Yamasaki et al., 1999). Nur wenige Studien beschreiben, dass neoplastische Zellen im Vergleich zu normalen Zellen unverändert interzelluläre Kommunikation (z.B. humanes follikuläres Adenom der Schilddrüse) aufweisen, die gleiche Anzahl oder sogar vermehrt Gap junction Kanäle bilden und Zell-zu-Zell-Kopplung besteht (Jamakosmanovic und Loewenstein, 1968; Loewenstein, 1979; Yamasaki, 1990). So konnte in wenigen humanen neoplastischen Geweben, wie im hepatozellulären Karzinom, im mammären Fibroadenom und Karzinom und im Prostatakarzinom, Cx43-Protein sowohl teilweise nur intrazytoplasmatisch als auch membranständig noch detektiert werden (Wilgenbus et al., 1992, Jamieson et al., 1998).

Im Gegensatz dazu zeigten Loewenstein und Kanno bereits 1966, dass Krebszellen nicht kommunizieren bzw. eine reduzierte oder veränderte interzelluläre Kommunikation über GJ aufweisen. In Erweiterung dieser Studie wurde vorgeschlagen, dass neoplastisch transformierte Zellen einer Population zunächst untereinander und mit den umgebenden normalen Zellen kommunizieren. Dies erlaubt die Erhaltung der normalen Wachstumsrate, auch die der Tumorzellen (Loewenstein, 1979, 1990; Krutovskikh und Yamasaki, 1997; Trosko und Ruch, 1998). Wenn diese Kommunikation in einem weiteren Schritt verloren geht und keine GJ-Kanäle von den Tumorzellen mehr zur Umgebung existieren, fehlt die Wachstumskontrolle und es kommt zu einem klonalen Wachstum der Tumorzellen. Dabei können die malignen Zellen unter Umständen untereinander selektiv über andere Cx-Isoformen, aber nicht mehr mit ihrer normalen Umgebung kommunizieren, so dass sie ein eigenes Kompartiment bilden.

Viele Tumorpromotoren und einige Onkogene (z.B. src, ras) können zu einer Inhibition zellulärer Kommunikation führen (z.B. Yamasaki, 1990; Budunova und Williams, 1994).

Umgekehrt wurde gezeigt, dass eine Transfektion kommunikations-defizienter Zelllinien mit Cx43 zu einer reduzierten Proliferation führt und die Zellen zu normalem Wachstum zurückkehren. Überexpression von Cx in malignen nicht-kopplungsfähigen Zelllinien führte zu einer Wachstumskontrolle und zu einem Verlust der Tumorigenität (Mehta et al., 1991; Eghbali et al., 1991; Rose et al., 1993; Mesnil et al., 1995). Weiterhin wurde festgestellt, dass Retinoide, Carotinoide, Glukokortikoide oder Vitamin D, die für eine Inhibition der Kanzerogenese in vitro bekannt sind, auch die zelluläre Kommunikation zwischen den Zellen verbessern und den Gehalt an verschiedenen Cx, wie Cx43, erhöhen (Mehta et al., 1989; Yamasaki, 1996).

Diese Untersuchungen ließen den Schluss zu, dass es sich bei Cx um eine Familie von Tumorsuppressorgenen handelt und GJ-Kanäle eine tumorsupprimierende Funktion bzw. Wirkung haben (Yamasaki, 1990; Lee et al., 1991, 1992; Budunova, 1994; Yamasaki et al., 1999). Einen direkten Beweis für diese Vermutung lieferten Versuche mit Cx32-„knock-out“-Mäusen. Cx32 ist hauptsächlich in normalem Lebergewebe lokalisiert. Cx32-defiziente Mäuse entwickeln in viel höherem Maße spontane oder chemisch induzierbare Lebertumore als Wildtyp-Tiere (Temme et al., 1997).

Der Verlust der Kommunikation von Tumorzellen zur normalen Umgebung kann verschiedene Ursachen haben. Er kann durch Schließen der GJ-Kanäle (Klaunig und Ruch, 1990), durch Veränderungen der Cx-Expression auf RNA- und/oder Proteinebene (Holder et al., 1993; Oyamada et al., 1994), durch veränderte Cx-Phosphorylierung, durch veränderte Lokalisation der GJ-Kanäle, durch veränderte intrazytoplasmatische oder perinukleäre Lokalisation der Cx (Omori et al., 1998), durch die Bildung inkompatibler Cx, durch gestörten Transport der Connexone zur Zellmembran oder durch Veränderung der Zelladhäsionsmoleküle erfolgen (Yamasaki, 1991; Yamasaki et al., 1999).

Es gibt eine Vielzahl weiterer Studien, die sich mit dem Phänomen der gestörten GJIC im Zusammenhang mit der Tumorgenese beschäftigen und die oben genannten Ursachen bestätigen (Krutovskikh et al., 1991; Lee et al., 1991; Neveu et al., 1994; Yamasaki und Naus, 1996; Omori et al., 1996 a,b; Krutovskikh und Yamasaki, 1997).

GJ bzw. Cx spielen in der Tumorgenese verschiedener Tumore eine wichtige Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass bei Aufhebung der Wachstumskontrolle durch die umgebenden

normalen Zellen auf die Tumorzellen durch GJ-Kanäle die Expression des Tumors voranschreitet (Murray und Fitzgerald, 1979; Klaunig und Ruch, 1990). Es wurden weiterhin Hinweise gefunden, dass eine verminderte Kopplung mit einer erhöhten Aggressivität von Tumoren einhergeht (Soroceanu et al., 2001). Man kann bei Tumorzellen davon ausgehen, dass ein Verlust von Zelladhäsionsmolekülen und Zellkontakten mit einer gleichzeitigen Dedifferenzierung für einen Invasivitätsprogress der Zellen verantwortlich ist (Frixen et al., 1991; Yamasaki, 1991). Verminderte GJ-Kommunikation kann dazu führen, dass isolierte Zellen weniger inhibitorische Signale empfangen und eine unregulierte Zellteilung und Differenzierung ausgelöst wird (Ruch, 1994). So konnten maligne Transformationen in der Lunge und in der Leber mit einem Verlust der GJ-Kommunikation in Verbindung gebracht werden (Ruch et al., 1998; Trosko und Ruch, 1998).

Es muss auf jeden Fall erwähnt werden, dass die Tumorgenese nicht generell bzw. notwendigerweise mit einer Abnahme interzellulärer Kommunikation verbunden ist. Wachstumsfaktoren wie beispielsweise TGF- $\beta$  können tumorfördernd wirken, ohne die Kopplung zu beeinflussen (Abernethy et al., 1985; Boreiko et al., 1986; Hamel et al., 1988; Budunova, 1994).

Obwohl also nicht alle Fälle einer Tumorgenese mit einer Reduktion, einem Verlust oder einer Veränderung der interzellulären Kommunikation über GJ-Kanäle einhergehen, scheint dennoch im Allgemeinen die Reduktion der GJ-Kommunikation zu einem Verlust an Differenzierungskontrolle und zu aggressivem Tumorwachstum zu führen (Krutovskikh und Yamasaki, 1997; Dhein, 1998).

## 2.3.2 GJ und Cx im Hoden

### 2.3.2.1 GJ und Cx im Hoden mit normaler Spermatogenese

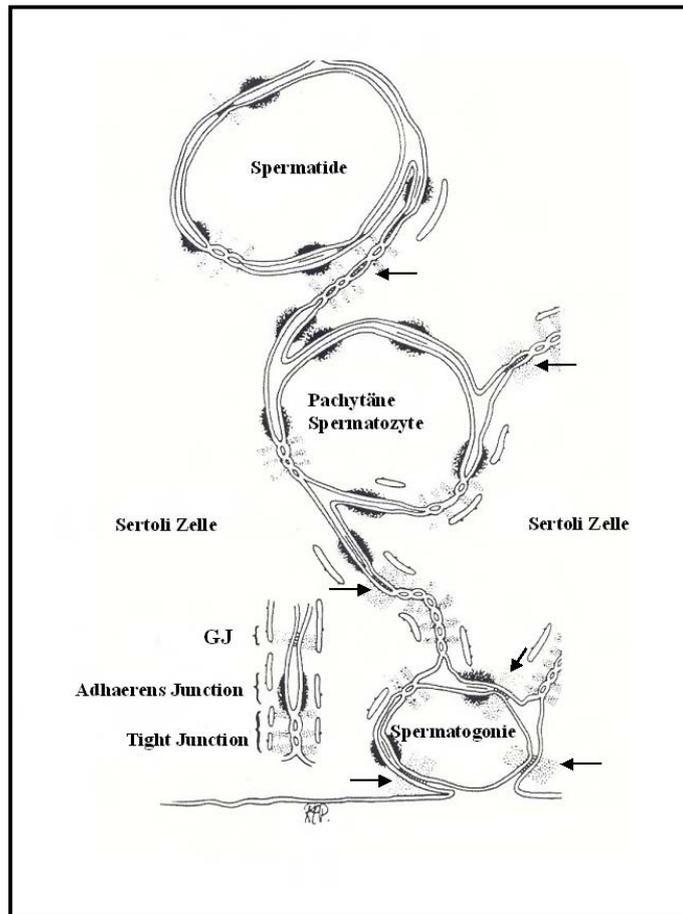
In Hodengewebe von Maus, Ratte, Meerschweinchen, Hamster, Nerz, Hund und Primat incl. Mensch, konnten GJ-Kanäle ultrastrukturell zwischen den verschiedenen Zellpopulationen (Sertoli Zellen, Keimzellen, Leydig Zellen) nachgewiesen werden. Außerdem wurde die zeitliche, räumliche und zellspezifische Expression unterschiedlicher Cx auf Proteinebene (IHC und WB) und auf RNA-Ebene (RT-PCR, NB und In-situ-Hybridisierung (ISH)) in verschiedenen Studien untersucht.

Adulte, terminal differenzierte Sertoli Zellen der untersuchten Spezies bilden GJ vor allem im basalen Bereich des Keimepithels aus. Dabei stehen sie mit den Keimzellen des basalen Kompartiments (Spermatogonien und primären Spermatozyten) und mit benachbarten Sertoli Zellen über den sogenannten „Sertoli-Sertoli-junctional-Komplex“ in Kontakt (Abb.8). Keimzellen ist es nicht möglich untereinander GJ auszubilden, da sie allseitig von lappen- und fingerförmigen Fortsätzen der Sertoli Zellen umgeben sind (Risley, 2000).

#### 2.3.2.1.1 Zellspezifische Expression

Ultrastrukturelle Studien finden GJ-Kanäle in normalem Hodengewebe intratubulär zwischen Sertoli Zellen (Dym und Fawcett 1970; Gilula et al., 1976; Connell, 1976; Bigliardi und Vegni-Talluri, 1977; Connell, 1978; Connell, 1980; Schleiermacher, 1980; Camatini et al., 1982a,b; Pelletier und Friend, 1983; Russell und Peterson, 1985; Vignon et al., 1987; Pelletier, 1988; Pelletier und Byers, 1992; Risley et al., 1992; Pelletier, 1995; Tan et al., 1996) sowie zwischen Sertoli Zellen und Keimzellen (Russell, 1977; McGinley et al., 1979; Schleiermacher, 1980; Pelletier und Friend, 1983; Russell et al., 1983; Russell und Peterson, 1985; Pelletier, 1988; Pelletier und Byers, 1992).

Weiterhin finden ultrastrukturelle Studien GJ im Hoden zwischen interstitiellen Leydig Zellen und zwischen peritubulären Zellen (Nagano und Suzuki 1976b; Risley et al., 1992; Tan et al 1996).



**Abb. 8:** Verteilung von GJ (Pfeile) im Keimepithel bei normaler Spermatogenese (modifiziert nach Pelletier und Byers, 1992)

### 2.3.2.1.2 Zeitliche Expression

Die zeitliche Expression von GJ im Hoden ist speziesspezifisch.

#### Mensch:

GJ zwischen humanen Sertoli Zellen konnten bislang präpubertär nicht oder nur in geringer Anzahl nachgewiesen werden (Furuya et al., 1978; Camatini et al., 1982a; Nistal und Paniagua, 1983).

#### Ratte und Maus:

GJ-Kanäle konnten intratubulär zwischen Sertoli Zellen und zwischen Sertoli Zellen und Keimzellen in Hodengewebe adulter und präpubertärer Ratten und Mäuse gefunden werden. Präpubertäre Tiere dieser beiden Spezies wiesen prinzipiell mehr GJ-Plaques auf als adulte Tiere (Gilula et al., 1976; Nagano und Suzuki, 1976a).

### Meerschweinchen und Nerz:

GJ zwischen Sertoli Zellen und zwischen Sertoli Zellen und Keimzellen von Nerz und Meerschweinchen konnten präpubertär nicht oder nur in geringer Anzahl nachgewiesen werden (Pelletier und Friend, 1983; Pelletier, 1988; Pelletier, 1995).

### Hund:

Im normalen Hoden des Rüden gibt es bislang nur wenige ultrastrukturelle Arbeiten über das Vorkommen und die Verteilung von GJ-Kanälen. GJ scheinen auch beim Hund erst mit Beginn der Pubertät vermehrt im Bereich der Blut-Hoden-Schranke von adulten Sertoli Zellen gebildet zu werden (Connell, 1976; Connell 1978; Connell, 1980).

#### 2.3.2.1.3 Vertreter der Cx-Gen und Proteinfamilie im Hoden

Untersuchungen auf RNA-Ebene mittels RT-PCR, Northern Blot und In-situ Hybridisierung haben gezeigt, dass adulte Sertoli Zellen der Ratte bzw. Maus mRNA folgender Cx enthalten: Cx26, Cx31, Cx32, Cx33, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45 und Cx46 (Batias et al., 1999; Risley et al., 1992; Risley, 2000; Defamie et al., 2001; Brehm et al., 2007).

Untersuchungen auf Proteinebene mittels IHC und/oder WB haben ergeben, dass adulte Sertoli Zellen Cx26 (Maus, Ratte, Mensch), Cx32 (Maus, Ratte), Cx33 (Ratte) und Cx43 (Maus, Ratte, Meerschweinchen, Nerz, Mensch, murine Zellkultur, Mensch) exprimieren können (Risley et al., 1992; Pelletier 1995; Tan et al., 1996; Lablack et al., 1998; Batias et al., 1999; Steger et al., 1999a; Batias et al., 2000; Bravo-Moreno et al., 2001; Perez-Armendariz et al., 2001; Defamie et al., 2001; Brehm et al., 2002; Decrouy et al., 2004; Fiorini et al., 2004; Fischer et al., 2005; Brehm et al., 2006b). Keimzellen (Spermatogonien und primäre Spermatozyten) sind immunopositiv für Cx31 (Mok et al., 1999) und Cx43 (Batias et al., 1999; Batias et al., 2000; Bravo-Moreno et al., 2001; Perez-Armendariz et al., 2001; Brehm et al., 2006a). Leydig Zellen scheinen ausschließlich Cx43 zu synthetisieren (Risley et al., 1992; Perez-Armendariz et al., 1994; Pelletier 1995; Tan et al 1996; Batias et al., 1999, 2000; Steger et al., 1999a; You et al., 2000; Bravo-Moreno et al., 2001; Perez-Armendariz et al., 2001; Brehm et al., 2002; Brehm et al., 2006b). Cx43 wurde außerdem mittels Immunfluoreszenz in peritubulären Zellen adulter Ratten detektiert (Risley et al., 1992).

Zum Vorkommen von verschiedenen Cx auf Proteinebene im adulten caninen Hoden gibt es bisher keine Studien.

### 2.3.2.2 GJ, Cx und ihre Funktion im Hoden

Im Hoden spielt die Kommunikation über GJ-Kanäle zwischen den verschiedenen Zellpopulationen neben parakriner und endokriner Kommunikation eine große Rolle. Diese Kommunikationswege können unabhängig voneinander sein, sich aber auch gegenseitig beeinflussen oder regulieren (Jegou, 1993; Byers et al., 1993; Griswold, 1995; Risley, 2000). GJ und Cx im Keimepithel bilden die Grundlage der direkten Zell-Zell-Interaktion bzw. -Kommunikation zwischen Sertoli Zellen und/oder Keimzellen, sie spielen bei der Regulation der terminalen Differenzierung der Sertoli Zellen und bei der Differenzierung und Proliferation von Keimzellen eine Rolle und sind somit entscheidend an der Regulation der Spermatogenese beteiligt (Risley et al., 1992; Jegou, 1993; Griswold, 1995; Risley, 2000; Risley et al., 2002). Darüber hinaus gewährleisten GJ den selektiven Austausch von Nährstoffen, Ionen oder kleineren Molekülen, die für die Entwicklung und Differenzierung der Zellen des Keimepithels essentiell sind. Sie stellen somit die metabolische Kopplung zwischen Sertoli Zellen und zwischen Sertoli Zellen und Keimzellen sicher. GJ leiten wahrscheinlich hormonelle Stimuli über sekundäre Botenstoffe an die rezeptordefizienten Keimzellen weiter und erlauben einen synchronen bzw. asynchronen Ablauf der Spermatogenese (Enders, 1993; Risley et al., 2002).

### 2.3.2.3 Cx43 im Hoden

Bisherige Studien berichteten über das Vorkommen von Cx43 in normalen Tubuli seminiferi von adulten Männern (Steger et al., 1999a; Brehm et al., 2002; Defamie et al., 2003; Brehm et al., 2006a, b), Mäusen (Risley et al., 1992; Perez-Armendariz et al., 1994; Batias et al., 1999, Batias et al., 2000; Bravo-Moreno et al., 2001; Brehm et al., 2007), Ratten (Kadle et al., 1991; Risley et al., 1992; Decrouy et al., 2004), Meerschweinchen und Nerzen (Pelletier, 1995) und Pferden (Hejmej et al., 2007).

Die intratubuläre Expression und Lokalisation des GJ-Proteins Cx43 zwischen Sertoli Zellen bzw. zwischen Sertoli Zellen und den Keimzellen des basalen Kompartiments ist vom Entwicklungszustand des Hodens (präpubertär oder adult) sowie vom jeweiligen Stadium der Spermatogenese abhängig (Risley et al., 1992, Pelletier, 1995; Tan et al., 1996; Batias et al., 1999; Steger et al., 1999a; Batias et al., 2000). Die Lokalisation der Immunreaktion von Cx43 im adulten Keimepithel ist in den verschiedenen Spezies vergleichbar.

### Mensch

Die Expression von Cx43 bei Männern mit histologisch normaler Spermatogenese zeigt folgendes Verteilungsmuster: Im Keimtubulus findet sich eine immunopositive Reaktion im basalen Drittel des Keimepithels oberhalb der Spermatogonien, unterhalb der primären Spermatozyten sowie zwischen benachbarten Sertoli Zellen entlang des „Sertoli-Sertoli-junctional-Komplex (Steger et al., 1999a; Brehm et al., 2002; Brehm et al., 2006b). Die interstitiellen Leydig Zellen sind deutlich immunopositiv für Cx43 (Steger et al., 1999a).

Durchgeführte ISH ergaben ein starkes Signal für Cx43 mRNA im Zytoplasma von Sertoli Zellen, Spermatogonien und primären Spermatozyten, entsprechend der Lokalisation des Proteins (Brehm et al., 2006b).

### Ratte und Maus

Cx43 Immunreaktionen konnten innerhalb des Keimepithels bereits mit Beginn der Trächtigkeit in fetalen Hoden gefunden werden und scheinen bereits in dieser Phase der Hodenentwicklung eine Rolle zu spielen (Risley et al., 1992; Bravo-Moreno et al., 2001; Perez-Armendariz et al., 2001). Mit dem Beginn der Spermatogenese, mit Bildung der funktionellen Blut-Hoden-Schranke und mit der terminalen Differenzierung der somatischen Sertoli Zellen konnte eine Reduzierung der GJ-Anzahl, eine Änderung ihrer Form, von oval zu linear, und vor allem eine Redistribution vom adluminalen in das basale Kompartiment des Keimtubulus in den Bereich des „Sertoli-Sertoli-junctional-Komplex“ festgestellt werden (Gilula et al., 1976; Nagano und Suzuki, 1976a; Risley et al., 1992; Batias et al., 2000; Bravo-Moreno et al., 2001; Perez-Armendariz et al., 2001). Im Keimepithel der Maus beispielsweise kommt es präpubertär zu dem beschriebenen Wechsel der räumlichen Expression von Cx43. Am dritten Tag nach der Geburt ist noch eine deutliche Immunreaktion im adluminalen Kompartiment bzw. im apikalen Bereich des Keimtubulus erkennbar. Die Lokalisation der Immunreaktion „wandert“ in den folgenden Tagen stetig in Richtung Basalmembran und erreicht nach etwa drei Wochen ihre finale, basolaterale Lokalisation. Mit Beginn der Spermatogenese sind im Hoden der Maus GJ-Kanäle, die Cx43 enthalten, ausschließlich im Bereich der Blut-Hoden Schranke nachweisbar (Bravo-Moreno et al., 2001). Cx43 kann in diesen Tierarten, wenn es im „Sertoli-Sertoli-junctional-Komplex“ angekommen und integriert ist, als Marker für die terminale Differenzierung adulter Sertoli Zellen angesehen werden.

Durchgeführte ISH an adulten Hoden dieser Nager ergaben in verschiedenen Zellen des basalen Kompartiments eine stadienspezifische Cx43-Expression, entsprechend der

Lokalisation des Cx43-Proteins. Das stärkste Signal bzw. die größte Menge an Cx43-mRNA konnte im Zytoplasma der Sertoli Zellen detektiert werden, gefolgt von einer schwächeren Reaktion in Spermatogonien und in primären Spermatozyten. Das Zytoplasma der interstitiellen Leydig Zellen war ebenfalls deutlich immunopositiv (Batias et al., 2000; Brehm et al., 2007).

Diese Ergebnisse belegen, dass auch die basal gelegenen Keimzellen in der Lage sind, Cx43-GJ-Kanäle mit benachbarten Sertoli Zellen auszubilden. Kombiniert man die Ergebnisse der stadienspezifischen Cx43-Expression auf RNA- und Proteinebene bei Ratte und Maus, so konnte festgestellt werden, dass zwischen beiden eine direkte Korrelation besteht. In den Stadien der Spermatogenese, in denen die größte Menge an Cx43-mRNA nachweisbar war, wurde die stärkste Immunreaktion zwischen Sertoli Zellen und/oder zwischen Sertoli Zellen und Keimzellen für das Cx43-Protein gefunden. In den Stadien, in denen weniger oder keine mRNA exprimiert wurde, konnte entsprechend weniger oder kein Protein mehr nachgewiesen werden. Die Regulation der Cx43-Expression in Sertoli Zellen und Keimzellen (Spermatogonien und primäre Spermatozyten) von Ratte und Maus scheint daher auf transkriptionaler Ebene stattzufinden (Batias et al., 2000).

#### Meerschweinchen und Nerz

Das GJ-Protein Cx43 wird im Keimepithel von Meerschweinchen und Nerz von Sertoli Zellen erstmals mit Beginn der Spermatogenese und mit Bildung der funktionellen Blut-Hoden-Schranke exprimiert und kann in diesen Tierarten als pubertärer Differenzierungsmarker der Sertoli Zelle verwendet werden (Pelletier, 1995).

#### Pferd

Cx43-Protein ist im Hoden des adulten Hengstes mit normaler Spermatogenese hauptsächlich im basalen Kompartiment zwischen Sertoli Zellen und Sertoli Zellen und Keimzellen lokalisiert. Im Gegensatz zum humanen Hoden konnte ebenfalls eine Immunreaktion im adluminalen Kompartiment zwischen Sertoli Zellen und zwischen Sertoli Zellen und runden und elongierten Spermatischen detektiert werden. Interstitielle Leydig Zellen des Hengstes sind deutlich immunopositiv für Cx43 (Hejmej et al., 2007).

#### Hund

Über das Vorkommen und die Lokalisation von Cx43 Protein in normalen Tubuli seminiferi des adulten Hundes gibt es bisher keine Studien. Wenige ultrastrukturelle Arbeiten

beschreiben das Vorkommen von vereinzelt Gap junctions im Hoden des präpubertären Hundes und gelegentlich Gap junction plaques im Bereich der Blut-Hoden-Schranke (Connell, 1976; Connell 1978; Connell 1980).

In den Spezies, in denen Cx43 erstmals mit Beginn der Spermatogenese im Bereich der Blut-Hoden-Schranke und zeitgleich mit deren Bildung exprimiert wird, wird diesem GJ-Protein eine regulierende und koordinierende Rolle beim stadienspezifischen Auf- und Abbau dieser Barriere zugesprochen (Pelletier, 1995). Außerdem scheint die Cx43 Expression in Sertoli Zellen für die normale testikuläre Entwicklung und Spermatogenese erforderlich zu sein (Brehm et al., 2007). Die Expression von Cx43 zwischen interstitiellen Leydig Zellen erreicht ihr Maximum nach der Pubertät. Der Kommunikation über GJ-Kanäle wird in dieser Zellpopulation eine Rolle in der Regulation und Kontrolle der Hormonsynthese zugesprochen (Risley et al., 1992; Perez-Armendariz et al., 1994).

#### 2.3.2.4 Cx45 im Hoden

Es existieren bisher nur wenige Studien über Cx45 im Hoden. Eine Arbeit beschäftigt sich mit dem mRNA-Expressionsmuster von insgesamt 11 verschiedenen Cx, unter anderem Cx45, in normalen fetalen Gonaden und in in der Entwicklung gestörten fetalen Gonaden der Maus (Juneja, 2003). Dafür wurden die Gonaden von Wildtyp-Mäusen, heterozygoten fetalen Cx43-„knock-out“-Mäusen und homozygoten Cx43-„knock-out“-Mäusen mit in der Entwicklung gestörten Gonaden jeweils 17,5 Tage post coitum untersucht. Cx45-mRNA konnte mittels RT-PCR in fetalen Hoden von allen drei untersuchten Genotypen detektiert werden. In den Hoden der homozygoten Cx43-„knock-out“-Mäuse wurde außer Cx45-mRNA nur noch mRNA von drei weiteren Cx (Cx26, Cx37, Cx40) gefunden (Juneja, 2003). In einer weiteren Studie wurde die mRNA-Expression von 11 verschiedenen Cx in aufgereinigten Tubuli seminiferi, isolierten Sertoli Zellen, peritubulären Zellen und Keimzellen von Ratten mittels RT-PCR untersucht. Cx45-mRNA wird in Tubuli seminiferi von 6 Tage alten, 15 Tage alten und adulten Ratten und in Sertoli Zellen, peritubulären Zellen, pachytänen Spermatozyten und runden Spermatischen von 20 Tage alten Ratten exprimiert (Risley, 2000). Im Hoden von Wildtyp-Mäusen konnte Cx45-mRNA mittels RT-PCR detektiert werden, wohingegen in Hoden von  $W/W^v$  mutierten Mäusen, denen jegliche Keimzellen fehlen, keine Cx45-mRNA mehr detektiert werden konnte, was für eine keimzellspezifische Cx45-Expression im Hoden interpretiert wurde (Lee et al., 2006).

### 2.3.2.5 GJ und Cx im Hoden bei Störungen der Spermatogenese

Das Vorkommen von GJ-Kanälen und Cx43 im Hodengewebe unter pathologischen Bedingungen wurde bisher in verschiedenen Studien ultrastrukturell, auf Protein- und/oder mRNA-Ebene untersucht. Dabei konnte eine Veränderung, eine Reduktion oder ein Verlust der Cx43-Expression in verschiedenen Spezies mit männlicher Infertilität in Verbindung gebracht werden (Wilgenbus et al., 1992; Steger et al., 1999a; Batias et al., 1999; Juneja et al., 1999; Batias et al., 2000; Roscoe et al., 2001; Brehm et al., 2002; Riskey et al., 2002; Defamie et al., 2003; Roger et al. 2004; Brehm et al., 2006a,b; Brehm et al., 2007; Sridharan et al., 2007; Winterhager et al., 2007).

#### 2.3.2.5.1 Mensch

In Hodengewebeproben von infertilen, azoospermen bzw. oligospermen Männern wurden mittels Gefrierbruch-Technik wenige atypische, GJ-ähnliche Strukturen entdeckt (Bigliardi und Vegni-Talluri, 1977). Eine weitere Studie an Hoden von Patienten mit sowohl quantitativ als auch qualitativ verminderter Spermatogenese und deutlich verringerter Spermienproduktion konnte elektronenmikroskopisch zeigen, dass GJ sehr selten oder gar nicht mehr detektierbar waren (Schleiermacher, 1980).

Die Expression von Cx43 wurde immunhistochemisch in menschlichem Hodengewebe von Patienten untersucht, die verschiedene Störungen der Spermatogenese aufwiesen. Es handelte sich um Patienten mit einem Arrest der Spermatogenese auf der Stufe der Spermatogonien, der Spermatozyten oder der Spermatischen sowie um Patienten mit SCO-Syndrom. Weder zwischen Sertoli Zellen in Keimtubuli mit SCO-Syndrom noch zwischen Sertoli Zellen und/oder zwischen Sertoli Zellen und Spermatogonien in Keimtubuli mit Spermatogonienarrest konnte eine Immunreaktion für Cx43 nachgewiesen werden. In Keimtubuli mit Spermatozytenarrest und in Keimtubuli mit einem Arrest der Spermatogenese auf der Stufe der runden Spermatischen ließ sich die Immunreaktion mit dem in Keimtubuli mit normaler Spermatogenese gefundenen Expressionsmuster vergleichen (Steger et al., 1999a, Brehm et al., 2002). Untersuchungen der Cx-Expression in menschlichem Hodengewebe mit Spermatogonienarrest und Carcinoma in situ (CIS) wurden ebenfalls auf Proteinebene für Cx26 und Cx43 durchgeführt. Für Cx26 konnte ein verstärktes immunhistochemisches Signal im Zytoplasma von Sertoli Zellen in Tubuli mit Spermatogonienarrest und in CIS-only Tubuli detektiert werden. Spermatogonien und CIS-Zellen blieben immunonegativ. Da Cx26 in der

normalen Spermatogenese nur eine schwache Immunreaktion zwischen Sertoli Zellen zeigt, wurde vermutet, dass es sich bei dieser verstärkten Expression um einen erfolglosen Kompensationsversuch für Cx43 handelt (Brehm et al., 2002).

Eine weitere Studie beschäftigte sich mit der Expression von Cx43 in Tubuli mit humanen CIS und Seminomen. Es konnte gezeigt werden, dass die Herunterregulierung der Cx43 Expression auf transkriptionaler Ebene in Tubuli mit CIS beginnt und zu einem kompletten Verlust der Cx43-mRNA in Seminomzellen führt. Cx43 Protein wurde nur noch in wenigen Tubuli mit CIS auf Höhe der Blut-Hoden-Schranke synthetisiert und konnte zwischen neoplastischen Keimzellen nicht mehr detektiert werden. Die Reduzierung der Cx43 Expression führte zu der Annahme, daß die frühe intratubuläre Störung der Cx43 Genexpression und die Unterbrechung der interzellulären Kommunikation zwischen Sertoli Zellen und/oder präinvasiven Tumorzellen eine Rolle in der Progressionsphase der humanen Seminomentwicklung spielen könnte (Brehm et al., 2006b). Zusätzlich wurde auf immunhistochemischer Ebene Cx43-Protein in Sertoli Zelltumoren im Hinblick auf Sertoli Zell Differenzierung untersucht. Zwischen den neoplastischen Sertoli Zellen konnte kein Cx43-Protein detektiert werden, was als Zeichen für einen präpubertären Differenzierungsstatus der neoplastischen Sertoli Zellen und als Indikation für einen neoplastischen Phänotyp interpretiert wurde (Brehm et al., 2006a).

In einer anderen Studie wurde die Expression von Cx26, Cx32 und Cx43 immunhistochemisch an humanem, tumorös verändertem Hodengewebe mit Seminom und Teratokarzinom untersucht. In keinem der Fälle konnte eine Cx-Expression in bzw. zwischen den Tumorzellen nachgewiesen werden (Wilgenbus et al., 1992).

#### 2.3.2.5.2 Hund

In einer ultrastrukturellen Studie konnte bei einem Hund mit deutlich erhöhtem Plasma-Östrogenspiegel im kryptorchen Hoden zwischen weniger differenzierten, entarteten Sertoli Zellen ausgedehnte GJ-Plaques gefunden werden (Thilander et al., 1987). In einer weiteren Untersuchung mittels Elektronenmikroskopie wurden hingegen zwischen entarteten caninen Sertoli Zellen keine Zell-zu-Zell-Verbindungen nachgewiesen (von Bomhard et al., 1978).

### 3 Ziele der Arbeit

Im Hoden verschiedener Spezies spielt die Kommunikation über GJ eine große Rolle. Veränderungen der Cx43-Expression konnten mit männlicher Infertilität in Verbindung gebracht werden und in Sertoli Zelltumoren und Seminomen adulter Männer kam es zu einer Reduktion oder dem Verlust der Cx43-Expression.

In der vorliegenden Studie soll die Expression von Cx43 und Cx45 im Hoden des Hundes, die Bedeutung der Cx für die Spermatogenese und die Veränderung der Cx43-Expression bei caninen testikulären Tumoren untersucht werden. Das häufige Auftreten caniner Hodentumore läßt die Spezies Hund für Studien des männlichen Reproduktionstraktes interessant erscheinen. Es ergab sich folgende Zielstellung: Charakterisierung der

1. Expression von Cx43 im Hoden des präpubertären Hundes und des adulten Hundes in der normalen Spermatogenese und die räumliche und zeitliche Verteilung dieses Proteins
2. Veränderungen der Cx43-Expression bei Sertoli Zelltumoren
3. Veränderungen der Cx43-Expression bei Keimzelltumoren
4. Expression von Cx45 im Hoden des adulten Hundes in der normalen Spermatogenese und die Lokalisation dieses Proteins
5. Co-Expression und Verteilungsmuster von Cx43 und Cx45 im normalen Keimepithel bzw. Hoden

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material/Gewebe

#### 4.1.1 Canine Hodengewebeproben

In dieser Arbeit wurde canines Hodenmaterial von Rüden untersucht, die in unterschiedlichen Kliniken (Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität, Gießen; Tierarztpraxis Dr. Kaiser, Stadtoldendorf; Tierarztpraxis Dres. Waldschmidt-Roth, Wetzlar) routinemäßig, oder mit Verdacht auf Hodentumor, kastriert wurden.

##### 4.1.1.1 Gewebeentnahme und Konservierung

Nach Eröffnung des Processus vaginalis und Entnahme der Hoden wurden unverzüglich die Nebenhoden abgetrennt und die Hoden mit einem sterilen Skalpell in der Längsachse geteilt. Je Hälfte wurden mehrere, etwa gleich große Gewebestücke entnommen und ein Teil in Bouin'sche Lösung überführt. Die restlichen Stücke wurden in Aluminiumfolie verpackt, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zur Weiterbehandlung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

##### 4.1.1.2 Klinische Daten

Das Patientenkollektiv bestand aus 41 Rüden (Alter von 4 Monaten bis 13 Jahren) mit einem Altersdurchschnitt von insgesamt 3,2 Jahren. 30 Tiere wurden routinemäßig, 11 Tiere wegen Verdacht auf Hodentumor kastriert. Die histologische Beurteilung ergab in 27 Fällen eine sowohl qualitativ als auch quantitativ intakte, normale Spermatogenese. In 4 Fällen wiesen die entnommenen Gewebestücke präpubertäre Keimstränge auf. Bei 10 Tieren konnten histologisch verschiedene Tumoren diagnostiziert werden.

4.2 Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Methoden angewendet:

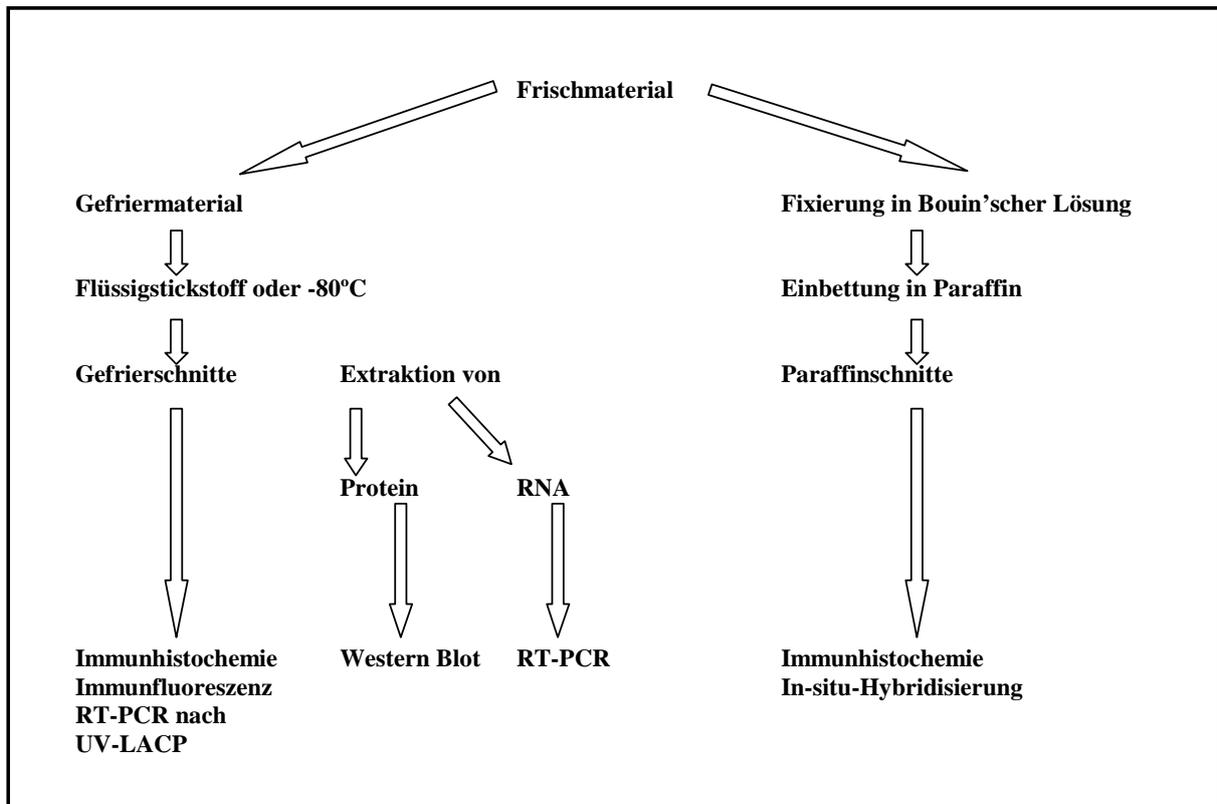


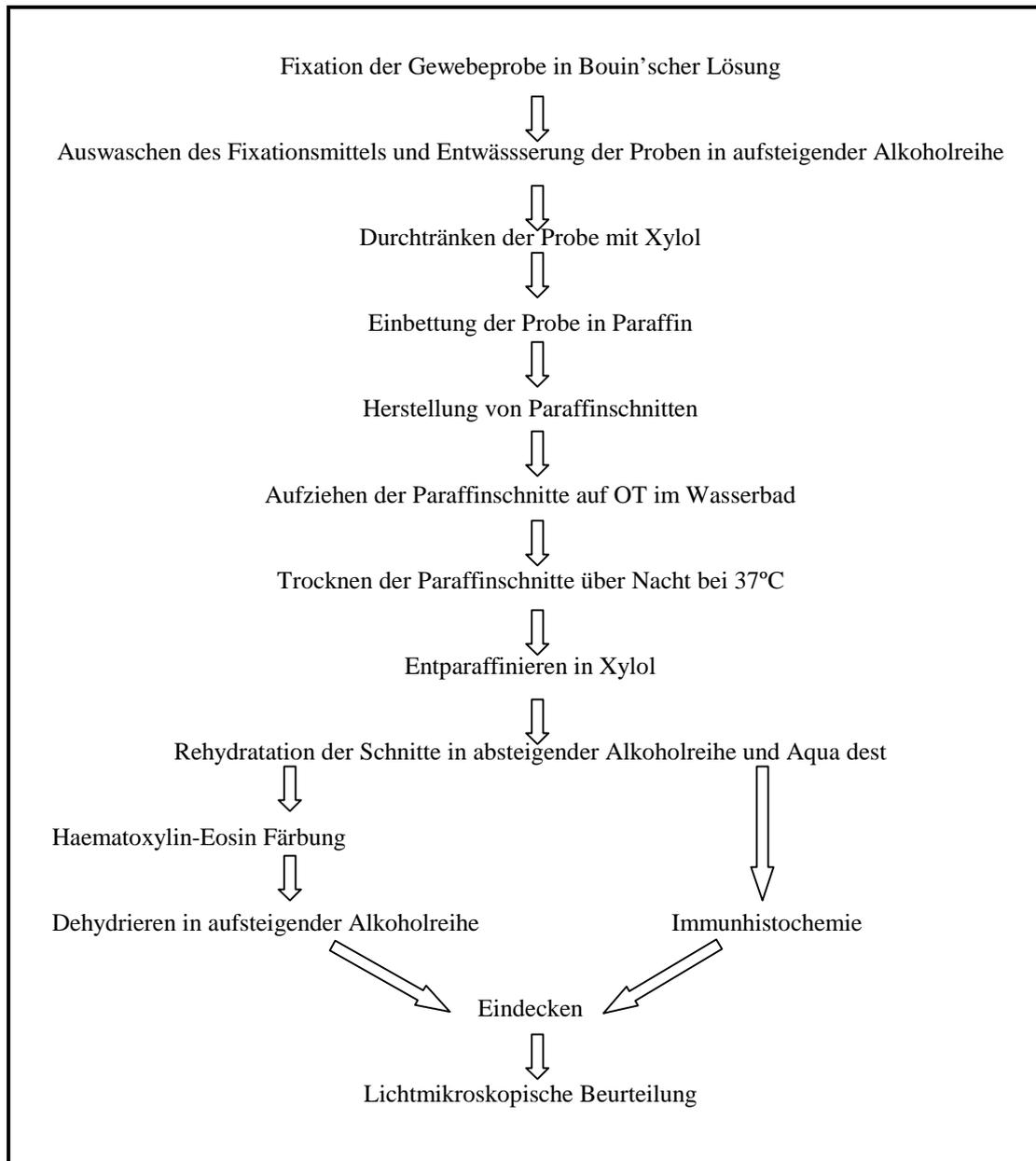
Abb. 9: Schematische Darstellung der durchgeführten Methoden

#### 4.2.1 Herstellung histologischer Schnittpräparate für die Immunhistochemie (IHC)

##### 4.2.1.1 Paraffinmaterial

##### 4.2.1.1.1 Vorbemerkung

Die Herstellung der histologischen Schnittpräparate erfolgte nach folgendem Schema (Abb. 10):



**Abb. 10:** Vorgehen bei der Herstellung histologischer Schnittpräparate (Paraffinmaterial)

#### 4.2.1.1.2 Fixation in Bouin'scher Lösung

Unmittelbar nach der Entnahme des Hodengewebes wurde dieses in Bouin'scher Lösung fixiert, welche aus folgenden Ausgangsmaterialien bestand:

- 15 ml gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung
- 5 ml Formalin
- 1 ml Eisessig

Die Lösungen wurden unmittelbar vor Gebrauch gemischt. Die Fixierzeit der Gewebeproben betrug 24 h. Nach dem Fixieren wurde das Gewebe täglich über 5 Tage mit 70%igem Alkohol (hergestellt aus abs. vergällten Ethanol) gespült, bis keine Gelbfärbung des Alkohols mehr sichtbar war.

#### 4.2.1.1.3 Entwässerung der Proben

Nach dem Entfernen der Fixierflüssigkeit wurden jede Probe in ein kleines Plastikbiopsiekörbchen verbracht, mit dem Entwässerungsgerät Leica TP 1050 (Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomat; Leica, Bensheim) in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, mit Xylol vermischt und mit Paraffin durchtränkt. Die Proben durchliefen die Stationen des nachfolgenden Programms:

- Ethanol 80 % für 2 h
- Ethanol 96 % für 2 h
- Ethanol 100 % für 3 h
- Ethanol 100 % für 3 h
- Ethanol 100 % für 3 h
- Xylol für 1 h
- Xylol für 45 min
- Xylol für 45 min
- Paraffin mit 59°C für 40 min
- Paraffin mit 59°C für 40 min
- Paraffin mit 59°C für 40 min

#### 4.2.1.1.4 Einbettung der Proben

Das Einbetten der Gewebeproben in Paraffin erfolgte in dem Einbettgerät Leica EG 1160 (Leica, Bensheim). Hierbei wurden die Proben in 3 cm x 2 cm x 2 cm große Stahlförmchen verbracht und mit 60°C warmen Paraffin übergossen. Anschließend wurden sie zur Härtung bzw. Abkühlung auf die Kühlplatte des Geräts gelegt.

#### 4.2.1.1.5 Beschichtung der Objektträger (OT)

Zum Erreichen einer besseren Haftfähigkeit der Schnitte wurden die Glas-Objektträger (SuperFrost-OT) vor der Herstellung von Paraffinschnitten mit 3-Aminopropyl-triethoxysilan (APTEX) nach folgendem Protokoll beschichtet:

- OT in Küvettenhalter einsortieren
- OT kurz in Glasbecken mit Aqua bidest. spülen
- Küvettenhalter auf Unterlage abtropfen lassen
- OT kurz in reinem Aceton spülen
- Aceton unter laufendem Abzug vollständig abdampfen lassen
- OT für 5 min in 2%iges APTEX (4 ml APTEX auf 196 ml Aceton)
- OT für 2 min in frisches Leitungswasser stellen
- OT für 2 min unter fließendem Leitungswasser spülen
- OT für 2 min in Aqua bidest. stellen
- Küvettenhalter abtropfen lassen
- OT über Nacht bei 37°C im Trockenschrank trocknen

#### 4.2.1.1.6 Herstellung von Paraffinschnitten

Von den in Paraffin eingebetteten Präparaten wurden mittels Schlittenmikrotom (Leica SM 2000 R) Schnitte mit einer Dicke von 5 µm gefertigt und in einem 37°C warmen, mit Aqua dest. gefüllten Wasserbad gestreckt. Jeweils zwei aufeinanderfolgende Schnitte wurden auf einen mit APTEX beschichteten OT verbracht. Getrocknet wurden die Paraffinschnitte über Nacht in einem Trockenschrank bei 37°C.

#### 4.2.1.1.7 Hämatoxylin-Eosin (H.E.)-Färbung

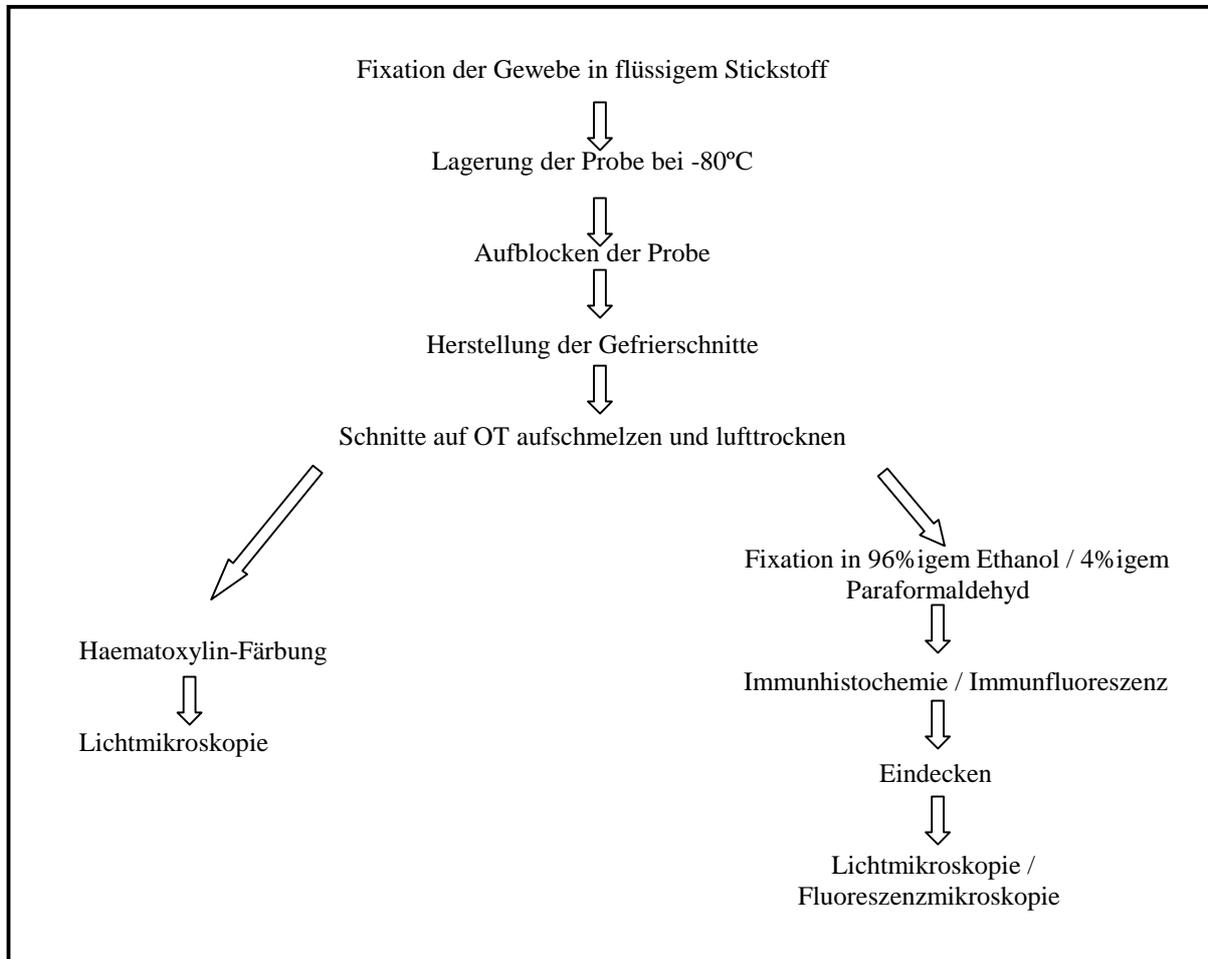
Zur vorläufigen Beurteilung der Gewebeerhaltung und der histologischen Beschaffenheit der jeweiligen Probe wurde von allen Paraffinpräparaten zunächst eine HE-Färbung angefertigt. Die Zellkerne wurden durch basisches Hämalaun blau angefärbt, alle anderen Strukturen erschienen in verschiedenen Farbabstufungen durch Eosin rot. Das Färbeprotokoll lautete wie folgt:

- OT in Küvettenhalter einsortieren
- 3 x 10 min Xylol
- 2 x 5 min abs. Ethanol
- 1 x 5 min 96%iges Ethanol
- 1 x 5 min 80%iges Ethanol
- 1 x 5 min 70%iges Ethanol
- 1 x 5 min 50%iges Ethanol
- 1 x 5 min Aqua dest.
- 1 x 7 min Hämatoxylin
- 1 x 15 min in fließendem Leitungswasser bläuen
- 1 x 7 min 1%iges Eosin
- kurz in Leitungswasser spülen
- kurz 70%iges Ethanol
- kurz 80%iges Ethanol
- 1 x 2 min 80%iges Ethanol
- 2 x 2 min 96%iges Ethanol
- 3 x 2 min abs. Ethanol
- 3 x 10 min Xylol
- Eindecken der gefärbten Schnitte mit Vitro-Clud

#### 4.2.1.2 Gefriermaterial

##### 4.2.1.2.1 Vorbemerkung

Die Herstellung der Gefrierschnitte erfolgte einheitlich nach folgendem Schema (Abb. 11):



**Abb. 11:** Schema zur Herstellung histologischer Schnittpräparate aus Gefriermaterial

Die Gefrierschnitte dienen der Cx43 IHC, der Cx45 IF, als Referenzschnitte der histologischen Beurteilung der im WB und in der RT-PCR am Gesamthomogenat eingesetzten Gewebe und waren Grundlage für die UV-laser assistierte Mikrodissektion mit nachfolgender RT-PCR. Das Gefriermaterial bildete die Grundlage für die angewendeten molekularbiologischen Techniken.

##### 4.2.1.2.2 OT

Für eine bessere Haftfähigkeit der Schnitte wurden Super Frost® Plus Objektträger benutzt.

#### 4.2.1.2.3 Aufblocken des Gewebes

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  konservierten Gewebeproben wurden mit dem wasserlöslichen Gewebeklebemittel Tissue-Tek® auf einem Metall-Objekthalter befestigt.

#### 4.2.1.2.4 Herstellung von Gefrierschnitten für die IHC (Immunfluoreszenz)

Vor dem Schneidevorgang wurde das aufgeblokte Gewebe für einige Zeit im Gefriermikrotom 2800 Frigocut gelagert, um sich der eingestellten Temperatur anpassen zu können. Mit dem Kryostat wurden dann ca. 10-12  $\mu\text{m}$  dicke Gefrierschnitte unter Verwendung eines Anti-Rollplättchens angefertigt, welche mit Super Frost® Plus Glas-OT aufgenommen wurden.

Je nach Beschaffenheit und Schneidbarkeit des Gewebes variierten Kühl- und Objekttemperatur individuell.

- Kühltemperatur:  $-28^{\circ}\text{C}$  bis  $-30^{\circ}\text{C}$
- Objekttemperatur:  $-20^{\circ}\text{C}$  bis  $-22^{\circ}\text{C}$

#### 4.2.1.2.5 Hämatoxylin-Färbung

Zur histologischen Beurteilung wurde jeweils der erste unfixierte, luftgetrocknete Gefrierschnitt auf einen Super Frost Plus OT bzw. auf ein unbeschichtetes Deckgläschen aufgenommen, für 30 sek mit Hämatoxylin überschichtet und anschließend mit Aqua bidest. gespült. Mit Hilfe dieser Schnellfärbung wurden geeignete Präparate für die durchgeführten molekularbiologischen Techniken ausgewählt.

#### 4.2.1.2.6 Fixation der Gefrierschnitte

Die übrigen Gefrierschnitte wurden entsprechend der nachfolgend durchgeführten Methode behandelt. Für die Immunhistochemie wurden die Schnitte 15 min bei Raumtemperatur getrocknet, 10 min in 96%igem Ethanol bei  $-20^{\circ}\text{C}$  fixiert und anschließend wiederum 15 min bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Durchführung der Immunfluoreszenz wurden die Schnitte 15 min bei Raumtemperatur getrocknet, 10 min in 4%igem Paraformaldehyd fixiert und anschließend in die entsprechende Pufferlösung verbracht.

## 4.2.2 Immunhistochemie (IHC)

### 4.2.2.1 Allgemeine Vorbemerkung zur IHC

Ziel der IHC ist es, mittels Antigen-Antikörperreaktionen definierte Epitope in Gewebeschnitten zu lokalisieren. Der Antigen-Antikörper-Komplex in Gewebeverbänden wird über eine Kopplung mit einem Enzym und anschließender Substratreaktion oder über direkte Fluorochrommarkierung sichtbar gemacht. In dieser Studie fanden zu diesem Zweck zum einen die indirekte Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Methode (APAAP-Methode) und die Avidin-Biotin-Peroxidasekomplex-Methode (ABC-Methode) Anwendung und zum anderen die indirekte Immunfluoreszenz (IF):

Bei der APAAP- und der ABC-Methode werden lösliche Enzym-Immunkomplexe zum Zweck der Signalverstärkung und einer daraus resultierenden Erhöhung der Sensitivität eingesetzt. Die Immunkomplexe der APAAP-Methode bestehen aus alkalischer Phosphatase und anti-alkalischer Phosphatase Antikörper. Es werden drei Antikörperlösungen eingesetzt: Zunächst bindet ein unkonjugierter Primärantikörper an das Antigen im Präparat. Der unkonjugierte Sekundärantikörper (= Brückenantikörper) verbindet den Primärantikörper mit dem APAAP-Komplex. Bei der ABC-Methode verbindet ein biotinylierter Sekundärantikörper (= Brückenantikörper) den Primärantikörper mit dem Avidin-Biotin-Komplex. Im Anschluß wird bei beiden Methoden durch eine Enzym-Substrat-Reaktion eine Färbung zum sichtbaren Nachweis erreicht. Die Färbung wird im Lichtmikroskop untersucht.

Bei der indirekten IF wird das Antigen zunächst mit einem nicht markierten Antikörper inkubiert und anschließend mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper bedeckt. Als Fluoreszenzmarker können unterschiedliche fluoreszierende Farbstoffe dienen, wie z.B. das in dieser Arbeit verwendete Fluoresceinthiocyanat (FITC), welches bei Untersuchung im Fluoreszenzmikroskop die Lokalisation des Antigens durch grüne Fluoreszenz anzeigt, oder das ebenfalls in dieser Arbeit verwendete Indocarbocyanin (Cy3), welches die Lokalisation des Antigens durch rote Fluoreszenz anzeigt.

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden kommerziell erhältliche Primär-, Sekundär-, und Tertiärantikörper, Detektionssysteme und Farbstoffe verwendet, und ein im Labor von Thomas Steinberg (Washington University, St. Louis, USA) hergestellter polyklonaler anti-Cx45-Antikörper (Lecanda et al., 1998) (Kaninchen-anti-Maus).

#### 4.2.2.2 Immunhistochemischer Nachweis von Sertoli Zellen (Vimentin-Färbung) an Paraffinmaterial

Zur definitiven Bestätigung der an vorangegangenen Schnitten bereits gestellten histologischen Diagnose und zur Differenzierung der Hoden mit Mischtumoren, wurde nach morphologischer Beurteilung der neu angefertigten Schnitte mittels HE-Färbung von jedem Paraffinblock von präpubertären Hunden, Hunden mit normaler Spermatogenese und Hunden mit Verdacht auf Hodentumor zur Identifizierung der Sertoli Zellen jeweils ein Schnitt mit Vimentin gefärbt. Es wurde die APAAP-Methode verwendet. Das ausführliche immunhistochemische Protokoll lautete wie folgt:

- Waschpuffer (1x Tris-HCl-Puffer) herstellen:
  - 10x Tris-HCl-Puffer: 121,1 g Tris-HCl in 800 ml Aqua bidest. lösen, mit konzentrierter HCl auf pH 7,6 einstellen und mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen
  - 1x Tris-HCl-Puffer: 100 ml 10x Tris-HCl-Puffer (pH 7,6) mit 1 ml Tween 20 mischen und mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen und lösen
  
- Citratpuffer herstellen:
  - Stammlösung A: 21,01 g Citronensäure-Monohydrat (Merck, Darmstadt) in 1 l Aqua bidest. lösen
  - Stammlösung B: 29,41 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Merck, Darmstadt) in 1 l Aqua bidest. lösen
  - 18 ml Stammlösung A und 82 ml Stammlösung B mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen und mit konzentrierter HCl auf pH 6,0 einstellen
  
- Blockpuffer herstellen:
  - 5 g BSA mit 1x Waschpuffer auf 100 ml auffüllen und mit konzentrierter HCl bzw. NaOH auf pH 7,6 einstellen und aliquotieren
  
- Gewebepreparierung (Entparaffinieren und Rehydrieren) – Alkoholreihe
  - OT in Küvettenhalter einsortieren
  - Xylol und OT bzw. Paraffinschnitte getrennt voneinander über Nacht bei 60°C in Trockenschrank
  - 1 x 5 min Xylol (60°C)
  - 2 x 5 min Xylol (RT)
  - 2 x 5 min 96%iger Alkohol (Ethanol)

## Material und Methoden

- 1 x 5 min 80%iger Alkohol (Ethanol)
- 1 x 5 min 70%iger Alkohol (Ethanol)
- 1 x 5 min Aqua bidest.
- 1 x 5 min in Waschpuffer (Standküvette auf Schüttler)
  
- Demaskierung der Antikörper-Bindungsstellen mittels Mikrowellenbehandlung  
OT in Standküvette einsortieren
  - 1 x 5 min Citratpuffer bei RT
  - Standküvette mit Citratpuffer (pH 6,0) in Tupperdose stellen
  - Tupperdose in Mikrowelle und 25 min bei 1000 W kochen
  - verdunsteten Citratpuffer regelmäßig durch Aqua bidest. ersetzen
  - Schnitte danach mindestens 20 min abkühlen lassen
  - 2 x 2 min Aqua dest.
  - 2 x 5 min in Waschpuffer (Standküvette auf Schüttler)
  - Schnitte mit DAKO-Pen umkreisen
  
- Blockierung endogener Enzymaktivitäten (endogene alkalische Phosphatase)
  - 20%ige Essigsäure herstellen: 160 ml Aqua bidest. und 40 ml Eisessig (100%ige Essigsäure) mischen
  - OT in Standküvette einsortieren
  - Inkubation mit 20%iger Essigsäure für 15 sek bei RT
  - 3 x 5 min in Waschpuffer (Standküvette auf Schüttler)
  
- Blockierung unspezifischer Bindungsstellen
  - Inkubation mit Blockpuffer (5%iges BSA) für 30 min in feuchter Kammer bei RT
  
- Inkubation mit primärem Antikörper  
Es wurde ein monoklonaler anti-Vimentin-Antikörper der Firma Dako, Hamburg, Klon V9, Maus-anti-Schwein, Nr. M0725 mit der Verdünnung 1:2000 verwendet.
  - Verdünnung des Antikörpers in Blockpuffer (5%iges BSA)
  - Inkubation mit Primärantikörper in feuchter Kammer über Nacht bei 4°C
  - 3 x 5 min Waschpuffer

- Inkubation mit sekundärem Antikörper

Es wurde folgender Antikörper verwendet:

- Sekundärantikörper: unkonjugierte Kaninchen-anti-Maus Immunglobuline, Dako, Hamburg, Nr. Z0259, Verdünnung 1: 50
- Verdünnung des Sekundärantikörpers in Blockpuffer (5%iges BSA)
- Inkubation mit Sekundärantikörper in feuchter Kammer für 45 min bei RT
- 3 x 5 min Waschpuffer (Schüttler)

- Inkubation mit APAAP Maus Enzymkomplex

Es wurde folgender löslicher Enzym-Anti-Enzymkomplex verwendet:

APAAP Mouse Monoclonal, DAKO, Hamburg Nr. D0651, Verdünnung 1:100

- Verdünnung des APAAP Enzymkomplexes in Blockpuffer (5%iges BSA)
- Inkubation mit APAAP Enzymkomplex in feuchter Kammer für 45 min bei RT
- 3 x 5 min Waschpuffer (Schüttler)

- Farbreaktion / Gegenfärbung / Eindecken der Schnitte

Als Entwicklerlösung wurde HistoMark®Red verwendet

- Inkubation mit HistoMark®Red in feuchter Kammer für 90 min bei RT
- Abstoppen der Reaktion mit kaltem Waschpuffer
- Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 5 sec
- Abstoppen der Reaktion in Leitungswasser
- Eindecken der Schnitte mit Kaisers Glycingelatine

Bei jedem Färbevorgang wurde jeweils ein Schnitt als Negativkontrolle mitgeführt und wie im Färbeprotokoll beschrieben behandelt, ausgenommen der Inkubation mit dem primären Antikörper, welche durch Inkubation mit Blockpuffer ersetzt wurde.

#### 4.2.2.3 Androgenrezeptor-IHC an Paraffinmaterial

Zum Nachweis des Steroidrezeptors wurde eine Immunhistochemie an Paraffinmaterial präpubertärer Hunde und von adulten Hunden mit normaler Spermatogenese durchgeführt. Es wurde die ABC-Methode angewandt. Das hierfür verwendete Protokoll entspricht dem unter Kapitel 3.2.2.2 genannten Protokoll nach der APAAP-Methode mit folgenden Änderungen:

- Blockierung endogener Enzymaktivitäten (endogene Peroxidase)
  - Methanol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> frisch ansetzen: 45 ml Methanol und 5 ml 30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mischen
  - OT in Standküvette einsortieren
  - Inkubation mit Methanol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 30 min bei RT (Standküvette auf Schüttler)
  - 3 x 5 min in Waschpuffer (Standküvette auf Schüttler)

- Inkubation mit primärem Antikörper

Es wurde ein polyklonaler anti-Androgen Rezeptor Antikörper der Firma Santa Cruz Biotechnology Inc., California , Kaninchen-anti-Mensch, Nr. sc-816 mit der Verdünnung 1:1000 verwendet.

- Inkubation mit sekundärem Antikörper

Es wurde folgender Antikörper verwendet:

- Sekundärantikörper: biotinylierte Ziege-anti-Kaninchen Immunglobuline, Dako, Hamburg, Nr. E0432, Verdünnung 1: 100

- Inkubation mit Vector Vectastain ABC-Elite Kit Standard (ABC-Kit)

- 30 min vor Gebrauch ABC-Lösung ansetzen (1 Tropfen Lösung A und 1 Tropfen Lösung B in 2,5 ml Waschpuffer lösen)
- 30 min mit ABC-Lösung in feuchter Kammer bei RT inkubieren

- Farbreaktion / Gegenfärbung / Eindecken der Schnitte

Als Entwicklerlösung wurde DAB verwendet

- Inkubation mit DAB in feuchter Kammer für 3 min bei RT

#### 4.2.2.4 Cx43-IHC an Gefriermaterial

Zum Nachweis des GJ-Protein Cx43 wurde eine IHC an Gefriermaterial präpubertärer Hunde, von Hunden mit normaler Spermatogenese und Hunden mit Sertoli Zelltumoren und Seminomen durchgeführt. Das für Gefriermaterial modifizierte Protokoll zur Immunhistochemie lautete wie folgt:

- Waschpuffer (PBS-Puffer) herstellen
  - 4 Tabletten PBS in 800 ml Aqua bidest. lösen und mit konzentrierter HCl bzw. NaOH auf pH 7,4 einstellen
- Blockpuffer herstellen:
  - 5 g BSA mit 100 ml Waschpuffer (PBS-Puffer) mischen
- Gewebevorbehandlung
  - Gefrierschnitte für 20 min bei RT lufttrocknen lassen
  - OT in Küvettenhalter einsortieren
  - Fixation des Gewebes mit 96%igem Ethanol für 10 min bei RT
  - 2 x 5 min Waschpuffer (Schüttler)
- Blockierung endogener Enzymaktivitäten (endogene alkalische Phosphatase)
  - Inkubation mit 20%iger Essigsäure für 15 sec bei RT
  - 3 x 5 min Waschpuffer (Schüttler)
  - Schnitte mit DAKO-Pen umkreisen
- Blockierung unspezifischer Bindungsstellen
  - Inkubation mit Blockpuffer für 20 min in feuchter Kammer bei RT
- Inkubation mit Primärantikörper

Es wurde ein polyklonaler anti-Cx43-Antikörper der Firma Zymed, San Francisco, Nr. 71-0700 (Kaninchen-anti-Ratte), mit der Verdünnung 1:100 verwendet.

  - Verdünnung des Antikörpers in Blockpuffer (5%iges BSA)
  - Inkubation mit Primärantikörper in feuchter Kammer über Nacht bei 4°C
  - 3 x 5 min Waschpuffer (Schüttler)
- Inkubation mit Sekundärantikörper und Tertiärantikörper

Es wurden die folgenden Antikörper verwendet:

- Sekundärantikörper: unkonjugierte Maus-anti-Kaninchen Immunglobuline, DAKO, Glostrup, Dänemark, Nr. M0737 Verdünnung 1:50
  - Tertiärantikörper: unkonjugierte Kaninchen-anti-Maus Immunglobuline, DAKO, Glostrup, Dänemark, Nr. Z0259, Verdünnung 1:50
  - Verdünnung des Sekundär- und Tertiärantikörpers in Blockpuffer (5%iges BSA)
  - Inkubation mit Sekundärantikörper in feuchter Kammer für 30 min bei RT
  - 3 x 5 min Waschpuffer (Schüttler)
  - Inkubation mit Tertiärantikörper in feuchter Kammer für 30 min bei RT
  - 3 x 5 min Waschpuffer (Schüttler)
- Inkubation mit APAAP Maus Enzymkomplex

Es wurde folgender löslicher Enzym-Anti-Enzymkomplex verwendet:

APAAP Mouse Monoclonal, DAKO, Hamburg Nr. D0651, Verdünnung 1:100

- Verdünnung des APAAP Enzymkomplexes in Blockpuffer (5%iges BSA)
  - Inkubation mit APAAP Enzymkomplex in feuchter Kammer für 45 min bei RT
  - 3 x 5 min Waschpuffer (Schüttler)
- Farbreaktion / Gegenfärbung / Eindecken der Schnitte
- Als Entwicklerlösung wurde HistoMark®Red verwendet.
- Inkubation mit HistoMark®Red in feuchter Kammer für 90 min bei RT
  - Abstoppen der Reaktion mit kaltem Waschpuffer
  - Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 5 sec
  - Abstoppen der Reaktion in Leitungswasser
  - Eindecken der Schnitte mit Kaisers Glyceringelatine

Bei jedem Färbvorgang wurde jeweils ein Schnitt als Negativkontrolle mitgeführt und wie im Färbeprotokoll beschrieben behandelt, ausgenommen der Inkubation mit dem primären Antikörper, welche durch Inkubation mit Blockpuffer ersetzt wurde.

#### 4.2.2.5 Cx45-Immunfluoreszenz (IF) an Gefriermaterial

Zum Nachweis des GJ-Proteins Cx45 wurde eine IF an caninem Gefriermaterial von Tieren mit normaler Spermatogenese durchgeführt. Ein Vorteil der IF-Methode ist, dass auch kleine Mengen exprimierter Moleküle leicht vor dem dunklen Hintergrund zu erkennen sind, was bei der IHC aufgrund der enzymatischen Farbreaktionen auf winzigen Flächen und vor diffusem Hintergrund schwer fällt. Der Nachteil der IF besteht vor allem darin, dass nicht bei Tageslicht gearbeitet werden kann, da das Signal schnell ausbleicht und dem Verschwinden der Leuchtkraft bei Lagerung bei Raumtemperatur. Dem wird durch Verwenden eines speziellen Einbettmediums und unmittelbare Dokumentation entgegengewirkt. Das Protokoll lautete wie folgt:

- Waschpuffer (PBS-Puffer) herstellen
  - 4 Tabletten PBS in 800 ml Aqua bidest. lösen und mit konzentrierter HCl bzw. NaOH auf pH 7,4 einstellen
- Antikörperverdünnungspuffer herstellen:
  - 1,0 g BSA und 45 ml Glycerin in 100 ml 0,3 % Tween in 0,02 M PBS lösen und mit 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> auf pH 8,0 einstellen
- Blockpuffer herstellen
  - Eselserum 1:10 in Antikörperverdünnungspuffer
- Gewebevorbehandlung
  - Gefrierschnitte mit 100 % Methanol 10 min bei -20°C inkubieren
  - Schnitte lufttrocknen
  - Schnitte mit DAKO-Pen umkreisen
- Blockierung unspezifischer Bindungsstellen
  - Inkubation mit Blockpuffer für 60 min in feuchter Kammer bei RT
- Inkubation mit Primärantikörper

Es wurde ein polyklonaler anti-Cx45-Antikörper aus dem Labor von Thomas Steinberg (Lecanda et al., 1998), (Kaninchen-anti-Maus) mit der Verdünnung 1:500 verwendet.

- Verdünnung des Primärantikörpers in Antikörperverdünnungspuffer
- Inkubation mit Primärantikörper in feuchter Kammer über Nacht bei 4°C
- 3 x 10 min Waschpuffer (Schüttler)
- ab jetzt alle Schritte im Dunkeln
  
- Inkubation mit sekundärem Antikörper:  
Es wurde ein Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugierter Esel-anti-Kaninchen Antikörper der Firma Chemicon International, Temecula, USA, Nr. AP182F, mit der Verdünnung 1:200 verwendet
  - Verdünnung des Antikörpers in Blockpuffer
  - Inkubation mit Sekundärantikörper in feuchter Kammer für 60 min bei RT
  - 3 x 10 min Waschpuffer (Schüttler)
  
- Eindecken der Schnitte
  - Eindecken der Schnitte mit Verschlusslösung Vectashield® Hard Set™ Mounting Medium mit DAPI
  - Lagerung bei 4°C
  - Innerhalb von 4-5 Tagen im Fluoreszenzmikroskop untersuchen

Bei jedem Färbevorgang wurde jeweils ein Schnitt als Negativkontrolle mitgeführt und wie im Färbeprotokoll beschrieben behandelt, ausgenommen der Inkubation mit dem primären Antikörper, welche durch Inkubation mit Antikörperverdünnungspuffer ersetzt wurde.

#### 4.2.2.5.1 Doppelfärbung Cx45-Aktin/ Cx45-Vimentin

Doppelfärbungen sind bei der Immunfluoreszenz leicht durchführbar, da durch verschiedene, geeignete Filter eine getrennte oder gemeinsame Darstellung verschiedener Antigene möglich ist und somit auch eine Kolokalisation bestimmter Moleküle sichtbar gemacht werden kann.

Zur Doppelfärbung Cx45-Aktin/Vimentin wurden als Primärantikörper ein polyklonaler anti-Cx45-Antikörper aus dem Labor von Thomas Steinberg (Lecanda et al., 1998), (Kaninchen-anti-Maus) mit der Verdünnung 1:500 und ein monoklonaler anti-Aktin-Antikörper (1:100) / anti-Vimentin-Antikörper (Firma Dako, Hamburg, Klon V9, Maus-anti-Schwein, Nr. M0725, Verdünnung 1:2000) verwendet. Als Sekundärantikörper wurden ein grün fluoreszierender Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugierter Esel-anti-Kaninchen Antikörper der Firma

Chemicon International mit der Verdünnung 1:200 und ein rot fluoreszierender Carbocyanin 3 (Cy3)-konjugierter Esel-anti-Ratte Antikörper (AP189C) der Firma Chemicon International mit der Verdünnung 1:100 verwendet. Beide Primärantikörper und beide Sekundärantikörper wurden gleichzeitig inkubiert. Die Durchführung des Versuchs erfolgte nach dem Protokoll unter Punkt 3.2.2.4..

#### 4.2.2.6 Lichtmikroskopie und Auswertung der Immunreaktion

Die Auswertung der Immunreaktion wurde an dem Photomikroskop Axiophot, Durchlicht und Auflicht-Fluoreszenz mit integrierter Kamera VC45, 2/3, vorgenommen. Für die Abbildungen im Ergebnisteil wurden folgende Objektive verwendet 20x/ 0,6 und 40x/ 1,30 Öl. Die Bildaufnahme, Archivierung und Dokumentation wurde mit Hilfe folgender Software durchgeführt: analySIS®, digitale Bildanalyse, Soft Imaging System GmbH, Münster.

#### 4.2.2.7 Fluoreszenzmikroskopie und Auswertung der Immunreaktion

Die immunfluoreszenzgefärbten Gefrierschnitte wurden mit einer Schwarz-Weiß-Kamera (Spot Insight, Visitron Systems, Puchheim) aufgenommen. Es fand folgendes Prinzip Anwendung: Licht geeigneter Wellenlängen regte die jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe nach entsprechender Filterung zur Emission von Photonen mit definierter, größerer Wellenlänge an (Tabelle 2).

**Tabelle 2:** Übersicht über die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und DAPI

<b>Fluorophor</b>	<b>Anregung (nm)</b>	<b>Emission</b>	<b>Verwendung</b>
FITC	495	512	Cx45, grün
Cy3	510-530	630-660	Aktin / Vimentin, rot
DAPI	358	461	Nukleus, blau

Es wurden für ein vollständiges Bild drei Einzelfotos eines Ausschnittes mit unterschiedlichen Belichtungszeiten und unterschiedlichen Objektiven (40x; 100x) aufgenommen. Die schwarz-weißen Einzelbilder zeigten nur die Lokalisation des jeweiligen Farbstoffes. Für eine vollständige Darstellung wurden den verschiedenen Wellenlängen mit Hilfe des Software-Programmes Metamorph (Visitron Systems, Puchheim) Farben zugeordnet: den FITC-Signalen grün, den Cy3-Signalen rot und der Kernfärbung blau. Für ein Komplettbild wurden alle Einzelfotos übereinander gelegt.

Die im Gewebe enthaltenen Kerne wurden mit DAPI gegengefärbt, welches mit der Desoxyribonukleinsäure in den Kernen reagiert und sich in der Mikroskopie mit einem geeigneten Filter blau darstellt. Dadurch wurde die Orientierung im Gewebe erleichtert.

#### 4.2.3 Extraktion und Isolation von RNA und Protein aus Gefriermaterial

##### 4.2.3.1 Allgemeine Vorbemerkung zur Extraktion und Isolation

Von den in Aluminiumfolie verpackten, nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten caninen Hodengewebeproben wurden zunächst Gefrierschnitte hergestellt. Diese Schnitte dienen als Referenzschnitte der histologischen Beurteilung der im WB und in der RT-PCR an Gesamthomogenat eingesetzten Gewebeproben und waren zum anderen Grundlage für das UV-LACP mit anschließender RT-PCR an isolierten Einzelzellen.

Für die Extraktion von Protein und RNA wurde Gefriermaterial von insgesamt 8 Hunden verwendet. Die histologische Beurteilung der Schnitte ergab die Diagnosen präpubertärer Hoden, qualitativ als auch quantitativ intakte, normale Spermatogenese, Sertoli Zelltumor und Seminom in jeweils zwei Fällen.

Für den Nachweis der GJ-Proteine Cx43 und Cx45 mittels WB sowie der Cx43/Cx45-spezifischen mRNA mittels RT-PCR wurden aus dem Gefriermaterial RNA und Protein extrahiert. Dies erfolgte mit dem TRIzol®-Reagent der Firma Life Technologies, Karlsruhe.

##### 4.2.3.2 Allgemeine Vorbereitungen

Zum Schutz der RNA vor einem Abbau durch RNasen aus der Umgebung und aus dem Gewebe selbst sowie zum Schutz vor Kontamination der Proben sind folgende Vorbereitungen zu treffen:

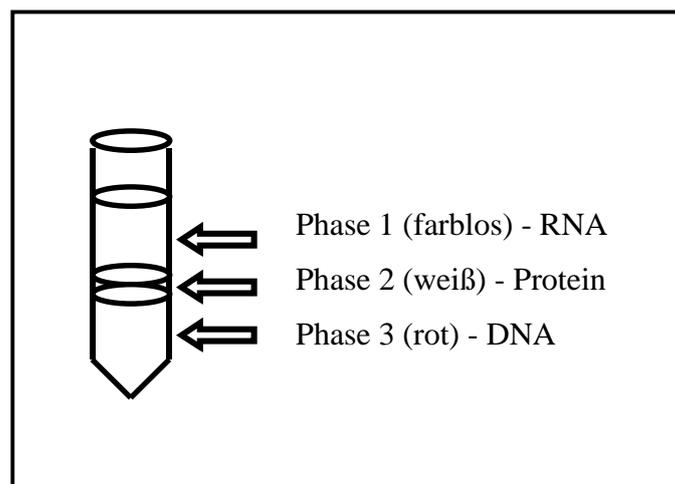
- RNase-freien Arbeitsplatz sicherstellen: Arbeitsplatz mit abs. Ethanol und RNase-AWAY® Reagent säubern
- RNase-freie Materialien sicherstellen: Glas, Porzellan, Metall und Arbeitsgeräte in Alufolie verpacken und für 4 Stunden bei  $180^{\circ}\text{C}$  im Sterilisator autoklavieren
- DEPC als RNase-Inhibitor zur Herstellung von RNase-freien Lösungen verwenden
- Lösungen (mit DEPC-Wasser), Mikroreaktionsgefäße und Pipettenspitzen bei  $120^{\circ}\text{C}$  autoklavieren

- frische Einmalhandschuhe verwenden (Reduzierung der Kontamination durch RNasen der Haut)
- Gewebe ständig in flüssigem Stickstoff aufbewahren
- vor Extraktion alle Arbeitsgeräte in flüssigem Stickstoff vorkühlen

#### 4.2.3.3 Extraktion

- Gewebe in einer Porzellanschale mit flüssigem Stickstoff mörsern
- ca. 100 mg Gewebe abwiegen und in ein 2 ml Eppendorf-Tube mit 1 ml TRIzol®-Reagent überführen
- Gewebe mit einem Homogenisator (Ultra-Turrax) auf höchster Geschwindigkeitsstufe homogenisieren
- 5 min bei RT stehen lassen
- 200 µl Trichlormethan zugeben
- Tube zusätzlich mit Parafilm verschließen und vortexen
- 5 min bei RT stehen lassen
- 15 min bei 4°C mit 14.160 x g zentrifugieren

Als Ergebnis ist eine Trennung in drei Phasen zu erkennen (Abb.12): die obere wässrige Phase ist farblos (RNA), die mittlere Phase ist weiß (Proteine) und die untere organische Phase ist rot und enthält DNA.



**Abb. 12:** Phasentrennung nach Zentrifugation

#### 4.2.3.4 Isolation der RNA

- Präzipitation

- Phase 1 (RNA) vorsichtig abpipettieren und in neues Eppendorf-Tube überführen (Verunreinigung durch Interphase vermeiden)
- Phasen 2 + 3 bis zur weiteren Verarbeitung in Kühlschrank lagern
- gleiche Menge (ca. 500  $\mu$ l) Isopropanol zur Phase 1 zupipettieren und vortexen
- 30 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  stehen lassen und anschließend vortexen
- 10 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit 14.160 x g zentrifugieren
  
- Waschen
  - Überstand verwerfen
  - Pellet mit 1 ml 70%igem Ethanol in DEPC-Wasser ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) lösen
  - 10 min in Eiswasser stellen und anschließend vortexen
  - 10 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit 14.160 x g zentrifugieren
  - diesen Schritt 1x wiederholen
  
- Resuspendieren
  - Überstand verwerfen
  - Pellet trocknen (ca. 20-30 min in Trockenschrank)
  - getrocknetes Pellet bei  $70^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad in 50  $\mu$ l DEPC-Wasser resuspendieren
  
- Bestimmung der Konzentration und der Reinheit der RNA

Die Menge an isolierter RNA (optische Dichte  $(\text{OD})_{260\text{nm}} 1 = 33 \mu\text{g RNA/ml}$ ) und die Bestimmung ihrer Reinheit erfolgte mittels Absorptions-Einstrahlphotometrie (Spektralphotometrie, BioPhotometer):

  - 0,1 M Tris-HCl-Puffer herstellen: 1,2 g Tris-HCl in 100 ml DEPC-Wasser lösen und pH 7,3 mit konzentrierter HCl einstellen
  - Leerwertbestimmung: 69  $\mu$ l sterilen 0,1 M Tris-HCl-Puffer in eine Kunststoff-Einmalküvette (UVette®) pipettieren und messen
  - Probenwertbestimmung: 1  $\mu$ l RNA zu 69  $\mu$ l Puffer geben und durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette gut mischen und messen
  
- Lagerung
  - Lagerung der RNA in Flüssigstickstoff

#### 4.2.3.5 Isolation der Proteine

- Präzipitation I
  - zu Phasen 2 +3 (siehe Abb. 12) 300 µl 100%iges Ethanol (-20°C) zupipettieren und vortexen
  - 5 min bei RT stehen lassen und anschließend vortexen
  - 10 min bei 4°C mit 14.160 x g zentrifugieren
  - Ergebnis: DNA im Pellet und Proteine im Überstand
  
- Präzipitation II
  - Überstand (ca. 600 µl) in ein 2 ml Eppendorf-Tube überführen
  - zum Überstand 1,5 ml Isopropylalkohol zupipettieren und vortexen
  - 5 min bei RT stehen lassen und anschließend vortexen
  - 10 min bei 4°C mit 14.160 x g UpM zentrifugieren
  
- Waschen
  - Überstand verwerfen
  - Pellet mit 2 ml 96%igem Ethanol (+ 0,3 M Guanidinhydrochlorid) lösen und vortexen
  - 30 min bei RT stehen lassen und anschließend vortexen
  - 10 min bei 4°C mit 14.160 x g zentrifugieren
  - Überstand verwerfen
  - diesen Schritt 2x wiederholen
  - Pellet in 2 ml 70%igem Ethanol lösen
  - 20 min bei RT stehen lassen und anschließend vortexen
  - 10 min bei 4°C mit 14.160 x g zentrifugieren
  
- Resuspendieren
  - Überstand verwerfen
  - Pellet ca. 30 min im Trockenschrank trocknen
  - 1%ige SDS-Lösung herstellen: 1g Laurylsulfat in 100 ml Aqua bidest. lösen
  - 1%ige SDS-Lösung zur Vermeidung proteolytischen Abbaus der Proteine mit Proteaseinhibitoren (Protease Inhibitor Cocktail, P-2714; PMSF (P-7626)) versetzen und mischen

- Pellet im Wasserbad bei 70°C in 500µl der „SDS-Proteaseinhibitor-Lösung“ resuspendieren
- 10 min bei 4°C mit 14.160 x g zentrifugieren
- Pellet verwerfen, Überstand in ein neues Tube überführen
  
- Bestimmung der Konzentration der Proteine (BCA-Methode)
  - BCA Protein Assay Reagent (Lösung A und B) bereitstellen
  - 100 µl Lösung A und 2 µl Lösung B pro zu messende Probe mischen
  - von der Mischung 95 µl in ein Eppendorf-Tube geben
  - 5 µl Proteinprobe dazugeben
  - 30 min bei 37°C im Wärmeschrank inkubieren

Die Messung der Menge an isoliertem Protein (Extinktion) erfolgte ebenfalls mittels Absorptions-Einstrahlphotometrie (Spektralphotometrie) am o.g. BioPhotometer.

- Leerwertbestimmung: Aqua bidest. in eine Kunststoff-Einmalküvette (UVette®) einfüllen und messen
- Probenwertbestimmung: 100 µl der Probe in eine neue Kunststoff-Einmalküvette einfüllen und messen
  
- Lagerung
  - Proben aliquotieren
  - Lagerung der Proben bei -20°C

#### 4.2.4 Nachweis der Cx43-Expression und Cx45-Expression auf Proteinebene mittels Western Blot (WB)

##### 4.2.4.1 Allgemeine Vorbemerkung zum WB

Beim sogenannten WB-Verfahren werden die einzelnen Komponenten einer Proteinmischung gelelektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht getrennt, anschließend mittels Elektroblothing auf eine Membran transferiert und damit immobilisiert. Auf der Membran werden die Proteine dann einer Nachweisreaktion unterzogen, welche für ein oder mehrere Proteine der aufgetrennten Mischung spezifisch ist.

Die in dieser Arbeit angewandte Nachweisreaktion ist die indirekte Methode des Avidin-Biotin-Komplexes (ABC). Nach Bindung des Primärantikörpers wird ein biotinylierter Sekundärantikörper zugegeben, welcher gegen den Primärantikörper gerichtet ist. Anschließend wird ein Avidin-Biotin-Komplex zugegeben. Mit der Substrat-Chromogen-Reaktion erfolgt die Sichtbarmachung der Reaktion.

Zur Darstellung von Cx43-Protein wurden Hodengewebssproben von präpubertären Hunden, von Hunden mit normaler Spermatogenese und von Hunden mit Sertoli Zelltumoren und Seminomen verwendet. Zur Darstellung von Cx45-Protein wurden Hodengewebssproben von adulten Hunden mit normaler Spermatogenese verwendet. Als Positivkontrolle diente für den Nachweis von Cx43 das Hodengewebe von Menschen mit normaler Spermatogenese und für den Nachweis von Cx45 mit Cx45 transfizierte HeLa-Zellen.

#### 4.2.4.2 Allgemeine Vorbereitungen

- Reinigung (Aqua bidest.) und Aufbau der Xcell *SureLock*<sup>TM</sup> Mini-Cell des NuPAGE® Electrophoresis Systems (Invitrogen, Karlsruhe) zur Durchführung der vertikalen, diskontinuierlichen SDS-PAGE bei neutralem pH-Wert

#### 4.2.4.3 Probenvorbereitung

- Proteinproben auftauen und vortexen
- 9,1 µl der Probe mit 3,5 µl 4x NuPAGE® LDS Sample Buffer und 1,4 µl 10x NuPAGE® Reducing Agent auf ein Gesamtvolumen von 14 µl zusammenmischen
- Proben vortexen und kurz zentrifugieren
- Proben 10 min im Wasserbad bei 70°C denaturieren

Als Kontrolle bzw. zum Vergleich des Molekulargewichts wurde eine Standardproteinmischung (Proteinmarker; SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard) verwendet.

#### 4.2.4.4 Gelelektrophorese

- Herstellung des Laufpuffers:
  - 1x NuPAGE® SDS Laufpuffer: 50 ml 20x NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen
  - 1x NuPAGE® SDS Laufpuffer + Antioxidant: 200 ml 1x NuPAGE® SDS Laufpuffer mit 500 µl NuPAGE® Antioxidant mischen

- 10 % NuPAGE® Bis-Tris Gel (+ MOPS Laufpuffer) aus der Verpackung nehmen und Gelkassette mit Aqua bidest. spülen
- den Klebestreifen vom Boden der Gelkassette lösen
- Taschenschablone aus dem Gel vorsichtig entfernen
- Probentaschen mit 1x NuPAGE® SDS Laufpuffer mittels Pipette spülen, Gelkassette umdrehen und schütteln um Laufpuffer zu entfernen; diesen Vorgang zwei mal wiederholen
- Gelkassette in die Xcell *SureLock*<sup>TM</sup> Mini-Cell Elektrophoresekammer einbauen
- innere Gelkammer mit 1x NuPAGE® MOPS SDS Laufpuffer + Antioxidant, äußere Gelkammer mit 1x NuPAGE® MOPS SDS Laufpuffer befüllen
- Proteinmarker (8 µl pro Spur) und Proben (10 µl pro Spur) durch den Laufpuffer hindurch mit der Hamiltonspritze auf den Taschenboden verbringen
- Hamiltonspritze zwischen den einzelnen Probenauftragungen mit Laufpuffer gründlich spülen
- Elektroden mit Stromgeber (Biometra Standard Power Pack P25, Biometra, Göttingen) verbinden

Die SDS-Gelelektrophorese fand bei einer konstanten Spannung von 200 V für 60 min statt.

#### 4.2.4.5 Elektroblotting

Unmittelbar nach Abschluß der Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine im „Semi-Dry-Blotting Verfahren“ auf eine Nitrozellulose Membran transferiert.

- Herstellung des Transferpuffers:
  - 1x NuPAGE® Transferpuffer: 50 ml 20x NuPAGE® Transfer Buffer, 1 ml NuPAGE® Antioxidant und 100 ml Methanol mit 849 ml Aqua bidest. auf 1 l auffüllen
- Inkubationsschale mit ca. 700 ml 1x NuPAGE® Transferpuffer befüllen und 5 Blotting pads des XCell II<sup>TM</sup> Blot Modules eintauchen bis die Blotting pads vollständig durchtränkt sind und keine Luftblasen mehr entweichen
- zwei Filterpapiere und die Nitrozellulose Membran für einige min in ca. 50 ml 1x NuPAGE® Transferpuffer einweichen
- Blotting Apparatur (Xcell *SureLock*<sup>TM</sup> Mini-Cell Kammer, Invitrogen) bereitstellen

- Gel nach Beendigung der Gelektrophorese aus der Kammer nehmen, die obere Plastikplatte mit Hilfe des Gel-Messers ablösen und die Einfüllspuren mit dem Gel-Messer entfernen
- ein Stück eingeweichtes Filterpapier auf das Gel legen, umdrehen und Gel und Filterpapier von der unteren Plastikplatte lösen
- Blotting Sandwich aufbauen (luftblasenfrei von unten nach oben):
  - zwei mit 1x NuPAGE® Transferpuffer durchtränkte Blotting pads in die Kathode des XCell II™ Blot Modules legen
  - Filterpapier
  - Gel
  - Nitrozellulose Membran
  - Filterpapier
  - 3 mit 1x NuPAGE® Transferpuffer durchtränkte Blotting pads
- obere Elektrodenplatte (Anode) aufsetzen
- Blot Modul fest zusammendrücken und in die Blotting Kammer einlegen
- Blot Modul mit 1x NuPAGE® Transferpuffer befüllen
- äußere Kammer mit Aqua bidest. befüllen
- Deckel auf die Einheit setzen und Elektrode mit Stromgeber verbinden

Das Elektroblothing fand bei einer konstanten Spannung von 30 V für 60 min statt.

- Nitrozellulose Membran nach Beendigung des Transfers auf der dem Gel zugewandten Seite kennzeichnen

#### 4.2.4.6 Nachweisreaktion

Es wurden kommerziell erhältliche Primär- und Sekundärantikörper, Detektionssysteme und Farbstoffe für die Nachweisreaktion verwendet und ein im Labor von Thomas Steinberg (Washington University, St. Louis, USA) hergestellter polyklonaler anti-Cx45-Antikörper (Lecanda et al., 1998) (Kaninchen-anti-Maus).

- Blockierung unspezifischer Bindungsstellen
  - Blockpuffer I herstellen:
    - 0,1 M PBS-Puffer herstellen: 1 Tablette PBS in 200 ml Aqua bidest. lösen, pH 7,4 mit NaOH bzw. HCl einstellen

- Blockpuffer I (5%iges Milchpulver herstellen): 0,75 g entfettetes Trockenmilchpulver in 15 ml 0,1 M PBS (pH 7,4) lösen
- Nitrozellulose-Membran mit der dem Gel zugewandten Seite nach oben in eine Inkubationsschale legen
- Inkubationsschale mit Blockpuffer I füllen
- Membran unter langsamen Schwenken auf Wippschüttler für 60 min bei RT blocken
- Blockpuffer I entfernen
  
- Inkubation mit primärem Antikörper  
Es wurden ein polyklonaler anti-Cx43-Antikörper der Firma Zymed, San Francisco, US, Kaninchen-anti-Ratte, Nr. 71-0700, mit der Verdünnung 1:500; und ein polykloner anti-Cx45-Antikörper von Dr. Tom Steinberg, Washington University, St. Louis, USA, mit der Verdünnung 1:500 verwendet.
  - Waschpuffer herstellen:
    - 100 ml 1x 0,1 M PBS (pH 7,4), 1,0 g BSA (1 %), 0,1 g (0,1 %) Tween 20 mischen
  - Primärantikörper-Lösung herstellen:
    - Cx43: 10 ml 1x 0,1 M PBS (pH 7,4), 0,1 g BSA (1 %) und 0,01 g Tween 20 (0,1 %) mischen, 20 µl Antikörper hinzu pipettieren und erneut gut mischen
    - Cx45: 10 ml 1x 0,1 M PBS (pH 7,4), 0,1 g BSA (1 %) und 0,01 g Tween 20 (0,1 %) mischen, 20 µl Antikörper hinzupipettieren und erneut gut mischen
  - Primärantikörper-Lösung auf die Membran geben und über Nacht bei RT unter langsamen Schwenken (Wippschüttler) inkubieren
  - Primärantikörper-Lösung entfernen
  - Membran 3 x 5 min bei RT unter langsamen Schwenken auf Wippschüttler mit Waschpuffer waschen
  - Waschpuffer entfernen
  
- Blockierung unspezifischer Bindungsstellen
  - Blockpuffer II (5%iges Ziegen Serum) herstellen:
  - 10 ml 1x 0,1 M PBS (pH 7,4) mit 0,5 ml Ziegen Serum mischen

- Blockpuffer II auf die Membran geben und für 30 min bei RT auf Wippschüttler inkubieren
- Blockpuffer II entfernen
  
- Inkubation mit sekundärem Antikörper  
Es wurden biotinylierte Ziege-anti-Kaninchen Immunglobuline der Firma DAKO, Hamburg, Nr. E0432, mit der Verdünnung 1:1000 verwendet.
  - Sekundärantikörper-Lösung herstellen:
    - 10 ml 1x 0,1 M PBS (pH 7,4), 0,1 g BSA (1 %) und 0,01 g Tween 20 (0,1 %) mischen, 10 µl Zweitantikörper zupipettieren und erneut gut mischen
  - Sekundärantikörper-Lösung auf die Membran geben und für 60 min bei RT unter langsamem Schwenken (Wippschüttler) inkubieren
  - Sekundärantikörper-Lösung entfernen und die Membran 4 x 5 min bei RT unter langsamem Schwenken auf Wippschüttler mit Waschpuffer waschen
  - Waschpuffer entfernen
  
- Inkubation mit ABC-Kit
  - ABC-Kit (Vector Vectastain ABC-Elite Kit Standard) ansetzen:
    - 10 ml 0,1 M Tris-HCl mit 4 Tropfen der Lösung A und 4 Tropfen der Lösung B mischen
  - ABC-Kit in Inkubationsschale geben und für 60 min bei RT unter langsamen Schwenken auf Wippschüttler inkubieren
  - ABC-Kit entfernen und Membran dreimal 10 min bei RT unter langsamen Schwenken auf Wippschüttler mit Waschpuffer waschen
  - Waschpuffer entfernen
  
- Farbreaktion
  - True Blue Peroxidase Substrate-Lösung in Inkubationsschale auf die Membran geben und für 5 min bei RT unter langsamen Schwenken auf Wippschüttler inkubieren
  - Visualisierungslösung entfernen und Farbreaktion durch dreimaliges Waschen der Membran mit Aqua bidest. stoppen
  - Membran im Trockenschrank bei 37°C im Dunkeln trocknen lassen

Bei jedem Färbevorgang wurden Negativkontrollen mitgeführt und wie im Protokoll beschrieben behandelt, ausgenommen der Inkubation mit dem primären Antikörper, welche durch Inkubation mit dem Blockpuffer I ersetzt wurde.

#### 4.2.4.7 Dokumentation

Die Dokumentation und Auswertung der Signale der Farbreaktion erfolgte mit Hilfe eines Scanners (AV630 CS) sowie mit Hilfe der Silver Fast Ai 5.5 Software der Firma Laser Soft Imaging, Kiel.

### 4.2.5 Nachweis der Cx43-Expression und Cx45-Expression auf mRNA-Ebene mittels Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

#### 4.2.5.1 Allgemeine Vorbemerkung zur RT-PCR

Die PCR ist eine in-vitro-Technik, mit der man gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt werden, vervielfältigen kann. Um RNA mit Hilfe einer PCR zu vervielfältigen, wandelt man zunächst die instabile RNA mittels der Reversen Transkription in eine stabilere cDNA um. In einer anschließenden PCR kann man durch den Einsatz von spezifischen Primern die gesuchte cDNA vervielfältigen. Die PCR besteht aus folgenden Schritten: Denaturierung der doppelsträngigen DNA, Bindung der Primer an die DNA (Hybridisierung), Verlängerung der Primer (Amplifikation).

Die Untersuchungen der Cx43- und Cx45-Expression auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR wurde zunächst an aus Hodenhomogenat extrahierter Gesamt-RNA durchgeführt. Da Cx43 in den Leydig Zellen exprimiert wird, wurden für Cx43 zusätzlich nur die Zellen des Keimepithels mit Hilfe der UV-Laser-assistierten Mikrodissektion untersucht. Durch diese Methode konnte eine höhere Sensitivität und Spezifität der Untersuchungen erreicht werden.

Zur Darstellung der Cx43-mRNA mittels RT-PCR aus Hodenhomogenat sowie aus mikrodissezierten Zellen wurden Hodengewebsproben von präpubertären Hunden, von Hunden mit normaler Spermatogenese und von Hunden mit Sertoli Zelltumoren und Seminomen verwendet. Zur Darstellung der Cx45-mRNA mittels RT-PCR aus Hodenhomogenat wurden Hodengewebsproben von adulten Hunden mit normaler Spermatogenese verwendet.

#### 4.2.5.2 RT-PCR am Hodenhomogenat

Im folgenden ist das Arbeitsprotokoll für die durchgeführte RT-PCR, ausgehend von Gesamt-RNA, dargestellt:

- DNase Behandlung

Um sicherzustellen, dass nach der Extraktion und Isolierung der Gesamt-RNA mittels TRIzol®-Reagent keine Verunreinigung mit genomischer DNA vorhanden war, wurde eine DNase-Behandlung durchgeführt.

- Reaktionsansatz pro Probe:

- 2 µl 10x DNase I-Puffer
- 1 µl DNase I, RNase frei
- 0,25 µl RNase-Inhibitor
- 6,65 µl mRNA (entspricht 200 ng/µl mRNA)
- Proben kurz anzentrifugieren
- im Thermocycler 10 min bei 37°C mit RNase-freier DNase I (10U/µl; Roche, Mannheim, Germany; 1-3 U/µg RNA) inkubieren, um genomische DNA zu verdauen
- 5 min bei 75°C inkubieren um die DNase-Aktivität zu stoppen

- cDNA-Synthese

- 10 µl Ansatz:
  - 2 µl 5 mM MgCl<sub>2</sub>
  - 1 µl 10x PCR-Puffer
  - 1 µl 10 mM dGTP
  - 1 µl 10 mM dTTP
  - 1 µl 10 mM dATP
  - 1 µl 10 mM dCTP
  - 0,5 µl 2,5 µM Random Hexamers
  - 0,5 µl RNase-Inhibitor (1 U/µl)
  - 0,5 µl Reverse Transkriptase (2,5 U/µl)
  - 1,5 µl RNA (DNase-behandelt)

- Im T3 Thermocycler wurde folgendes Programm durchlaufen:

- Schritt 1: 8 min bei 21°C
  - Schritt 2: 15 min bei 42°C
  - Schritt 3: 5 min bei 99°C
  - Schritt 4: 5 min bei 5°C
- Lagerung der cDNA bei -20°C
- Auswahl der Primer:

Zur Detektierung der Cx43- und Cx45-mRNA wurden unterschiedliche Primerpaare verwendet. Zum einen wurde ein selbst ausgesuchtes Primerpaar verwendet. Zum anderen handelt es sich um ein Primerpaar, welches in der Literatur von Di et al. (Di et al., 2001) für die Amplifikation der Cx45-mRNA des Menschen beschrieben wurde. Die Sequenzen der Primerpaare lauteten wie folgt:
- selbst ausgesuchte Primerpaare
    - Cx43 Upstream-Primer:  
5'-CCA TCT CTA ACT CCC ATG CAC AGC-3'
    - Cx43 Downstream-Primer:  
5'-TGG CAC GAC TGC TGG CTC TGC TT-3'
    - Größe des Amplifikates: 137 bp, Name „Cx43 I“  
NCBI Accession Number: NM\_000165
- Primerpaare aus der Literatur:
    - Cx45 Upstream-Primer:  
5'-GGA GCT TTC TGA CTC GCC TG-3'
    - Cx45 Downstream-Primer:  
5'-CGG CCA TCA TGC TTA GGT TT-3'
    - Größe des Amplifikates: 487 bp, Name „Cx45 I“  
Accession Number: U03493
- Als interne Kontrolle und zur Beurteilung der Qualität der extrahierten RNA wurde jede Probe mittels eines „Housekeeping Genes“, hier  $\beta$ -Aktin, überprüft. Die Sequenzen der selbst gewählten Primer lauten wie folgt:

- $\beta$ -Aktin-Primer:  
Upstream-Primer:  
5'-TTC CTT CCT GGG CAT GGA GT-3'  
Downstream-Primer:  
5'-TAC AGG TCT TTG CGG ATG TC-3'  
Größe des Amplifikates: 90 bp; "β-Aktin 90"

Die Primerpaare wurden von der Firma MWG Biotech GmbH, Ebersberg synthetisiert.

- PCR

Es wurden verschiedene Bedingungen für die PCR verwendet. Für die selbst ausgesuchten Cx43 I Primerpaare wurde eine PCR mit abnehmender Hybridisierungstemperatur durchgeführt (Touchdown-PCR) zur Erleichterung der optimalen Hybridisierung des Amplimers mit dem Zielmolekül und zur Verminderung der Bildung von Artefakten und Primerdimeren.

Zum anderen wurde für die Primerpaare aus der Literatur das an entsprechender Stelle beschriebene Programm (Di et al., 2001) verwendet.

- 50  $\mu$ l Ansatz:
  - 31,75  $\mu$ l Aqua bidest.
  - 4  $\mu$ l 10x PCR-Puffer
  - 2  $\mu$ l 50 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung
  - 1  $\mu$ l 5' Primer (10 pmol)
  - 1  $\mu$ l 3' Primer (10 pmol)
  - 10  $\mu$ l cDNA
  - 0,25  $\mu$ l Amplitaq Gold DNA Polymerase (5U/ $\mu$ l)
- Im T3-Thermocycler (Biometra, Göttingen) wurden folgende Primer-spezifischen PCR-Programme für Cx43 und Cx45 durchlaufen:
  - Primer Cx43 I  
Schritt 1: 95°C, 10 min  
Schritt 2: 95°C, 1 min  
Schritt 3: 66°C, 1 min  
Schritt 4: 72°C, 2 min  
Schritte 2-4 10 x wiederholen

Schritt 5: 95°C, 10 min

Schritt 6: 62°C, 1 min

Schritt 7: 72°C, 2 min

Schritte 5-7 25 x wiederholen

Schritt 8: 72°C, 10 min

Schritte 1, 2, 5 = Denaturierung

Schritte 3, 6 = Annealing

Schritte 4, 7 = Amplifikation

Schritt 8 = Vervollständigung der Amplifikation

- Primer Cx45 I

Schritt 1: 95°C, 10 min

Schritt 2: 95°C, 1 min

Schritt 3: 66°C, 1 min

Schritt 4: 72°C, 2 min

Schritte 2 - 4 35 x wiederholen

Schritt 5: 72°C, 10 min

Schritte 1, 2 = Denaturierung

Schritt 3 = Hybridisierung

Schritt 4 = Amplifikation

Schritt 5 = Vervollständigung der Amplifikation

- Primer  $\beta$ -Aktin 90

Schritt 1: 95°C, 10 min

Schritt 2: 94°C, 1 min

Schritt 3: 55°C, 1 min

Schritt 4: 72°C, 1 min

Schritte 2-4 35 x wiederholen

Schritt 5: 72°C, 10 min

Schritte 1, 2 = Denaturierung

Schritt 3 = Hybridisierung

Schritt 4 = Amplifikation

Schritt 5 = Vervollständigung der Amplifikation

- Es wurde nur mit gestopften Spitzen pipettiert und nur spezielle dünnwandige PCR-Tubes verwendet.
- Kontrolle der RT-PCR durch Agarosegelelektrophorese (DNA-Gel)  
Zur Auftrennung der PCR-Amplifikate wurden die Proben in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer (Mini®-Gelelektrophorese-Apparatur) auf ein 2%iges Agarose-Gel aufgetragen.
  - Laufpuffer (1x TAE-Puffer) herstellen:
    - 10x TAE-Puffer: 48,4 g Tris, 11,4 ml Essigsäure, 20 ml 0,5 M EDTA mischen, pH 8,0 einstellen und auf 1 l mit Aqua bidest. auffüllen
    - 1x TAE-Puffer: 100 ml 10x TAE-Puffer mit 900 ml Aqua bidest. mischen
  - Auftragspuffer herstellen:
    - 0,05 g Bromphenolblau (0,5 ml aus 1%iger Lösung), 0,05 g Xylencyanol (0,5 ml aus 1%iger Lösung), 3 g Ficoll400, 3 ml 0,5 M EDTA mischen
    - mit 1x TAE-Puffer auf 20 ml auffüllen und filtrieren
  - Herstellung des 2%igen Agarose-Gels (Mini-Gel)
    - 0,6 g Agarose in 30 ml 1x TAE-Puffer pH 8,0 suspendieren
    - Agarose-Suspension in der Mikrowelle vorsichtig aufkochen und bei RT auf ca. 60 - 65°C abkühlen lassen
    - Agarose-Lösung luftblasenfrei in ein Geltaflett gießen
    - 30 min bei RT erstarren lassen
    - Taschenschablone und Gummi-Endblöcke entfernen
    - Geltaflett in die Elektrophoresekammer einsetzen
    - Elektrophoresekammer mit Laufpuffer bis ca. 0,5 cm oberhalb des Agarosegels füllen
  - Probenvorbereitung und Laden der Proben
    - 15 µl der Probe mit 5 µl Auftragspuffer versetzen
    - das Gemisch in die Geltaschen pipettieren

Zur Bestimmung der Fragmentgröße der zu untersuchenden Proben wurde ein DNA-Größenstandard (100 bp Marker; 100 bp DNA-Ladder) auf das Gel aufgetragen:

- Vorbereitung und Laden des Markers
  - 2 µl 1:10 mit Aqua bidest. verdünntem 100 bp Marker mit 2 µl Auftragspuffer und 8 µl Aqua bidest. versetzen
  - das Gemisch in eine Geltasche pipettieren
- Gelelektrophorese
  - Sicherheitsdeckel der Elektrophoresekammer schließen
  - Sicherheitsstecker mit Stromgeber (PowerPac 200 Power Supply) verbinden
  - Elektrophorese 30 min bei einer Spannung von 200 V laufen lassen
  - Stromgeber ausschalten und Geltafett aus der Elektrophoresekammer nehmen
  - Gel in einer Inkubationsschale mit 60 ml 1x TAE-Puffer, pH 8,0 und 6 µl SYBR-Green 30 min auf Schüttler inkubieren

- Detektion und Dokumentation

Die Detektion der elektrophoretisch getrennten Proben erfolgte mittels UV-Licht (High Performance Ultraviolet Transilluminator).

Die Ergebnisse wurden mittels Polaroid GelCam dokumentiert, unter Verwendung von Polaroid-Sofortbildfilmen (unbeschichtete schwarz/weiß-Filme, Typ 667).

#### 4.2.5.3 RT-PCR nach UV-LACP

Bei der UV-Laser-assistierten Mikrodisektion werden aus einem Paraffinschnitt, oder, wie in dieser Arbeit, aus einem Gefrierschnitt mit Hilfe eines fokussierten UV-Lasers vorher ausgewählte Zellen oder Zellgruppen herausgeschnitten und durch das sog. „Laser-Pressure Catapulting“, kurz LPC, mit Laser-Energie aus dem Gewebe herauskatapultiert. Die Zellen oder Zellgruppen werden im Deckel eines Mikrozentrifugenröhrchens aufgefangen und stehen nun für eine anschließende molekularbiologische Analyse zur Verfügung.

Die einzelnen Arbeitsschritte sind im Folgenden in chronologischer Reihenfolge aufgeführt:

#### 4.2.5.4 Vorbereitungen

- Arbeitsplatz und Geräte
  - RNase freien Arbeitsplatz und RNase freie Geräte sicherstellen (siehe Extraktion von RNA und Protein)
  
- Vorbereitung der Objektträger
  - die mit einer Membran beschichteten Objektträger (Palm® Membrane Slides) für 30 min mit UV-Licht (Wellenlänge 254 nm) aus ca. 15 cm Entfernung für eine bessere Haftung der Schnitte bestrahlen
  
- Herstellung und Färbung von Gefrierschnitten
  - 10 µm dicke Gefrierschnitte nach dem Protokoll zur Herstellung von Gefrierschnitten für die IHC anfertigen
  - Schnitte mit einem Membran-beschichteten Objektträger aufnehmen und 1 Minute bei RT trocknen lassen
  - Schnitte für 30 sec mit Hämatoxylin überschichten, in DEPC-Wasser abspülen
  - Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe dehydrieren:
    - 10 sec in 70%igem Alkohol (Ethanol)
    - 10 sec in 80%igem Alkohol (Ethanol)
    - 10 sec in 96%igem Alkohol (Ethanol)
  - Schnitte trocknen lassen
  - jeden einzelnen Schnitt mit DAKO-Pen umkreisen
  - Schnitte bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C in steriler Standkuvette aufbewahren

#### 4.2.5.5 Ablauf der UV-LACP

Die UV-Laser assistierte Mikrodisektion erfolgte mit Hilfe des Palm® MicroBeam Systems. Das System bestand aus folgenden Komponenten:

- inverses Hochleistungsmikroskop (Axiovert 135)
- motorisierter und über eine Computer-Maus manuell steuerbarer Objektisch
- mit dem Computer sowie mit dem Mikroskop verbundener integrierter Laser (Nitrogen/Stickstoff-Laser mit 337 nm) zum Ausschneiden der gewünschten Zellen
- mit dem Computertisch verbundene Color Video Camera

- Software (Palm® RoboSoftware) zur Steuerung der Mikrodissektion

Die Mikrodissektion lässt sich in vier Arbeitsschritte untergliedern, die im Folgenden für die Isolierung eines Gemisches aus Sertoli-Zellen und Keimzellen des Hundes mit normaler Spermatogenese exemplarisch dargestellt sind (Abb. 13 a-d):

- Auswahl der interessierenden Zellen am Gefrierschnitt mittels Mikroskop bzw. Monitor (Abb. 13 a)
- Markierung der späteren Schnittlinie mit Hilfe der Software (Abb. 13 b)
- Automatisches Umschneiden des ausgewählten Areals mit Hilfe des Laserstrahls (Abb. 13 c)
- Herauskatapultieren des ausgeschnittenen Areals mit Hilfe des „Laser-Pressure Catapulting“ (Abb. 13 d)



**Abb. 13 a-d:** Darstellung der UV-Laser assistierten Mikrodissektion am Beispiel eines Keimtubulus mit Sertoli- und Keimzellen eines adulten Hundes mit normaler Spermatogenese, Primärvergrößerung x 20, Erklärung im Text.

Das herauskatapultierte Gewebe wird im Deckel eines Mikrozentrifugenröhrchens, welcher mit 2,5 µl sterilem Mineralöl ausgekleidet ist, aufgefangen und steht nach anschließender kurzer Zentrifugation zur weiteren Behandlung im Boden des Mikrozentrifugenröhrchens zur Verfügung. In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Ansätze mittels der Mikrodissektion angefertigt. Zum einen wurden aus dem Hodengewebe von präpubertären Hunden und von Hunden mit normaler Spermatogenese sämtliche Keimzellen und Sertoli Zellen aus dreißig Tubuli seminiferi pro Ansatz und ca. fünfundvierzig interstitielle Bereiche mit Leydig Zellen ausgeschnitten und im Deckel eines Zentrifugenröhrchens gesammelt. Zum anderen wurden aus caninen Sertoli Zelltumoren und aus caninen Seminomen dreißig vergleichbar große Bereiche pro Ansatz ausgeschnitten und gesammelt.

#### 4.2.5.6 Extraktion der RNA

Zur Extraktion der Gesamt-RNA des mikrodissezierten Gewebes wurde das RNA-Extraktionskit RNeasy Micro Kit verwendet. Das abgeänderte Protokoll („Total RNA Isolation from Microdissected Cryosections“) lautete wie folgt:

- Gebrauchslösung herstellen:
  - Puffer RPE vorbereiten:
    - 11 ml Puffer RPE (Buffer RPE) mit 44 ml reinem Ethanol verdünnen (Aufbewahrung bei RT)
  - Puffer RLT vorbereiten:
    - 10 µl β-Mercaptoethanol mit 1 ml Puffer RLT (Buffer RLT; Aufbewahrung bei RT für einen Monat)
  - Träger RNA-Gebrauchslösung herstellen:
    - Stammlösung herstellen: „carrier RNA“ in 1 ml RNase freiem Wasser (RNase-free water) lösen und aliquotieren (Konzentration: 310 ng/µl; Aufbewahrung bei -20°C)
    - Stammlösung verdünnen: 5 µl der Stammlösung mit 34 µl Puffer RLT mischen
    - Gebrauchslösung herstellen: 6 µl verdünnte Stammlösung mit 54 µl Buffer RLT mischen (Endkonzentration: 4 ng/µl)
  - DNase I Stammlösung herstellen:
    - DNase I (1500 Kunitz units) in 500 µl RNase freiem Wasser lösen (nicht vortexen)

## Material und Methoden

- Lösung aliquotieren, Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für bis zu 9 Monate
- 80%iges Ethanol herstellen:
  - 24 ml reines Ethanol mit 6 ml RNase freiem Wasser mischen
- 70%iges Ethanol herstellen:
  - 21 ml reines Ethanol mit 9 ml RNase freiem Wasser mischen
- Extraktion:
  - mikrodissiziertes Gewebe direkt nach der Zentrifugation mit 350  $\mu\text{l}$  Puffer RLT versetzen
  - 5  $\mu\text{l}$  Träger-RNA Gebrauchslösung zugeben
  - 30 sec vortexen
- Die so behandelte Probe kann bei  $-70^{\circ}\text{C}$  für mehrere Monate aufbewahrt werden und nach anschließendem Auftauen bei RT wie folgt weiterverarbeitet werden:
  - 350  $\mu\text{l}$  70%iges Ethanol zugeben
  - die Probe in ein Säulchen (RNeasy MinElute Spin Column) welches in einem 2 ml Sammelgefäß steckt, geben
  - das Säulchen 15 sec bei RT mit 9.830 x g zentrifugieren
  - Durchfluss verwerfen
  - 350  $\mu\text{l}$  Puffer RW1 (Buffer RW1) zugeben und 15 sec bei RT mit 9.830 x g zentrifugieren
  - Durchfluss verwerfen
  - 10  $\mu\text{l}$  DNase Stammlösung mit 70  $\mu\text{l}$  Puffer RDD (Buffer RDD) mischen und die Lösung direkt auf die Membran des Säulchens geben
  - 15 min bei RT inkubieren
  - 350  $\mu\text{l}$  RW1 zugeben und 15 sec bei RT mit 9.830 x g zentrifugieren
  - Durchfluss verwerfen
  - 500  $\mu\text{l}$  80%iges Ethanol zugeben und für 2 min bei RT mit 9.830 x g zentrifugieren
  - Überstand und Sammelgefäß verwerfen, Säulchen in ein neues 2 ml Sammelgefäß stecken
  - mit offenem Deckel 5 min bei RT mit 31.870 x g zentrifugieren, um sämtliches Ethanol zu entfernen

- Durchfluss und Sammelgefäß verwerfen, Säulchen in ein neues 1,5 ml Sammelgefäß geben
- 14 µl RNase freies Wasser direkt auf die Membran geben und 1 Minute bei RT mit 31.870 x g zentrifugieren; die gelöste RNA befindet sich im Sammelgefäß

#### 4.2.5.7 RT-PCR

Im folgenden ist das Arbeitsprotokoll für die durchgeführte RT-PCR, ausgehend von der extrahierten Gesamt-RNA aus mikrodisssezierten Zellen, dargestellt:

- cDNA-Synthese
  - 20 µl Ansatz:
    - 2,6 µl DEPC-Wasser
    - 2 µl 10x RT-Puffer
    - 2 µl 5 mM dNTP
    - 0,4 µl 50 µM Oligo-dT-Primer
    - 1 µl Sensiscript reverse transcriptase (4 U/µl)
    - 12 µl Probe
  - im T3 Thermocycler wurde folgendes Programm durchlaufen :
    - Schritt 1: 37°C, 60 min
    - Schritt 2: 93°C, 5 min

- PCR

Für die PCR aus mikrodissseziertem Gewebe wurde das o.g. Primerpaar mit dem Namen Cx43 I (Größe des Amplifikates: 137 bp) verwendet, da aufgrund der geringen Stabilität der Nukleinsäuren aus mikrodissseziertem Gewebe das Amplikon eine Größe von 200 bp nicht überschreiten sollte.

Da die RNA-Ausbeute bei mikrodissseziertem Gewebe sehr gering war, wurde als interne Kontrolle für jede Probe das „Housekeeping Gene“ β-Aktin mitgeführt. Die Sequenz der Primer β-„Aktin 90“ siehe unter Kapitel 3.2.5.2.

- 20 µl-Ansatz:
  - 2,6 µl DEPC-Wasser

## Material und Methoden

- 2  $\mu$ l 10x Puffer
  - 4  $\mu$ l 5x Q-Solution
  - 0,4  $\mu$ l 10 mM dNTP
  - 0,4  $\mu$ l upstream Primer (10 pmol/ $\mu$ l)
  - 0,4  $\mu$ l downstream Primer (10 pmol/ $\mu$ l)
  - 0,2  $\mu$ l Taq-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)
  - 10  $\mu$ l cDNA
- im T3 Thermocycler wurde das o.g. Programm für das Primerpaar Cx43 I mit folgenden Änderungen durchlaufen:
- Schritt 2-4 15 x wiederholen
  - Schritt 5-7 35 x wiederholen
- das Programm für das Primerpaar „ $\beta$ -Aktin 90“ entsprach dem o.g. Programm für  $\beta$ -Aktin mit folgenden Änderungen:
- Schritt 2-4 50 x wiederholen
- es wurde nur mit gestopften Pipettenspitzen pipettiert und es wurden nur spezielle dünnwandige PCR-Tubes verwendet.
- Kontrolle der PCR durch Agarose Gelelektrophorese (DNA-Gel) / Detektion / Dokumentation
    - die Auftrennung der PCR-Amplifikate sowie die Detektion und Dokumentation erfolgte wie unter Punkt 3.2.5.2 beschrieben

#### 4.2.6 In-situ-Hybridisierung (ISH)

##### 4.2.6.1 Allgemeine Vorbemerkungen zur ISH

Bei der ISH werden Digoxigenin-markierte cRNA-Sonden, die mit der komplementären mRNA der Zelle binden, mittels Anti-Digoxigenin-Antikörper detektiert und mit Hilfe einer Farbreaktion visualisiert. Dieses Verfahren wird benutzt, um spezifisch mRNA einer bestimmten Zielsequenz in situ nachzuweisen.

Markierte RNA-Sonden hoher spezifischer Aktivität können durch In-vitro-Transkription klonierter DNA-Fragmente hergestellt werden. In dieser Arbeit wurden die zu Cx43 komplementären „antisense“-Sonden zur Detektion der entsprechenden mRNA in der Zelle hergestellt. Die zu Cx43 sequenzidentischen „sense“-Sonden dienten als Negativkontrolle.

Für die Sondenherstellung wurde eine humane Hodenprobe mit normaler Spermatogenese mit Trizol® Reagent extrahiert und mit DNase behandelt. Ein 137 bp (Cx43) langes mRNA-Fragment wurde mittels RT-PCR amplifiziert. Für dieses Verfahren wurden die Primer der bereits durchgeführten RT-PCR verwendet. Die PCR-Fragmente wurden in einer 2%igen Agarose-Gelelektrophorese separiert, unter UV-Licht aus dem Gel geschnitten und mit einem DNA-Purifikationskit aufgereinigt. Das gewonnene Cx43-Fragment wurde in ein Plasmid inseriert (pGEM®-T Vektor, Abb. 14, 15) und anschließend in einem Bakterium (E.coli, Eco XL-1 Blue) vervielfältigt.

Nach der Klonierung folgte die Separierung der Plasmide aus dem Bakterium mit Hilfe eines QIAprep Spin Plasmid Kits nach Anleitung des Herstellers. Um Erfolg und Spezifität der Klonierung zu prüfen wurde das Cx43-Insert mit Hilfe zweier Restriktionsenzyme mit spezifischen Schnittstellen (Not-I, Nco-I; Abb. 14) von dem Plasmid getrennt und in einer 2%igen Agarose-Gelelektrophorese unter UV-Licht nachgewiesen.

Bei der anschließenden Linealisierung der Plasmide mit jeweils Not-I und Nco-I entstehen zwei „lineare“ Plasmide mit endständigen Inserts. Die Inserts werden durch Hinzufügen zweier RNA-Polymerasen (T7 und SP-6), deren spezifischen Initiationsstellen und Promotoren sich auf dem Plasmid befinden, in eine „antisense“- bzw. „sense“-Richtung transkribiert.

Die Identität der Cx43-Inserts wurde durch Sequenzierung bestätigt (Qiagen).

##### 4.2.6.2 Herstellung der Sonden

Im Folgenden ist das Arbeitsprotokoll für die durchgeführte Sondenherstellung, ausgehend von der extrahierten Gesamt-RNA mit nachfolgender RT-PCR und anschließender Gelelektrophorese aus Hodenhomogenat, dargestellt:

- Aufreinigung des PCR-Fragmentes (QIAEX II Kit, Qiagen)
  - Gewünschte Bande unter UV-Licht-Kontrolle aus dem Gel mit einem sterilen Skalpell ausschneiden
  - Gelstück in einem 1,5 ml Eppendorf Tube wiegen
  - 3 x Volumen Puffer QX1 zu 1 x Gewicht des Gelstückes dazugeben
  - QIAEX II-Lösung resuspendieren (30 sec vortexen)
  - 30-60 µl QIAEX II-Lösung zupipettieren, mischen
  - 10 min im Wasserbad bei 50°C (während der Inkubation alle 2 min kurz vortexen)
  - 30 sec bei 16.620 x g zentrifugieren
  - Überstand verwerfen
  - 500 µl Puffer QX1 dazugeben, vortexen
  - 30 sec bei 16.620 x g zentrifugieren
  - Überstand verwerfen
  - 500 µl Puffer PE dazugeben, vortexen
  - Überstand verwerfen
  - Diesen Schritt 1x wiederholen
  - Pellet 10-15 min bei 37°C trocknen
  - 20 µl Aqua bidest. zupipettieren, mischen
  - 5 min bei RT stehen lassen
  - 30 sec bei 16.620 x g zentrifugieren
  - DNA im Überstand

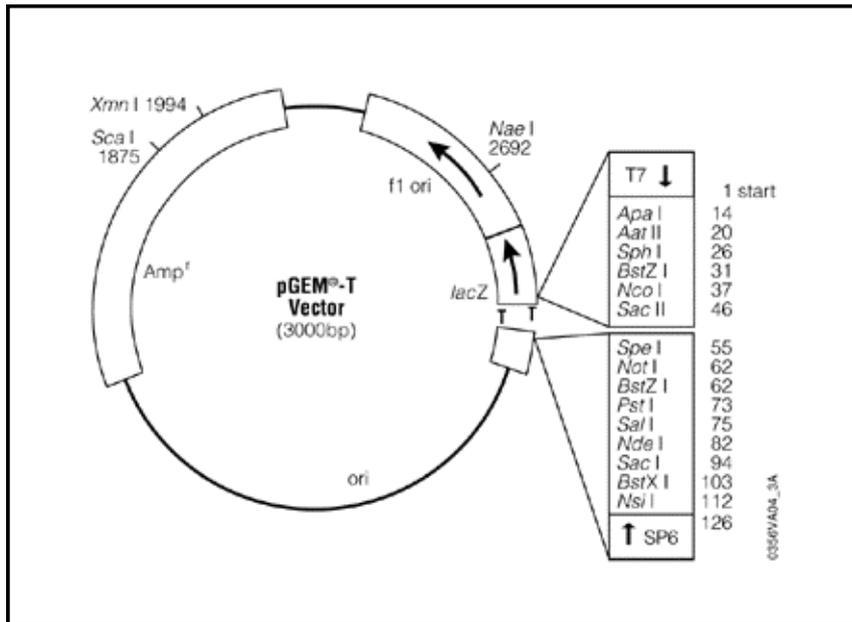


Abb. 14: pGEM<sup>®</sup>-T Vektor

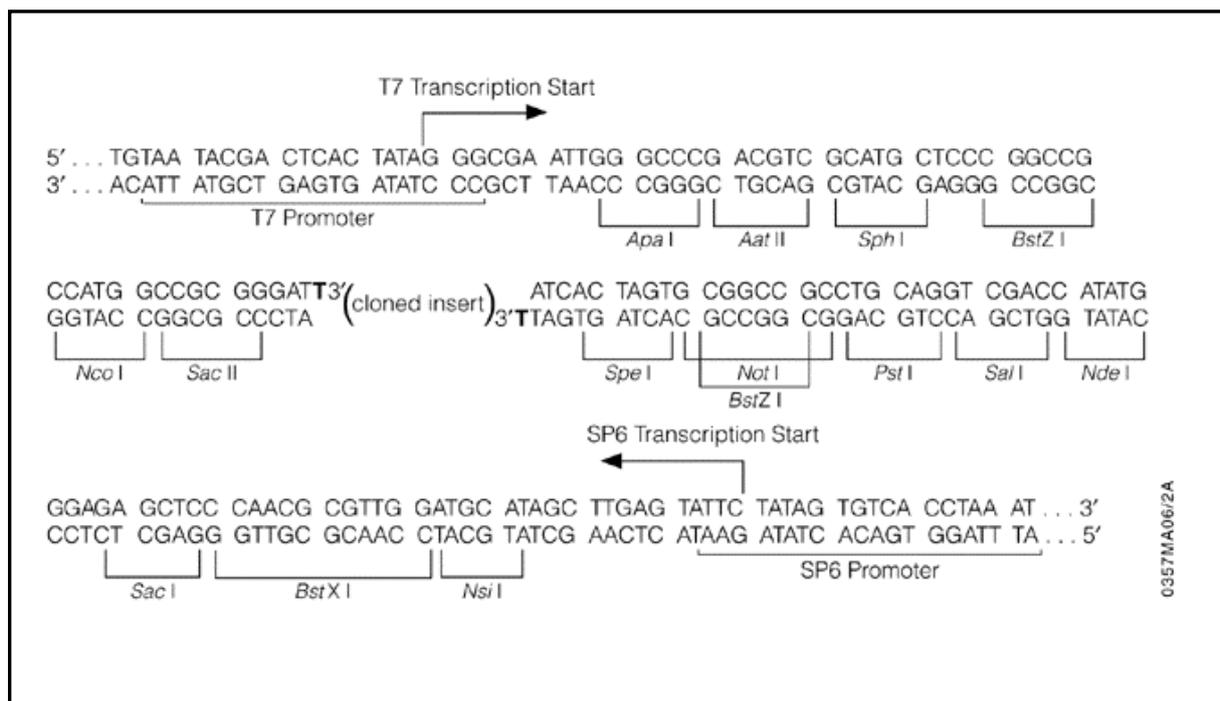


Abb. 15: Sequenz des pGEM<sup>®</sup>-T Vektors. Oben durch T7 transkribierte mRNA, unten durch SP6 transkribierte mRNA.

- Klonierung
  - Lösungen ansetzen:
    - LB-Medium: 25 Kapseln LB-Medium auf 1 l Aqua bidest., autoklavieren, im Kühlschrank aufbewahren

## Material und Methoden

- LB-Agar-Medium: 40 Kapseln LB-Agar-Medium auf 1 l Aqua bidest., autoklavieren, im Kühlschrank aufbewahren
- o Herstellung kompetenter Zellen (ECO XL1-Blue)
  - 2 ml LB-Medium in steriles Reagenzglas geben
  - ECO XL1-Blue (Stratagene) Bakterien mit einer Öse dazugeben
  - über Nacht bei 37°C auf Schüttler inkubieren

Am nächsten Tag:

- 19,5 ml LB-Medium bei 37°C vorwärmen
  - 0,5 ml der über Nacht inkubierten Bakterien dazugeben
  - 1-2 h bei 37°C auf Schüttler
  - 30 min in Eiswasser
  - 5 min bei 4°C und 6.290 x g zentrifugieren
  - Überstand verwerfen
  - Pellet mit 20 ml CaCl<sub>2</sub> 50 mM mischen
  - 30-60 min auf Eis stellen und häufig mischen
  - zentrifugieren 5 min bei 4°C und 6.290 x g
  - Überstand verwerfen
  - Pellet in 2-3 ml CaCl<sub>2</sub> resuspendieren, man erhält ca. 2 ml kompetente Zellen
- 
- o Ligation von pGEM-T Vektor (Promega, Mannheim) und Insert (PCR-Produkt)
    - Ansatz:
      - 5µl 2x Ligase-Puffer
      - 1 µl pGEM-T Vektor
      - 3 µl Insert
      - 1 µl T4 DNA-Ligase
    - bei 4°C über Nacht in Wasserbad inkubieren
    - 10 µl Ligationsprodukt
  - o Transformation des Plasmids (mit Inserts)
    - Ligationsprodukt (10 µl) mit 200 µl kompetenten Zellen mischen
    - 30 min auf Eis stehen lassen
    - 2 min bei 42°C im Wasserbad inkubieren

- 2 min im Eiswasser inkubieren
- 300 µl LB-Medium zugeben
- 30 min bei 37°C inkubieren
- während der Inkubation Vorbereitung der Platten:
  - LB-Agar-Medium im Schnellkochtopf 10 min kochen
  - 1-2 h bei 60°C im Wasserbad inkubieren
  - 30 µg/ml Tetrazyklin und 100 mg/ml Ampicillin zugeben und lösen
  - 30 ml pro Platte gießen und erkalten lassen bis das Medium fest wird
  - Platten 10-15 min bei 37°C inkubieren
  - 40 µl X-Gal (20 mg/ml in Dimethylformamid) pro Platte auftragen und einziehen lassen
  - 40 µl IPTG (200 mg/ml in Aqua bidest.) pro Platte auftragen und einziehen lassen
- Auftragen von transformierten ECO XL-1 Blue auf LB-Agar-Tet-Amp-Xgal-IPTG Platten
  - ca. 150 µl transformierte ECO XL-1 Blue mit Trigalski-Spatel auf Platten verteilen
  - bei 37°C über Nacht inkubieren (Deckel nach unten, damit kein Kondenswasser auf Agar tropft)
- Auswertung der Platten
  - weiße Kolonien (durch Insertion des Plasmids verlieren die Kolonien ihre blaue Farbe) ernten
  - in steriles Reagenzglas mit 5 ml LB Medium + 500 µl Ampicillin geben
  - bei 37°C über Nacht auf Schüttler inkubieren
- Plasmid-Extraktion (QIAprep Spin Plasmid Kit, Qiagen)
  - 5 ml Über-Nacht-Kultur 2 min bei 4°C und 6.290 x g zentrifugieren
  - Überstand verwerfen
  - Pellet in 250 µl Puffer 1 resuspendieren
  - 250 µl Puffer 2 zugeben, 3-6 x kippen
  - 350 µl N3-Puffer zugeben, 3-6 x kippen
  - 10 min bei 4°C und 31.870 x g zentrifugieren (Plasmid ist im Überstand)
  - Überstand in Spin Columns geben
  - 1 min bei 4°C und 16.620 x g zentrifugieren

- Durchfluss verwerfen
  - 750 µl PE-Puffer auf Sieb geben
  - 1 Minute bei 4°C und 16.620 x g zentrifugieren
  - Durchfluss verwerfen
  - 1 Minute bei 4°C und 16.620 x g zentrifugieren
  - Spin Columns auf neue 1,5 ml Tubes setzen
  - 50 µl EB-Puffer (oder Aqua bidest., pH 7,0 – 8,5) auf Sieb geben
  - 1 Minute bei RT stehen lassen
  - 1 Minute bei 4°C und 16.620 x g zentrifugieren; das Plasmid befindet sich im Durchfluss
- Herausschneiden des Cx43-Inserts aus dem Plasmid mit Hilfe von Not-I und Nco-I
    - Spaltung des Plasmid mit Not-I und Nco-I (Doppelverdau)
      - Ansatz:
        - 9 µl Aqua bidest.
        - 1 µl 100x BSA-Lösung
        - 2 µl Restriktionspuffer für Not-I und Nco-I (Puffer 3)
        - 5 µl Plasmid
        - 0,5 µl Not-I
        - 0,5 µl Nco-I
      - bei 37°C über Nacht im Wasserbad inkubieren
      - 20 min bei 65°C im Wasserbad inkubieren (Hitzeinaktivierung)
      - Nachweis des Transkriptes mittels 2%iger Agarose-Gelelektrophorese
    - Spaltung des Plasmid mit Not-I und Nco-I (Einzelverdau)
      - Ansatz mit Not-I:
        - 10,5 µl Aqua bidest.
        - 2 µl 100x BSA-Lösung
        - 5 µl Plasmid
        - 2 µl Restriktionspuffer für Not-I (Puffer 3)
        - 0,5 µl Not-I
      - Ansatz mit Nco-I:
        - 12,5 µl Aqua bidest.
        - 5 µl Plasmid
        - 2 µl Restriktionspuffer für Nco-I (Puffer 4)

0,5 µl Nco-I

- beide Ansätze bei 37°C über Nacht im Wasserbad inkubieren
- 20 min bei 65°C im Wasserbad inkubieren (Hitzeinaktivierung)
- Transkription in vitro-Herstellung der „sense“ und „anti-sense“ Sonden
  - Ansatz:
    - 8 µl DEPC-Wasser
    - 4 µl 5x Transkriptionspuffer
    - 2 µl 10x Digoxigenine RNA-Labeling-Mix
    - 2 µl 100x DTT
    - 2 µl linearisiertes Plasmid
    - 2 µl RNA-Polymerase (T7 für das Not-I geschnittene Plasmid, SP-6 für das Nco-I geschnittene Plasmid)
  - 1 h bei 37°C im Wasserbad inkubieren
  - 0,5 µl 0,5 M EDTA-Lösung zugeben
  - 1,2 µl 8 M Lithium-Chlorid-Lösung zugeben
  - 70,7 µl kaltes (-20°C), 100%iges Ethanol zugeben
  - 1 h bei -80°C im Gefrierschrank ausfallen lassen
  - 20 min bei 4°C und 16.620 x g zentrifugieren
  - Überstand verwerfen
  - 200 µl gekühltes 70%iges Ethanol zugeben
  - 15 min bei 4°C und 16.620 x g zentrifugieren
  - Überstand verwerfen
  - Pellet bei 37°C trocknen
  - 50 µl DEPC-Wasser zugeben
  - 10 min bei 70°C im Wasserbad resuspendieren
  - beide Sonden bei -20°C lagern

#### 4.2.6.3 Cx43-ISH an Paraffinmaterial

- Gebrauchslösungen herstellen
  - 0,2 N HCl
    - 5,2 ml 25%ige HCl und 200 ml DEPC Wasser
  - 20x SSC Stammlösung
    - 88,23 g Natriumcitrat ( $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$ )
    - 175,29 g NaCl
    - mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen
    - pH 7,0 einstellen
    - 1 ml DEPC zugeben
    - bei 37°C über Nacht im Brutschrank inkubieren
    - autoklavieren
  - 1 M  $MgCl_2$ -Lösung
    - 81,4 g  $MgCl_2$  in 400 ml DEPC Wasser lösen
  - PBSM-Puffer
    - 1 Tablette PBS in 200 ml DEPC Wasser lösen
    - 1 ml 1 M  $MgCl_2$ -Lösung zugeben
  - 0,2%ige Glycin-Lösung
    - 200 mg Glycin in 100 ml PBSM-Puffer lösen
  - 4%ige Paraformaldehydlösung
    - 25 g Paraformaldehyd in 500 ml 1x PBSM-Puffer unter dem Abzug auf einem Magnetprüher bei 70°C lösen
    - 4 N NaOH zugeben (bis die Lösung klar wird)
    - mit konzentrierter HCl auf pH 7,0 einstellen
    - aliquotieren, bei -20°C aufbewahren
  - 50%iges Dextransulfat
    - 5 g Dextransulfat in 10 ml DEPC Wasser lösen
    - einige Tage im Kühlschrank stehen lassen
    - aliquotieren, bei -20°C aufbewahren
  - 3%iges BSA in 1x TNMT
    - 3 g BSA in 100 ml TNMT Puffer lösen
    - aliquotieren, bei -20°C lagern

- Denhardt-Reagenz (BFP)
  - 200 mg BSA
  - 200 mg Ficoll 400
  - 200 mg Polyvinylpyrolidon
  - in 10 ml DEPC-Wasser lösen
  - aliquotieren, bei -20°C lagern
- 10x TNMT-Puffer
  - 121,1 g Tris-HCl
  - 58,4 g NaCl
  - 4,17 g MgCl<sub>2</sub>
  - in 1 l Aqua bidest. lösen
- 5x NTB-Puffer
  - 60,5 g Tris-HCl
  - 29,2 g NaCl
  - in 1 l Aqua bidest. lösen
  - pH 9,6 einstellen
  - 1 ml DEPC zugeben
  - über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubieren
  - autoklavieren
- 1 M Levamisol
  - 2,4 g Levamisol in 10 ml 1x NTB-Puffer lösen
  - aliquotieren, bei -20°C aufbewahren
- TBS-Puffer
  - 121,1 g Tris-HCl
  - 58,4 g NaCl
  - in 1 l Aqua bidest. lösen
  - pH 7,4 einstellen
- Vorbereitung am Vortag
  - Die Schnitte und eine Küvette mit Xylol getrennt voneinander über Nacht im 60°C Brutschrank stehen lassen
- Tag 1 ISH
  - Vorbereitung der Schnitte

Entparaffinieren und Rehydrieren der Schnitte in Alkoholreihe

- 5 min Xylol bei 60°C
- 2 x 5 min Xylol bei RT
- 2 x 5 min abs. Ethanol
- 1 x 5 min 96%iges Ethanol
- 1 x 5 min 70%iges Ethanol
- Im weiteren Verlauf wurden ausschließlich sterile Behälter, steriles Besteck und sterile Lösungen verwendet, um eine RNase-Kontamination zu vermeiden. Die Sterilisation der Instrumente erfolgte bei 180°C für 4 h. Die Lösungen wurden mit DEPC Wasser angesetzt.
  - Schnitte 1 x in DEPC Wasser waschen
  - 20 min in 0,2 N HCl inkubieren
  - 15 min bei 70°C in 2x SSC inkubieren
  - 1 x 5 min in PBSM-Puffer waschen
- Demaskierung der Bindungsstellen mit Proteinase K
  - Schnitte 25 min bei 37°C in einer feuchten (mit DEPC Wasser) Kammer mit Proteinase K (40 µg/ml) inkubieren
  - 1 x 5 min in 0,2%igem Glycin abstoppen
- Blockierung endogener Phosphatase
  - 15 sec in 20%iger Essigsäure in DEPC inkubieren
  - 1 x 5 min in PBSM-Puffer waschen
- Nachfixierung
  - 10 min in 4%iger Paraformaldehyd-Lösung inkubieren
  - 1 x 5 min in PBSM-Puffer waschen
  - 1 h in 20%igem Glycerin in DEPC prähybridisieren
- Vorbereitung der Sonden

**Sondenmischung herstellen:**

Ansatz:

- 4 µl Salmon-sperm-DNA (1 mg/ml)
- 8 µl Yeast-t-RNA (1 mg/ml)
- 8 µl DIG-cRNA Sonde

### Hybridisierungspuffer herstellen:

Ansatz:

- 52  $\mu$ l DEPC-Wasser
- 40  $\mu$ l 20x SSC
- 80  $\mu$ l 50%iges Dextransulfat
- 8  $\mu$ l Denhardt-Reagenz
- 200  $\mu$ l deionisiertes Formamid
  
- Sondengemisch und Hybridisierungspuffer zusammenmischen
- Sonden (getrennt Not-1 und Nco-1) auf die Schnitte geben
- 10 min bei 70°C auf der Heizplatte denaturieren
- OT sofort auf einer Eisplatte abkühlen
- bei 37°C über Nacht in einer mit DEPC-Wasser befeuchteten Kammer inkubieren

- Tag 2 ISH

- Posthybridisierung

In diesem Schritt erfolgt eine stringente Waschung, um nicht spezifisch gebundene Sonden vom Schnitt zu lösen und somit eine unspezifische Hintergrundreaktion zu vermeiden

- 3 x 10 min in 4x SSC bei RT waschen
- 4 x 5 min in 4x SSC bei 42°C waschen
- 1 x 15 min in 2x SSC bei 60°C waschen
- 1 x 15 min in 0,2x SSC bei 42°C waschen
- 1 x 5 min in 0,1x SSC bei RT waschen
- 1 x 5 min in 2x SSC bei RT waschen

- Immunhistochemie

- Lösungen ansetzen: 1x TNMT: 100 ml 10x TNMT in 900 ml Aqua bidest. lösen; anti-DIG-Antikörper ansetzen, Konzentration 1:500 mit TNMT-Puffer
- 10 min in 1x TNMT-Puffer bei RT waschen
- 1 h bei RT in 3%igem BSA in 1x TNMT-Puffer inkubieren
- mit anti-DIG-Antikörper in feuchter Kammer über Nacht bei 4°C inkubieren

- Tag 3 ISH
  - Farbreaktion
    - Lösungen ansetzen: 1x NTB: 20 ml 5x NTB + 5 ml 1 M  $\text{MgCl}_2$  + 75 ml Aqua bidest.; 1x TNMT: 100 ml 10x TNMT + 900 ml Aqua dest.
    - 2 x 10 min in 1x TNMT-Puffer waschen
    - 5 min in 1x NTB-Puffer waschen
    - 5 min in 50 ml 1x NTB mit 250  $\mu\text{l}$  1 M Levamisol
    - mit NBT-BCIP in einer feuchten Kammer im Dunkeln entwickeln
    - mit 1x NTB die Reaktion abstoppen
  - Eindecken
    - Schnitte mit DAKO Glycergel eindecken

## 5 Ergebnisse

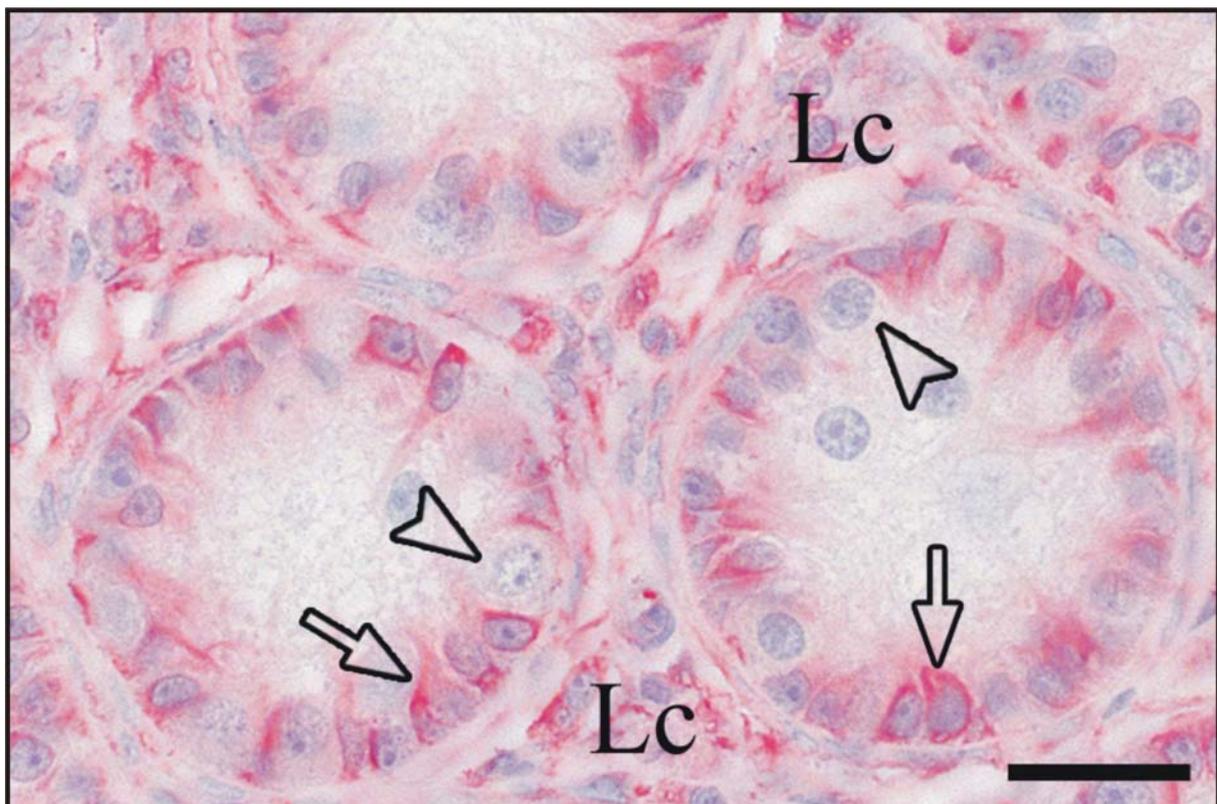
### 5.1 Immunhistochemie

#### 5.1.1 Vimentin

Die Identifikation von Sertoli Zellen und die Differenzierung zwischen verschiedenen Typen testikulärer Tumore (Sertoli Zelltumor und Seminom) erfolgte an Paraffinschnitten mittels Vimentin und der APAAP-Methode.

##### 5.1.1.1 Präpubertäre Hoden

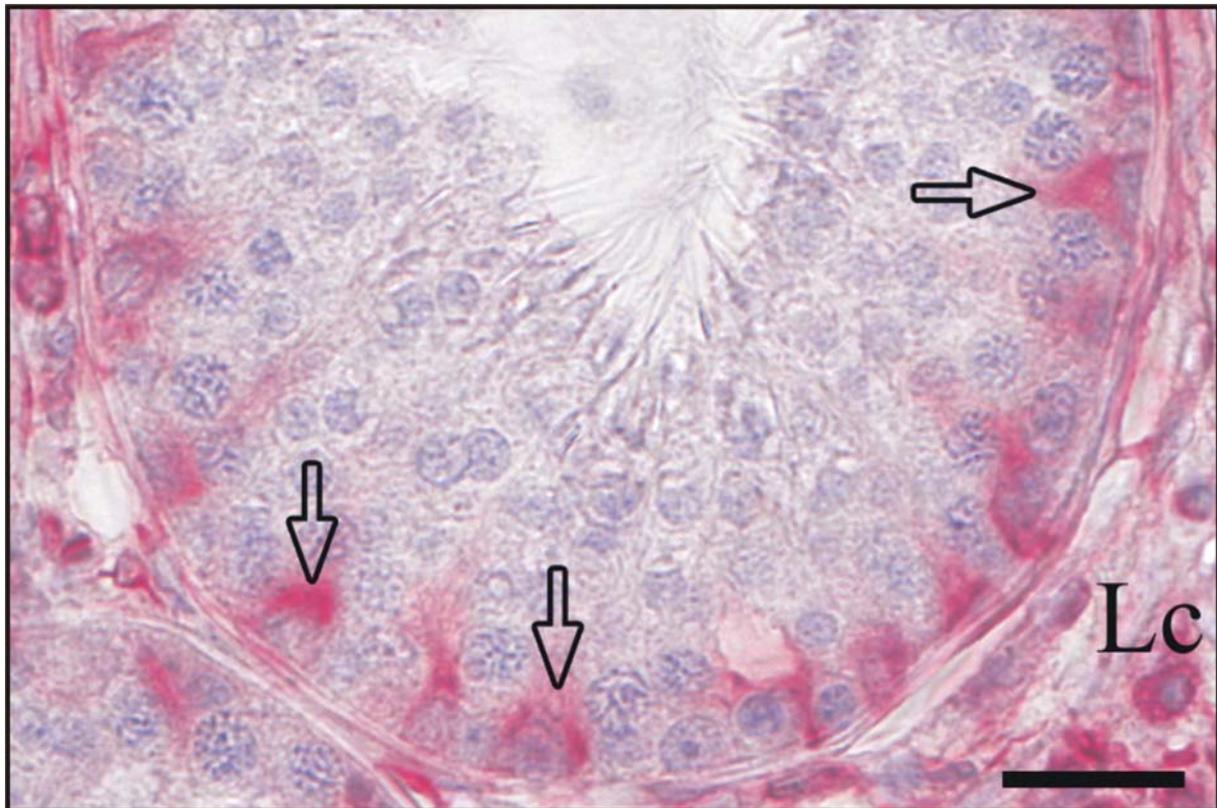
Im präpubertären Hoden und im Hoden mit normaler Spermatogenese konnte ein reproduzierbares immunhistochemisches Signal für Vimentin im basalen Kompartiment der Keimtubuli im Bereich des Zytoplasmas der Sertoli Zellen, im Zytoplasma von Leydig Zellen und in Endothelzellen von Blutgefäßen gefunden werden (Abb. 16).



**Abb. 16:** Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin im Hoden des präpubertären Hundes, Paraffinschnitt. Man erkennt ein Signal im Zytoplasma von Sertoli Zellen (durchsichtige Pfeile) und im Zytoplasma von Leydig Zellen (Lc). Präpubertäre Spermatozoen (durchsichtiger Pfeilkopf) bleiben negativ für Vimentin. Messbalken = 25 µm.

### 5.1.1.2 Normale Spermatogenese

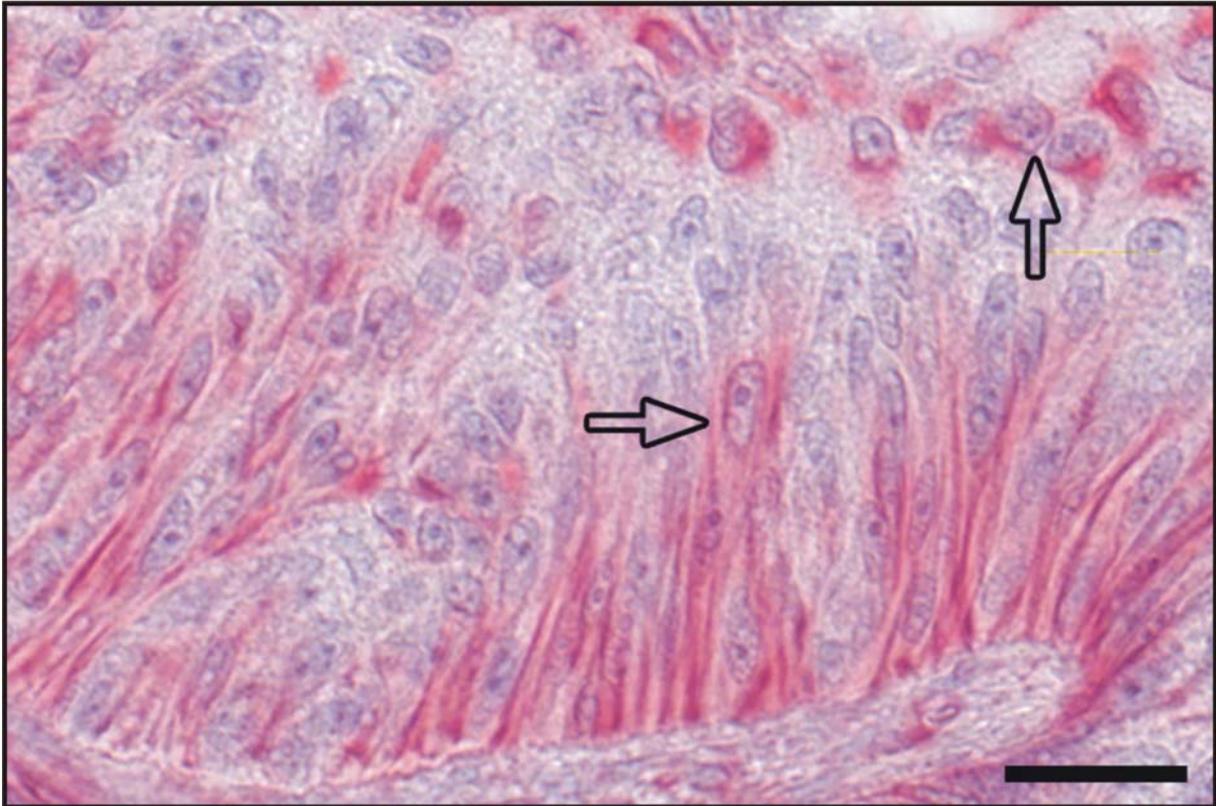
Im Hoden mit normaler Spermatogenese konnte ein reproduzierbares Signal im basalen Kompartiment der Keimtubuli im Bereich des Zytoplasmas der Sertoli Zellen, im Zytoplasma von Leydig Zellen und in Endothelzellen von Blutgefäßen detektiert werden (Abb. 17).



**Abb. 17:** Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin im Hoden des adulten Hundes mit normaler Spermatogenese, Paraffinschnitt. Man erkennt ein Signal im Zytoplasma von Sertoli Zellen (durchsichtige Pfeile) und im Zytoplasma von Leydig Zellen (Lc). Messbalken = 25 µm.

### 5.1.1.3 Sertoli Zelltumor

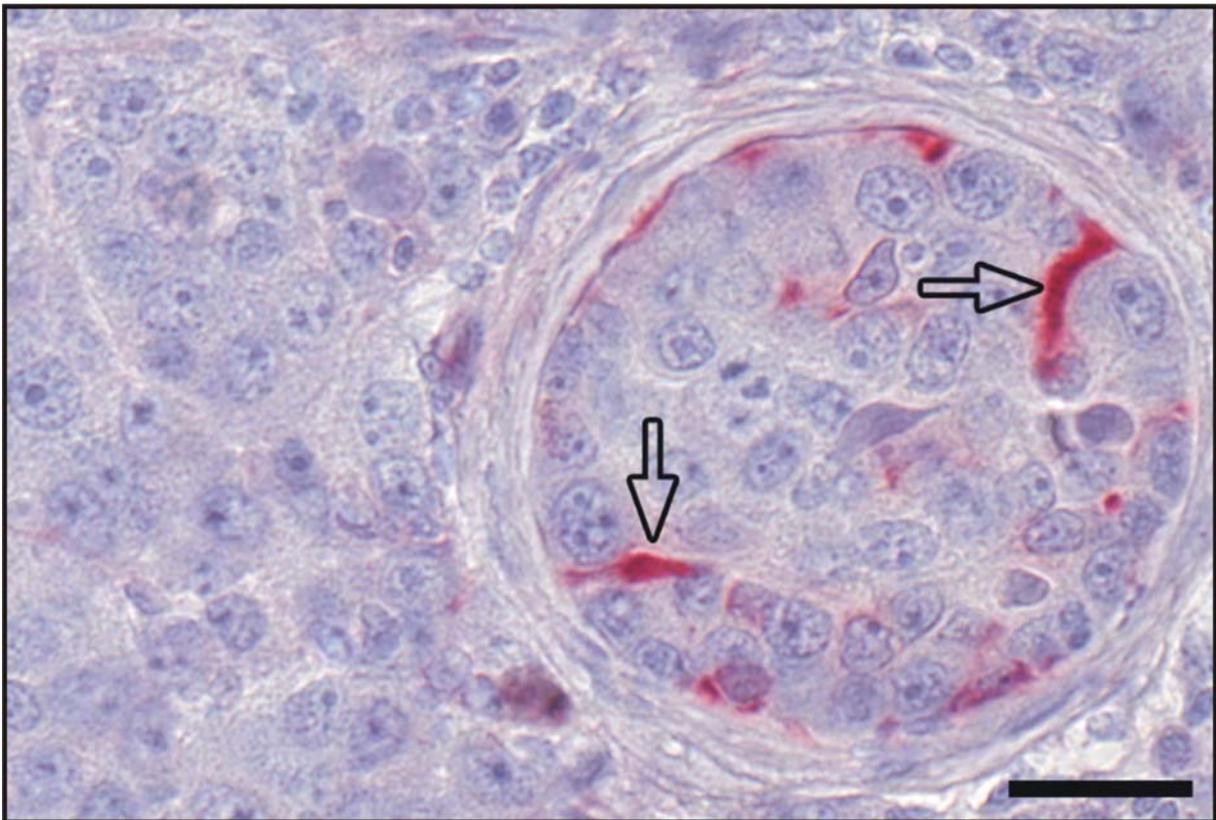
In neoplastischem Hodengewebe identifizierte der Anti-Vimentin-Antikörper neoplastische Sertoli Zellen in Sertoli Zelltumoren, wobei eine heterogene intratubuläre Färbung festgestellt werden konnte, da wenige adluminale Zellen keine Immunreaktion für Vimentin zeigten (Abb. 18).



**Abb. 18:** Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin im Hoden des Hundes mit Sertoli Zelltumor, Paraffinschnitt. Man erkennt ein Signal im Zytoplasma von tumorös entarteten Sertoli Zellen (durchsichtige Pfeile). Messbalken = 25  $\mu$ m.

#### 5.1.1.4 Seminom

Neoplastische Keimzellen in Seminomen blieben negativ für den immunhistochemischen Nachweis von Vimentin (Abb. 19).



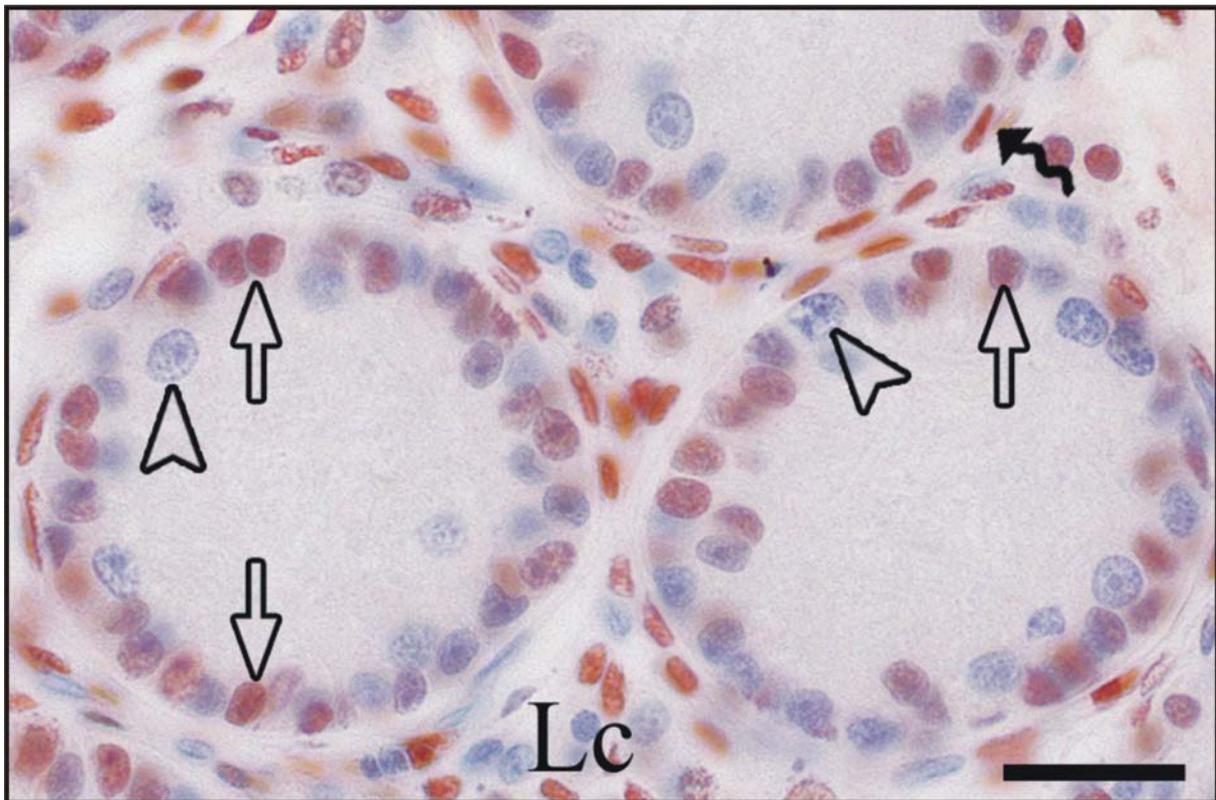
**Abb. 19:** Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin im Hoden des Hundes mit Seminom, Paraffinschnitt. Man erkennt ein Signal im Zytoplasma residualer Sertoli Zellen (durchsichtige Pfeile). Neoplastische Keimzellen bleiben negativ für Vimentin. Messbalken = 25  $\mu$ m.

### 5.1.2 Androgenrezeptor

In präpubertären Hoden und in adulten Hoden mit normaler Spermatogenese wurden mittels Anti-Androgenrezeptor-Antikörper Sertoli Zellkerne, Kerne von peritubulären Zellen und von Leydig Zellen an Paraffinschnitten mittels ABC-Methode markiert. Die Intensität der Farbreaktion wurde hierbei mit Paraffinschnitten, die aus demselben immunhistochemischen Versuch stammten, direkt miteinander verglichen.

#### 5.1.2.1 Präpubertäre Hoden

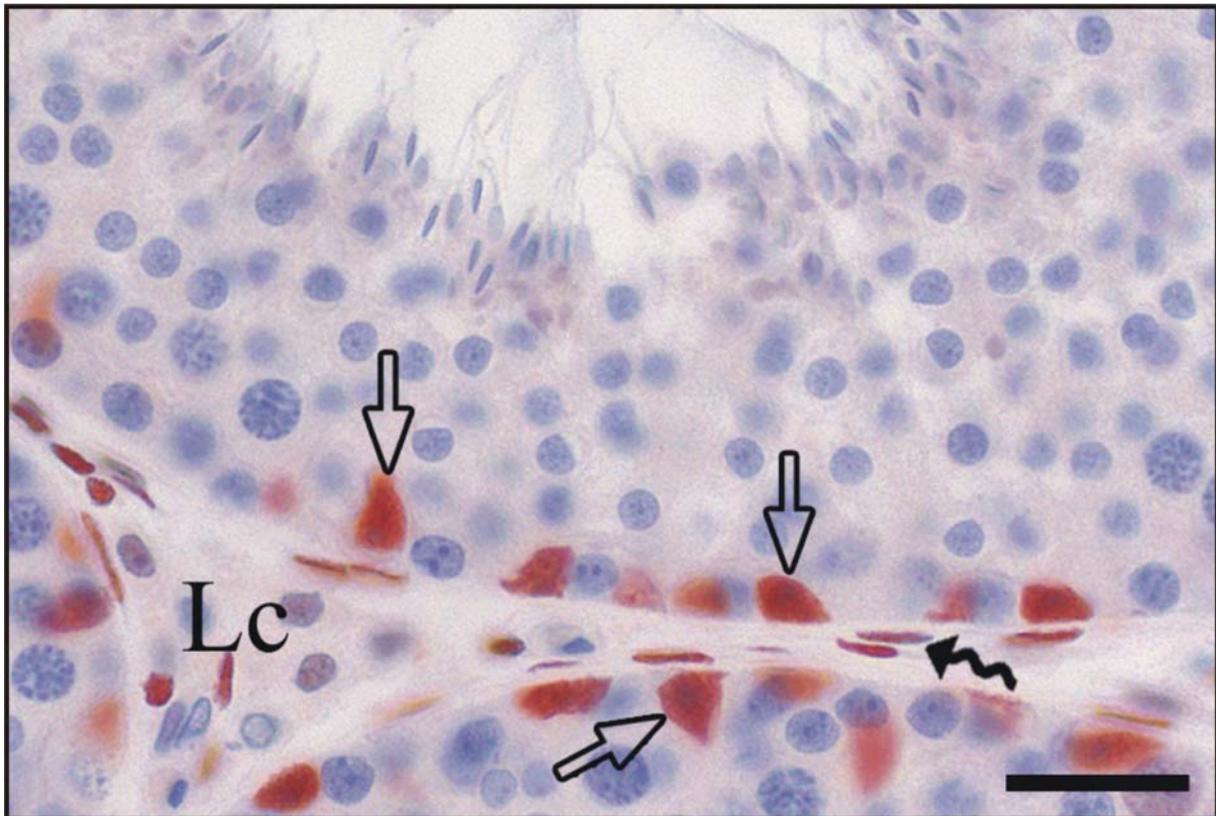
Der immunhistochemische Nachweis des Androgenrezeptors am Keimepithel des präpubertären Hundes ergab reproduzierbare, spezifische Signale in Kernen von peritubulären Zellen und Leydig Zellen und deutlich schwächere Signale in Zellkernen von Sertoli Zellen (Abb. 20).



**Abb. 20:** Immunhistochemischer Nachweis des Androgenrezeptors im Hoden des präpubertären Hundes, Paraffinschnitt. Man erkennt ein schwaches Signal im Kern von Sertoli Zellen (durchsichtige Pfeile) und ein stärkeres Signal im Kern von peritubulären Zellen (geschlängelter Pfeil). Prä spermatogonien bleiben immunonegativ (durchsichtige Pfeilköpfe). Messbalken = 25  $\mu$ m.

#### 5.1.2.2 Normale Spermatogenese

Der immunhistochemische Nachweis des Androgenrezeptors am Keimepithel des adulten Hundes mit normaler Spermatogenese ergab deutliche und spezifische Signale in Zellkernen von Sertoli Zellen, peritubulären Zellen und Leydig Zellen (Abb. 21).



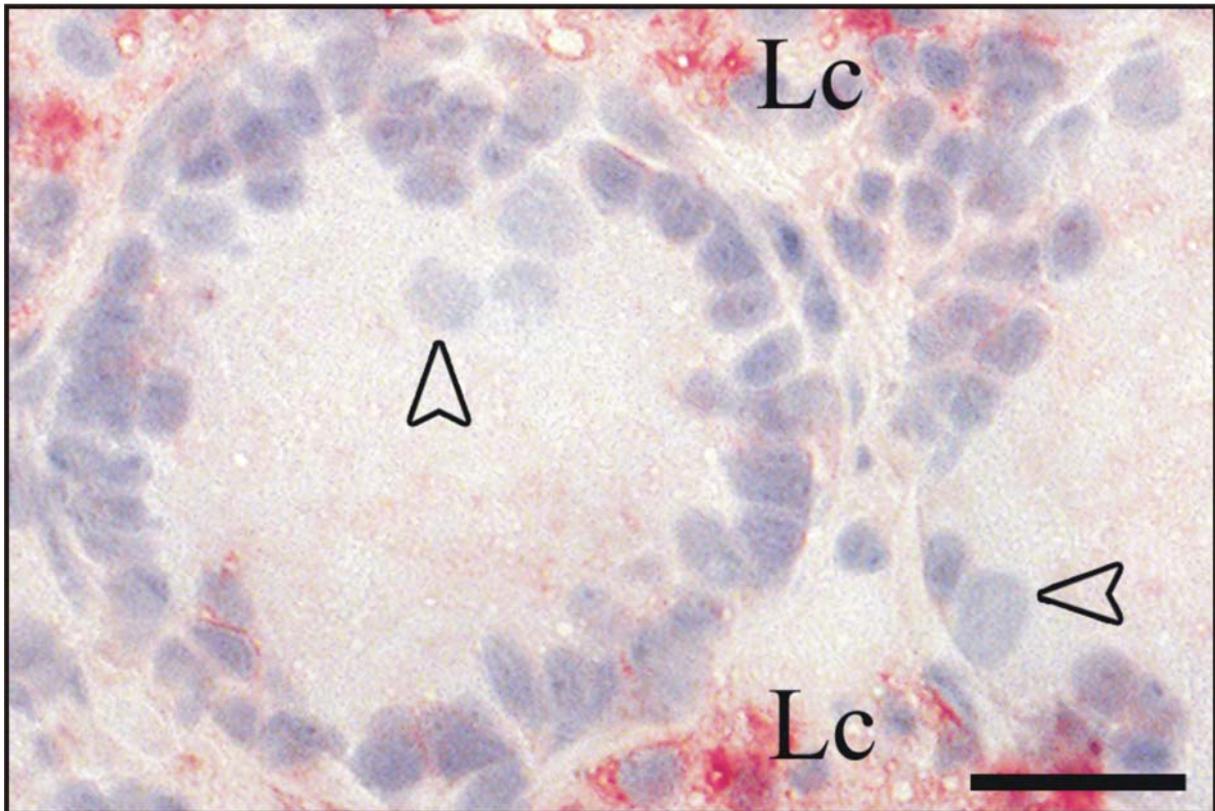
**Abb. 21:** Immunhistochemischer Nachweis des Androgenrezeptors im Hoden des adulten Hundes mit normaler Spermatogenese, Paraffinschnitt. Man erkennt ein starkes positives Signal im Kern von Sertoli Zellen (durchsichtige Pfeile), im Kern von peritubulären Zellen (geschwängelter Pfeil) und Leydig Zellen (Lc). Messbalken = 25 µm.

### 5.1.3 Cx43

Der immunhistochemische Nachweis des Cx43-Proteins im Hodengewebe des präpubertären Hundes, des Hundes mit normaler Spermatogenese, des Hundes mit Sertoli Zelltumor und des Hundes mit Seminom erfolgte an Gefrierschnitten mittels APAAP-Methode. Cx43 ist das bislang vorherrschende GJ-Protein im Hoden verschiedener Spezies und spielt eine wichtige Rolle bei der Initiierung und Aufrechterhaltung der normalen Spermatogenese.

#### 5.1.3.1 Präpubertärer Hoden

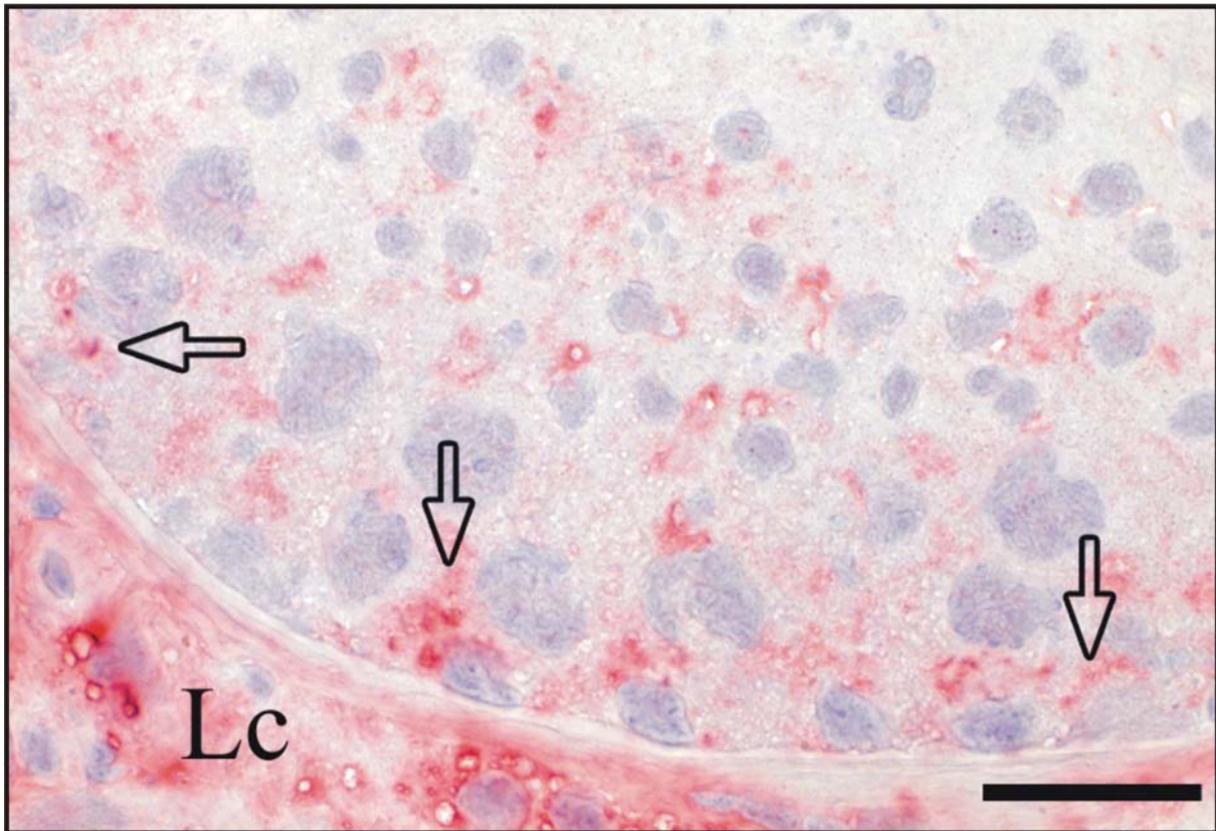
Im Keimepithel des präpubertären Hundes konnten keine oder nur vereinzelt schwache Signale für Cx43 zwischen Sertoli Zellen und Sertoli Zellen und Prä spermatogonien detektiert werden. Die Ergebnisse waren reproduzierbar. Eine starke Immunreaktion für Cx43 konnte stets zwischen interstitiellen Leydig Zellen gezeigt werden, so dass dieser Zelltyp als Positivkontrolle im gleichen histologischen Schnitt verwendet werden konnte (Abb.22).



**Abb. 22:** Immunhistochemischer Nachweis des Cx43-Proteins im Hoden des präpubertären Hundes, Gefrierschnitt. Zwischen den Zellen des Keimepithels, Sertoli Zellen und Präspmatogonien (durchsichtige Pfeilköpfe deuten auf Präspmatogonien) sind keine oder schwach immunopositive Reaktionen für Cx43-Protein sichtbar. Man erkennt ein starkes Signal zwischen interstitiellen Leydig Zellen (Lc). Messbalken = 25  $\mu$ m.

#### 5.1.3.2 Normale Spermatogenese

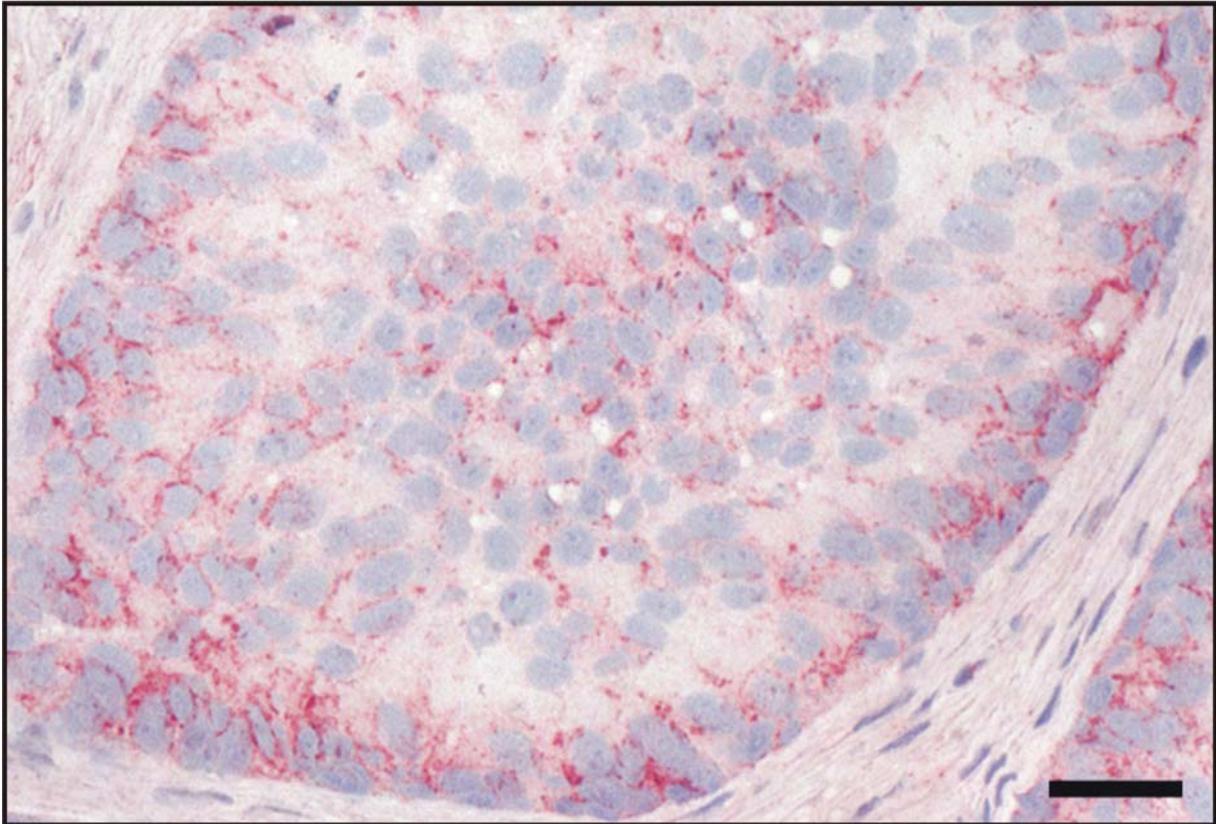
Im Keimepithel des adulten Hundes mit normaler Spermatogenese konnte Cx43-Protein an Gefrierschnitten mittels APAAP-Methode intratubulär zum einen zwischen Sertoli Zellen als Bestandteil des Sertoli-Sertoli-Zell-Verbindungskomplexes und zum anderen zwischen Sertoli Zellen und basal gelegenen Keimzellen wiederholt detektiert werden. Die als interne Positivkontrolle dienenden interstitiellen Leydig Zellen zeigten eine starke Immunreaktion für Cx43-Protein (Abb. 23).



**Abb. 23:** Immunhistochemischer Nachweis des Cx43-Proteins im Hoden des adulten Hundes mit normaler Spermatogenese, Gefrierschnitt. Man erkennt ein positives Signal für Cx43-Protein zwischen Sertoli Zellen sowie zwischen Sertoli Zellen und basal gelegenen Keimzellen (durchsichtige Pfeile). Ein schwaches positives Signal ist im adluminalen Kompartiment sichtbar. Eine starke Immunreaktion zeigt sich zwischen interstitiellen Leydig Zellen (Lc). Messbalken = 25µm.

#### 5.1.3.3 Sertoli Zelltumor

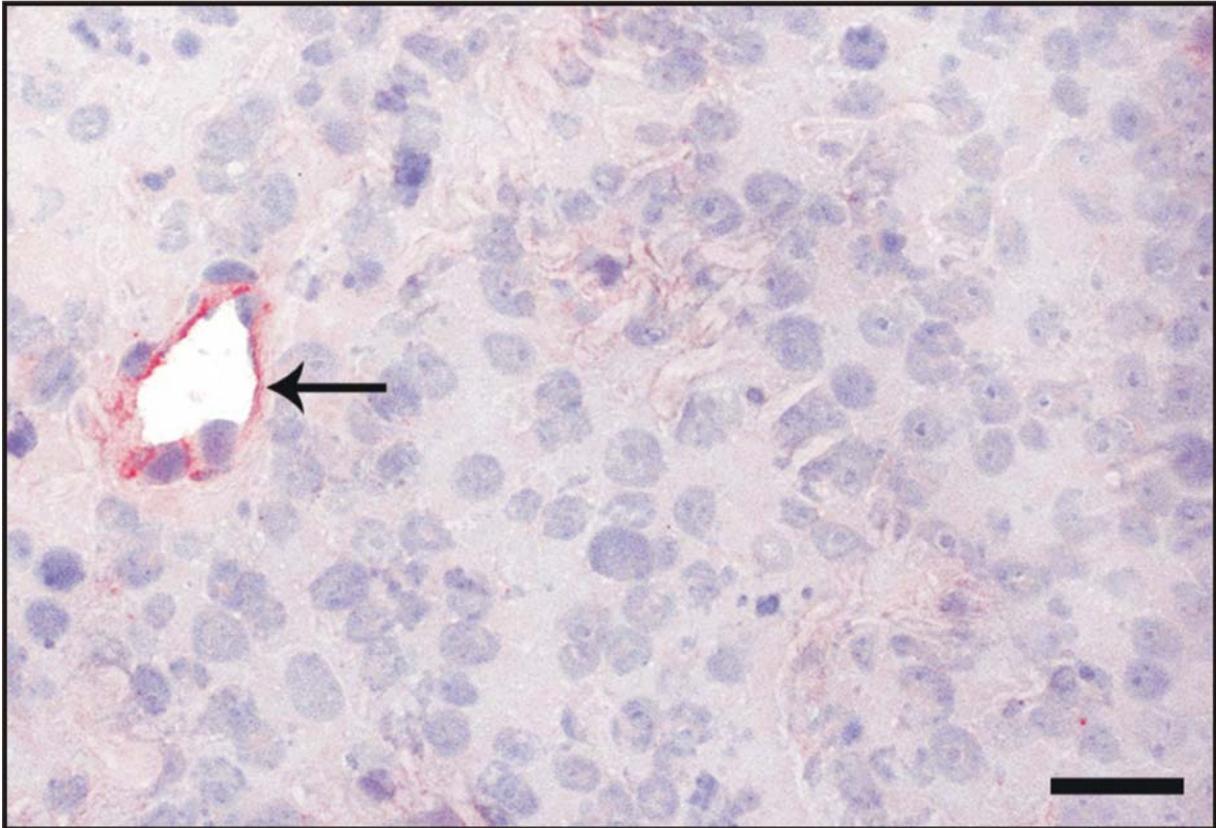
In Sertoli Zelltumoren des Hundes konnte ein starkes immunhistochemisches Signal für Cx43 zwischen neoplastischen Sertoli Zellen gefunden werden (Abb. 24).



**Abb. 24:** Immunhistochemischer Nachweis des Cx43-Proteins im Hoden des Hundes mit intratubulärem Sertoli Zelltumor, Gefrierschnitt. Man erkennt ein starkes immunopositives Signal zwischen neoplastischen Sertoli Zellen. Messbalken = 25  $\mu$ m.

#### 5.1.3.4 Seminom

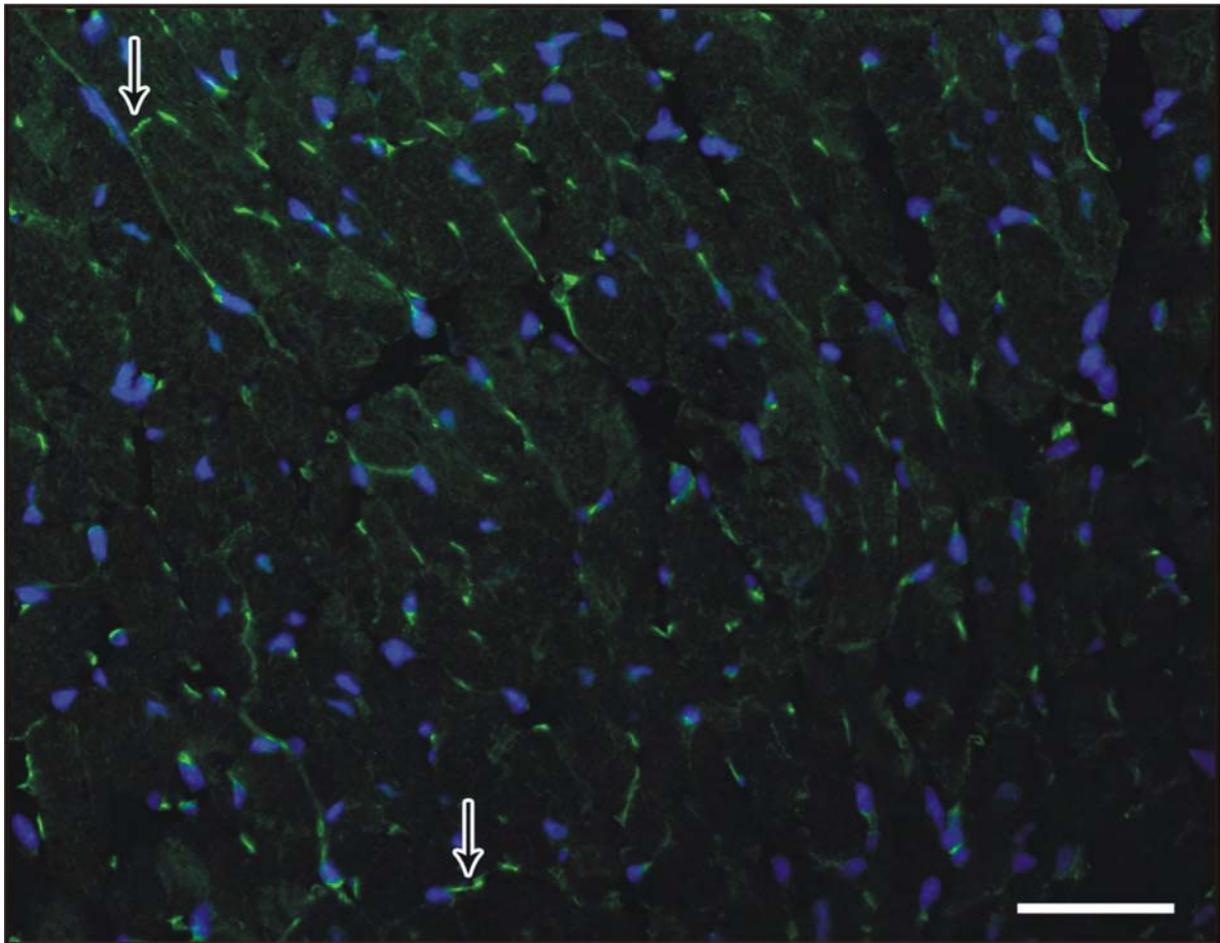
Gefrierschnitte von Hundehoden mit der pathologisch-histologischen Diagnose Seminom wiesen keine Immunreaktion für Cx43-Protein auf. Nur in Endothelzellen kleiner Blutgefäße konnte ein Signal für Cx43 detektiert werden (Abb. 25).



**Abb. 25:** Immunhistochemischer Nachweis des Cx43-Proteins im Hoden des Hundes mit Seminom. Man erkennt ein positives Signal zwischen Endothelzellen von Blutgefäßen (schwarzer Pfeil). Die neoplastischen Keimzellen sind immunonegativ für Cx43-Protein. Messbalken = 25 µm.

#### 5.1.4 Immunfluoreszenz (IF) Cx45

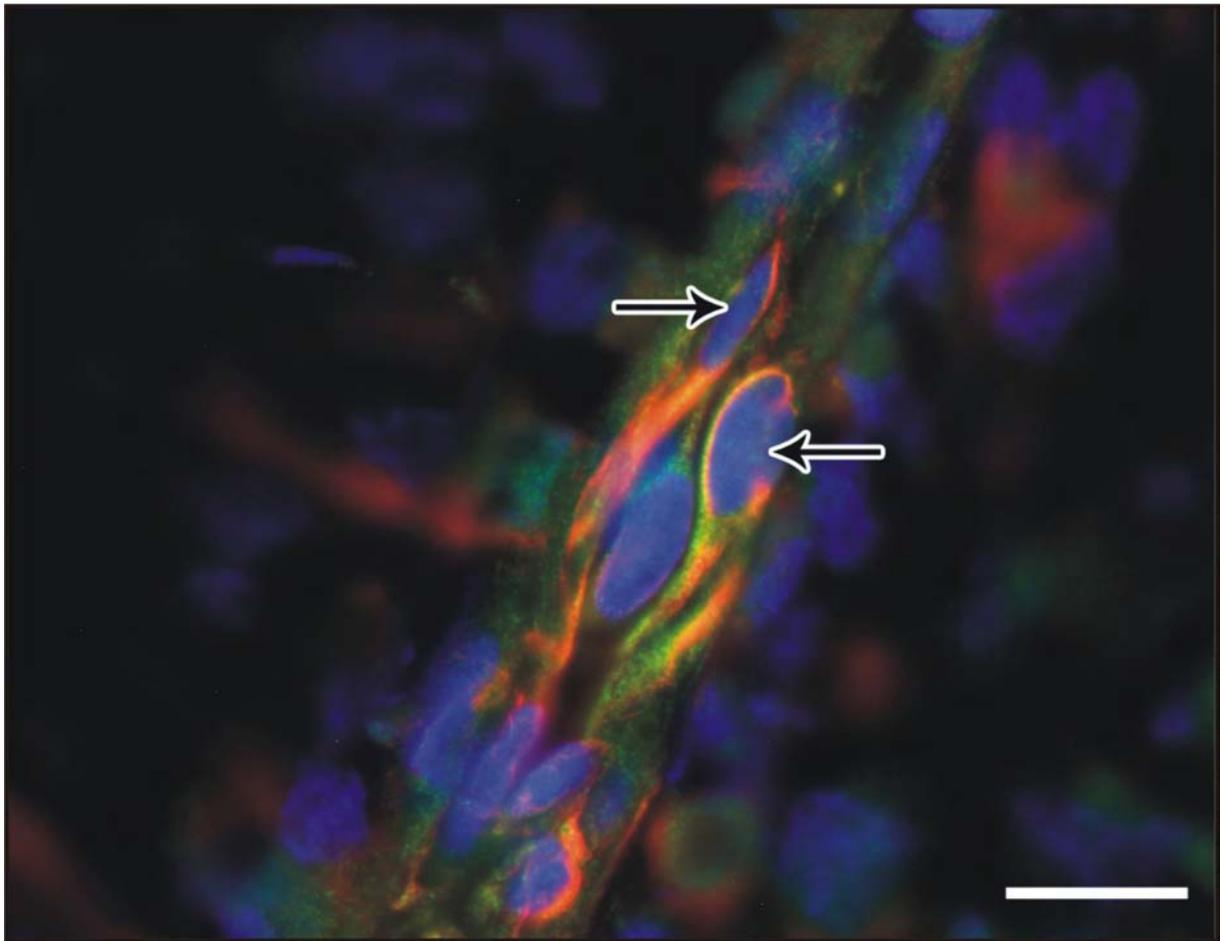
Der immunhistochemische Nachweis des Cx45-Proteins am Keimepithel des adulten Hundes mit normaler Spermatogenese erfolgte an Gefriermaterial mittels indirekter Immunfluoreszenz. Dabei wurden zusätzlich Doppelfärbungen, zum einen mit Cx45 und Aktin, zur besseren Identifizierung der peritubulären Zellen, und zum anderen mit Cx45 und Vimentin, zur besseren Identifizierung der Sertoli Zellen und peritubulären Zellen, durchgeführt. Als Positivkontrolle diente Herzgewebe der Maus (Abb. 26), da Cx45-Protein bekanntermaßen zwischen Herzmuskelzellen und in den Glanzstreifen exprimiert wird. Die immunhistochemische Färbung an Gefriermaterial des Herzgewebes der Maus ergab ein reproduzierbares Signal zwischen Herzmuskelzellen und in den Glanzstreifen.



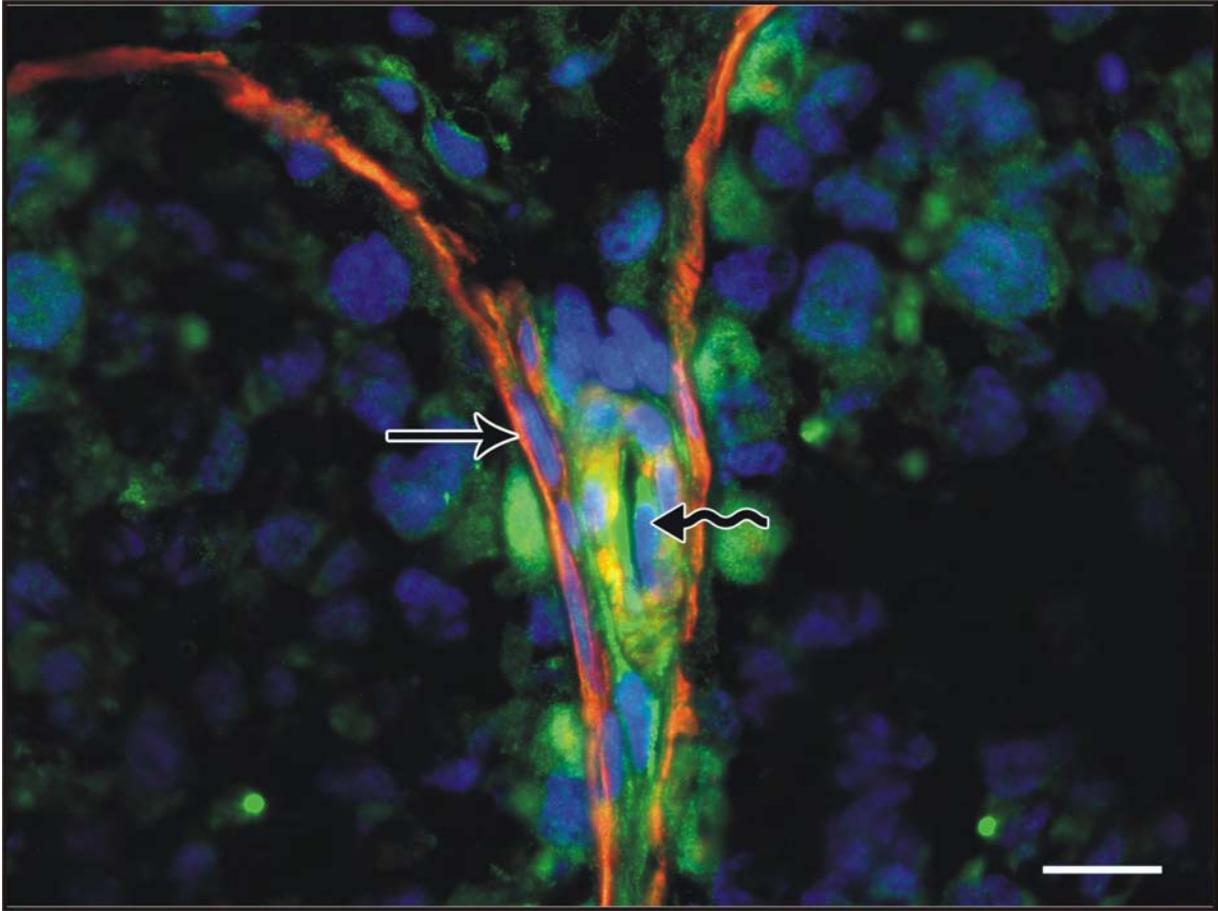
**Abb. 26:** Nachweis des Cx45-Proteins mittels Immunfluoreszenz im Herzgewebe der Maus. Man erkennt ein positives grünes Signal zwischen den Herzmuskelzellen und in den Glanzstreifen (Pfeile). Messbalken = 50  $\mu\text{m}$ .

#### 5.1.4.1 Normale Spermatogenese

Der immunhistochemische Nachweis für Cx45 am Keimepithel des adulten Hundes mit normaler Spermatogenese mittels indirekter Immunfluoreszenz zeigte ein spezifisches Signal in der Zellmembran der peritubulären Zellen (Abb. 27). Doppelfärbungen von Cx45 und Aktin bestätigten das spezifische Signal für Cx45 in den peritubulären Zellen und zeigten eine Kolokalisation in den Endothelzellen kleiner Blutgefäße (Abb. 28). Reaktionen im basalen Kompartiment des Keimtubulus im Bereich der Kerne der Sertoli Zellen, Spermatogonien und primären Spermatozyten können als unspezifisch für Cx45 gewertet werden (Abb. 28).



**Abb. 27:** Nachweis des Cx45- (grünes Signal) und Vimentin- (rotes Signal) Proteins mittels Immunfluoreszenz im Hoden des adulten Hundes mit normaler Spermatogenese, Gefrierschnitt. Das positive gelbe Signal in den peritubulären Zellen (Pfeile) demonstriert die Kolokalisation. Messbalken = 20  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 28:** Nachweis des Cx45- (grünes Signal) und Aktin- (rotes Signal) Proteins mittels Immunfluoreszenz im Hoden des adulten Hundes mit normaler Spermatogenese, Gefrierschnitt. Die gelbe Farbe demonstriert die Kolokalisation in peritubulären Zellen (Pfeil) und Endothelzellen kleiner Blutgefäße (geschlängelter Pfeil). Messbalken = 20µm.

## 5.2 Western Blot (WB)

Der Nachweis der C43- und Cx45-Proteine am Hodenhomogenat bzw. Proteinhomogenat aus Gefriermaterial des Hundes erfolgte mit Hilfe der ABC-Methode.

### 5.2.1 Cx43 WB

Die zur Detektion von Cx43-Protein durchgeführten Western Blots zeigten folgende Ergebnisse:

Western Blots von Hodenhomogenaten mit der histologischen Diagnose „präpubertär“ und „normale Spermatogenese“ zeigten drei Banden bei Molekulargewichten von ca. 45 kDa, 43 kDa und 41 kDa (Abb. 29, Spuren 1 und 2).

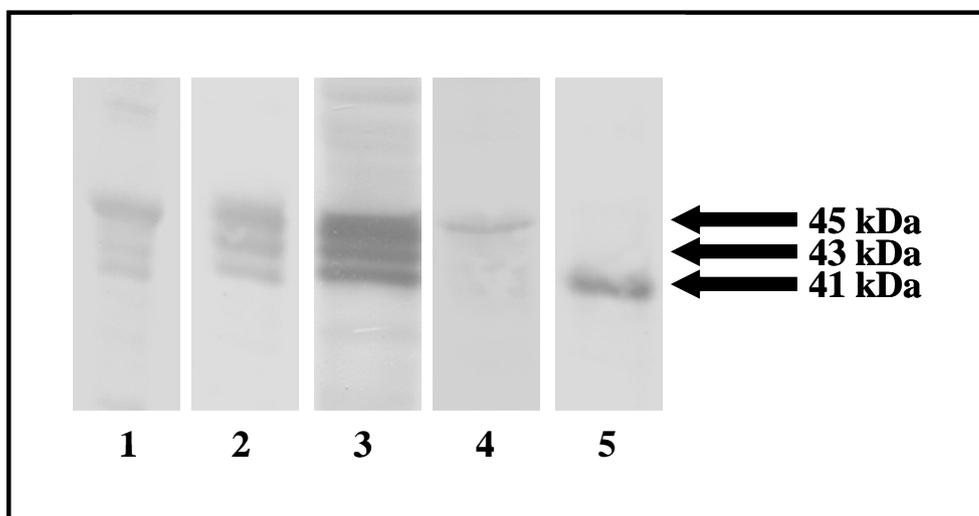
## Ergebnisse

Der Cx43-Protein-Nachweis mittels Western Blot von Hoden mit der Diagnose „Sertoli Zelltumor“ ergab ebenfalls drei Banden bei Molekulargewichten von 45 kDa, 43 kDa und 41 kDa (Abb. 29, Spur 3).

Der Nachweis des Cx43-Proteins am Hodenhomogenat mit der Diagnose „Seminom“ ergab eine einzelne schwache Bande bei 45 kDa (Abb. 29, Spur 4).

Da es sich bei Cx43 um ein Phosphoprotein handelt wurde untersucht, ob es sich bei den gefundenen zusätzlichen immunoreaktiven Banden um phosphorylierte Cx43-Isoformen handelt. Dies erforderte eine Zusatzbehandlung der Proteinproben vor Durchführung des Western Blots durch Inkubation mit alkalischer Phosphatase (hier „calf intestinal alkaline phosphatase“, CIP).

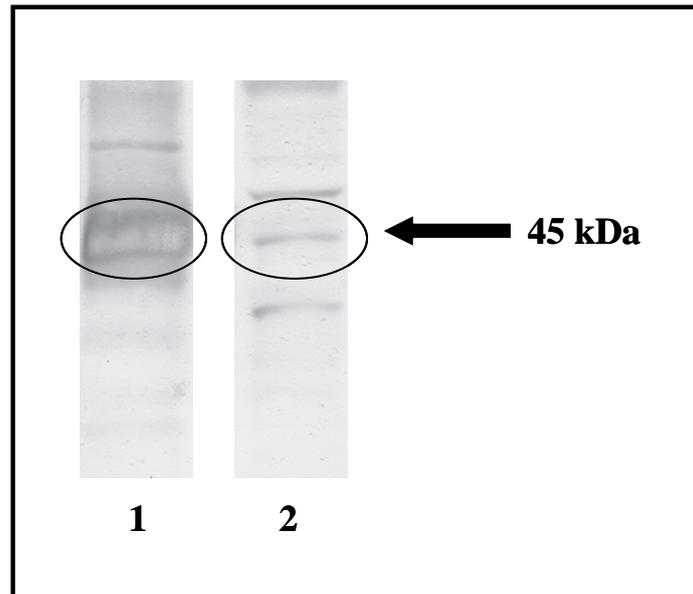
Die Zusatzbehandlung führte bei allen untersuchten Geweben zu einer Änderung des elektrophoretischen Bandenmusters. Die drei detektierten Cx43-Isoformen im Hoden von präpubertären Hunden, Hunden mit normaler Spermatogenese und Hunden mit Sertoli Zelltumor reduzierten sich nach der Behandlung mit CIP auf eine einzelne Bande bei 41 kDa (repräsentativ Abb. 29, Spur 5). Die an Hodenhomogenaten mit der Diagnose „Seminom“ gefundene Bande bei 45 kDa verschwand und eine einzelne Bande bei 41 kDa konnte detektiert werden.



**Abb. 29:** Nachweis des Cx43-Proteins am Hodenhomogenat verschiedener Hunde mittels Western Blot. 1: präpubertär, 2: adult, normale Spermatogenese, 3: Sertoli Zelltumor, bei allen drei untersuchten Homogenaten sind Banden im Bereich von 41-45 kDa sichtbar (1-3), 4: Seminom, lediglich eine Bande im Bereich von 45 kDa ist sichtbar, 5: repräsentativ mit CIP behandeltes Homogenat eines adulten Hundes mit normaler Spermatogenese, eine Bande ist im Bereich von 41 kDa sichtbar.

## 5.2.2 Cx45 WB

Die zur Detektion von Cx45-Protein durchgeführten Western Blots am Hoden- bzw. Proteinhomogenat aus Gefriermaterial des adulten Hundes mit normaler Spermatogenese ergaben eine einzelne Bande im Bereich von 45 kDa (Abb. 30, Spur 2). Mit Cx45 transfizierte HeLa Zellen dienten als Positivkontrolle und ergaben ebenfalls eine spezifische Bande bei 45 kDa (Abb. 30, Spur 1).



**Abb. 30:** Nachweis des Cx45-Proteins am Hodenhomogenat des Hundes mit normaler Spermatogenese. 1: Positivkontrolle, mit Cx45 transfizierte Hela-Zellen, 2: adulter Hund mit normaler Spermatogenese, eine Bande ist bei 45 kDa sichtbar.

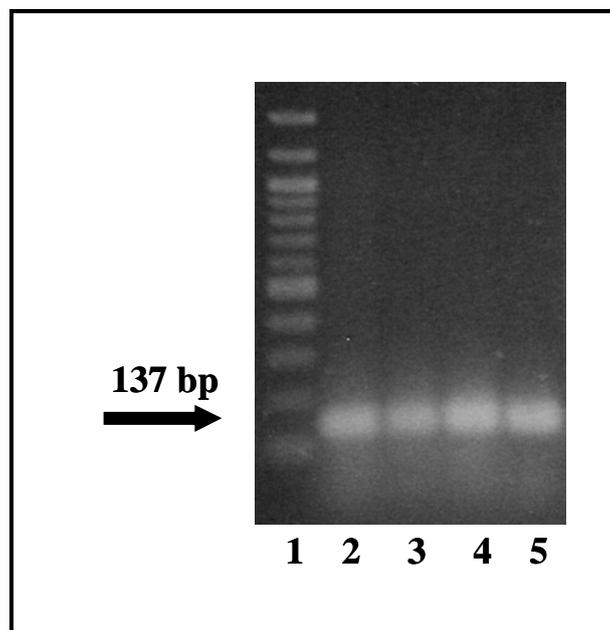
## 5.3 Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Der Nachweis der Cx43-mRNA erfolgte sowohl an aus Hodenhomogenat extrahierter Gesamt-RNA als auch an extrahierter Gesamt-RNA aus mikrodissezierten Zellen (UV-laser-assistierte Mikrodissektion) des präpubertären Hundes, des adulten Hundes mit normaler Spermatogenese, des Hundes mit Sertoli Zelltumor und des Hundes mit Seminom.

Der Nachweis der Cx45-mRNA erfolgte an aus Hodenhomogenat extrahierter Gesamt-RNA des präpubertären Hundes, des adulten Hundes mit normaler Spermatogenese, des Hundes mit Sertoli Zelltumor und des Hundes mit Seminom.

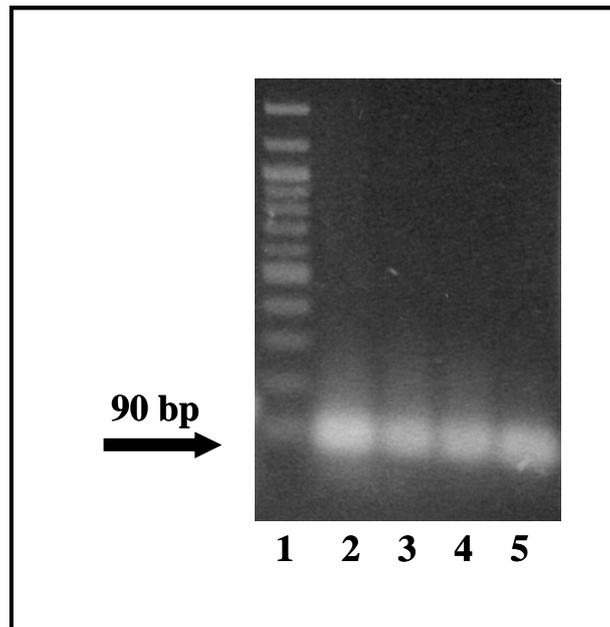
## 5.3.1 Hodenhomogenat

Zur Detektierung der Cx43-mRNA aus Hodenhomogenat wurde ein selbst ausgesuchtes Primerpaar verwendet. Die RT-PCR für Cx43 an Gesamthomogenat, extrahiert aus Hodengewebe mit der histologischen Diagnose „präpubertär, normale Spermatogenese, Sertoli Zelltumor und Seminom“, ergab jeweils ein spezifisches PCR-Produkt bei 137 bp (Abb. 31, Spuren 2-5). Diese Banden erwiesen sich in nachfolgender Sequenzierung als spezifisches Signal für Cx43 des Hundes. Das bei den Proben als interne Kontrolle verwendete  $\beta$ -Aktin ergab jeweils eine Bande im erwarteten Bereich von 90 bp (Abb. 32, Spuren 2-5).



**Abb. 31:** Nachweis der Cx43-mRNA an Hodenhomogenat von Hunden mittels RT-PCR. 1: Marker, 2: präpubertär, 3: adult, normale Spermatogenese, 4: Sertoli Zelltumor, 5: Seminom. Für alle untersuchten Proben sind spezifische Banden im erwarteten Bereich von 137 bp sichtbar.

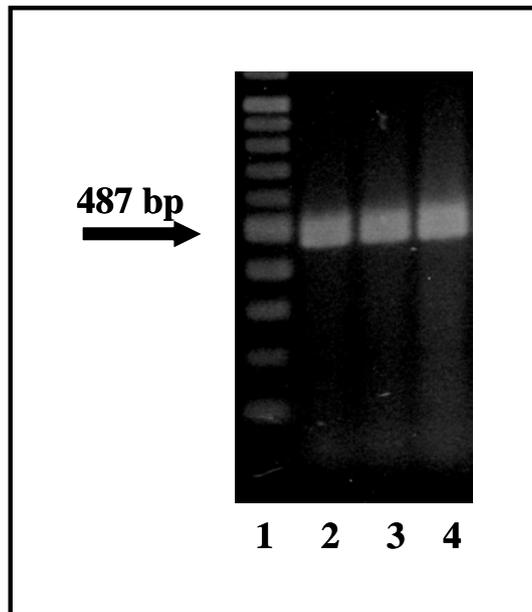
## Ergebnisse



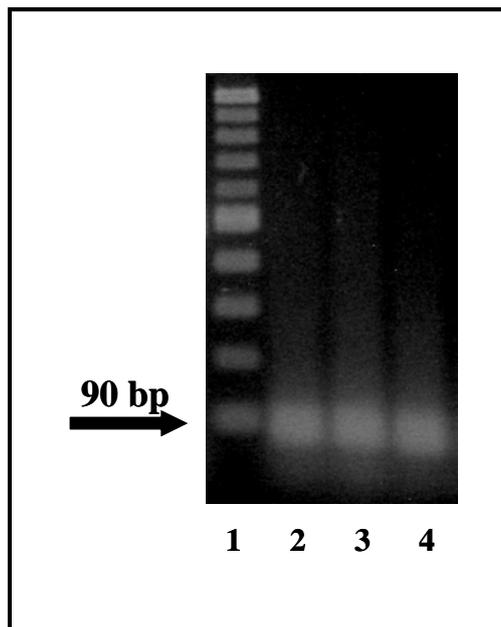
**Abb. 32:** Nachweis der  $\beta$ -Aktin-mRNA an Hodenhomogenat von Hunden mittels RT-PCR. 1: Marker, 2: präpubertär, 3: adult, normale Spermatogenese, 4: Sertoli Zelltumor, 5: Seminom. Für alle untersuchten Proben sind spezifische Banden im Bereich von 90 bp sichtbar.

Das für Cx45 verwendete Primerpaar stammt aus der Literatur (Di et al., 2001). Die RT-PCR an Gesamthomogenat, extrahiert aus Hodengewebe mit der histologischen Diagnose „normale Spermatogenese“, ergab ein spezifisches PCR-Produkt bei 487 bp (Abb. 33, Spuren 2-4). Diese Banden erwiesen sich in nachfolgender Sequenzierung als spezifisches Signal für Cx45 des Hundes. Das bei den Proben als interne Kontrolle verwendete  $\beta$ -Aktin ergab jeweils eine Bande im erwarteten Bereich von 90 bp (Abb. 34; Spuren 2-4).

Ergebnisse



**Abb. 33:** Nachweis der Cx45-mRNA an Hodenhomogenat von Hunden mittels RT-PCR. 1: Marker, 2-4: adult, normale Spermatogenese. Für alle untersuchten Proben sind spezifische Banden im Bereich von 487 bp sichtbar.

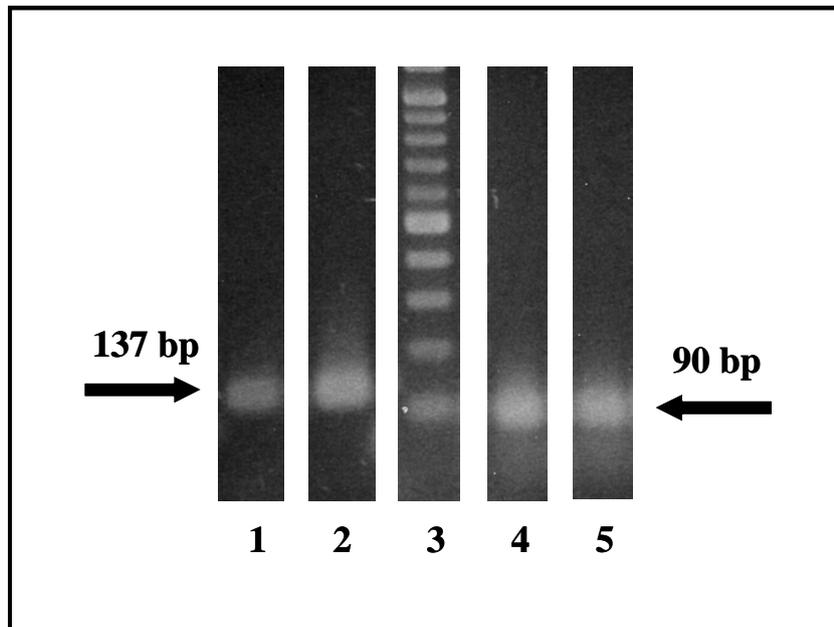


**Abb. 34:** Nachweis der  $\beta$ -Aktin-mRNA an Hodenhomogenat von Hunden mit normaler Spermatogenese mittels RT-PCR. 1: Marker, 2-4: adult, normale Spermatogenese. Für alle untersuchten Proben sind Banden im erwarteten Bereich von 90 bp sichtbar.

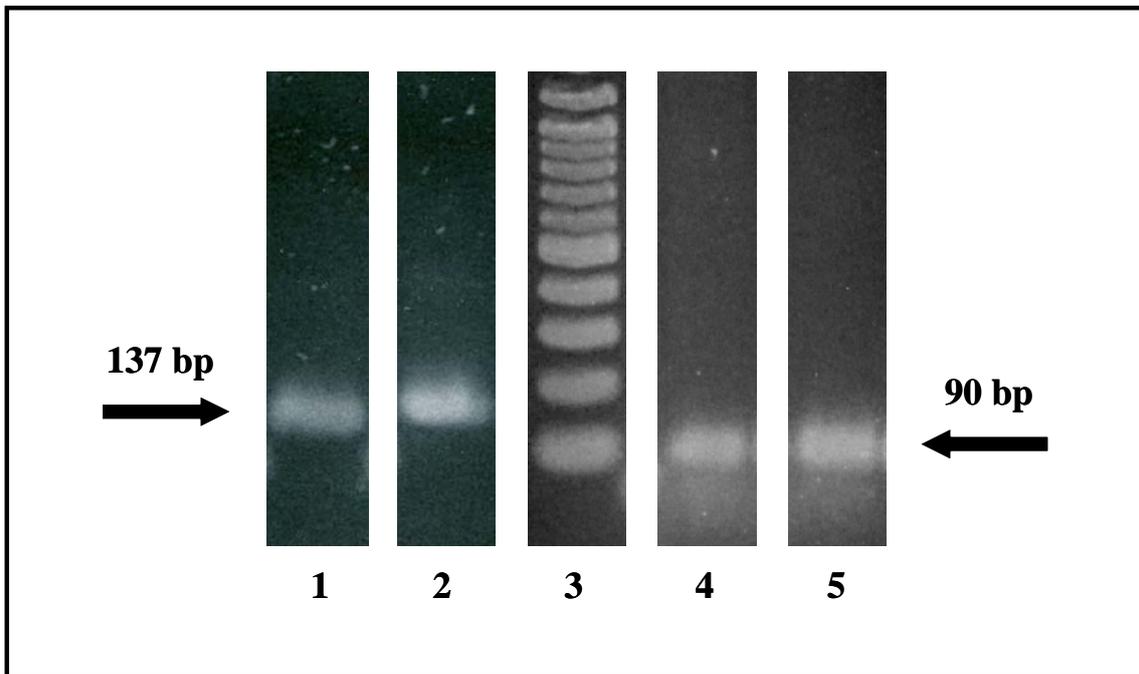
### 5.3.2 UV-Laser assistierte Mikrodissektion

Mit Hilfe der UV-Laser assistierten Mikrodissektion wurden zur Unterscheidung der intratubulären von der interstitiellen Cx43-mRNA-Expression und im Hinblick auf die in dieser Arbeit interessierende intratubuläre Cx43-Expression selektiv Keimtubuli mit Sertoli Zellen und Keimzellen aus Gefrierschnitten mit der histologischen Diagnose „präpubertäre Keimtubuli und normale Spermatogenese“, sowie neoplastische Zellen aus Gefrierschnitten mit der histologischen Diagnose „Sertoli Zelltumor und Seminom“ isoliert, deren Gesamt-RNA extrahiert und anschließend auf ihren Cx43-mRNA-Gehalt untersucht. Bei allen Proben konnten Banden im erwarteten Bereich von 137 bp detektiert werden (Abb. 35, Spur 1, Abb. 36, Spur 1, Abb. 37, Spuren 1 und 2). Diese Banden erwiesen sich in nachfolgender Sequenzierung als spezifisches Signal für Cx43 des Hundes. Zusätzlich wurden bei den Gefrierschnitten mit der histologischen Diagnose „präpubertär und normale Spermatogenese“ Zellen des interstitiellen Gewebes isoliert und auf Cx43-mRNA untersucht (Abb. 35, Spur 2, Abb. 36, Spur 2). Die detektierten Banden im Bereich von 137 bp wurden ebenfalls sequenziert und erwiesen sich als spezifisch. Das als interne Kontrolle bei allen Proben aufgrund der geringen RNA-Ausbeute aus mikrodissezierten Zellen verwendete  $\beta$ -Aktin ergab jeweils eine Bande im erwarteten Bereich von 90 bp (Abb. 35, Abb. 36, Abb. 37, jeweils Spuren 4 und 5).

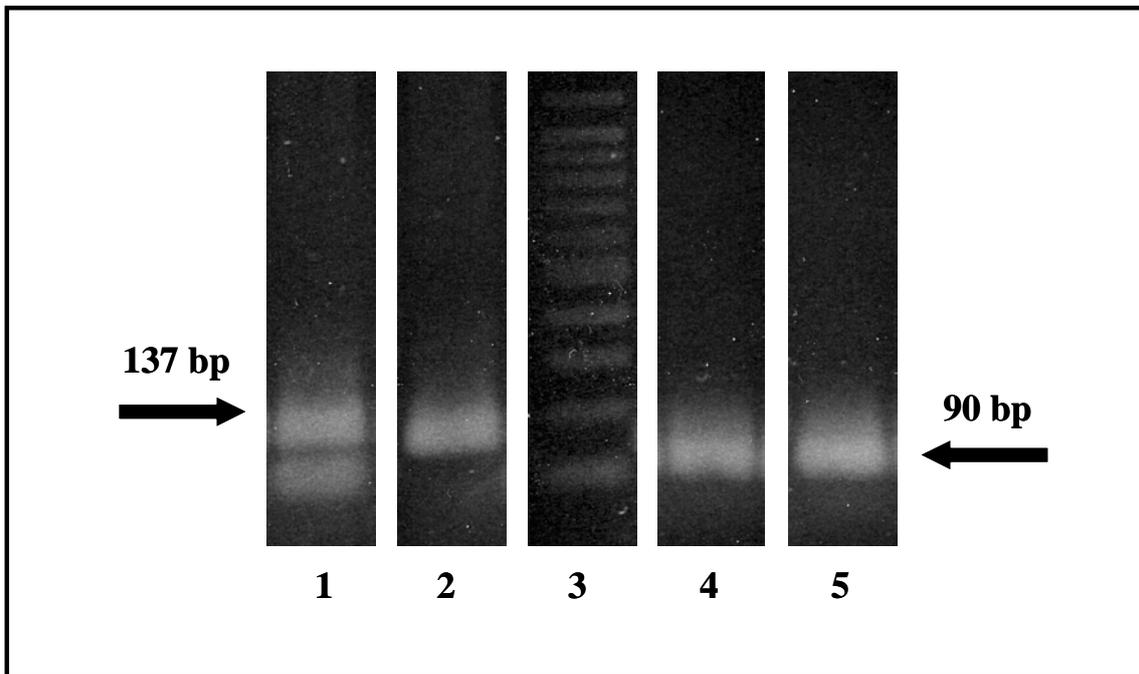
## Ergebnisse



**Abb. 35:** Nachweis der Cx43- und  $\beta$ -Aktin-mRNA an mikrodissezierten Keimzellen und Sertoli Zellen und mikrodissezierten Leydig Zellen des präpubertären Hundes mittels RT-PCR. 1: Cx43 Sertoli Zellen und Keimzellen, 2: Cx43 Leydig Zellen, 3: Marker, 4:  $\beta$ -Aktin Sertoli Zellen und Keimzellen, 5:  $\beta$ -Aktin Leydig Zellen. Für Cx43 sowie für  $\beta$ -Aktin sind spezifische Banden im erwarteten Bereich sichtbar.



**Abb. 36:** Nachweis der Cx43- und  $\beta$ -Aktin-mRNA an mikrodissezierten Keimzellen und Sertoli Zellen und mikrodissezierten Leydig Zellen des adulten Hundes mit normaler Spermatogenese mittels RT-PCR. 1: Cx43 Sertoli Zellen und Keimzellen, 2: Cx43 Leydig Zellen, 3: Marker, 4:  $\beta$ -Aktin Sertoli Zellen und Keimzellen, 5:  $\beta$ -Aktin Leydig Zellen. Für Cx43 sowie für  $\beta$ -Aktin sind spezifische Banden im erwarteten Bereich sichtbar.



**Abb. 37:** Nachweis der Cx43- und  $\beta$ -Aktin-mRNA an mikrodisssezierten neoplastischen Sertoli Zellen und neoplastischen Keimzellen des Hundes mittels RT-PCR. 1: Cx43 in neoplastischen Sertoli Zellen, 2: Cx43 in neoplastischen Keimzellen, 3: Marker, 4:  $\beta$ -Aktin in neoplastischen Sertoli Zellen, 5:  $\beta$ -Aktin in neoplastischen Keimzellen. Für Cx43 sowie für  $\beta$ -Aktin sind spezifische Banden im erwarteten Bereich sichtbar.

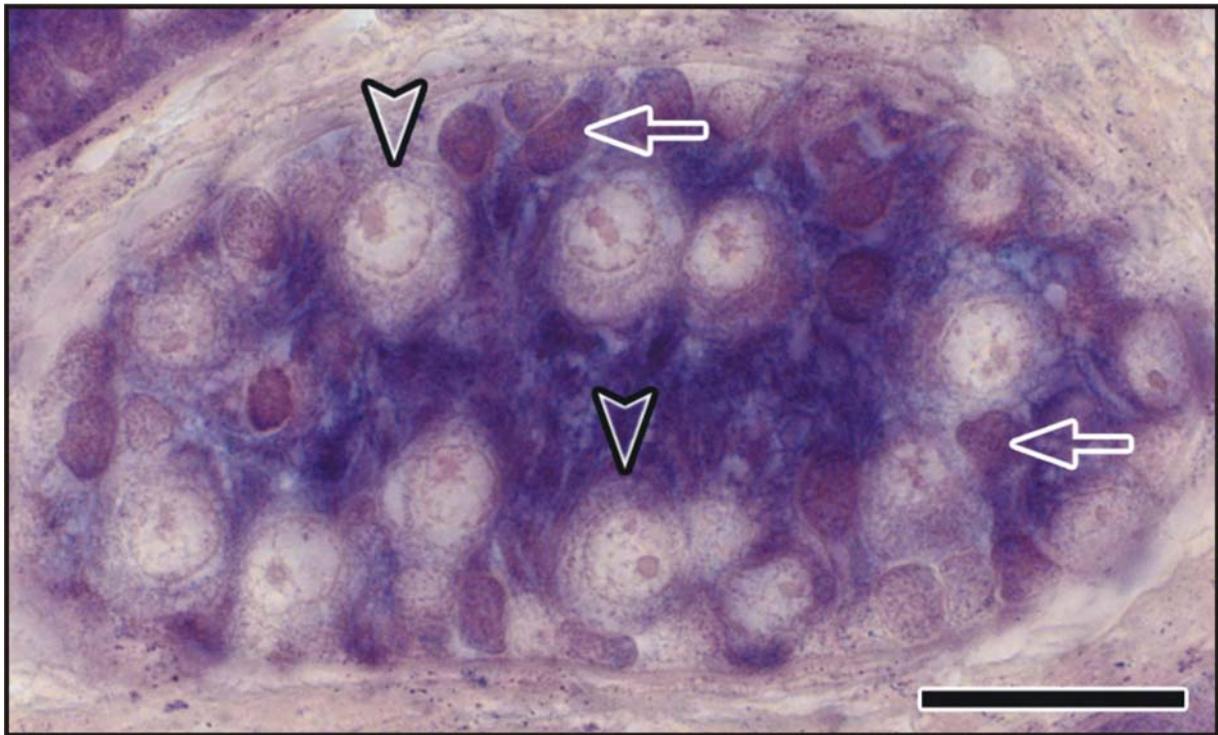
## 5.4 In-situ-Hybridisierung (ISH)

### 5.4.1 Cx43

Der Nachweis der Cx43-mRNA am Keimepithel des präpubertären Hundes, am Keimepithel des adulten Hundes mit normaler Spermatogenese, des Hundes mit Sertoli Zelltumor und des Hundes mit Seminom erfolgte an Paraffinschnitten mittels „anti-sense“-Sonde für Cx43.

#### 5.4.1.1 Präpubertäre Hoden

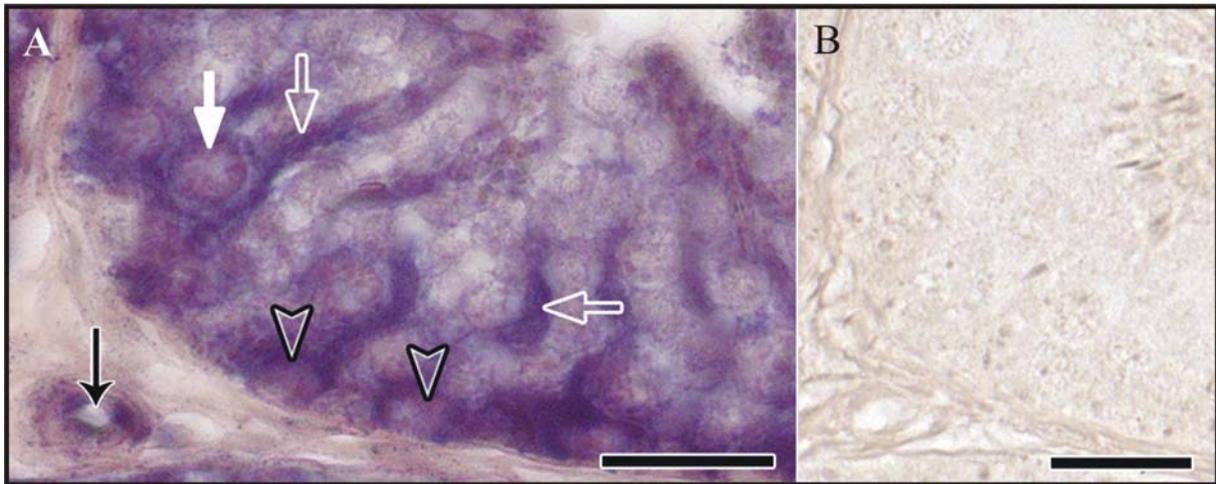
Cx43-mRNA konnte im Keimepithel des präpubertären Hundes ausschließlich im Zytoplasma der Sertoli Zellen nachgewiesen werden. Prä-spermatogonien blieben negativ für Cx43-mRNA (Abb. 38). Die Kontrollschnitte, die mit Cx43 „sense“-Sonden inkubiert wurden, blieben negativ.



**Abb. 38:** Nachweis der zellulären Lokalisation der Cx43-mRNA mittels in-situ-Hybridisierung an Paraffinschnitten des präpubertären Hundes. Präpubertärer Keimtubulus. Reaktion im Zytoplasma der Sertoli Zellen (durchsichtige weiße Pfeile). Präspermatogonien (durchsichtige Pfeilköpfe) sind negativ für Cx43-mRNA. Messbalken = 25  $\mu$ m.

#### 5.4.1.2 Normale Spermatogenese

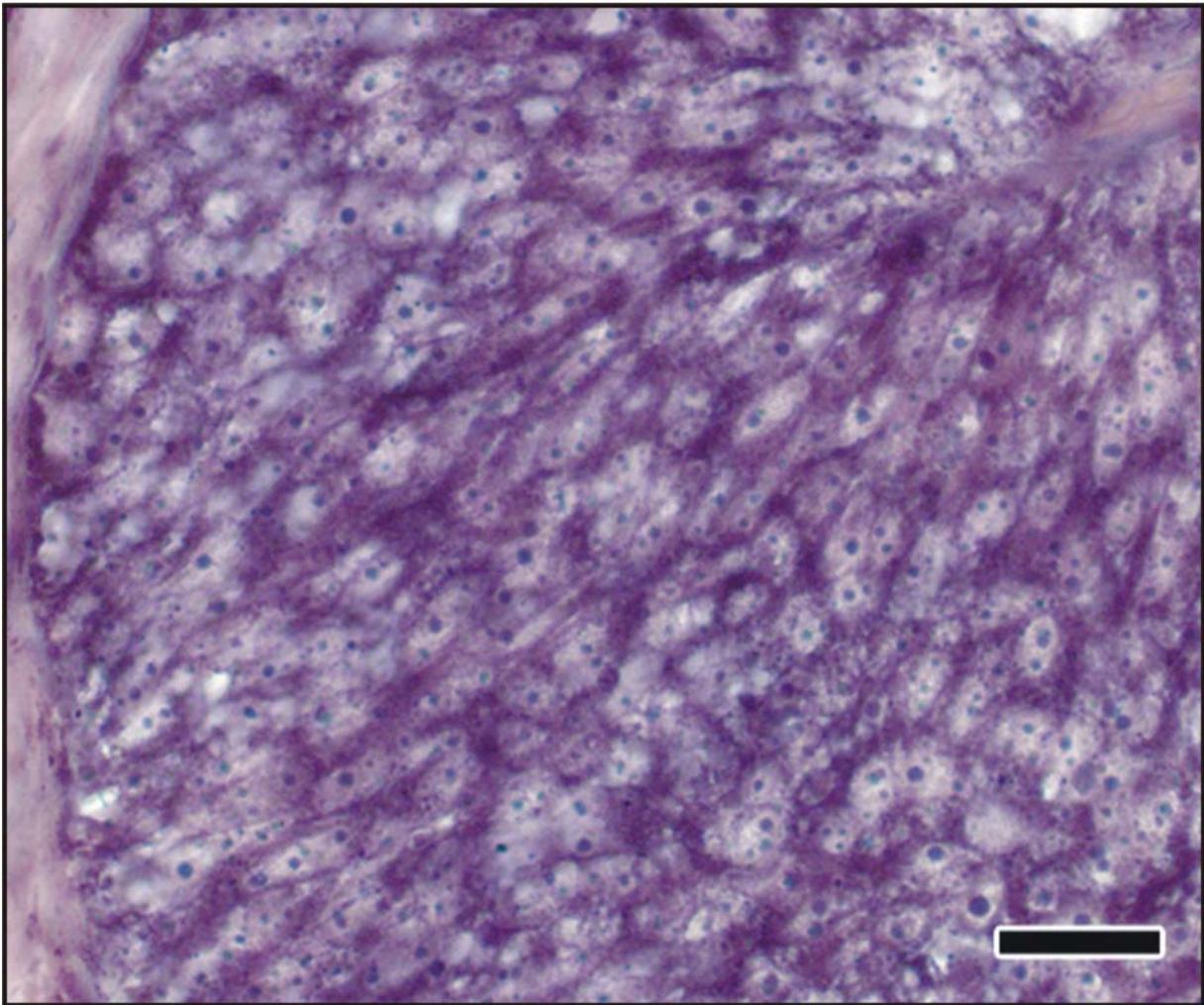
Im Keimepithel des adulten Hundes mit normaler Spermatogenese konnte Cx43-mRNA hauptsächlich im basalen Kompartiment mit Lokalisation im Zytoplasma von Sertoli Zellen, Spermatogonien und primären Spermatozyten detektiert werden (Abb. 39 A). Endothelzellen kleiner Blutgefäße zeigten ein starkes Signal für Cx43-mRNA (Abb. 39 A). „Sense“-Sonden blieben negativ (Abb. 39 B).



**Abb. 39:** Nachweis der zellulären Lokalisation der Cx43-mRNA mittels in-situ-Hybridisierung an Paraffinschnitten des adulten Hundes mit normaler Spermatogenese. **A:** Keimtubulus mit normaler Spermatogenese. Sertoli Zell Zytoplasma (durchsichtige weiße Pfeile), Spermatogonien (durchsichtige Pfeilköpfe), und primäre Spermatozyte (weißer Pfeil), sowie Endothelzellen eines kleinen Blutgefäßes (schwarzer Pfeil) sind positiv für Cx43-mRNA. **B:** Keimtubulus mit normaler Spermatogenese, Negativkontrolle. Messbalken = 25 µm

#### 5.4.1.3 Sertoli Zelltumor

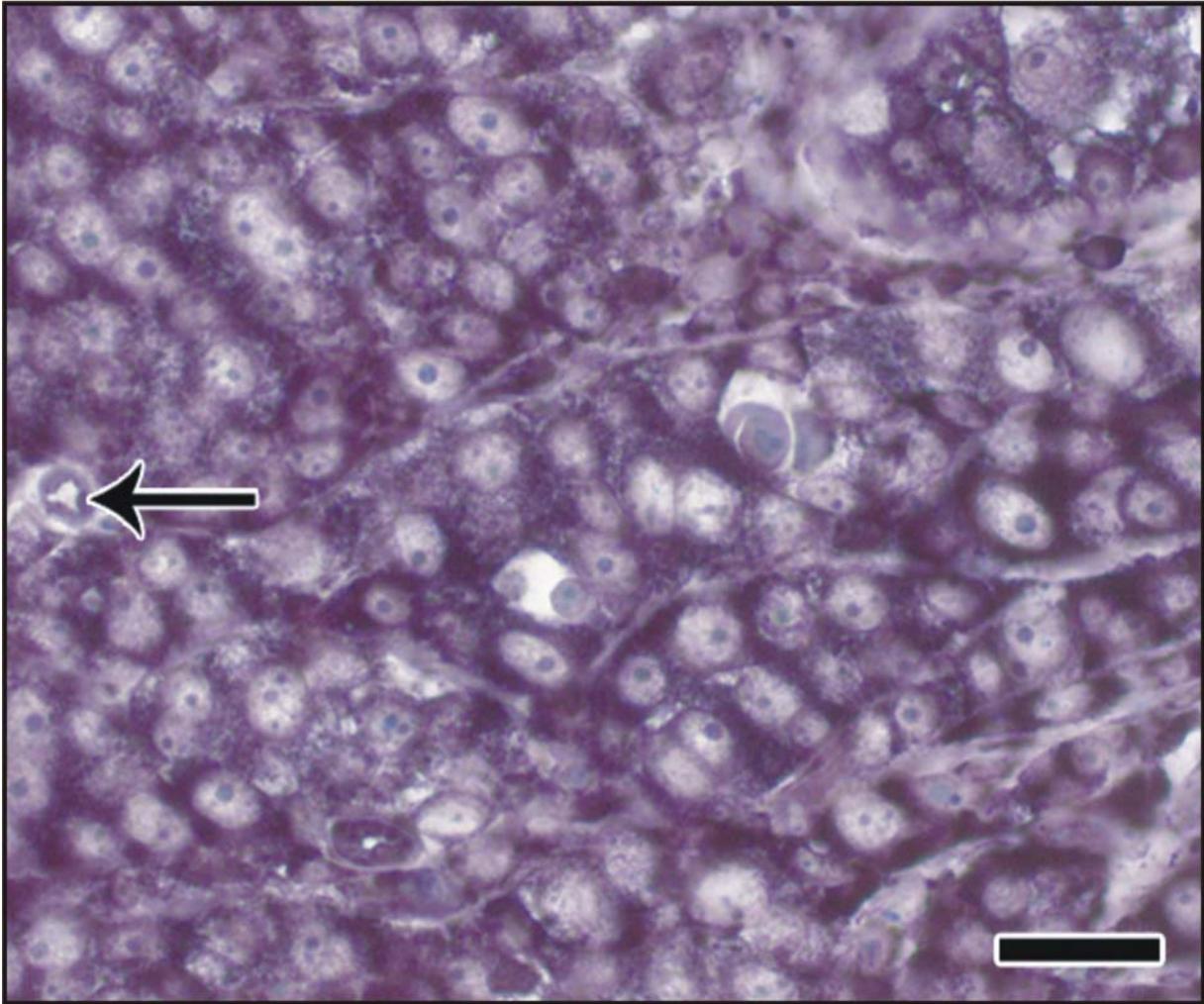
Eine homogene Cx43-mRNA-Expression konnte im caninen Sertoli Zelltumor detektiert werden. Die Zytoplasmata der neoplastischen Sertoli Zellen wiesen ein starkes Hybridisierungssignal für Cx43-mRNA auf (Abb. 40). Kontrollschnitte mit „sense“-Sonden waren negativ.



**Abb. 40:** Nachweis der zellulären Lokalisation der Cx43-mRNA mittels in-situ-Hybridisierung an Paraffinschnitten des Hundes mit Sertoli Zelltumor. Ausschnitt aus einem intratubulären Sertoli Zelltumor. Das Zytoplasma der neoplastischen Sertoli Zellen zeigt ein Hybridisierungssignal für Cx43. Messbalken = 25  $\mu$ m.

#### 5.4.1.4 Seminom

In neoplastische Keimzellen des caninen Seminom konnte ein homogenes Signal für Cx43-mRNA nachgewiesen werden (Abb. 41). Endothelzellen kleiner Blutgefäße waren ebenfalls positiv für Cx43-mRNA (Abb. 41). „Sense“-Sonden Kontrollschnitte waren komplett negativ.



**Abb. 41:** Nachweis der zellulären Lokalisation der Cx43-mRNA mittels in-situ-Hybridisierung an Paraffinschnitten des Hundes mit Seminom. Ausschnitt aus einem Seminom. Neoplastische Keimzellen und Endothelzellen kleiner Blutgefäße (schwarzer Pfeil) zeigen ein Signal für Cx43-mRNA. Messbalken = 25  $\mu$ m.

### 5.5 Zusammenfassung der Ergebnisse für Cx43

In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der Cx43-mRNA und -Proteinexpression der verschiedenen untersuchten Hodengewebe zusammengefasst. Es wurde folgende, rein qualitative Einteilung der Ergebnisse vorgenommen:

- +     $\Rightarrow$     spezifische Cx43-mRNA/Cx43-Protein nachweisbar
- $\Rightarrow$     keine spezifische Cx43-mRNA/kein Cx43-Protein nachweisbar

**Tabelle 3:** Ergebnisse der Cx43-mRNA- und -Proteinexpression

Hodengewebe	Sertoli Zelle		Keimzelle	
	mRNA	Protein	mRNA	Protein
präpubertär	+	+/-	-	-
adult, normale Spermatogenese	+	+	+	+
Sertoli Zelltumor	+	+		
Seminom			+	-

### 5.6 Zusammenfassung der vorläufigen Ergebnisse für Cx45

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der Cx45-mRNA und -Proteinexpression der untersuchten Hoden adulter Hunde mit normaler Spermatogenese mit den jeweils durchgeführten Methoden zusammengefasst. Es wurde folgende, rein qualitative Einteilung der Ergebnisse vorgenommen:

Ergebnisse

+            spezifische Cx45-mRNA/Cx45-Protein nachweisbar

-            keine spezifische Cx45-mRNA/kein Cx45-Protein nachweisbar

**Tabelle 4:** Ergebnisse der Cx45-mRNA und -Proteinexpression

RT-PCR	WB	IHC		
		Sertoli Zelle	Keimzelle	Peritubuläre Zelle
Hodenhomogenat	Hodenhomogenat			
+	+	-	-	+

## 6 Diskussion

Diese Arbeit beschäftigte sich überwiegend mit der Fragestellung, ob das GJ Protein Cx43 im Hoden des Hundes vorkommt und welches Verteilungs- und Lokalisationsmuster im caninen präpubertären Keimepithel, im Keimepithel des adulten Hundes mit normaler Spermatogenese und bei caninen Sertoli Zelltumoren und Seminomen auf mRNA- und Proteinebene besteht. Da Cx43 bereits im Hoden verschiedener Spezies beschrieben wurde (Kadle et al., 1991; Risley et al., 1992; Perez-Armendariz et al., 1994; Pelletier, 1995; Steger et al., 1999a; Brehm et al., 2006a; Hejmej et al., 2007), konnte davon ausgegangen werden, dass es auch im Hoden des Hundes exprimiert wird. Das häufige Auftreten caniner Hodentumore ließ die Spezies Hund zudem für Studien des männlichen Reproduktionstraktes interessant erscheinen. Da die Cx43 Genexpression und Proteinsynthese in neoplastischen humanen Hoden zusammen mit einer Sertoli Zelldifferenzierung während Sertoli Zelltumorentwicklung und Seminomentstehung herunterreguliert wird (Wilgenbus et al., 1992; Brehm et al., 2002; Roger et al., 2004; Brehm et al., 2006a; Brehm et al., 2006b), wurde beim Hund ein ähnliches Ergebnis erwartet. Interessanterweise lieferte dieses Forschungsprojekt, entgegen angenommener Vermutung, teilweise ein anderes Bild.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Fragestellung, ob ein weiteres GJ Protein, Cx45, im Hoden des Hundes in der normalen Spermatogenese auf mRNA- und Proteinebene exprimiert wird und wenn ja, wo es lokalisiert ist. Da Cx43 mit Cx45 im Herzen heteromere GJ-Kanäle bildet (Martinez et al., 2002) ergab sich die Frage nach einer eventuell bestehenden Kolo-kalisation dieser beiden GJ Proteine im Hoden des Hundes und ihrem Verteilungsmuster.

### 6.1 Cx43 in der normalen Spermatogenese des präpubertären und adulten Hundes

Die an caninem präpubertären Hodengewebe durchgeführte IHC für Cx43 ergab keine oder nur eine schwache sichtbare Färbung für Cx43-Protein innerhalb der Keimtubuli. Ein spezifisches Signal für dieses Protein konnte zwischen den interstitiellen Leydig Zellen detektiert werden. Die mit dem gleichen Antikörper durchgeführten WB an Proteinhomogenat aus präpubertären Hoden zeigten drei spezifische Banden bei 41, 43 und 45 kDa, die sich nach Inkubation mit CIP auf eine einzelne Bande bei 41 kDa reduzierten, und wahrscheinlich von interstitiellen präpubertären Leydig Zellen und Endothelzellen stammen. Interessanterweise wird Cx43-mRNA in präpubertären Keimsträngen bereits exprimiert, wie

durch UV-Laser-assistierte Mikrodissektion gezeigt werden konnte. Mit dieser spezifischen und sensitiven Methode, bei der einzelne Keimtubuli, die präpubertäre Sertoli Zellen und Prä spermatogonien enthielten, und Leydig Zell Areale als Positivkontrolle vom umgebenden Gewebe separiert und mittels RT-PCR untersucht wurden, kam es zu Signalen im erwarteten Bereich. Diese erwiesen sich durch nachfolgende Sequenzierung als spezifisch. Durchgeführte In-situ-Hybridisierungen bestätigten die Lokalisation von Cx43-mRNA innerhalb des präpubertären Keimstranges und zeigten die ausschließliche Expression der mRNA im Zytoplasma von Sertoli Zellen. Prä spermatogonien exprimieren in diesem Entwicklungsstadium noch kein Cx43. Im Hoden der Maus konnte Cx43-mRNA postnatal bis zum 19. Tag ausschließlich in Sertoli Zellen gefunden werden. Allerdings wurde im adluminalen Bereich der Sertoli Zellen bereits Cx43-Protein detektiert. Keimzellen exprimierten Cx43-mRNA erst später, im basalen Bereich des Keimtubulus (Batias et al., 2000). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass GJ, die Cx43 enthalten, am Einsatz der Spermatogenese in der Spezies Maus beteiligt sind. Eine frühere Studie konnte im Hoden von Hunden mittels Elektronenmikroskopie einige wenige GJ zwischen Sertoli Zellen direkt nach der Geburt detektieren (Connell, 1980) und weist auf eine vermutliche Beteiligung dieser GJ an der Vervollständigung der funktionellen Blut-Hoden-Schranke in der Pubertät hin. Cx43 scheint das vorherrschende Cx im Hoden verschiedener Spezies zu sein und seine Expression scheint von dem Entwicklungsgrad des Hodens abzuhängen. Im Keimepithel von Meerschweinchen konnte Cx43-Protein erstmals mit dem Beginn der Spermatogenese nachgewiesen werden. Die Verteilung des Proteins stimmte mit der der Elemente der Blut-Hoden-Schranke überein (Pelletier, 1995). Im Mäusehoden konnte Cx43-Protein hingegen bereits, wenn auch im adluminalen Kompartiment des Hodens lokalisiert, in fetalen und neonatalen Sertoli Zellen gefunden werden (Bravo-Moreno et al., 2001). Die räumliche Verteilung des Proteins beginnt apikal in neonatalen und präpubertären Sertoli Zellen und endet im basalen Bereich dieser Zellen, ebenfalls auf der Höhe der Blut-Hoden-Schranke. Durch Abwesenheit des Cx43-Proteins im Hoden von präpubertären Hunden wird der Hoden vermutlich am frühzeitigen Einsatz der Spermatogenese gehindert. Eine weitere Studie, welche die Androgenrezeptor-Expression und -Synthese untersucht, vermutet, dass die fehlende oder geringe Expression des Androgenrezeptors in fetalen, neonatalen und frühen infantilen Sertoli Zellen einen vorübergehenden und physiologischen Zustand der Androgen-Insensitivität darstellt, der wahrscheinlich ebenso den Hoden vor verfrühtem Beginn der Spermatogenese schützen soll (Chemes et al., 2005). Die Ergebnisse dieser Studie konnten mittels Androgenrezeptor IHC am Hoden des präpubertären Hundes und des adulten Hundes

bestätigt werden. Dabei wurde in präpubertären Sertoli Zellkernen im Vergleich zu murenen Sertoli Zellen ein schwaches Signal für das Androgenrezeptor-Protein detektiert. Folglich könnten die Expression von Cx43 und des Androgenrezeptors in Sertoli Zellen als funktioneller Marker für die canine Sertoli Zelldifferenzierung und die Reifung des Keimtubulus dienen. Die Bedeutung von Cx43-mRNA im präpubertären Hoden des Hundes bleibt unklar.

Im Hoden des adulten Hundes mit normaler Spermatogenese wurden Signale für Cx43-Protein zwischen Sertoli Zellen und zwischen Sertoli Zellen und Keimzellen, im basalen Kompartiment des Keimepithels detektiert. Die Verwendung von Gefrierschnitten, die eine bessere Erhaltung der Antigene bieten als Paraffinschnitte, aber stärkere morphologische Veränderungen zeigen, erschwerte eine Unterscheidung der verschiedenen Zellpopulationen, wodurch eine mögliche stadienspezifische Verteilung von Cx43-Protein nicht untersucht werden konnte. Die Immunreaktion im adluminalen Kompartiment des Keimtubulus wurde ebenfalls bei Hengsten gezeigt (Hejmej et al., 2007) und kann vermutlich mit kleineren GJ-Kanälen zwischen Sertoli Zellen und Spermatozoen in Verbindung gebracht werden. Die interstitiellen Leydig Zellen wiesen eine deutliche Immunreaktion auf. Diese Ergebnisse wurden durch WB bestätigt, die ebenfalls verschiedene Cx43-Isoformen bei 41, 43 und 45 kDa zeigten, die sich nach Inkubation mit CIP auf eine Bande bei 41 kDa reduzierten. Dies deutet darauf hin, dass sowohl verschiedene adulte Zellpopulationen, aber auch schon Zellen des präpubertären Hodens in der Lage sind, unphosphoryliertes und phosphoryliertes Cx43-Protein zu synthetisieren. Cx43-mRNA konnte sowohl mittels RT-PCR an isolierten Keimtubuli als auch mittels In-situ-Hybridisierung im Zytoplasma von Sertoli Zellen, Spermatozoen und primären Spermatozoen nachgewiesen werden.

Es liegt die Vermutung nahe, dass Cx43-Protein im Hoden des Hundes erstmals mit Beginn der Spermatogenese in der Pubertät synthetisiert wird und somit, wie bereits für andere Spezies angenommen (Pelletier, 1995), unerlässlich für die Unterstützung einer aufeinander abgestimmten Keimzeldifferenzierung, -proliferation und -reifung ist. Außerdem scheint Cx43 eine Rolle bei der terminalen Differenzierung der somatischen Sertoli Zellen zu spielen und ist wahrscheinlich an der morphologischen und funktionellen Ausbildung der Blut-Hoden-Schranke beteiligt (Connell, 1980; Pelletier, 1995). Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass das Expressions- und Verteilungsmuster für Cx43 im Hoden des adulten Hundes mit normaler Spermatogenese vergleichbar ist mit dem anderer Spezies und dass Cx43 eine funktionelle Rolle in der Spermatogenese zu spielen scheint. Vorherige Studien beschreiben das Vorkommen von Cx43 im normalen Keimepithel adulter Männer (Steger et al., 1999a;

Brehm et al., 2006a), Mäuse (Risley et al., 1992; Perez-Armendariz et al., 1994; Batias et al., 2000), Ratten (Kadle et al., 1991; Risley et al., 1992), Meerschweinchen und Nerze (Pelletier, 1995) und Pferden (Hejmej et al., 2007) sowie sein stadienspezifisches Verteilungsmuster. So findet man im Keimepithel des Mannes eine deutlich reduzierte oder keine immunopositive Reaktion für Cx43 zwischen benachbarten Sertoli Zellen entlang des „Sertoli-Sertoli-junctional-Complex“ in den Stadien II und III der Spermatogenese, wo eine Translokation der Spermatozyten vom basalen ins adluminal Kompartiment stattfindet (Steger et al., 1999a). Um im normalen Keimepithel des adulten Hundes die Stadienspezifität von Cx43 untersuchen zu können, sollten morphologisch besser erhaltene Paraffinschnitte verwendet werden. Da deren Antigenität meist schlechter erhalten ist, wäre der Gebrauch eines sensitiveren Detektionssystems sinnvoll.

## 6.2 Cx43 in caninem Sertoli Zelltumor und Seminom

Die vorliegenden caninen Hodenneoplasien wurden histologisch nach den Kriterien von Nielsen und Lein (1974) und Nielsen und Kennedy (1990) eingeteilt. Das Intermediärfilament Vimentin diente zusätzlich zur Identifikation der Sertoli Zellen, zur Unterscheidung zwischen Sertoli Zelltumoren und Seminomen und somit zur Verifizierung der pathologisch-histologischen Diagnose. Vimentin ist das Hauptintermediärfilament in Sertoli Zellen (Franke et al., 1979). Im caninen Hoden mit normaler Spermatogenese färbte der Anti-Vimentin-Antikörper das Zytoplasma von Sertoli Zellen und interstitiellen Leydig Zellen, wie auch in der Analyse von Patnaik und Mostofi (1993) beschrieben. Allerdings zeigten die Keimzellen im Gegensatz zu fokalen, perinukleären Reaktionen in vorher erwähnter Studie kein immunreaktives Signal. Die Untersuchung der caninen Hodentumoren ergab ein starkes Signal im Zytoplasma der neoplastischen Sertoli Zellen und in den Endothelzellen kleiner Blutgefäße. Neoplastische Keimzellen blieben negativ. Somit kann Vimentin, wie in vorherigen Studien beschrieben (Patnaik und Mostofi, 1993; Peters et al., 2000; Peters et al., 2001), zur Unterscheidung neoplastischer Sertoli Zellen von neoplastischen Keimzellen in histologisch zweifelhaften Fällen und bei der Unterscheidung von Mischtumoren eingesetzt werden.

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Sertoli Zelltumoren handelte es sich sowohl um Sertoli Zelltumoren vom intratubulären Typ, als auch um Sertoli Zelltumoren vom diffusen Typ. Beide untersuchten Typen zeigten interessanterweise in der Immunhistochemie ein starkes Signal für Cx43-Protein zwischen den neoplastischen Sertoli Zellen. Diese Ergebnisse stehen

im Gegensatz zu untersuchten humanen Sertoli Zelltumoren, bei denen keine Immunreaktivität für Cx43 gefunden werden konnte (Brehm et al., 2006a) und deuten auf eine unterschiedliche Regulation der Cx43-Proteinsynthese in caninen und humanen Sertoli Zelltumoren. Bestätigt werden diese Daten durch eine ultrastrukturelle Analyse, in der membranständige GJ-Kanäle in einem caninen Sertoli Zelltumor detektiert werden konnten. Diese GJ-Kanäle waren vor allem zwischen weniger gut differenzierten neoplastischen Sertoli Zellen zu sehen (Thilander et al., 1987). Daher stellt sich die Frage, ob Sertoli Zelltumoren des Hundes, im Gegensatz zu denen des Menschen (Brehm et al., 2006a), von adulten und differenzierten Sertoli Zellen abstammen, die im Stande sind, Cx43-Protein zu synthetisieren. Eine Untersuchung des Differenzierungszustandes der neoplastischen Sertoli Zellen mittels verschiedener Differenzierungsmarker zu Beginn der Tumorentstehung, während derer noch tubuläre Strukturen erhalten sind, sowie in späteren Sertoli Zelltumoren würde, eine weitere Möglichkeit bieten, eine Aussage über den tatsächlichen Differenzierungszustand der Zellen und die Tumorentwicklung zu treffen. Ob neoplastische Sertoli Zellen fähig sind über funktionelle GJ-Kanäle zu kommunizieren, bleibt zu untersuchen. Durchgeführte WB an Proteinhomogenat aus Sertoli Zelltumorgewebe bestätigten die Ergebnisse der IHC. Es konnten drei starke immunreaktive Banden für Cx43-Protein bei 41, 43 und 45 kDa dargestellt werden. Eine Behandlung mit CIP reduzierte diese Banden auf ein immunreaktives Signal bei 41 kDa. Dieses Ergebnis zeigt wiederum, dass neoplastische Sertoli Zellen in der Lage sind, ebenfalls phosphoryliertes und unphosphoryliertes Cx43-Protein zu synthetisieren. Phosphorylierung von Cx43 ist in die Regulierung der Kommunikation über GJ-Kanäle zu verschiedenen Stadien des Zellzyklus und ebenso in die Regulierung des Lebenszyklus der Cx sowie in die Kopplung intakter GJ-Kanäle mit einbezogen (Solan und Lampe, 2005). Cx43 wird hauptsächlich vor seiner Ankunft in der Plasmamembran phosphoryliert und seine Phosphorylierung wurde mit der Anhäufung von Connexonen in GJ-Plaques assoziiert (Musil und Goodenough, 1991). Darüber hinaus ist bekannt, dass Phosphorylierung die interzelluläre Kommunikation über GJ beeinflussen kann (Berthoud et al., 1993; Saez et al., 1993). Da im WB der untersuchten caninen Sertoli Zelltumore unterschiedlich phosphorylierte Cx43-Isoformen festgestellt wurden, kann man vermuten, dass diese Isoformen in die Sertoli Zellmembran integriert sind und über die Fähigkeit zur funktionellen interzellulären Kommunikation über GJ-Kanäle verfügen.

Nur wenige Arbeiten beschreiben, dass neoplastische Zellen normale interzelluläre Kommunikation über GJ-Kanäle aufweisen, die gleiche oder sogar eine höhere Anzahl an GJ bilden und, verglichen mit ihren Gegenstücken, eine normale Zellkopplung zeigen

(Loewenstein, 1979; Yamasaki, 1990). Bei den meisten Neoplasien kann man eine Reduzierung oder einen kompletten Verlust der Cx-Expression auf transkriptionaler Ebene, abnormale Phosphorylierung und/oder Lokalisation der Cx und einen Defekt in der Zusammenfügung der GJ feststellen (Yamasaki 1990; Krutovskikh et al., 1991). Gestörte interzelluläre Kommunikation über GJ und/oder der Verlust der Cx-Expression werden mit verschiedenen humanen Neoplasien in Verbindung gebracht und sollen mit der Transformation in Tumorgewebe und erhöhter Invasivität korrelieren. Dazu zählen Prostata (Hossain et al., 1999), Brust (Laird et al., 1999), Lunge (Ruch et al., 2001), Gehirn (Soroceanu et al., 2001) und Hoden (Wilgenbus et al., 1992; Brehm et al., 2002; Roger et al., 2004). Allerdings konnte in einzelnen humanen neoplastischen Geweben, wie dem hepatozellulären Karzinom, im Fibroadenom und Karzinom der Brust und im Prostatakarzinom, Cx43-Protein noch detektiert werden (Wilgenbus et al., 1992; Jamieson et al., 1998). Canine Sertoli Zelltumoren scheinen eine der wenigen Neoplasien zu repräsentieren, die noch Cx43-Proteinexpression aufweisen.

Sertoli Zelltumoren des Rüden können mit klinischen Feminisierungserscheinungen einhergehen. Dieses Phänomen ist auf die Sekretion übermäßiger Östrogenmengen durch die Tumorzellen zurückzuführen (Nielsen and Kennedy, 1990) und führt zu erhöhten Östradiol-Konzentrationen im testikulären und peripheren venösen Blut (Peters et al. 2000). Bekanntermaßen können GJ, die Cx43 enthalten, im Myometrium der Nager durch Östrogen hochreguliert werden. Dies geschieht über vermeintliche, auf Östrogen ansprechende, Elemente (Dahl und Berger, 1978; Burghardt et al., 1984; Yu et al., 1994). Es ist also denkbar, dass die beobachtete Synthese von Cx43-Protein in caninen Sertoli Zelltumoren ein Östrogen-abhängiger Prozess ist und dass Hormone einen regulierenden Einfluss auf die Cx-Expression im Hoden ausüben können.

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Keimzelltumoren des Rüden handelte es sich um Seminome des diffusen Typs. Im Gegensatz zu Sertoli Zelltumoren konnte in untersuchten caninen Seminomen keine Immunreaktion für Cx43-Protein zwischen neoplastischen Keimzellen festgestellt werden. Dieses Ergebnis wurde durch WB am Proteinhomogenat von Seminomen bestätigt. Es wurde eine schwache Bande im Bereich von 45 kDa detektiert, die mutmaßlich von Cx43 in verbleibenden einzelnen Leydig Zellen oder Endothelzellen stammt. Untersuchungen auf der mRNA-Ebene ergaben ein Hybridisierungssignal für Cx43 im Zytoplasma neoplastischer Keimzellen und dies konnte mittels RT-PCR an isolierten neoplastischen Zellen bestätigt werden. Verschiedene Studien an männlichen Hodentumoren

zeigten ebenfalls, dass keine Immunreaktivität für Cx43-Protein zwischen neoplastischen Keimzellen gefunden werden konnte (Wilgenbus et al., 1992; Brehm et al., 2006b), oder dass das Protein eine abweichende intrazytoplasmatische Lokalisation aufwies (Roger et al., 2004). Auf mRNA-Ebene konnte Cx43 in humanen Seminomen mittels RT-PCR nachgewiesen werden, jedoch ergaben durchgeführte In-situ-Hybridisierungen, dass es sich dabei um Cx43-mRNA in residualen Leydig Zellen, Endothelzellen und peritubulären Zellen handelte. Neoplastische Keimzellen zeigten kein Signal für Cx43-mRNA. In Keimzelltumoren des Menschen scheint Cx43-mRNA daher bereits auf transkriptionaler Ebene herunterreguliert zu werden (Brehm et al., 2006b), wohingegen in caninen Seminomen Cx43-mRNA noch vorhanden ist. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Tumorzellen in Seminomen nicht im Stande sind, Cx43-Protein zu synthetisieren und über Cx43 GJ-Kanäle zu kommunizieren. Untersuchungen an bösartigen Tumoren des caninen Gesäuges ergaben unterschiedliche Ergebnisse für Cx43-Protein. So wurden beim Spindelzellkarzinom nur einige wenige positive Signale in der Zellmembran gefunden, eine gesteigerte intrazytoplasmatische Immunreaktion beim Karzinosarkom oder überhaupt keine Immunreaktion im komplexen Karzinom und squamösen Zellkarzinom (Torres et al., 2005). Cx43-mRNA konnte aber mittels RT-PCR in 80 % der bösartigen Mischtumore und in 90 % der Adenokarzinome des Gesäuges der Hündin detektiert werden (Gotoh et al., 2006). Defekte interzelluläre Kommunikation über GJ ist typisch für die Entwicklung der meisten Tumore, Seminome eingeschlossen (Yamasaki et al., 1999; Soroceanu et al., 2001). Neoplastische Keimzellen in caninen Seminomen scheinen nicht über funktionelle GJ-Kanäle zu kommunizieren. Im Keimepithel der Hoden von Sertoli Zell-spezifischen Cx43 „knock-out“-Mäusen, denen das Cx43 Gen in Sertoli Zellen fehlt, konnte in verbleibenden Spermatogonien noch Cx43-mRNA, jedoch ebenfalls kein Protein mehr gefunden werden. Dies weist auf eine gestörte heterotypische Kommunikation über Cx43 GJ-Kanäle zwischen Sertoli Zellen und Spermatogonien hin (Brehm et al., 2007). Warum Cx43-mRNA noch exprimiert, aber nicht in Protein translatiert wird, ist bisher nicht bekannt. Es wird vermutet, dass die Expression von Proteinen auf verschiedenen Stufen reguliert werden kann, wie auf transkriptionaler und posttranskriptionaler Ebene, im Hinblick auf mRNA-Splicing und mRNA-Stabilität, auf translationaler Ebene und durch posttranslationale Ereignisse. Untersuchungen an Follikeln des Rattenovars zeigten, dass Luteinisierendes Hormon in der Lage ist, die Cx43-Translation zu hemmen. Dieser hormonell bedingte Effekt wurde über Proteinkinase A und MAP-Kinase vermittelt. Auch in diesem Fall konnte kein Cx43-Protein mehr detektiert werden, wohingegen die mRNA noch vorhanden war (Kalma et al., 2004). In einer anderen Studie der

Leberregeneration der Ratte konnte durch Injektion von Cycloheximid zur Proteinsynthesehemmung von hauptsächlich in der Leber vorkommendem Cx26 und Cx32 festgestellt werden, dass das Verschwinden der Cx26-mRNA ebenfalls verhindert, Cx32-mRNA jedoch nicht mehr detektiert werden konnte. Es wurde angenommen, dass Proteinfaktoren in die Regulation der Cx26-mRNA-Expression involviert sind. Diese Regulation über Proteinfaktoren findet auf posttranskriptionaler Ebene statt und beeinflusst die Stabilität der mRNA (Kren et al., 1993).

Bereits Loewenstein und Kanno konnten 1966 zeigen, dass die Mehrzahl tumorös veränderter Zellen nicht miteinander kommunizieren oder eine veränderte interzelluläre Kommunikation über GJ aufweisen. Ebenso wurde beschrieben, dass es sich bei Cx um eine Familie von Tumorsuppressorgenen handelt und es bei Verlust oder Reduzierung der Cx-Expression zur Tumorprogression kommt (Yamasaki, 1999). Die Ergebnisse der auf Protein- und mRNA-Ebene untersuchten caninen Seminome lassen vermuten, dass die Herunterregulierung von Cx43 eine Rolle in der Entwicklungsphase dieser Keimzelltumore spielt und dass das Seminom des Hundes im Hinblick auf die Cx43-Expression mit dem Keimzelltumor des Mannes verglichen werden kann.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse für Cx43 im Hoden des Hundes, dass (1) Cx43 in die Initiierung der caninen Spermatogenese involviert zu sein scheint, da es wahrscheinlich erstmals mit Beginn der Spermatogenese in der Pubertät exprimiert wird und daher als pubertärer Differenzierungsmarker eingesetzt werden kann, (2) Cx43 scheint an der Aufrechterhaltung der Spermatogenese beteiligt zu sein, da gezeigt werden konnte, dass es zwischen reifen Sertoli Zellen und zwischen Sertoli Zellen und Spermatogonien und Spermatozyten exprimiert wird, (3) Cx43 scheint in caninen Hodentumoren unterschiedlich reguliert zu werden, da es zwischen neoplastischen Sertoli Zellen noch synthetisiert wird, aber nicht mehr zwischen neoplastischen Keimzellen und kann daher als Marker für canine Sertoli Zelltumore eingesetzt werden. Weitere Studien sollten sich mit dem Differenzierungsstatus der neoplastischen Sertoli Zellen beschäftigen. Es bleibt außerdem zu erläutern, welche translationalen Faktoren der Cx43-Expression/-Synthese in Zusammenhang mit der Entwicklung der caninen Keimzelltumore und dem Einsatz der pubertären Cx43-Synthese stehen. In Anbetracht der hohen Frequenz testikulärer Tumore des Hundes und ihren Gemeinsamkeiten oder Gegensätzen zu humanen Hodentumoren, sollten zukünftige vergleichende Studien die Spezies Hund einbeziehen.

### 6.3 Cx45 in der normalen Spermatogenese des adulten Hundes

Erste, am Hodengewebe des Hundes mit normaler Spermatogenese unter Verwendung des Anti-Cx45-Antikörpers von Prof. Dr. Thomas Steinberg, Washington University St. Louis, durchgeführte Immunfluoreszenz-Untersuchungen, ergaben ein spezifisches immunreaktives Signal in den peritubulären Zellen und in den Endothelzellen kleiner Gefäße. Die ebenfalls detektierten, weniger deutlichen Signale im basalen Bereich der Keimtubuli und im Bereich der Kerne der Sertoli Zellen, Spermatogonien und Spermatozyten können als unspezifische Hintergrundfärbung und Kernfärbung gedeutet werden. Als Ursache kommt dafür eventuell eine Kreuzreaktivität des polyklonalen Anti-Cx45-Antikörpers in Frage. Hintergrundfärbungen aufgrund einer Kreuzreaktivität entstehen vor allem dann, wenn ein oder mehrere Epitope des gesuchten Antigens auch auf anderen Proteinen vorkommen, es sich also um gemeinsame, stark verwandte oder sogar nur ähnliche Epitope handelt. Im Hoden des Hundes könnten dafür andere Mitglieder der Proteinfamilie der Cx in Frage kommen. Eine weitere Möglichkeit der unspezifischen Hintergrundfärbung des gesamten Gewebes oder bestimmter Anteile ist die physikalische Verletzung des Gewebes, z.B. durch Zellquetschung oder Austrocknung vor der Fixierung, und sollte auch bei den hier verwendeten Gefrierschnitten nicht außer acht gelassen werden (Boenisch, 2003). Die als Positivkontrolle am Herzen der Maus durchgeführte IF ergab spezifische Signale für Cx45 in den Glanzstreifen und zwischen den Herzmuskelzellen. Mit dem gleichen Antikörper durchgeführte WB an Hodenhomogenat des adulten Hundes mit normaler Spermatogenese bestätigten die Ergebnisse der IF und zeigten eine schwache Bande im Bereich von 45 kDa. Zur genauen Lokalisation wurde ein Homogenat von mit Cx45-transfizierten HeLa-Zellen von Prof. Dr. Kathryn Yamada, Washington University St. Louis, verwendet, welches ein spezifisches Signal bei 45 kDa aufwies. Es sind bisher keine weiteren Studien zur Cx45-Protein-Expression im Hoden des Hundes bekannt und die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Cx45 ein weiteres Mitglied der Cx-Familie im Hoden zu sein scheint und wahrscheinlich in den peritubulären Zellen exprimiert wird. In der Ratte konnten auf ultrastruktureller Ebene Tight junctions zwischen peritubulären Zellen nachgewiesen werden, die die Passage von größeren Molekülen in das Keimepithel verhindern und somit möglicherweise in ihrer Funktion als Barriere für diese Moleküle, die Blut-Hoden-Schranke unterstützen (Dym und Fawcett, 1970). Man kann annehmen, dass auch Gap junctions, wie im Fall der Blut-Hoden-Schranke, einen Teil dieser Barriere darstellen. Peritubuläre Zellen spielen außerdem eine Rolle bei Kontraktionen des Keimepithels und fördern somit den Spermientransport in das

Lumen des Keimtubulus. Roosen-Runge (1951) berichtete als erster über die Motilität des Keimepithels von Ratten und Hunden. Es ist bekannt, dass GJ-Kanäle, die u.a. Cx45 enthalten, im Herzen für die elektrische Impulsweiterleitung und somit für eine koordinierte Kontraktion der Herzmuskelzellen zuständig sind (Gros und Jongsma, 1996). Man könnte annehmen, dass die Kontraktilität der Tubuli seminiferi während bestimmter Stadien des Keimepithelzyklus über GJ-Kanäle, die Cx45 enthalten, reguliert wird. Peritubuläre Zellen synthetisieren Androgenrezeptor-Protein (Ruizeveld de Winter et al., 1991; Zhou et al., 2002), was in dieser Studie ebenfalls im Hoden des präpubertären Hundes und des adulten Hundes mit normaler Spermatogenese gezeigt werden konnte. Sie sind über die Weiterleitung des für die Funktionalität der männlichen Reproduktion essentiellen Steroid-Hormons Testosteron in das Keimepithel indirekt an der Stimulation der Spermatogenese beteiligt (Zhou et al., 2002). Hormonelle Effekte werden also teilweise über peritubuläre Zellen vermittelt. Es ist denkbar, dass auch Cx45 in peritubulären Zellen mit Cx der Zellen des Keimepithels funktionelle GJ-Kanäle bilden und über Metabolite und Signalmoleküle Einfluss auf die Spermatogenese und die verschiedenen Zellen nehmen könnte.

Die Untersuchung der Cx45-Expression mittels RT-PCR erfolgte an Hodenhomogenat von adulten Hunden mit normaler Spermatogenese. Bei den untersuchten Proben kam es zu Banden im erwarteten Bereich und somit konnte erstmals Cx45-mRNA im Hoden des Hundes detektiert werden. Die von Risley (2000) durchgeführte RT-PCR an aufgereinigten Tubuli seminiferi, isolierten Sertoli Zellen, Keimzellen und peritubulären Zellen von präpubertären und adulten Ratten zeigte bereits unter anderen Cx das Vorhandensein von Cx45-mRNA in Tubuli seminiferi von präpubertären Ratten und Sertoli Zellen, pachytänen Spermatozyten, runden Spermatiden und peritubulären Zellen von adulten Ratten. Der Autor geht davon aus, dass wenig mRNA-Sequenz vorhanden, und dementsprechend die Ausbeute an eventuell translatiertem Protein funktionell unsignifikant sein könnte (Risley, 2000). Im Gegensatz dazu konnten Lee et al., 2006 im Hoden von W/W<sup>v</sup> mutierten Mäusen, denen jegliche Keimzellen im Hoden fehlen, keine Cx45-mRNA mehr detektieren. Dieses Ergebnis deutet auf eine keimzellspezifische Expression von Cx45 hin (Lee et al., 2006). Welche funktionelle Rolle Cx45 im Hoden des Hundes und für dessen Spermatogenese spielt, bleibt aufzuklären. Innerhalb eines mRNA-Expressionsmusters im Hoden von adulten Mäusen, fetalen normalen Mäusen, heterozygoten fetalen Cx43-„knock-out“-Mäusen und homozygoten Cx43-„knock-out“-Mäusen konnte ebenfalls mittels RT-PCR unter anderen Cx, Cx45-mRNA detektiert werden (Juneja, 2003). Es kann spekuliert werden, dass Cx45 im Hoden von Cx43-„knock-

out“-Mäusen in der Lage ist, kompensatorisch und in kompatiblen Verbindungen mit anderen Cx, die negativen Effekte der Mutationen auf die Spermatogenese zu minimieren (Juneja, 2003).

Obwohl die in dieser Arbeit untersuchten Vertreter der Cx-Protein-Familie im Herzen heteromere Gap-junctions bilden (Martinez et al., 2002) und auch im Herzen der Spezies Hund mittels Immunhistochemie lokalisiert werden konnten (Kanter et al., 1992), geben die erhaltenen Ergebnisse keinen Hinweis auf eine Kolo-kalisation von Cx43 und Cx45 im Hoden des adulten Hundes mit normaler Spermatogenese. Cx43 scheint zwischen Sertoli Zellen und zwischen Sertoli Zellen und Spermatogonien und primären Spermatozyten lokalisiert zu sein, wohingegen die Untersuchungen für Cx45 seine hauptsächliche Lokalisation in den peritubulären Zellen des Hodens vermuten lässt. Weiterhin ist bekannt, dass es bei ventrikulären Arrhythmien im Herzen zu einer Herunterregulierung von Cx43 und einer Hochregulierung von Cx45 kommt (Yamada et al., 2003). Ob Cx45 bei Spermatogenesestörungen und der Entstehung von Hodentumoren eine Rolle spielt und eventuell in der Lage ist, die Herunterregulierung von Cx43 z.B. in der Entstehung von Seminomen zu kompensieren, bleibt aufzuklären.

## 7 Zusammenfassung

Im Hoden treten zwischen den unterschiedlichen Zellpopulationen verschiedene Möglichkeiten zur interzellulären Kommunikation auf. Neben parakriner und endokriner Kommunikation spielt dabei die direkte zelluläre Kommunikation über GJ-Kanäle eine sehr wichtige Rolle. Das GJ-Protein Cx43 ist das vorherrschende Cx im Hoden der meisten Spezies und wird von Sertoli Zellen, Spermatogonien, Spermatozyten, peritubulären Zellen und interstitiellen Leydig Zellen exprimiert. Im Keimepithel des Meerschweinchens und des Nerzes wird Cx43 erstmals mit Beginn der Spermatogenese und mit Bildung der funktionellen Blut-Hoden-Schranke exprimiert und kann in diesen Tierarten als pubertärer Differenzierungsmarker der Sertoli Zelle verwendet werden. Es scheint für die terminale Differenzierung der Sertoli Zellen, die kontrollierte Interaktion und Kommunikation zwischen Sertoli Zellen und Keimzellen und die pubertäre Initiation der Spermatogenese erforderlich zu sein. In neoplastischen humanen Hoden wird Cx43-Protein, einhergehend mit Sertoli Zelldifferenzierung während Keimzelltumor- und Sertoli Zelltumorentwicklung, herunterreguliert. Der Hund wurde wegen des relativ häufigen Auftretens testikulärer Neoplasien als Tiermodell im Vergleich zu Studien des männlichen Reproduktionstraktes vorgeschlagen. Das GJ-Protein Cx45 wird zwischen Herzmuskelzellen und Zellen der glatten Muskulatur exprimiert. Im Hoden konnte Cx45-mRNA in Tubuli seminiferi von Nagern gefunden werden. Cx43 und Cx45 können oft im gleichen GJ-Plaques kolokalisiert sein. Sie bilden im Herzen heteromere GJ-Kanäle, wobei es assoziiert mit ventrikulären Arrhythmien zu einer Herunterregulierung von Cx43 und einer Hochregulierung von Cx45 kommt.

In der gegenwärtigen Studie wurde das mögliche Vorkommen von Cx43-mRNA und -Protein im Hoden von präpubertären Hunden, adulten Hunden mit normaler Spermatogenese und in verschiedenen Formen testikulärer Tumore, mit Hilfe von Immunhistochemie, Western Blot, RT-PCR aus Gewebehomogenat und aus mikrodisszezierten Zellen und In-situ Hybridisierung, untersucht. Zudem wurde das mögliche Auftreten von Cx45-mRNA und -Protein im Hoden von adulten Hunden mit normaler Spermatogenese, mit Hilfe von Immunhistochemie, Western Blot und RT-PCR aus Gewebehomogenat ermittelt.

Cx43-mRNA konnte in allen untersuchten caninen testikulären Geweben detektiert werden. Bemerkenswerterweise synthetisieren Sertoli Zellen in präpubertären Keimsträngen nur geringe Mengen an Cx43-Protein, was eine Rolle von Cx43-Protein bei der Initiierung der Spermatogenese annehmen lässt. In Tubuli seminiferi des adulten Hundes war Cx43-Protein

zwischen Sertoli Zellen und zwischen Sertoli Zellen und Keimzellen des „Sertoli-Sertoli cell junctional complex“ lokalisiert, was auf seine Rolle bei der Erhaltung der Spermatogenese deutet. In caninen Hodentumoren zeigte sich ein unterschiedliches Verteilungs- und Expressionsmuster. Cx43 Protein konnte nur zwischen neoplastischen Sertoli Zellen in Sertoli Zelltumoren detektiert werden. Es fehlte zwischen neoplastischen Keimzellen in Seminomen, was auf eine unterschiedliche Regulation in testikulären Tumoren schließen lässt. Wenn man die hohe Frequenz des Auftretens von Hodenkrebs in Hunden betrachtet und ihre Ähnlichkeiten oder Unterschiede im Vergleich zu humanen testikulären Neoplasien, könnten zukünftige vergleichende pathogenetische Studien canine Keimzelltumoren mit einbeziehen. Cx45 mRNA konnte mittels RT-PCR in allen untersuchten caninen testikulären Geweben detektiert werden. Erste Ergebnisse auf Proteinebene im Hoden des adulten Hundes zeigten, dass Cx45 zwischen peritubulären Zellen lokalisiert ist, woraus sich schließen lässt, dass Cx45 ein weiteres Mitglied der Cx Familie zu sein scheint, und im Hoden des Hundes exprimiert wird.

## 8 Summary

In the testis, intercellular communication is regulated through certain mechanisms between different cell populations. The direct communication via gap junction channels plays, among paracrine and endocrine communication, an important role. The gap junctional protein Cx43 is known to be expressed by Sertoli cells, spermatogonia, spermatocytes, peritubular cells and interstitial Leydig cells and represents the predominant Cx in the testis of most species. Cx43 is known to be first expressed with the onset of spermatogenesis and formation of the blood-testis-barrier in the seminiferous epithelium of guinea pig and mink and may be a useful functional pubertal differentiation marker for Sertoli cells. It is supposed to be necessary for the terminal differentiation of Sertoli cells, the controlled interaction and communication between Sertoli and germ cells, and the pubertal initiation of spermatogenesis. In neoplastic human testis, Cx43 gene expression and Cx43 protein synthesis were found to be reduced together with a Sertoli cell dedifferentiation during seminoma and Sertoli cell tumor development. The dog has been proposed as a model for studies of the male reproductive system, because of the occurrence of testicular neoplasms in relative high frequency. Cx45 expression is known to occur between cardiac myocytes and smooth muscle cells. In the testis, Cx45 mRNA could be found in rodent seminiferous epithelium. Cx43 and Cx45 can often be colocalized in the same gap junctional plaque. In the heart, they form heteromeric gap junction channels and, associated with ventricular arrhythmias, Cx45 protein is found to be up-regulated in conjunction with down-regulation of Cx43.

In the present study, the possible occurrence of Cx43-mRNA and -protein in testes of prepubertal dogs, adult dogs with normal spermatogenesis and in different forms of testicular tumors was investigated, using immunohistochemistry, western blot, RT-PCR from tissue homogenate and from microdissected tubules and in-situ hybridization. Moreover, the possible occurrence of Cx45-mRNA and -protein in testes of adult dogs was investigated, using immunohistochemistry, western blot and RT-PCR.

Cx43 mRNA was detected in all investigated canine testicular tissues. Remarkably, Sertoli cells in prepubertal cords do only synthesize small amounts of Cx43 protein, supposing a role of Cx43 protein in the initiation of spermatogenesis. In seminiferous tubules of the adult dog, Cx43 protein was localized between Sertoli cells and between Sertoli cells and germ cells of the Sertoli-Sertoli cell junctional complex, indicating its role in the maintenance of spermatogenesis. In canine testicular tumors a different distribution and expression pattern was shown. Cx43 protein was only detectable between neoplastic Sertoli cells in Sertoli cell

#### Summary

tumor. It was absent between neoplastic germ cells in seminoma, indicating that Cx43 is regulated differentially in testicular tumors. Considering the high frequency of testicular cancer in dogs and their similarities or extremes to human testicular neoplasms, future comparative pathogenetic studies may also include canine seminoma.

Cx45 mRNA was detected by RT-PCR in all investigated canine testicular tissues. Preliminary results in testis of the the adult dog reveal that, Cx45 protein was localized between peritubular cells, indicating that Cx45 seems to be another member of the connexin family to be expressed in canine testis.

## 9 Literaturverzeichnis

Abernethy DJ, Greenlee WF, Huband JC, Boreiko CJ. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) promotes the transformation of C3H/10T1/2 cells. *Carcinogenesis* 1985; 6, 651-653.

Adami H, Bergström R, Möhner M, Zatonski W, Storm H, Ekblom A, Tretli S, Teppo L, Ziegler H, Rahu M. Testicular cancer in nine northern european countries. *Int J Cancer* 1994; 59, 33-38.

Al-Attar L, Noel K, Dutertre M, Belville C, Forrest MG, Burgoyne PS, Josso N, Rey R. Hormonal and cellular regulation of Sertoli cell anti-Mullerian hormone production in the postnatal mouse. *J Clin Invest* 1997; 100, 1335-1343.

Alcoléa S, Théveniau-Ruissy M, Jarry-Guichard T, Marics I, Tzouanancou E, Chauvin JP, Briand JP, Moormann AFM, Lamers WF, Gros DB. Downregulation of connexin45 gene products during mouse heart development. *Circ Res* 1999; 84, 1365-1379.

Aumüller G, Steinbrück M, Krause W, Wagner HJ. Distribution of vimentin-type intermediate filaments in Sertoli cells of the human testis, normal and pathologic. *Anat Embryol* 1988; 178, 129-136.

Aumüller G, Schulze C, Viehbahn C. Intermediate filaments in Sertoli cells. *Microsc Res Tech* 1992; 20, 50-72.

Baldrige D, Lecanda F, Shin CS, Stains J, Civitelli R. Sequence and structure of the mouse connexin45 gene. *Biosci Rep* 2001; 21, 683-689.

Barrio LC, Capel J, Jarrillo JA, Castro C, Revilla A. Species-specific voltage-gating properties of connexin45 junctions expressed in *Xenopus* oocytes. *Biophys J* 1997; 73, 757-769.

Batias C, Defamie N, Lablack A, Thepot D, Fenichel P, Segretain D, Pointis G. Modified expression of testicular gap junction connexin 43 during normal spermatogenic cycle and in altered spermatogenesis. *Cell Tissue Res* 1999; 298, 113-121.

Batias C, Siffroi JP, Fenichel P, Pointis G, Segretain D. Connexin43 gene expression and regulation in the rodent seminiferous epithelium. *J Histochem Cytochem* 2000; 48, 793-805.

Benazzi C, Sarli G, Preziosi R, Marcato PS. Laminin expression in testicular tumours of the dog. *J Comp Pathol* 1995; 112, 141-150.

Bennett MVL, Barrio LC, Bargiello TA, Spray DC, Hertzberg E, Saez JC. Gap junctions: new tools, new answers, new questions. *Neuron* 1991; 6, 305-320.

Bergmann M. Physiology of Spermatogenesis. In: *Andrology for the Clinician*. Schill WB, Comhaire FH, Hargreave TB (Hrsg.). Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2006; 272-281.

Berthelsen JG, Skakkebaek NE, Mogensen P, Sorensen BL. Incidence of carcinoma in situ of germ cells in contralateral testis of men with testicular tumours. *Br Med J* 1979; 2, 363-364.

Berthelsen JG, Skakkebaek NE. Value of testicular biopsy in diagnosing carcinoma in situ of testis. *Scan J Urol Nephrol* 1981; 15, 165-168.

Berthoud VM, Rook MB, Traub O, Hertzberg EL, Saez JC. On the mechanisms of cell uncoupling induced by a tumor promoter phorbol ester in clone 9 cells, a rat liver epithelial cell line. *Eur J Cell Biol* 1993, 62, 384-396.

Beyer EC, Paul DL, Goodenough DA. Connexin43: A protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *J Cell Biol* 1987; 105, 2621-2629.

Beyer EC, Goodenough DA, Paul DL. The connexins, a family of related Gap Junction Proteins. In: *Gap Junctions*, Hertzberg EL, Johnson RG (Hrsg.). Alan R.Liss Inc., New York, 1988; 167-175.

Beyer EC, Paul DL, Goodenough DA. Connexin family of gap junction proteins. *J Membr Biol* 1990; 116: 187-194.

Bigliardi E, Vegni-Talluri M. Gap junctions between Sertoli cells in the infertile human testis. *Fertil Steril* 1977; 28, 755-758.

Böckers TM, Nieschlag E, Kreutz MR, Bergmann M. Localization of follicle-stimulating hormone (FSH) immunoreactivity and hormone receptor mRNA in testicular tissue of infertile men. *Cell Tissue Res* 1994; 278, 595-600.

Boenisch T. Hintergrundfärbung. In: *Handbuch III: Immunchemischer Färbemethoden*, Boenisch T (Hrsg.). DakoCytomation Corporation, Carpinteria, 2003; 46-52.

Boreiko CJ, Abernethy DJ, Sanchez JH, Dorman BH. Effect of mouse skin tumor promoters upon [3H]uridine exchange and focus formation in cultures of C3H/10T1/2 mouse fibroblasts. *Carcinogenesis* 1986; 7, 1095-1099.

Bravo-Moreno JF, Diaz-Sanchez V, Montoya-Flores JG, Lamoyi E, Saez JC, Perez-Armendariz EM. Expression of connexin43 in mouse Leydig, Sertoli, and germinal cells at different stages of postnatal development. *Anat Rec* 2001; 264, 13-24.

Brehm R, Marks A, Rey R, Kliesch S, Bergmann M, Steger K. Altered expression of connexin 26 and 43 in Sertoli cells in seminiferous tubules infiltrated with carcinoma-in-situ or seminoma. *J Pathol* 2002; 197, 647-653.

Brehm R, Rodolfo R, Kliesch S, Steger K, Marks A, Bergmann M. Mitotic activity of Sertoli cells in adult human testis: an immunohistochemical study to characterize Sertoli cells in testicular cords from patients showing testicular dysgenesis syndrome. *Anat Embryol* 2006a; 211, 223-236.

Brehm R, Rüttinger C, Fischer P, Gashaw I, Winterhager E, Kliesch S, Bohle RM, Steger K, Bergmann M. Transition from preinvasive carcinoma in situ to seminoma is accompanied by a reduction of connexin 43 expression in Sertoli cell and germ cells. *Neoplasia* 2006b; 8, 499-509.

Brehm R, Zeiler M, Rüttinger C, Herde K, Kibschull M, Winterhager E, Willecke K, Guillou F, Lécureuil C, Steger K, Konrad L, Biermann K, Failing K, Bergmann M. A Sertoli cell-specific knockout of connexin43 prevents initiation of spermatogenesis. *Am J Pathol* 2007; 171, 19-31.

Bruning G, Dierichs R, Stümpel C, Bergmann M. Sertoli cell nuclear changes in human testicular biopsies as revealed by three dimensional reconstruction. *Andrologia* 1993; 25, 311-316.

Bruzzone R, White TW, Paul DL. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem* 1996a; 238, 1-27.

Bruzzone R, White TW, Goodenough DA. The cellular internet: on-line with connexins. *BioEssays* 1996b; 18, 709-718.

Budunova IV. Alteration of gap junctional intercellular communication during carcinogenesis. *Cancer J* 1994; 7, 228-237.

Budunova IV, Williams GM. Cell culture assays for chemicals with tumor-promoting or tumor-inhibiting activity based on the modulation of intercellular communication. *Cell Biol Toxicol* 1994; 10, 71-116.

Burghardt RC, Matheson RL, Gaddy D. Gap junction modulation in rat uterus. I. Effects of estrogens on myometrial and serosal cells. *Biol Reprod* 1984; 30, 239-248.

Butterweck A, Gergs U, Elfgang C, Willecke K, Traub O. Immunochemical characterization of the gap junction protein connexin45 in mouse kidney and transfected human HeLa cells. *J Membrane Biol* 1994a; 141, 247-256.

Butterweck A, Elfgang C, Willecke K, Traub O. Differential expression of the gap junction proteins connexin45, -43, -40, -31 and -26 in mouse skin. *Eur J Cell Biol* 1994b; 65, 152-163.

Byers S, Pelletier RM, Suarez-Quian C. Sertoli cell junctions and the seminiferous epithelium barrier. In: *The Sertoli cell*, Griswold MD, Russell LD (Hrsg.). Cache River Press: Clearwater, FL, 1993; 431-446.

Calero G, Kanemitsu M, Taffet SM, Lau AF, Delmar M. A 17mer peptide interferes with acidification-induced uncoupling of connexin43. *Circ Res* 1998; 82, 929-935.

Camatini M, Franchi E, de Curtis I, Anelli G, Masera G. Chemotherapy does not affect the development of inter-Sertoli junctions in childhood leukaemia. *Anat Rec* 1982a; 203, 353-363.

Camatini M, de Curtis I, Franchi E. Dynamic aspect of inter-Sertoli junctions in monkeys. *J Ultrastruct Res* 1982b; 79, 314-326.

Caspar DLD, Sosinsky GE, Tibbitts TT, Phillips WC, Goodenough DA. Gap Junction structure. In: *Gap Junctions*, Hertzberg EL, Johnson RG (Hrsg.). Alan R.Liss Inc., New York, 1988; 117-133.

Caveney S. The role of gap junctions in development. *Ann Rev Physiol* 1985; 47, 319-335.

Chakraborty J. Conditions adversely affecting Sertoli cells. In: *The Sertoli cell*, Russell LD, Griswold MD (Hrsg.). Cache River Press, Clearwater, FL, 1993; 578-595.

Chang C, Kokontis J, Liao S. Structural analysis of complementary DNA and amino acid sequences of the human and rat androgen receptors. *Proc natl Acad Sci USA* 1988; 85, 7211-7215.

Chang Q, Gonzalez M, Pinter MJ, Balice-Gordon RJ. Gap junctional coupling and patterns of connexin expression among neonatal at lumbar spinal motor neurons. *J Neurosci* 1999; 19, 10813-10828.

Chemes HE, Nistal M, Regadera J, Gonzales Peramoto P, Rey R, Serrano A, Musse MP. Physiologic androgen insensitivity of the feto/neonatal/early infantile human testis possibly prevents precocious spermatogenic development. *Int J Androl* 2005; 28, 40.

Chung SS, Lee WM, Cheng CY. Study on the formation of specialized inter-Sertoli cell junctions in vitro. *J Cell Physiol* 1999; 181, 258-272.

Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *A J Anat* 1963; 112, 35-51.

Clermont Y. Introduction to the Sertoli cell. In *The Sertoli cell*, Griswold MD, Russell LD (Hrsg.). Cache River Press: Clearwater, FL, 1993; XXI-XXV.

Collins DH, Symington T. Sertoli cell tumour. *J Urol* 1964; 36, 52-61.

Collins LL, Lee HJ, Chen YT, Chang M, Hsu HY, Yeh S Chang C. The androgen receptor in spermatogenesis. *Cytogenet Genome Res* 2003; 103, 299-301.

Connell CJ. A freeze-fracture and lanthanum tracer study of the development of the junctions between Sertoli cells of the prepubertal dog. *J Cell Biol*, 1976; 70, 80a (Abstract).

Connell CJ. A freeze-fracture and lanthanum tracer study of the complex junction between Sertoli cells of the canine testis. *J Cell Biol* 1978; 76, 57-75.

Connell CJ. Blood-testis barrier formation and the initiation of meiosis in the dog. In: *Testicular development, structure and function*. Steinberger A, Steinberger E (Hrsg.). Raven Press New York, 1980; 71-78.

Coppen SR, Dupont E, Rothery S, Severs NJ. Connexin45 expression is preferentially associated with the ventricular conduction system in mouse and rat heart. *Circ Res* 1998; 82, 232-243.

Coppen SR, Severs NJ, Gourdie RG. Connexin45 (alpha 6) expression delineates an extended conduction system in the embryonic and mature rodent heart. *Dev Genet* 1999; 24, 82-90.

Corsaro CM, Migeon BR. Comparison of contact-mediated communication in normal and transformed human cells in culture. *Proc Natl Acad Sci US* 1977; 74, 4476-4480.

Cotchin E. Testicular neoplasms in dogs. *J Comp Pathol* 1960; 70, 232-248.

Cruciani V, Mikalsen SO. The connexin gene family in mammals. *Biol Chem* 2005; 386, 325-332.

Dahl G and Berger W. Nexus formation in the myometrium during parturition and induced by oestrogen. *Cell Biol Intern Rep* 1978; 2, 381-387.

Damjanov I. Pathobiology of human germ cell neoplasia. *Recent Results in Cancer Research* 1991; 123, 1-19.

Davidoff MS, Breucker H, Holstein AF, Seidl K. Cellular architecture of the lamina propria of human seminiferous tubules. *Cell Tissue Res* 1990; 262, 253-261.

Decrouy X, Gasc JM, Pointis G, Segretain D. Functional characterization of Cx43 based gap junctions during spermatogenesis. *J Cell Physiol* 2004; 200: 146-154.

Defamie N, Mograbi B, Roger C, Cronier L, Malassine A, Brucker-Davis F, Fenichel P, Segretain D, Pointis G. Disruption of gap junctional intercellular communication by lindane is associated with aberrant localization of connexin43 and zonula occludens-1 in 42GPA9 Sertoli Cells. *Carcinogenesis* 2001; 22, 1537-1542.

Defamie N, Berthaut I, Mograbi B, Chevallier D, Dadoune JP, Fenichel P, Segretain D, Pointis G. Impaired gap junction connexin43 in Sertoli cells of patients with secretory azoospermia: a marker of undifferentiated Sertoli cells. *Lab Invest* 2003; 83, 449-456.

Dhein S. Gap-Junction-Kanäle und zelluläre Kommunikation. *Dtsch Med Wochenschr* 1998; 123, 912-917.

Di WL, Rugg EL, Leigh IM, Kelsell DP. Multiple epidermal connexins are expressed in different keratinocyte subpopulations including connexin 31. *J Invest Dermatol* 2001; 117, 958-964.

Dieckmann KP, Loy V, Büttner P. Prevalence of bilateral testicular germ cell tumors and early detection based on contralateral testicular intra-epithelial neoplasia. *Br J Urol* 1993; 71, 340-345.

Dym M, Fawcett DW. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 1970; 3, 308-326.

Eghbali B, Kessler JA, Reid LM, Roy C, Spray DC. Involvement of gap junctions in tumorigenesis: transfection of tumor cells with connexin32 cDNA retards growth in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88, 10701-10705.

Ek JF, Delmar M, Perzova R, Taffet SM. Role of histidine 95 on pH gating of the cardiac gap junction protein connexin43. *Circ Res* 1994; 74, 1058-1064.

Ek-Vitorin JF, Calero G, Morley GE, Coombs W, Taffet SM, Delmar M. Ph regulation of connexin43: molecular analysis of the gating particle. *Biophys J* 1996; **77**, 1273-1284.

Enders GC, Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell communications. In: *The Sertoli cell*, Russell LD, Griswold MD (Hrsg.). Cache River Press, Clearwater, 1993; 448-460.

Evans WH. Assembly of gap junction intercellular communication channels. *Biochem Soc Trans* 1994; 22, 788-792.

Evans WH, Martin PEM. Gap-junctions: structure and function. *Mol Membr Biol* 2002; 19, 121-136.

Fiorini C, Mograbi B, Cronier L, Bourget I, Decrouy X, Nebout M, Ferrua B, Malassine A, Samson M, Fénichel P, Segretain D, Pointis G. Dominant negative effect of connexin33 on gap junctional communication is mediated by connexin43 sequestration. *J Cell Sci* 2004; 117, 4665-4672.

Fischer P, Brehm R, Konrad L, Hartmann S, Kliesch S, Bohle RM, Bergmann M. Connexin33: a rodent specific member of the gap junction protein family? *J Androl* 2005; 26, 75-84.

Franke WW, Grund C, Schmidt E. Intermediate-sized filaments present in Sertoli cells are of the vimentin type. *Eur J Cell Biol* 1979; 19, 269-275.

Franke WW, Schmid E, Schiller DL, Winter S, Jarasch ED, Moll R, Denk H, Jackson BW, Illmensee K. Differentiation-related patterns of expression of proteins of intermediate-size filaments in tissues and cultured cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1982; 46, 431-453.

Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Lochner D, Birchmeier W. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 1991; 113, 173-185.

Furuya S, Kumamoto Y, Sugiyama S. Fine structure and development of Sertoli junctions in human testis. *Arch Androl* 1978; 1, 211-219.

Gilula NB, Fawcett DW, Aoki A. The Sertoli cell occluding junctions and gap junctions in mature and developing mammalian testes. *Dev Biol* 1976; 50, 142-168.

Giwercman A, Grindsted J, Hansen B, Jensen OM, Skakkebaek NE. Testicular cancer risk in boys with maldescended testis: a cohort study. *J Urol* 1987; 138, 1214-1216.

Gondos B, Berndston WE. Postnatal and pubertal development. In: *The Sertoli cell*, Griswold MD, Russell LD (Hrsg.). Cache River Press: Clearwater, FL, 1993; 115-154.

Gotoh H, Harada K, Suzuki K, Hashimoto S, Yamamura H, Sato T, Fukumoto K, Hagiwara H, Ishida T, Yamada K, Asano R, Yano T. Expression patterns of connexin 26 and connexin 43 mRNA in canine benign and malignant mammary tumours. *Vet J* 2006, 172, 178-80.

Griswold MD. Action of FSH on mammalian Sertoli cells. In: *The Sertoli cell*, Griswold MD, Russell LD (Hrsg.). Cache River Press: Clearwater, FL, 1993; 493-508.

Griswold MD. Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biol Reprod* 1995; 52, 211-216.

Griswold MD. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 1998; 9, 411-416.

Griswold MD, McLean D. Control of spermatogenesis via Sertoli cells. In: *Testicular Tangrams*, Rommerts FFG, Teerds KJ. (Hrsg.). Springer Verlag: Berlin, 2002; 75-84.

Griswold MD, McLean D. The Sertoli cell. In: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, Knobil E, Neill JD et al., (Hrsg.). Elsevier Academic Press, London, 2006; 949-975.

Grootenhuis AJ, van Sluijs FJ, Klaij IA, Steenbergen J, Timmermann MA, Bevers MM, Dieleman SJ, de Jong FH. Inhibin, gonadotropins and sexsteroids in dogs with Sertoli cell tumours. *J Endocrinol* 1990; 127, 235-242.

Gros DB, Jongasma HJ. Connexins in mammalian heart function. *Bioessays* 1996; 18, 719-730.

Grümmer R, Traub O, Winterhager E. Gap junction connexin genes cx26 and cx43 are differentially regulated by ovarian steroid hormones in rat endometrium. *Endocrinology* 1999; 140, 2509-2516.

Hadziselimovic F. Cryptorchidism. Ultrastructure of normal and cryptorchid testis development. In: *Advances in anatomy, embryology and cell biology*. Brodal A, Hild W, Ortmann R, Schiebler TH, Töndry G, Wolff E (Hrsg.), Springer Heidelberg 1977.

Hamel E, Katoh F, Mueller G, Birchmeier W, Yamasaki H. Transforming growth factor beta as a potent promoter in two-stage BALB/c 3T3 cell transformation. *Cancer Res* 1988; 48, 2832-2836.

Hayes HM, Pendergrass TW. Canine testicular tumors. Epidemiologic features of 410 dogs. *Int J Cancer* 1976; 18, 482-487.

Hejmej A, Kotula-Balak M, Sadowska J, Bilinska B. Expression of connexin 43 protein in testes, epididymides and prostates of stallions. *Equine Vet J* 2007; 39,122-127.

Hennemann H, Schwarz HJ, Willecke K. Characterization of gap junction genes expressed in F9 embryonic carcinoma cells: molecular cloning of mouse connexin31 and -45 cDNAs. *Eur J Cell Biol* 1992; 57, 51-58.

Hertlein B, Butterweck A, Haubrich S, Willecke K, Traub O. Phosphorylated carboxy terminal serine residues stabilize the mouse gap junction protein connexin45 against degradation. *J Membrane Biol* 1998; 162, 247-257.

Holder JW, Elmore E, Barrett JC. Gap junction function and cancer. *Cancer Res* 1993; 53, 3475-3485.

Hossain MZ, Jagdale AB, Ao P, LeCiel C, Huang RP, Boynton AL. Impaired expression and posttranslational processing of connexin43 and downregulation of gap junctional communication in neoplastic human prostate cells. *Prostate* 1999; 38, 55-59.

Jamakosmanovic A, Loewenstein WR. Intercellular communication and tissue growth. *J Cell Biol* 1968; 38, 556-561.

Jamieson S, Going JJ, D'Arcy R, George WD. Expression of gap junction proteins connexin 26 and connexin 43 in normal human breast and in breast tumours. *J Pathol* 1998; 184, 37-43.

Jegou B. The Sertoli-germ cell communication network in mammals. *Int Rev Cytol* 1993; 147, 25-96.

Johnson CM, Kanter EM, Green KG, Laing JG, Betsuyaku T, Beyer EC, Steinberg TH, Saffitz JE, Yamada KA. Redistribution of connexin45 in gap junctions of connexin43-deficient hearts. *Cardiovas Res* 2002; 53, 921-935.

Jordan K, Chodock R, Hand AR, Laird DW. The origin of annular gap junctions: a mechanism of gap junction internalisation. *J Cell Sci* 2001; 114, 763-773.

Juneja SC, Barr KJ, Enders GC, Kidder GM. Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin43. *Biol Reprod* 1999; 60, 1263-1270.

Juneja SC. mRNA expression pattern of multiple members of connexin gene family in normal and abnormal fetal gonads in mouse. *Indian J Physiol Pharmacol* 2003; 47, 147-156.

Kadle R, Zhang JT, Nicholson BJ. Tissue-specific distribution of differentially phosphorylated forms of cx43. *Mol Cell Biol* 1991; 11, 363-369.

Kahiri CN, Khalil MW, Tekpetey F, Kidder GM. Leydig cell function in mice lacking connexin43. *Reproduction* 2006; 132, 607-616.

Kalma Y, Granot I, Galiani D, Barash A, Dekel N. Luteinizing hormone-induced connexin 43 down-regulation: Inhibition of translation. *Endocrinol* 2004; 145, 1617-1624.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Brain and behaviour. In: *Principles of neural science*, Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (Hrsg.). Elsevier Science Publishing Co., New York, 1995; 5-17.

Kanno Y, Sasaki Y, Shiba Y, Yoshida-Noro C, Takeichi M. Monoclonal antibody ECCD-1 inhibits intercellular communication in teratocarcinoma PCC3 cells. *Exp Cell Res* 1984; 152, 270-273.

Kanter HL, Saffitz JE, Beyer EC. Cardiac myocytes express multiple gap junction proteins. *Circ Res* 1992; 70, 438-444.

Kanter HL, Laing JG, Beyer EC, Grenn KG, Saffitz JE. Multiple connexins colocalize in canine ventricular myocyte gap junctions. *Circ Res* 1993; 73, 344-350.

Kennedy PC, Cullen JM, Edwards JF, Goldschmidt MH, Larsen S, Munson L, Nielsen S. Tumors of the testis. In: *Histological classification of tumors of the genital system of domestic animals*, Schulman FY (Hrsg.). WHO, Washington, 1998; 4, 15-19.

Kerr JB, Loveland KL, O'Bryan MK, deKretser DM. Cytology of the testis and intrinsic control mechanisms. In: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, Knobil E, Neill JD et al., (Hrsg.). Elsevier Academic Press, London, 2006; 827-947.

Klaunig JE, Ruch RJ. Role of inhibition of intercellular communication in carcinogenesis. *Lab Invest* 1990; 62, 135-146.

Kluin PM, Kramer MF, de Rooij DG. Proliferation of spermatogonia and Sertoli cells in maturing mice. *Anat Embryol* 1984; 169, 73-78.

Köhler K, Reinacher M. Epidemiologie von Tumoren und tumorähnlichen Veränderungen des Endokriniums und der Gonaden bei obduzierten Hunden. *Tierärztl Prax* 2000; 28, 305-310.

Kratzer SS, Ulbright TM, Talerman A, Srigley JR, Roth LM, Wahle GR, Moussa M, Stephens JK, Millos A, Young RH. Large cell calcifying Sertoli cell tumor of the testis. Contrasting features of six malignant and six benign tumors and a review of the literature. *Am J Surg Pathol*. 1997; 21, 1271-80.

Krause W. Störungen der Spermatogenese. In: *Andrologie: Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane*, Krause W, Weidner W (Hrsg.). Enke Verlag Stuttgart, 1998; 137-152.

Kren BT, Kumar NM, Wang SQ, Gilula NB, Steer CJ. Differential regulation of multiple gap junction transcripts and proteins during rat liver regeneration. *J Cell Biol* 1993; 123, 707-718.

Krüger O, Plum A, Kim JS, Winterhager E, Maxeiner S, Hallas G, Kirchhoff S, Traub O, Lamers WS, Willecke K. Defective vascular development in connexin 45-deficient mice. *Development* 2000; 127, 4179-4193.

Krutovskikh V, Oyamada M, Yamasaki H. Sequential changes of gap junctional intercellular communication during multistage rat liver carcinogenesis: direct measurement of communication in vivo. *Carcinogenesis* 1991; 12, 1701-1706.

Krutovskikh V, Yamasaki H. The role of gap junctional intercellular communication (GJIC) disorders in experimental and human carcinogenesis. *Histol Histopathol* 1997; 12, 761-768.

Krutovskikh V, Troyanovsky SM, Piccoli C, Tsuda H, Asamoto M, Yamasaki H. Differential effect of subcellular localization of communication impairing gap junction protein connexin43 on tumor cell growth in vivo. *Oncogene* 2000; 19, 505-513.

Kumai M, Nishii K, Nakamura K, Takeda N, Suzuki M, Shibata Y. Loss of connexin45 causes a cushion defect in early cardiogenesis. *Development* 2000; 127, 3501-3512.

Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel. *Cell*, 1996; 84, 381-388.

Kunzelmann P, Bluemcke I, Traub O, Dermietzel R, Willecke K. Coexpression of connexin45 and -32 in oligodendrocytes of rat brain. *J Neurocytol* 1997; 26, 17-22.

Kwong KF, Schuessler RB, Green KG, Laing JG, Beyer EC, Boineau JP, Saffitz JE. Differential expression of gap junction proteins in the canine sinus node. *Circ Res* 1998; 82, 604-612.

Lablack A, Bourdon V, Defamie N, Batias C, Mesnil M, Fenichel P, Pointis G, Segretain D. Ultrastructural and biochemical evidence for gap junction and connexin43 expression in a clonal Sertoli cell line: a potential model in the study of junctional complex formation. *Cell Tissue Res* 1998; 294, 279-287.

Laing JG, Beyer EC. The gap junction protein connexin43 is degraded via the ubiquitin proteasome pathway. *J Biol Chem* 1995; 270, 26399-26403.

Laird DW, Castillo M, Kasprzak L. Gap Junction turnover, intracellular trafficking, and phosphorylation of connexin43 in Brefeldin A-treated rat mammary tumor cells. *J Cell Biol* 1995; 131, 1193-1203.

Laird DW. The life cycle of a connexin: gap junction formation, removal, and degradation. *J Biophys Biomembr* 1996; 28, 311-318.

Laird DW, Fistouris P, Batist G, Alpert L, Huynh HT, Carystinos GD, Alaoui-Jamali MA. Deficiency of connexin43 gap junctions is an independent marker for breast tumors. *Cancer Res* 1999; 59, 4104-4110.

Laird DW. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J* 2006; 394, 527-543.

Larsen WJ, Tung HN, Murray SA, Swenson CA. Evidence for the participation of actin microfilaments and bristle coats in the internalization of gap junction membrane. *J Cell Biol* 1979; 83, 576-587.

Lecanda F, Towler DA, Ziambaras K, Cheng S-L, Koval M, Steinberg TH, Civitelli R. gap junctional communication modulates gene expression in osteoblastic cells. *Mol Biol Cell* 1998; 9, 2249-2258.

Lee JH, Engel W, Nayernia K. Stem cell protein piwil2 modulates expression of murine spermatogonial stem cell expressed genes. *Mol Reprod Dev* 2006; 73, 173-179.

Lee SW, Tomasetto C, Sager R. Positive selection of candidate tumor suppressor genes by subtractive hybridisation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88, 2825-2829.

Lee SW, Tomasetto C, Paul D, Keyomarsi K, Sager R. Transcriptional downregulation of gap junction proteins blocks junctional communication in human mammary tumor cell lines. *J Cell Biol* 1992; 118, 1213-1221.

Loewenstein WR. Permeability of membrane junctions. *Ann NY Acad Sci* 1966; 137, 441-472.

Loewenstein WR. Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochem Biophys Acta* 1979; 560, 1-65.

Loewenstein WR. Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. *Physiol Rev* 1981; 61, 829-913.

Loewenstein WR, The cell-to-cell channel of gap junctions. *Cell* 1987; 48, 725-726.

Loewenstein WR. Cell-cell communication and the control of growth. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142, 48-53.

Loewenstein WR, Kanno Y. Intercellular communication and the control of tissue growth; lack of communication between cancer cells. *Nature* 1966; 209, 1248-1249.

Looijenga LH, Olie RA, van der Gaag I, van Sluijs FJ, Matoska J, Ploem-Zaaijer J, Kneplé C, Oosterhuis JW. Seminomas of the canine testis. Counterpart of spermatocytic seminoma of men? *Lab Invest* 1994; 74, 490-496.

Loy V, Dieckmann KP. Carcinoma in situ of the testis: intratubular germ cell neoplasia or testicular intraepithelial neoplasia. *Hum Pathol* 1990; 21, 457-458.

Lu B, Smock SL, Castleberry TA, Owen TA. Molecular cloning and functional characterization of the canine androgen receptor. *Mol Cell Biochem* 2001; 226, 129-140.

Makowski L, Caspar D, Phillips WC, Goodenough DA. Gap junction structures. II. Analysis of X-ray diffraction data. *J Cell Biol* 1977; 74, 629-645.

Manjunath CK, Goings GE, Page E. Cytoplasmic surface and intermembrane components of rat heart gap junctional proteins. *Am J Physiol* 1984; 246, 865-875.

Martinez AD, Hayrapetyan V, Moreno AP, Beyer BC. Connexin43 and connexin45 form heteromeric gap junction channels in which individual components determine permeability and regulation. *Circ Res* 2002; 90, 1100-1107.

McCluggage WG, Shanks JH, Whiteside C, Maxwell P, Banerjee SS, Biggart JD. Immunohistochemical study of testicular sex cord-stromal tumors, including staining with anti-inhibin antibody. *Am J Surg Pathol* 1998; 22, 615-619.

McGinley DM, Posalaky Z, Porvaznik M, Russell LD. Gap junctions between Sertoli and germ cells of rat seminiferous tubules. *Tissue Cell* 1979; 11, 741-754.

McKinnell C, Saunders PT, Fraser HM, Kelnar CJ, Kivlin C, Morris KD, Sharpe RM. Comparison of androgen receptor and oestrogen receptor beta immunoexpression in the testes of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) from birth to adulthood: low androgen receptor immunoexpression in Sertoli cells during the neonatal increase in testosterone concentrations. *Reproduction* 2001; 122, 419-429.

Mehta PP, Bertram JS, Loewenstein WR. The actions of retinoids on cellular growth correlate with their actions on gap junctional communication. *J Cell Biol* 1989; 108, 1053-1065.

Mehta PP, Hotz-Wagenblatt A, Rose B, Shalloway D, Loewenstein WR. Incorporation of the gene for a cell-cell channel protein into transformed cells leads to normalization of growth. *J Membr Biol* 1991; 124, 207-225.

Mehta PP, Yamamoto M, Rose B. Transcription of the gene for the gap junctional protein Cx43 and expression of functional cell-to-cell channels are regulated by cAMP. *Mol Biol Cell* 1992; 3, 839-850.

Mesnil M, Krutovskikh V, Omori Y, Yamasaki H. Role of blocked gap junctional intercellular communication in non-genotoxic carcinogenesis. *Toxicol Lett* 1995; 82-83, 701-706.

Meurer DG, Hoppen HO, Ueberschär S, Hewicker-Trautwein, Mischke R. Konzentration von Östradiol-17 $\beta$  und Testosteron im Blut von Hunden mit testikulären Neoplasien. *Tierärztl Prax* 2000; 28, 315-319.

Misdorp W. Ätiologie und Pathologie von Krebserkrankungen. In: *Kleintieronkologie: Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hunden und Katzen*, Keßler M (Hrsg.). Parey Buchverlag, Berlin, 2000; 3-19.

Mok BW, Yeung WSB, Luk JM. Differential expression of gap-junction gene connexin 31 in seminiferous epithelium of rat testes. *FEBS Lett* 1999; 453, 243-248.

Moller H. Trends in sex-ratio, testicular cancer and male reproductive hazards: are they connected? *APMIS* 1998; 106, 232-238.

Mostofi FK, Price EB. Tumors of the male genital system. In: *Atlas of tumor pathology*. Armed forces Institute of Pathology, Washington DC, 1973; 86-99.

Mostofi FK, Sobin LH. Histological typing of testis tumours. In: *International histological classification of tumours*, No.16. World Health Organization, Genf, 1977; 1-39.

Müller J, Skakkebaek NE, Ritzen M, Ploen L, Petersen KE. Carcinoma in situ of the testis in children with 45, X/46,XY gonadal dysgenesis. *J Pediatr* 1985; 106, 431-436.

Murray AW, Fitzgerald DJ. Tumor promoters inhibit metabolic cooperation in cocultures of epidermal and 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1979; 91, 395-401.

Musil LS, Cunningham BA, Edelman GM, Goodenough DA. Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines. *J Cell Biol* 1990; 111, 2077-2088.

Musil LS, Goodenough DA. Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation and assembly into gap junctional plaques. *J Cell Biol* 1991; 115, 1357-1374.

Musil LS, Goodenough DA. Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell* 1993; 74, 1065-1077.

Nagano T, Suzuki F. The postnatal development of the junctional complexes of the mouse Sertoli cells as revealed by freeze fracture. *Anat Rec* 1976a; 185, 403-417.

Nagano T, Suzuki F. Freeze-fracture observations on the intercellular junctions of Sertoli cells and of Leydig cells in the human testis. *Cell Tissue Res* 1976b; 166, 37-48.

Nakamura K, Kuraoka A, Kawabuchi M, Shibata Y. Specific localization of gap junction protein, connexin45, in the deep muscular plexus of dog and rat small intestine. *Cell Tissue Res* 1998; 292, 487-494.

Neuhaus IM, Bone W, Wang SP, Ionasescu V, Werner R. The human connexin 32 gene is transcribed from two tissue specific promoters. *Biosci Rep* 1996; 16, 239-248.

Neveu M, Hully JR, Babcock KL, Hertzberg EL, Nicholson BJ, Paul DL, Pitot HC. Multiple mechanisms are responsible for altered expression of gap junction genes during oncogenesis in rat liver. *J Cell Sci* 1994; 107, 83-95.

Nicholson PW, Harland SJ. Inheritance and testicular cancer. *Br J Cancer* 1995; 71, 421-426.

Nielsen K, Jacobsen GK. Malignant Sertoli cell tumour of the testis. An immunohistochemical study and a review of the literature. *APMIS* 1988; 96, 755-60.

Nielsen K, Jacobsen GK. Malignant Sertoli cell tumour of the testis. An immunohistochemical study and a review of the literature. *APMIS* 1988; 96, 755-60.

Nielsen SW, Lein DH. Tumours of the testis. *Bull World Health Organ* 1974; 50, 71-78.

Nielsen SW, Kennedy PC. Tumors of the genital systems. In: *Tumors in domestic animals*, Moulton JE (Hrsg.). University of California Press, Berkeley, 1990; 479-517.

Nieschlag E. Nosologie andrologischer Krankheitsbilder. In: *Andrologie: Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. Nieschlag E, Behre HM (Hrsg.). Springer Verlag Berlin 2000; 91-95.

Nieto JM, Pizarro M, Balaguer LM, Romano J. Canine testicular tumors in descended and cryptorchid testes. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 1989; 96, 186-189.

Nistal M, Paniagua R. The postnatal development of the human Sertoli cells. *Z Mikrosk Anat Forsch* 1983; 97, 739-752.

O'Keefe D. Tumors of the genital system and mammary glands. In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, Ettinger SJ, Feldmann EC (Hrsg.). WB Saunders Co, Philadelphia, 1995; 1699-1704.

Okuma A, Kuraoka A, Iida H, Inai T, Wasano K, Shibata Y. Colocalization of connexin43 and connexin45 but absence of connexin40 in granulosa cell gap junction of rat ovary. *J Reprod Fertil* 1996; 107, 255-264.

Omori Y, Krutovskikh V, Mironov N, Tsuda H, Yamasaki H. Cx32 gene mutation in a chemically induced rat liver tumour. *Carcinogenesis* 1996a; 17, 2077-2080.

Omori Y, Mesnil M, Yamasaki H. Connexin mutations from X-linked charcot-marie-tooth disease patients: functional defects and dominant negative effects. *Mol Biol Cell* 1996b; 7, 907-916.

Omori Y, Duflot-Dancer A, Mesnil M, Yamasaki H. Role of connexin (gap junction) genes in cell growth control: approach with site-directed mutagenesis and dominant-negative effects. *Toxicol Lett* 1998; 96, 105-110.

Orth JM. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anat Rec* 1982; 203, 485-292.

Osborn M, Weber K. Tumor diagnosis by intermediate filament typing: a novel tool for surgical pathology. *Lab Invest* 1983; 48, 372-394.

Oyamada Y, Oyamada M, Fusco A, Yamasaki H. Aberrant expression, function and localization of connexins in human esophageal carcinoma cell lines with different degrees of tumorigenicity. *J Cancer Res Clin Oncol* 1994; 120, 445-453.

Patnaik AK, Mostofi FK. A clinicopathologic, histologic, and immunohistochemical study of mixed germ cell-stromal tumors of the testis in 16 dogs. *Vet Pathol* 1993; 30, 287-295.

Pelletier RM, Friend DS. The Sertoli cell junctional complex: structure and permeability to filipin in the neonatal and adult guinea pig. *Am J Anat* 1983; 168, 213-228.

Pelletier RM. Cyclic modulation of Sertoli cell junctional complexes in a seasonal breeder: the mink (*Mustela vison*). *Am J Anat* 1988; 183, 68-102.

Pelletier RM, Byers SW. The blood-testis barrier and Sertoli cell junctions: structural considerations. *Microsc Res Tech* 1992; 20, 3-33.

Pelletier RM. The distribution of connexin 43 is associated with the germ cell differentiation and with the modulation of the Sertoli cell junctional barrier in continual (guinea pig) and seasonal breeders (mink) testes. *J Androl* 1995; 16, 400-409.

Pelliniemi LJ, Fröjdman K, Paranko J. Embryological and prenatal development and function of Sertoli cells. In: *The Sertoli cell*, Griswold MD, Russell LD (Hrsg.). Cache River Press: Clearwater, FL, 1993; 88-113.

Perez-Armendariz EM, Romano MC, Luna J, Miranda C, Bennett MVL, Moreno P. Characterization of gap junctions between pairs of Leydig cells from mouse testis. *Am J Physiol* 1994; 267, 570-580.

Perez-Armendariz EM, Lamoyi E, Mason JI, Cisneros-Armas D, Luu-The V, Bravo-Moreno JF. Developmental regulation of connexin43 expression in fetal mouse testicular cells. *Anat Rec* 2001; 264, 237-246.

Peters MAJ, van Sluijs FJ. Testicular tumors in dogs: a literature review. *Tijdschrift diergeneeskunde* 1996; 121, 36-38.

Peters MAJ, de Rooij DG, Teerds KJ, van der Gaag I, van Sluijs FJ. Spermatogenesis and testicular tumours in the ageing dog. *J Reprod Fertil* 2000; 120, 443-452.

Peters MAJ, Teerds KJ, Vandergaag I, De Rooij DG, van Sluijs FJ. Use of antibodies against LH Receptor, 3 $\beta$ -hydroxy steroid dehydrogenase and vimentin to characterize different types of testicular tumour in dogs. *Reproduction* 2001; 121, 287-296.

Peters MAJ, Mol JA, van Wolferen ME, Oosterlaken-Dijksterhuis MA, Teerds KJ, van Sluijs FJ. Expression of the insulin-like growth factor (IGF) system and steroidogenic enzymes in canine testis tumors. *Reprod Biol Endokrinol* 2003; 14, 1:22.

Plum A, Hallas G, Magin T, Dombrowski F, Hagendorff A, Schumacher B, Wolpert C, Kim JS, Lamers WH, Evert M, Meda P, Traub O, Willecke K. Unique and shared functions of different connexins in mice. *Curr Biol* 2000; 10, 1083-1091.

Prange H, Kosmehl H, Katenkamp D. Die Pathologie der Hodentumoren des Hundes. *Arch. Exp Veterinaarmed* 1987; 41, 366-388.

Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE. Immunohistochemical identification of androgen receptors in germ cell neoplasia. *J Endocrinol* 1992; 135, 1-4.

Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, Graem N, Müller J, Cate RL, Skakkebaek NE. Expression of anti-Müllerian hormone during normal and pathological gonadal development: Association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metabol* 1999; 84, 3836-3844.

Reaume AG, DeSousa PA, Kulkarni S, Langille BL, Zhu D, Davies TC, Juneja SC, Kidder GM, Rossant J. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 1995; 267, 1831-1834.

Regadera J, Martinez-Garcia F, Gonzalez-Peramato P, Serrano A, Nistal M, Suarez-Quian C. Androgen receptor expression in Sertoli cells as a function of seminiferous tubule maturation in the human cryptorchid testis. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 88, 413-421.

Reifinger M. Statistical studies of the occurrence of testicular neoplasms in domestic mammals. *Zentralbl Veterinaermed A* 1988; 35, 63-72.

Reinacher M. Neues zu Onkogenese und Metastasierung. *Tierärztl Prax* 2002; 30, 403-15.

Ren P, de Feijter AW, Paul DL, Ruch RJ. Enhancement of liver cell gap junction protein expression by glucocorticoids. *Carcinogenesis* 1994; 15, 1807-1813.

Risley MS, Tan IP, Roy C, Saez JC. Cell-, age- and stage-dependent distribution of connexin43 gap junctions in testes. *J Cell Sci* 1992; 103, 81-96.

Risley MS. Connexin gene expression in seminiferous tubules of the Sprague-Dawley rat. *Biol Reprod* 2000; 62, 748-754.

Risley MS, Tan IP, Farrell J. Gap junctions with varied permeability properties establish cell-type specific communication pathways in the rat seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 2002; 67, 945-952.

Rogatsch H, Jezek D, Hittmair A, Mikuz G, Feichtinger H. Expression of vimentin, cytokeratin, and desmin in Sertoli cells of human fetal, cryptorchid, and tumor-adjacent testicular tissue. *Virchows Arch* 1996; 427, 497-502.

Roger C, Mograbi B, Chevallier D, Michiels JF, Tanaka H, Segretain D, Pointis G, Fenichel P. Disrupted traffic of connexin 43 in human testicular seminoma cells: overexpression of Cx43 induces membrane location and cell proliferation decrease. *J Pathol* 2004; 202, 241-246.

Roosen-Runge EC. Motions of the seminiferous tubules of rat and dog. *Anat Rec* 1951; 109, 413.

Roscoe WA, Barr KJ, Mhawi AA, Pomerantz DK, Kidder GM. Failure of spermatogenesis in mice lacking connexin43. *Biol Reprod* 2001; 65, 829-838.

Rose B, Mehta PP, Loewenstein WR. Gap junction protein gene suppresses tumorigenicity, *Carcinogenesis* 1993; 14, 1073-1075.

Ruch RJ. The role of gap junctional intercellular communication in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci* 1994; 24, 216-231.

Ruch RJ, Cesen-Cummings K, Malkinson AM. Role of gap junctions in lung neoplasia. *Exp Lung Res* 1998; 24, 523-539.

Ruch RJ, Porter S, Koffler LD, Dwyer-Nield LD, Malkinson AM. Defective gap junctional intercellular communication in lung cancer: loss of an important mediator of tissue homeostasis and phenotypic regulation. *Exp Lung Res* 2001; 27, 231-243.

Ruizeveld de Winter JA, Trapman J, Vermey M, Mulder E, Zegers ND, van der Kwast TH. Androgen receptor expression in human tissues: an immunohistochemical study. *J Histochem Cytochem* 1991; 39, 927-936.

Russell LD. Desmosome-like junctions between Sertoli and germ cells in the rat testis. *Am J Anat* 1977; 148, 313-328.

Russell LD, Tallon-Doran M, Weber JE, Wong V, Peterson RN. Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell: III. A study of specific cellular relationships. *Am J Anat* 1983; 167, 181-192.

Russell LD, Peterson RN. Sertoli cell junctions: morphological and functional correlates. *Int Rev Cytol* 1985; 94, 177-211.

Russell D, Ettlín RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED. Staging for laboratory species. In: *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Russell D, Ettlín RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED (Hrsg.). Cache River Press Clearwater, 1990; 62-194.

Russell LD. Role in Spermiation. In: *The Sertoli cell*, Griswold MD, Russell LD (Hrsg.). Cache River Press: Clearwater, FL, 1993a; 269-304.

Russell LD. Morphological and functional evidence for Sertoli-germ cell relationships. In: *The Sertoli cell*, Griswold MD, Russell LD (Hrsg.). Cache River Press: Clearwater, FL, 1993b; 365-390.

Saez JC, Nairn AC, Czernik AJ, Spray DC, Hertzberg EL, Greengard P, Bennett MV. Phosphorylation of connexin32, a hepatocyte gap junction protein by camp-dependent protein kinase, protein kinase C and  $Ca^{2+}$  / calmodulin-dependent proteinkinase II. *Eur J Biochem* 1990; 192, 263-273.

Saez JC, Berthoud VM, Moreno AP, Spray DC. Gap junctions: Multiplicity of controls in differentiated and undifferentiated cells and possible functional implications. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1993, 27, 163-198.

Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martínez AD, Beyer EC. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* 2003; 83, 1359-1400.

Sarli G, Benazzi C, Prziósi R, Marcato PS. Proliferative activity assessed by anti-PCNA and Ki-67 monoclonal antibodies in canine testicular tumours. *J Comp Pathol* 1994; 110, 357-368.

Sasano H, Nakashima N, Matsuzaki O, Kato H, Aizawa S, Sasano N, Nagura H. Testicular sex cord-stromal lesions. Immunohistochemical analysis of cytokeratin, vimentin and steroidogenic enzymes. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 1992; 421, 163-169.

Schleiermacher E. Ultrastructural changes of the intercellular relationship in impaired human spermatogenesis. *Hum Genet* 1980; 54, 391-404.

Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 2003, 125; 769-784.

Sinowatz F. Gametogenese. In: *Embryologie des Menschen. Kurzlehrbuch*, Sinowatz F, Seitz J, Bergmann M, Petzoldt U, Fanghänel J (Hrsg.). Dt. Ärzte-Verlag, Köln, 1999; 31-49.

Skinner MK. Secretion of growth factors and other regulatory factors. In: *The Sertoli cell*, Griswold MD, Russell LD (Hrsg.). Cache River Press: Clearwater, FL, 1993a; 237-248.

Skinner MK. Sertoli cell-peritubular myoid cell interactions. In: *The Sertoli cell*, Griswold MD, Russell LD (Hrsg.). Cache River Press: Clearwater, FL, 1993b; 477-484.

Söhl G, Willecke K. An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun and Adhes* 2003; 10, 173-180.

Söhl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* 2004; 62, 228-232.

Solan JL, Lampe PD. Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly. *Biochim Biophys Acta* 2005, 1711, 154-163.

Soroceanu L, Manning TJ, Sontheimer H. Reduced expression of connexin43 and functional gap junction coupling in human gliomas. *Glia* 2001 33, 107-117.

Sridharan S, Simon L, Meling DD, Cyr DG, Gutstein DE, Fishman GI, Guillou F, Cooke PS. Proliferation of adult Sertoli cells following conditional knockout of the gap junctional protein GJA1 (connexin43) in mice. *Biol Reprod* 2007; 76, 804-812.

Steger K, Schimmel M, Wrobel KH. Immunocytochemical demonstration of cytoskeletal proteins in seminiferous tubules of adult rams and bulls. *Arch Histol Cytol* 1994; 57, 17-28.

Steger K, Rey R, Kliesch S, Louis F, Schleicher G, Bergmann M. Immunohistochemical detection of immature Sertoli cell markers in testicular tissue of infertile men: a preliminary study. *Int J Androl* 1996; 19, 122-128.

Steger K, Tetens F, Bergmann M. Expression of connexin43 in human testis. *Histochem Cell Biol* 1999a; 112, 215-220.

Steger K, Rey R, Louis F, Kliesch S, Behre HM, Nieschlag E, Hoepffner W, Bailey D, Marks A, Bergmann M. Reversion of differentiated phenotype and maturation block in Sertoli cells in pathological human testis. *Hum Reprod* 1999b; 14, 136-143.

Steinberg TH, Civitelli R, Geist ST, Robertson AJ, Hicke E, Veenstra RE, Wang HZ, Warlow PM, Westphale EM, Laing JG, Beyer EC. Connexin43 and connexin45 form gap junctions with different molecular permeabilities in osteoblastic cells. *EMBO J* 1994; 7, 744-750.

Stoker MGP, Shearer M, O'Neill C. Growth inhibition of polyoma-transformed cells by contact with static normal fibroblasts. *J Cell Sci* 1966; 3, 297-310.

Stoker MGP. Transfer of growth inhibition between normal and virus-transformed cells: autoradiographic studies using marked cells. *J Cell Sci* 1967; 2, 293-304.

Suarez-Quian CA, Martinez-Garcia F, Nistal M, Regadera J. Androgen receptor distribution in adult human testis. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84, 350-358.

Talerman A. Malignant Sertoli cell tumor of the testis. *Cancer* 1971; 28, 446-455.

Tan IP, Roy C, Saez RJ, Saez CG, Paul DL, Risley MS. Regulated assembly of connexin33 and connexin43 into rat Sertoli cell gap junctions. *Biol Reprod* 1996; 54, 1300-1310.

Temme A, Buchmann A, Gabriel HD, Nelles E, Schwarz M, Willecke K. High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32. *Curr Biol* 1997; 7, 713-716.

Terayama K, Hirokawa M, Shimizu M, Kanahara T, Manabe T. Sertoli cell tumor of the testis. Report of a case with imprint cytology findings. *Acta Cytol* 1998; 42, 1458-1460.

Theilen GH, Madwell BR. Tumors of the genital system. In: *Veterinary cancer medicine*. Theilen GH, Madwell BR. (Hrsg.). Lea & Febiger, Philadelphia 1987; 583-600.

Thilander G, Lindberg R, Plöen L. Ultrastructural features of the neoplastic Sertoli cell in a dog. *Acta Vet Scand* 1987; 28, 445-446.

Torres LN, Matera JM, Vasconcellos CH, Avanzo JL, Hernandez-Blazquez FJ, Dagli MLZ. Expression of connexins 26 and 43 in canine hyperplastic and neoplastic mammary glands. *Vet Pathol* 2005; 42, 633-641.

Trosko JE, Ruch RJ. Cell-cell communication in carcinogenesis. *Front Biosci* 1998; 3, 208-236.

Unger VM, Kumar NM, Gilula NG, Yeager M. Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. *Science* 1999; 283, 1176-1180.

Unwin PN, Zampighi G. Structure of the junction between communicating cells. *Nature* 1980; 283, 545-549.

Unwin PN, Ennis PD. Calcium-mediated changes in gap junction structure: evidence from the low angle X-ray pattern. *J Cell Biol* 1983; 97, 1459-1466.

Van Veen TAB, Van Rijen HVM, Jongsma HJ. Electrical conductance of mouse connexin45 gap junction channels is modulated by phosphorylation. *Cardiovas Res* 2000; 46, 496-510.

Vignon X, Terquem A, Dadoune JP. The postnatal development of the junctional complexes of hamster Sertoli cells as revealed by HRP and freeze-fracture. *J Submicrosc Cytol* 1987; 19, 303-309.

Von Bomhard D, Pukkavesa C, Haenichen T. The ultrastructure of testicular tumors in the dog: III. Sertoli cells and Sertoli Cell tumors and general conclusions. *J Comp Pathol* 1978; 88, 67-73.

Von der Maase H, Rorth M, Walbom-Jorgensen S, Sorensen BL, Christophersen IS, Hald T, Jacobsen GK, Berthelsen JG, Skakkebaek NE. Carcinoma in situ of contralateral testis in patients with testicular germ cell cancer: study of 27 cases in 500 patients. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1986; 293, 1398-1401.

Von Sandersleben J, Dämmrich K, Dahme E. Geschwülste. In: *Pathologische Histologie der Haustiere*, von Sandersleben J, Dämmrich K, Dahme E (Hrsg.). Fischer Verlag, Stuttgart, 1989; 42-73.

Wang YF, Daniel EE. Gap junctions in gastrointestinal muscle contain multiple connexins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281, G533-G543.

Weinbauer GF, Gromoll J, Simoni M, Nieschlag E. Physiologie der Hodenfunktion. In: *Andrologie-Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. Nieschlag E, Behre HM (Hrsg.). Springer Verlag Berlin 2000; 27-67.

White TW, Bruzzone R, Wolfram S, Paul DL, Goodenough DA. Selective interactions among the multiple connexin proteins expressed in the vertebrate lens: the second extracellular domain is a determinant of compatibility between connexins. *Cell Biol* 1994; 125, 879-892.

White TW, Bruzzone R, Paul DL. The connexin family of intercellular channel forming proteins. *Kidney Int* 1995; 48, 1148-1157.

Wilgenbus KK, Kirkpatrick CJ, Knuechel R, Willecke K, Traub O. Expression of cx26, cx32 and cx43 gap junction proteins in normal and neoplastic human tissues. *Int J Cancer* 1992; 51, 522-529.

Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckhardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Deutsch U, Söhl G. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* 2002; 383, 725-737.

Williams K, McKinnell C, Saunders PTK, Walker M, Fisher JS, Turner KJ, Atanassova N, Sharpe RM. Neonatal exposure to potent and environmental oestrogens and abnormalities of the male reproductive system in the rat: evidence for importance of the androgen-oestrogen balance and assessment of the relevance to man. *Hum Reprod Update* 2001; **7**, 236-247.

Willingham-Rocky LA, Golding MC, Wright JM, Kraemer DC, Westhusin AM, Burghardt RC. Cloning of GJA1 (connexin43) and its expression in canine ovarian follicles throughout the estrous cycle. *Gene Expr Patterns* 2007; **7**, 66-71.

Winterhager E, Pielensticker N, Freyer J, Ghanem A, Schrickel JW, Kim JS, Behr R, Grümmer R, Maass K, Urschel S, Lewalter T, Tiemann K, Simoni M, Willecke K. Replacement of connexin43 by connexin26 in transgenic mice leads to dysfunctional reproductive organs and slowed ventricular conduction in the heart. *BMC Dev Biol* 2007; **7**, 26.

Wolfe SL. The cell surface and intracellular communication. In: *Molecular and cellular biology*, Wolfe SL (Hrsg.). Wadsworth Publishing, Belmont 1993; 232-272.

Wrobel KH, Bergmann M. Male reproductive system. In: *Dellmann's textbook of veterinary histology*, Eurell JA, Frappier BL (Hrsg.). Blackwell Publishing, Iowa 2006; 233-255.

Yamada KA, Rogers JG, Sundset R, Steinberg TH, Saffitz JE. Up-regulation of connexin45 in heart failure. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2003; **14**, 1205-1212.

Yamasaki H. Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1990; **11**, 1051-1058.

Yamasaki H. Aberrant expression and function of gap junctions during carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 1991; **93**, 191-197.

Yamasaki H. Role of disrupted gap junctional intercellular communication in detection and characterization of carcinogens. *Mutat Res* 1996; **365**, 91-105.

Yamasaki H, Naus CC. Role of connexin genes in growth control. *Carcinogenesis* 1996; 17, 1199-1213.

Yamasaki H, Krutovskikh V, Mesnil M, Tanaka T, Zaidan-Dagli ML, Omori Y. Role of connexin (gap junction) genes in cell growth control and carcinogenesis. *C R Acad Sci III* 1999; 322, 151-159.

You S, Li W, Lin T. Expression and regulation of connexin43 in rat Leydig cells. *J Endocrinol* 2000; 166, 447-453.

Young RH, Koelliker DD, Scully RE. Sertoli cell tumors of the testis, not otherwise specified. *Am J Surg Pathol* 1998; 22, 709-721.

Yu W, Dahl G, Werner R. The connexin43 gene is responsive to oestrogen. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1994; 255, 125-132.

Zhou Q, Nie R, Prins GS, Saunders PTK, Katzenellenbogen BS, Hess RA. Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *J Androl* 2002; 23, 870-881.

## 10 Bezugsquellen

### 10.1 Stoffe und Reagenzien

ABC-Elite Kit Standard; Vector Vectastain	Vector Laboratories, Burlingame, England
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid/ N, N'-Methylenbisacrylamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Agarose	Bioline, Luckenwalde
Ampicillin (2,5 mg)	Stratagene, Heidelberg
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
APTEX (3-Aminopropyl-triethoxysilan)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
BCA Protein Assay Reagent Lsg. A und B	Pierce, Illinois, USA
β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
BSA (bovines Serumalbumin)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Chloroform/Trichlormethan	Roth, Karlsruhe
CIP (calf intestinal alkaline phosphatase)	New England Biolabs, Frankfurt
DAB (Diaminobenzidin)	BioLogo, Kronshagen
DEPC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dextransulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
DNA-Größenstandard, (100bp DNA-ladder)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
DNA-Ligase	Promega, Mannheim
DNA-Purifikationssystem QIAEX II	Qiagen, Hilden
DNase I, RNase frei	Roche, Mannheim
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
EDTA-Lösung (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

## Bezugsquellen

Eisessig	Merck, Darmstadt
Eosin	Shandon, Frankfurt
Ethanol vergällt	Schmitt, Dillenburg
Ethanol rein	Merck, Darmstadt
Ficoll 400	Serva, Heidelberg
Formamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Glycerin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Guanidinhydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
HistoMark <sup>®</sup> Red	KPL, Gaithersburg, USA
HCl	Merck, Haar
IPTG (Isopropylthiogalactosid)	Bioline, Luckenwalde
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
KCl (Kaliumchlorid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
LB-Medium	Q Biogene, USA
LB-Agar-Medium	Q Biogene, USA
Levamisol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ligase-Puffer	Promega, Mannheim
Magermilchpulver	Heirler Cenovis, Radolfzell
Methanol	Merck, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub> -Lösung	Promega, Mannheim
Mineralöl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck, Haar
NBT/BCIP	KPL, Wedel

## Bezugsquellen

Paraffin	Vogel, Gießen
Paraformaldehyd	Merck, Haar
PBS (Phosphate buffered saline)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
pGEM-T Vektor	Promega, Mannheim
Pikrinsäurelösung	Riedel-deHaen, Seelze
Restriktionsenzyme (Not I, Nco I)	New England Biolabs, Frankfurt
RNA-Polymerasen (T7 und SP-6)	Promega, Mannheim
Salmon-sperm DNA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Sensiscript <sup>®</sup> RT-Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Sybr <sup>®</sup> Green	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Taq DNA-Polymerase Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Tetracyclin (1,5 mg)	Stratagene, Heidelberg
Tris-HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Triton	Merck, Darmstadt
TRIZol <sup>®</sup>	Invitrogen, Karlsruhe
True Blue Peroxidase Substrate	KPL, Gaithersburg, USA
Tween 20-R, Polyoxyethylensorbitan Mono- laurate	Roth, Karlsruhe
Vectashield <sup>®</sup> Mounting Medium mit DAPI	Alexis Deutschland GmbH, Grünberg
Vitro-Clud	Langenbrinck, Emmendingen
X-Gal	Invitrogen, Karlsruhe
Xylol	Roth, Karlsruhe
Yeast-t-RNA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ziegenerum	Vector, Burlingame, USA

## 10.2 Geräte

Autoklav	MAGV, Rabenau-Londorf
Biometra Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen

## Bezugsquellen

Bio Photometer	Ependorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Brutschrank	Memmert, Schwabach
Einbettgerät Leica EG 1160	Leica, Bensheim
Entwässerungsgerät Leica TP 1050	Leica, Bensheim
Feuchte Kammer	Kreatech Diagnostics, Amsterdam, Niederlande
Gefriermikrotom Kryostat 2800 Frigocut-E	Reichert und Jung, jetzt Leica-Systems GmbH, Nussloch
Gelelektrophorese-Apparatur Agagel Mini <sup>®</sup>	Biometra, Göttingen
Heizplatte	MAGV, Rabenau-Londorf
High Performance Ultraviolett Transilluminator	Ultra Violet Products, Cambridge, USA
Kamera VC45, 2/3	PCO AG, Kelheim
Palm <sup>®</sup> MicroBeam System	Palm Microlaser Technologies, Bernried
Photomikroskop Axiophot	Carl-Zeiss AG, Oberkochen
Scanner AV 630	Avision Inc., Taiwan
Schlittenmikrotom Leica SM 2000 R	Leica, Bernsheim
Sterilisator Heraeus	MAGV, Rabenau-Londorf
T3-Thermocycler	Biometra, Göttingen
Trockenschrank	Memmert, Schwabach
Ultra-Turrax-Gerät T8	IKA Labortechnik, Staufen
Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomat	Leica, Bensheim
Vortexer	Heidolph, Schwabach
Schüttler IKA-Vibrax-VXR	IKA-Werke, Staufen
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Wippschüttler	Eigenbau
Zentrifuge MIKRO 22R	Hettich, Tuttlingen

### 10.3 Sonstiges Material

DAKO-Pen	DAKO, Hamburg
Escherichia coli, Eco XL-1 Blue	Stratagene, Heidelberg
Küvetten Art. Nr. H550.1	Roth, Karlsruhe
Mikroreaktionsgefäße	Sarstedt, Nürnberg
Mikrozentrifugenröhrchen	Palm Microlaser Technologies, Bernried

## Bezugsquellen

Palm <sup>®</sup> Membrane Slides	Palm Microlaser Technologies, Bernried
Parafilm	American National Can, Menasha, USA
PCR-Tubes, dünnwandig	Axygen Scientific Inc., Union City, USA
Pipettenspitzen	Ratiolab, Dreieich
Pipettenspitzen, gestopft	Biozym Diagnostic GmbH, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen, gestopft, Finntip Filter	Labsystems, Helsinki, Finnland
Polaroi-Sofortbildfilme Typ 667	Polaroid, Offenbach
Porzelschalen, Pinzetten	Ratiolab, Dreieich
Skalpellklinge	Produkte für die Medizin AG, Köln
Super-Frost-OT	Langenbrinck, Emmerdingen
Super-Frost-OT Plus	VWR-International GmbH, Darmstadt
Tissue Tek <sup>®</sup> O.C.T. <sup>™</sup> Compound 4584	Leica Microsystems GmbH, Nussloch
UVette <sup>®</sup> (Einmalküvetten)	Eppendorf AG, Hamburg

## 10.4 Software

analySIS, digitale Bildanalyse	Soft Imaging System GmbH, Münster
Palm <sup>®</sup> Robo Software	Palm Microlaser Technologies, Bernried

## 11 Verzeichnis der Abkürzungen

Adenin	<b>A</b> denin
Abb.	<b>A</b> bbildung
ABC	<b>A</b> vidin- <b>B</b> iotin- <b>K</b> omplex
abs.	<b>a</b> bsolut
APAAP	<b>A</b> lkalische- <b>P</b> hosphatase- <b>A</b> nti- <b>A</b> lkalische- <b>P</b> hosphatase
APTEX	3- <b>A</b> minopropyltriethoxy-Silane
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
Aqua dest.	einfach destilliertes Wasser
BHS	<b>B</b> lut- <b>H</b> oden- <b>S</b> chranke
bp	<b>B</b> asenpaare
BSA	<b>b</b> ovines <b>S</b> erumalbumin
C	<b>C</b> ytosin
°C	Grad <b>C</b> elsius
Ca <sup>2+</sup>	<b>C</b> alziumionen
CAMP	<b>C</b> yklisches <b>A</b> denosin <b>m</b> onophosphat
C-Terminus	<b>C</b> arboxy-Terminus eines Proteins
c-DNA	<b>c</b> opy-DNA
CIP	<b>C</b> alf <b>I</b> ntestinal <b>A</b> lkaline <b>P</b> hosphatase
CL	zytoplasmatische Schleife eines Cx („cytoplasmic loop“)
Cx	<b>C</b> onnexin
Cy3	Indocarbocyanin
Da	<b>D</b> alton
DEPC	<b>D</b> iethylpyrocarbonat
DIG	<b>D</b> igoxigenin

## Verzeichnis der Abkürzungen

DNA (DNS)	<b>D</b> eoxy <b>r</b> ibonucleinsäure („-acid“)
DNase	<b>D</b> eoxyribonucle <b>ase</b>
dNTP	<b>d</b> eoxy-Ribonucleotid <b>t</b> riphosphat
FITC	<b>F</b> luorescein <b>i</b> sothiocy <b>a</b> nat
FSH	<b>F</b> ollikel-stimulierendes <b>H</b> ormon
g	<b>G</b> ramm
G	<b>G</b> uanin
GJ	<b>G</b> ap <b>J</b> unction
h	Stunde („hour“)
H <sup>+</sup>	Wasserstoffionen
HCl	Salzsäure
HE	<b>H</b> ämatoxylin- <b>E</b> osin
IF	<b>I</b> mmun <b>f</b> luoreszenz
IHC	<b>I</b> mmun <b>h</b> istochemie
IL	intrazelluläre Schleife eines Cx („intracellular loop“)
ISH	<b>I</b> n-situ <b>H</b> ybridisierung
K <sup>+</sup>	<b>K</b> aliumionen
KCl	<b>K</b> aliumchlorid
kDa	<b>K</b> ilodalton
l	<b>L</b> iter
LH	lutinisierendes <b>H</b> ormon
M	<b>M</b> olar
mg	<b>M</b> illigramm
MgCl <sub>2</sub>	<b>M</b> agnesiumchlorid
min	<b>M</b> inuten

## Verzeichnis der Abkürzungen

ml	<b>Milliliter</b>
mM	<b>Millimolar</b>
mRNA	Boten („ <b>messenger</b> “)-RNA
MG (MW)	<b>Molekulargewicht</b> („ <b>molecular weight</b> “)
Na <sup>+</sup>	<b>Natriumionen</b>
NBT/BCIP	<b>Nitro-Blau-Tetrazolium/Bromo-Chloro-Indolyl-Phosphat</b>
N-Terminus	Aminoterminus eines Peptids
NaCl	<b>Natriumchlorid</b>
NaOH	Natronlauge
NB	<b>Northern Blot</b>
NCBI	<b>National Center Biotechnology Information</b>
ng	<b>Nanogramm</b>
nm	<b>Nanometer</b>
NTB	Nitroblautetrazolimchlorid
OD	<b>optische Dichte</b>
OT	<b>Objekträger</b>
PAGE	<b>Polyacrylamid-Gelelektrophorese</b>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung („ <b>phosphate-buffered-saline</b> “)
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen- konzentration
RNA (RNS)	<b>Ribonucleinsäure</b> („ <b>-acid</b> “)
RT	<b>Raumtemperatur</b>
RT-PCR	<b>Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion</b>
SCO	<b>Sertoli-Cell-Only</b>
SDS	<b>Sodiumdodecylsulfat</b>
sec	<b>Sekunden</b>

Verzeichnis der Abkürzungen

SSC	<b>Standard Saline Citrate</b>
T	<b>Thymin</b>
TAE	<b>Tris-Acetat-EDTA-Puffer</b>
TGF $\beta$	<b>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></b>
TNMT	<b>Tris-Natriumchlorid-Magnesiumchlorid-Triton-Base</b>
Tris	<b>Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan</b>
U	Enzymeinheiten („ <b>units</b> “)
UpM	Umdrehungen <b>per Minute</b>
UV-LACP	Ultraviolett-Laser <b>assisted cell-picking</b>
V	<b>Volt</b>
W	<b>Watt</b>
WB	<b>Western Blot</b>
WHO	<b>World Health Organisation</b>
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D- <b>galaktosidase</b>
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer

## **Danksagung**

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. M. Bergmann, möchte ich ganz herzlich danken für die Überlassung des Themas, für seine Unterstützung beim wissenschaftlichen Arbeiten, für seine Ratschläge und das in jeder Hinsicht gezeigte Verständnis und seine Geduld.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Brehm für die freundschaftliche Zusammenarbeit, die ständige Hilfsbereitschaft und Geduld, die zahlreichen Anregungen und Diskussionen beim Erstellen der Veröffentlichung und vor allem für die Einweisung in die Thematik dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. L. Fink (Institut für Pathologie, JLU Giessen) danke ich für die Gelegenheit, das Palm® MicroBeam System nutzen zu können.

Bei Frau G. Erhardt, M. Fink, A. Hax, A. Hild und R. Weigel bedanke ich mich herzlich für ihre Hilfestellung im Labor.

Für die Bereitstellung des tierischen Probenmaterials möchte ich mich bei Herrn Dr. G. Schuler (Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit tierärztlicher Ambulanz, JLU Giessen), bei der Tierklinik Dr. Kaiser (Stadtoldendorf) und bei der tierärztlichen Praxis Waldschmidt-Roth (Wetzlar) bedanken.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Veterinär-Anatomie möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Vor allem O. Lekhkota und M. Zeiler danke ich für die vielfältige Hilfe und moralische Unterstützung und meinen Mitdoktoranden M. Cavalcanti und V. Sonnack für die schöne Zeit im gemeinsamen „Doktorandenzimmer“.

Weiterhin möchte ich der Justus-Liebig-Universität, Giessen, für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit mittels des „Graduiertenstipendiums für Nachwuchswissenschaftler“ danken.

Ich danke Anja, Caro, Kerstin, Linn, Susan und Peter für die schöne Zeit während unseres Studiums und der Doktorarbeit, und vor allem für ihre Freundschaft.

Meiner Schwester Melanie und Alex danke ich für ihr Verständnis und ihre liebevolle und moralische Unterstützung in der gesamten Zeit.

Zuletzt möchte ich meine Eltern ganz besonders danken, die niemals Zweifel an meinem Gelingen hatten und ohne deren Unterstützung und Rückhalt ein Studium der Tiermedizin sowie diese Arbeit für mich nicht möglich gewesen wären. DANKE.

## **Erklärung**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5308-7



9 17 8 3 8 3 5 19 5 3 0 8 6