

UNTERSUCHUNGEN ZUM DIFFERENZIERUNGSZUSTAND
VON SERTOLI ZELLEN IN MÄUSEN MIT SERTOLI
ZELL-SPEZIFISCHEM KNOCKOUT DES CONNEXIN
43-GENS (SCCX43KO)

KAROLA WEIDER



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 2011

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.

1st Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

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

Betreuer: Prof. Dr. Ralph Brehm

**Untersuchungen zum Differenzierungszustand von
Sertoli Zellen in Mäusen mit Sertoli Zell-
spezifischem Knockout des Connexin 43-Gens
(SCCx43KO)**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

KAROLA WEIDER
Tierärztin aus Langen

Gießen 2011

Gefördert durch die Dr. med. vet. Hans-Joachim und Gertrud Engemann-
Stiftung, Gießen und die Deutsche Forschungsgemeinschaft
(BR 3365/2-1 und KFO 181/1)

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

Dekan: Prof. Dr. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. R. Brehm

Prof. Dr. Dr. h.c. mult. H. Bostedt

Tag der Disputation: 07. Juli 2011

Meinen Eltern

VERÖFFENTLICHUNGEN.....	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	IX
TABELLENVERZEICHNIS	XI
1 EINLEITUNG UND ZIELE DER ARBEIT	1
2 LITERATURÜBERSICHT	4
2.1 Funktionelle Histologie des Hodens	4
2.1.1 Keimzellen	4
2.1.1.1 <i>Ursprung</i>	5
2.1.1.2 <i>Spermatogenese</i>	5
2.1.1.3 <i>Kinetik der Spermatogenese</i>	7
2.1.1.4 <i>Hormonelle Regulation der Spermatogenese</i>	9
2.1.2 Sertoli Zellen.....	10
2.1.2.1 <i>Ursprung</i>	10
2.1.2.2 <i>Funktionen und Eigenschaften</i>	10
2.1.2.3 <i>Proliferation und Differenzierung</i>	13
2.1.2.4 <i>Regulation der Proliferation und Differenzierung</i>	14
2.1.2.5 <i>Biochemische Differenzierungsmarker und Zell-spezifische Marker</i>	14
2.1.2.6 <i>Veränderte Differenzierung bei testikulären Störungen</i>	19
2.2 Gap Junctions und Connexine	21
2.2.1 Aufbau und Funktionen von Gap Junction-Kanälen.....	21
2.2.2 Connexine – die Proteine der Gap Junctions	23
2.2.2.1 <i>Nomenklatur</i>	23
2.2.2.2 <i>Proteinstruktur und Lokalisation</i>	24
2.2.2.3 <i>Genstruktur und Expression</i>	25
2.2.3 Permeabilität von Gap Junction-Kanälen.....	26
2.2.4 Lebenszyklus von Gap Junctions	27
2.2.5 Gap Junction- und Connexin-Expression im Hoden	29
2.2.6 Connexin 43 im Keimepithel verschiedener Spezies	31
2.2.7 Connexin 43 und transgene Mausmodelle	32
2.2.7.1 <i>Konstitutive Connexin 43-Knockout-Mäuse</i>	32
2.2.7.2 <i>Konstitutive Connexin 43-Knockin-Mäuse</i>	34

2.2.7.3	<i>Konditionale (Zell-spezifische) Connexin 43-Knockout-Mäuse</i>	34
2.2.8	Rolle und Funktionen von Connexin 43 im Keimepithel.....	38
3	MATERIAL UND METHODEN	41
3.1	Versuchsdesign und Versuchstiere	41
3.1.1	Versuchstierhaltung.....	41
3.1.2	Generierung der SCCx43KO-Mäuse	41
3.1.3	PCR-Genotypisierung.....	42
3.1.4	Bestätigung der PCR-Genotypisierungsergebnisse.....	45
3.1.5	Probengewinnung.....	46
3.1.6	Versuchsdesign und eingesetzte Maushoden	46
3.2	Herstellung von Paraffinschnitten	49
3.2.1	Fixierung in Bouin oder 10 % NBF.....	49
3.2.2	Entwässerung und Einbettung.....	50
3.2.3	Beschichtung der Objektträger mit APES	50
3.2.4	Mikrotomie	51
3.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	51
3.4	Immunhistochemie	52
3.4.1	Allgemeine Vorbemerkung	52
3.4.2	Vimentin.....	53
3.4.3	Anti-Müller-Hormon.....	55
3.4.4	Androgenrezeptor	56
3.4.5	GATA-1.....	56
3.4.6	3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase	56
3.4.7	Ki-67	57
3.4.8	β -Galaktosidase.....	57
3.4.9	Mikroskopische Auswertung und Dokumentation	58
3.5	TUNEL-Färbung	58
3.6	Extraktion und Isolation von RNA und Proteinen aus Gefriermaterial ...	60
3.6.1	Allgemeine Vorbemerkung und Gefrierfixierung	60
3.6.2	Extraktion und Isolation mittels TRIzol [®] -Reagenz.....	60
3.7	DNase-Verdau und cDNA-Synthese (RT-PCR)	64

3.7.1	Allgemeine Vorbemerkung	64
3.7.2	DNase-Verdau und cDNA-Synthese.....	64
3.7.3	Überprüfung des DNase-Verdau und der RT-PCR	66
3.7.4	Aufreinigung der cDNA	67
3.8	Western Blot-Analyse.....	68
3.8.1	Allgemeine Vorbemerkung	68
3.8.2	Probenvorbereitung	69
3.8.3	Gelelektrophorese	69
3.8.4	Elektroblotting.....	70
3.8.5	Nachweisreaktion für Anti-Müller-Hormon und GATA-1	70
3.8.6	Dokumentation.....	72
3.9	Real-Time PCR	72
3.9.1	Allgemeine Vorbemerkung	72
3.9.2	Generierung der Primer	73
3.9.3	Bestimmung der exakten Effizienzen und Schmelzkurvenanalyse	73
3.9.4	Genexpressionsvergleich für Anti-Müller-Hormon und GATA-1.....	75
3.9.5	Sequenzierung der PCR-Produkte	76
3.9.6	Statistische Analyse.....	78
3.10	Semidünnschnitte und Transmissionselektronenmikroskopie	79
4	ERGEBNISSE.....	81
4.1	Differenzierungszustand von Sertoli Zellen in SCCx43KO-Mäusen.....	81
4.1.1	Differenzierung auf biochemischer Ebene	81
4.1.1.1	<i>Vimentin</i>	81
4.1.1.2	<i>Anti-Müller-Hormon</i>	82
4.1.1.3	<i>Androgenrezeptor</i>	84
4.1.1.4	<i>GATA-1</i>	86
4.1.2	Differenzierung auf morphologischer Ebene.....	88
4.2	Intratubuläre Zellcluster in SCCx43KO-Mäusen.....	89
4.2.1	Zusammensetzung und Differenzierung	89
4.2.2	Apoptose	91
4.2.3	Zeitpunkt des Auftretens.....	92
5	DISKUSSION	93

6	ZUSAMMENFASSUNG	102
7	SUMMARY	105
8	LITERATURVERZEICHNIS	107
9	ANHANG.....	127
9.1	Stoffe und Reagenzien	127
9.2	Antikörper.....	129
9.3	Hergestellte Puffer und Lösungen	130
9.4	Geräte	133
9.5	Gerätezubehör und sonstiges Material.....	134
9.6	Software.....	134
	ERKLÄRUNG.....	135
	DANKSAGUNG	136

VERÖFFENTLICHUNGEN

In die mit * markierten Veröffentlichungen sind Teile dieser Arbeit mit eingegangen.

Artikel

***Weider K**, Bergmann M, Giese S, Guillou F, Failing K, Brehm R. Altered differentiation and clustering of Sertoli cells in transgenic mice showing a Sertoli cell specific knockout of the connexin 43 gene (SCCx43KO). *Differentiation* 2011, doi:10.1016/j.diff.2011.03.001

Weider K, Bergmann M, Brehm R. Connexin 43: its regulatory role in testicular junction dynamics and spermatogenesis. *Histol Histopathol.* 2011 (in press).

Carette D, **Weider K**, Gilleron J, Giese S, Dompierre J, Bergmann M, Brehm R, Denizot JP, Segretain D, Pointis G. Major involvement of connexin 43 in seminiferous epithelial junction dynamics and male fertility. *Dev Biol.* 2010; 346: 54-67.

Giese S, Hossain H, Markmann M, Chakraborty T, Tchatalbachev S, Guillou F, Bergmann M, Failing K, **Weider K**, Brehm R. A Sertoli cell specific knockout of connexin 43 leads to multiple alterations in testicular gene expression in prepubertal mice. *Am J Pathol.* 2011 (submitted).

Abstracts

***Weider K**, Bergmann M, Willecke K, Guillou F, Brehm R. Altered differentiation and clustering of Sertoli cells in transgenic mice showing a Sertoli cell specific knockout of the connexin 43 gene (SCCx43KO). *Reprod Domest Anim.* 2010; 45: 57-58.

Dieser Abstract war verbunden mit einer **Posterpräsentation** auf der „43. Jahrestagung für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung gleichzeitig 34. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung“ vom 24. bis 26. Februar 2010 in München.

***Weider K**, Bergmann M, Willecke K, Guillou F, Brehm R. Altered differentiation and clustering of Sertoli cells in transgenic mice showing a Sertoli cell specific knockout of the connexin 43 gene (SCCx43KO). *Anat Histol Embryol.* 2010; 334.

Dieser Abstract war verbunden mit einem **Vortrag** auf dem „XXVIIIth Congress of the European Association of Veterinary Anatomists“ vom 28. bis 31. Juli 2010 in Paris, Frankreich.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und physikalische Maßeinheiten sind nicht gesondert aufgeführt.

ABC	Avidin-Biotin-Komplex (avidin-biotin-complex)
ABP	Androgen-bindendes Protein
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AMH / MIS	Anti-Müller-Hormon / Müllerian inhibiting substance
APES	3-Aminopropyltriethoxysilan
AR	Androgenrezeptor
ARKO	genereller Knockout des Androgenrezeptors (ubiquitous androgen receptor knockout)
β-Gal	beta-Galaktosidase
3β-HSD	3beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase
BCA	Bicinchoninsäure (bicinchoninic acid)
BHS	Blut-Hoden-Schranke
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
CIS	Carcinoma <i>in situ</i>
Cre	causes recombination
Cu	Kupfer (Cuprum)
Cx	Connexin
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMP	2,4,6-Dimethylaminomethylphenol
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F1	erste Filialgeneration
F2	zweite Filialgeneration

FC	fold change (x-fache Veränderung)
flox	flanked by loxP
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GJ	Gap Junction
GJIC	Gap junctional intercellular communication
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HE	Hämatoxylin-Eosin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Hsp90ab1	heat shock protein 90 kDa alpha, class B member 1
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
IP3	Inositoltriphosphat
ISH	<i>In-situ</i> -Hybridisierung
KI	Knockin
KO	Knockout
KZ	Keimzelle
LH	Luteinisierendes Hormon
LN	Flüssigstickstoff (liquid nitrogen)
loxP	locus of X-ing over
M	Marker
MgCl ₂	Magnesiumdichlorid
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	Natriumdihydrogenphosphat
NB	Northern Blot
NBF	neutral-gepuffertes Formalin (neutral buffered formalin)
NTC	Negativkontrolle (no template control)
OD	optische Dichte
OsO ₄	Osmiumtetroxid
OT	Objektträger
P	Parentalgeneration
PAS	Periodic-Acid-Schiff-Färbung

PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
p. c.	post coitum
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
p. p.	post partum
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
RXR β	Retinoid X Rezeptor beta
SA	Standardabweichung
SCARKO	Sertoli Zell-spezifischer Androgenrezeptor-Knockout (Sertoli cell specific androgen receptor knockout)
SCCx43KO	Sertoli Zell-spezifischer Connexin 43-Knockout (Sertoli cell specific connexin 43 knockout)
SCO	Sertoli cell only
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SRY	Sex determinierende Region auf dem Y-Chromosom
SZ / SC	Sertoli Zelle / Sertoli cell
T3	Trijodthyronin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TGF- β	Transforming growth factor-beta
TUNEL	terminale Desoxyribonukleotidyltransferase vermittelte dUTP End-Markierung (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling)
UpM	Umdrehungen pro Minute
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
WT-1	Wilms Tumor 1

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1 Schematische Darstellung der Spermatogenese.	7
Abb. 2 Keimepithelzyklus und Differenzierung der Spermatiden in der Maus	8
Abb. 3 Hormonelle Regulation der Spermatogenese	10
Abb. 4 Aufgaben und Funktionen von adulten SZ	11
Abb. 5 Verteilung von Vimentinfilamenten in typischen adulten SZ.....	15
Abb. 6 Aufbau eines GJ-Plaques.	22
Abb. 7 Cx- und Connexon-Kombinationen in GJ-Kanälen.....	23
Abb. 8 Proteinstruktur und Lokalisation eines Cx.	24
Abb. 9 Struktur von Cx-Genen.....	25
Abb. 10 Permeabilität von GJ-Kanälen: Rotationsmodell	27
Abb. 11 Lebenszyklus von GJ-Kanälen.....	27
Abb. 12 Aufbau von LoxP-Elementen.....	35
Abb. 13 Vereinfachtes Schema einer Zell-spezifischen Cre/loxP-Zuchtstrategie.	36
Abb. 14 SCCx43KO: makroskopisches Erscheinungsbild.....	37
Abb. 15 SCCx43KO: histologischer Phänotyp.....	38
Abb. 16 Generierung der SCCx43KO-Mäuse.....	41
Abb. 17 PCR-Genotypisierung: Elektrophorese-Gelbilder.....	45
Abb. 18 β -Gal-IHC zur Bestätigung der PCR-Genotypisierung.	46
Abb. 19 Schematische Darstellung der durchgeführten Methoden.....	47
Abb. 20 SZ-Differenzierungszustand: Vimentin-IHC.....	81
Abb. 21 SZ-Differenzierungszustand: AMH-IHC (präpubertär und adult).....	82
Abb. 22 SZ-Differenzierungszustand: AMH-IHC (pubertär).....	83
Abb. 23 SZ-Differenzierungszustand: WB und Real-Time PCR für AMH.	84
Abb. 24 SZ-Differenzierungszustand: AR-IHC.....	85
Abb. 25 SZ-Differenzierungsmarker: GATA-1-IHC (präpubertär und pubertär).....	86
Abb. 26 SZ-Differenzierungsmarker: GATA-1-IHC (adult).....	87
Abb. 27 SZ-Differenzierungszustand: WB und Real-Time PCR für GATA-1.	87
Abb. 28 SZ-Differenzierungszustand: Semidünnschnitte und TEM.....	88
Abb. 29 SZ-Differenzierungszustand: HE-Färbung.	89
Abb. 30 Zellcluster: IHC von verschiedenen SZ-Markern.....	89
Abb. 31 Zellcluster: IHC von 3β -HSD.	90
Abb. 32 Zellcluster: Semidünnschnitt und TEM-Bild.....	90

Abb. 33 Zellcluster: β -Gal- und Ki-67-IHC.	91
Abb. 34 Zellcluster: TEM-Bild und TUNEL-Färbung.	92
Abb. 35 Zellcluster: Zeitpunkt des Auftretens im HE-Schnitt.	92

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1 PCR-Genotypisierung: eingesetzte Primer (Brehm et al. 2007).	44
Tab. 2 IHC: eingesetzte Primär- und Sekundärantikörper.....	53
Tab. 3 Real-Time PCR: eingesetzte Primer.....	73
Tab. 4 Real-Time PCR: Platten-Belegungsschema Verdünnungsreihe.	75
Tab. 5 Real-Time PCR: Platten-Belegungsschema Genexpressionsvergleich.....	76

1 EINLEITUNG UND ZIELE DER ARBEIT

Zur Aufrechterhaltung der Funktion eines mehrzelligen Organismus ist die Kommunikation zwischen einzelnen Zellen essenziell. Diese kann dabei über verschiedene Mechanismen vermittelt werden, auf direktem Wege aber „sprechen“ Zellen nur über so genannte GJ-Kanäle miteinander. Diese Kanäle sind spezialisierte Membranstrukturen, die die Zytoplasmata benachbarter Zellen unmittelbar miteinander verbinden und so den direkten Austausch von Stoffen bis zu einem Molekulargewicht von 1 kDa ermöglichen. Sie sind bei Säugetieren in fast allen Zelltypen normaler Gewebe zu finden mit Ausnahme weniger terminal differenzierter Zellen, wie den Erythrozyten, Skelettmuskelzellen und Spermien. GJ ermöglichen eine direkte metabolische und elektrische Kopplung von Zellen sowie die koordinierte Antwort von gekoppelten Zellen auf Hormone und Wachstumsfaktoren. Ihnen wird eine bedeutende Rolle in der Proliferation und Differenzierung von Zellen, Apoptose, Aufrechterhaltung der Gewebekomöostase, aber auch Tumorgenese zugesprochen.

Ein einzelner GJ-Kanal besteht aus zwei Halbkanälen, den Connexonen, wobei jede der beiden beteiligten Zellen einen Halbkanal beisteuert. Connexone wiederum sind jeweils aus sechs Proteinuntereinheiten aufgebaut, den so genannten Cx. Bis dato sind in der Cx-Genfamilie 21 verschiedene Cx beim Menschen und 20 Cx in der Maus bekannt. Sie werden Gewebe- und Zell-spezifisch exprimiert, und verschiedene Zelltypen weisen oft mehr als ein Cx auf. Im Keimepithel sind GJ für die Interaktion von somatischen SZ bei der Bildung der BHS zum Schutz der haploiden KZ sowie für die Interaktion und Kommunikation von SZ und KZ von besonderer Bedeutung. Das GJ-Protein Cx43 ist dabei das vorherrschende Cx im Hoden der meisten Spezies und im Keimepithel zwischen benachbarten SZ und zwischen SZ und Spermatogonien sowie primären Spermatozyten lokalisiert. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass Veränderungen in der Cx43-Expression mit einer gestörten Spermatogenese bei Menschen und Nagern sowie Hodentumor-entwicklung beim Mann und Hund assoziiert sind.

Um nun die spezifische Rolle und die Funktionen von Cx43 auf die testikuläre Entwicklung und Spermatogenese untersuchen zu können, wurden in den letzten Jahren verschiedene KO-Mausmodelle entwickelt. Der generelle KO des Cx43-Gens

führt dabei zu einer Herzmissbildung und infolgedessen zum Tod der transgenen Mäuse unmittelbar nach der Geburt. Um diese Problematik zu umgehen und die SZ-spezifische Rolle von Cx43 auf die Spermatogenese *in vivo* untersuchen zu können, wurde kürzlich mit Hilfe des Cre/loxP-Rekombinasesystems eine lebensfähige konditionale KO-Mauslinie generiert, bei der das Cx43-Gen ausschließlich in den SZ fehlt. Verglichen mit ihren WT-Wurfgeschwistern zeigen männliche SCCx43KO-Mäuse keine Unterschiede im Körpergewicht, und auch Nebenhoden, Samenleiter und akzessorische Geschlechtsdrüsen sowie der Hodenabstieg erscheinen unverändert. Die Größe und das Gewicht der Hoden dieser KO-Mäuse sind jedoch drastisch reduziert. Die Tiere sind infertil und zeigen histologisch einen Arrest der Spermatogenese auf der Stufe der Spermatogonien oder SCO-Tubuli. Lediglich in maximal fünf Prozent der Samenkanälchen ist eine qualitativ normale Spermatogenese zu beobachten. Darüber hinaus treten abnormale intratubuläre Zellcluster, Vakuolen im Zytoplasma von SZ und eine Hyperplasie der interstitiellen Leydig Zellen auf. Eine statistische Analyse ergab zudem, dass die durchschnittliche Anzahl der Spermatogonien pro Samenkanälchen in adulten SCCx43KO-Mäusen verglichen mit ihren WT-Wurfgeschwistern signifikant reduziert ist. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der somatischen SZ pro Tubulus signifikant erhöht ist und sie auch nach der Pubertät noch proliferieren. Dabei sei zu erwähnen, dass adulte SZ als postmitotische Zellen angesehen werden, sie sich normalerweise mit der Pubertät ausdifferenzieren und danach keine Zellteilung mehr zeigen. Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die Cx43-Expression in den SZ der Maus eine absolute Voraussetzung für die Initiierung und Aufrechterhaltung der Spermatogenese darstellt. Darüber hinaus scheint Cx43 essenziell für die Beendigung der SZ-Proliferation während der Pubertät zu sein. Dieses GJ-Protein repräsentiert damit einen Hauptregulator für die Entwicklung von SZ sowie KZ und demonstriert, wie unabdingbar die direkte interzelluläre Kommunikation für die Spermatogenese ist.

Die zahlreichen Aufgaben von ausdifferenzierten und funktionell reifen SZ dienen vor allem der Vermehrung und Differenzierung von KZ, also der Initiierung und Aufrechterhaltung der Spermatogenese. So haben adulte SZ beispielsweise eine Stütz- und Ernährungsfunktion für KZ, ebenso sorgen sie für die Ausbildung der BHS, die dem Schutz der haploiden und damit antigenen KZ-Populationen dient. Das

Ausbleiben einer funktionellen Reifung von SZ während der Pubertät nimmt dabei Einfluss auf ihre Fähigkeit, das Überleben der KZ im postnatalen Hoden zu sichern und die KZ-Entwicklung zu unterstützen; die Folge ist unweigerlich eine gestörte Spermatogenese. Umgekehrt kann allerdings das Vorliegen einer gestörten Spermatogenese nicht grundsätzlich auf eine beeinträchtigte Differenzierung von SZ zurückgeführt werden. Nur in bestimmten Fällen konnten Studien an pathologischem Hodengewebe von Mensch und Nager zeigen, dass eine beobachtete abnormale KZ-Entwicklung mit einer veränderten SZ-Reifung einherging.

Die in den SCCx43KO-Mäusen beobachteten histologischen Veränderungen, wie Proliferation adulter SZ zusammen mit einer gestörten Spermatogenese, verdeutlichen, wie notwendig die Untersuchung des Differenzierungszustands der Cx43-defizienten SZ ist. Aus diesem Grund war das Hauptziel dieser Studie herauszufinden, ob die SZ in den KO-Mäusen neben ihrem proliferativen Status noch weitere immature Eigenschaften auf morphologischer und/oder funktioneller Ebene aufweisen. Handelt es sich bei diesen Zellen gar um primär undifferenzierte oder sekundär dedifferenzierte SZ, die folglich unfähig sind, die Initiierung und Aufrechterhaltung der Spermatogenese zu gewährleisten?

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Erforschung der in den SCCx43KO-Mäusen beobachteten abnormalen intratubulären Zellcluster. Untersucht wurden zum einen ihr exakter Auftrittszeitpunkt und zum anderen die Zusammensetzung, der Differenzierungszustand und das „Schicksal“ der Zellen in diesen Zellaggregaten.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Funktionelle Histologie des Hodens

Der adulte Hoden dient als paariges Organ der Bildung der Spermien (Spermatogenese) und der männlichen Geschlechtshormone (Androgensynthese) (Weinbauer et al. 2009). Der Hoden selbst wird von einer derben Bindegewebskapsel (Tunica albuginea) überzogen, der außen noch eine Tunica serosa anliegt. Von der Tunica albuginea ziehen radiär Septen (Septula testis) in das Organinnere und bilden dort den Bindegewebskörper (Mediastinum testis). Die Septen unterteilen das Hodenparenchym in zahlreiche pyramidenförmige Hodenläppchen (Lobuli testis), welche die stark geschlängelten samenbereitenden Samenkanälchen (Tubuli seminiferi contorti) enthalten. Diese bestehen aus dem innen gelegenen Keimepithel (Epithelium spermatogenicum) und einer äußeren, dem Epithel anliegenden myofibrösen Hülle, der Lamina propria. Die Lamina propria wiederum setzt sich aus einer Basalmembran (Membrana basalis), einer Kollagenfaserschicht (Stratum fibrosum) und den kontraktile peritubulären Zellen (Stratum myoideum) zusammen. Die Tubuli seminiferi contorti strecken sich vor dem Übertritt in das Mediastinum zu kurzen, geraden Abschnitten (Tubuli seminiferi recti) und bilden im Bindegewebskörper das Hodennetz (Rete testis) von dem Ausführungsgänge (Ductuli efferentes) Verbindung zum Nebenhoden (Epididymis) aufnehmen. Das Keimepithel besteht aus den verschiedenen Generationen der KZ und den somatischen SZ. Zwischen den Samenkanälchen befindet sich das interstitielle Bindegewebe (Interstitium), das sich aus lockerem Bindegewebe, Gefäß- und Nervenplexen, Fibrozyten, freien mononukleären Zellen und den Leydig Zellen zusammensetzt, wobei Letztere der Synthese von Testosteron dienen (Liebich 2003).

2.1.1 Keimzellen

Zu den im Keimepithel von adulten Hoden befindlichen KZ zählen die peripher an der Basalmembran liegenden Spermatogonien vom Typ A und B, die lumenwärts folgenden primären und sekundären Spermatozyten sowie die lumennahen runden und schließlich ausdifferenzierten elongierten Spermatisden (Weinbauer et al. 2009).

2.1.1.1 Ursprung

Die Stammzellen der männlichen Geschlechtszellen sind die Primordialkeimzellen. Diese Urkeimzellen sind diploid und finden sich beim Säuger zunächst extra-embryonal, und zwar im Epithel des Dottersacks in unmittelbarer Nähe der Allantoisanlage. Von hier aus wandern sie in die Keimdrüsenanlage ein, indem sie über das Bindegewebe des Enddarms in das Mesenterium und schließlich über die Nierenanlage in die Genitalleiste gelangen. Diese Wanderung erfolgt sowohl aktiv durch amöboide Eigenbewegung als auch durch passive Verlagerung infolge Abfaltung des Embryonalkörpers (Byskov 1986, Bendel-Stenzel 1998, Schnorr und Kressin 2006).

In der Maus wandern die Primordialkeimzellen ab Tag 9,5 p. c. aktiv vom Enddarm in Richtung Genitalleiste, die sie dann fast alle am Tag 11,5 p. c. erreicht haben (Bendel-Stenzel 1998, McLaren 2000). Ab diesem Zeitpunkt werden sie als Gonozyten bezeichnet (De Rooij und Russell 2000). Postnatal bewegen sich die Gonozyten vom Tubuluszentrum zunächst in Richtung Basalmembran und differenzieren sich dann in Typ A Spermatogonien. Diese Zellen können im Maus Hoden ab dem 3. Tag p. p. nachgewiesen werden (Vergouwen et al. 1991), Spermatogonien vom Typ B hingegen erst ab dem 8. Tag nach der Geburt (Bellvé et al. 1977). Zwischen dem 8-10 Tag p. p. treten im Maushoden die ersten KZ in die Meiose ein, und die Spermatogenese startet. Dies kann mit dem Beginn der Pubertät gleichgesetzt werden. Vollständig ausdifferenzierte Spermatozoen und damit eine komplette Spermatogenese sowie das Ende der Pubertät finden sich bei der Maus ab Tag 35 nach der Geburt (Bellvé et al. 1977, Vergouwen et al. 1993).

2.1.1.2 Spermatogenese

Unter Spermatogenese versteht man sämtliche Vermehrungs- und Reifungsvorgänge, die sich während der Entwicklung der männlichen KZ in den Samenkanälchen abspielen und die Bildung von reifen Spermien zum Ziel haben. Prinzipiell können drei Phasen der KZ-Reifung unterschieden werden: (1) die mitotische Proliferation und Differenzierung der diploiden Spermatogonien, (2) die meiotische Reifeteilung der tetraploiden Spermatozoen und (3) die Transformation der haploiden Spermatozoen in Spermien (Spermiogenese) (Clermont 1972, Weinbauer et al. 2009).

Die Spermatogenese (Abb. 1) beginnt mit mitotischen Teilungen der Stammzellen, den diploiden Spermatogonien Typ A ($2n2C$), die an die Basalmembran der Tubuli seminiferi grenzen. Bei diesen mitotischen Teilungen verbleibt eine Spermatogonie Typ A als Stammzelle, die andere unterliegt weiteren mitotischen Teilungen, aus denen zunächst intermediäre Spermatogonien und dann die Spermatogonien vom Typ B hervorgehen. Diese sind ebenfalls mitotisch aktiv und entwickeln sich zu den primären Spermatozyten (Spermatozyten 1. Ordnung), die eine 1. Reifeteilung durchlaufen. Vor Eintritt in die Prophase I der Meiose (Präleptotän-Stadium) kommt es in Vorbereitung auf die Meiose zunächst zu einer Verdopplung der Chromosomen. Präleptotäne primäre Spermatozyten sind damit tetraploid ($2n4C$). Histologisch kann man sie nur schwer von Spermatogonien Typ B unterscheiden, jedoch haben sie keine Verbindung mehr zur Basalmembran. Danach folgt das Leptotän-Stadium, hier kondensiert das Chromatin und wird sichtbar. Im Zygotän paaren sich die homologen Chromosomen durch Ausbildung des synaptonemalen Komplexes. Zur Chiasmabildung mit Crossing over kommt es dann im Pachytän. Zusätzlich kondensiert das Chromatin weiter, und der Zellkern vergrößert sich. Im Diplotän trennen sich die Chromosomen voneinander. Die Diakinese leitet mit Auflösung der Kernmembran über zur Metaphase I, diese erfolgt, ebenso wie die Anaphase und Telophase, sehr rasch. Damit ist die 1. Reifeteilung vollendet, und es sind die Spermatozyten 2. Ordnung (sekundäre Spermatozyten) mit haploidem Chromosomensatz, aber zwei Chromatiden entstanden ($1n2C$). Diese treten nach einer kurzen Interphase ohne DNA-Reduplikation in die 2. meiotische Teilung ein, wobei die beiden Chromatiden jedes Chromosoms auf die beiden Tochterzellen (Spermatiden) verteilt werden. Mit Bildung der Spermatiden ($1n1C$) ist der Prozess der Zellvermehrung abgeschlossen. Nun folgt die Spermiogenese, in der sich die Spermatiden zu reifen Spermatozoen ausdifferenzieren. Zuerst findet die Golgiphase statt, bei der ein akrosomales Vesikel aus fusionierten Lysosomen entsteht. Darauf folgt die Kappenphase, in der sich das Bläschen abflacht und auf dem Zellkern als akrosomale Kappe auflagert. Gleichzeitig starten die Kondensierung des Zellkerns und die Entwicklung des Flagellums. In der anschließenden Akrosomenphase findet eine erste Differenzierung des Akrosoms statt, welches hydrolytische Enzyme enthält, die das spätere Eindringen in die Zona pellucida der Eizelle ermöglichen. In dieser Phase erfolgt zudem eine Elongation des Zellkörpers und -kerns. In der abschließenden Reifungsphase erhalten das Akrosom und der Spermienkopf ihre

artspezifische Form, und der Residualkörper wird abgeschnürt. Am Ende des Differenzierungsprozesses entstehen elongierte Spermatisden, die in das Lumen des Keimtubulus abgegeben werden (Spermiation) und dann als Spermatozoen oder Spermien bezeichnet werden (Hoffmann 2003, Liebich 2003, Bergmann 2006, Hess und de Franca 2008, Weinbauer et al. 2009).

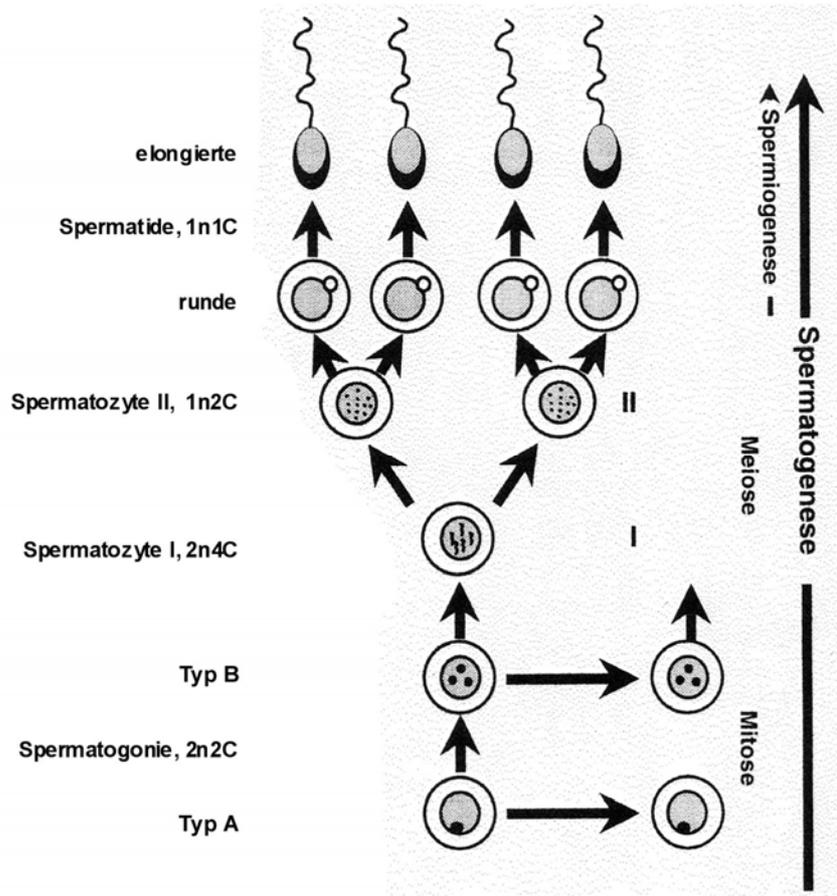


Abb. 1 Schematische Darstellung der Spermatogenese.

Zunächst teilt sich eine Typ A Stammspermatogonie in zwei Tochterzellen. Während die eine dieser Tochterzellen als Stammzelle verbleibt, differenziert sich die andere nach weiteren mehrfachen mitotischen Teilungen zur Typ B Spermatogonie. Am Ende der Differenzierungsphase wird diese zur tetraploiden primären Spermatozyte und tritt in die Meiose I ein. Nach der ersten Reifeteilung wird die primäre Spermatozyte zur sekundären Spermatozyte und durchläuft die 2. meiotische Teilung. Am Ende der Meiose liegen haploide runde Spermatisden vor. Diese durchlaufen einen morphologischen Umwandlungsprozess (Spermiogenese), bei dem am Ende reife Spermatozoen in das Tubuluslumen entlassen werden (Spermiation) (Bergmann 2006, modifiziert).

2.1.1.3 Kinetik der Spermatogenese

Der Spermatogenesezyklus (von den Mitosen der Spermatogonien bis zur Ablösung der Spermien) läuft in den Samenkanälchen nicht überall synchron ab, denn entlang eines Tubulus beginnen die Spermatogonien mit ihren Teilungen zeitlich versetzt. Die dadurch entstehenden unterschiedlichen Zellassoziationen repräsentieren jeweils ein Stadium des Keimepithels. Hervorgerufen werden diese typischen Zell-

verbände vor allem durch die verschiedenen Entwicklungsstufen und die Lage der Spermatozoen bei der Transformation. Die zeitliche Abfolge aller Stadien wird als Keimepithelzyklus bezeichnet. Die Anzahl der Stadien variiert dabei zwischen den Spezies. Beim Menschen wird der Keimepithelzyklus in sechs Stadien (I-VI) unterteilt. Aufgrund der Kernmorphologie der Spermatozoen und der Farbreaktion der Spermatozoidkerne auf PAS ist die Differenzierung dieser Zellen zusätzlich noch in acht Stufen (1-8) unterteilt. In Mäusen setzt sich der Keimepithelzyklus aus zwölf Stadien (I-XII) zusammen, während die Differenzierung der Spermatozoen in 16 Stufen (1-16) unterteilt ist (Abb. 2) (Clermont 1972, Brehm und Steger 2005, Schnorr und Kressin 2006, Hess und de Franca 2008, Weinbauer et al. 2009).

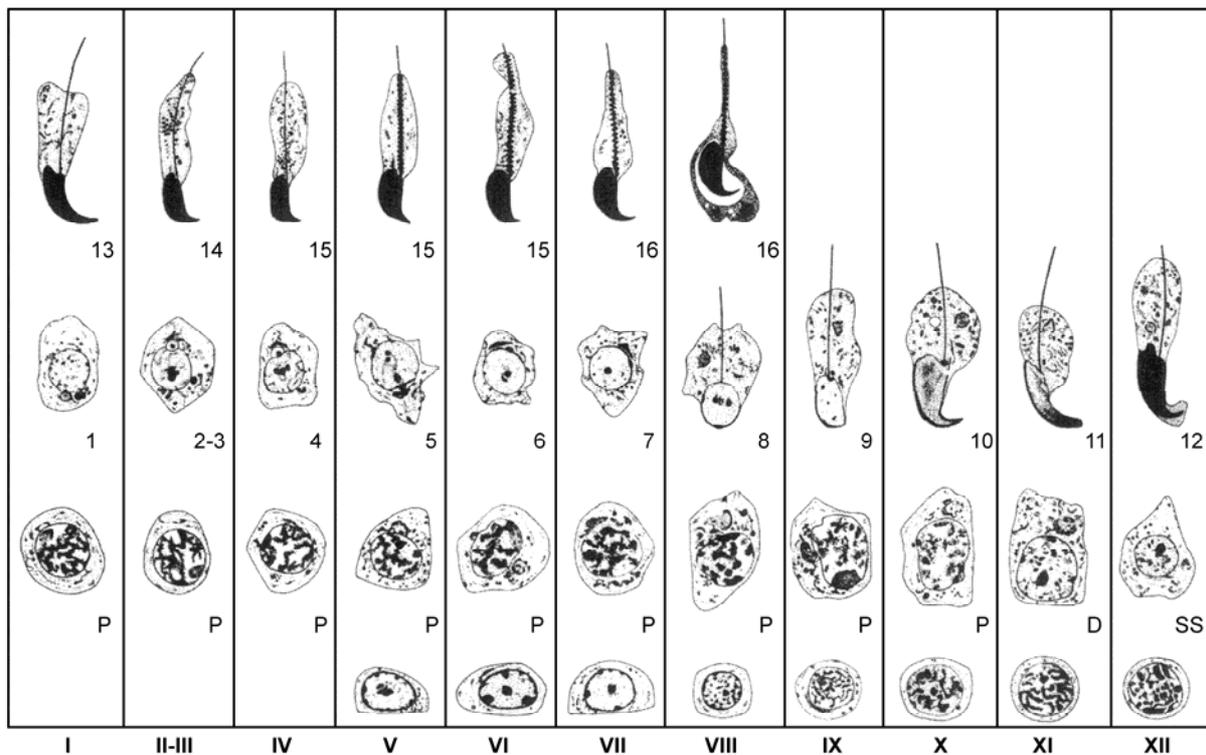


Abb. 2 Keimepithelzyklus und Differenzierung der Spermatozoen in der Maus

Bei der Maus setzt sich der Keimepithelzyklus aus 12 Stadien (I-XII) zusammen, während die Differenzierung der Spermatozoen in 16 Stufen (1-16) unterteilt ist (Brehm und Steger 2005).

Neben der zeitlichen Abfolge der Stadien existiert auch eine räumliche Abfolge. Während im Tubulusquerschnitt von Säugetierhoden grundsätzlich nur ein Stadium anzutreffen ist, folgen im Tubuluslängsschnitt die einzelnen Stadien bzw. die typischen Zellverbände wellenartig aufeinander. Dieser Sachverhalt wird als Welle der Spermatogenese bezeichnet. Im menschlichen Hoden und in Teilbereichen der Hoden verschiedener Affen werden jedoch auch pro Tubulusquerschnitt mehrere

Stadien identifiziert. Hintergrund ist hier die helikale Anordnung der Tubuli, und je enger die Windungen der Helix, umso mehr Stadien werden im Horizontalschnitt angetroffen und umgekehrt (Clermont 1972, Brehm und Steger 2005, Schnorr und Kressin 2006, Weinbauer et al. 2009).

2.1.1.4 Hormonelle Regulation der Spermatogenese

Die Regulation der Spermatogenese über Hormone (Abb. 3) ist als ein endokriner Regelkreis mit einem negativen Rückkopplungsmechanismus unter Einbeziehung des Hypothalamus, des Hypophysenvorderlappens (Adenohypophyse) und der Hoden organisiert. Neuroendokrine Zellen des Hypothalamus produzieren das Peptidhormon GnRH, welches im Hypophysenvorderlappen dann die Sekretion von FSH und LH stimuliert. Im Hoden bindet LH an entsprechende Rezeptoren der Leydig Zellen und stimuliert so die Produktion von Testosteron, welches negativ-rückkoppelnd auf den Hypothalamus und die Hypophyse wirkt. In SZ übt das Testosteron seine Funktion über den AR aus, der im Zellkern als ligandaktivierter Transkriptionsfaktor fungiert. Im Hoden konnten AR bisher in SZ, peritubulären Zellen und Leydig Zellen selbst, nicht aber in KZ nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass die Androgenwirkungen auf die KZ auf parakrinem Weg durch die AR-positiven SZ vermittelt werden. FSH bindet an Rezeptoren in den SZ und stimuliert die Produktion von ABP, welches Androgene mit einer hohen Affinität bindet. ABP wird von den SZ in das umliegende Keimepithel und in das Tubuluslumen abgegeben. Offensichtlich ermöglicht es so den Übertritt von Testosteron in die Tubuli seminiferi und dient der lokalen Anreicherung von Androgenen im Keimepithel. Zudem gelangt ABP-gebundenes Testosteron mit der Tubulusflüssigkeit und reifen Spermien in den Nebenhodenkopf. SZ produzieren darüber hinaus noch die beiden Hormone Inhibin und Aktivin. Inhibin agiert dabei an der Adenohypophyse als selektiver Hemmer der FSH-Freisetzung, Aktivin führt zu einer vermehrten Ausschüttung von FSH (Hoffmann 2003, Holdcraft und Braun 2004, Brehm und Steger 2005, Weinbauer et al. 2009).

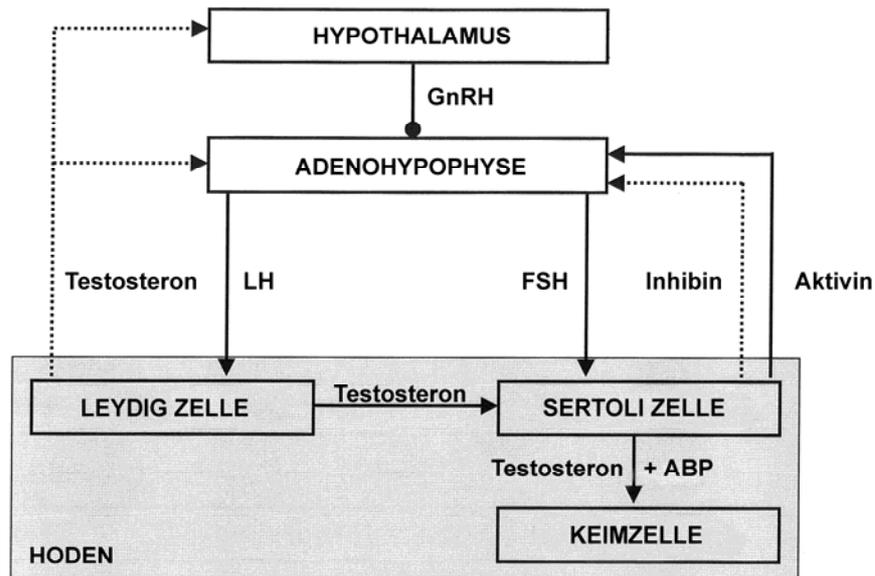


Abb. 3 Hormonelle Regulation der Spermatogenese

.....▶ = negative Rückkopplung, —▶ = positive/r Rückkopplung/Effekt, GnRH = Gonadotropin-Releasing-Hormon, LH = Luteinisierendes Hormon, FSH = Follikelstimulierendes Hormon, ABP = Androgen-bindendes Protein (Brehm und Steger 2005, modifiziert).

2.1.2 Sertoli Zellen

Bei allen Säugetieren treten im Keimepithel neben der KZ-Population auch somatische „Nicht-KZ-Elemente“ auf, die als SZ oder Stützzellen bezeichnet werden.

2.1.2.1 Ursprung

Der Ursprung der somatischen SZ wird auch heute noch kontrovers diskutiert. Zum einen wird die Ansicht vertreten, dass SZ aus dem Zölomepithel entstammen und somit epithelialen Ursprungs sind; andere sehen sie als mesenchymale Zellen mit Ursprung in der Urniere (Mesonephros), und Dritte wiederum sehen ihre Ursprünge sowohl im Zölomepithel als auch im Mesonephros (eine Übersicht liefert: Byskov 1986). Für SZ der Maus konnte allerdings in einer Studie von Karl und Capel (1998) nachgewiesen werden, dass diese Zellen epithelialen Ursprungs sind, also aus dem Zölomepithel entstammen und während der Entwicklung in die Hodenanlage einwandern. Es ist durchaus denkbar, dass dies auch auf SZ anderer Spezies zutrifft.

2.1.2.2 Funktionen und Eigenschaften

SZ spielen eine zentrale Rolle in der testikulären Entwicklung und folglich in der Entstehung des männlichen Phänotyps (Sharpe et al. 2003). So exprimieren sie embryonal zum einen das SRY-Gen für die Geschlechtsbestimmung und zum anderen das AMH für die Rückbildung der Müller'schen Gänge, welche die Anlagen

für den Uterus, die Eileiter und das Vaginadach darstellen (Goodfellow und Lovell-Badge 1993, Mackay 2000, Josso et al. 2001). Während der Pubertät allerdings, und zwar einhergehend mit der Ausdifferenzierung von SZ, wandeln sich auch deren Funktionen. SZ übernehmen nun Aufgaben, die vor allem der Vermehrung und Differenzierung von KZ dienen (Abb. 4) (Sharpe et al. 2003).

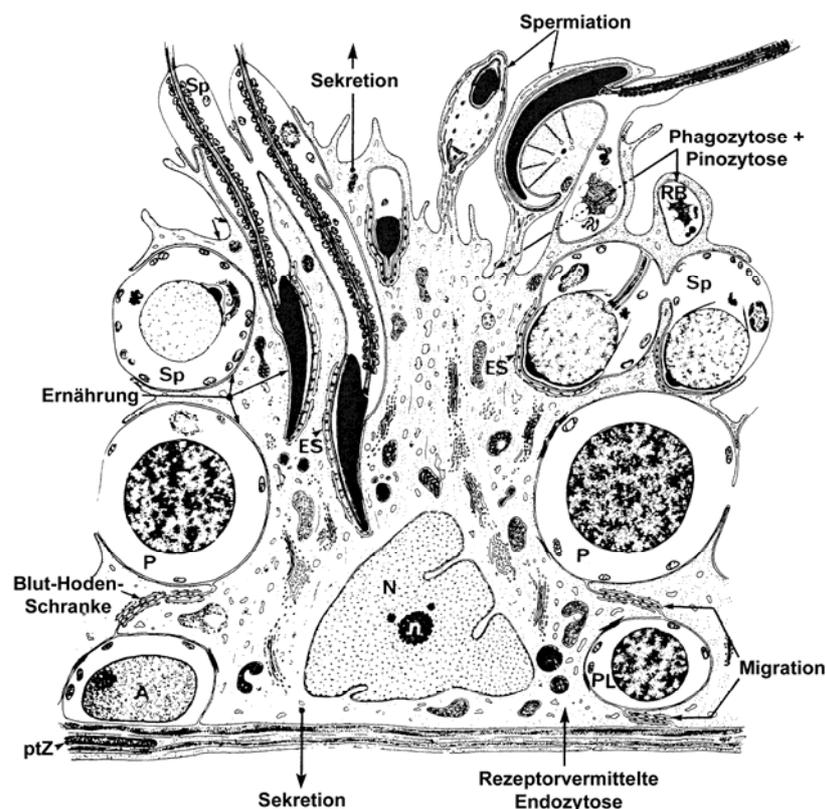


Abb. 4 Aufgaben und Funktionen von adulten SZ

Die SZ sitzen auf der Basalmembran und reichen mit ihrem apikalen Pol bis zum Lumen des Keimtubulus. Entlang ihres Zellkörpers, der sich über die gesamte Höhe des Keimepithels erstreckt, finden die Vermehrungs- und Reifungsphasen der KZ statt. Während dieser Entwicklung wandern die KZ von basal nach apikal und werden letztendlich als reife Spermien in das Tubuluslumen abgegeben. ptZ = peritubuläre Zelle; N = Zellkern und n = Nukleolus einer SZ; A = Spermatogonie; PL = präleptotäne Spermatozyte; P = pachytäne Spermatozyte; Sp = runde & elongierte Spermatiden; RB = Residualkörper; ES = ektoplasmatische Spezialisierungen (Clermont 1993, modifiziert).

Bildung der BHS

Während der Pubertät und mit Beginn der ersten Meiose der KZ sowie dem Proliferationsarrest der SZ bilden Letztere die so genannte BHS aus. Durch Zonulae occludentes bzw. Tight Junctions verbinden sich benachbarte SZ in ihrem basalen Drittel miteinander. Diese Zell-zu-Zell-Verbindungen verschließen den Interzellularspalt nahezu vollständig und stellen so eine effektive Diffusionsbarriere dar. Durch die BHS wird das Keimepithel in zwei Abschnitte unterteilt, im basalen Kompartiment

befinden sich die Spermatogonien und präleptotänen Spermatozyten 1. Ordnung und im adluminalen Kompartiment die weiter fortgeschrittenen und ausgereiften KZ-Stadien (Dym und Fawcett 1970, Weinbauer et al. 2009). Bei der BHS handelt es sich um eine sehr dynamische Struktur, da sie einem ständigen Auf- und Abbau unterliegt, und zwar während der Passage von präleptotänen Spermatozyten in das adluminale Kompartiment (eine Übersicht liefern: Mruk und Cheng 2004). Für die BHS werden zwei Hauptfunktionen postuliert: (1) die physikalische Isolierung der haploiden und damit antigenen KZ Populationen, um deren Erkennung durch das körpereigene Immunsystem zu verhindern, und (2) die Bereitstellung eines spezifischen metabolischen Milieus für den Ablauf der Meiose und Spermiogenese (eine Übersicht liefern: Byers et al. 1993). Eine ausgebildete und funktionell intakte BHS ist zudem eine absolute Voraussetzung für die Formation des mit Flüssigkeit gefüllten Tubuluslumens (Russell et al. 1989, Sharpe et al. 2003).

Stützfunktion, Ernährung der KZ und Sekretion

Die somatischen SZ fußen auf der Basalmembran der Keimtubuli und durchziehen das gesamte Keimepithel bis zum Lumen des Tubulus. Mit seitlichen Fortsätzen schieben sie sich zwischen die verschiedenen Generationen der KZ und füllen die Räume zwischen diesen Zellen vollständig aus. Sie übernehmen somit als Stützzellen eine rein mechanische Aufgabe, indem sie als Gerüst der Stabilität der KZ im Keimepithel dienen (Clermont 1993, Liebich 2003, Weinbauer et al. 2009).

Die Ausbildung der BHS und deren Selektivität im Ausschluss von Molekülen bedingt, dass für die im adluminalen Kompartiment lokalisierten KZ kein direkter Zugang zu Metaboliten aus der Peripherie oder aus dem Interstitium besteht. Damit sind die KZ auf eine Versorgung durch die SZ angewiesen. SZ produzieren und sezernieren zudem eine intratubuläre Flüssigkeit und bilden dadurch das Tubuluslumen sowie ein spezielles Mikromilieu für die Entwicklung der KZ im adluminalen Kompartiment und den Transport der Spermien im Lumen. Dieses Mikromilieu wird durch spezifische Sekretionsprodukte in seiner Zusammensetzung beeinflusst. Es ist bekannt, dass SZ neben verschiedenen anorganischen Ionen auch zum Beispiel Inositol, Glutamat, Laktat sowie ABP, Inhibin, Aktivin und einen Plasminogenaktivator synthetisieren. ABP besitzt eine hohe Bindungskapazität für Testosteron und Dihydrotestosteron und dient somit als Träger für Androgene zu den KZ und in den Nebenhoden. Der Plasminogenaktivator, ein Transferrin-like-Protein, bewirkt eine

Steigerung der Beweglichkeit der KZ und Inhibin dient als negatives Feedbacksignal zur Regulation der FSH-Sekretion (Griswold 1993a, Liebich 2003, Weinbauer et al. 2009).

Fähigkeit zur Phagozytose

SZ sind in der Lage, degenerierte KZ zu phagozytieren. Insbesondere werden Zytoplasmaresten reifer Spermatozoen nach der Spermienabgabe von SZ aufgenommen und mit Hilfe ihrer Lysosomen abgebaut (Liebich 2003).

Intraepitheliale Migration der KZ und Spermiation

Da die KZ keine Möglichkeit haben, sich selbstständig zu bewegen, wird der Transport dieser Zellen im Keimepithel mit Hilfe der SZ bewerkstelligt. Die Abgabe der Spermatozoen in das Tubuluslumen (Spermiation) ist ein komplexer Vorgang. Er beginnt nach Lösung der tubulobulbären Komplexe zwischen den SZ und dem Spermatozoidkopf (Russell 1993, Liebich 2003).

2.1.2.3 Proliferation und Differenzierung

Die Entwicklung von SZ setzt sich aus zwei Phasen zusammen: Proliferation und Differenzierung. In Mäusehoden beginnt die Proliferation der SZ früh in der fetalen Entwicklungsphase, erreicht dort ihren Höhepunkt, setzt sich postnatal fort und wird während der Pubertät bzw. zwischen der zweiten und dritten Lebenswoche ganz abgeschaltet (Kluin et al. 1984, Vergouwen et al. 1991). Letzteres geht mit einer Ausdifferenzierung der SZ einher und resultiert in einer radikalen Änderung in der Morphologie und Funktion dieser Zellen. Sobald die Proliferation beendet und die Differenzierung vollständig ist, nehmen die SZ zudem unter normalen Bedingungen ihre Proliferationsaktivität nicht wieder auf (Sharpe et al. 2003). Diese kann somit als ein Marker für unreife SZ verwendet werden. Die Differenzierung von SZ während der Pubertät beinhaltet unter anderem folgende strukturelle und funktionelle Änderungen, die als Marker für mature SZ herangezogen werden können: (1) die Zunahme ihrer Zellgröße, (2) die Ausbildung ihrer Stadien-spezifischen hochprismatischen Zellform, (3) die Entwicklung von zahlreichen zytoplasmatischen Fortsätzen zwischen den differenzierenden KZ, (4) der Wechsel von einem mehr zentral lokalisierten Zellkern mit mehreren kleinen Nukleoli zu einem basal lokalisierten Kern mit dem typischen dreigeteilten Nukleolus, (5) die Bildung der BHS

und (6) des Tubuluslumens, (7) das Ende ihrer mitotischen Zellteilungen und (8) der Verlust oder Gewinn der Expression verschiedener Proteine (eine Übersicht liefern: Gondos und Berndston 1993).

2.1.2.4 Regulation der Proliferation und Differenzierung

Die Mechanismen und chemischen Faktoren, die an der Regulierung der Proliferation und Differenzierung von SZ beteiligt sind, wurden bereits in zahlreichen Studien untersucht, sind bis dato aber noch nicht vollständig aufgeklärt. Zu den wichtigsten Hormonen, die direkten Einfluss auf die Entwicklung von SZ nehmen, gehören FSH, Testosteron und T3. Beispielsweise konnte nachgewiesen werden, dass FSH die Proliferationsrate von SZ erhöht, die Hormone Testosteron und T3 hingegen deren Unterdrückung bewirken (eine Übersicht liefern: Gondos und Berndston 1993, Griswold 1993b, Pelliniemi et al. 1993, Buzzard et al. 2003). Aber auch andere Hormone, Wachstumsfaktoren, Metalloproteine, Vitamine und parakrine Faktoren sowie Zellen (Leydig Zellen, peritubuläre Zellen, KZ) können auf direktem oder indirektem Wege für die Entwicklung von SZ und den Erhalt ihrer verschiedenen Funktionen verantwortlich gemacht werden (Skinner 1993a, b, Griswold 1993b).

2.1.2.5 Biochemische Differenzierungsmarker und Zell-spezifische Marker

Die Expressionsmuster bestimmter Proteine können Aufschluss über eine korrekte oder eventuell gestörte Umwandlung von unreifen in funktionell reife SZ geben. Auch kann mit Hilfe dieser Proteine eine mögliche primäre Unreife oder sekundäre Dedifferenzierung von SZ aufgedeckt werden. Nachfolgend sind diejenigen Proteine näher beschrieben, die in dieser Arbeit als Differenzierungsmarker für SZ verwendet wurden. Darüber hinaus kamen im Rahmen der Erforschung der intratubulären Zellcluster einige dieser Proteine als Zell-spezifische Marker zum Einsatz, wie z. B. GATA-1, welches im Keimepithel nur von SZ nicht aber von KZ exprimiert wird.

Vimentin

Vimentin gehört zu den so genannten Intermediärfilamenten, die zusammen mit den Aktinfilamenten und den Mikrotubuli das Zytoskelett eukaryotischer Zellen bilden. Mit einem Durchmesser von ungefähr 10 nm sind Intermediärfilamente zwischen den Aktinfilamenten (5-9 nm) und Mikrotubuli (25 nm) einzuordnen, daher auch der Name Intermediärfilament (Alberts et al. 2003).

Im Zytoplasma von SZ wird Vimentin während aller Phasen der Entwicklung exprimiert und repräsentiert damit einen stabilen Marker für diese Zellen (Brehm und Steger 2005). In SZ der Maus konnte Vimentin erstmals am 13. Tag p. c. nachgewiesen werden. In unreifen SZ konzentrieren sich die Filamente zunächst nur im basalen Bereich des Zytoplasmas (Kanai et al. 1992). In typischen reifen SZ (Abb. 5) sind die Vimentinfilamente rund um den basal gelegenen Zellkern versammelt. Zusätzlich ziehen von dieser perinukleären Lage Filamentbündel in Richtung Zelloberfläche (Amlani und Vogl 1988, Wayne Vogl et al. 1993). Im Hoden konnte eine Expression von Vimentin zudem im Zytoplasma von Endothel-, Leydig und peritubulären Zellen demonstriert werden (Aumüller et al. 1992).

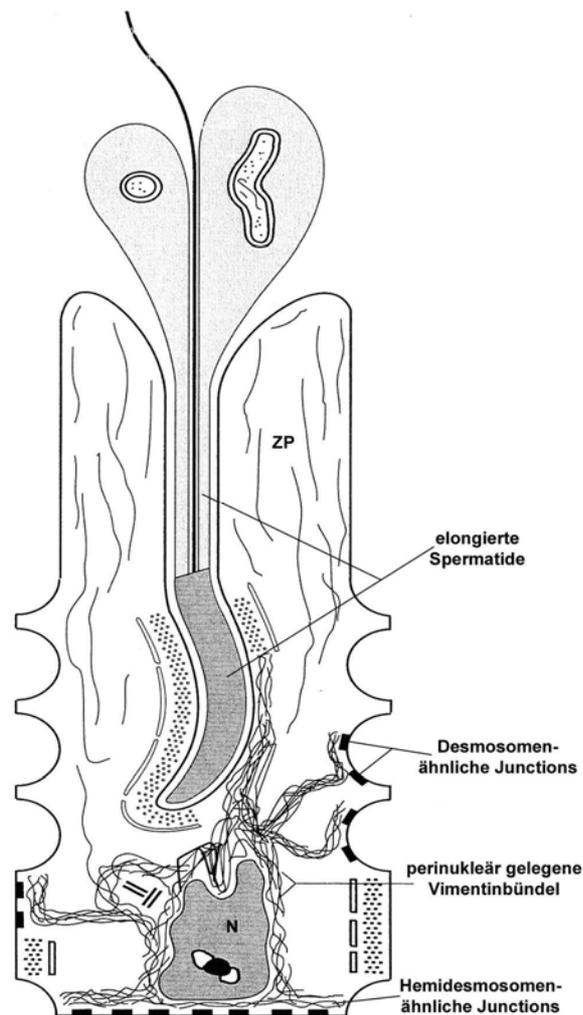


Abb. 5 Verteilung von Vimentinfilamenten in typischen adulten SZ.

Über Desmosomen-ähnliche Junctions sind die Vimentinbündel mit benachbarten SZ und frühen KZ assoziiert. Weitere Verknüpfungen bestehen über ektoplastische Spezialisierungen mit apikalen Invaginationen, die elongierte Spermatozyten enthalten, und über Hemidesmosomen-ähnliche Junctions mit der extrazellulären Matrix im Bereich der Zellbasis. N = Zellkern und ZP = Zytoplasma einer SZ (Wayne Vogl et al. 1993, modifiziert).

AMH

Das AMH, auch bezeichnet als Müllerian inhibiting substance, ist ein zur TGF- β -Familie gehörendes Glykoprotein (Cate et al. 1986, Pepinsky et al. 1988). Im männlichen Säugetier wird das AMH von unreifen SZ gebildet, seine Expression im Zytoplasma startet dabei früh embryonal, und zwar mit Beginn der gonadalen Organogenese und persistiert bis zur Pubertät, ist also in adulten SZ nicht mehr nachweisbar (Tran et al. 1987, Münsterberg und Lovell-Badge 1991, Rey et al. 1996, Steger et al. 1996, Rajpert-De Meyts et al. 1999, Steger et al. 1999b, Josso et al. 2001, Tan et al. 2005). Dadurch, dass die Expression während der Pubertät abgeschaltet wird, kann AMH als ein Marker für immature SZ herangezogen werden.

In fetalen Hoden von Mäusen beginnt die Proteinexpression von AMH um den 12. Tag p. c. (Beau et al. 2001). Das Maximum der Expression wird bereits einen halben Tag später erreicht (Beau et al. 2001) und bleibt bis einige Tage nach der Geburt bzw. bis zur Pubertät annähernd konstant, sinkt dann ab und wird schließlich zwischen der 2. und 3. Lebenswoche ganz abgeschaltet (Münsterberg und Lovell-Badge 1991). Al-Attar et al. (1997) zeigten in ihrer Studie, dass sich das Serum-AMH in postnatalen Mäusen bis zum 6. Lebenstag auf dem höchsten Level befindet, zwischen dem 7. und 13. Lebenstag signifikant absinkt und ab dem 15. Lebenstag nicht mehr nachweisbar ist. Die von ihnen untersuchten mRNA-Level für AMH zeigten ein ähnliches Muster.

Die Hauptaufgabe des AMH im männlichen Säuger liegt in der Rückbildung der Müller'schen Gänge, welche die Anlagen für den Uterus, die Eileiter und das Vaginadach repräsentieren (Josso et al. 1993). Obwohl diese Rückbildung bereits in der frühen Phase der Fetalentwicklung erfolgt und auch abgeschlossen wird, kann das AMH in hohen Konzentrationen im Serum bis zur Pubertät gefunden werden (Rey et al. 1993, Al-Attar et al. 1997). Dies spricht für zusätzliche Funktionen von AMH, wie die Teilnahme an der Kontrolle der Leydig Zell-Proliferation und Androgensynthese (Behringer et al. 1994, Rouiller-Fabre et al. 1998).

Die Herunterregulierung der AMH-Expression in den SZ zum Zeitpunkt der Pubertät wird mit der funktionellen Aktivierung ihres AR, mit steigenden Androgenkonzentrationen im Hoden sowie mit dem Eintritt der KZ in die Meiose in Verbindung

gebracht (Rey et al. 1994, Al-Attar et al. 1997, Rajpert-De Meyts et al. 1999). Darüber hinaus scheint der Transkriptionsfaktor GATA-1 ein potentieller Repressor der AMH-Genexpression zu sein (Beau et al. 2001).

AR

Die biologischen Effekte von Androgenen, wie Testosteron oder Dihydrotestosteron, werden überwiegend durch den AR vermittelt. Der AR ist ein X-Chromosom-kodiertes Mitglied der Steroidhormonrezeptor-Superfamilie, eine Klasse von Kernrezeptoren, die hauptsächlich als Ligand-aktivierte Transkriptionsfaktoren agieren. Die Fähigkeit des AR, die Transkription bestimmter Gene zu regulieren, erfolgt durch seine Interaktion mit spezifischen DNA-Sequenzen in der Nähe oder innerhalb des Zielgen-Promotors (Chang et al. 1995, Heinlein und Chang 2002).

Die Expression des AR im Zellkern ist eine typische Eigenschaft von reifen SZ, auch wenn in adulten Ratten (Bremner et al. 1994), Mäusen (Tan et al. 2005) und Menschen (Suárez-Quian et al. 1999) eine stadienabhängige Expression nachgewiesen werden konnte. Zudem erfolgt die Anschaltung der AR-Expression in SZ verschiedener Spezies bereits während der Pubertät, zeigt sich also auch schon in noch unreifen SZ. Im fetalen und frühen postnatalen Zeitraum findet sich allerdings keine AR-Expression in SZ-Kernen verschiedener Spezies (Bremner et al. 1994, Williams et al. 2001, Kelnar et al. 2002, Tan et al. 2005). Dadurch, dass die Expression für den AR während der Pubertät angeschaltet wird, kann dieser als ein Marker für sich ausdifferenzierende und mature SZ herangezogen werden.

In den SZ der Maus konnte der AR mittels IHC nicht vor dem 4. Tag nach der Geburt detektiert werden. Während ab dem 7. Tag zunächst nur einige wenige SZ über den AR verfügen, erhöht sich zeitgleich mit der pubertären Entwicklung auch die Anzahl der AR-positiven SZ. Zudem zeigte sich postnatal in allen Leydig und peritubulären Zellkernen eine einheitliche AR-Immunreaktion (Al-Attar et al. 1997, Tan et al. 2005).

GATA-1

GATA-1 gehört zur Familie der GATA-Transkriptionsfaktoren, die eine bedeutende Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von Zellen spielen. Bei Vertebraten werden derzeit sechs GATAs unterschieden, die in einer Vielzahl von Geweben

exprimiert werden. Die Bezeichnung GATA rührt daher, dass diese Faktoren an die DNA-Konsensussequenz (A/T)GATA(A/G) binden (Lowry und Atchley 2000). Basierend auf ihrer Sequenzhomologie und ihrem Expressionsmuster werden die GATA-Proteine in zwei Subfamilien unterteilt: GATA-1, -2 und -3 bilden die erste Unterfamilie und haben wesentliche Funktionen während der Entwicklung und Genregulation der Hämatopoese, d. h., sie werden vor allem in Zellen hämatopoetischer Abstammung exprimiert (Weiss und Orkin 1995). GATA-4, -5 und -6 repräsentieren die zweite Unterfamilie und sind primär an der Entwicklung und Differenzierung des Endo- und Mesoderms beteiligt und somit für die Entwicklung und Funktion von Herz, Darm, Lunge und Gonaden essenziell (Molkentin 2000).

Der Transkriptionsfaktor GATA-1 wird in erythroiden Zellen (Leonard et al. 1993, Fujiwara et al. 1996), Megakaryozyten (Martin und Orkin 1990, Romeo et al. 1990), Eosinophilen (Zon et al. 1993) und Mastzellen (Martin und Orkin 1990) exprimiert. Aber auch außerhalb des hämatopoetischen Systems wird GATA-1 gebildet, und zwar in SZ des Hodens (Ito et al. 1993, Yomogida et al. 1994). Yomogida et al. (1994) zeigten in ihrer Studie, dass in SZ von Mäusen die Expression des GATA-1-Proteins zeitgleich mit der ersten Spermatogenesewelle und dem Beginn der SZ-Differenzierung induziert wird, d. h., sie fanden erste GATA-1-positive SZ-Kerne am Tag 7 p. p. In ihren Untersuchungen kamen sie zudem zu dem Ergebnis, dass anfangs, sprich während der pubertären Hodenentwicklung, das GATA-1-Protein in SZ-Kernen aller Tubuli nachweisbar ist, in Hoden adulter Mäuse jedoch nur noch in Tubuli mit den Spermatogenesestadien VII bis IX. Als eine mögliche Ursache hierfür geben sie eine Unterdrückung der GATA-1-Expression durch negative Feedbacksignale bestimmter KZ-Typen an. Dadurch, dass die Expression für GATA-1 während der Pubertät angeschaltet wird, kann es, wie der AR, als ein Marker für sich ausdifferenzierende und mature SZ herangezogen werden.

3 β -HSD

Das Isoenzym 3 β -HSD ist essentiell für die Biosynthese von allen aktiven Steroidhormonen, wie den Gluco- und Mineralcorticoiden, Östrogenen und Androgenen. Es ist verantwortlich für die Oxidation und Isomerisierung der Δ^5 -3 β -Hydroxysteroid-Vorläufer in Δ^4 -Ketosteroide. Im Mausgenom konnten bis heute sechs verschiedene Isoformen für 3 β -HSD identifiziert werden, die Gewebe- und Entwicklungs-spezifisch

exprimiert werden. Im Hoden wird 3 β -HSD ausschließlich von Leydig Zellen gebildet und kann somit dort als Leydig Zell-spezifischer Marker eingesetzt werden. Immunhistochemisch lässt sich dieses Protein im Zytoplasma von Leydig Zellen nachweisen (eine Übersicht liefern Payne et al. 1995, 1997, Simard et al. 2005).

Ki-67

Bei Ki-67 handelt es sich um ein Protein, das Anfang der 80er Jahre von Gerdes et al. (1983) entdeckt und genauer erforscht wurde. Der Name steht für die Stadt Kiel, in der das Protein entdeckt wurde, und für die Nummer des Zellklons, der letztendlich den Antikörper gegen Ki-67 produziert hat (Gerdes et al. 1983, 1984). Das Ki-67-Protein wird in allen Zellen während der aktiven Phasen (G₁, S, G₂ und M), nicht jedoch während der Ruhephase (G₀) des Zellzyklus exprimiert und kann damit als Proliferationsmarker genutzt werden (Gerdes et al. 1984, Scholzen und Gerdes 2000). Das Expressionsmuster von Ki-67 beschränkt sich auf den Zellkern, das Protein kann aber auch, beispielsweise während der Mitose, im Zytoplasma vorkommen. Auch wenn Ki-67 bereits seit Jahren und weit verbreitet als Proliferationsmarker eingesetzt wird, so ist seine genaue Funktion noch nicht geklärt. Es gibt Hinweise, dass die Proteinexpression von Ki-67 eine absolute Voraussetzung für die Aufrechterhaltung des Zellzyklus ist (Scholzen und Gerdes 2000).

2.1.2.6 Veränderte Differenzierung bei testikulären Störungen

In der Vergangenheit haben verschiedene Studien an Hodengewebe von Menschen und Nagern gezeigt, dass testikuläre Störungen (wie SCO-Syndrom oder CIS) in bestimmten Fällen mit einer beeinträchtigten Differenzierung und/oder Proliferation von SZ einhergehen (Bergmann und Kliesch 1994, Rogatsch et al. 1996, Steger et al. 1996, Kliesch et al. 1998, Raymond et al. 2000, Brehm et al. 2002, Maymon et al. 2002, Myers et al. 2005).

Bergmann und Kliesch (1994) sowie Steger et al. (1996) untersuchten den Differenzierungsstatus von SZ mit Hilfe von Markerproteinen in Hodenbiopsaten infertiler Männer. SZ in Tubuli mit einem Spermatogenese-arrest oder mit SCO-Syndrom zeigten sich immunpositiv für AMH und/oder für Cytokeratin 18. Bei Cytokeratin 18 handelt es sich, ebenso wie bei AMH, um einen Marker für unreife SZ. Die Expression in adulten Hoden zeigt somit eine fehlende SZ-Differenzierung auf. Ähnliche Resultate konnten an Hodenbiopsaten von Patienten mit Azoospermie

erzielt werden (Maymon et al. 2002). In mit präinvasiven CIS-Zellen infiltrierten Hoden von adulten Männern konnten ebenfalls SZ von einem immaturren Phänotyp nachgewiesen werden, da diese eine Reexpression von Cytokeratin 18 zeigten (Rogatsch et al. 1996, Kliesch et al. 1998, Brehm et al. 2002).

Hypogonadale Mäuse mit einer Deletion des GnRH-Gens zeigten, neben einem Arrest der Spermatogenese auf der Stufe der primären Spermatozyten, eine deutlich reduzierte SZ-Zahl und SZ-Reifungsdefekte in Form einer unvollständig ausgebildeten BHS (Myers et al. 2005). In adulten Hoden von konstitutiven Dmrt1KO-Mäusen, mit einem vollständigen Verlust von KZ, konnten Raymond et al. (2000) ebenfalls SZ mit Reifungsdefekten nachweisen. So offenbarten adulte Dmrt1-defiziente SZ unreife Eigenschaften, wie einen permanent proliferativen Status, eine immature Morphologie und keine Lumenbildung in den Keimtubuli. Darüber hinaus zeigten diese SZ eine verzögerte und reduzierte GATA-1-Expression.

Unter anderem wird angenommen, dass das Ausbleiben einer funktionellen Reifung von SZ Einfluss auf ihre Fähigkeit nimmt, das Überleben der KZ im postnatalen Hoden zu sichern und die KZ-Entwicklung zu unterstützen, und es infolgedessen zu einer gestörten Spermatogenese kommt. Umgekehrt wird in bestimmten Fällen vermutet, dass die Abwesenheit von meiotischen und postmeiotischen KZ zu sekundären Veränderungen in SZ führen kann, die sich in immaturren Eigenschaften äußern (Sharpe et al. 2003). Es gibt jedoch auch einige Studien, die zeigen, dass das Fehlen von bestimmten KZ nicht unweigerlich eine Ausbildung von unreifen SZ bedingt (Handel und Eppig 1979, Rajpert-de Meyts et al. 1999, Blagosklonova et al. 2002).

Handel und Eppig (1979) untersuchten den Differenzierungsstatus von SZ in Hoden von zwei mutanten Mauslinien mit einem genetisch bedingten Verlust von KZ. Sie konnten zeigen, dass diese transgenen Mäuse trotz der Abwesenheit von KZ auf ultrastruktureller Ebene normale adulte SZ entwickeln. Neben dem dreigeteilten Nukleolus kam es zur Ausbildung der BHS und des Tubuluslumens.

In Männern mit Azoospermie, entweder mit einer idiopathischen Abwesenheit von KZ (Rajpert-de Meyts et al. 1999) oder verknüpft mit Y-Chromosom-Mikrodeletionen (Blagosklonova et al. 2002), zeigte sich ebenfalls keine Veränderung im SZ-Differenzierungsstatus, zumindest auf immunhistochemischer Ebene. In beiden Studien konnte ein Verlust von AMH und M2A in adulten SZ nachgewiesen werden.

Das M2A-Antigen stellt, ebenso wie AMH, einen Marker für unreife SZ dar, da es in SZ nur bis zur Pubertät exprimiert wird (Sharpe et al. 2003).

2.2 Gap Junctions und Connexine

Zur Aufrechterhaltung der Funktion eines mehrzelligen Organismus ist die Kommunikation zwischen einzelnen Zellen essenziell. Diese kann dabei über verschiedene Mechanismen vermittelt werden, auf direktem Wege aber „sprechen“ Zellen nur über so genannte GJ-Kanäle miteinander.

2.2.1 Aufbau und Funktionen von Gap Junction-Kanälen

GJ-Kanäle (Abb. 6) sind spezialisierte Membranstrukturen, die die Zytoplasmata benachbarter Zellen direkt miteinander verbinden und die unmittelbare passive Übertragung von vielen niedermolekularen Stoffen ermöglichen. Bei Säugetieren sind sie in fast allen Zelltypen normaler Gewebe zu finden mit Ausnahme weniger terminal differenzierter Zellen, wie den Spermien, Erythrozyten und Skelettmuskelzellen (Bruzzone et al. 1996a, Kumar und Gilula 1996, Willecke et al. 2002). Diese interzellulären Kanäle können in Ansammlungen von bis zu mehreren tausend auftreten. Ab einer Dichte von ca. 10^4 Kanälen pro μm^2 spricht man von einem GJ-Plaque (Loewenstein 1981). Ein einzelner GJ-Kanal besteht aus zwei Halbkanälen, den Connexonen, wobei jede der beiden beteiligten Zellen einen Halbkanal beisteuert. Diese Halbkanäle wiederum sind jeweils aus sechs Proteinuntereinheiten aufgebaut, den so genannten Cx. Diese lagern sich als Transmembranproteine zu einer ringförmigen Struktur mit einer zentralen hydrophilen Pore zusammen. Im Bereich eines GJ-Kanals wird der Abstand zwischen den benachbarten Zellmembranen von ursprünglich 20 bis 30 nm auf einen kleinen Spalt („gap“) von 2 bis 4 nm verringert (Bruzzone et al. 1996a, Kumar und Gilula 1996).

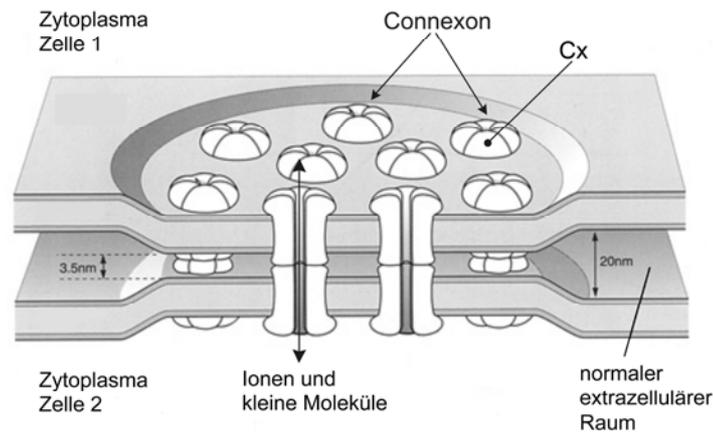


Abb. 6 Aufbau eines GJ-Plaques.

GJ-Kanäle in den Plasmamembranen zweier benachbarter Zellen (Willecke et al. 2002, modifiziert).

Wie aus Abb. 7 ersichtlich, können Connexone aus sechs identischen Cx bestehen und werden dann als homomer bezeichnet. Halbkanäle, die hingegen aus verschiedenen Cx zusammengesetzt sind, werden als heteromer bezeichnet. Ein GJ-Kanal wiederum wird als homotypisch bezeichnet, wenn er aus zwei gleichen Connexonen besteht, und als heterotypisch, wenn er aus zwei unterschiedlichen Halbkanälen aufgebaut ist (Bruzzone et al. 1996a, Kumar und Gilula 1996, Willecke et al. 2002). Nur bestimmte heterotypische Connexone bilden funktionelle GJ-Kanäle aus. So formen Connexone aus Cx43 und Cx26 permeable GJ-Kanäle, Connexone aus Cx43 und Cx32 jedoch nicht (Bruzzone et al. 1996a, Falk et al. 1997). Diese zahlreichen Kombinationsmöglichkeiten aus den verschiedenen Cx und Connexonen ermöglichen, dass GJ-Kanäle spezifische biophysikalische Eigenschaften besitzen und sich z. B. in ihrer Selektivität (Goldberg et al. 1999) und Permeabilität (Kumar und Gilula 1996, Goldberg et al. 1999) für bestimmte Stoffe unterscheiden. Dadurch entsteht ein breites Spektrum an spezifischen Funktionen von GJ-Kanälen innerhalb biologischer Prozesse.

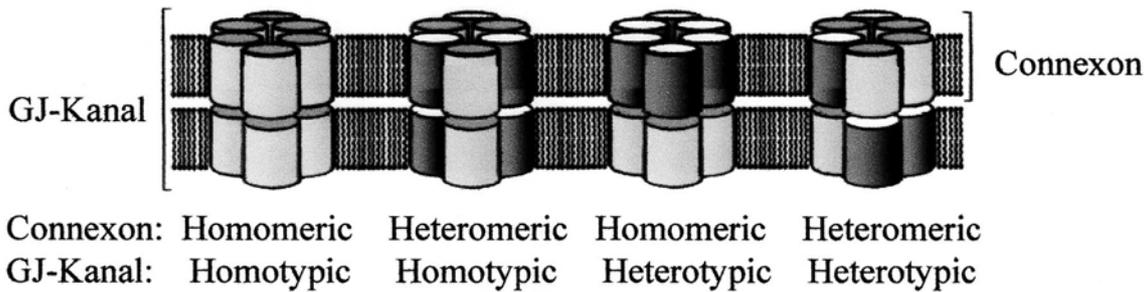


Abb. 7 Cx- und Connexon-Kombinationen in GJ-Kanälen.

Verschiedene Kombinationsmöglichkeiten von Cx und Connexonen in der Zusammensetzung eines GJ-Kanals (Evans und Martin 2002, modifiziert).

GJ-Kanäle sind für die meisten niedermolekularen Stoffe permeabel. Physiologisch wirksame Substanzen bis 1 kDa, wie verschiedene Ionen, kleine Metaboliten (Glukose, Aminosäuren, Nukleotide) und sekundäre Botenstoffe (Ca^{2+} , cAMP, IP_3), aber auch Karzinogene und Morphogene können passiv über GJ-Kanäle direkt von einer Zelle in die nächste gelangen. Dieser Molekülfluss wird auch als GJIC bzw. als GJ-vermittelte interzelluläre Kommunikation bezeichnet und ermöglicht eine metabolische und elektrische Kopplung von Zellen sowie die koordinierte Antwort von gekoppelten Zellen auf Hormone und Wachstumsfaktoren (Bruzzone et al. 1996a, Kumar und Gilula 1996, Risley 2000). Die molekulare Kommunikation über GJ spielt somit eine Rolle bei der Regulation der Proliferation und Differenzierung von Zellen, Apoptose, Aufrechterhaltung der Gewebekomöostase, aber auch Tumorgenese (Vinken et al. 2006, Metha 2007).

2.2.2 Connexine – die Proteine der Gap Junctions

Cx bilden eine Gruppe von Transmembranproteinen mit hoher genetischer Homologie, die man zu einer multigenen Proteinfamilie zusammenfasst (Beyer et al. 1990, Bruzzone et al. 1996a).

2.2.2.1 Nomenklatur

Für die Nomenklatur der Cx-Isoformen existieren zwei alternative Systeme. Bei der von Beyer et al. (1990) vorgeschlagenen und bis dato von den meisten Forschern angewendeten basiert der Name dieser Proteine auf ihrer aus der cDNA-Sequenz abgeleiteten theoretischen Molekülmasse. So besitzt z. B. Cx43 ein Molekulargewicht von 43 kDa. Der Name eines Cx setzt sich dabei aus der Abkürzung „Cx“ und seinem Molekulargewicht zusammen. Die Bezeichnung der Spezies, abgekürzt

oder ausgeschrieben, kann dem Namen vorangestellt werden, so ist hCx43 oder humanCx43 der Name für das menschliche Cx43.

Die alternative Nomenklatur unterteilt die Cx entsprechend dem Grad ihrer Sequenzidentität und der Länge der zytoplasmatischen Schleife in die Gruppen α , β , und γ . Cx werden hier abgekürzt mit „Gj“ für Gap Junction, gefolgt von der Bezeichnung für die Gruppe und einer Zahl, die den Cx einer Gruppe fortlaufend nach dem Zeitpunkt ihrer Entdeckung zugeordnet wurde. Beispielsweise war mCx43 das erste Cx der α -Gruppe und wird folglich mit Gja1 abgekürzt (Söhl und Willecke 2004).

2.2.2.2 Proteinstruktur und Lokalisation

Jedes Cx-Protein (Abb. 8) besteht aus vier Transmembrandomänen (M1 bis M4), zwei extrazellulären Schleifen (E1 und E2) und drei zytoplasmatischen Domänen (N-Terminus, zytoplasmatische Schleife, C-Terminus).

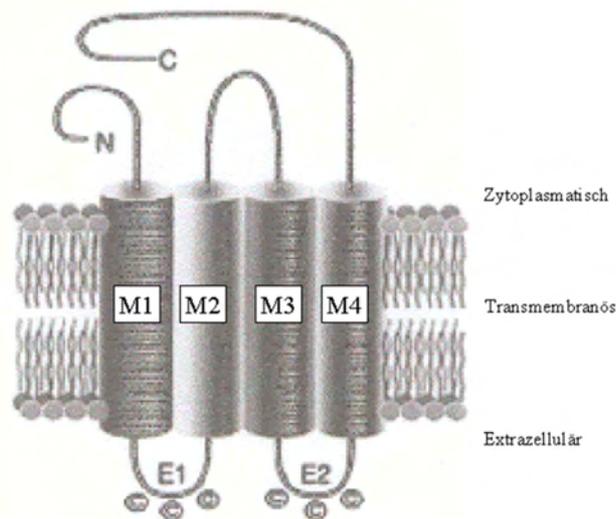


Abb. 8 Proteinstruktur und Lokalisation eines Cx.

M1-M4: Transmembrandomänen; E1-E2: Extrazelluläre Schleifen; N: Amino-Terminus; C: Carboxy-Terminus (Kumar und Gilula 1996, modifiziert).

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 (zwischen M2 und M3) und der C-Terminus die höchste Sequenzvariabilität auf. Verschiedene Längen dieser Regionen bilden die Hauptursache für Größenunterschiede bei den Cx. Diese Domänen sind aber auch deshalb interessant, weil sich hier die Aminosäure-Sequenzen in den einzelnen Cx stark unterscheiden und daher dort deren

funktionelle Unterschiede vermutet werden. Neben der Bedeutung der GJ-Kanäle für den Austausch von Signalmolekülen ist lange bekannt, dass der C-Terminus eine große Rolle bei der intrazellulären Signaltransduktion spielt. Die Domänen M1 bis M4, die die Plasmamembran durchspannen, sind verantwortlich für die Bildung der hydrophilen Pore und die extrazellulären Schleifen für das „Andocken“ der beiden Connexone untereinander zur Ausbildung eines funktionellen GJ-Kanals (Bennett et al. 1991, Bruzzone et al. 1996a, Kumar and Gilula 1996, Willecke et al. 2002, Sáez et al. 2003).

2.2.2.3 Genstruktur und Expression

Gemeinsames Merkmal fast aller Cx ist ihre relativ einfache Genstruktur. Die meisten Cx-Gene setzen sich zusammen aus zwei Exons, wobei dem oft kurzen, untranslatierten ersten Exon ein Intron variabler Länge und dann das zweite Exon folgt, welches sowohl die gesamte kodierende Sequenz als auch verbleibende nichtkodierende Abschnitte enthält (Abb. 9 A). Abweichende Genstrukturen finden sich bis dato nur bei drei Cx: Cx32, Cx36 und Cx45. Bei Cx36 z. B. beinhaltet das Exon 1 bereits einen Teil der kodierenden Sequenz (Abb. 9 B) (Söhl und Willecke 2004).

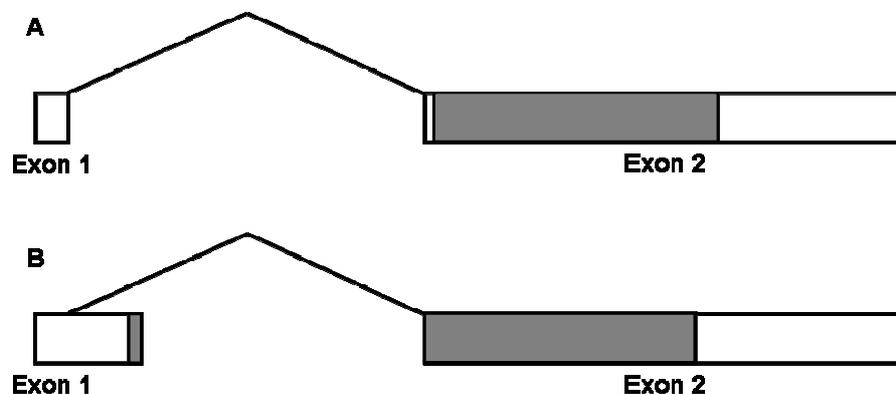


Abb. 9 Struktur von Cx-Genen.

(A) Genstruktur der meisten Cx, so auch von Cx43, mit einem untranslatierten Exon 1, einem Intron variabler Länge und der kodierenden Sequenz (graue Box) auf Exon 2. (B) Genstruktur von z. B. Cx36 mit aufgeteilter kodierender Sequenz auf Exon 1 und Exon 2 (Söhl und Willecke 2004, modifiziert).

Die verschiedenen Mitglieder der Cx-Genfamilie zeigen ein Gewebe- und Zell-spezifisches zeitliches und räumliches Expressionsmuster. Die meisten Gewebe exprimieren dabei mehr als nur ein Mitglied, und selbst eine Zelle kann verschiedene Cx aufweisen (Bruzzone et al. 1996a, b, Kumar und Gilula 1996, Willecke et al. 2002). Es gibt Cx, die in fast allen Organen bzw. Zellen der Körpers exprimiert

werden, hierzu zählt beispielsweise Cx43. Andere Cx, wie das Cx33, wurden bislang nur in Hoden von Mäusen und Ratten gefunden. Bis dato sind 21 verschiedene Cx im menschlichen Genom und 20 Cx in der Maus bekannt (Willecke et al. 2002).

Die Regulation der Expression von Cx ist Zell-spezifisch und kann durch physiologische, aber auch pharmakologische und diätetische Faktoren sowohl auf transkriptionaler als auch auf posttranskriptionaler Ebene beeinflusst werden. Verschiedene Stoffe, wie cAMP, Glukokortikoide, Prostaglandine oder Phorbol ester, bewirken auf transkriptionaler Ebene eine Verstärkung der Transkription und damit eine Erhöhung der entsprechenden mRNA-Levels (Sáez et al. 2003). Beispielsweise zeigten sich in einer *In-vitro*-Studie von Civitelli et al. (1998) nach Inkubation von Osteosarkomzellen mit Prostaglandin E₂ oder Parathormon erhöhte mRNA-Level von Cx43. Auf posttranskriptionaler Ebene hingegen kann die mRNA-Stabilität beeinflusst werden (Sáez et al. 2003). So bewirkte zum Beispiel eine erhöhte cAMP-Konzentration einen erhöhten Level an Cx32-mRNA in Primärkulturen von Hepatozyten der Ratte, und dies ohne messbare Veränderungen in der Transkriptionsrate (Sáez et al. 1989).

2.2.3 Permeabilität von Gap Junction-Kanälen

Der Öffnungszustand und damit die Permeabilität von GJ-Kanälen sind gewebe- und Cx-spezifisch und können durch nicht kovalente (z. B. elektrostatische Interaktionen) oder kovalente Modifikationen (z. B. Phosphorylierungen des C-Terminus) reguliert werden. Zudem kann der Öffnungszustand bzw. die Öffnungswahrscheinlichkeit durch sekundäre Botenstoffe (wie cAMP und IP₃) oder Ionen (wie Ca²⁺, Na⁺ und H⁺) sowie den pH-Wert in Sekunden bis Minuten moduliert werden (Bruzzone et al. 1996a). Beispielsweise kann eine zu hohe intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration (Loewenstein 1981, Sáez et al. 1990, Kumar und Gilula 1996) oder eine Erniedrigung des pH-Werts in der Zelle (Sáez et al. 1990, Bruzzone et al. 1996a) einen Verschluss der GJ-Kanäle bewirken.

Als Mechanismus für die Regulation des Öffnungszustands von GJ-Kanälen werden zwei Modelle diskutiert: Beim Twist- oder Rotationsmodell (Abb. 10) soll eine Drehung der Cx im Uhrzeigersinn zu einer Änderung ihrer Neigungswinkel führen und damit einen Kanalverschluss bewirken (Unwin und Zampighi 1980, Unwin und

Ennis 1984, Willecke et al. 2002). Das zweite so genannte „Ball-und-Kette“-Modell beinhaltet den Kanalverschluss durch den C-Terminus als „Ball“, welcher mit der zytoplasmatischen Schleife interagiert (Ek et al. 1994, Ek-Vitorin 1996, Calero et al. 1998).

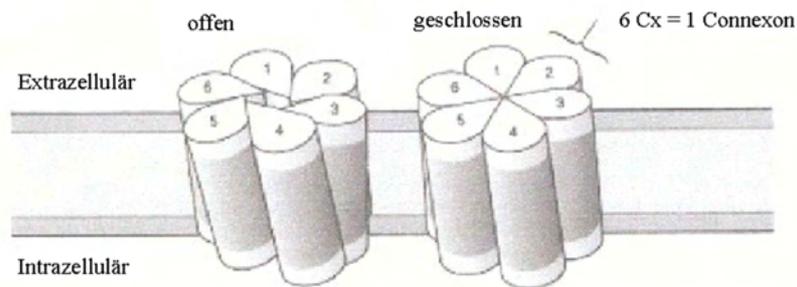


Abb. 10 Permeabilität von GJ-Kanälen: Rotationsmodell

Mechanismus zur Regulation des Öffnungszustands von GJ-Kanälen (Willecke et al. 2002, modifiziert).

2.2.4 Lebenszyklus von Gap Junctions

Die Synthese und Degradation eines GJ-Kanals ist ein komplexer Prozess, der sich vereinfacht aus den folgenden Einzelschritten zusammensetzt (Abb. 11): die Biosynthese der Cx-Proteine, ihre Oligomerisierung zu Connexonen, deren intrazellulärer Transport und Einfügen in die Zellmembran, die Bildung funktioneller GJ-Kanäle bzw. GJ-Plaques und letztendlich der GJ- bzw. Cx-Abbau (eine Übersicht liefern: Segretain und Falk 2004).

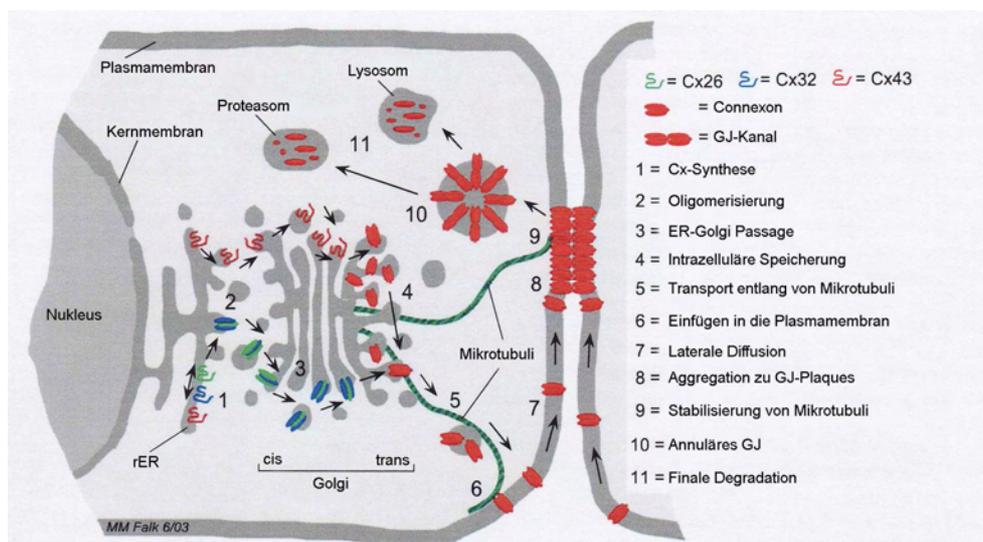


Abb. 11 Lebenszyklus von GJ-Kanälen.

Prozess des Auf- und Abbaus von GJ-Kanälen bzw. deren Proteinuntereinheiten am Beispiel von Cx26, Cx32 und Cx43 (Segretain und Falk 2004, modifiziert).

Die Synthese der Cx-Proteine erfolgt analog zu anderen integralen Membranproteinen von Ribosomen, die an das rER gebunden sind. Sie werden kotranslational in dessen Membran integriert, bevor die Polypeptidkette vollständig übersetzt ist (Falk et al. 1994, Zhang et al. 1996). Cx26 kann *in vitro* allerdings auch posttranslational in die rER-Membran inseriert werden (Zhang et al. 1996, Ahmad und Evans 2002). Der N- und der C-Terminus der Cx in der Membran des rER sind zum Zytoplasma hin orientiert (Laird et al. 1995). Bei den meisten Cx handelt es sich um Phosphoproteine, eine Ausnahme bildet beispielsweise Cx26 (Sáez et al. 1998). Die Phosphorylierung kann bereits im rER erfolgen, aber auch erst im Golgi-Apparat oder noch später. Der Ort der Zusammenlagerung von sechs Cx zu einem Connexon ist abhängig vom Cx-Typ und kann ebenfalls im rER oder Golgi-Apparat stattfinden (Sáez et al. 2003). Ahmad und Evans (2002) konnten jedoch zusätzlich demonstrieren, dass Cx26 erst in der Plasmamembran zu Halbkanälen oligomerisiert. Für den Transport der gebildeten Halbkanäle zur Plasmamembran werden verschiedene Wege diskutiert. Zum einen kann dieser entlang von Mikrotubuli über vom Trans-Golgi-Netzwerk abgeschnürte Vesikel erfolgen (Segretain et al. 2004). Zum anderen konnten Martin et al. (2001) zeigen, dass Cx26 und andere Cx auch über einen von Mikrotubuli unabhängigen Weg zur Plasmamembran gelangen können. Sind die Connexone in der Plasmamembran angekommen, müssen sich zur Bildung funktionsfähiger GJ-Kanäle zwei Halbkanäle benachbarter Zellen miteinander verbinden. Dies geschieht durch die Ausbildung von nicht kovalenten Wechselwirkungen zwischen den extrazellulären Schleifen der beteiligten Cx (Manjunath et al. 1984, Unger et al. 1999). Hierbei spielen Zelladhäsionsmoleküle 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).

Die Hauptabbauwege von Proteinen umfassen die Ubiquitin-abhängige oder Ubiquitin-unabhängige Proteolyse über Lysosomen oder Proteasomen (Laing und Beyer 1995). Verschiedene morphologische und biochemische Untersuchungen in den vergangenen Jahren haben damit begonnen, den Mechanismus für die Degradation von GJ-Kanälen bzw. deren Cx aufzudecken (eine Übersicht liefern:

Beyer und Berthoud 2002, Sáez et al. 2003). Dabei demonstrierten elektronenmikroskopische Studien eine Internalisierung von kompletten GJ-Plaques als ringförmige, von einer Doppelmembran umgebene Strukturen, die auch als „annuläre GJ“ bezeichnet werden (Larsen et al. 1979, 1981, Mazet et al. 1985). Für die anschließende Degradierung konnte eine Verdauung durch Lysosomen (Larsen and Tung 1978, Naus et al. 1993, Musil et al. 2000) und/oder Proteasomen (Laing und Beyer 1995, Musil et al. 2000) nachgewiesen werden. Die veröffentlichten Studien zeigen also, dass GJ-Kanäle bzw. deren Cx auf unterschiedlichen Wegen degradiert werden. Dabei wird vermutet, dass der gewählte Abbauweg vom Zelltyp abhängig ist, und dass dieser innerhalb desselben Zelltyps wiederum abhängt vom metabolischen und/oder pathologischen Status der Zelle (Sáez et al. 2003).

Bei GJ handelt es sich um dynamische Strukturen; sie bzw. ihre Proteinuntereinheiten scheinen zudem sehr kurzlebig zu sein, wie in mehreren Studien demonstriert werden konnte (Sáez et al. 2003). Fallon and Goodenough (1981) konnten nachweisen, dass hepatische GJ *in vivo* über eine Halbwertszeit von ca. fünf Stunden verfügen. Pulse-chase-Experimente mit Zellkulturen offenbarten Halbwertszeiten für verschiedene Cx von nur ein bis drei Stunden (Traub et al. 1989, Musil et al. 1990, Laird et al. 1991, Darrow et al. 1995).

2.2.5 Gap Junction- und Connexin-Expression im Hoden

Auf ultrastruktureller Ebene konnten mittels Elektronenmikroskopie, Semidünnschnitt- und/oder Gefrierbruch-Technik GJ-Kanäle im Hodengewebe verschiedener Spezies (Maus, Ratte, Meerschweinchen, Hamster, Nerz, Hund, Primat und Mensch) zwischen unterschiedlichen Zellpopulationen nachgewiesen werden. GJ traten dabei intratubulär zwischen benachbarten SZ sowie zwischen SZ und bestimmten KZ auf (eine Übersicht liefern: Russell und Peterson 1985, Enders 1993). Während es KZ selbst nicht möglich ist, untereinander GJ auszubilden, da sie allseitig von zytoplasmatischen Fortsätzen der SZ umgeben sind, konnten zwischen den interstitiellen Leydig Zellen GJ identifiziert werden (Nagano und Suzuki 1976, Nistal und Paniagua 1979, Prince 1990, Risley et al. 1992, Tan et al. 1996). Morphologische Beschreibungen zu GJ-Kanälen zwischen peritubulären Zellen wurden bisher noch nicht veröffentlicht (Risley et al. 2000).

Auf Protein-Ebene konnten mittels IHC, IF und/oder WB im Hoden verschiedener Spezies bis dato sieben Cx-Isoformen nachgewiesen werden. In Endothelzellen von Blutgefäßen wurden im Rattenhoden Cx37 (Tan et al. 1996) und im Maushoden Cx30.2 (Nielsen und Kumar 2003) detektiert. Für somatische SZ konnte eine Synthese von Cx26 (Maus, Ratte, Mensch [Tumor]), Cx32 (Maus, Ratte), Cx33 (Maus, Ratte) und Cx43 (Maus, Ratte, Meerschweinchen, Nerz, Hund, Mensch) demonstriert werden (Risley et al. 1992, Pelletier 1995, Tan et al. 1996, Batias et al. 1999, Steger et al. 1999a, Batias et al. 2000, Bravo-Moreno et al. 2001, Pérez-Armendariz et al. 2001, Brehm et al. 2002, Defamie et al. 2003, Decrouy et al. 2004, Fiorini et al. 2004, Fischer et al. 2005, Fiorini et al. 2006, Gilleron et al. 2006, Lee et al. 2006, Brehm et al. 2007, Rüttinger et al. 2008, Carette et al. 2010). Für bestimmte KZ (Spermatogonien und primäre Spermatozyten) zeigte sich zum einen im Rattenhoden eine Expression von Cx31 (Mok et al. 1999) und zum anderen bei Maus, Ratte und Mensch eine Synthese von Cx43 (Batias et al. 1999, 2000, Bravo-Moreno et al. 2001, Decrouy et al. 2004, Brehm et al. 2006a). Cx43 wurde zudem in Leydig Zellen von Maus, Ratte, Meerschweinchen, Nerz und Mensch (Risley et al. 1992, Pérez-Armendariz et al. 1994, Pelletier 1995, Tan et al. 1996, Steger et al. 1999a, Batias et al. 2000, You et al. 2000, Bravo-Moreno et al. 2001, Pérez-Armendariz et al. 2001, Segretain et al. 2003) und in peritubulären Zellen von Maus und Ratte (Risley et al. 1992, Risley 2000) nachgewiesen. Analog zu den Endothelzellen konnte auch in Leydig Zellen der Maus eine Expression von Cx30.2 lokalisiert werden (Nielsen und Kumar 2003). Darüber hinaus wurden Cx33 und Cx43 in kultivierten murinen SZ (Lablack et al. 1998, Defamie et al. 2001, Mograbi et al. 2003, Fiorini et al. 2004, Segretain et al. 2004, Fiorini et al. 2008) und Cx43 in Kokulturen von SZ und Spermatozyten (Godet et al. 2008) nachgewiesen.

Untersuchungen auf RNA-Ebene mittels ISH, NB und/oder RT-PCR in Hoden von Nagern haben ergeben, dass adulte SZ die mRNA von folgenden acht Cx exprimieren: Cx26, Cx31, Cx32, Cx33, Cx37, Cx40, Cx43 und Cx45. Dahingegen konnten neun Cx-mRNAs in KZ (Cx26, Cx31, Cx32, Cx33, Cx37, Cx40, Cx45, Cx50) und fünf in peritubulären Zellen (Cx31, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45) nachgewiesen werden (Risley et al. 1992, Batias et al. 1999, Mok et al. 1999, Batias et al. 2000, Risley 2000). Durchgeführte ISH an Hodengewebe von Männern (Defamie et al.

2003, Brehm et al. 2006b) und Hunden (Rüttinger et al. 2008) zeigten ein Signal für Cx43 im Zytoplasma von SZ, Spermatogonien und primären Spermatozyten.

Funktionelle *In-situ*-Dye-Coupling-Experimente an Rattenhoden von Decrouy et al. (2004) offenbarten, dass Cx43 beteiligt ist an der Kopplung zwischen benachbarten SZ, zwischen SZ und Spermatogonien und zwischen SZ und primären Spermatozyten, nicht aber zwischen SZ und Spermatisiden. Zusätzlich konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die Farbstoffübertragung ausschließlich von SZ auf KZ erfolgt und nicht umgekehrt. Diese beobachtete unidirektionale Kopplung wurde dabei als Möglichkeit interpretiert, mit der SZ Kontrolle auf KZ ausüben können, und zwar durch eine Anreicherung von Molekülen in KZ.

2.2.6 Connexin 43 im Keimepithel verschiedener Spezies

Im Zusammenhang mit Kapitel 2.2.5 wird offensichtlich, dass Cx43, verglichen mit anderen testikulären Cx, das vorherrschende im Hoden verschiedener Spezies ist. Seine Expression und Lokalisation im Keimepithel ist dabei vom Entwicklungsstand des Hodens und vom jeweiligen Stadium des Keimepithelzyklus abhängig, zwischen verschiedenen Spezies im adulten Hoden aber vergleichbar.

Maus und Ratte

In einer Studie von Pérez-Armendariz und Mitarbeitern (2001) konnte Cx43 bereits fetal (ab Tag 11,5 p. c.) in primordialis KZ und somatischen Zellen von undifferenzierten Gonaden der Maus nachgewiesen werden. Immunreaktionen für Cx43 wurden darüber hinaus im Keimepithel von neugeborenen Mäusen (Batias et al. 2000, Bravo-Moreno et al. 2001) und Ratten (Tan et al. 1996), und zwar zwischen KZ und somatischen SZ, detektiert. Während der Pubertät und damit zeitgleich mit Beginn der Spermatogenese, Ausbildung der funktionellen BHS und Differenzierung von SZ kommt es in den SZ zu einer Änderung in der räumlichen Expression von Cx43. Dabei „wandert“ das immunreaktive Signal vom adluminalen Kompartiment der SZ zu basalen Regionen (Tan et al. 1996, Batias et al. 2000, Bravo-Moreno et al. 2001). In adulten Tieren entwickelt sich zudem eine Stadien-spezifische Expression von Cx43. So zeigte sich eine intensive Immunfärbung für Cx43 in SZ bei Ratten (Risley et al. 1992, Tan et al. 1996, Decrouy et al. 2004, Fiorini et al. 2006) während der Stadien I bis VIII, bei Mäusen (Risley et al. 1992, Batias et al. 1999, 2000)

hingegen nur während der Stadien VI bis VIII. In den anderen Stadien des Keim-epithelzyklus konnte entweder eine nur schwache oder gar keine Farbreaktion demonstriert werden.

Mensch

Das GJ-Protein Cx43 wird im Keimepithel des Mannes von SZ erstmals mit Beginn der Spermatogenese und mit Bildung der BHS exprimiert, dabei konnte eine Cx43-Immunreaktivität zwischen angrenzenden SZ und zwischen SZ und KZ (Spermatogonien und primären Spermatozyten) nachgewiesen werden. Diese Immunreaktion zeigte sich stadienabhängig, d. h., während der Stadien II und III des Keimepithelzyklus war das Signal für Cx43 drastisch reduziert oder fehlte vollständig (Steger et al. 1999a, Brehm et al. 2002, Defamie et al. 2003).

Meerschweinchen und Nerz

Analog zur Expression im menschlichen Keimepithel konnte Pelletier (1995) zeigen, dass Cx43 von SZ dieser Tierarten ebenfalls erstmals mit Beginn der Spermatogenese und mit Bildung der BHS exprimiert wird. Bei diesen Tieren entwickelte sich zudem eine permanente Cx43-Expression über den gesamten Keimepithelzyklus hinweg, die Verteilung der Cx43-Immunreaktion zeigte sich allerdings stadienabhängig.

2.2.7 Connexin 43 und transgene Mausmodelle

Um den spezifischen Beitrag der unterschiedlichen Cx-Proteine auf die Funktion von GJ im Bereich der molekularen Physiologie während der embryonalen Entwicklung und/oder im adulten Organismus *in vivo* untersuchen zu können, wurden in den letzten Jahren verschiedene Cx-KO- und Cx-KI-Mausmodelle entwickelt (eine Übersicht liefern: Willecke et al. 2002). Diese Mausmutanten spielen in der heutigen Wissenschaft als Modelle zur Erforschung biologischer Prozesse, vor allem aber auch als Modellorganismen für menschliche Erkrankungen, eine bedeutende Rolle.

2.2.7.1 Konstitutive Connexin 43-Knockout-Mäuse

Bei den konstitutiven oder generellen KO-Mäusen handelt es sich um Mausmutanten, bei denen gezielt meist ein einzelnes Gen in allen Zellen des Körpers deaktiviert wurde und die Mutation darüber hinaus über die gesamte Entwicklung

hinweg im Tier präsent ist. Die Genmanipulation selbst geschieht dabei als Gene Targeting in embryonalen Stammzellen, die dann in die Keimbahn einer Maus eingebracht werden (Hall et al. 2009).

Eine der ersten Mausmutanten für Cx war die konstitutive Cx43KO-Maus. Homozygot Cx43-defiziente Mäuse entwickelten sich zunächst scheinbar normal, verstarben dann jedoch unmittelbar nach der Geburt. Als Ursache wurde eine Herzmissbildung in Form einer Obstruktion der Pulmonalarterien festgestellt (Reaume et al. 1995). Trotz des perinatalen Versterbens dieser Mausmutanten, konnte in den letzten Jahren mit Hilfe des Cx43KO-Mausmodells in verschiedenen Studien an embryonalen und fetalen Hoden eine direkte Rolle von Cx43 auf die testikuläre Entwicklung und Spermatogenese nachgewiesen werden (Juneja et al. 1999, Roscoe et al. 2001, Juneja 2003, Francis und Lo 2006, Kahiri et al. 2006).

Untersuchungen an fetalen Hoden Cx43-defizienter Mäuse ergaben, dass das Fehlen von Cx43 in dieser frühen Phase der Gonadenentwicklung zu Störungen der Migration und Proliferation der primordialen KZ führt. Diese KO-Tiere zeigten, verglichen mit WT-Mäusen, sowohl ein vermindertes Hoden- und Körpergewicht als auch eine deutliche Reduktion der KZ-Zahl ab Tag 11,5 p. c. (Juneja et al. 1999). Des Weiteren wurde demonstriert, dass die beobachtete verringerte KZ-Zahl in den Cx43KO-Embryonen auf einer erhöhten Apoptoserate beruht (Francis und Lo 2006). Der Verlust des Cx43-Gens offenbarte zudem tiefgreifende Effekte auf die Expression von anderen testikulären Cx. Während in fetalen Hoden von Cx43KO-Mausmutanten nur vier Cx-mRNAs (Cx26, Cx37, Cx40 und Cx45) detektiert werden konnten, zeigten fetale WT-Hoden eine Expression von insgesamt acht Cx-Mitgliedern (Juneja 2003).

Zur Untersuchung der postnatalen Hodenentwicklung und der Funktion von Leydig Zellen wurde in zwei weiteren Studien fetales Hodengewebe von Cx43KO-Mäusen unter die Nierenkapsel von entweder normalen männlichen (Roscoe et al. 2001) oder kastrierten (Kahiri et al. 2006) adulten WT-Mäusen transplantiert. In der Studie von Roscoe et al. (2001) zeigten sich in den transplantierten Cx43KO-Keimtubuli im Vergleich zu Hoden von WT-Mäusen 90 % weniger KZ und fast ausschließlich somatische SZ. Somit scheint, dass die Expression von Cx43 auch an der

postnatalen Entwicklung der murinen KZ beteiligt ist, bei der Initiierung der Spermatogenese eine wichtige Rolle spielt und das Fehlen als eine mögliche Ursache für die Entstehung von Spermatogenesestörungen, wie dem SCO-Syndrom, interpretiert werden kann. Kahiri et al. (2006) demonstrierten, dass der Androgengehalt im Blutserum von kastrierten Mäusen mit Cx43KO-Hodengewebe unter der Nierenkapsel vergleichbar war mit dem von „Wirten“, denen normales Hodengewebe von WT-Mäusen implantiert wurde. Folglich scheinen Cx43-GJ für die Androgenproduktion nicht essenziell zu sein.

2.2.7.2 Konstitutive Connexin 43-Knockin-Mäuse

Zusätzliche Daten bezüglich der Rolle von Cx43 auf die postnatale Hodenentwicklung und Spermatogenese stammen von zwei weiteren Studien, bei denen die kodierende Sequenz von Cx43 entweder gegen die kodierende Region von Cx32 bzw. Cx40 (Plum et al. 2000) oder gegen die von Cx26 (Winterhager et al. 2007) ausgetauscht wurde. Plum et al. (2000) zeigten zum einen, dass beide KI-Mauslinien lebensfähig sind, und zum anderen, dass die Funktion von Cx43 im Maushoden nicht durch die beiden anderen Cx kompensiert werden kann. Beide Mausmutanten waren infertil, hatten ein vermindertes Hodengewicht sowie reduzierte KZ-Zahlen und zeigten eine gestörte Spermatogenese mit überwiegend SCO-Tubuli. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich aus der Studie von Winterhager et al. (2007), in der die lebensfähigen, aber infertilen männlichen Cx26KI-Mäuse einen Arrest der Spermatogenese auf der Stufe der Spermatogonien oder primären Spermatozyten sowie SCO-Tubuli entwickelten.

2.2.7.3 Konditionale (Zell-spezifische) Connexin 43-Knockout-Mäuse

In Rahmen der Weiterentwicklung von konstitutiven KO und mit Hilfe neuerer Technologien sind schließlich die so genannten konditionalen KO-Mäuse entstanden. Bei diesen Mäusen wird das gewünschte Gen in nur einem speziellen Organ, Gewebe oder Zelltyp, und zwar zu einem bestimmten Zeitpunkt oder über einen Zeitraum der Entwicklung hinweg deaktiviert. Konditionale KO-Mausmodelle sind den konstitutiven Modellen oft überlegen, da sie „präziser“ sind und die Mäuse meist eine höhere Lebenserwartung aufweisen (Brehm und Steger 2005).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, konditionale KO-Mäuse zu generieren, die allerdings am häufigsten genutzte Methode ist das so genannte Cre/loxP-Rekombinasesystem (Nagy 2000). Cre ist dabei ein 38-kDa-Enzym, welches aus dem Bakteriophagen P1 stammt und die ortsspezifische Rekombination zwischen zwei DNA-Zielsequenzen von jeweils 34 bp, den loxP-Elementen, katalysiert (Hamilton und Abremski 1984). Jedes loxP-Element besteht aus einer asymmetrischen Kernsequenz (core region) von 8 bp, die von zwei umgekehrten Sequenzwiederholungen (inverted repeats) von 13 bp flankiert wird (Abb. 12). Die loxP-Elemente selbst dienen der Cre-Rekombinase als Erkennungssequenz, das Enzym bindet dabei spezifisch an die Inverted-repeat-Abschnitte. Die core region gibt dem Element seine Orientierung. Insofern beide loxP-Elemente in gleicher Orientierung auf dem DNA-Strang liegen, führt dies zu einem Ausschneiden des dazwischenliegenden DNA-Abschnitts.

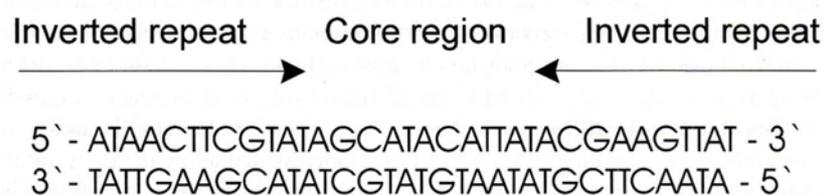


Abb. 12 Aufbau von LoxP-Elementen.

LoxP-Elemente bestehen aus zwei umgekehrten Sequenzwiederholungen (inverted repeats) von jeweils 13 bp, die eine asymmetrische Kernsequenz (core region) von 8 bp flankieren (Brehm und Steger 2005).

Um nun ein Zielgen mit Hilfe des Cre/loxP-Rekombinasesystems konditional auszuschalten, müssen zunächst zwei konstitutive transgene Mauslinien generiert werden. Zum einen werden zwei loxP-Elemente transgen so in das Zielgen eingebracht, dass das ausgewählte Exon von ihnen flankiert wird (= gefloxtes Gen), in Abwesenheit von Cre bleibt dieses gefloxtes Gen intakt und wird normal exprimiert. Zum anderen wird die Cre-Rekombinase transgen in eine zweite Mauslinie eingeschleust (= Cre-Maus). Durch die zusätzlich gezielte Wahl von Promotoren, wie z. B. Zell-spezifische, kann die Expression von Cre kontrolliert werden. Zur konditionalen Ausschaltung des Zielgens kommt es dann, wenn die gefloxtes und die Cre-Maus miteinander verpaart werden (Abb. 13).

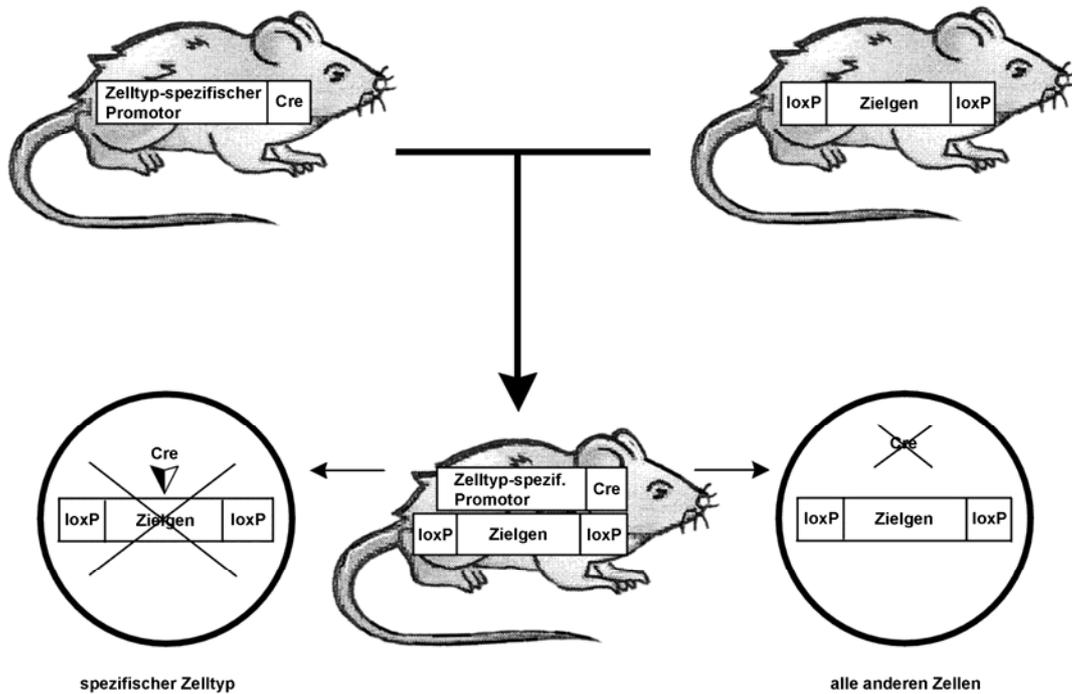


Abb. 13 Vereinfachtes Schema einer Zell-spezifischen Cre/loxP-Zuchtstrategie.

Transgene Mäuse, die das Cre-Gen unter der Kontrolle von einem Zelltyp-spezifischen Promotor exprimieren, werden mit transgenen Mäusen verpaart, bei denen das Zielgen von zwei loxP-Elementen flankiert ist. Die resultierenden Mäuse verfügen über beides, das Cre-Gen und das loxP-gefloxte Zielgen. In den Zellen, in denen das Cre-Enzym exprimiert wird, erfolgt eine Deletion des Zielgens. In allen anderen Zellen bleibt das Zielgen erhalten (Brehm und Steger 2005, modifiziert).

SZ-spezifischer KO des Cx43-Gens (SCCx43KO)

Um die beschriebene Problematik des generellen Cx43KO-Mausmodells zu umgehen und die SZ-spezifische Rolle von Cx43 auf die testikuläre Entwicklung und Spermatogenese *in vivo* untersuchen zu können, wurde mit Hilfe des Cre/loxP-Systems erfolgreich eine lebensfähige konditionale KO-Mauslinie generiert, bei der das Cx43-Gen nur in den SZ fehlt (Brehm et al. 2007, Sridharan et al. 2007). Gekreuzt wurden hierfür zwei etablierte transgene Mauslinien: AMH-Cre-Mäuse (Lécureuil et al. 2002) und Cx43-gefloxte LacZ-Mäuse (Theis et al. 2000, 2001). Im vorliegenden Modell steht die Expression von Cre unter der Kontrolle eines Promotors, der für das AMH codiert. Dieser Promoter stellt somit sicher, dass das Cre-Enzym ausschließlich in den SZ aktiviert wird und folglich nur in diesen Zellen eine Deletion des geflochten Cx43-Gens erfolgen kann. Zusätzlich ist bei den Cx43-gefloxten Mäusen ein stilles LacZ-Reporter gen eingebaut, welches für das Enzym β -Gal codiert. Dieses Gen wird nur beim Ausschneiden des vorgeschalteten Cx43-Gens abgelesen und stellt einen indirekten Nachweis für die Cre-vermittelte Deletion des Cx43-Gens dar (siehe Kapitel 3.1.4).

Verglichen mit ihren WT-Wurfgeschwistern zeigten männliche heterozygote und homozygote SCCx43KO-Mäuse keine Unterschiede im Körpergewicht; und auch Nebenhoden, Samenleiter und akzessorische Geschlechtsdrüsen sowie der Hodenabstieg erschienen unverändert. Die Größe und das Gewicht der Hoden der homozygoten KO-Mäuse waren jedoch drastisch reduziert (Abb. 14), darüber hinaus waren diese Tiere infertil.

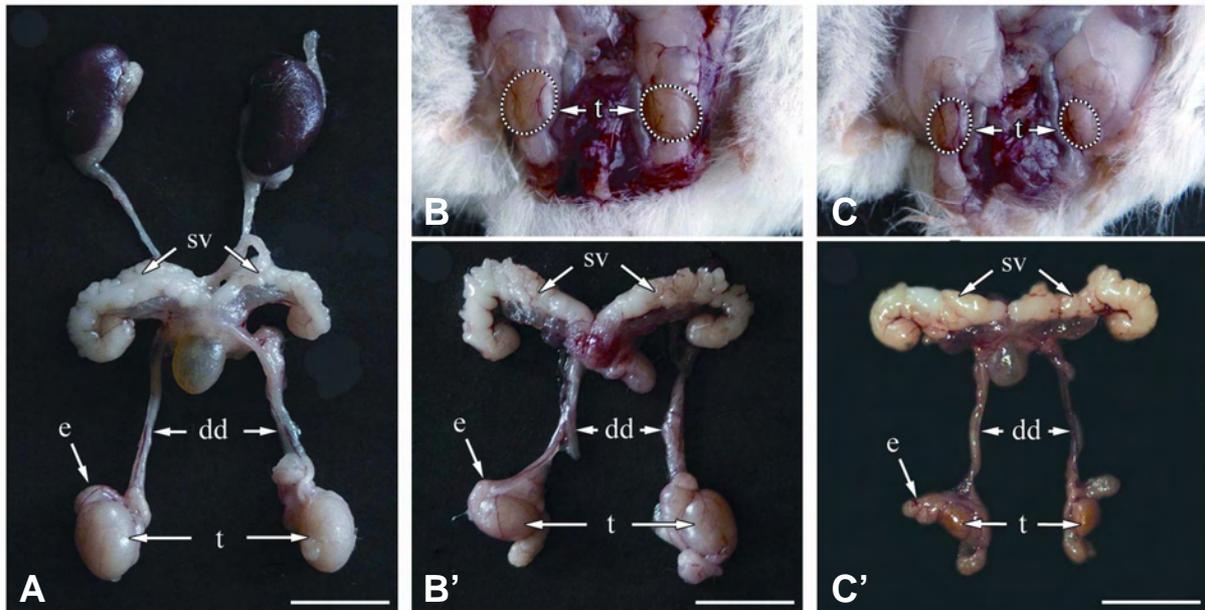


Abb. 14 SCCx43KO: makroskopisches Erscheinungsbild.

Urogenitaltrakt von adulten WT- (A) und Genitaltrakt von SCCx43KO^{+/-}- (B, B') und SCCx43KO^{-/-}- (C, C') Mäusen. Die homozygoten KO-Mäuse zeigen einen unveränderten Hodenabstieg (C), die Hodengröße ist allerdings drastisch reduziert (C'). t = Hoden; e = Nebenhoden; dd = Samenleiter; sv = Samenblasendrüse; Messbalken = 1 cm. (Brehm et al. 2007, modifiziert)

Eine histologische Analyse (Abb. 15) des Hodengewebes zeigte, dass WT-, aber auch heterozygote KO-Tiere eine qualitativ und quantitativ normale Spermatogenese zeigten. Letzteres weist darauf hin, dass ein Cx43-Allel in SZ ausreicht, um eine funktionelle Spermatogenese zu gewährleisten. Die homozygoten KO-Tiere hingegen zeigten histologisch einen Arrest der Spermatogenese auf der Stufe der Spermatogonien oder SCO-Tubuli. Lediglich in maximal 5 % der Samenkanälchen war eine qualitativ normale Spermatogenese zu beobachten. Darüber hinaus traten abnormale intratubuläre Zellcluster, Vakuolen im Zytoplasma von SZ und eine Hyperplasie der interstitiellen Leydig Zellen auf.

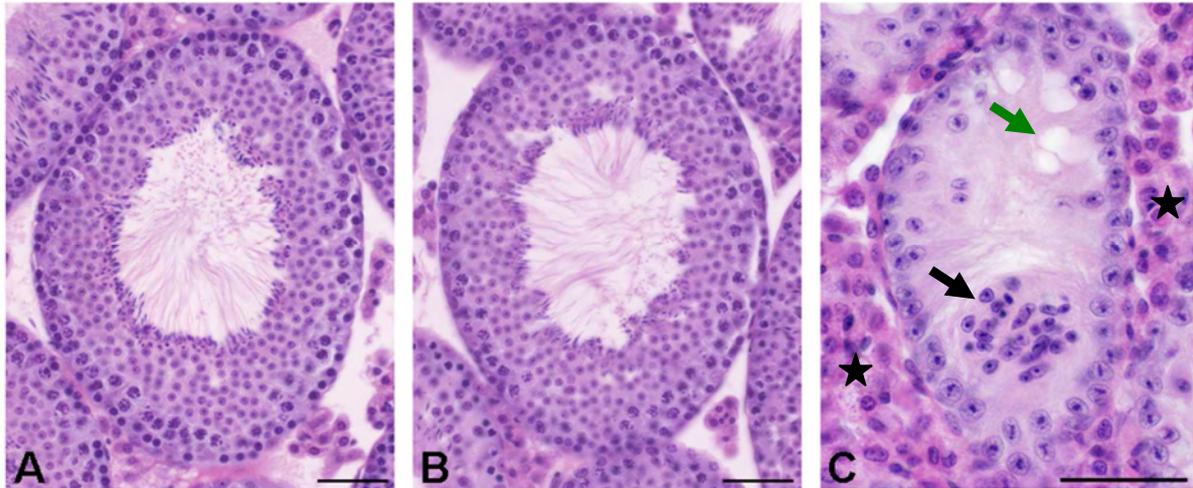


Abb. 15 SCCx43KO: histologischer Phänotyp.

Histologischer Vergleich zwischen Hoden von adulten WT- (A), SCCx43KO^{+/-}- (B) und SCCx43KO^{-/-}- (C) Mäusen. Während die WT- (A) und heterozygoten KO- (B) Mäuse eine qualitativ und quantitativ normale Spermatogenese zeigen, enthalten die Samenkanälchen der homozygoten KO-Mäuse (C) hier ausschließlich SZ. Hinzu kommen weitere morphologische Veränderungen, wie intratubuläre Zellcluster (C, schwarzer Pfeil), zytoplasmatische Vakuolen (C, grüner Pfeil) und eine Hyperplasie der Leydig Zellen (C, Sterne). Messbalken = 50 µm. (Brehm et al. 2009, modifiziert).

Eine statistische Auswertung ergab zudem, dass die durchschnittliche Anzahl der Spermatogonien pro Samenkanälchen in adulten homozygoten SCCx43KO-Mäusen, verglichen mit ihren WT- und heterozygoten KO-Wurfgeschwistern, signifikant reduziert ist. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der somatischen SZ pro Tubulus signifikant erhöht ist und diese auch nach der Pubertät noch proliferieren.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die Cx43-Expression in SZ der Maus eine absolute Voraussetzung für die Initiierung und Aufrechterhaltung der Spermatogenese darstellt. Darüber hinaus scheint Cx43 essenziell für die Beendigung der SZ-Proliferation während der Pubertät zu sein. Dieses GJ-Protein repräsentiert damit einen Hauptregulator für die Entwicklung von SZ sowie KZ und zeigt, wie unabdingbar die direkte interzelluläre Kommunikation ist.

2.2.8 Rolle und Funktionen von Connexin 43 im Keimepithel

Die in Kapitel 2.2.7 beschriebenen unterschiedlichen Cx43-Mausmutanten liefern direkte Nachweise für eine Involvierung von Cx43 in die Regulation der Proliferation und Differenzierung von SZ und KZ sowie Kontrolle der Spermatogenese (Reaume et al. 1995, Juneja et al. 1999, Plum et al. 2000, Roscoe et al. 2001, Juneja 2003,

Francis und Lo 2006, Kahiri et al. 2006, Winterhager et al. 2007, Brehm et al. 2007, Sridharan et al. 2007).

Es existieren aber noch zahlreiche weitere Studien, die indirekte Nachweise für eine Rolle von Cx43 in der Spermatogenese aufzeigen:

(1) Cx43 formt funktionelle GJ-Kanäle zwischen SZ und proliferierenden KZ (Decrouy et al. 2004), zudem wird die Cx43-Expression bei Spezies wie Maus, Ratte und Mensch stadienabhängig kontrolliert (Risley et al. 1992, Tan et al. 1996, Batias et al. 1999, 2000, Pointis et al. 2005). Dies deutet auf eine enge regulatorische Beziehung zwischen spezifischen KZ und der Cx43-Synthese hin und zeigt, dass Cx43 am Proliferationsprozess dieser Zelltypen beteiligt zu sein scheint.

(2) Cx43-GJ zwischen SZ scheinen ein interzelluläres Netzwerk innerhalb des Keimepithels zu formen. Diese Synzytium-ähnliche Organisation erlaubt eine Koordination des Metabolismus von SZ eines Keimtubulus und, indirekt durch die Kopplung mit bestimmten KZ, die Synchronisierung deren Proliferation und Differenzierung (Risley et al. 2002, Decrouy et al. 2004).

(3) Dem GJ-Protein Cx43 wird zudem eine regulierende und koordinierende Rolle beim Stadien-spezifischen Auf- und Abbau der BHS zugesprochen (Pelletier 1995, Cyr et al. 1999, Steger et al. 1999a, Segretain et al. 2004, Lee et al. 2006, Li et al. 2009, Carette et al. 2010, Li et al. 2010).

(4) Veränderungen in der Cx43-Expression können mit zahlreichen testikulären Störungen wie dem SCO-Syndrom oder Hodentumoren in Verbindung gebracht werden. Beispielsweise zeigten Männer mit einem testikulären CIS, SZ-Tumor oder Seminom (Brehm et al. 2002, Roger et al. 2004, Brehm et al. 2006a, b) oder Hunde mit einem Seminom (Rüttinger et al. 2008) eine reduzierte oder fehlende Cx43-Expression in SZ und/oder Tumorzellen. Auch infertile Patienten mit Klinefelter-Syndrom (Kotula-Balak et al. 2007) oder einem idiopathischen Spermatogonienarrest oder SCO-Syndrom (Steger et al., 1999a; Defamie et al., 2003; Matuso et al., 2007) offenbarten eine Reduktion oder einen Verlust von Cx43.

(5) In Studien mit verschiedenen KO-Mäusen (z. B. *ebo/ebo*, *jun-d^{-/-}* und *RXRβ^{-/-}*) konnte im Zusammenhang mit einer gestörten Spermatogenese ebenfalls eine reduzierte oder fehlende testikuläre Cx43-Immunreaktion nachgewiesen werden (Batias et al. 1999, 2000, Kotula-Balak et al. 2007).

(6) Zwei *In-vitro*-Studien (Gilleron et al. 2006, 2009) bestätigen eine Beteiligung von Cx43-GJ an der Kontrolle der Proliferation von SZ. Nach Gilleron et al. (2006) stellt Cx43 dabei möglicherweise ein Zwischenziel für die T3-vermittelte Inhibition der neonatalen SZ-Proliferation dar. Des Weiteren liefern Gilleron et al. (2009) Hinweise, dass Cx43 an der Regulation der KZ-Zahlen beteiligt ist, indem es das Überleben von Spermatogonien negativ kontrolliert.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Versuchsdesign und Versuchstiere

3.1.1 Versuchstierhaltung

Als Versuchstier bzw. „Organspender“ diente die Labormaus der Art *Mus Musculus* (Gattung: *Mus*, Familie: *Muridae*, Ordnung: *Rodentia*). Die Versuchstierhaltung erfolgte im Tierstall der Philipps-Universität Marburg unter kontrollierten Bedingungen bei einer Temperatur von 20 bis 22°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50 bis 70 %. Der Tag-Nacht-Rhythmus betrug im Sommer: 12 Stunden Licht im Wechsel mit 12 Stunden Dunkelheit, im Winter: 6 Stunden Licht und 18 Stunden Dunkelheit. Wasser und standardisiertes Nagerfutter standen den Mäusen ad libitum zur Verfügung. Der Tierversuch wurde beim Regierungspräsidium Gießen vorschriftsmäßig angezeigt (Geschäftsnummer: V54 – 19 c 20/15 c GI 18/1).

3.1.2 Generierung der SCCx43KO-Mäuse

Wie bereits in Kapitel 2.2.7.3 beschrieben, müssen zur Generierung von SCCx43KO-Mäusen zunächst zwei etablierte transgene Mauslinien miteinander verpaart werden, die AMH-Cre-Mäuse mit den homozygoten Cx43-geflochten LacZ-Mäusen (= P-Generation). In einem nächsten Schritt werden transgene Mäuse aus der F1-Generation, die Cre-positiv sind (AMH-Cre^{+/-}), und heterozygote Träger des geflochtenen Cx43-Allels (Cx43^{flox/WT}) mit homozygoten Cx43-geflochten LacZ-Mäusen (Cx43^{flox/flox}) rückgekreuzt, um in der F2-Generation die homozygoten KO-Mäuse (SCCx43KO^{-/-}) zu erhalten (Abb. 16).

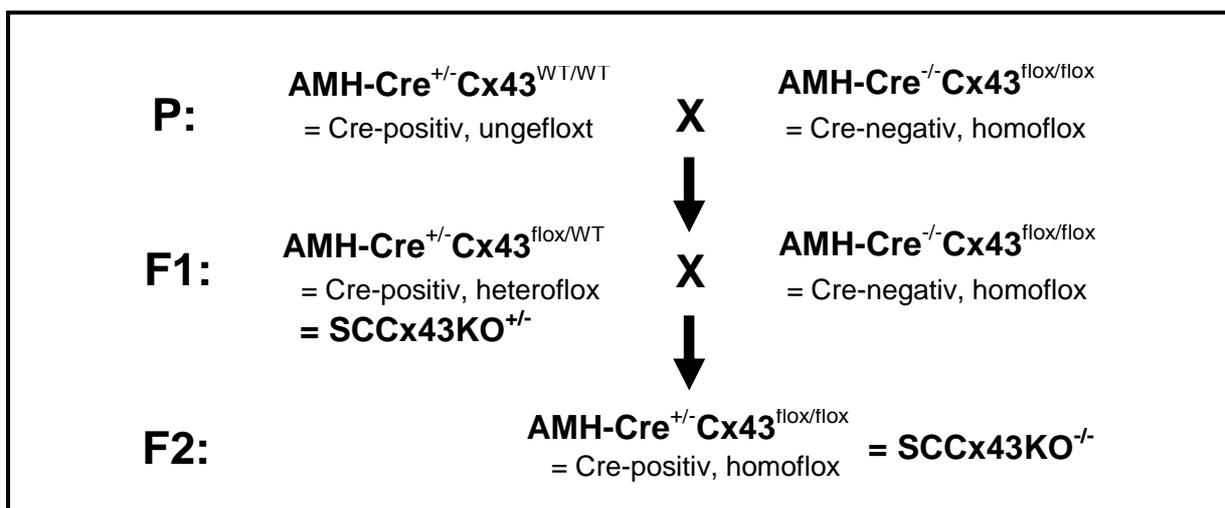


Abb. 16 Generierung der SCCx43KO-Mäuse.

3.1.3 PCR-Genotypisierung

Um den Genotyp der gezüchteten und in den Versuchen eingesetzten phänotypisch identischen Mäuse bestimmen zu können, erfolgte eine DNA-Analyse von gewonnenen Schwanzspitzen mittels PCR. Die PCR ist eine *In-vitro*-Technik, mit der bestimmte DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten Basensequenzen eingerahmt werden, enzymatisch millionenfach vervielfältigt werden können. Dieser Vorgang wird auch als Amplifikation bezeichnet. Die PCR besteht im Wesentlichen aus den Schritten: Schmelzen der doppelsträngigen DNA (Denaturierung), Anlagerung der Primer an die DNA (Hybridisierung) und Verlängerung der Primer (Elongation).

Im Tierstall wurde innerhalb der ersten 14 Tage p. p. von jedem noch nicht abgesetzten Versuchstier eine 3 bis maximal 5 mm lange Biopsie der Schwanzspitze gewonnen. Um die Mäuse eindeutig identifizieren zu können, erfolgte zudem eine dauerhafte Markierung mittels Ohrstanze. Die Schwanzbiopsate selbst wurden unmittelbar und bis zur Weiterverarbeitung in ein Tube mit 200 µl DirectPCR Lysis Reagent (mouse tail) verbracht. Dieser Schritt ist erforderlich, um verschiedene Komponenten, die im Tiergewebe vorhanden sind und PCR-Reaktionen hemmen können, auszuschalten. Für die Isolation der genomischen DNA wurden dann im Labor je Probe 20 µl Proteinase K Stammlösung hinzugefügt. Nach sorgfältigem Mischen erfolgte eine Inkubation über Nacht in einem 55°C warmen Wasserbad. Zur Inaktivierung der Proteinase K kamen die Proben am nächsten Morgen für 45 Minuten in ein 85°C warmes Wasserbad. Anschließend wurden die Proben kurz gevortext und an zentrifugiert sowie der Überstand mit der isolierten DNA jeweils in ein neues Tube pipettiert und bei -20°C gelagert.

Für die Genotypisierung wurden je zwei PCR-Reaktionen mit einer anschließenden gelelektrophoretischen Auftrennung der Produkte durchgeführt. Einerseits wurde auf das Vorhanden- oder Nichtvorhandensein des Cre-Gens getestet, andererseits ob es sich um eine für Cx43 homozygot, heterozygot oder nicht gefloxt Maus handelt.

PCR zur Detektion der Cre-Rekombinase:

Von jeder Probe wurde jeweils 1 µl DNA vorgelegt und mit 24 µl des nachfolgenden PCR-Ansatzes gemischt:

- 15 µl steriles DEPC-Aqua bidest
- 5 µl 5 x Green GoTaq[®] Flexi Buffer
- 2 µl MgCl₂ (25 mM)
- 0,5 µl dNTP Mix (10 mM)
- 0,5 µl Cre-Primer, vorwärts (10 pmol; Tab. 1)
- 0,5 µl Cre-Primer, rückwärts (10 pmol; Tab. 1)
- 0,5 µl GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase (5 u/µl)

Das im Thermocycler verwendete Protokoll enthielt folgende Schritte:

- 2 Minuten bei 95 °C Initiale Denaturierung der DNA -Doppelstränge
 - 30 Sekunden bei 95 °C Denaturierung der DNA-Doppel stränge
 - 30 Sekunden bei 58 °C Anlagerung der Primer
 - 30 Sekunden bei 72 °C Amplifikation der DNA
 - 7 Minuten bei 72 °C Finale Amplifikationsphase
 - Unbegrenzt bei 4 °C Kühlung der Produkte
- } x 40

PCR zur Detektion der LoxP-Elemente:

Von jeder Probe wurde jeweils 1 µl DNA vorgelegt und mit 24 µl des nachfolgenden PCR- Ansatzes gemischt:

- 15,35 µl steriles DEPC-Aqua bidest
- 5 µl 5 x Green GoTaq[®] Flexi Buffer
- 2 µl MgCl₂ (25 mM)
- 0,5 µl dNTP Mix (10 mM)
- 0,5 µl Cx43-Primer, vorwärts (10 pmol; Tab. 1)
- 0,5 µl Cx43-Primer, rückwärts (10 pmol; Tab. 1)
- 0,15 µl GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase (5 u/µl)

Das im Thermocycler verwendete Protokoll enthielt folgende Schritte:

- 2 Minuten bei 95 °C Initiale Denaturierung der DNA -Doppelstränge
 - 45 Sekunden bei 95 °C Denaturierung der DNA-Doppel stränge
 - 45 Sekunden bei 64 °C Anlagerung der Primer
 - 90 Sekunden bei 72 °C Amplifikation der DNA
 - 5 Minuten bei 72 °C Finale Amplifikationsphase
 - Unbegrenzt bei 4 °C Kühlung der Produkte
- } x 40

Tab. 1 PCR-Genotypisierung: eingesetzte Primer (Brehm et al. 2007).

Gen	Primer, vorwärts	Primer, rückwärts	Länge Amplifikat
Cre	CCTGGAAAATGCTTCTGTCCG	GCAGGCGCAGGAGCTGGTGC	1914 bp
Cx43	TCATGCCCGGCACAAGTGAGAC	TCACCCCAAGCTGACTCAACCG	1100 bp (gefloxt) 987 bp (ungefloxt)

Nach der Amplifikation wurden die PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Der genaue Ablauf war wie folgt:

Herstellung der Agarose-Gele:

- 1,5 %iges Agarose-Gel für die Produkte der Cre-PCR:
0,45 g Agarose in 30 ml 1 × TAE-Ansatzpuffer (pH 8,4) suspendieren
- 2 %iges Agarose-Gel für die Produkte der LoxP-PCR:
0,6 g Agarose in 30 ml 1 × TAE-Ansatzpuffer (pH 8,4) suspendieren
- Agarose-Suspension in der Mikrowelle vorsichtig aufkochen und anschließend bei RT auf ca. 65°C abkühlen lassen
- 3 µl GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain dazu pipettieren und durch Schwenken mit dem Gel vermischen
- Agarose-Lösung luftblasenfrei in ein Geltablett gießen
- 30 Minuten bei RT erstarren lassen
- Probenkamm und Gummi-Endblöcke entfernen
- Geltablett in die Elektrophoresekammer einsetzen
- Elektrophoresekammer mit 1 × TAE-Laufpuffer (pH 8,4) bis ca. 1 cm oberhalb des Agarose-Gels füllen

Verdünnen der PCR-Produkte mittels Aqua bidest:

Cre-PCR: je 20 µl Aqua bidest

LoxP-PCR: je 110 µl Aqua bidest

Vorbereiten des Markers:

- 1 µl 1 kb DNA Ladder mit
- 2 µl 6 × DNA Loading Dye und
- 9 µl Aqua bidest mischen

Anschließend wurden 12 µl vom Marker und jedem PCR-Produkt (verdünnt) in jeweils eine Geltasche pipettiert. Die Laufzeit betrug 45 Minuten bei 120 Volt (Energieförderant: PowerPac 200).

Die Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese wurden mit Hilfe des Transilluminators UVsolo L dargestellt, fotografiert und gespeichert (siehe Abb. 17). Mittels Thermal printer Mitsubishi P93E wurden diese zudem auf Fotopapier ausgedruckt.

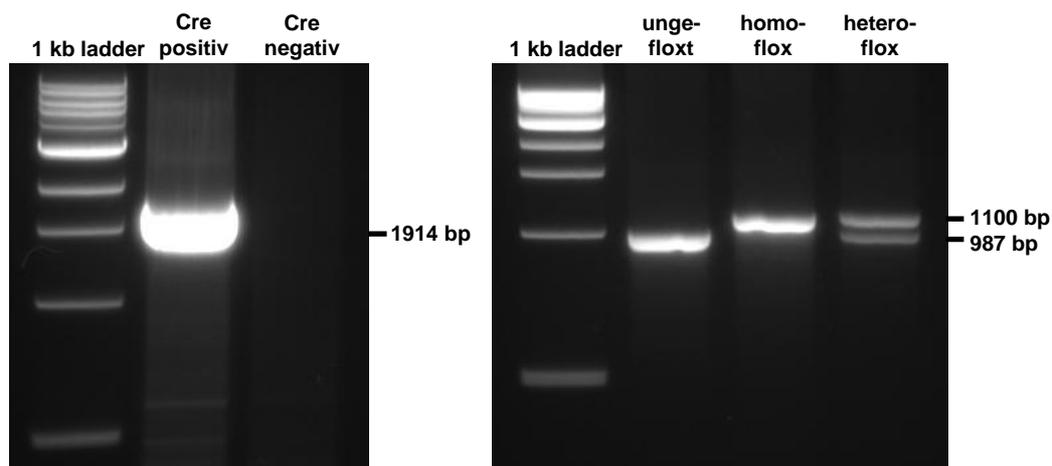


Abb. 17 PCR-Genotypisierung: Elektrophorese-Gelbilder.

3.1.4 Bestätigung der PCR-Genotypisierungsergebnisse

Nach Tötung der Mäuse und Entnahme der Hoden (siehe Kapitel 3.1.5) erfolgte zunächst eine Bestätigung der PCR-Genotypisierungsergebnisse auf immunhistochemischer Ebene. Zum Einsatz kam hierfür die β -Gal-IHC, die einen indirekten Nachweis für die Cre-vermittelte Deletion des Cx43-Gens darstellt. Diese Nachweismöglichkeit besteht, da ein stilles LacZ-Gen bei den Cx43-geflochten Mäusen eingebaut ist. Dieses Reporter-gen codiert für das Enzym β -Gal und wird nur bei erfolgreichem Ausschneiden des vorgeschalteten Cx43-Gens abgelesen. Mit einem entsprechenden Antikörper kann dann das β -Gal-Protein in den Kernen der SZ immunhistochemisch nachgewiesen werden, allerdings nicht bei den WT-Tieren (Abb. 18 A), sondern nur bei den KO-Mäusen (Abb. 18, B und C). Denn nur die Mäuse, die Cre-positiv sind und bei denen gleichzeitig zumindest ein Cx43-Gen mit LoxP markiert ist, zeigen eine positive Farbreaktion. Die Durchführung der IHC erfolgte dabei anhand des unter Kapitel 3.4.8 beschriebenen Protokolls.

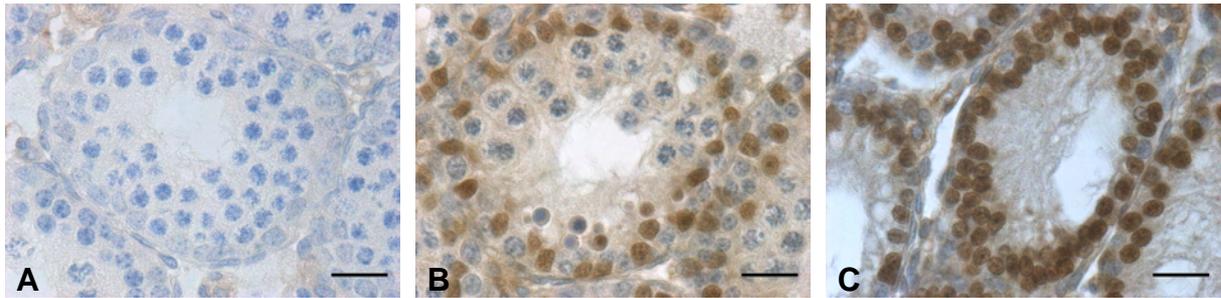


Abb. 18 β -Gal-IHC zur Bestätigung der PCR-Genotypisierung.

Vergleich zwischen Hoden von 15 Tage alten WT- (A), SCCx43KO^{+/−}- (B) und SCCx43KO^{−/−}- (C) Mäusen. Während die SZ-Kerne von WT-Mäusen (A) keine β -Gal-Färbung zeigen, sind die SZ-Kerne der KO-Mäuse (B, C) immunpositiv. Die KZ, peritubulären und Leydig Zellen (A-C) sind β -Gal-negativ. Messbalken = 20 μ m.

3.1.5 Probengewinnung

Genotypisierte homo- und heterozygote KO- sowie WT-Mäuse verschiedenen Alters (Tag 2 p. p. bis adult) wurden durch eine Ketamin/Xylazin-Narkoseüberdosis mittels intraperitonealer Injektion euthanasiert. Direkt im Anschluss wurden von jeder Maus beide Hoden sorgfältig herauspräpariert und entsprechend den Folgeversuchen zunächst fixiert und dann weiterverarbeitet.

3.1.6 Versuchsdesign und eingesetzte Maushoden

Nachfolgend findet sich ein Überblick über das Versuchsdesign und die dabei verwendeten Mäuse bzw. deren Hoden. Die Anzahl und das Alter der untersuchten Maushoden standen dabei in Abhängigkeit zur Fragestellung und den entsprechend angewandten Methoden (Abb. 19) bzw. variierten mit diesen. Grundsätzlich fand pro Altersstufe immer ein direkter paarweiser Vergleich zwischen WT- und homozygoten KO-Mäusen desselben Wurfes statt, dabei kamen als WT-Mäuse Cre-negativ Tiere zum Einsatz. Lediglich im Rahmen der HE-Färbung wurden pro Altersstufe auch Mäuse aus unterschiedlichen Würfen miteinander verglichen.

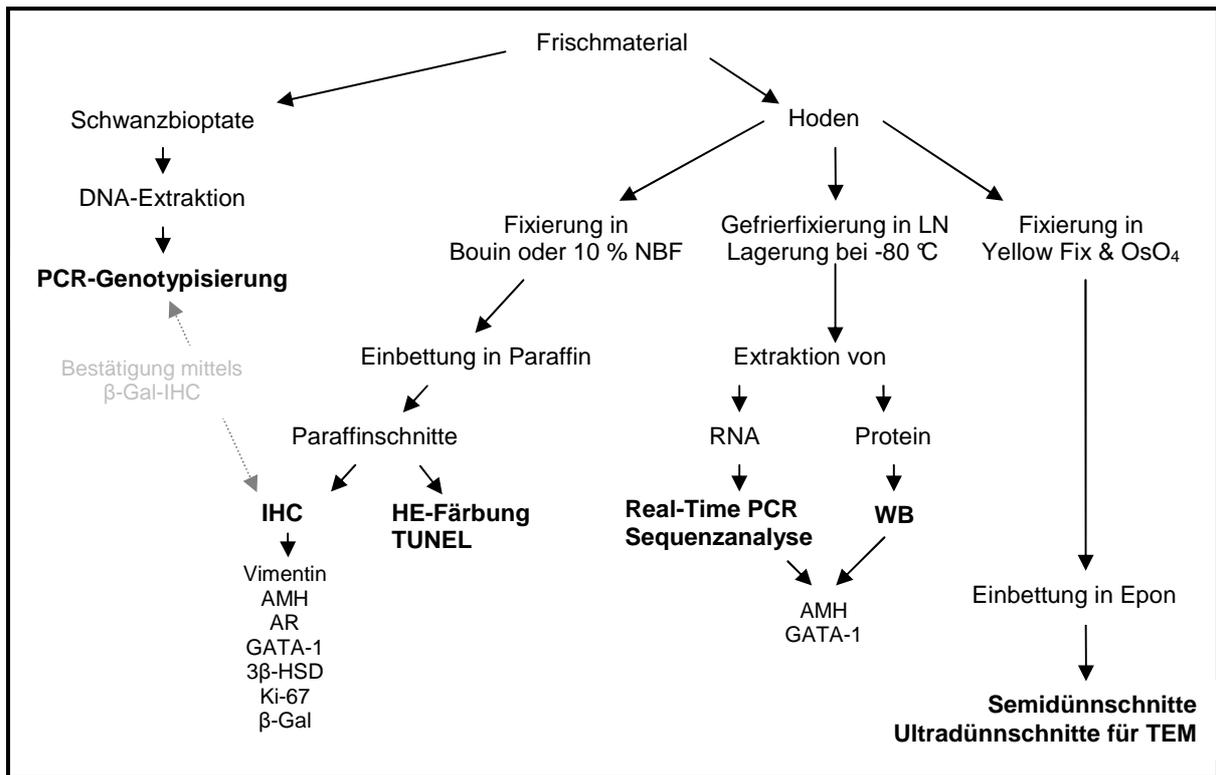


Abb. 19 Schematische Darstellung der durchgeführten Methoden.

HE-Färbung:

Um die strukturelle Differenzierung der SZ auf Lichtmikroskopebene und den Zeitpunkt des Auftretens der intratubulären Zellcluster in SCCx43KO^{-/-}-Mäusen zu bestimmen, wurden Hoden von 2 bis 124 Tage alten Mäusen im HE-Schnitt untersucht. Die einzelnen untersuchten Altersstufen waren im präpubertären Zeitraum die Tage 2-5 und 7, im pubertären Zeitraum die Tage 8-19, 21-23, 25, 27, 30, 31, 33, 35 und im adulten Zeitraum die Tage 54, 72, 91 und 124. Insgesamt kamen n = 1-7 Mäuse pro Genotyp und Alter bzw. durchschnittlich 2,83 KO- und 4,14 WT-Mäuse pro Alter zum Einsatz.

IHC:

Die Immunfärbung wurde genutzt, um in den homozygoten SCCx43KO-Mäusen den biochemischen SZ-Differenzierungszustand sowie die Zusammensetzung und Differenzierung der Zellen in den intratubulären Zellclustern zu bestimmen.

Die Untersuchung des Status der SZ-Reifung erfolgte dabei mit Hilfe der nachfolgenden etablierten SZ-Differenzierungsmarker Vimentin, AMH, AR und GATA-1. Diese Marker wurden ausgewählt, weil ihre Expression eindeutig mit der

Unreife (AMH) oder Reife (AR und GATA-1) von SZ assoziiert ist. Während Vimentin von fetal bis adult exprimiert wird, erfolgt eine Abschaltung von AMH bzw. eine Anschaltung von AR und GATA-1 während der Pubertät. Weitere Gründe, die für die Auswahl dieser Marker sprachen, waren zum einen ihre SZ-Spezifität im Keimepithel und zum anderen ihre unterschiedliche Proteinlokalisierung, also im Zytoplasma (Vimentin und AMH) oder Zellkern (AR und GATA-1). Dabei kamen Mäuse im Alter von 2 bis 166 Tagen zum Einsatz, und zwar um den präpubertären (Tage im Detail: 2, 5 und 7), pubertären (Tage im Detail: 8, 10, 12, 15, 17, 19, 21 und 31) und adulten Zeitraum (Tage im Detail: 54, 91, 124 und 166) abzudecken. Für biologische Replikate wurden aus jeder der drei Altersgruppen $n = 4$ Hoden pro Genotyp von 5 und 15 Tage alten sowie adulten Mäusen untersucht. An den anderen Tagen ging jeweils nur ein Tier pro Genotyp in die Versuche mit ein.

Um die Zusammensetzung und Differenzierung der Zellen zu bestimmen, welche die intratubulären Zellaggregationen in den SCCx43KO^{-/-}-Mäusen bilden, kamen verschiedene SZ-spezifische Marker (Vimentin, AMH, AR, GATA-1 und β -Gal) zum Einsatz, also Proteine, die im Keimepithel ausschließlich von SZ nicht aber von KZ exprimiert werden. Um zusätzlich auszuschließen, dass Leydig Zellen an der Bildung dieser Zellcluster beteiligt sind, erfolgte ein immunhistochemischer Nachweis des Leydig Zell-spezifischen Markers 3β -HSD. Darüber hinaus wurde eine Untersuchung der „geclusterten“ Zellen mit Hilfe des Proliferationsmarkers Ki-67 durchgeführt. Zum Einsatz kamen $n = 3$ (3β -HSD), $n = 4$ (Vimentin, AMH, AR, GATA-1 und Ki-67) und $n = 20$ (β -Gal) Hoden von adulten KO-Mäusen.

WB-Analyse und Real-Time PCR:

Da Unterschiede zwischen KO- und WT-Mäusen im Expressionsmuster von AMH und GATA-1 auf immunhistochemischer Ebene (siehe Kapitel 4.1.1) beobachtet wurden, erfolgte eine zusätzliche Untersuchung dieser SZ-Differenzierungsmarker mittels WB und Real-Time PCR. Für beide Marker kamen $n = 4$ Mäuse pro Genotyp und Methode zum Einsatz, für AMH 15 Tage alte und für GATA-1 adulte Tiere.

Semidünnschnitte und TEM:

Um die morphologische Differenzierung der SZ sowie die Zusammensetzung und Differenzierung der „geclusterten“ Zellen in adulten SCCx43KO^{-/-}-Mäusen auf Semi- und Ultradünnschnittebene zu bestimmen, wurden Hoden von 80, 107, 178 und 344

Tage alten Mäusen untersucht. Zum Einsatz kamen als biologische Replikate insgesamt 5 KO- und 4 WT-Mäuse.

TUNEL-Färbung:

Aufgrund der beobachteten apoptotischen Morphologie von einzelnen an die Cluster angehefteten Zellen (siehe Kapitel 4.2.2) erfolgte eine weitere Untersuchung dieser Zellen mit Hilfe der so genannten TUNEL-Methode. Diese dient dem biochemischen Nachweis von apoptotischen Zellen. Als biologische Replikate kamen $n = 20$ Hoden von adulten SCCx43KO^{-/-}-Mäusen zum Einsatz.

3.2 Herstellung von Paraffinschnitten

3.2.1 Fixierung in Bouin oder 10 % NBF

Für die HE-Färbung, die verschiedenen immunhistochemischen Nachweise und die TUNEL-Färbung erfolgte die Gewebefixierung grundsätzlich in Bouin'scher Lösung, da diese neben der Erhaltung der Antigenität auch einen weitgehenden Struktur-erhalt der zellulären und subzellulären Hodenarchitektur gewährleistet. Die Fixierung der frisch entnommenen Hoden erfolgte dabei über Nacht für ca. 16 Stunden. Im Anschluss wurde das Gewebe drei bis sieben Tage lang täglich mit 70 %igem Alkohol (hergestellt aus 100 % Ethanol) gespült, bis keine Gelbfärbung des Alkohols mehr sichtbar und folglich die Fixierlösung nahezu vollständig entfernt war.

Für GATA-1- und Ki-67-IHC musste allerdings die Gewebefixierung in 10 % NBF erfolgen und damit ein gewisser Strukturverlust in Kauf genommen werden, da die entsprechenden primären Antikörper an Bouin-fixiertem Hodengewebe nicht funktionierten. Die frisch entnommenen Hoden wurden für zwei bis vier Stunden bei 4°C fixiert, anschließend für ca. eine Stunde unter fließendem Leitungswasser gespült und dann in PBS-Puffer überführt.

Vor der Entwässerung und Einbettung (siehe Kapitel 3.2.2) wurden die Proben zunächst für 24 Stunden in 50 %igem Alkohol und dann für weitere 24 Stunden in 70 %igem Alkohol „vorentwässert“.

3.2.2 Entwässerung und Einbettung

Die Entwässerung und Einbettung der Gewebeproben erfolgte automatisiert im Einbettautomat TP 1050. Zunächst wurde hierbei das Wasser in den Geweben mittels aufsteigender Alkoholreihe durch 100 % Ethanol ersetzt und anschließend via Xylol (Intermedium zur Entfettung und Entalkoholisierung) in flüssiges Paraffin überführt. Die Proben durchliefen dabei die Stationen des nachfolgenden Programms:

- Alkohol 80 % für 2 Stunden
- Alkohol 96 % für 2 Stunden
- Alkohol 100 % für 3 Stunden
- Alkohol 100 % für 3 Stunden
- Alkohol 100 % für 3 Stunden
- Xylol für 1 Stunde
- Xylol für 45 Minuten
- Xylol für 45 Minuten
- Paraffin mit 59°C für 40 Minuten
- Paraffin mit 59°C für 40 Minuten
- Paraffin mit 59°C für 40 Minuten

Abschließend erfolgte das Aufblocken der Gewebeproben mit Hilfe der Ausgießstation EG 1160.

3.2.3 Beschichtung der Objektträger mit APES

Zum Erreichen einer besseren Haftfähigkeit der Gewebeschnitte wurden die Glas-Objektträger vor der Herstellung von Paraffinschnitten mit APES nach dem folgenden Protokoll beschichtet:

- OT kurz in reinem Aceton spülen (zum Entfetten und Reinigen)
- Aceton unter laufendem Abzug vollständig abdampfen lassen
- OT für 5 Minuten in 2 %iges APES stellen („Silanisierung“)
- OT für 2 Minuten in frisches Leitungswasser stellen
- OT für 2 Minuten unter fließendem Leitungswasser spülen
- OT für 2 Minuten in Aqua bidest stellen

- OT abtropfen lassen
- OT über Nacht bei 37°C im Trockenschrank trocknen

3.2.4 Mikrotomie

Von den in Paraffin eingebetteten Präparaten wurden mittels Schlittenmikrotom 5 µm dicke Schnitte angefertigt und in einem 37°C warmen, mit Aqua dest gefüllten Wasserbad gestreckt. Jeweils zwei aufeinander folgende Schnitte wurden auf einen mit APES beschichteten OT gezogen. Zum Trocknen wurden die Paraffinschnitte über Nacht in einen Trockenschrank bei 37°C gebracht.

3.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Mit Hilfe der HE-Färbung als Übersichtsfärbung ist eine Unterscheidung verschiedener Gewebe- und Zellstrukturen im mikroskopischen Bild möglich. Hämatoxylin als basischer Farbstoff färbt alle sauren Strukturen, insbesondere Zellkerne bzw. die darin enthaltene DNA. Bei Eosin hingegen handelt es sich um einen sauren Farbstoff, der an basische Komponenten, wie Zellplasma-Proteine, bindet und aufgrund dessen das Zytoplasma rot färbt.

Das Färbeprotokoll lautete wie folgt:

Entparaffinieren und Rehydrieren

- 3 × 10 Minuten Xylol
- 1 × 5 Minuten 100 %iger Alkohol
- 1 × 5 Minuten 96 %iger Alkohol
- 1 × 5 Minuten 80 %iger Alkohol
- 1 × 5 Minuten 70 %iger Alkohol
- 1 × 5 Minuten 50 %iger Alkohol
- 1 × 5 Minuten Aqua dest

Färbung und Gegenfärbung

- 30 bis 60 Sekunden Hämatoxylin
- 10 Minuten in fließendem Leitungswasser bläuen
- 5 bis 6 Minuten 1 %iges Eosin
- kurz in Leitungswasser spülen

Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe

- kurz 70 %iger Alkohol
- kurz 80 %iger Alkohol
- 1 x 2 Minuten 80 %iger Alkohol
- 2 x 2 Minuten 96 %iger Alkohol
- 3 x 2 Minuten 100 %iger Alkohol
- 3 x 10 Minuten Xylol

Abschließend erfolgte ein Eindecken der gefärbten Schnitte mittels Vitro-Clud.

Die Auswertung der HE-Färbungen und die Herstellung der Abbildungen für den Ergebnisteil wurden mit Hilfe des Photolichtmikroskops Axiophot durchgeführt. Folgende Objektive kamen dabei zum Einsatz: Plan-Apochromat[®] 20x/0,6 und Plan-Neofluar[®] 40x/1,30 Öl. Die Bildaufnahme und -bearbeitung sowie Archivierung erfolgten mit Hilfe der Software analySIS[®].

3.4 Immunhistochemie

3.4.1 Allgemeine Vorbemerkung

Ziel der IHC ist es, mittels Antigen-Antikörper-Reaktionen definierte Epitope in Gewebeschnitten zu lokalisieren. Zur Detektion der nachfolgenden Proteine in Paraffinschnitten wurde die jeweilige IHC nach dem Prinzip der so genannten ABC-Methode durchgeführt. Diese indirekte Färbemethode basiert auf der hohen Affinität von Avidin zu Biotin. Zunächst bindet ein unkonjugierter primärer Antikörper spezifisch an das Antigen im Präparat und wird dann mit Hilfe eines biotinylierten sekundären Antikörpers (= Brückenantikörper) nachgewiesen, welcher gegen den ersten Antikörper gerichtet ist. Danach folgen ein vorgeformter Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex und schließlich die Substrat-Chromogen-Reaktion.

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden kommerziell erhältliche Primär- und Sekundärantikörper, Detektionssysteme und Farbstoffe und ein im Labor von Prof. J. I. Mason aus Kaninchen hergestellter polyklonaler 3 β -HSD-Antikörper verwendet (Mason et al. 2004). Eine Übersicht über die verwendeten Antikörper inklusive Gewebefixierung und Antigen-Demaskierung liefert Tab. 2.

Tab. 2 IHC: eingesetzte Primär- und Sekundärantikörper.

Primärantikörper	Verdünnung	Gewebe- fixierung	Antigen- Retrieval
AR (N-20): sc-816 aus Kaninchen (polyklonal)	1:250	Bouin	Ja
β-Gal (ab616) aus Kaninchen (polyklonal)	1:1000	Bouin	Nein
3β-HSD aus Kaninchen (polyklonal)	1:3000	Bouin	Ja
GATA-1 (N6): sc-265 aus Ratte (polyklonal)	1:50	10 % NBF	Ja
Ki-67 (SP6) aus Kaninchen (monoklonal)	1:2000	10 % NBF	Ja
MIS (C-20): sc-6886 aus Ziege (polyklonal)	1:500	Bouin	Nein
Vimentin (C-20): sc-7557 aus Kaninchen (polyklonal)	1:100	Bouin	Ja
Sekundärantikörper, biotinyliert	Protein	Verdünnung	
Ziege Anti-Kaninchen IgG, E0432	AR	1:400	
	β-Gal	1:400	
	3β-HSD / Ki-67	1:200	
	Vimentin	1:100	
Kaninchen Anti-Ziege IgG, E0466	AMH	1:800	
Kaninchen Anti-Ratte IgG, BA-4000	GATA-1	1:250	

Bei den nachfolgenden Färbeprozessen wurde jeweils ein Schnitt als Negativkontrolle mitgeführt und wie im Protokoll beschrieben behandelt, ausgenommen die Inkubation mit dem Primärantikörper, welche durch Inkubation mit BSA-Blockpuffer ersetzt wurde. Das Gewebe blieb in allen Fällen vollständig unmarkiert.

3.4.2 Vimentin

Das immunhistochemische Protokoll zur Detektion von Vimentin lautete wie folgt:

Tag 1:

Gewebevorbehandlung (Entparaffinieren und Rehydrieren)

- 3 × 10 Minuten Xylol
- 1 × 5 Minuten 100 %iger Alkohol
- 1 × 5 Minuten 96 %iger Alkohol
- 1 × 5 Minuten 80 %iger Alkohol
- 1 × 5 Minuten 70 %iger Alkohol
- 1 × 5 Minuten 50 %iger Alkohol
- 1 × 5 Minuten Aqua dest
- 1 × 5 Minuten in Tris-Waschpuffer (Schüttler)

Demaskierung der Antikörper-Bindungsstellen mittels Mikrowellenbehandlung

- OT in Citratpuffer verbringen
- bei 800 W erhitzen bis Citratpuffer kocht (ca. 4 Minuten)
- 3 x 5 Minuten bei 465 W inkubieren
- OT für 20 Minuten im Citratpuffer bei RT abkühlen lassen
- 2 x 5 Minuten in Tris-Waschpuffer (Schüttler)

Blockierung der endogenen Peroxidase

- OT für 30 Minuten bei RT in 3 % igem H₂O₂ inkubieren (Schüttler)
- 2 x 5 Minuten in Tris-Waschpuffer (Schüttler)

Blockierung unspezifischer Bindungsstellen

- OT für 30 Minuten bei RT in BSA-Blockpuffer inkubieren (Schüttler)

Inkubation mit Primärantikörper

- Antikörper Vimentin (C-20): sc-7557 mit BSA-Blockpuffer 1:100 verdünnen
- Schnitte mit DAKO-Pen umkreisen
- 60 µl der Verdünnung auf einen Schnitt pro OT pipettieren
- auf dem mitgeführten Kontrollschnitt 60 µl BSA-Blockpuffer pipettieren
- Inkubation über Nacht bei 4°C in feuchter Kammer

Tag 2:

Inkubation mit Sekundärantikörper

- Antikörper E0432 mit BSA-Blockpuffer 1:100 verdünnen
- 2 x 5 Minuten in Tris-Waschpuffer (Schüttler)
- Verdünnung des Antikörpers mit BSA-Blockpuffer
- je 60 µl der Verdünnung auf beide Schnitte pro OT pipettieren
- Inkubation für 60 Minuten bei RT in feuchter Kammer

Inkubation mit Vectastain Elite ABC Standard Kit - Peroxidase

- 2 x 5 Minuten in Tris-Waschpuffer (Schüttler)
- ABC-Lösung nach Herstellerangaben ansetzen (mindestens 30 Minuten vor Gebrauch): 1 Tropfen Lösung A + 1 Tropfen Lösung B in 2,5 ml Tris-Waschpuffer

- je 1 bis 2 Tropfen ABC-Lösung auf beide Schnitte aufbringen
- 60 Minuten bei RT in feuchter Kammer inkubieren

Farbreaktion mit Peroxidase-Substratkit AEC

- 2 x 5 Minuten in Tris-Waschpuffer (Schüttler)
- Färbelösung ansetzen: 1 Tropfen AEC auf 300 µl Substratpuffer (im Kit enthalten)
- je 60 µl der Färbelösung auf beide Schnitte pipettieren
- Inkubation bei RT für 5 Minuten

Gegenfärbung und Eindecken

- 3 x 3 Minuten in Aqua dest (Schüttler)
- ca. 5 Sekunden mit Hämatoxylin gegenfärben
- 5 Minuten in Leitungswasser bläuen
- OT in Aqua dest verbringen
- Eindecken der OT mit Glycerin-Gelatine

3.4.3 Anti-Müller-Hormon

Das hierfür verwendete Protokoll entspricht dem unter Kapitel 3.4.2 genannten Färbeprotokoll mit folgenden Änderungen:

Demaskierung der Antikörper-Bindungsstellen mittels Mikrowellenbehandlung

Für die Detektion des AMH war kein Antigen-Retrieval erforderlich.

Inkubation mit Primärantikörper

Eingesetzt wurde der Antikörper MIS (C-20): sc-6886 in einer Verdünnung von 1:500.

Inkubation mit Sekundärantikörper

Verwendet wurde der Antikörper E0466 in einer Verdünnung von 1:800.

Farbreaktion mit Peroxidase-Substratkit AEC

Die Inkubation erfolgte für 10 Minuten.

3.4.4 Androgenrezeptor

Das hierfür verwendete Protokoll entspricht dem unter Kapitel 3.4.2 genannten Färbeprotokoll mit folgenden Änderungen:

Inkubation mit Primärantikörper

Eingesetzt wurde der Antikörper AR (N-20): sc-816 in einer Verdünnung von 1:500.

Inkubation mit Sekundärantikörper

Verwendet wurde der Antikörper E0432 in einer Verdünnung von 1:400.

Farbreaktion mit Peroxidase-Substratkit AEC

Die Inkubation erfolgte für 15 Minuten.

3.4.5 GATA-1

Das hierfür verwendete Protokoll entspricht dem unter Kapitel 3.4.2 genannten Färbeprotokoll mit folgenden Änderungen:

Inkubation mit Primärantikörper

Eingesetzt wurde der Antikörper GATA-1 (N6): sc-265 in einer Verdünnung von 1:50.

Inkubation mit Sekundärantikörper

Verwendet wurde der Antikörper BA-4000 in einer Verdünnung von 1:250.

Farbreaktion mit Peroxidase-Substratkit AEC

Die Inkubation erfolgte für 10 Minuten.

3.4.6 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase

Das hierfür verwendete Protokoll entspricht dem unter Kapitel 3.4.2 genannten Färbeprotokoll mit folgenden Änderungen:

Inkubation mit Primärantikörper

Eingesetzt wurde der von Prof. J. I. Mason zur Verfügung gestellte Antikörper 3 β -HSD in einer Verdünnung von 1:3000.

Inkubation mit Sekundärantikörper

Verwendet wurde der Antikörper E0432 in einer Verdünnung von 1:200.

Farbreaktion mit Peroxidase-Substratkit DAB

Als Färbelösung kam nicht AEC, sondern DAB zum Einsatz, die Inkubation erfolgte für 10 Minuten.

3.4.7 Ki-67

Das hierfür verwendete Protokoll entspricht dem unter Kapitel 3.4.2 genannten Färbeprotokoll mit folgenden Änderungen:

Inkubation mit Primärantikörper

Eingesetzt wurde der Antikörper Ki-67 (SP6) in einer Verdünnung von 1:2000.

Inkubation mit Sekundärantikörper

Verwendet wurde der Antikörper E0432 in einer Verdünnung von 1:200.

Farbreaktion mit Peroxidase-Substratkit DAB

Als Färbelösung kam nicht AEC, sondern DAB zum Einsatz, die Inkubation erfolgte für 10 Minuten.

3.4.8 β -Galaktosidase

Das hierfür verwendete Protokoll entspricht dem unter Kapitel 3.4.2 genannten Färbeprotokoll mit folgenden Änderungen:

Demaskierung der Antikörper-Bindungsstellen mittels Mikrowellenbehandlung

Für die Detektion der β -Gal war kein Antigen-Retrieval erforderlich.

Inkubation mit Primärantikörper

Eingesetzt wurde der Antikörper β -Gal (ab616) in einer Verdünnung von 1:1000.

Inkubation mit Sekundärantikörper

Verwendet wurde der Antikörper E0432 in einer Verdünnung von 1:400.

Farbreaktion mit Peroxidase-Substratkit DAB

Als Färbelösung kam nicht AEC, sondern DAB zum Einsatz, die Inkubation erfolgte für 4 Minuten.

3.4.9 Mikroskopische Auswertung und Dokumentation

Die Auswertung der verschiedenen Immunreaktionen und die Herstellung der Abbildungen für den Ergebnisteil wurden mit Hilfe des Photolichtmikroskops Axiophot durchgeführt. Folgende Objektive kamen dabei zum Einsatz: Plan-Apochromat[®] 20x/0,6 und Plan-Neofluar[®] 40x/1,30 Öl. Die Bildaufnahme und -bearbeitung sowie Archivierung erfolgte mit Hilfe der Software analySIS[®].

3.5 TUNEL-Färbung

Zur Darstellung apoptotischer Zellen auf biochemischer Ebene wurde die so genannte TUNEL-Färbung gemäß dem ApopTag[®] Kit (S7100) durchgeführt. Die TUNEL-Technik ermöglicht, durch Apoptose entstandene DNA-Strangbrüche spezifisch zu markieren und für das Lichtmikroskop sichtbar zu machen. An die durch DNA-Fragmentierung entstandenen freien 3'-Hydroxyl-Enden werden mittels des Enzyms terminale Desoxynukleotidyltransferase Digoxigenin-gekoppelte Nukleotide gebunden. Anschließend erfolgt eine entsprechende Antigen-Antikörper-Chromogen-Reaktion, wobei der Anti-Digoxigenin-Antikörper an das Enzym Peroxidase gekoppelt ist.

Die TUNEL-Färbung erfolgte in Anlehnung an das Herstellerprotokoll:

Entparaffinieren und Rehydrieren

- 4 × 5 Minuten Xylol
- 3 × 5 Minuten 100 %iger Alkohol
- 1 × 3 Minuten 95 %iger Alkohol
- 1 × 3 Minuten 70 %iger Alkohol
- 2 × 5 Minuten PBS-Puffer (Schüttler)

Vorbehandlung mit Proteinase K

- OT in 48 ml PBS mit 60 µl Proteinase K Stammlösung verbringen
- 30 Minuten bei RT inkubieren

- 2 x 2 Minuten in Aqua dest waschen (Schüttler)

Blockierung der endogenen Peroxidase

- OT für 5 Minuten bei RT in 3 % igem H₂O₂ inkubieren (Schüttler)
- 2 x 5 Minuten in PBS-Puffer waschen (Schüttler)

Inkubation mit Equilibration Buffer:

- Equilibration Buffer (im Kit enthalten) unverdünnt auf die Schnitte auftragen
- mindestens 10 Sekunden maximal 1 Stunde bei RT inkubieren

Inkubation mit TdT-Enzymen:

- TdT-Enzyme (im Kit enthalten) mit Reaction Buffer (im Kit enthalten) in der Verdünnung 1:5 ansetzen
- auf jeden Schnitt 20 µl aufpipettieren und mit Folie (im Kit enthalten) abdecken
- 1 Stunde bei 37°C inkubieren
- bei Negativkontrolle: Reaction Buffer ohne TdT-Enzyme aufpipettieren

Stoppen und Waschen:

- 1, 5 ml Stop/Wash Buffer (im Kit enthalten) mit 50 ml Aqua dest ansetzen
- OT darin 15 Sekunden gut schütteln
- dann noch 10 Minuten auf Schüttler stellen
- 4 x 1 Minute in PBS-Puffer waschen

Inkubation in Anti-Digoxigenin-Peroxidase:

- 20 µl der Anti-Digoxigenin-Peroxidase (im Kit enthalten) auf jeden Schnitt auftragen und mit Folie (im Kit enthalten) abdecken
- 30 Minuten bei RT inkubieren
- 5 x 2 Minuten in PBS-Puffer waschen

Farbreaktion mit Peroxidase-Substratkit DAB

- Färbelösung ansetzen: 1 Tropfen DAB auf 300 µl Substratpuffer (im Kit enthalten)
- je 60 µl der Färbelösung auf die Schnitte pipettieren
- Inkubation bei RT für 5 Minuten
- 3 x 5 Minuten in Aqua dest waschen (Schüttler)

Gegenfärbung und Eindecken

- ca. 10 Sekunden mit Hämatoxylin gegenfärben
- 5 Minuten in Leitungswasser bläuen

Entwässern und Eindecken:

- 1 x 3 Minuten 70 %iger Alkohol
- 1 x 3 Minuten 80 %iger Alkohol
- 1 x 3 Minuten 100 %iger Alkohol
- 1 x 3 Minuten Isopropanol
- 2 x 5 Minuten Xylol
- Eindecken in EUKITT[®]

Die Auswertung der TUNEL-Färbung und die Herstellung der Abbildungen für den Ergebnisteil wurden mit Hilfe des Photolichtmikroskops Axiophot durchgeführt. Folgende Objektive kamen dabei zum Einsatz: Plan-Apochromat[®] 20x/0,6 und Plan-Neofluar[®] 40x/1,30 Öl. Die Bildaufnahme und -bearbeitung sowie Archivierung erfolgten mit Hilfe der Software analySIS[®].

3.6 Extraktion und Isolation von RNA und Proteinen aus Gefriermaterial

3.6.1 Allgemeine Vorbemerkung und Gefrierfixierung

Die notwendige Gewinnung von Proteinen für die WB Analyse (siehe Kapitel 3.8) und RNA für die Real-Time PCR (siehe Kapitel 3.9) erfolgte an Gesamthodenhomogenat mittels TRIzol[®]-Reagenz. Dafür wurden die entsprechenden Hoden zunächst mittels Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff bei -196° C direkt nach ihrer Entnahme fixiert und im Anschluss bei -80° C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

3.6.2 Extraktion und Isolation mittels TRIzol[®]-Reagenz

Zum Schutz der RNA vor einem Abbau durch RNasen sowie zum Schutz vor einer Kontamination der Proben wurden folgende Vorbereitungen getroffen:

- Arbeitsplatz mit 100 %igem Ethanol und RNase-AWAY[®] Reagent säubern
- verwendete Behälter und Instrumente aus Glas, Porzellan oder Metall für 4 Stunden bei 180° C sterilisieren
- Lösungen mit DEPC-Wasser ansetzen und bei 120° C autoklavieren

Die Extraktion und Isolation von RNA und Proteinen mittels TRIzol[®]-Reagenz erfolgte in Anlehnung an das Herstellerprotokoll:

Extraktion von RNA, DNA und Proteinen

- Hoden mit 500 µl TRIzol[®]-Reagenz homogenisieren (Ultra-Turrax[®] T8)
- 5 Minuten auf Eis stehen lassen
- 100 µl Chloroform zugeben und gut mischen
- 5 Minuten auf Eis stehen lassen
- 15 Minuten bei 4°C mit 12.000 UpM zentrifugieren (MIKRO 22R-Zentrifuge)

Nach der Zentrifugation sind drei Phasen zu erkennen. Die obere wässrige, farblose Phase enthält die RNA, die mittlere weiße Schicht die DNA und die untere wässrige, rote Phase die Proteine.

Isolation der RNA

1. Präzipitation:

- obere Phase vorsichtig abpipettieren und in ein neues Tube überführen
- mittlere und untere Phase bis zur weiteren Verarbeitung im Kühlschrank lagern
- gleiche Menge an Isopropanol (ca. 300 µl) zur oberen Phase pipettieren, dann mehrmals kippen
- 30 Minuten bei -20°C stehen lassen, danach mehrmals kippen
- 10 Minuten bei 4°C mit 12.000 UpM zentrifugieren

2. Waschen:

- Überstand verwerfen
- Pellet mit 500 µl 70 %igem Alkohol in DEPC-Wasser lösen
- kurz vortexen, so dass das Pellet hochschwimmt
- 10 Minuten auf Eis stellen
- 10 Minuten bei 4°C mit 12.000 UpM zentrifugieren
- diesen Waschschrift 1 x wiederholen

3. Resuspendieren:

- Überstand verwerfen
- Pellet für ca. 20 Minuten im Wärmeschrank bei 37°C trocknen

- 20 µl steriles DEPC-Aqua bidest auf das Pellet pipettieren
- kurz vortexen
- 10 Minuten ins Wasserbad (70°C) stellen
- kurz anzentrifugieren und wieder auf Eis stellen

Messung der RNA-Menge und Kontrolle der RNA-Qualität:

Die Konzentration der RNA-Lösung wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dabei wird aus der gemessenen Extinktion der Lösung (E_{260}) die RNA-Konzentration auf Grundlage der optischen Dichte ($OD_{260nm} = 40 \mu\text{g RNA / ml}$) errechnet. Um Auskunft über die Reinheit der RNA-Lösung zu erhalten, wurde zusätzlich eine Messung bei 280 nm durchgeführt. Die E_{260}/E_{280} -Rate sollte dabei zwischen 1,65 und 2,0 liegen. Abweichungen weisen auf Verunreinigung mit Proteinen oder Resten von Phenol hin.

Die einzelnen Arbeitsschritte lauten wie folgt:

- Kunststoff-Einmalküvetten (UVette[®]) mit 69 µl Tris-HCl-Puffer füllen und Leerwert bestimmen
- 1 µl RNA dazu pipettieren, gut mischen und RNA-Menge messen
- die übrige RNA bis zur Weiterverarbeitung bzw. Umwandlung in cDNA (siehe Kapitel 3.7) bei -80°C lagern

Isolation von Proteinen

1. DNA-Präzipitation:

- zur mittleren und unteren Phase 150 µl 100 %igen Alkohol pipettieren
- kurz vortexen
- 5 Minuten bei RT stehen lassen
- kurz vortexen
- 10 Minuten bei 4° C mit 12.000 UpM zentrifugieren

Ergebnis: DNA im Pellet, Proteine im Überstand.

2. Protein-Präzipitation:

- Überstand vorsichtig in eine neues Tube überführen
- 750 µl Isopropanol dazu pipettieren
- kurz vortexen

- 10 Minuten bei RT stehen lassen
- kurz vortexen
- 10 Minuten bei 4° C mit 12.000 UpM zentrifugieren

3. Waschen:

- Überstand abpipettieren und verwerfen
- zum Pellet 1 ml 96 %igen Alkohol in 0,3 M Guanidinhydrochlorid pipettieren
- vortexen, bis Pellet hochschwimmt
- 20 Minuten bei RT stehen lassen
- vortexen
- 10 Minuten bei 4° C mit 12.000 UpM zentrifugieren
- Waschen 2 x wiederholen
- Überstand verwerfen
- Pellet in 1 ml 70 %igem Alkohol in DEPC lösen
- 20 Minuten bei RT stehen lassen
- vortexen und dann 10 Minuten bei 4° C mit 12.000 UpM zentrifugieren

4. Pellet trocknen und resuspendieren:

- Überstand verwerfen
- Pellet im Wärmeschrank bei 37°C trocknen (ca. 15 bis 30 Minuten)
- 250 µl 1 %ige SDS-Lösung dazu pipettieren
- kurz vortexen
- für 1 bis 2 Stunden ins Wasserbad (70°C) bis Pellet sich aufgelöst hat, zwischendrin vortexen
- 10 Minuten bei 4° C mit 12.000 UpM zentrifugieren
- Überstand in ein neues Tube überführen

Messung der Protein-Konzentration (BCA-Methode):

Bei der Proteinbestimmung mittels BCA-Methode werden Cu^{2+} -Ionen durch Proteine zu Cu^{1+} -Ionen reduziert. Diese Ionen bilden mit der Bicinchinonsäure einen violetten Farbkomplex, der durch Absorptionsmessung bei 562 nm gemessen werden kann.

- BCA Protein Assay Reagent (Lösung A und B) bereitstellen

- 100 µl Lösung A + 2 µl Lösung B pro zu messende Probe mischen
- 95 µl der Mischung + 5 µl Proteinprobe in ein neues Tube pipettieren
- 30 Minuten bei 37°C im Wärmeschrank inkubieren

Die Messung der Menge an isoliertem Protein (Extinktion) erfolgte photometrisch:

- 100 µl Aqua dest in Kunststoff-Einmalküvette pipettieren und Leerwert bestimmen
- 100 µl der Protein-BCA-Mischung in eine neue Kunststoff-Einmalküvette einfüllen und Proteinmenge messen

Proteinlösungen bis zur Weiterverarbeitung im WB (siehe Kapitel 3.8) bei -20°C lagern, vorher aliquotieren (30 bis 60 µl pro Tube).

3.7 DNase-Verdau und cDNA-Synthese (RT-PCR)

3.7.1 Allgemeine Vorbemerkung

Für jede Probe wurde zunächst die gemäß Kapitel 3.6.2 gemessene RNA-Konzentration für die nachfolgende cDNA-Synthese mit sterilem DEPC-Aqua bidest auf 200 ng/µl normiert. Dabei wurden jeweils 30 µl normierte Gesamt-RNA hergestellt. Die Berechnung erfolgte anhand der nachfolgenden Formel:

$$200 \text{ ng/}\mu\text{l} \times 30 \mu\text{l} = \text{gemessene RNA-Menge (ng/}\mu\text{l)} \times X$$

mit **X** = einzusetzende RNA-Menge in µl

3.7.2 DNase-Verdau und cDNA-Synthese

DNase-Verdau

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

Reaktionsansatz pro Probe:

- 1 µl MgCl₂-Lösung (25 mM)
- 1 µl 10 x PCR Gold Buffer
- 1 µl DNase I, RNase free
- 0,25 µl RNase Inhibitor (40 U/µl)
- 6,65 µl der normierten RNA

- im Thermocycler für 10 Minuten bei 37°C inkubieren, um genomische DNA zu verdauen
- abschließend für 5 Minuten bei 75°C inkubieren, um die DNase-Aktivität wieder zu stoppen

cDNA-Synthese

Um RNA mit Hilfe einer PCR zu vervielfältigen, wandelt man zunächst die instabile RNA mittels der Reversen Transkriptase in eine stabilere cDNA um. In einer anschließenden PCR kann man durch den Einsatz von spezifischen Primern die gesuchte cDNA amplifizieren.

Reaktionsansatz pro Probe:

- 2 µl MgCl₂-Lösung (25 mM)
- 1 µl 10 × PCR Gold Buffer
- 4 µl dNTP Mix (10 mM)
- 0,5 µl Random Hexamers (50 µM)
- 0,5 µl RNase Inhibitor (20 U/µl)
- 0,5 µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/µl)
- 1,5 µl der DNA-freien RNA

Tubes in den Thermocycler stellen und folgendes Programm durchlaufen lassen:

- 8 Minuten bei 21°C (Primer lagern sich an)
- 15 Minuten bei 42°C (Reverse Transkription)
- 5 Minuten bei 99°C (Abbau der Reversen Transkriptase)
- Unbegrenzt bei 4°C (Kühlung der Produkte)

Es wurde noch ein weiterer Mix, wie oben beschrieben, jedoch mit 0,5 µl sterilem DEPC-Aqua anstatt der Reversen Transkriptase hergestellt und mit 1,5 µl der eingestellten RNA je Probe vermischt. Das Protokoll im Thermocycler entsprach ebenfalls dem oben beschriebenen zur Herstellung der cDNA. Dadurch, dass keine Reverse Transkriptase zugesetzt wurde, erfolgte jedoch keine Umschreibung der RNA in cDNA. Diese „Kontroll-RNA“ diente dann der Überprüfung des Erfolgs des DNase-Verdau.

3.7.3 Überprüfung des DNase-Verdau und der RT-PCR

Um das Gelingen des DNase-Verdau und der cDNA-Synthese zu überprüfen, wurde eine PCR mit anschließender Gelelektrophorese durchgeführt. Zum Einsatz kam ein spezifisches Primerpaar für das Referenzgen β -Aktin (siehe Tab. 3). Diese Primer wurden im Rahmen der Real-Time PCR selbst ausgewählt und auf ihre Spezifität überprüft (siehe Kapitel 3.9.2).

Von jeder Probe wurden jeweils 1 μ l cDNA und 1 μ l Kontroll-RNA mit 24 μ l PCR-Mix gemischt. Dieser PCR-Mix wurde wie folgt hergestellt:

- 15 μ l steriles DEPC-Aqua bidest
- 5 μ l 5 x Green GoTaq[®] Flexi Buffer
- 2 μ l MgCl₂ (25 mM)
- 0,5 μ l dNTP Mix (10 mM)
- 0,5 μ l β -Aktin-Primer, vorwärts (10 pmol)
- 0,5 μ l β -Aktin-Primer, rückwärts (10 pmol)
- 0,5 μ l GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase (5 u/ μ l)

Das im Thermocycler verwendete Protokoll enthielt folgende Schritte:

- 2 Minuten bei 95°C Initiale Denaturierung der DNA -Doppelstränge
 - 30 Sekunden bei 95°C Denaturierung der DNA-Doppelstränge
 - 30 Sekunden bei 60°C Anlagerung der Primer
 - 7 Minuten bei 72°C Amplifikation der DNA
 - 7 Minuten bei 72°C Finale Amplifikationsphase
 - Unbegrenzt bei 4°C Kühlung der Produkte
- } x 40

Nach der Amplifikation wurden nun die PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Der genaue Ablauf war wie folgt:

Herstellung des 2 %igen Agarose-Gels:

- 0,6 g Agarose in 30 ml 1 x TAE-Ansatzpuffer (pH 8,0) suspendieren
- Agarose-Suspension in der Mikrowelle vorsichtig aufkochen und anschließend bei RT auf 65°C abkühlen lassen

- 3 µl SYBR[®] GREEN I dazu pipettieren und durch Schwenken mit dem Gel vermischen
- Agarose-Lösung luftblasenfrei in ein Geltablett gießen
- 30 Minuten bei RT erstarren lassen
- Probenkamm und Gummi-Endblöcke entfernen
- Geltablett in die Elektrophoresekammer einsetzen
- Elektrophoresekammer mit 1 × TAE-Laufpuffer (pH 8,0) bis ca. 1 cm oberhalb des Agarose-Gels füllen

Vorbereiten des Markers:

- 2 µl PCR 100 bp Low Ladder mit
- 2 µl 6 × DNA Loading Dye und
- 8 µl Aqua bidest mischen

Anschließend wurden 12 µl vom Marker und jedem PCR-Produkt in jeweils eine Geltasche pipettiert. Die Laufzeit betrug 45 Minuten bei 120 Volt (Energilieferant: PowerPac 200).

Die Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese wurden mit Hilfe des Transilluminators UVsolo L dargestellt, fotografiert und gespeichert. Mittels Thermal printer Mitsubishi P93E wurden diese zudem auf Fotopapier gedruckt.

Es kamen nur diejenigen cDNA-Proben in der Real-Time PCR zum Einsatz, die in der Gelelektrophorese nur eine einzige spezifische Bande für das aus der cDNA hergestellte PCR-Produkt und keine Bande zur Überprüfung des DNase-Verdaus zeigten.

3.7.4 Aufreinigung der cDNA

Vor dem Einsatz der cDNA in der Real-Time PCR wurde eine Aufreinigung mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgte in Anlehnung an das Herstellerprotokoll. Sämtliche Puffer, Säulchen und Tubes sind in diesem Kit enthalten.

Vorarbeiten:

- PB-Puffer-Gebrauchslösung: 120 µl pH-Indikator I zu 30 ml PE-Puffer geben
- PE-Puffer-Gebrauchslösung: 24 ml 100 %igen Alkohol hinzufügen

Der genaue Ablauf war wie folgt:

- 5 Volumeneinheiten PB-Puffer (250 µl) zu 1 Volumeneinheit der cDNA (50 µl) dazu pipettieren und mischen
- zur DNA-Bindung:
obiges cDNA-Puffer-Gemisch jeweils in ein QIAquick-Säulchen pipettieren und bei 13.000 UpM für 30-60 Sekunden zentrifugieren
- anschließend Durchfluss verwerfen und die Säulchen wieder im jeweiligen 2 ml Sammeltube platzieren
- zum Waschen:
750 µl PE-Puffer auf jedes Säulchen pipettieren und 30-60 Sekunden zentrifugieren (13.000 UpM)
- anschließend Durchfluss erneut verwerfen und die Säulchen wieder im jeweiligen 2 ml Sammeltube platzieren
- erneut 60 Sekunden zentrifugieren (13.000 UpM)
- jedes Säulchen in einem neuen 1,5 ml Tube mit Deckel platzieren (2 ml Sammeltube verwerfen)
- zum Lösen der DNA:
50 µl EB-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) ins Zentrum der Membran pipettieren und erneut für 30-60 Sekunden zentrifugieren (13.000 UpM)
- Säulchen verwerfen und aufgereinigte cDNA in den 1,5 ml Tubes bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C lagern

3.8 Western Blot-Analyse

3.8.1 Allgemeine Vorbemerkung

Beim eingesetzten WB-Verfahren wurden die Komponenten einer Proteinmischung mittels Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht in einzelne Proteinbanden aufgetrennt. Anschließend erfolgte der Transfer dieser aufgetrennten Proteine durch Elektroblothing auf eine Trägermembran. Auf der Membran wurden die Proteine dann

einer Nachweisreaktion unterzogen, analog zur IHC kam die so genannte ABC-Methode (siehe Kapitel 3.4.1) zum Einsatz.

Für jede Probe wurde zunächst die gemäß Kapitel 3.6.2 gemessene Protein-Konzentration mit 1 %iger SDS-Lösung verdünnt. Dabei wurden jeweils 11,7 µl normiertes Gesamtprotein hergestellt. Die Berechnung erfolgte anhand der nachfolgenden Formel:

Gewünschte (normierte) Protein-Konzentration (µg/ml) × 11,7 µl = gemessene Protein-Konzentration (µg/ml) × **X**

mit **X** = einzusetzende Protein-Menge in µl

3.8.2 Probenvorbereitung

- Proteinproben auftauen und kurz vortexen
- 11,7 µl der normierten Probe mit 4,5 µl 4 × NuPAGE® LDS Sample Buffer und 1,8 µl 10 × NuPAGE® Sample Reducing Agent vermischen
- Proben-Mix kurz vortexen und anzentrifugieren
- dann für 10 Minuten bei 70°C ins Wasserbad

3.8.3 Gelelektrophorese

- 50 ml 20 × NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer mit 950 ml Aqua bidest verdünnen (für Außenkammer)
- 200 ml 1 × NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer mit 500 µl NuPAGE® Antioxidant versetzen (für Innenkammer)
- NuPAGE® Novex® 10 % Bis-Tris Mini Gel (1.0 mm × 12 wells) aus der Verpackung nehmen und Klebestreifen vom Boden der Gelkassette entfernen
- Gelkamm aus der Kammer lösen und die Geltaschen sowie restliche Gelkassette mit Aqua bidest spülen
- Gelkassette in die XCell SureLock™ Elektrophoresekammer einbauen
- innere Gelkammer mit 1 × NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer + Antioxidant und äußere Gelkammer mit 1 × NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer befüllen
- 5 µl vom Marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) und 15 µl von jedem Proben-Mix in jeweils eine Geltasche pipettieren
- Elektroden mit Stromgeber (Standard Power Pack P25) verbinden und SDS-Gelelektrophorese bei einer konstanten Spannung von 200 V für 60 Minuten laufen lassen

3.8.4 Elektroblothing

Unmittelbar nach Abschluss der Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine im „Semi-Dry-Blot-Verfahren“ auf eine Trägermembran transferiert:

- Sponge Pads, Nitrozellulose-Membran (mit 0,45 µm Porengröße) sowie Filterpapiere in 1 x NuPAGE® Transfer Buffer einweichen
- Gel nach Beendigung der Elektrophorese aus der Kammer nehmen, die obere Plastikplatte mit Hilfe des Gelmessers ablösen und die Einfüllspuren abtrennen
- eingeweichtes Filterpapier auf das Gel legen, alles umdrehen und nun Gel + Filterpapier von der unteren Plastikplatte lösen
- Blotting-Sandwich in dem XCell II™ Blot Module wie folgt aufbauen (luftblasenfrei von unten nach oben):
 - 3 Sponge Pads
 - Filterpapier
 - Nitrozellulose-Membran
 - Gel
 - Filterpapier
 - 2 Sponge Pads
- Blot-Modul in die XCell SureLock™ Kammer einsetzen und mit 1 x NuPAGE® Transfer Buffer befüllen
- äußere Kammer mit Aqua dest auffüllen
- Deckel auf die Einheit setzen und Elektroden mit dem Stromgeber verbinden; das Blotten fand bei einer konstanten Spannung von 30 V für 60 Minuten statt

3.8.5 Nachweisreaktion für Anti-Müller-Hormon und GATA-1

Nach Ende des Blotvorgangs wurde mittels ABC-Methode die Immunreaktion durchgeführt:

Blockierung unspezifischer Bindungsstellen:

- Nitrozellulose-Membran mit der dem Gel zugewandten Seite nach oben in eine Inkubationsschale legen
- Inkubationsschale mit Blockpuffer I füllen
- Membran unter langsamen Schwenken (Mini-Wippschüttler WT 16) für 30 Minuten bei RT blocken

- Blockpuffer I abkippen
- Membran für 3 × 5 Minuten in Waschpuffer II waschen (Wippschüttler)

Inkubation mit primärem Antikörper

Für den Nachweis von AMH und GATA-1 kamen die gleichen primären Antikörper wie in der IHC (siehe Tab. 2) zum Einsatz, allerdings mit einer anderen Verdünnung: AMH 1:200 und GATA-1 1:100.

- Herstellen der Primärantikörper-Verdünnung mittels Puffer III
- Membran darin über Nacht bei RT auf Wippschüttler inkubieren
- am nächsten Tag Primärantikörper-Verdünnung abkippen
- Membran für 3 × 5 Minuten in Puffer III waschen (Wippschüttler)

Inkubation mit sekundärem Antikörper

Für den Nachweis von AMH und GATA-1 kamen die gleichen sekundären Antikörper wie in der IHC (siehe Tab. 2) zum Einsatz, allerdings mit einer anderen Verdünnung: AMH 1:3000 und GATA-1 1:1000.

- Herstellen der Sekundärantikörper-Verdünnung mittels Puffer III
- Membran darin für 45 Minuten bei RT auf Wippschüttler inkubieren
- danach Sekundärantikörper-Verdünnung abkippen
- Membran für 4 × 5 Minuten in Puffer IV waschen (Wippschüttler)

Inkubation mit Vectastain Elite ABC Standard Kit – Peroxidase

- ABC-Lösung nach Herstellerangaben ansetzen (mindestens 30 Minuten vor Gebrauch): 1 Tropfen Lösung A + 1 Tropfen Lösung B in 2,5 ml PBS-Puffer
- Membran darin für 45 Minuten bei RT auf Wippschüttler inkubieren
- danach ABC-Lösung abkippen
- Membran für 2 × 5 Minuten in Puffer IV waschen (Wippschüttler)
- Membran für 2 × 5 Minuten in PBS-Puffer waschen (Wippschüttler)

Farbreaktion

- TrueBlue™ Peroxidase Substrate-Lösung auf die Membran geben
- Membran für 2 bis 5 Minuten unter dem Abzug im Dunkeln darin inkubieren

- danach Visualisierungslösung abkippen
- Membran für 3 × 5 Minuten in Aqua bidest waschen (Wippschüttler)
- Membran im Dunkeln im Trockenschrank bei 37°C trocknen lassen

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

3.8.6 Dokumentation

Zur digitalen Archivierung sowie zur Herstellung von Abbildungen für den Ergebnisteil wurden sämtliche Membranen mit Hilfe des Canon PIXMA MP510 eingescannt.

3.9 Real-Time PCR

3.9.1 Allgemeine Vorbemerkung

Eine der modernsten Methoden zur absoluten oder relativen Quantifizierung von Nukleinsäuren wie mRNA ist die Real-Time PCR. Mittels Fluoreszenz-Messungen nach jedem PCR-Zyklus ermöglicht diese Methode eine Quantifizierung der PCR-Amplifikate in Echtzeit. Die Zunahme der Fluoreszenz ist dabei proportional zum gebildeten PCR-Produkt. In der vorliegenden Arbeit kam als Fluoreszenzfarbstoff der interkalierende DNA-Farbstoff SYBR Green I zum Einsatz. Darüber hinaus wurde eine relative Quantifizierung durchgeführt, die auf Vergleichsmessungen mit definierten Standards basiert, was man auch als Normalisierung der Expressionsergebnisse bezeichnet. Herangezogen wurden hierfür zwei konstant exprimierte und nicht regulierte Referenzgene (β -Aktin und Hsp90ab1) und zur Berechnung der Expressionsunterschiede die so genannte $\Delta\Delta C(t)$ -Methode (Livak und Schmittgen 2001). Um die relative Quantifizierung zusätzlich zu optimieren, erfolgte die Bestimmung der exakten Effizienzen der Amplifikation von Ziel- und Referenzgenen. Dafür wurde jeweils eine Standardkurve aus unterschiedlichen cDNA-Verdünnungsstufen erstellt und aus deren Steigung dann die eigentliche PCR-Effizienz bestimmt und in die Berechnung einbezogen. Diese effizienzkorrigierte relative Quantifizierung (Pfaffl 2001) mittels Real-Time PCR stellt bis dato die genaueste Form der mRNA-Quantifizierung dar.

3.9.2 Generierung der Primer

Um eine erfolgreiche Real-Time PCR-Reaktion und eine spezifische Amplifikation der Produkte zu gewährleisten, wurden bei der Primer-Generierung verschiedene Parameter (wie z. B. ein GC-Gehalt von 40-60 %) berücksichtigt. Das Design der Primer für die Ziel- und Referenzgene (Tab. 3) erfolgte dabei mit Hilfe der Beacon Designer Software, zusätzlich wurden die Basensequenzen mit Hilfe des „Basic Local Alignment Search Tools“ geblastet. Die eigentliche Herstellung der Primer erfolgte durch die Firma Eurofins MWG GmbH, Ebersberg. Vor dem Einsatz der Primer in der Real-Time PCR wurden diese aber zunächst noch in einer klassischen PCR-Reaktion mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese getestet. Zum Einsatz kam hierbei das unter Kapitel 3.7.3 beschriebene Protokoll, lediglich die Primer wurden verändert. Nur die Primerpaare, die zu einer einzelnen spezifischen Bande führten, wurden weiter genutzt. Dies traf auf sämtliche in Tab. 3 gelisteten Primer zu.

Tab. 3 Real-Time PCR: eingesetzte Primer.

Gen	Primer, vorwärts Primer, rückwärts	Länge Amplifikat	Effizienz
AMH	CCAACGACTCCCGCAGCTC CTTCCCGCCCATGCCACTC	93 bp	101,9 %
GATA-1	ACTCCCCAGTCTTTCAGGTGTATC TAAGGTGAGCCCCCAGGAAT	67 bp	86,3 %
β-Aktin	TTCCTTCTTGGGCATGGAGT TACAGGTCTTTGCGGATGTC	90 bp	88,2 %
Hsp90ab1	AAGAGAGCAAGGCAAAGTTTGAG TGGTCACAATGCAGCAAGGT	120 bp	87,6 %

3.9.3 Bestimmung der exakten Effizienzen und Schmelzkurvenanalyse

Vor dem eigentlichen Genexpressionsvergleich zwischen KO- und WT-Mäusen wurde für jedes Gen eine Real-Time PCR mit einer cDNA-Verdünnungsreihe im CFX96™ Real-Time PCR Detection System durchgeführt. Dies diente zum einen der Bestimmung der exakten Effizienzen für die untersuchten Zielgene AMH und GATA-1 sowie für die Referenzgene β-Aktin und Hsp90ab1. Zum anderen wurde zeitgleich eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um ein weiteres Mal die Spezifität der Amplifikation zu überprüfen.

Das Protokoll für jedes Gen lautete wie folgt:

Erstellung des Master-Mixes:

	pro Well	für 18 Wells + 2 Verlust, d. h. × 20
iQTM SYBR [®] Green Supermix	10 µl	200 µl
Primer, vorwärts (10 pmol)	0,6 µl	12 µl
Primer, rückwärts (10 pmol)	0,6 µl	12 µl
steriles DEPC-Aqua bidest	7,8 µl	156 µl
Gesamtvolumen	19 µl	380 µl

Erstellung der cDNA-Verdünnungsreihe:

Es wurde jeweils die cDNA einer WT-Maus eingesetzt und die einzelnen Verdünnungsstufen in getrennten Tubes nach folgendem Schema angesetzt:

- Tube1: 1 µl cDNA + 9 µl steriles DEPC-Aqua bidest (1:10)
- Tube2: 1 µl cDNA aus Tube1 + 9 µl steriles DEPC-Aqua bidest (1:100)
- Tube3: 1 µl cDNA aus Tube2 + 9 µl steriles DEPC-Aqua bidest (1:1000)
- Tube4: 1 µl cDNA aus Tube3 + 9 µl steriles DEPC-Aqua bidest (1:10000)

Alle Reaktionen mit einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden als Triplikate durchgeführt, das entsprechende Platten-Belegungsschema findet sich in Tab. 4. D. h., in 3 Wells der 96-Well Platte (Multiplate[™] 96-Well Unskirted PCR Plates, Low-Profile) wurde je 1 µl cDNA der gleichen Konzentration vorgelegt. Als Negativkontrolle (NTC) wurde in 3 weitere Wells je 1 µl steriles DEPC-Aqua bidest anstatt der cDNA pipettiert. Anschließend wurden in jedes Well 19 µl des Master-Mixes dazugegeben und vorsichtig gemischt. Die Platte wurde dann mit Hilfe eines Klebefilms (Microseal[®] 'B' Adhesive Seals) verschlossen und in das Real-Time PCR-Gerät verbracht.

Tab. 4 Real-Time PCR: Platten-Belegungsschema Verdünnungsreihe.

	1	2	3
A	unverdünnt	unverdünnt	unverdünnt
B	1:10	1:10	1:10
C	1:100	1:100	1:100
D	1:1000	1:1000	1:1000
E	1:10000	1:10000	1:10000
F	NTC	NTC	NTC

Amplifikations- und Schmelzkurvenprotokoll:

- 3 Minuten bei 95°C Initiale Denaturierung der cDN A-Doppelstränge
 - 10 Sekunden bei 95°C Denaturierung der cDNA-Doppe lstränge
 - 60 Sekunden bei 60°C Anlagerung der Primer/ Ampli fikation
 - Detektion von Fluoreszenz
- } x 40
- Nach 95°C für 10 Sekunden (Auftrennung der cDNA-D oppelstränge) erfolgte die Schmelzkurvenerstellung mit einer schrittweisen (0,5°C alle 5 Sekunden) Erhöhung der Temperatur von 65°C auf 95°C.

Die Detektion und die Auswertung erfolgten mit Hilfe der CFX Manager™ Software. Nur Primerpaare bzw. Amplifikate, die einen einzelnen spezifischen Schmelzkurvenpeak und eine aus der Steigung der Standardkurve errechnete Effizienz zwischen 85 und 105 % zeigten, wurden für die Experimente genutzt. Dies traf auf alle in Tab. 3 gelisteten Primer zu.

3.9.4 Genexpressionsvergleich für Anti-Müller-Hormon und GATA-1

Für den Vergleich der normalisierten Genexpression zwischen SCCx43KO^{-/-}- und WT-Mäusen bezüglich der Zielgene AMH und GATA-1 kam das in Tab. 5 abgebildete Platten-Belegungsschema zum Einsatz. Für alle Reaktionen wurden technische Triplikate angefertigt und Negativkontrollen mitgeführt.

Tab. 5 Real-Time PCR: Platten-Belegungsschema Genexpressionsvergleich.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	WT β-Aktin	WT β-Aktin	WT β-Aktin	WT Hsp90ab1	WT Hsp90ab1	WT Hsp90ab1	WT Zielgen	WT Zielgen	WT Zielgen
B	KO β-Aktin	KO β-Aktin	KO β-Aktin	KO Hsp90ab1	KO Hsp90ab1	KO Hsp90ab1	KO Zielgen	KO Zielgen	KO Zielgen
C	NTC β-Aktin	NTC β-Aktin	NTC β-Aktin	NTC Hsp90ab1	NTC Hsp90ab1	NTC Hsp90ab1	NTC Zielgen	NTC Zielgen	NTC Zielgen

Das allgemeine Protokoll für den Genexpressionsvergleich lautete wie folgt:

Erstellung des Master-Mixes pro Gen:

	pro Well	für 9 Wells + 2 Verlust, d. h. x 11
iQTM SYBR® Green Supermix	10 µl	110 µl
Primer, vorwärts (10 pmol)	0,6 µl	6,6 µl
Primer, rückwärts (10 pmol)	0,6 µl	6,6 µl
steriles DEPC-Aqua bidest	7,8 µl	85,8 µl
Gesamtvolumen	19 µl	209 µl

Die Mengen der Reagenzien blieben dabei für jedes Gen gleich, lediglich die Primer (siehe Tab. 3) wurden entsprechend variiert. Nach Herstellung des Master-Mixes wurde nach dem in Tab. 5 beschriebenen Pipettierplan zunächst 1 µl cDNA oder steriles DEPC-Aqua bidest vorgelegt und dann 19 µl Master-Mix hinzugefügt. Der Verschluss der Platte erfolgte wieder mit Hilfe des Klebefilms Microseal® 'B' Adhesive Seals. Das Thermocycler-Protokoll entsprach dem für die cDNA-Verdünnungsreihe (siehe Kapitel 3.9.3), und auch die Auswertung erfolgte mit der CFX Manager™ Software.

3.9.5 Sequenzierung der PCR-Produkte

Für AMH und GATA-1 wurde durch die Firma Scientific Research and Development GmbH, Bad Homburg, im Anschluss an den Genexpressionsvergleich eine Sequenzanalyse der Amplifikate durchgeführt.

Die PCR-Produkte wurden hierfür in einer separaten PCR mit einer anschließenden Agarose-Gelelektrophorese hergestellt. Die Vorgehensweise entsprach der unter

Kapitel 3.1.3 beschriebenen, jedoch mit folgenden Änderungen: Als Primer kamen die in Tab. 3 aufgeführten zum Einsatz und anstatt des GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain Detektionssystems wurden 6 µl Ethidiumbromid verwendet. Die Extraktion der cDNA aus dem Gel geschah mit Hilfe des GeneJET™ Gel Extraction Kit in Anlehnung an das Herstellerprotokoll:

- alle Arbeiten bei Raumtemperatur und mit Handschuhen durchführen
- alle Zentrifugationen erfolgen bei 12.000 UpM

1. Schritt:

- mit sterilem Skalpell DNA-Bande aus dem Agarose-Gel herausschneiden; so nah wie möglich an der DNA schneiden, um das Gel-Volumen gering zu halten
- Gel-Scheibchen in ein vorgewogenes 1,5 ml Tube verbringen und wiegen; Gewicht sollte unter 1 g liegen

2. Schritt:

- 1:1 Volumen Binding Buffer (im Kit enthalten) zum Gel-Scheibchen dazu pipettieren (d. h. Volumen Binding Buffer = Gewicht Gel-Scheibchen, Beispiel: 100 µl Binding Buffer zu 100 mg Gel)

3. Schritt:

- Gel-Mixtur für 10 Minuten bei 50-60°C im Wasserbad inkubieren bzw. so lange, bis Gel-Scheibchen vollständig gelöst ist
- um den Schmelzprozess zu unterstützen, den Tubeinhalt alle paar Minuten durch Schwenken mischen
- die Farbe von der Lösung prüfen: Eine gelbe Farbe zeigt einen optimalen pH für die DNA-Bindung an, wenn die Lösung orange oder violett ist, 10 µl 3 M Natrium-Acetat (pH 5,2; im Kit enthalten) hinzugeben und mischen

4. Schritt: bei DNA-Fragmentlängen von ≤ 500 bp

- 1:2 Volumen 100 % Isopropanol zur Gel-Lösung hinzugeben (z. B. 100 µl Isopropanol zu 100 mg Gel in 100 µl Binding Buffer)

5. Schritt:

- bis zu 800 µl aus dem löslich gemachten Gel (aus Schritt 3 oder 4) in eine GeneJET Purification Säule (im Kit enthalten) pipettieren
- 1 Minute zentrifugieren

- Durchfluss verwerfen und Säule zurück in das gleiche Sammel tube
6. Schritt: wenn aufgereinigte DNA zur Sequenzierung eingesetzt wird
- 100 µl Binding Buffer auf die GeneJET Purification Säule pipettieren und 1 Minute zentrifugieren, anschließend Durchfluss verwerfen und Säule zurück ins Sammel tube stellen
7. Schritt:
- 700 µl Wash Buffer (im Kit enthalten; vorab verdünnen mit 96-100% Ethanol) auf die Säule pipettieren und 1 Minute zentrifugieren, anschließend Durchfluss verwerfen und Säule zurück ins Sammel tube stellen
8. Schritt:
- leere Säule im Sammel tube für 1 Minute zentrifugieren, um restlichen Wash Buffer vollständig zu entfernen
9. Schritt:
- GeneJET Purification Säule in ein neues 1,5 ml Tube überführen
 - 50 µl Elution Buffer (im Kit enthalten) in das Zentrum der Säulenmembran pipettieren
 - 1 Minute zentrifugieren
10. Schritt:
- GeneJET Purification Säule verwerfen
 - aufgereinigte DNA im 1,5 ml Tube bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung lagern

Die so produzierten Amplifikate wurden in ihrem 1,5 ml Tube belassen, diese mit PARAFILM® verschlossen und an die oben genannte Firma per Post versendet. Für beide PCR-Produkte, AMH und GATA-1, war die Überprüfung der Nukleotid-Abfolge mittels DNA-Sequenzierung erfolgreich.

3.9.6 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte durch Herrn Dr. Klaus Failing, AG Biomathematik und Datenverarbeitung, Justus-Liebig-Universität Gießen, unter Zuhilfenahme der Software „BMDP Statistical Software Package, release 8.1“. Basierend auf dem Versuchsdesign (siehe Kapitel 3.1.6) wurde jeweils ein Wurfgeschwisterpaar, bestehend aus einer KO- und einer WT-Maus, als statistische Einheit betrachtet. Diesem entsprechend erfolgte für beide Gene (AMH und GATA-1) eine Berechnung der relativen Genexpression von KO-Maus zur WT-Maus innerhalb

jedes Wurfgeschwisterpaares. Anschließend wurde gegen den hypothetischen Mittelwert = 1 verglichen. Zum Einsatz kam hierfür der zweiseitige Einstichproben t-Test (Programm BMDP3D). Für die statistische Signifikanz der Genexpressionsunterschiede zwischen KO- und WT-Mäusen wurde ein p-Wert von $\leq 0,05$ zugrunde gelegt.

Im Vergleich zu den WT-Mäusen ist in pubertären und adulten KO-Mäusen die durchschnittliche Anzahl von SZ pro Tubulus signifikant erhöht (Brehm et al. 2007, Sridharan et al. 2007). Und dadurch, dass AMH und GATA-1 SZ-spezifisch exprimierte Gene sind, musste in der statistischen Analyse zusätzlich berücksichtigt werden, dass die mittels Real-Time PCR gemessenen Unterschiede in der Genexpression zwischen KO- und WT-Mäusen nicht allein auf der erhöhten SZ-Zahl in den KO-Mäusen beruhten. Folgender Korrekturfaktor wurde dafür berechnet: $(\bar{\text{SZ-Zahl pro Tubulusquerschnitt in WT-Maus}}) / (\bar{\text{SZ-Zahl pro Tubulusquerschnitt in KO-Maus}})$. Die durchschnittliche SZ-Zahl pro Tubulusquerschnitt wurde mit Hilfe von β -Gal-gefärbten Hoden (siehe Kapitel 3.4.7) bestimmt, indem immunpositive SZ in 20 Samenkanälchen von $n = 3$ Mäusen pro Genotyp (AMH: 15 Tage alte; GATA-1: adulte) gezählt wurden. Zum Einsatz kam das Photolichtmikroskop Axiophot bei einer Vergrößerung von $\times 400$. Für AMH wurde ein Korrekturfaktor von 0,68 (23/34) und für GATA-1 ein Faktor von 0,64 (20,5 / 32) errechnet und in die statistische Analyse einbezogen.

3.10 Semidünnschnitte und Transmissionselektronenmikroskopie

Zur Herstellung von Semidünnschnitten sowie Ultradünnschnitten wurden die Hoden in Kunstharz (Epon) eingebettet. Es wurde dabei wie folgt vorgegangen:

Gewebefixierung und Einbettung:

- Fixierung der Hoden für vier Stunden bei 4 °C in Yellow Fix
- nach kurzem Anfixieren werden die Proben zurechtgeschnitten (ca. 5 × 2 × 2 mm)
- 3 × für 10 Minuten in PBS-Puffer waschen
- Nachfixierung für zwei Stunden in 1 %igem OsO_4
- 3 × für 10 Minuten in PBS-Puffer waschen
- Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe:
 - 15 Minuten in 50 %igen Alkohol

- 15 Minuten in 70 %igen Alkohol
- 15 Minuten in 80 %igen Alkohol
- 15 Minuten in 96 %igen Alkohol
- 5 Minuten in 100 %igen Alkohol
- 3 x 40 Minuten in 100 %igen Alkohol
- 3 x für 10 Minuten in Xylol spülen
- Proben über Nacht in Xylol/Epon-Gemisch inkubieren und im Anschluss für 6 Stunden in reines Epon überführen (Silikon-Ausbettförmchen)
- abschließend im Brutschrank bei 60°C für 20 Stunden polymerisieren

Herstellung der Dünnschnitte:

Semidünnschnitte mit einer Schnittdicke von 1 µm und Ultradünnschnitte mit einer Schnittdicke von 80 nm wurden mit Hilfe des Reichert Ultracut-Mikrotoms angefertigt. Während die Semidünnschnitte nach Richardson gefärbt wurden, erfolgte bei den Ultradünnschnitten eine Kontrastierung im Reichert Ultrastainer mit Uranylacetat und Bleicitrat.

Auswertung und Dokumentation der Dünnschnitte:

Die Auswertung und Dokumentation der Semidünnschnitte erfolgte mittels Lichtmikroskopie, und zwar analog zu den immunhistochemischen Präparaten (siehe Kapitel 3.4.9). Hierfür wurden die Semidünnschnitte zunächst auf einen OT verbracht und mittels Epon eingedeckt, die Aushärtung erfolgte über Nacht bei 60°C im Wärmeschrank. Zur Auswertung der Ultradünnschnitte wurden diese zunächst auf Kupfer-Netze aufgezogen und dann mit Hilfe des Elektronenmikroskops EM 109 untersucht und dokumentiert.

4 ERGEBNISSE

4.1 Differenzierungszustand von Sertoli Zellen in SCCx43KO-Mäusen

4.1.1 Differenzierung auf biochemischer Ebene

4.1.1.1 Vimentin

Vimentin konnte im SZ-Zytoplasma von WT- und KO-Mäusen durchgängig von Tag 2 bis adult mittels IHC detektiert werden. Dabei variierte die Verteilung der Filamente altersabhängig von einer ausschließlich basalen Akkumulation in unreifen SZ (Abb. 20, A und B, Pfeile) zu einer perinukleären Lokalisation in reifen SZ (Abb. 20, C und D). Während in adulten Kontrollmäusen die typischen apikalen bzw. nach luminal gerichteten Filamentprojektionen auftraten (Abb. 20 C, Pfeile), zeigten sich diese Vimentinbündel in den KO-Mäusen deutlich verkürzt (Abb. 20 D, Pfeile).

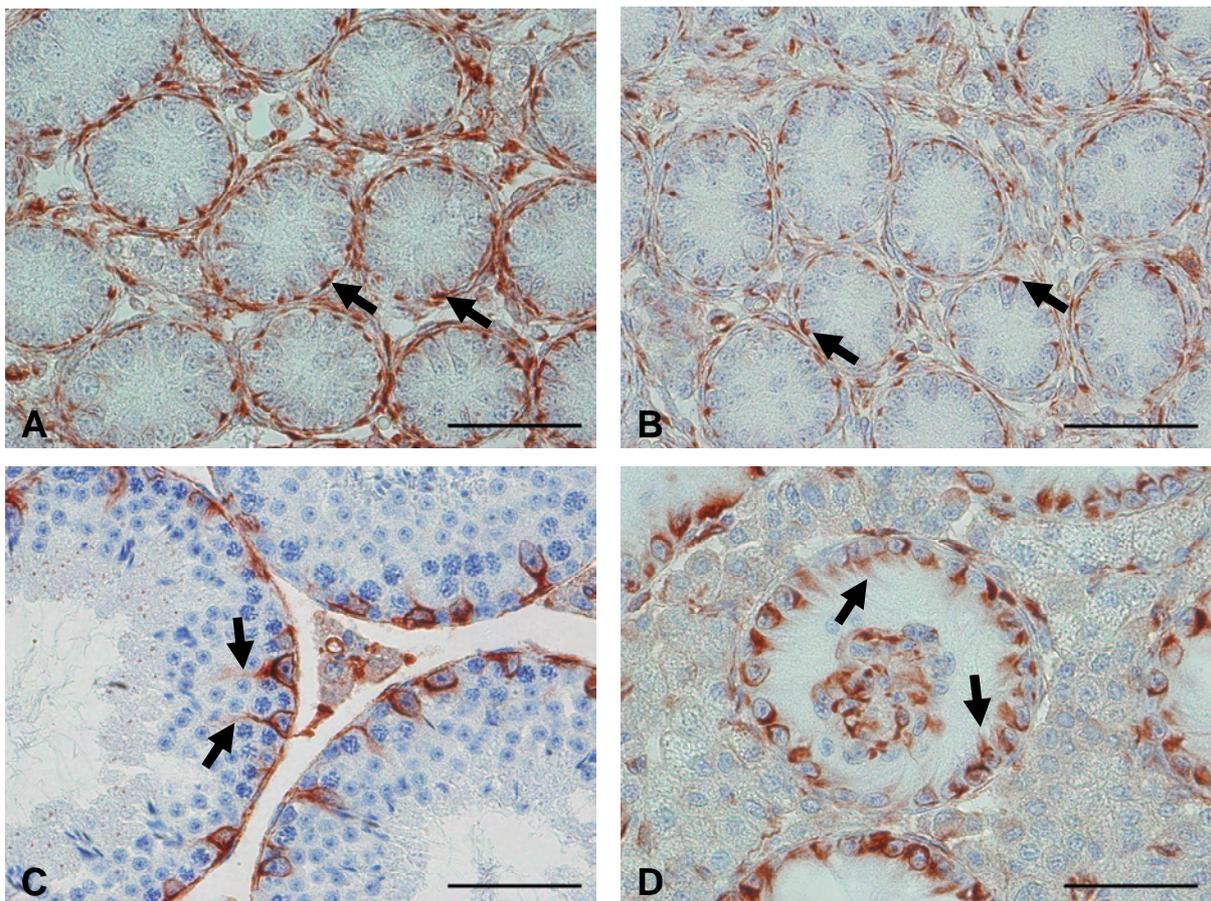


Abb. 20 SZ-Differenzierungszustand: Vimentin-IHC.

Vimentin-IHC in 5 Tage alten (A und B) und adulten (C und D) WT- (linke Spalte) und SCCx43KO^{-/-}-Maushoden (rechte Spalte). In beiden Genotypen variiert die Verteilung des SZ-Vimentins von einer nur basalen Akkumulation in unreifen SZ (A und B, Pfeile) zu einer perinukleären Lokalisation in reifen SZ (C und D). Die in adulten WT-Mäusen typischen apikalen Filamentprojektionen (C, Pfeile) erscheinen in den KO-Hoden deutlich verkürzt (D, Pfeile). Messbalken = 50 µm.

4.1.1.2 Anti-Müller-Hormon

Während präpubertär an den Tagen 2, 5 (Abb. 21, A und B), 7 und 8 eine eindeutige immunhistochemische Färbung für AMH im SZ-Zytoplasma von WT- und KO-Maus-hoden nachgewiesen werden konnte, zeigten adulte Tiere beider Genotypen (Abb. 21, C und D) keine AMH-Immunreaktion mehr, und zwar in sämtlichen Keimtubuli.

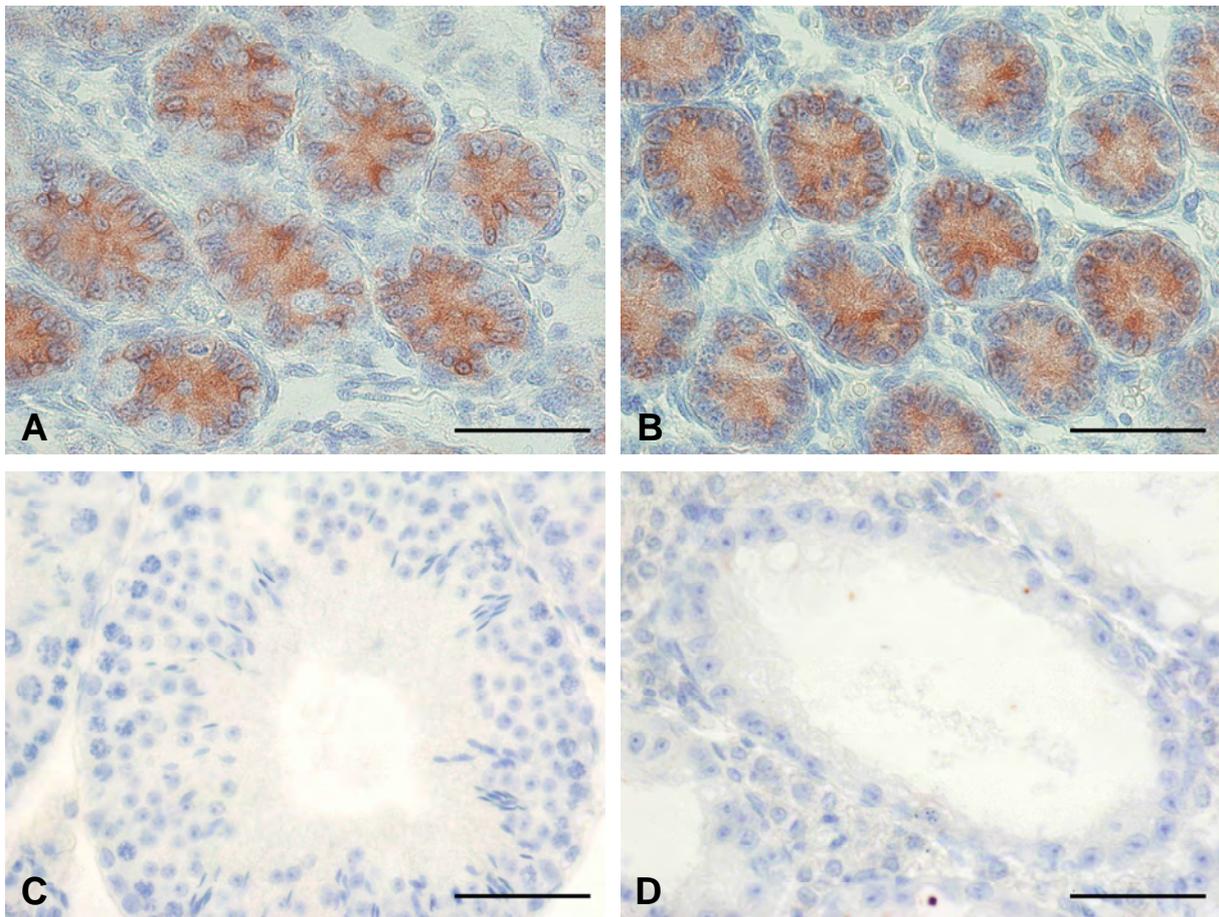


Abb. 21 SZ-Differenzierungszustand: AMH-IHC (präpubertär und adult).

IHC von AMH in 5 Tage alten (A und B) und adulten (C und D) WT- (linke Spalte) und SCCx43KO^{-/-}-Maus Hoden (rechte Spalte). Beide Genotypen zeigen in allen Samenkanälchen eine eindeutige SZ-zytoplasmatische AMH-Färbung am Tag 5 (A und B) und einen vollständigen Verlust der AMH-Immunreaktivität in adulten Mäusen (C und D). Messbalken = 50 μ m.

Im Zeitraum der Pubertät traten in den WT-Mäusen an den Tagen 10, 12 und 15 (Abb. 22 A) erste AMH-negative Tubuli auf. Bei diesen Tubuli handelte es sich um solche Samenkanälchen, die über eine fortgeschrittene Spermatogenese verfügten, sprich bei denen die KZ in die Meiose eingetreten und primäre Spermatozyten vorhanden sind. Ab Tag 17 (Abb. 22 C) konnte in den Kontrollmäusen kein immunhistochemisches Signal mehr für AMH detektiert werden. Im Gegensatz dazu offenbarten die SZ der KO-Wurfgeschwister an den Tagen 10, 12, 15 (Abb. 22 B), 17

(Abb. 22 D) und 19 ausschließlich immunpositive AMH-Samenkanälchen. Erst ab Tag 21 konnte dann auch in den Keimtubuli der KO-Tiere kein Signal mehr für AMH festgestellt werden.

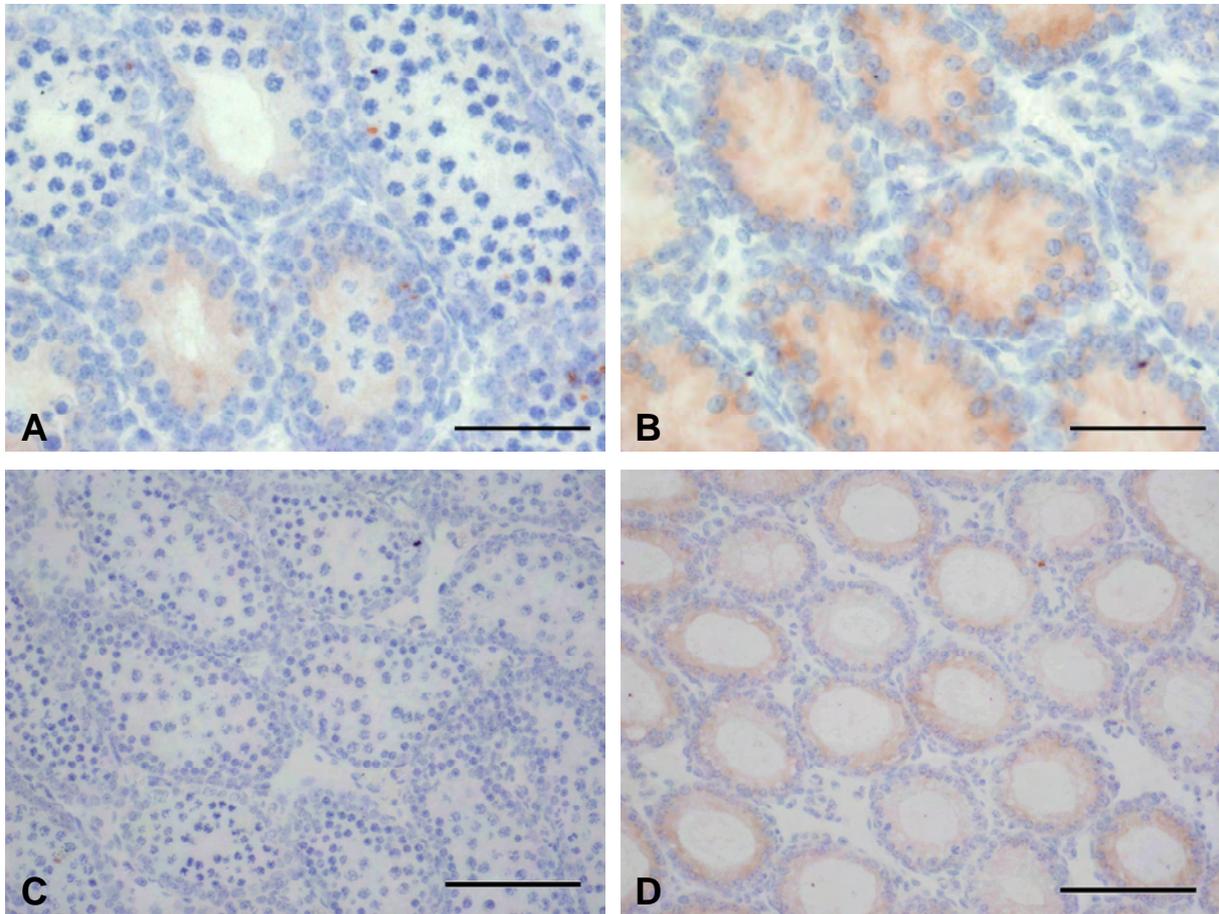


Abb. 22 SZ-Differenzierungszustand: AMH-IHC (pubertär).

IHC von AMH in 15 (A und B) und 17 Tage alten (C und D) WT- (linke Spalte) und SCCx43KO^{-/-}-Maus Hoden (rechte Spalte). In den WT-Mäusen zeigen sich an Tag 15 (A) erste AMH-negative Tubuli und an Tag 17 (C) sind alle Samenkanälchen negativ. Im Gegensatz dazu sind sowohl in 15 (B) wie auch in 17 Tage alten (D) KO-Mäusen sämtliche Keimtubuli AMH-positiv. Messbalken = 50 μ m (A und B), 100 μ m (C und D).

Die zur Detektion von AMH durchgeführten WB (Abb. 23 A) aus Hodenhomogenat von 15 Tage alten Mäusen zeigten eine deutlichere Bande für das AMH-Protein bei ca. 59,8 kDa in der KO-Maus (Abb. 23 A, Spur 1) im Vergleich zur WT-Maus (Abb. 23 A, Spur 2). Durch mitgeführte Negativkontrollen (d. h. keine Inkubation mit dem Primärantikörper) konnten die anderen Banden unspezifischen Reaktionen des Sekundärantikörpers zugeordnet werden (Abb. 23 A, Spur 3).

Nach Anwendung der Real-Time PCR (Abb. 23 B) ergab sich auf mRNA-Ebene eine statistisch signifikante ca. 1,7-fache Erhöhung der AMH-Genexpression in 15 Tage alten SCCx43KO^{-/-}-Mäusen verglichen mit ihren WT-Wurfgeschwistern (FC = 1,7038; SA = 0,2642; p = 0,0129). Dabei wurde der FC-Wert, der die x-fache Veränderung angibt, errechnet aus den gemessenen und gemittelten Genexpressionswerten der KO-Mäuse geteilt durch die der WT-Mäuse (n = 4 pro Genotyp).

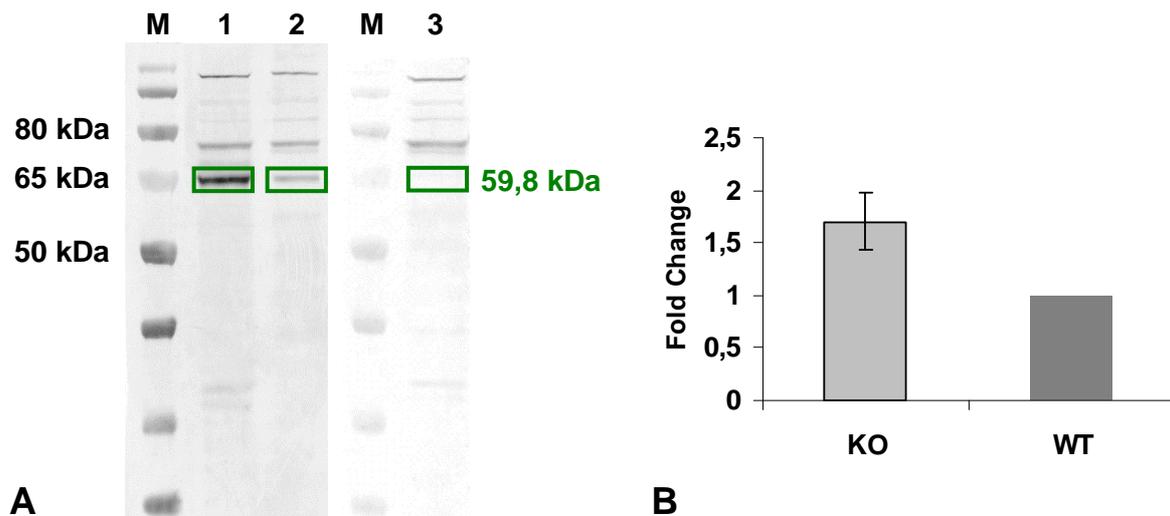


Abb. 23 SZ-Differenzierungszustand: WB und Real-Time PCR für AMH.

Die WB-Analyse (A) aus Hodenhomogenat von 15 Tage alten Mäusen ergab eine deutlichere Bande für AMH im Bereich von ca. 59,8 kDa in der KO-Maus (Spur 1) im Vergleich zur WT-Maus (Spur 2); Spur 3 = Negativkontrolle. Die Ergebnisse aus der Real-Time PCR (B) demonstrieren die statistisch signifikante Erhöhung in der mRNA-Expression von AMH in 15 Tage alten SCCx43KO^{-/-}-Mäusen (FC = 1,7038; SA = 0,2642; p = 0,0129).

4.1.1.3 Androgenrezeptor

An den Tagen 2, 5 (Abb. 24 A) und 7 zeigten die SZ von WT-Mäusen zunächst noch keine nukleäre Immunreaktion für den AR. Erst an Tag 8, zeitgleich mit dem Beginn der Pubertät, konnte in einem Teil der SZ-Kerne eine schwache Farbreaktion nachgewiesen werden. Von Tag 10 an waren dann alle SZ pro Tubulus eindeutig immunpositiv (Abb. 24, C und E). Ein identisches altersabhängiges Muster der AR-Proteinexpression fand sich in den SZ von KO-Mäusen (Abb. 24, B, D und F). Darüber hinaus konnte bei allen untersuchten Mäusen eine einheitliche und permanente AR-Expression in peritubulären Zellen (Abb. 24, A-F, Pfeile) und Leydig Zellen (Abb. 24, A-F, Pfeilköpfe) detektiert werden.

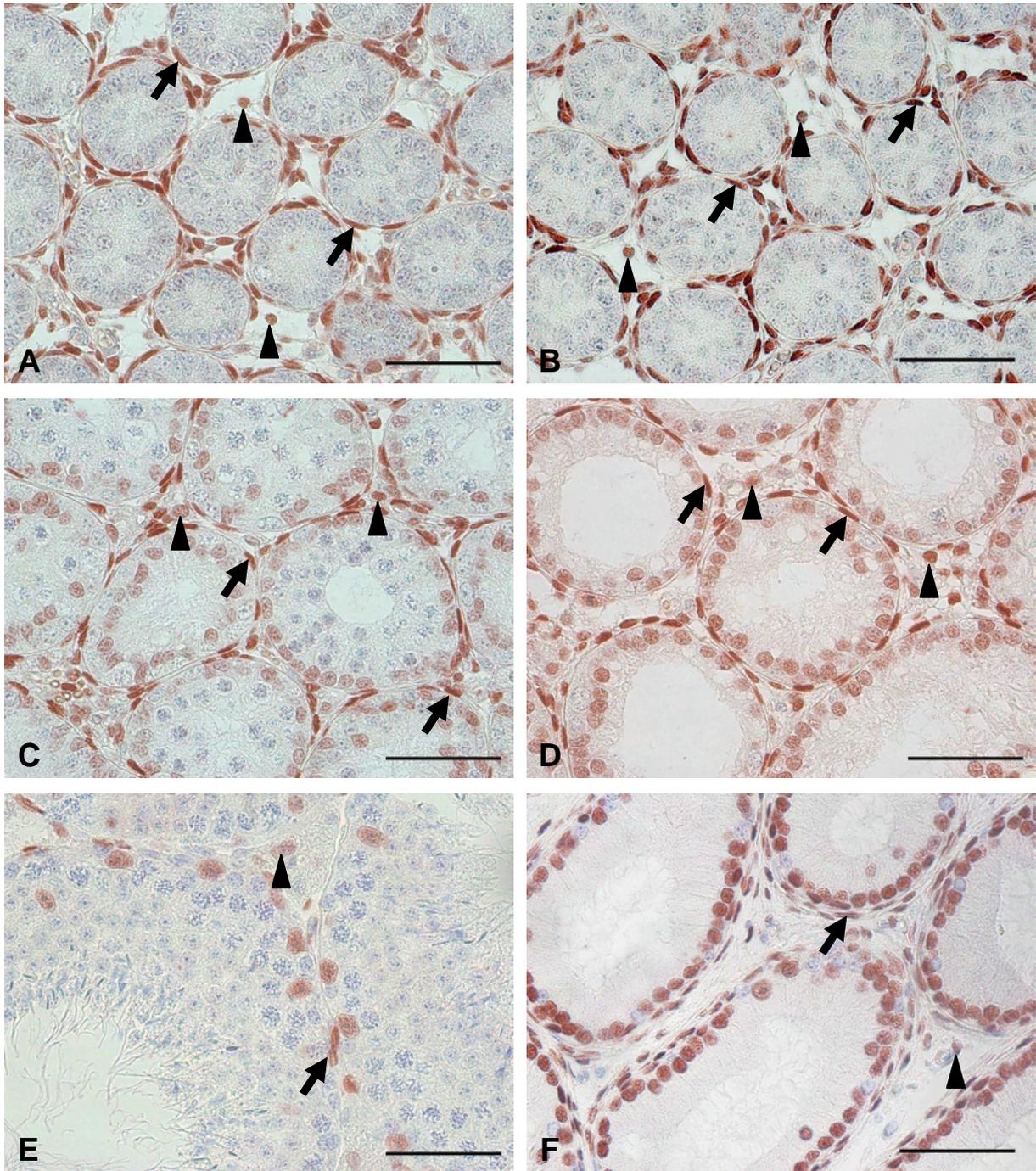


Abb. 24 SZ-Differenzierungszustand: AR-IHC.

Expressionsprofil für AR in 5 Tage alten (A und B), 15 Tage alten (C und D) und adulten (E und F) WT- (linke Spalte) und KO-Maushoden (rechte Spalte). Die AR-Kernfärbung ist in SZ beider Genotypen nicht detektierbar an Tag 5 (A und B), aber präsent in SZ von 15 Tage alten (C und D) und adulten (E und F) Mäusen. Zudem zeigen peritubuläre Zellen (A-F, Pfeile) und Leydig Zellen (A-F, Pfeilköpfe) eine einheitliche AR-Kernexpression zu jedem Alter. Messbalken = 50 μ m.

4.1.1.4 GATA-1

An den Tagen 2, 5 (Abb. 25, A und B) und 7 war das GATA-1-Protein in den SZ-Kernen von WT- und KO-Maushoden mittels IHC nicht detektierbar. An Tag 8 und den darauf folgenden Tagen im Zeitraum der Pubertät (Abb. 25, C und D) konnte analog zum AR das GATA-1-Protein in allen SZ-Kernen beider Genotypen nachgewiesen werden.

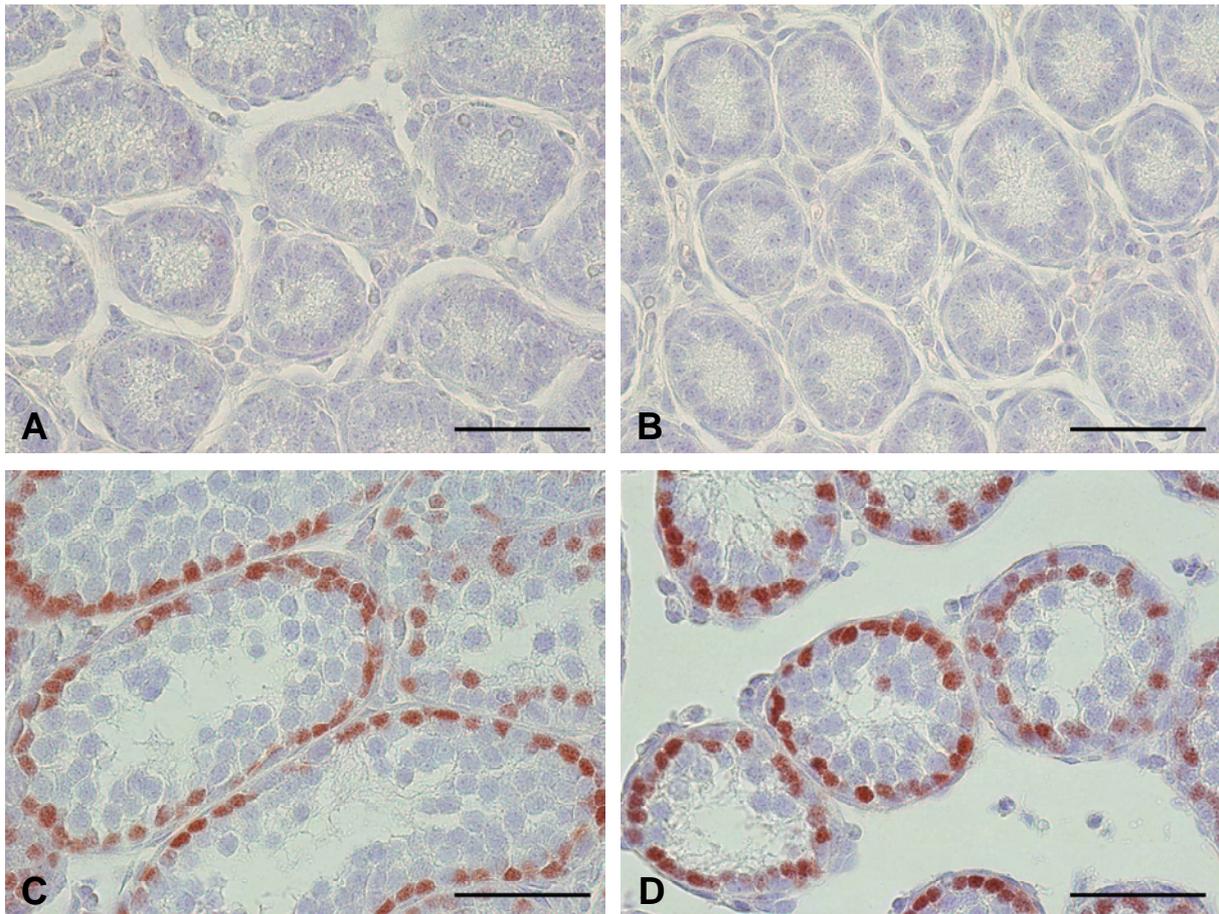


Abb. 25 SZ-Differenzierungsmarker: GATA-1-IHC (präpubertär und pubertär).

GATA-1-IHC in NBF-fixierten 5 Tage alten (A und B) und 15 Tage alten (C und D) WT- (linke Spalte) und KO-Maushoden (rechte Spalte). In beiden Genotypen ist GATA-1 an Tag 5 nicht detektierbar (A und B), an Tag 15 ist das Protein in allen SZ-Kernen vorhanden (C und D). Messbalken = 50 μ m.

In SZ-Kernen von adulten WT-Mäusen mit einer vollständigen Spermatogenese entwickelte sich eine stadienabhängige Expression von GATA-1 (Abb. 26 A, Pfeile). Im Gegensatz dazu zeigte sich in adulten KO-Mäusen eine permanente GATA-1-Expression in allen SZ (Abb. 26 B).

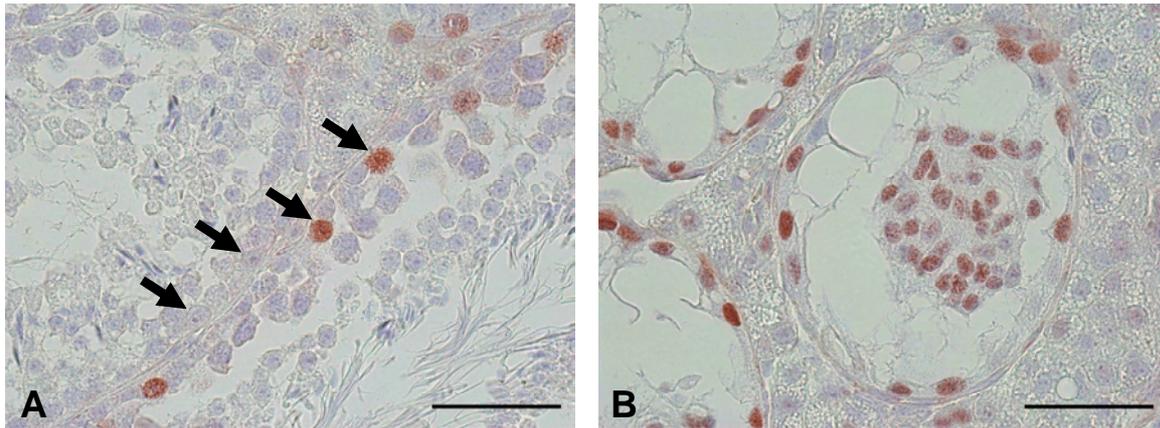


Abb. 26 SZ-Differenzierungsmarker: GATA-1-IHC (adult).

GATA-1-IHC in NBF-fixierten adulten WT- (A) und KO-Maushoden (B). Die Expression von GATA-1 in SZ-Kernen von adulten WT-Mäusen wird stadienabhängig (A, Pfeile). Adulte KO-Mäuse hingegen zeigen eine permanente GATA-1-Expression in allen SZ (B). Messbalken = 50 µm.

Die zur Detektion von GATA-1 durchgeführten WB (Abb. 27 A) aus Hodenhomogenat von adulten Mäusen zeigten eine deutlichere Bande für das GATA-1-Protein bei ca. 47 kDa in der KO-Maus (Abb. 27 A, Spur 1) im Vergleich zur WT-Maus (Abb. 27 A, Spur 2). Auch bei den WB für GATA-1 wurden Negativkontrollen mitgeführt (Abb. 27 A, Spur 3), so dass die anderen Banden unspezifischen Reaktionen des Sekundärantikörpers zugeordnet werden konnten. Nach Anwendung der Real-Time PCR (Abb. 27 B) ergab sich auf mRNA-Ebene eine statistisch signifikante ca. 1,9-fache Erhöhung der GATA-1-Expression in adulten KO-Mäusen verglichen mit ihren WT-Wurfgeschwistern (FC = 1,9986; SA = 0,4910; $p = 0,0268$; $n = 4$ pro Genotyp).

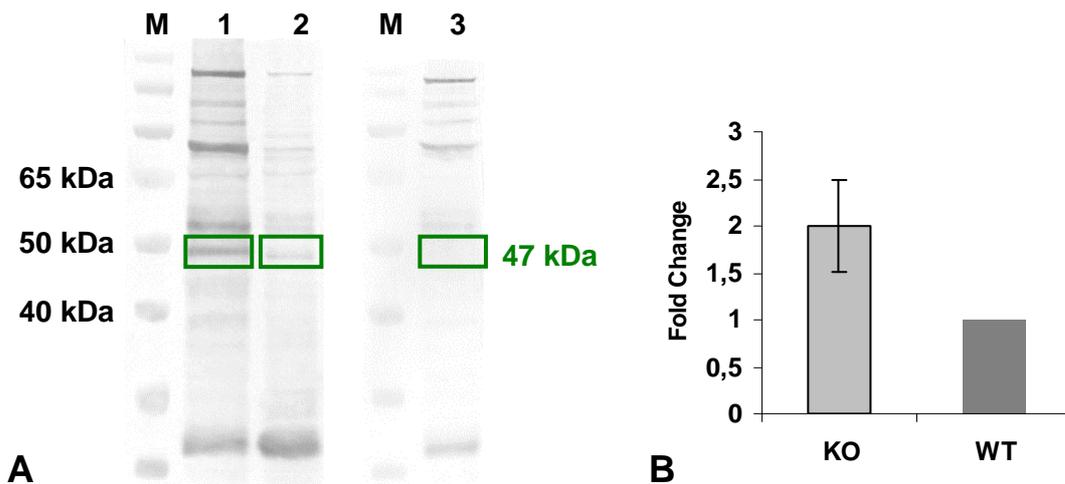


Abb. 27 SZ-Differenzierungszustand: WB und Real-Time PCR für GATA-1.

Die WB-Analyse (A) aus Hodenhomogenat von adulten Mäusen ergab eine deutlichere Bande für GATA-1 im Bereich von ca. 47 kDa in der KO-Maus (Spur 1) im Vergleich zur WT-Maus (Spur 2); Spur 3 = Negativkontrolle. Die Ergebnisse aus der Real-Time PCR (B) demonstrieren die statistisch signifikante Erhöhung in der mRNA-Expression von GATA-1 in adulten SCCx43KO^{-/-}-Mäusen (FC = 1.9986; SA = 0.4910; $p = 0.0268$).

4.1.2 Differenzierung auf morphologischer Ebene

Morphologische Untersuchungen mittels Semi- (Abb. 28, A und B) und Ultradünnschnitten (Abb. 28, C und D) zeigten, dass SZ von adulten WT- und KO-Mäusen große, basal lokalisierte Kerne mit einem dreigeteilten Nukleolus ausbilden.

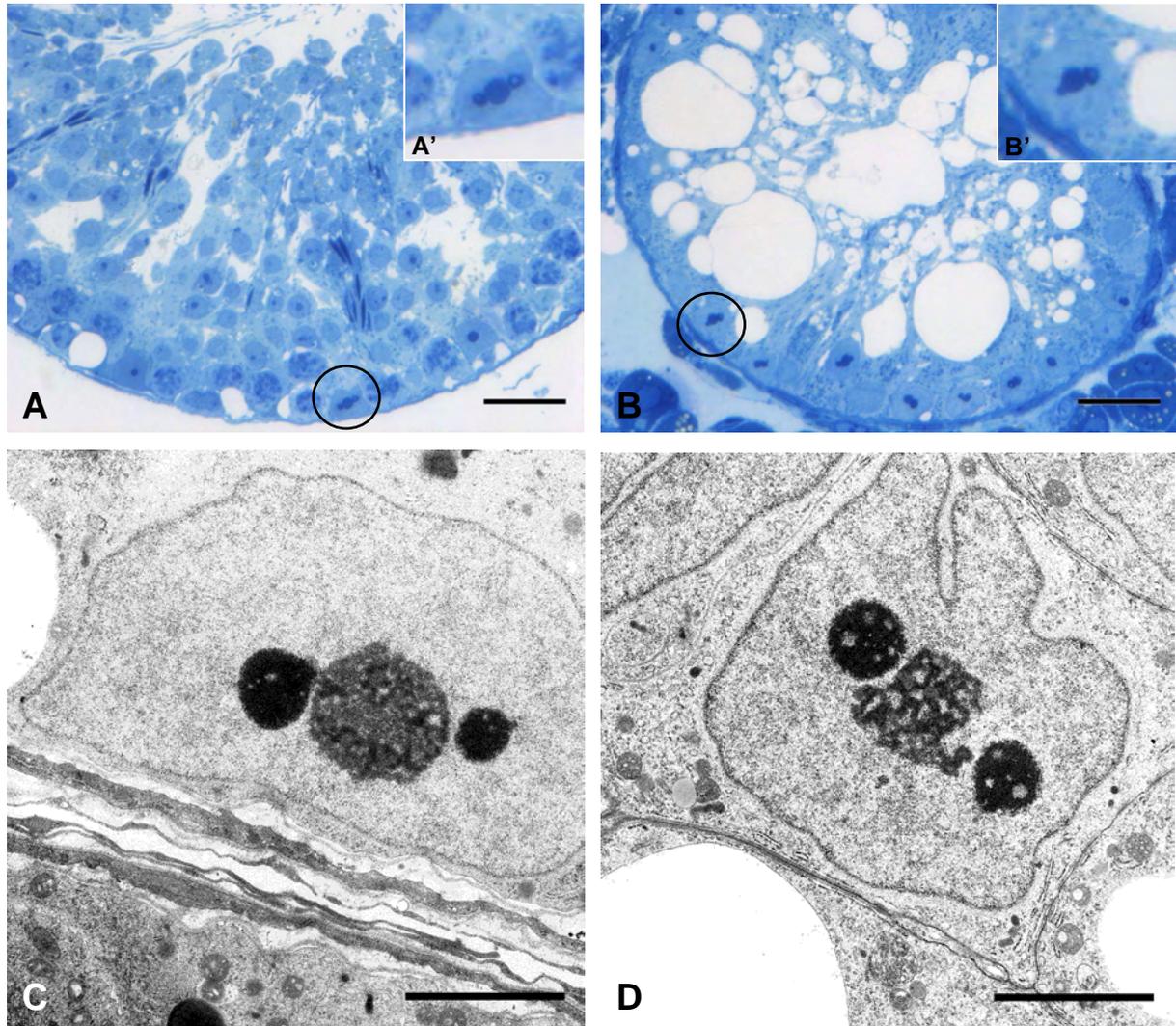


Abb. 28 SZ-Differenzierungszustand: Semidünnschnitte und TEM.

Semidünnschnitte (A und B) und TEM-Bilder (C und D) von adulten WT- (linke Spalte) und KO-Maushoden (rechte Spalte). Beide Genotypen zeigen große, basal lokalisierte SZ-Kerne mit einem dreigeteilten Nukleolus (A-D). A' und B' sind dabei Vergrößerungen der umkreisten Bereiche in A und B. Messbalken = 20 µm (A und B), 3 µm (C und D).

HE-Färbungen ergaben zudem, dass sich Tubuluslumina in Hoden von beiden Genotypen sukzessive im pubertären Zeitraum, und zwar ab Tag 12, entwickeln (Abb. 29, A und B, Pfeile). D. h., anfangs findet sich in nur einigen Samenkanälchen ein Lumen, in adulten Hoden weisen dann alle Keimtubuli ein Lumen auf.

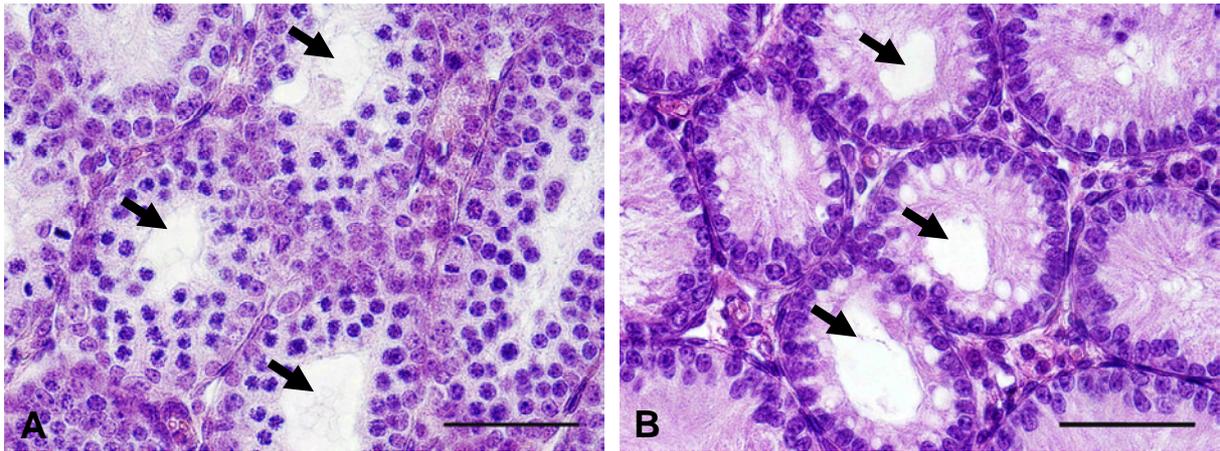


Abb. 29 SZ-Differenzierungszustand: HE-Färbung.

HE-Färbung von 12 Tage alten WT- (A) und SCCx43KO^{-/-}-Maus Hoden (B). In beiden Genotypen zeigen sich erste Keimtubuli mit einem Lumen (A und B, Pfeile). Messbalken = 50 µm.

4.2 Intratubuläre Zellcluster in SCCx43KO-Mäusen

4.2.1 Zusammensetzung und Differenzierung

Nahezu alle Zellen pro Zellcluster zeigten sich in den untersuchten adulten KO-Hoden immunpositiv für die SZ-Marker Vimentin, GATA-1 und AR (Abb. 30, A-C, Pfeile). Für AMH, als spezifischer Marker für unreife SZ, konnte keine Farbreaktion in den Zellclustern von adulten KO-Hoden beobachtet werden (Abb. 30, D, Pfeile).

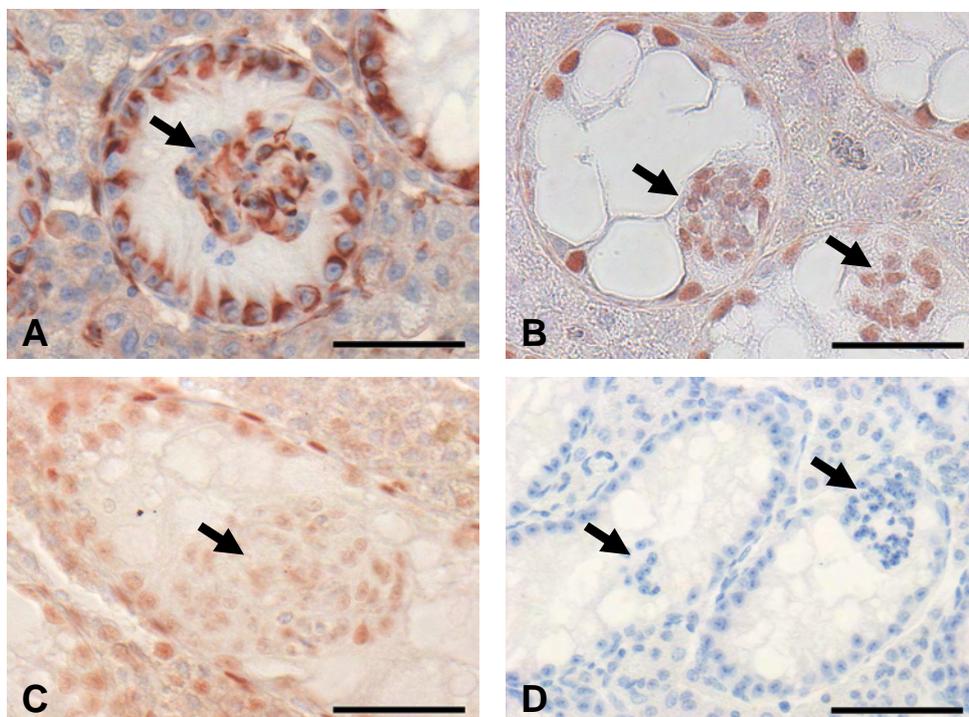


Abb. 30 Zellcluster: IHC von verschiedenen SZ-Markern.

IHC von Vimentin (A), GATA-1 (B), AR (C, ohne Hämatoxylin-Gegenfärbung) und AMH (D) in adulten SCCx43KO^{-/-}-Hoden. Die „geclusterten“ Zellen zeigen sich immunpositiv für Vimentin, GATA-1 und AR (A-C, Pfeile) und immunnegativ für AMH (D, Pfeile). Messbalken = 50 µm (A-C), 100 µm (D).

Zusätzlich konnte in adulten KO-Hoden gezeigt werden, dass sämtliche Zellen der intratubulären Zellaggregate immunnegativ für den Leydig Zell-spezifischen Marker 3 β -HSD sind (Abb. 31, grüner Pfeil).

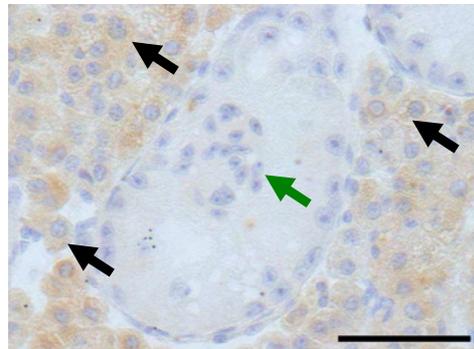


Abb. 31 Zellcluster: IHC von 3 β -HSD.

IHC von 3 β -HSD in adulten SCCx43KO^{-/-}-Maus Hoden. Während das Zytoplasma der Leydig Zellen im Interstitium (schwarze Pfeile) immunpositiv für 3 β -HSD ist, weisen die Zellen der Cluster (grüner Pfeil) keine Farbreaktion auf. Messbalken = 50 μ m.

Untersuchungen auf Semi- und Ultradünnschnittebene zeigten, dass die in den KO-Mäusen beobachteten intratubulären Zellhaufen hauptsächlich von morphologisch abnormalen SZ (Abb. 32 A, Pfeilköpfe) und nur einzelnen an die Cluster angehefteten KZ (Abb. 32 A, schwarzer Pfeil) gebildet werden. Im Gegensatz zu den basal lokalisierten SZ-Kernen (Abb. 32 A, weißer Pfeil), die eine normale Morphologie aufweisen, erscheinen die SZ-Kerne innerhalb der Cluster deutlich schmaler, mit zahlreichen Einfaltungen und Ansammlungen von Heterochromatin entlang der Kernmembran (Abb. 32, A und B, Pfeilköpfe).

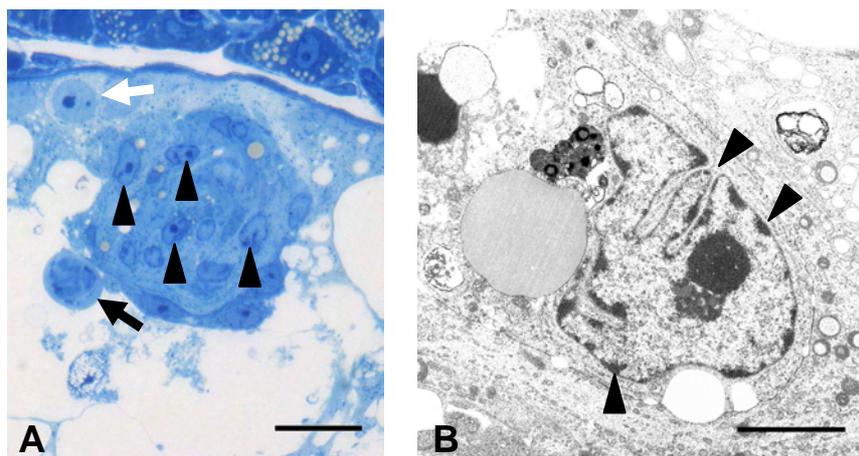


Abb. 32 Zellcluster: Semidünnschnitt und TEM-Bild.

Semidünnschnitt (A) und TEM-Bild (B) von adulten KO-Maus Hoden. Intratubuläre Zellaggregate werden hauptsächlich von morphologisch abnormalen SZ (A, Pfeilköpfe) und nur einzelnen an die Cluster angehefteten KZ (A, schwarzer Pfeil) gebildet. Im Vergleich zu den basal lokalisierten SZ-Kernen (A, weißer Pfeil) mit einer normalen Morphologie erscheinen die SZ-Kerne innerhalb der Cluster deutlich schmaler, mit zahlreichen Einfaltungen und Ansammlungen von Heterochromatin entlang der Kernmembran (A und B, Pfeilköpfe). Messbalken = 20 μ m (A), 3 μ m (B).

Die beobachteten, morphologisch veränderten SZ-Kerne innerhalb der Zellcluster von adulten KO-Tieren zeigten sich zudem immunnegativ für β -Gal (Abb. 33 A, schwarzer Pfeil) und für den Proliferationsmarker Ki-67 (Abb. 33 B, Pfeil). Am Clusterrand gelegene SZ-Kerne mit einer noch weitgehend normalen Morphologie wiesen jedoch, analog zu den basal lokalisierten, weiterhin eine Farbreaktion für β -Gal auf (Abb. 33 A, grüner Pfeil).

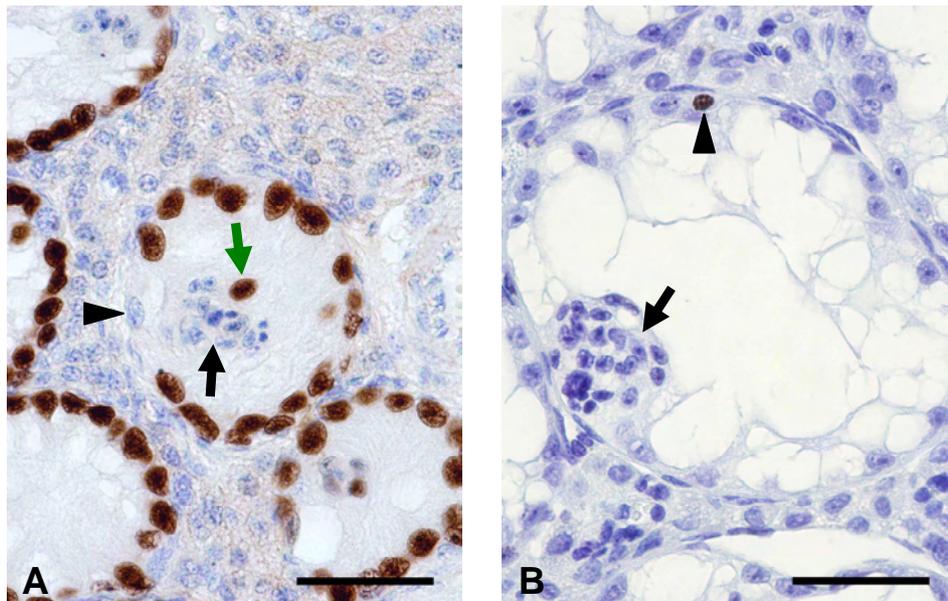


Abb. 33 Zellcluster: β -Gal- und Ki-67-IHC.

IHC von β -Gal (A) und Ki-67 (B) in adulten SCCx43KO^{-/-}-Maus Hoden. Die morphologisch veränderten SZ innerhalb der Zellcluster zeigen sich immunnegativ für β -Gal (A, schwarzer Pfeil) und Ki-67 (B, Pfeil). Zu beachten sind die noch β -Gal-positive SZ am Clusterrand (A, grüner Pfeil) sowie die β -Gal-negative Spermatogonie (A, Pfeilkopf) und die Ki-67-positive Zelle (B, Pfeilkopf) am Tubulusrand. Messbalken = 50 μ m.

4.2.2 Apoptose

Auf ultrastruktureller Ebene zeigten adulte KO-Hoden einzelne an die Cluster angeheftete Zellen mit typischen morphologischen Anzeichen für Apoptose, wie sichelförmig hochkondensiertes Chromatin (Abb. 34 A, Pfeil). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die Zellen innerhalb der Cluster, die morphologisch SZ entsprechen, TUNEL-negativ sind (Abb. 34 B, Pfeil). TUNEL-positive Zellen fanden sich ausschließlich nur basal am Tubulusrand oder angeheftet an die Zellhaufen (Abb. 34 B, Pfeilköpfe).

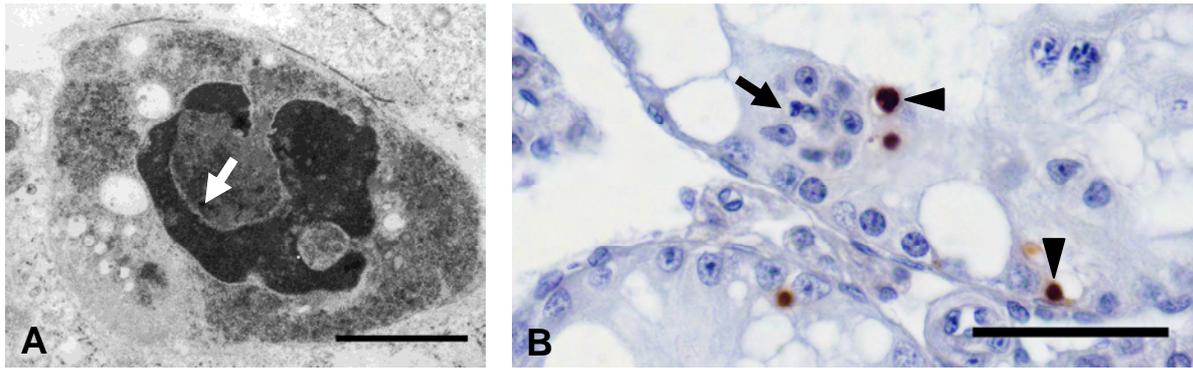


Abb. 34 Zellcluster: TEM-Bild und TUNEL-Färbung.

TEM-Bild (A) und TUNEL-Färbung (B) von adulten SCCx43KO^{-/-}-Maushoden. Repräsentatives TEM-Bild (A) von einer Cluster-angehefteten degenerierenden Zelle mit sichelförmig kondensiertem Chromatin (A, Pfeil). „Geclusterte“ Zellen, die morphologisch SZ entsprechen, zeigen sich TUNEL-negativ (B, Pfeil). Zu beachten sind die TUNEL-positiven Zellen, die entweder basal lokalisiert oder an die Cluster angeheftet sind (B, Pfeilköpfe). Messbalken = 3 µm (A), 50 µm (B).

4.2.3 Zeitpunkt des Auftretens

Von Tag 2 bis Tag 11 zeigte keiner der untersuchten KO-Maushoden intratubuläre Zellcluster im HE-Schnitt (Abb. 35 A). Von Tag 12 bis Tag 30, d. h., während der Pubertät traten erste kleine Zellansammlungen auf, bestehend aus ca. 3-8 Zellen pro Cluster (Abb. 35 B, Pfeile). In diesem Zeitraum war allerdings weiterhin die überwiegende Zahl der untersuchten Hoden im HE-Schnitt „clusterfrei“. Ab Tag 31 traten die Zellhaufen regelmäßig in nahezu jedem Samenkanälchen pro Hoden auf, teilweise konnten sogar 2 bis 3 Cluster pro Keimtubulus beobachtet werden (Abb. 35 C, Pfeile). Zusätzlich stieg die Zellzahl innerhalb der Cluster an, und zwar auf bis zu 25 Zellen pro Zellhaufen.

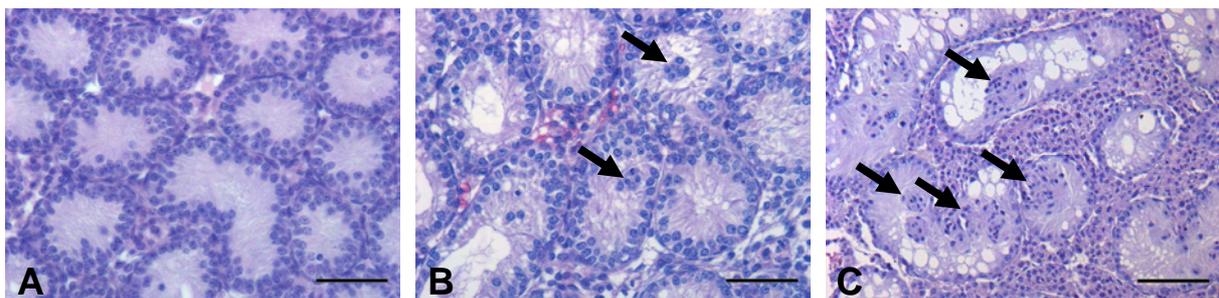


Abb. 35 Zellcluster: Zeitpunkt des Auftretens im HE-Schnitt.

Repräsentatives Bild (A) für den Zeitraum von Tag 2 bis Tag 11, in dem noch keine intratubulären Zellcluster zu beobachten sind. Von Tag 12 bis Tag 30 treten erste kleine Zellhaufen in wenigen Keimtubuli auf (B, Pfeile). Ab Tag 31 zeigen sich die Zellcluster regelmäßig in nahezu jedem Tubulus pro Hoden, teilweise können sogar 2 bis 3 Cluster pro Tubulus beobachtet werden (C, Pfeile). Zusätzlich steigt die Zellzahl innerhalb der Cluster an, und zwar auf bis zu 25 Zellen pro Zellhaufen. Messbalken = 50 µm (A und B), 100 µm (C).

5 DISKUSSION

Im Laufe der testikulären Entwicklung durchläuft die SZ eine radikale morphologische und funktionelle Veränderung. So erfolgt während der Pubertät der Wechsel von einer immaturren, proliferierenden zu einer reifen, nicht-proliferierenden Zelle. Sobald die Proliferation beendet und die Differenzierung vollständig ist, nehmen die SZ zudem unter normalen Bedingungen ihre Proliferationsaktivität nicht wieder auf, diese kann somit als ein Marker für unreife SZ verwendet werden. Die zahlreichen Aufgaben von ausdifferenzierten und funktionell reifen SZ dienen vor allem der Vermehrung und Differenzierung von KZ, also der Initiierung und Aufrechterhaltung der Spermatogenese. Das Ausbleiben einer funktionellen Reifung von SZ während der Pubertät nimmt somit Einfluss auf ihre Fähigkeit, das Überleben der KZ im postnatalen Hoden zu sichern und die KZ-Entwicklung zu unterstützen, mit der Folge einer gestörten Spermatogenese (Sharpe et al. 2003).

Aufgrund der in den SCCx43KO-Mäusen nachgewiesenen Veränderungen, wie dem Vorkommen von proliferierenden adulten SZ zusammen mit einer gestörten Spermatogenese (Brehm et al. 2007, Sridharan et al. 2007), beschäftigte sich diese Arbeit in erster Linie mit der Fragestellung, ob die SZ in den KO-Mäusen neben ihrem proliferativen Status noch weitere immature Eigenschaften auf morphologischer und/oder funktioneller Ebene aufweisen. Dabei sollte geklärt werden, ob es sich bei den adulten Cx43-defizienten SZ eventuell um primär undifferenzierte oder sekundär dedifferenzierte SZ handelt, die folglich unfähig sind, die Initiierung und Aufrechterhaltung der Spermatogenese zu gewährleisten. Praktisch erfolgte eine Bestimmung des Differenzierungszustands von SZ in den SCCx43KO-Mäusen im Zeitverlauf, und zwar jeweils im Abgleich mit den WT-Wurfgeschwistern. Zum Einsatz kamen dafür verschiedene SZ-Differenzierungsmarker, auf der einen Seite biochemische Marker, wie das AMH, und auf der anderen Seite morphologische Marker, wie die Gestalt der SZ-Kerne.

In Erweiterung der beiden grundlegenden Studien (Brehm et al. 2007, Sridharan et al. 2007) zum SCCx43KO-Mausmodell, zeigt die vorliegende Arbeit auf, dass der SZ-spezifische Verlust von Cx43 in einer zumindest teilweise abnormalen Entwicklung von somatischen SZ in Mäusen resultiert. Untersuchungen offenbarten adulte Cx43-defiziente SZ mit einem intermediären Phänotyp, d. h. mit Eigenschaften

von reifen und unreifen SZ. Die vorliegenden Ergebnisse schließen zudem aus, dass es sich um primär undifferenzierte oder sekundär dedifferenzierte Zellen handelt. Neben dem proliferativen Status (Sridharan et al. 2007), als Eigenschaft von immaturren SZ, konnten im Rahmen dieser Arbeit folgende Charakteristika von ausdifferenzierten SZ demonstriert werden: (1) die Ausbildung des dreigeteilten Nukleolus und die Formation des Tubuluslumens, (2) der Expressionsstart des AR und von GATA-1 sowie (3) die Herunterregulierung des AMH während der Pubertät, darüber hinaus (4) der Wechsel im Vimentin-Expressionsmuster von basal nach perinukleär. In Zusammenarbeit mit Carette et al. (2010) konnte zudem die Integrität der BHS zwischen den Cx43-defizienten SZ adulter Mäuse nachgewiesen werden. Die funktionelle Untersuchung der BHS erfolgte dabei mittels TEM, und zwar anhand von Lanthan-Tracer-Studien und einer hypertonen Glukose-Perfusion. Eine ausgebildete und funktionell intakte BHS repräsentiert eine weitere Eigenschaft von reifen SZ und ist darüber hinaus eine Voraussetzung für die Formation des flüssigkeitsgefüllten Tubuluslumens (Russell et al. 1989, Sharpe et al. 2003). Zusätzlich demonstrierten Carette et al. (2010) jedoch erhöhte Protein- und mRNA-Level von zum Beispiel Occludin und N-Cadherin in den SCCx43KO-Mäusen. Diese veränderte (molekulare) Zusammensetzung der BHS zusammen mit der nachgewiesenen Integrität kann dabei als ein weiteres Zeichen für den in der vorliegenden Arbeit beobachteten abnormalen intermediären SZ-Phänotyp interpretiert werden. Darüber hinaus deuten diese veränderten Expressionswerte der untersuchten „Junction“-Proteine an, dass möglicherweise eine Veränderung im dynamischen Öffnungs- und Schließungsprozess der BHS oder gar ein permanenter Verschluss dieser Barriere vorliegt. Und gerade Letzteres könnte eine mögliche Ursache für die in den KO-Mäusen beobachtete KZ-Defizienz darstellen, da während der KZ-Entwicklung präleptotäne und leptotäne Spermatozyten 1. Ordnung die BHS passieren und so vom basalen in das adluminale Kompartiment gelangen müssen. Denn nur hier sind die haploiden KZ vor Autoantikörpern geschützt. Ein permanenter Verschluss würde die KZ-Passage verhindern, und die Folge wäre eine gestörte Spermatogenese.

Fasst man diese Ergebnisse zusammen, so proliferieren SZ von SCCx43KO-Mäusen nach der Pubertät weiter, trotz Anzeichen einer ansonsten normalen Ausdifferenzierung. Dies impliziert, dass adulte SZ eher in ihrer Proliferation unterdrückte

Zellen zu sein scheinen, als tatsächlich terminal differenzierte, postmitotische Zellen, wie ursprünglich angenommen. Ergänzend zu unserem Mausmodell konnten Tarulli et al. (2006) im Dsungarischen Zwerghamster ebenfalls die Proliferation von adulten SZ nachweisen und damit die bisher postulierte Ansicht, dass postpubertäre SZ terminal differenzierte Zellen seien, in Frage stellen. Auch verschiedene *In-vitro*-Studien zeigten, dass adulte murine SZ ihre Mitose fortsetzen können (Chaudhary et al. 2005, Ahmed et al. 2009). Darüber hinaus demonstrierten Gilleron et al. (2006, 2009) *in vitro*, dass Cx43 die SZ-Proliferation negativ kontrolliert.

Im Rahmen der Erforschung des Differenzierungsstatus von SZ in den SCCx43KO-Mäusen konnten in dieser Arbeit zusätzlich folgende Ergebnisse erzielt werden: (1) kürzere apikale Zellprojektionen von Vimentin-Filamenten, (2) eine verlängerte AMH Synthese während der Pubertät und (3) eine permanente Expression von GATA-1 in allen adulten SZ. Als Ursache für diese Veränderungen im räumlichen oder zeitlichen Expressionsmuster von Vimentin, AMH und GATA-1 könnte der beobachtete Mangel an reifenden KZ in Frage kommen, selbst primär verursacht durch den Verlust von Cx43 in den SZ der KO-Mäuse.

Für das Intermediärfilament Vimentin konnte in der Vergangenheit bereits in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die Ausbildung der apikalen Zellprojektionen in adulten SZ vom Keimepithelzyklus abhängig ist. Dabei scheinen diese Filamentbündel mit apikalen Invaginationen, die elongierte Spermatidenköpfe enthalten, verknüpft zu sein (Amlani und Vogl 1988, Wayne Vogl et al. 1993). Zusätzlich konnte in früheren Studien demonstriert werden, dass der Verlust der strukturellen Integrität des Keimepithels in kryptorchiden Rattenhoden (Wang et al. 2002) oder nach Behandlung mit verschiedenen Chemikalien (Johnson et al. 1991, Richburg und Boekelheide 1996, Dalgaard et al. 2001) mit einem Zusammenbruch der apikalen Vimentin-Extensionen korreliert. Diese Ergebnisse deuten an, dass der Verlust von elongierten Spermatiden in unseren SCCx43KO-Mäusen eine Ursache für die verkürzten apikalen Vimentin-Projektionen darstellen könnte.

Die während der Pubertät auf Protein- und mRNA-Ebene nachgewiesene verlängerte AMH-Synthese in unseren transgenen Mäusen weist auf eine zeitliche Verzögerung in der Differenzierung von Cx43-defizienten SZ hin. Allerdings gestaltet es sich schwierig, eine eindeutige Aussage darüber zu treffen, welche zugrunde liegenden

molekularen Mechanismen letztendlich für das Scheitern der zeitlich korrekten Downregulierung des AMH verantwortlich sind.

In humanen SZ scheint die AMH-Expression primär durch Androgene gesteuert zu werden, da die Herunterregulierung des AMH zeitgleich mit der AR-Expression in SZ und steigenden intratestikulären Testosteronspiegeln auftritt (Boukari et al. 2009). Sehr wahrscheinlich existieren aber beim Mann zusätzliche Mechanismen für die AMH-Downregulierung, wie beispielsweise der Eintritt der KZ in die Meiose (Rey et al. 1994, Rajpert-de Meyts et al. 1999). So konnte in infertilen Männern mit einem Arrest der Spermatogenese auf prämeiotischer Ebene eine fortgesetzte AMH-Expression beobachtet werden (Steger et al. 1996).

Darüber hinaus scheinen Spezies-spezifische Unterschiede in der Herunterregulierung von AMH zu bestehen. In Mäusen gibt es Hinweise darauf, dass ein synergistischer Effekt von verschiedenen bekannten (z. B. Androgenen, Expression von GATA-1 und Eintritt der KZ in die Meiose) und unbekanntem Faktoren notwendig ist, um eine Beendigung der AMH-Expression während der Pubertät zu bewirken (Al-Attar et al. 1997, Beau et al. 2000). So zeigten Al-Attar et al. (1997) in postnatalen Mäusen, dass der Eintritt von KZ in die Meiose in Synergie mit Androgenen agiert, um die AMH-Synthese während der Pubertät zu hemmen, und dass das Fehlen von meiotischen KZ (was auch in den SCCx43KO-Mäusen zu beobachten ist) in einer unvollständigen Downregulierung der AMH-Expression resultiert. Zum Einsatz kamen XXSxr^b-Mäuse, welche über zwei X-Chromosomen verfügen und keine meiotischen KZ entwickeln. Die männlichen Tiere zeigten während der Pubertät eine persistierende AMH-Expression trotz der Produktion von adäquaten Androgenspiegeln und der Expression des AR in SZ, was synergistische oder auch hierarchische Regulationsmechanismen wahrscheinlich macht. Vergleichbare Ergebnisse für die Expression von AMH und AR konnten in der vorliegenden Arbeit in den SCCx43KO-Mäusen nachgewiesen werden.

Des Weiteren konnte in ARKO- (genereller KO des AR) und SCARKO- (SZ-spezifischer KO des AR) Mäusen gezeigt werden, dass weder eine direkte noch eine indirekte Androgenwirkung für eine korrekte Downregulierung von AMH notwendig ist, da in beiden KO-Mäusen die AMH-Expression im selben Zeitraum wie in den Kontrollmäusen abgeschaltet wurde (De Gendt et al. 2004).

Weiterhin scheint Testosteron nicht das einzige Hormon zu sein, welches die AMH-Produktion reguliert, auch FSH und T3 sind beteiligt. T3 fungiert dabei als ein

Hauptregulator für die Proliferation und Reifung von SZ (Buzzard et al. 2003). Während ein vorliegender Hypothyroidismus mit einer verlängerten Proliferationsperiode und einer deutlichen Erhöhung der Zellzahl von adulten SZ verknüpft ist, beschleunigt der Hyperthyroidismus die Differenzierung von SZ, was in niedrigeren SZ-Zahlen pro Hoden resultiert (van Haaster et al. 1992, Bunick et al. 1994). Zudem ist bekannt, dass ein Abfall in der AMH-mRNA-Expression beim Hypothyroidismus *in vivo* verzögert ist, was darauf hindeutet, dass T3 die mRNA-Expression von AMH regulieren kann. Ein neonataler Hypothyroidismus verlängert also die mitogene Phase von SZ und ist mit einer Verzögerung der SZ-Reifung verknüpft, darüber hinaus verursacht er eine verlängerte Expression von AMH und zusätzlich vom Thyroidhormonrezeptor α (Bunick et al. 1994). Eine solche verlängerte bzw. erhöhte mRNA-Expression des Thyroidhormonrezeptors α , als ein sensitiver Marker für proliferierende unreife SZ, konnte auch in adulten SCCx43KO-Mäusen demonstriert werden (Sridharan et al. 2007).

Diese hormonelle Regulation der AMH-mRNA konnte außerdem in Sertoli Zellkulturen, die von 2 Tage alten Ratten stammten, gezeigt werden (Arambepola et al. 1998). In den Studien von Arambepola et al. (1998) zeigte sich, dass T3 die mRNA-Expression von AMH negativ stimuliert, da mit T3 behandelte Zellkulturen einen wesentlich dramatischeren Abfall der AMH-mRNA-Level aufwiesen als die Kontrollkulturen. Für FSH konnte ein ähnlicher Einfluss *in vitro* nachgewiesen werden, und für T3 und FSH zusätzlich ein additiver Effekt auf die AMH-Expression in kultivierten SZ.

In vivo scheint T3 außerdem genomische und nichtgenomische Effekte auf Cx43 auszuüben. So führten genomische T3-Effekte zu einer erhöhten Cx43-Expression in SZ verknüpft mit einer reduzierten SZ-Proliferationsrate. Die T3-Wirkung wurde zudem *in vitro* mittels der SZ-Linie 42GPA9 bestätigt (Gilleron et al. 2006). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Cx43 in SZ ein intermediäres Ziel für die T3-Hemmung der neonatalen SZ-Proliferation darstellt. Bezogen auf die vorliegende Arbeit und die untersuchten SCCx43KO-Mäuse könnte der Verlust des T3-Vermittlers Cx43 in den SZ „eine Art Hypothyroidismus“ verursacht haben, was (1) in einer erhöhten SZ-Proliferationsrate, (2) in einer verlängerten Expression des Thyroidhormonrezeptors α resultiert (gezeigt durch Sridharan et al. 2007) und (3) mit einer verzögerten AMH-Downregulierung während der Pubertät verbunden ist, wie in

der Arbeit von Bunick et al. (1994) und in der vorliegenden Studie demonstriert wurde.

Bis dato nur in einem Abstract publizierte Untersuchungen (Giese et al. 2010) über den Effekt des SZ-spezifischen KOs von Cx43 auf die testikuläre Genexpression in acht Tage alten Mäusen mittels Microarray-Analyse und Real-Time PCR ergaben, dass die SZ-Zahl zwischen diesen acht Tage alten KO- und WT-Mäusen noch vergleichbar ist, aber dass bereits zu diesem Alterszeitpunkt eine signifikante Hochregulierung der mRNA-Expression von AMH in den SCCx43KO-Mäusen vorliegt. Gemäß der Hypothese von Al-Attar et al. (1997), dass die AMH-Produktion von SZ hauptsächlich auf mRNA-Ebene reguliert wird, scheint es möglich, dass eine vorausgehende Erhöhung in der AMH-mRNA-Expression nachfolgend in einer erhöhten AMH-Proteinsynthese und damit in einer verzögerten Downregulierung von AMH resultiert, was in der vorliegenden Arbeit im Zeitraum der Pubertät (Tag 10, 12, 15, 17 und 19) gezeigt wurde.

Während in SZ von adulten WT-Mäusen eine Stadien-spezifische Expression von GATA-1 beobachtet wurde, zeigten Cx43-defiziente SZ der KO-Wurfgeschwister eine permanente Expression dieses Markers. Das Ergebnis auf immunhistochemischer Ebene konnte dabei mittels WB-Analyse und Real-Time PCR bestätigt werden. Wahrscheinlich ist, dass diese nachgewiesene Veränderung auf dem Fehlen von reifenden KZ und folglich auf dem Ausbleiben von negativen Feedbacksignalen für die Unterdrückung von GATA-1 basiert. Bereits in der Vergangenheit konnte diese sekundäre Modulation in zwei anderen mutanten Mauslinien und in kryptorchiden Maushoden gezeigt werden (Yomogida et al. 1994).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Erforschung der in den SCCx43KO-Mäusen beobachteten abnormalen intratubulären Zellcluster. Zum einen wurden ihr Auftrittszeitpunkt und zum anderen die Zusammensetzung, der Differenzierungszustand und das „Schicksal“ der Zellen in diesen Zellaggregaten ermittelt. Die hier durchgeführten Untersuchungen bestätigen aktuelle Ergebnisse, allen voran aber erweitern sie diese. So demonstrierten Sridharan et al. (2007) und Carette et al. (2010) mittels IHC von WT-1 oder Vimentin, dass adulte SCCx43KO-Mäuse Cluster von SZ in ihrem Tubuluslumen ausbilden. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch zusätzlich gezeigt werden, dass die intratubulären Zellaggregate nicht nur von SZ, sondern auch von

einzelnen an die Cluster angehefteten KZ gebildet werden. Zudem wurde eine Beteiligung von Leydig Zellen ausgeschlossen. Analog zu den Cx43-defizienten SZ, die sich in ihrer normalen Position befinden, weisen auch die „geclusterten“ SZ keine wesentlichen Veränderungen in ihrem biochemischen Differenzierungsstatus auf, d. h., sie exprimieren reife (AR und GATA-1), aber keine unreifen (AMH) Marker. Im Gegensatz zu den basal lokalisierten SZ verlieren die „geclusterten“ SZ mit zunehmenden morphologischen Veränderungen, ähnlich zu solchen, die von Russell et al. (1996) beobachtet wurden und typisch für unreife SZ sind (Gondos und Berndston 1993), jedoch ihre Fähigkeit, das LacZ-Reportergen zu exprimieren. Dieses Reportergen stellt einen zuverlässigen Nachweis für die erfolgreiche und permanente Deletion des Cx43-Gens in den SZ der transgenen Mäuse dar. Darüber hinaus zeigen die „geclusterten“ SZ keine Proliferationsaktivität mehr, was darauf hindeutet, dass die beobachtete abnormale SZ-Mitose in adulten KO-Mäusen (Sridharan et al. 2007) vor der Bildung der Cluster auftritt.

Als ein Zeichen für eine epitheliale Desorganisation treten erste kleine Zellhaufen während der Pubertät in den Keimtubuli der KO-Tiere auf. Diese werden im Zeitverlauf zahlreicher, darüber hinaus steigt die Anzahl der Zellen pro Zellcluster wesentlich an, was einen altersabhängigen Prozess impliziert. Sridharan et al. (2007) stellen dazu die Hypothese auf, dass die fortgesetzte Proliferation von SZ in den adulten KO-Mäusen zu einer exzessiven Ansammlung von SZ entlang der Tubulus-Basalmembran führt und es infolgedessen zu einer Ablösung von einigen SZ kommt. Ob die SZ allerdings tatsächlich ihren Kontakt zur Basalmembran verlieren, ist bisher noch nicht geklärt, denn eine komplette Loslösung würde aller Voraussicht nach im Zelltod enden. *In vitro* gibt es Hinweise, dass der Kontakt zur Basalmembran für das Überleben der SZ absolut notwendig ist (Dirami et al. 1995). In unseren SCCx43KO-Mäusen zeigen jedoch ausschließlich einzelne an die Cluster angeheftete Zellen ein positives TUNEL-Signal und morphologische Eigenschaften für Apoptose, so dass es sich bei diesen apoptotischen Zellen eher um degenerierende KZ und nicht um „geclusterte“ SZ handelt. Unterstützt wird diese Schlussfolgerung von der Tatsache, dass die Apoptose den dominanten Weg für die Eliminierung von KZ darstellt (Rodriguez et al. 1997). Durch Apoptose zugrunde gehende SZ hingegen konnten *in vivo* bisher nur sehr selten beschrieben werden (Sasso-Cerri und Cerri 2008).

Die Bildung von SZ-Clustern scheint typisch für Situationen mit KZ-Defizienzen zu sein, wie bereits in verschiedenen murinen Tiermodellen mit einer gestörten

Spermatogenese gezeigt werden konnte (Schrans-Stassen et al. 2001, Kopecky et al. 2005, Mazaud-Guittot et al. 2010). Auch wenn dieses Phänomen mit dem Fehlen von KZ assoziiert zu sein scheint, so sind die zugrunde liegenden Mechanismen für die Formierung von intratubulären Zellclustern in den SCCx43KO-Mäusen bis jetzt nicht geklärt. Abweichungen in der Zellform können mit einer veränderten Expression, Verteilung und Lokalisation von Intermediärfilamenten in Zusammenhang gebracht werden. Vimentinfilamenten in SZ wird zudem eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der Spermatogenese zugesprochen (Kopecky et al., 2005; Sasso-Cerri und Cerri 2008). Dies bedeutet, dass die in den KO-Mäusen beobachteten verkürzten apikalen Vimentin-Projektionen womöglich mit der Bildung der intratubulären Zellcluster verknüpft sind. Letztendlich deutet die Gegenwart von aggregierten SZ im Lumen der Keimtubuli an, dass der Verlust von Cx43 einen dynamischen Einfluss auf die Topographie von einzelnen SZ hat, und dies trotz bestehender Zell-Zell-Kontakte und Integrität der BHS (Carette et al. 2010).

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei den adulten Cx43-defizienten SZ um primär undifferenzierte oder sekundär dedifferenzierte Zellen handelt. Diese zwei abnormalen „Differenzierungsformen“ entfallen somit als mögliche Ursache für die beobachtete gestörte Spermatogenese im vorliegenden transgenen Mausmodell. Zwar weisen die SZ der KO-Mäuse eine teilweise abnormale Entwicklung auf (wie fortgesetzte Proliferation, verlängerte AMH-Synthese und Clusterbildung), in allen anderen untersuchten Punkten zeigen sie jedoch eine normale Differenzierung. Durch den SZ-spezifischen Verlust von Cx43 und entsprechender GJ-Kanäle zwischen SZ sowie zwischen SZ und bestimmten KZ ist die metabolische Unterstützung der KZ durch die SZ zumindest über diesen Weg unterbrochen. Und eben genau dies könnte eine Ursache für die in den SCCx43KO-Mäusen beobachtete gestörte Spermatogenese darstellen, würde aber zur eindeutigen Klärung zusätzliche Untersuchungen erfordern.

Inmitten verschiedener transgener Mausmodelle, die genutzt werden, um die vielfältigen Ursachen für männliche Infertilität zu untersuchen, zeigen die SCCx43KO-Mäuse einen bislang einzigartigen intermediären SZ-Phänotyp mit primären Defekten in Form von SZ-Clusterbildung und fortgesetzter Mitose in Verbindung mit der Expression von adulten Differenzierungsmarkern. Folglich

repräsentieren diese KO-Mäuse ein einmaliges Tiermodell zur Untersuchung einer gestörten Spermatogenese verknüpft mit einer abnormalen Entwicklung von SZ, was in einigen Fällen von menschlicher Sterilität oder der Pathogenese von menschlichen KZ-Tumoren relevant ist.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Im Hoden wird die interzelluläre Kommunikation zwischen den unterschiedlichen Zellpopulationen über verschiedene Mechanismen reguliert. Die direkte Kommunikation mittels GJ-Kanälen erlaubt einen unmittelbaren Austausch von kleinen Molekülen und reguliert essenzielle Prozesse während der Proliferation und Differenzierung von Zellen. Das GJ-Protein Cx43 ist dabei das vorherrschende Cx im Hoden der meisten Spezies. Im murinen Keimepithel wird es p. c. vom Tag 11,5 an exprimiert und ist zwischen benachbarten SZ und zwischen SZ und bestimmten KZ lokalisiert. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass Veränderungen in der Cx43-Expression mit einer gestörten Spermatogenese bei Menschen und Nagern sowie Hodentumorentwicklung beim Mann und Hund assoziiert sind.

Der generelle KO des Cx43-Gens führt zu einer Herzmissbildung und infolgedessen zum Tod der transgenen Mäuse unmittelbar nach der Geburt. Um diese Problematik zu umgehen und die SZ-spezifische Rolle von Cx43 auf die testikuläre Entwicklung, Spermatogenese und SZ-Reifung *in vivo* untersuchen zu können, wurde mit Hilfe des Cre/loxP-Rekombinasesystem eine lebensfähige konditionale KO-Mauslinie generiert, bei der das Cx43-Gen ausschließlich in den SZ fehlt. Verglichen mit ihren WT-Wurfgeschwistern zeigen männliche SCCx43KO-Mäuse keine Unterschiede im Körpergewicht und auch Nebenhoden, Samenleiter und akzessorische Geschlechtsdrüsen sowie der Hodenabstieg erscheinen unverändert. Die Größe und das Gewicht der Hoden dieser KO-Mäuse sind jedoch drastisch reduziert. Die Tiere sind infertil und zeigen histologisch einen Arrest der Spermatogenese auf der Stufe der Spermatogonien oder SCO-Tubuli. Darüber hinaus treten abnormale intratubuläre Zellcluster, Vakuolen im Zytoplasma von SZ und eine Hyperplasie der interstitiellen Leydig Zellen auf. Eine statistische Analyse ergab zudem, dass die durchschnittliche Anzahl der Spermatogonien pro Samenkanälchen in adulten SCCx43KO-Mäusen verglichen mit ihren WT-Wurfgeschwistern signifikant reduziert ist. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der somatischen SZ pro Tubulus signifikant erhöht ist und sie auch nach der Pubertät noch proliferieren. Dabei sei zu erwähnen, dass adulte SZ als postmitotische Zellen angesehen werden, sie sich normalerweise mit der Pubertät ausdifferenzieren und danach keine Zellteilung mehr zeigen. Diese Ergebnisse betonen den kritischen Beitrag von Cx43

auf den Reifungsprozess von SZ, welcher normalerweise während des pubertären Zeitraums in einer Beendigung der mitotischen Zellteilung resultiert.

Aus diesem Grund war eine Untersuchung der SZ-Reifung in diesem neuen transgenen Mausmodell von besonderem Interesse und das Hauptziel dieser Arbeit, den Differenzierungsstatus von SZ auf ultrastruktureller, Protein- und mRNA-Ebene zu bestimmen. Darüber hinaus erfolgte die Erforschung der in den SCCx43KO-Mäusen beobachteten abnormalen intratubulären Zellcluster. Untersucht wurden zum einen ihr exakter Auftrittszeitpunkt und zum anderen die Zusammensetzung, der Differenzierungszustand und das „Schicksal“ der Zellen in diesen Zellaggregaten.

Während der Pubertät zeigten Cx43-defiziente SZ auf immunhistochemischer Ebene einen regulären Expressionsstart von AR und GATA-1, beides Marker für mature SZ. Darüber hinaus konnte in SZ der KO-Mäuse eine von neonatal bis adult und damit zeitlich normale Expression von Vimentin nachgewiesen werden. Zudem wurde die Expression von AMH, als ein Marker für immature SZ, während der Pubertät herunterreguliert, allerdings zeitlich verzögert. Diese beobachtete verlängerte AMH-Synthese, die mittels WB und Real-Time PCR bestätigt wurde, weist auf eine teilweise Veränderung im Differenzierungsprogramm der Cx43-defizienten SZ hin. Zusätzlich konnte in SZ von adulten KO-Mäusen eine abnormale permanente Expression von GATA-1 nachgewiesen werden. Diese wird möglicherweise durch das Fehlen von reifenden KZ und deren negativen Feedbacksignalen verursacht. Auf ultrastruktureller Ebene erlangten die Cx43-defizienten SZ ihr reifes Erscheinungsbild, was durch den dreigeteilten Nukleolus, einer typischen Eigenschaft von differenzierten SZ, demonstriert werden konnte. Außerdem konnte ab dem zwölften Tag nach der Geburt die Bildung des Tubuluslumens in WT- und KO-Maushoden als ein weiteres Merkmal für die Ausdifferenzierung von SZ beobachtet werden.

Die intratubulären Zellcluster in den KO-Mäusen werden hauptsächlich von abnormalen SZ und nur einzelnen an die Cluster angehefteten apoptotischen KZ gebildet. Experimentell wurde dies mittels IHC, TUNEL-Färbung und TEM-Experimenten nachgewiesen. Während der Pubertät treten erste kleine und einzelne Zellcluster auf, die im Laufe der Zeit zahlreicher werden. Darüber hinaus steigt die

Anzahl der Zellen innerhalb eines Clusters deutlich an, was einen altersabhängigen Prozess impliziert.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass adulte Cx43-defiziente SZ trotz der Ausbildung einer adulten Morphologie, der Expression von adulten und dem Verlust von immaturren Differenzierungsmarkern weiterhin proliferieren können. Dies impliziert einen einzigartigen und abnormalen intermediären Phänotyp mit Eigenschaften von sowohl undifferenzierten als auch differenzierten SZ.

7 SUMMARY

In the testis, intercellular communication is regulated through certain mechanisms between different cell populations. The direct communication via gap junction channels allows intercellular passage of small molecules and regulates essential processes during cell proliferation and differentiation. The gap junctional protein Cx43 is the predominant Cx in testis of most species. In the seminiferous epithelium of mouse testes, it is expressed from day 11.5 p. c. and located between neighboring SCs and between SCs and specific germ cells. In the past, alterations of Cx43 expression were found to be associated with germ cell tumorigenesis in men and dogs as well as spermatogenic impairment in humans and rodents.

Total disruption of the Cx43 gene leads to altered cardiac morphology and to sudden perinatal death. In order to circumvent the problems of the general Cx43 deficiency and to clarify the SC specific roles of Cx43 on testicular development, spermatogenesis and SC maturation *in vivo*, a viable conditional Cx43KO mouse line has been generated successfully using the Cre/loxP recombination system, which lacks the Cx43 gene solely in SCs. Adult SCCx43KO mice showed normal testis descent and development of the urogenital tract, but testis size and weight were drastically lower when compared with WT and heterozygous littermates. Histological analysis revealed that SC specific deletion of Cx43 mostly results in an arrest of spermatogenesis at the level of spermatogonia or SC-only syndrome, as well as: abnormal intratubular cell clusters, SC cytoplasmic vacuoles, increased SC numbers and reduced number of spermatogonia per seminiferous tubule. Furthermore, as SCs were found to be still proliferating in adult KO mice, it was postulated that lack of Cx43 expression in SCs caused these somatic cells to remain in an apparently permanent proliferative state. These results emphasize the critical contribution of Cx43 to the normal maturational progression of SCs which normally results in the cessation of SC mitogenesis during the pubertal period.

Taken these results into account, the study of SC maturation in this new transgenic mouse model was clearly needed to elucidate whether still proliferating Cx43 deficient adult SCs exhibit additional immature features at functional and/or morphological level. Thus, the primary objective was to determine the state of SC

differentiation at ultrastructural, protein and mRNA levels. Furthermore, the time of occurrence, composition, differentiation and fate of cells belonging to the observed intratubular cell clusters in SCCx43KO mice were also investigated.

Using IHC Cx43 deficient SCs depicted an accurate start of the mature marker AR and GATA-1 during puberty and a temporally normal vimentin expression from neonatal up to adult. Expression of the AMH, as a marker of SC immaturity, was downregulated during puberty, but its disappearance was delayed. This observed extended AMH synthesis during puberty, which was confirmed by WB and Real-Time PCR, suggests a partial alteration in the SC differentiation program. Additionally, SCs of adult KOs showed an abnormal permanent and uniform expression of GATA-1 at protein and mRNA level, maybe caused by the lack of maturing germ cells and the lack of negative feedback signals. At ultrastructural level, adult Cx43 deficient SCs obtained their mature appearance, demonstrated by the tripartite nucleolus, as a typical feature of differentiated SCs. Furthermore, a tubular lumen formation could be observed, after postnatal day 12, in both WT and KO mice, depicting another characteristic for SC differentiation.

Intratubular clustered cells were mainly formed by abnormal SCs and single attached apoptotic germ cells, verified by IHC, TUNEL staining and TEM experiments. Clusters first appeared during puberty and became more numerous in adulthood with increasing cell numbers per cluster, thus suggesting an age-related process.

In conclusion, adult Cx43 deficient SCs seem to proliferate while maintaining expression of mature markers and their adult morphology, indicating a unique and abnormal intermediate phenotype with characteristics common to both undifferentiated and differentiated SCs.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Ahmad S, Evans WH. Post-translational integration and oligomerization of connexin 26 in plasma membranes and evidence of formation of membrane pores: implications for the assembly of gap junctions. *Biochem J.* 2002 Aug 1;365(3):693-9.
- Ahmed EA, Barten-van Rijbroek AD, Kal HB, Sadri-Ardekani H, Mizrak SC, van Pelt AM, de Rooij DG. Proliferative activity in vitro and DNA repair indicate that adult mouse and human Sertoli cells are not terminally differentiated, quiescent cells. *Biol Reprod.* 2009 Jun;80(6):1084-91.
- Al-Attar L, Noël K, Dutertre M, Belville C, Forest MG, Burgoyne PS, Josso N, Rey R. Hormonal and cellular regulation of Sertoli cell anti-Müllerian hormone production in the postnatal mouse. *J Clin Invest.* 1997 Sep 15;100(6):1335-43.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, Jaenicke L. *Molekularbiologie der Zelle.* Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2003, 4. Auflage, Seite 1055-140.
- Amlani S, Vogl AW. Changes in the distribution of microtubules and intermediate filaments in mammalian Sertoli cells during spermatogenesis. *Anat Rec.* 1988 Feb;220(2):143-60.
- Arambepola NK, Bunick D, Cooke PS. Thyroid hormone and follicle-stimulating hormone regulate Müllerian-inhibiting substance messenger ribonucleic acid expression in cultured neonatal rat Sertoli cells. *Endocrinology.* 1998 Nov;139(11):4489-95.
- Aumüller G, Schulze C, Viebahn C. Intermediate filaments in Sertoli cells. *Microsc Res Tech.* 1992 Jan 1;20(1):50-72.
- 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 Oct;298(1):113-21.
- Batias C, Siffroi JP, Fénichel P, Pointis G, Segretain D. Connexin43 gene expression and regulation in the rodent seminiferous epithelium. *J Histochem Cytochem.* 2000 Jun;48(6):793-805.
- Beau C, Vivian N, Münsterberg A, Dresser DW, Lovell-Badge R, Guerrier D. In vivo analysis of the regulation of the anti-Müllerian hormone, as a marker of Sertoli cell

- differentiation during testicular development, reveals a multi-step process. *Mol Reprod Dev.* 2001 Jul;59(3):256-64.
- Behringer RR, Finegold MJ, Cate RL. Müllerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell.* 1994 Nov 4;79(3):415-25.
- Bellvé AR, Cavicchia JC, Millette CF, O'Brien DA, Bhatnagar YM, Dym M. Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. *J Cell Biol.* 1977 Jul;74(1):68-85.
- Bendel-Stenzel M, Anderson R, Heasman J, Wylie C. The origin and migration of primordial germ cells in the mouse. *Semin Cell Dev Biol.* 1998 Aug;9(4):393-400.
- Bennett MV, Barrio LC, Bargiello TA, Spray DC, Hertzberg E, Sáez JC. Gap junctions: new tools, new answers, new questions. *Neuron.* 1991 Mar;6(3):305-20.
- Bergmann M, Kliesch S. The distribution pattern of cytokeratin and vimentin immunoreactivity in testicular biopsies of infertile men. *Anat Embryol (Berl).* 1994 Dec;190(6):515-20.
- Bergmann M. Physiology of Spermatogenesis. In: Schill WB, Comhaire FH, Hargreave TB (Hrsg.). *Andrology for the Clinician.* Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2006, Seite 272-281.
- Beyer EC, Paul DL, Goodenough DA. Connexin family of gap junction proteins. *J Membr Biol.* 1990 Jul;116(3):187-94.
- Beyer EC, Berthoud VM. Gap junction synthesis and degradation as therapeutic targets. *Curr Drug Targets.* 2002 Dec;3(6):409-16.
- Blagosklonova O, Joanne C, Roux C, Bittard H, Fellmann F, Bresson JL. Absence of anti-Müllerian hormone (AMH) and M2A immunoreactivities in Sertoli cell-only syndrome and maturation arrest with and without AZF microdeletions. *Hum Reprod.* 2002 Aug;17(8):2062-5.
- Boukari K, Meduri G, Brailly-Tabard S, Guibourdenche J, Ciampi ML, Massin N, Martinerie L, Picard JY, Rey R, Lombès M, Young J. Lack of androgen receptor expression in Sertoli cells accounts for the absence of anti-Müllerian hormone repression during early human testis development. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 May;94(5):1818-25.
- Bravo-Moreno JF, Díaz-Sánchez V, Montoya-Flores JG, Lamoyi E, Saéz JC, Pérez-Armendariz EM. Expression of connexin43 in mouse Leydig, Sertoli, and germinal

- cells at different stages of postnatal development. *Anat Rec.* 2001 Sep 1;264(1):13-24.
- Brehm R, Marks A, Rey R, Kliesch S, Bergmann M, Steger K. Altered expression of connexins 26 and 43 in Sertoli cells in seminiferous tubules infiltrated with carcinoma-in-situ or seminoma. *J Pathol.* 2002 Aug;197(5):647-53.
- Brehm R, Steger K. Regulation of Sertoli cell and Germ Cell Differentiation. *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology* 181, Springer Verlag, Berlin Heidelberg 2005.
- Brehm R, Rey 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 (Berl).* 2006a Jun;211(3):223-36.
- 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 cells and germ cells. *Neoplasia.* 2006b Jun;8(6):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 Jul;171(1):19-31.
- Brehm R, Zeiler M, Bergmann M. Connexin 43 and spermatogenesis. In: Glander H-J, Grundewald S, Paasch U (Hrsg.). *Biology of Male Germ Cells.* Shaker Verlag, Aachen 2009, Seite 3-28.
- Bremner WJ, Millar MR, Sharpe RM, Saunders PT. Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology.* 1994 Sep;135(3):1227-34.
- Bruzzone R, White TW, Paul DL. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem.* 1996a May 15;238(1):1-27.
- Bruzzone R, White TW, Goodenough DA. The cellular Internet: on-line with connexins. *Bioessays.* 1996b Sep;18(9):709-18.
- Bunick D, Kirby J, Hess RA, Cooke PS. Developmental expression of testis messenger ribonucleic acids in the rat following propylthiouracil-induced neonatal hypothyroidism. *Biol Reprod.* 1994 Oct;51(4):706-13.

- Buzzard JJ, Wreford NG, Morrison JR. Thyroid hormone, retinoic acid, and testosterone suppress proliferation and induce markers of differentiation in cultured rat sertoli cells. *Endocrinology*. 2003 Sep;144(9):3722-31.
- Byers S, Pelletier RM, Suárez-Quian C. Sertoli-Sertoli Cell Junctions and the Seminiferous Epithelium Barrier. In: Russell LD, Griswold MD (Hrsg.). *The Sertoli Cell*. Cache River Press, Clearwater 1993, Seite 431-446.
- Byskov AG. Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiol Rev*. 1986 Jan;66(1):71-117.
- Calero G, Kanemitsu M, Taffet SM, Lau AF, Delmar M. A 17mer peptide interferes with acidification-induced uncoupling of connexin43. *Circ Res*. 1998 May 18;82(9):929-35.
- Carette D, Weider K, Gilleron J, Giese S, Dompierre J, Bergmann M, Brehm R, Denizot JP, Segretain D, Pointis G. Major involvement of connexin 43 in seminiferous epithelial junction dynamics and male fertility. *Dev Biol*. 2010 Oct 1;346(1):54-67.
- Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, Tizard R, Farber NM, Cheung A, Ninfa EG, Frey AZ, Gash DJ, Chow EP, et al. Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell*. 1986 Jun 6;45(5):685-98.
- Chang C, Saltzman A, Yeh S, Young W, Keller E, Lee HJ, Wang C, Mizokami A. Androgen receptor: an overview. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 1995;5(2):97-125.
- Chaudhary J, Sadler-Riggelman I, Ague JM, Skinner MK. The helix-loop-helix inhibitor of differentiation (ID) proteins induce post-mitotic terminally differentiated Sertoli cells to re-enter the cell cycle and proliferate. *Biol Reprod*. 2005 May;72(5):1205-17.
- Civitelli R, Ziambaras K, Warlow PM, Lecanda F, Nelson T, Harley J, Atal N, Beyer EC, Steinberg TH. Regulation of connexin43 expression and function by prostaglandin E2 (PGE2) and parathyroid hormone (PTH) in osteoblastic cells. *J Cell Biochem*. 1998 Jan 1;68(1):8-21.
- Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev*. 1972 Jan;52(1):198-236.
- Clermont Y. Introduction to the Sertoli cell. In: Russell LD, Griswold MD (Hrsg.). *The Sertoli Cell*. Cache River Press, Clearwater 1993, Seite XXI-XXV.

- Cyr DG, Hermo L, Egenberger N, Mertineit C, Trasler JM, Laird DW. Cellular immunolocalization of occludin during embryonic and postnatal development of the mouse testis and epididymis. *Endocrinology*. 1999 Aug;140(8):3815-25.
- Dalgaard M, Hossaini A, Hougaard KS, Hass U, Ladefoged O. Developmental toxicity of toluene in male rats: effects on semen quality, testis morphology, and apoptotic neurodegeneration. *Arch Toxicol*. 2001 Apr;75(2):103-9.
- Darrow BJ, Laing JG, Lampe PD, Saffitz JE, Beyer EC. Expression of multiple connexins in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *Circ Res*. 1995 Mar;76(3):381-7.
- Decrouy X, Gasc JM, Pointis G, Segretain D. Functional characterization of Cx43 based gap junctions during spermatogenesis. *J Cell Physiol*. 2004 Jul;200(1):146-54.
- 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 Sep;22(9):1537-42.
- Defamie N, Berthaut I, Mograbi B, Chevallier D, Dadoune JP, Fénichel 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 Mar;83(3):449-56.
- De Gendt K, Swinnen JV, Saunders PT, Schoonjans L, Dewerchin M, Devos A, Tan K, Atanassova N, Claessens F, Lécureuil C, Heyns W, Carmeliet P, Guillou F, Sharpe RM, Verhoeven G. A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Feb 3;101(5):1327-32.
- De Rooij DG, Russell LD. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl*. 2000 Nov-Dec;21(6):776-98.
- Dirami G, Ravindranath N, Kleinman HK, Dym M. Evidence that basement membrane prevents apoptosis of Sertoli cells in vitro in the absence of known regulators of Sertoli cell function. *Endocrinology*. 1995 Oct;136(10):4439-47.
- Dym M, Fawcett DW. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod*. 1970 Dec;3(3):308-26.

- 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 Jun;74(6):1058-64.
- Ek-Vitorín JF, Calero G, Morley GE, Coombs W, Taffet SM, Delmar M. PH regulation of connexin43: molecular analysis of the gating particle. *Biophys J.* 1996 Sep;71(3):1273-84.
- Enders GC. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ Cell Communication. In: Russell LD, Griswold MD (Hrsg.). *The Sertoli Cell.* Cache River Press, Clearwater 1993, Seite 448-60.
- Evans WH, Martin PE. Gap junctions: structure and function (Review). *Mol Membr Biol.* 2002 Apr-Jun;19(2):121-36.
- Falk MM, Kumar NM, Gilula NB. Membrane insertion of gap junction connexins: polytopic channel forming membrane proteins. *J Cell Biol.* 1994 Oct;127(2):343-55.
- Falk MM, Buehler LK, Kumar NM, Gilula NB. Cell-free synthesis and assembly of connexins into functional gap junction membrane channels. *EMBO J.* 1997 May 15;16(10):2703-16.
- Fallon RF, Goodenough DA. Five-hour half-life of mouse liver gap-junction protein. *J Cell Biol.* 1981 Aug;90(2):521-6.
- 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 Sep 15;117(Pt 20):4665-72.
- Fiorini C, Decrouy X, Defamie N, Segretain D, Pointis G. Opposite regulation of connexin33 and connexin43 by LPS and IL-1alpha in spermatogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006 Mar;290(3):C733-40.
- Fiorini C, Gilleron J, Carette D, Valette A, Tilloy A, Chevalier S, Segretain D, Pointis G. Accelerated internalization of junctional membrane proteins (connexin 43, N-cadherin and ZO-1) within endocytic vacuoles: an early event of DDT carcinogenicity. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Jan;1778(1):56-67.
- Fischer P, Brehm R, Konrad L, Hartmann S, Kliesch S, Bohle RM, Bergmann M. Connexin 33: a rodent-specific member of the gap junction protein family? *J Androl.* 2005 Jan-Feb;26(1):75-84.

- Francis RJ, Lo CW. Primordial germ cell deficiency in the connexin 43 knockout mouse arises from apoptosis associated with abnormal p53 activation. *Development*. 2006 Sep;133(17):3451-60.
- Fujiwara Y, Browne CP, Cunniff K, Goff SC, Orkin SH. Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Oct 29;93(22):12355-8.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983 Jan 15;31(1):13-20.
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*. 1984 Oct;133(4):1710-5.
- Giese S, Hossain H, Izar B, Chakraborty T, Tchatalbachev S, Willecke K, Guillou F, Bergmann M, Brehm R. The effect of a Sertoli cell-specific knockout of connexin 43 on testicular gene expression in prepubertal mice. *Anat Histol Embryol*. 2010; 39:269-70.
- Gilleron J, Nebout M, Scarabelli L, Senegas-Balas F, Palmero S, Segretain D, Pointis G. A potential novel mechanism involving connexin 43 gap junction for control of sertoli cell proliferation by thyroid hormones. *J Cell Physiol*. 2006 Oct;209(1):153-61.
- Gilleron J, Carette D, Durand P, Pointis G, Segretain D. Connexin 43 a potential regulator of cell proliferation and apoptosis within the seminiferous epithelium. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Jun;41(6):1381-90.
- Godet M, Sabido O, Gilleron J, Durand P. Meiotic progression of rat spermatocytes requires mitogen-activated protein kinases of Sertoli cells and close contacts between the germ cells and the Sertoli cells. *Dev Biol*. 2008 Mar 1;315(1):173-88.
- Goldberg GS, Lampe PD, Nicholson BJ. Selective transfer of endogenous metabolites through gap junctions composed of different connexins. *Nat Cell Biol*. 1999 Nov;1(7):457-9.
- Gondos B, Berndston WE. Postnatal and Pubertal Development. In: Russell LD, Griswold MD (Hrsg.). *The Sertoli Cell*. Cache River Press, Clearwater 1993, Seite 115-154.
- Goodfellow PN, Lovell-Badge R. SRY and sex determination in mammals. *Annu Rev Genet*. 1993;27:71-92.

- Griswold MD. Protein Secretion by Sertoli Cells: General Considerations. In: Russell LD, Griswold MD (Hrsg.). *The Sertoli Cell*. Cache River Press, Clearwater 1993a, Seite 195-200.
- Griswold MD. Action of FSH on mammalian Sertoli cells. In: Russell LD, Griswold MD (Hrsg.). *The Sertoli Cell*. Cache River Press, Clearwater 1993b, Seite 493-508.
- Hall B, Limaye A, Kulkarni AB. Overview: generation of gene knockout mice. *Curr Protoc Cell Biol*. 2009 Sep; CHAPTER: Unit–19.1217.
- Hamilton DL, Abremski K. Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites. *J Mol Biol*. 1984 Sep 15;178(2):481-6.
- Handel MA, Eppig JJ. Sertoli cell differentiation in the testes of mice genetically deficient in germ cells. *Biol Reprod*. 1979 Jun;20(5):1031-8.
- Heinlein CA, Chang C. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol Endocrinol*. 2002 Oct;16(10):2181-7.
- Hess RA, Renato de Franca L. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Adv Exp Med Biol*. 2008;636:1-15.
- Hoffmann B. *Andrologie – Physiologie, Pathologie und Biotechnologie der männlichen Fortpflanzung*. Lehmanns Media, Berlin 2003, Seite 68-82.
- Holdcraft RW, Braun RE. Hormonal regulation of spermatogenesis. *Int J Androl*. 2004 Dec;27(6):335-42.
- Ito E, Toki T, Ishihara H, Ohtani H, Gu L, Yokoyama M, Engel JD, Yamamoto M. Erythroid transcription factor GATA-1 is abundantly transcribed in mouse testis. *Nature*. 1993 Apr 1;362(6419):466-8.
- Johnson KJ, Hall ES, Boekelheide K. 2,5-Hexanedione exposure alters the rat Sertoli cell cytoskeleton. I. Microtubules and seminiferous tubule fluid secretion. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1991 Dec;111(3):432-42.
- Josso N, Cate RL, Picard JY, Vigrier B, di Clemente N, Wilson C, Imbeaud S, Pepinsky RB, Guerrier D, Boussin L, Legeai L, Carre-Eusebe D. Anti-Müllerian hormone, the Jost factor. In: Bardin CW (Hrsg.). *Recent Progress in Hormone Research*. Academic Press 48, San Diego 1993, Seite 1-59.
- Josso N, di Clemente N, Gouédard L. Anti-Müllerian hormone and its receptors. *Mol Cell Endocrinol*. 2001 Jun 20;179(1-2):25-32.

- Juneja SC, Barr KJ, Enders GC, Kidder GM. Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin43. *Biol Reprod.* 1999 May;60(5):1263-70.
- 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 Apr;47(2):147-56.
- Kahiri CN, Khalil MW, Tekpetey F, Kidder GM. Leydig cell function in mice lacking connexin43. *Reproduction.* 2006 Oct;132(4):607-16.
- Kanai Y, Kawakami H, Takata K, Kurohmaru M, Hirano H, Hayashi Y. Involvement of actin filaments in mouse testicular cord organization in vivo and in vitro. *Biol Reprod.* 1992 Feb;46(2):233-45.
- 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 May;152(1):270-4.
- Karl J, Capel B. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev Biol.* 1998 Nov 15;203(2):323-33.
- Kelnar CJ, McKinnell C, Walker M, Morris KD, Wallace WH, Saunders PT, Fraser HM, Sharpe RM. Testicular changes during infantile 'quiescence' in the marmoset and their gonadotrophin dependence: a model for investigating susceptibility of the prepubertal human testis to cancer therapy? *Hum Reprod.* 2002 May;17(5):1367-78.
- Kliesch S, Behre HM, Hertle L, Bergmann M. Alteration of Sertoli cell differentiation in the presence of carcinoma in situ in human testes. *J Urol.* 1998 Nov;160(5):1894-8.
- Kluin PM, Kramer MF, de Rooij DG. Proliferation of spermatogonia and Sertoli cells in maturing mice. *Anat Embryol (Berl).* 1984;169(1):73-8.
- Kopecky M, Semecky V, Nachtigal P. Vimentin expression during altered spermatogenesis in rats. *Acta Histochem.* 2005;107(4):279-89.
- Kotula-Balak M, Hejmej A, Sadowska J, Bilinska B. Connexin 43 expression in human and mouse testes with impaired spermatogenesis. *Eur J Histochem.* 2007 Oct-Dec;51(4):261-8.
- Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel. *Cell.* 1996 Feb 9;84(3):381-8.
- Lablack A, Bourdon V, Defamie N, Batias C, Mesnil M, Fenichel P, Pointis G, Segretain D. Ultrastructural and biochemical evidence for gap junction and

- connexin 43 expression in a clonal Sertoli cell line: a potential model in the study of junctional complex formation. *Cell Tissue Res.* 1998 Nov;294(2):279-87.
- Laing JG, Beyer EC. The gap junction protein connexin43 is degraded via the ubiquitin proteasome pathway. *J Biol Chem.* 1995 Nov 3;270(44):26399-403.
- Laird DW, Puranam KL, Revel JP. Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. *Biochem J.* 1991 Jan 1;273(Pt 1):67-72.
- 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 Dec;131(5):1193-203.
- Larsen WJ, Tung HN. Origin and fate of cytoplasmic gap junctional vesicles in rabbit granulosa cells. *Tissue Cell.* 1978;10(3):585-98.
- 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 Dec;83(3):576-87.
- Larsen WJ, Tung HN, Polking C. Response of granulosa cell gap junctions to human chorionic gonadotropin (hCG) at ovulation. *Biol Reprod.* 1981 Dec;25(5):1119-34.
- Lécureuil C, Fontaine I, Crepieux P, Guillou F. Sertoli and granulosa cell-specific Cre recombinase activity in transgenic mice. *Genesis.* 2002 Jul;33(3):114-8.
- Lee NP, Leung KW, Wo JY, Tam PC, Yeung WS, Luk JM. Blockage of testicular connexins induced apoptosis in rat seminiferous epithelium. *Apoptosis.* 2006 Jul;11(7):1215-29.
- Leonard M, Brice M, Engel JD, Papayannopoulou T. Dynamics of GATA transcription factor expression during erythroid differentiation. *Blood.* 1993 Aug 15;82(4):1071-9.
- Li MW, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. Connexin 43 and plakophilin-2 as a protein complex that regulates blood-testis barrier dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Jun 23;106(25):10213-8.
- Li MW, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. Connexin 43 is critical to maintain the homeostasis of the blood-testis barrier via its effects on tight junction reassembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Oct 19;107(42):17998-8003.
- Liebich HG. Männliche Geschlechtsorgane. In: Liebich HG, Böck P, Budras KD, Maierl J, Reese S (Hrsg.). *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere.* Schattauer Verlag, Stuttgart 2003, 4. Auflage, Seite 271-92.

- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.
- Loewenstein WR. Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. *Physiol Rev*. 1981 Oct;61(4):829-913.
- Lowry JA, Atchley WR. Molecular evolution of the GATA family of transcription factors: conservation within the DNA-binding domain. *J Mol Evol*. 2000 Feb;50(2):103-15.
- Mackay S. Gonadal development in mammals at the cellular and molecular levels. *Int Rev Cytol*. 2000;200:47-99.
- Manjunath CK, Goings GE, Page E. Cytoplasmic surface and intramembrane components of rat heart gap junctional proteins. *Am J Physiol*. 1984 Jun;246(6 Pt 2):H865-75.
- Martin DI, Orkin SH. Transcriptional activation and DNA binding by the erythroid factor GF-1/NF-E1/Eryf 1. *Genes Dev*. 1990 Nov;4(11):1886-98.
- Martin PE, Blundell G, Ahmad S, Errington RJ, Evans WH. Multiple pathways in the trafficking and assembly of connexin 26, 32 and 43 into gap junction intercellular communication channels. *J Cell Sci*. 2001 Nov;114(Pt 21):3845-55.
- Mason JI, Howe BE, Howie AF, Morley SD, Nicol MR, Payne AH. Promiscuous 3beta-hydroxysteroid dehydrogenases: testosterone 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities of mouse type I and VI 3beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocr Res*. 2004 Nov;30(4):709-14.
- Matsuo Y, Nomata K, Eguchi J, Aoki D, Hayashi T, Hishikawa Y, Kanetake H, Shibata Y, Koji T. Immunohistochemical analysis of connexin43 expression in infertile human testes. *Acta Histochem Cytochem*. 2007 Jul 3;40(3):69-75.
- Maymon BB, Yogev L, Paz G, Kleiman SE, Schreiber L, Botchan A, Hauser R, Yavetz H. Sertoli cell maturation in men with azoospermia of different etiologies. *Fertil Steril*. 2002 May;77(5):904-9.
- Mazaud-Guittot S, Meugnier E, Pesenti S, Wu X, Vidal H, Gow A, Le Magueresse-Battistoni B. Claudin 11 deficiency in mice results in loss of the Sertoli cell epithelial phenotype in the testis. *Biol Reprod*. 2010 Jan;82(1):202-13.
- Mazet F, Wittenberg BA, Spray DC. Fate of intercellular junctions in isolated adult rat cardiac cells. *Circ Res*. 1985 Feb;56(2):195-204.

- McLaren A. Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. *Mol Cell Endocrinol.* 2000 May 25;163(1-2):3-9.
- Mehta PP. Introduction: a tribute to cell-to-cell channels. *J Membr Biol.* 2007 Jun;217(1-3):5-12.
- Mograbi B, Corcelle E, Defamie N, Samson M, Nebout M, Segretain D, Fénichel P, Pointis G. Aberrant Connexin 43 endocytosis by the carcinogen lindane involves activation of the ERK/mitogen-activated protein kinase pathway. *Carcinogenesis.* 2003 Aug;24(8):1415-23. Epub 2003 Jun 5.
- Mok BW, Yeung WS, Luk JM. Differential expression of gap-junction gene connexin 31 in seminiferous epithelium of rat testes. *FEBS Lett.* 1999 Jun 25;453(3):243-8.
- Molkentin JD. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem.* 2000 Dec 15;275(50):38949-52.
- Mruk DD, Cheng CY. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr Rev.* 2004 Oct;25(5):747-806.
- Münsterberg A, Lovell-Badge R. Expression of the mouse anti-müllerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development.* 1991 Oct;113(2):613-24.
- 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 Nov;111(5 Pt 1):2077-88.
- Musil LS, Goodenough DA. Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *J Cell Biol.* 1991 Dec;115(5):1357-74.
- Musil LS, Goodenough DA. Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell.* 1993 Sep 24;74(6):1065-77.
- Musil LS, Le AC, VanSlyke JK, Roberts LM. Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function. *J Biol Chem.* 2000 Aug 18;275(33):25207-15.

- Myers M, Ebling FJ, Nwagwu M, Boulton R, Wadhwa K, Stewart J, Kerr JB. Atypical development of Sertoli cells and impairment of spermatogenesis in the hypogonadal (hpg) mouse. *J Anat.* 2005 Dec;207(6):797-811.
- 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.* 1976 Feb 6;166(1):37-48.
- Nagy A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis.* 2000 Feb;26(2):99-109.
- Naus CC, Hearn S, Zhu D, Nicholson BJ, Shivers RR. Ultrastructural analysis of gap junctions in C6 glioma cells transfected with connexin43 cDNA. *Exp Cell Res.* 1993 May;206(1):72-84.
- Nielsen PA, Kumar NM. Differences in expression patterns between mouse connexin-30.2 (Cx30.2) and its putative human orthologue, connexin-31.9. *FEBS Lett.* 2003 Apr 10;540(1-3):151-6.
- Nistal M, Paniagua R. Leydig cell differentiation induced by stimulation with HCG and HMG in two patients affected with hypogonadotropic hypogonadism. *Andrologia.* 1979 May-Jun;11(3):211-22.
- Payne AH, Clarke TR, Bain PA. The murine 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase multigene family: structure, function and tissue-specific expression. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1995 Jun;53(1-6):111-8.
- Payne AH, Abbaszade IG, Clarke TR, Bain PA, Park CH. The multiple murine 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms: structure, function, and tissue- and developmentally specific expression. *Steroids.* 1997 Jan;62(1):169-75.
- 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 Sep-Oct;16(5):400-9.
- Pelliniemi LJ, Fröjdman K, Paranko J. Embryological and Prenatal Development and Function of Sertoli Cells. In: Russell LD, Griswold MD (Hrsg.). *The Sertoli Cell.* Cache River Press, Clearwater 1993, Seite 87-113.
- Pepinsky RB, Sinclair LK, Chow EP, Mattaliano RJ, Manganaro TF, Donahoe PK, Cate RL. Proteolytic processing of mullerian inhibiting substance produces a transforming growth factor-beta-like fragment. *J Biol Chem.* 1988 Dec 15;263(35):18961-4.

- Pérez-Armendariz EM, Romano MC, Luna J, Miranda C, Bennett MV, Moreno AP. Characterization of gap junctions between pairs of Leydig cells from mouse testis. *Am J Physiol.* 1994 Aug;267(2 Pt 1):C570-80.
- Pérez-Armendariz EM, Lamoyi E, Mason JI, Cisneros-Armas D, Luu-The V, Bravo Moreno JF. Developmental regulation of connexin 43 expression in fetal mouse testicular cells. *Anat Rec.* 2001 Nov 1;264(3):237-46.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001 May 1;29(9):e45.
- Plum A, Hallas G, Magin T, Dombrowski F, Hagendorff A, Schumacher B, Wolpert C, Kim J, Lamers WH, Evert M, Meda P, Traub O, Willecke K. Unique and shared functions of different connexins in mice. *Curr Biol.* 2000 Sep 21;10(18):1083-91.
- Pointis G, Fiorini C, Defamie N, Segretain D. Gap junctional communication in the male reproductive system. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Dec 20;1719(1-2):102-16.
- Prince FP. Ultrastructural evidence of mature Leydig cells and Leydig cell regression in the neonatal human testis. *Anat Rec.* 1990 Dec;228(4):405-17.
- Rajpert-De Meyts E, Jørgensen 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 Metab.* 1999 Oct;84(10):3836-44.
- Raymond CS, Murphy MW, O'Sullivan MG, Bardwell VJ, Zarkower D. *Dmrt1*, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev.* 2000 Oct 15;14(20):2587-95.
- Reaume AG, de Sousa PA, Kulkarni S, Langille BL, Zhu D, Davies TC, Juneja SC, Kidder GM, Rossant J. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science.* 1995 Mar 24;267(5205):1831-4.
- Rey R, Lordereau-Richard I, Carel JC, Barbet P, Cate RL, Roger M, Chaussain JL, Josso N. Anti-müllerian hormone and testosterone serum levels are inversely during normal and precocious pubertal development. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993 Nov;77(5):1220-6.
- Rey R, Mebarki F, Forest MG, Mowszowicz I, Cate RL, Morel Y, Chaussain JL, Josso N. Anti-müllerian hormone in children with androgen insensitivity. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994 Oct;79(4):960-4.
- Rey R, al-Attar L, Louis F, Jaubert F, Barbet P, Nihoul-Fékété C, Chaussain JL, Josso N. Testicular dysgenesis does not affect expression of anti-müllerian

- hormone by Sertoli cells in premeiotic seminiferous tubules. *Am J Pathol.* 1996 May;148(5):1689-98.
- Richburg JH, Boekelheide K. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate rapidly alters both Sertoli cell vimentin filaments and germ cell apoptosis in young rat testes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996 Mar;137(1):42-50.
- Risley MS, Tan IP, Roy C, Sáez JC. Cell-, age- and stage-dependent distribution of connexin43 gap junctions in testes. *J Cell Sci.* 1992 Sep;103 (Pt 1):81-96.
- Risley MS. Connexin gene expression in seminiferous tubules of the Sprague-Dawley rat. *Biol Reprod.* 2000 Mar;62(3):748-54.
- 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 Sep;67(3):945-52.
- Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I, Vassalli P. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J.* 1997 May 1;16(9):2262-70.
- Rogatsch H, Jezek D, Hittmair A, Mikuz G, Feichtinger H. Expression of vimentin, cytokeratin, and desmin in Sertoli cells of human fetal, cryptorchid, and tumour-adjacent testicular tissue. *Virchows Arch.* 1996 Feb;427(5):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 Feb;202(2):241-6.
- Romeo PH, Prandini MH, Joulin V, Mignotte V, Prenant M, Vainchenker W, Marguerie G, Uzan G. Megakaryocytic and erythrocytic lineages share specific transcription factors. *Nature.* 1990 Mar 29;344(6265):447-9.
- Roscoe WA, Barr KJ, Mhawi AA, Pomerantz DK, Kidder GM. Failure of spermatogenesis in mice lacking connexin43. *Biol Reprod.* 2001 Sep;65(3):829-38.
- Rouiller-Fabre V, Carmona S, Merhi RA, Cate R, Habert R, Vigier B. Effect of anti-Mullerian hormone on Sertoli and Leydig cell functions in fetal and immature rats. *Endocrinology.* 1998 Mar;139(3):1213-20.
- Russell LD, Peterson RN. Sertoli cell junctions: morphological and functional correlates. *Int Rev Cytol.* 1985;94:177-211.

- Russell LD, Bartke A, Goh JC. Postnatal development of the Sertoli cell barrier, tubular lumen, and cytoskeleton of Sertoli and myoid cells in the rat, and their relationship to tubular fluid secretion and flow. *Am J Anat.* 1989 Mar;184(3):179-89.
- Russell LD. Role in Spermiation. In: Russell LD, Griswold MD (Hrsg.). *The Sertoli Cell.* Cache River Press, Clearwater 1993, Seite 269-304.
- Russell LD, França LR, Brinster RL. Ultrastructural observations of spermatogenesis in mice resulting from transplantation of mouse spermatogonia. *J Androl.* 1996 Nov-Dec;17(6):603-14.
- 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 testes and canine testicular tumors. *Histochem Cell Biol.* 2008 Sep;130(3):537-48.
- Sáez JC, Gregory WA, Watanabe T, Dermietzel R, Hertzberg EL, Reid L, Bennett MV, Spray DC. cAMP delays disappearance of gap junctions between pairs of rat hepatocytes in primary culture. *Am J Physiol.* 1989 Jul;257(1 Pt 1):C1-11.
- Sáez JC, Nairn AC, Czernik AJ, Spray DC, Hertzberg EL, Greengard P, Bennett MV. Phosphorylation of connexin 32, a hepatocyte gap-junction protein, by cAMP-dependent protein kinase, protein kinase C and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Eur J Biochem.* 1990 Sep 11;192(2):263-73.
- Sáez JC, Martínez AD, Brañes MC, González HE. Regulation of gap junctions by protein phosphorylation. *Braz J Med Biol Res.* 1998 May;31(5):593-600.
- Sáez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev.* 2003 Oct;83(4):1359-400.
- Sasso-Cerri E, Cerri PS. Morphological evidences indicate that the interference of cimetidine on the peritubular components is responsible for detachment and apoptosis of Sertoli cells. *Reprod Biol Endocrinol.* 2008 May 9;6:18.
- Schnorr B, Kressin M. *Embryologie der Haustiere.* Enke Verlag, Stuttgart 2006, 5. Auflage, Seite 3-13.
- Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000 Mar;182(3):311-22.
- Schrans-Stassen BH, Saunders PT, Cooke HJ, de Rooij DG. Nature of the spermatogenic arrest in Dazl ^{-/-} mice. *Biol Reprod.* 2001 Sep;65(3):771-6.

- Segretain D, Decrouy X, Dompierre J, Escalier D, Rahman N, Fiorini C, Mograbi B, Siffroi JP, Huhtaniemi I, Fenichel P, Pointis G. Sequestration of connexin43 in the early endosomes: an early event of Leydig cell tumor progression. *Mol Carcinog.* 2003 Dec;38(4):179-87.
- Segretain D, Falk MM. Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Mar 23;1662(1-2):3-21.
- Segretain D, Fiorini C, Decrouy X, Defamie N, Prat JR, Pointis G. A proposed role for ZO-1 in targeting connexin 43 gap junctions to the endocytic pathway. *Biochimie.* 2004 Apr-May;86(4-5):241-4.
- 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 Jun;125(6):769-84.
- Simard J, Ricketts ML, Gingras S, Soucy P, Feltus FA, Melner MH. Molecular biology of the 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family. *Endocr Rev.* 2005 Jun;26(4):525-82.
- Skinner MK. Secretion of Growth Factors and Other Regulatory Factors. In: Russell LD, Griswold MD (Hrsg.). *The Sertoli Cell.* Cache River Press, Clearwater 1993a, Seite 237-48.
- Skinner MK. Sertoli cell-peritubular Myoid Cell Interactions. In: Russell LD, Griswold MD (Hrsg.). *The Sertoli Cell.* Cache River Press, Clearwater 1993b, Seite 477-84.
- Söhl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res.* 2004 May 1;62(2):228-32.
- 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 (connexin 43) in mice. *Biol Reprod.* 2007 May;76(5):804-12.
- Steger K, Rey R, Kliesch S, Louis F, Schleicher G, Bergmann M. Immunohistochemical detection of immature Sertoli cell markers in testicular tissue of infertile adult men: a preliminary study. *Int J Androl.* 1996 Apr;19(2):122-8.
- Steger K, Tetens F, Bergmann M. Expression of connexin 43 in human testis. *Histochem Cell Biol.* 1999a Sep;112(3):215-20.
- Steger K, Rey R, Louis F, Kliesch S, Behre HM, Nieschlag E, Hoepffner W, Bailey D, Marks A, Bergmann M. Reversion of the differentiated phenotype and maturation

- block in Sertoli cells in pathological human testis. *Hum Reprod.* 1999b Jan;14(1):136-43.
- Suárez-Quian CA, Martínez-García F, Nistal M, Regadera J. Androgen receptor distribution in adult human testis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Jan;84(1):350-8.
- Tan IP, Roy C, Sáez JC, Sáez CG, Paul DL, Risley MS. Regulated assembly of connexin33 and connexin43 into rat Sertoli cell gap junctions. *Biol Reprod.* 1996 Jun;54(6):1300-10.
- Tan KA, De Gendt K, Atanassova N, Walker M, Sharpe RM, Saunders PT, Denolet E, Verhoeven G. The role of androgens in sertoli cell proliferation and functional maturation: studies in mice with total or Sertoli cell-selective ablation of the androgen receptor. *Endocrinology.* 2005 Jun;146(6):2674-83.
- Tarulli GA, Stanton PG, Lerchl A, Meachem SJ. Adult sertoli cells are not terminally differentiated in the Djungarian hamster: effect of FSH on proliferation and junction protein organization. *Biol Reprod.* 2006 May;74(5):798-806.
- Theis M, Magin TM, Plum A, Willecke K. General or cell type-specific deletion and replacement of connexin-coding DNA in the mouse. *Methods.* 2000 Feb;20(2):205-18.
- Theis M, Mas C, Döring B, Krüger O, Herrera P, Meda P, Willecke K. General and conditional replacement of connexin43-coding DNA by a lacZ reporter gene for cell-autonomous analysis of expression. *Cell Commun Adhes.* 2001;8(4-6):383-6.
- Tran D, Picard JY, Campargue J, Josso N. Immunocytochemical detection of anti-müllerian hormone in Sertoli cells of various mammalian species including human. *J Histochem Cytochem.* 1987 Jul;35(7):733-43.
- Traub O, Look J, Dermietzel R, Brümmer F, Hülser D, Willecke K. Comparative characterization of the 21-kD and 26-kD gap junction proteins in murine liver and cultured hepatocytes. *J Cell Biol.* 1989 Mar;108(3):1039-51.
- Trosko JE, Ruch RJ. Cell-cell communication in carcinogenesis. *Front Biosci.* 1998 Feb 15;3:d208-36.
- Unger VM, Kumar NM, Gilula NB, Yeager M. Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. *Science.* 1999 Feb 19;283(5405):1176-80.
- Unwin PN, Zampighi G. Structure of the junction between communicating cells. *Nature.* 1980 Feb 7;283(5747):545-9.

- Unwin PN, Ennis PD. Two configurations of a channel-forming membrane protein. *Nature*. 1984 Feb 16-22;307(5952):609-13.
- Van Haaster LH, De Jong FH, Docter R, De Rooij DG. The effect of hypothyroidism on Sertoli cell proliferation and differentiation and hormone levels during testicular development in the rat. *Endocrinology*. 1992 Sep;131(3):1574-6.
- Vergouwen RP, Jacobs SG, Huiskamp R, Davids JA, de Rooij DG. Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *J Reprod Fertil*. 1991 Sep;93(1):233-43.
- Vergouwen RP, Huiskamp R, Bas RJ, Roepers-Gajadien HL, Davids JA, de Rooij DG. Postnatal development of testicular cell populations in mice. *J Reprod Fertil*. 1993 Nov;99(2):479-85.
- Vinken M, Vanhaecke T, Papeleu P, Snykers S, Henkens T, Rogiers V. Connexins and their channels in cell growth and cell death. *Cell Signal*. 2006 May;18(5):592-600.
- Wang ZQ, Watanabe Y, Toki A, Itano T. Altered distribution of Sertoli cell vimentin and increased apoptosis in cryptorchid rats. *J Pediatr Surg*. 2002 Apr;37(4):648-52.
- Wayne Vogl A, Pfeiffer DC, Redenbach DM, Grove BD. Sertoli Cell Cytoskeleton. In: Russell LD, Griswold MD (Hrsg.). *The Sertoli Cell*. Cache River Press, Clearwater 1993, Seite 39-86.
- Weinbauer GF, Gromoll J, Simoni M, Nieschlag E. Physiologie der Hodenfunktion. In: Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (Hrsg.). *Andrologie – Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. Springer Verlag, Heidelberg 2009, 3. Auflage, Seite 15-62.
- Weiss MJ, Orkin SH. GATA transcription factors: key regulators of hematopoiesis. *Exp Hematol*. 1995 Feb;23(2):99-107.
- Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Güldenagel M, Deutsch U, Söhl G. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem*. 2002 May;383(5):725-37.
- Williams K, McKinnell C, Saunders PT, Walker M, Fisher JS, Turner KJ, Atanassova N, Sharpe M. 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 May-Jun;7(3):236-47.

- 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 Apr 4;7:26.
- Yomogida K, Ohtani H, Harigae H, Ito E, Nishimune Y, Engel JD, Yamamoto M. Developmental stage- and spermatogenic cycle-specific expression of transcription factor GATA-1 in mouse Sertoli cells. *Development.* 1994 Jul;120(7):1759-66.
- You S, Li W, Lin T. Expression and regulation of connexin43 in rat Leydig cells. *J Endocrinol.* 2000 Aug;166(2):447-53.
- Zhang JT, Chen M, Foote CI, Nicholson BJ. Membrane integration of in vitro-translated gap junctional proteins: co- and post-translational mechanisms. *Mol Biol Cell.* 1996 Mar;7(3):471-82.
- Zon LI, Yamaguchi Y, Yee K, Albee EA, Kimura A, Bennett JC, Orkin SH, Ackerman SJ. Expression of mRNA for the GATA-binding proteins in human eosinophils and basophils: potential role in gene transcription. *Blood.* 1993 Jun 15;81(12):3234-41.

9 ANHANG

9.1 Stoffe und Reagenzien

Aceton	Roth, Karlsruhe
Agarose	Bioline, Luckenwalde
APES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
ApopTag [®] Kit (S7100)	Millipore, Schwalbach
Azur II	Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu-Ulm
BCA Protein Assay Reagent	Pierce, Illinois, USA
Bleicitrat	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Borax	Merck, Darmstadt
BSA	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt
DEPC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
DirectPCR Lysis Reagent (mouse tail)	Viagen Biotech, Los Angeles, USA
DMP 30	Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu-Ulm
DNA Loading Dye (6 x)	Fermentas, St. Leon-Rot
DNase I, RNase free	Roche, Mannheim
dNTP Mix (10 mM)	Applied Biosystems, Darmstadt
EDTA-Lösung (0,5 M)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Eosin	Shandon, Frankfurt
Epon	Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu-Ulm
Essigsäure 100% (Eisessig)	Merck, Darmstadt
Ethanol (100 %, vergällt)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
EUKITT [®]	Langenbrinck, Emmendingen
Formalin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
GelRed [™] Nucleic Acid Gel Stain	Biotium, Hayward, USA
GeneJET [™] Gel Extraction Kit	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Glutaraldehyd	Roth, Karlsruhe
Glycerin-Gelatine	Merck, Darmstadt
GoTaq [®] Flexi DNA Polymerase	Promega, Mannheim

Green GoTaq [®] Flexi Buffer (5 x)	Promega, Mannheim
Guanidinhydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Hämatoxylin	Shandon, Frankfurt
HCl	Merck, Darmstadt
H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt
iQTM SYBR [®] Green Supermix	BioRad, München
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Ketamin	Medistar GmbH, Holzwickede
Laurylsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Magermilchpulver	Heirler Cenovis, Radolfzell
Marker (1 kb DNA Ladder)	New England BioLabs, Frankfurt
Marker (PCR 100 bp Low Ladder)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Marker (PageRuler [™] Protein Ladder)	Fermentas, St. Leon-Rot
Methanol	Merck, Darmstadt
Methylenblau	Merck, Darmstadt
MgCl ₂ -Lösung	Applied Biosystems, Darmstadt
Mineralöl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
MultiScribe [™] Reverse Transcriptase	Applied Biosystems, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	Merck, Darmstadt
NuPAGE [®] Antioxidant	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE [®] LDS Sample Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE [®] MOPS SDS Running Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE [®] Sample Reducing Agent	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE [®] Transfer Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
OsO ₄	Roth, Karlsruhe
Paraffin	Vogel, Giessen
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS-Tabletten	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
PCR Gold Buffer (10 x)	Applied Biosystems, Darmstadt
Peroxidase-Substratkit AEC	biologo, Kronshagen
Peroxidase-Substratkit DAB	biologo, Kronshagen
Pikrinsäure	Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu-Ulm

Primer	Eurofins MWG GmbH, Ebersberg
Proteinase K	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Random Hexamers (50 µM)	Applied Biosystems, Darmstadt
RNase-AWAY®	Invitrogen, Karlsruhe
RNase Inhibitor (20 U/µl)	Applied Biosystems, Darmstadt
RNase Inhibitor (40 U/µl)	Applied Biosystems, Darmstadt
SYBR® GREEN I	Sigma, Saint Louis, USA
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Tris-HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Triton	Merck, Darmstadt
Trizma® base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
TRizol®-Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
TrueBlue™ Peroxidase Substrate	KPL, Maryland, USA
Tween® 20	Roth, Karlsruhe
Uranylacetat	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Vectastain Elite ABC Standard Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Vitro-Clud	Langenbrinck, Emmendingen
Xylazin	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg
Xylol	Roth, Karlsruhe

9.2 Antikörper

AR (N-20): sc-816	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
β-Gal (ab616)	Abcam Ltd., Cambridge, UK
3β-HSD	Prof. J. I. Mason, Edinburgh, Schottland
GATA-1 (N6): sc-265	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Kaninchen Anti-Ratte IgG, BA-4000	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Kaninchen Anti-Ziege IgG, E0466	DAKO, Hamburg
Ki-67 (SP6)	Innovative Diagnostik-Systeme, Hamburg
MIS (C-20): sc-6886	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Vimentin (C-20): sc-7557	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Ziege Anti-Kaninchen IgG, E0432	DAKO, Hamburg

9.3 Hergestellte Puffer und Lösungen

2 %iges APES	10 ml APES 490 ml Aceton
Blockpuffer I	1,5 g (5 %) BSA 1,5 g (5 %) Magermilchpulver 30 ml PBS-Puffer
Bouin'sche Lösung	15 ml Pikrinsäure-Lösung (gesättigt) 5 ml Formalin 1 ml Eisessig (kurz vor Gebrauch zusetzen)
BSA-Blockpuffer	1 g BSA 70 ml Tris-Waschpuffer
Citratpuffer	7 ml Stammlösung A 41 ml Stammlösung B ad 500 ml Aqua Dest <u>Stammlösung A:</u> 4,2 g Citronensäure-Monohydrat in 200 ml Aqua bidest lösen <u>Stammlösung B:</u> 29,41 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat in 1 l Aqua bidest lösen
3 %iges H ₂ O ₂	54 ml 30 %iges H ₂ O ₂ 6 ml Methanol
10 % NBF nach Lillie	25 ml Formalin 1 g NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O 1,625 g Na ₂ HPO ₄ 225 ml Aqua dest pH-Wert auf 7,0 einstellen
1 x NuPAGE® Transfer Buffer	50 ml 20 x NuPAGE® transfer buffer 1 ml NuPAGE® Antioxidant

	100 ml Methanol 849 ml Aqua bidest
PBS-Puffer	5 PBS-Tabletten 1000 ml Aqua dest
Proteinase K Stammlösung (4µg/µl)	4 mg Proteinase K 1 ml PBS-Puffer
Puffer III	2 g (1 %) BSA 200 µl (0,1 %) Tween [®] 20 200 ml PBS-Puffer
Puffer IV	200 µl (0,1 %) Tween [®] 20 200 ml PBS-Puffer
Richardson	1 % Azur II in Aqua dest 1 % Methylenblau in 1 % Borax in Aqua dest
1 %ige SDS-Lösung	1g Laurylsulfat 100 ml Aqua bidest
10 x TAE-Puffer (pH 8,0)	48,4 g Trizma [®] base 20 ml EDTA (0,5 M) 990 ml Aqua bidest pH-Wert mit Essigsäure auf 8,0 einstellen auf 1000 ml mit Aqua bidest auffüllen
1 x TAE-Puffer (pH 8,0)	100 ml 10 x TAE-Puffer (pH 8,0) 900 ml Aqua bidest
10 x TAE-Puffer (pH 8,4)	48,4 g Trizma [®] base 20 ml EDTA (0,5 M) 11,4 ml Essigsäure

	<p>990 ml Aqua bidest pH-Wert mit Essigsäure auf 8,4 einstellen auf 1000 ml mit Aqua bidest auffüllen</p>
1 x TAE-Puffer (pH 8,4)	<p>100 ml 10 x TAE-Puffer (pH 8,4) 900 ml Aqua bidest</p>
Tris-HCl-Puffer	<p>1,2 g Tris-HCl 100 ml DEPC-Wasser pH-Wert mit HCl auf 7,3 einstellen</p>
Tris-Waschpuffer	<p>100 ml Stammlösung 900 ml Aqua dest 250 µl Triton <u>Stammlösung:</u> 60,5 g Tris-HCl in 700 ml Aqua dest lösen; pH-Wert auf 7,6 einstellen und mit Aqua dest auf 1000 ml auffüllen; pH- Wert erneut einstellen und 90 g NaCl darin lösen.</p>
Waschpuffer II	<p>1,5 g (1 %) BSA 150 ml PBS-Puffer</p>
Xylol/Epon-Gemisch	<p>10 ml Xylol 10 ml Epon 0,2 ml (2 %) DMP 30</p>
Yellow Fix	<p>4 % Paraformaldehyd 0,02 % Pikrinsäure 2 % Glutaraldehyd PBS-Puffer</p>

9.4 Geräte

Agargel Mini Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Ausgießstation EG 1160	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Autoklav	MAGV, Rabenau-Londorf
Axiophot	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Canon PIXMA MP510	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
CFX96™ Real-Time PCR System	BioRad, München
Einbettgerät TP 1050	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Elektronenmikroskop EM 109	Carl Zeiss AG, Oberkochen
MIKRO 22R-Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Mikrowelle, Privileg 8020	Quelle, Fürth
Mini-Wippschüttler WT 16	Biometra, Göttingen
PowerPac 200	BioRad, München
Reichert Ultracut-Mikrotom	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Reichert Ultrastainer	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Schlittenmikrotom SM 2000 R	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Schüttler IKA®KS 130basic	IKA®Werke, Staufen
Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Sterilisator, Heraeus	MAGV, Rabenau-Londorf
Thermal printer Mitsubishi P93E	Biometra, Göttingen
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen
Transilluminator UVsolo L	Biometra, Göttingen
Trockenschrank	Memmert, Schwalbach
Ultra-Turrax® T8	IKA® Werke, Staufen
Vortexer	Heidolph, Schwalbach
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach
Wasserbad	Memmert, Schwalbach
XCell II™ Blot Module	Invitrogen, Karlsruhe
XCell SureLock™ Mini-Cell	Invitrogen, Karlsruhe

9.5 Gerätezubehör und sonstiges Material

DAKO-Pen	DAKO, Hamburg
Feuchte Kammer	Kreatech Diagnostics, Amsterdam
Filterpapier	Invitrogen, Karlsruhe
Kupfer-Netze	Plano GmbH, Wetzlar
Microseal [®] 'B' Adhesive Seals	BioRad, München
Multiplate [™] 96-Well PCR Plates	BioRad, München
Nitrozellulose-Membran	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE [®] Novex [®] 10 % Bis-Tris Gel	Invitrogen, Karlsruhe
Objektträger	Langenbrinck, Emmendingen
PARAFILM [®]	Pechiney Plastic Packing, Chicago, USA
Pipettenspitzen, gestopft (steril)	nerbe plus GmbH, Winsen
Plan-Apochromat [®] 20x/0,6	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Plan-Neofluar [®] 40x/1,30 Öl	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Silikon-Ausbettförmchen	Plano GmbH, Wetzlar
Sponge Pads	Invitrogen, Karlsruhe
UVette [®]	Eppendorf AG, Hamburg

9.6 Software

analySIS [®]	Soft Imaging System GmbH, Münster
Basic Local Alignment Search Tool	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi
Beacon Designer Software	BioRad, München
BMDP Statistical Software, release 8.1	BMDP Statistical Software, Los Angeles, CA
CFX Manager [™] Software 1.6	BioRad, München

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.

DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. R. Brehm, möchte ich von ganzem Herzen danken, und zwar für das mir entgegengebrachte Vertrauen beim Überlassen des Themas, für seine Unterstützung beim wissenschaftlichen Arbeiten und Erstellen dieser Dissertation, für die sehr freundschaftliche Zusammenarbeit und für seine Ratschläge und das in jeder Hinsicht gezeigte Verständnis und seine Geduld, und nicht zu vergessen seinen Optimismus.

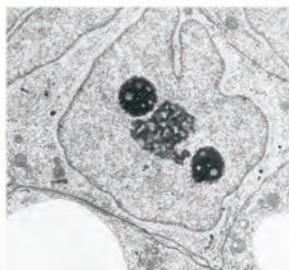
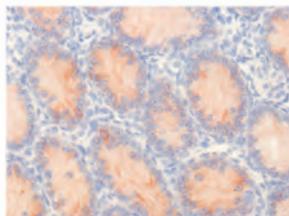
Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. M. Bergmann für seine zahlreichen Hilfestellungen und wertvollen Tipps, vor allem bei der Erstellung von Postern und wissenschaftlichen Veröffentlichungen.

Weiterhin danke ich der Dr. med. vet. Hans-Joachim und Gertrud Engemann-Stiftung, Gießen für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit in Form des Engemann-Stipendiums. Der Deutschen Forschungsgesellschaft (BR 3365/2-1 und KFO 181/1) danke ich ebenfalls für die finanzielle Unterstützung, ohne die das Projekt nicht hätte durchgeführt werden können.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die freundliche Unterstützung danken. Insbesondere bei Frau J. Dern-Wieloch, A. Hax, S. Schubert-Porth und R. Weigel bedanke ich mich herzlichst für ihre zahlreichen Hilfestellungen im Labor.

Vor allem aber danke ich auch meinen Mitdoktoranden D. Fietz, S. Giese, S. Günther, C. Ratzenböck und T. Reich für ihre vielfältige Hilfe, moralische und freundschaftliche Unterstützung. Auch die sehr schöne und amüsante Zeit im gemeinsamen Doktorandenzimmer bleibt unvergessen.

Zuletzt möchte ich meinen 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.



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-5781-7



9 783835 957817