

**Isoformen des Angiotensin-Converting Enzyms (CD143) in
Hodenentwicklung, Spermatogenese und adulten
Keimzelltumoren**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs der Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Katharina Pauls
aus Dsheskasgan, Kasachstan
Gießen 2002

Aus dem Zentrum für Pathologie
Des Universitätsklinikums Gießen
Leiter: Prof. Dr. med. A. Schulz

Gutachter: Prof. Dr. med. A. Schulz
Gutachter: PD Dr. med. H. Hölschermann

Tag der Disputation: 05.11.02

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Angiotensin-Converting Enzym (ACE, Kininase II, CD143).....	1
1.1.1 Molekularer Aufbau, Genregulation und Isoformen	1
1.1.2 Enzymkinetik und Substrate	4
1.1.3 Expression.....	4
1.2 Physiologische Funktionen von ACE.....	6
1.2.1 Renin-Angiotensin-System (RAS).....	6
1.2.2 Kinin-Kallikrein-System (KKS)	8
1.2.3 AcSDKP.....	9
1.2.4 Weitere Funktionen.....	9
1.3 ACE in testikulären Geweben	10
1.3.1 Physiologische Expression.....	10
1.3.2 Physiologische Funktionen	11
1.3.3 Expression in Keimzelltumoren (KZT)	12
2 Ziele der Arbeit.....	14
3 Material und Methoden	15
3.1 Gewebe	15
3.1.1 Untersuchungsmaterial	15
3.1.2 Gewebepreparation und Lagerung	16
3.2 Immunhistochemie (IH)	17
3.2.1 Vorbehandlung der Präparate	17
3.2.2 Monoklonale Antikörper (mAk).....	17
3.2.3 APAAP-Technik.....	18
3.2.4 LSAB-Technik.....	20
3.2.5 Auswertung.....	20
3.2.6 Statistik	21
3.3 Molekularbiologische Methoden.....	22

3.3.1	Isolierung der mRNA aus Gewebeschnitten.....	22
3.3.2	Isolierung der DNA aus Gewebeschnitten.....	23
3.3.3	UV-Laser assistiertes Cell-Picking (LACP)	23
3.3.4	Primer.....	24
3.3.5	cDNA- Synthese	25
3.3.6	PCR.....	26
3.3.7	In situ-Hybridisierung (ISH).....	28
4	Ergebnisse.....	31
4.1	Somatisches ACE in der Hodenreifung.....	31
4.2	ACE-Isoformen im normalen Hoden und Nebenhoden	36
4.2.1	Zelluläre Expression der ACE-Isoformen im adulten Hoden.....	36
4.2.2	Zelluläre Expression von ACE in Rete testis und Nebenhoden	41
4.3	ACE-Expression in Keimzelltumoren	47
4.3.1	Isoformen in nicht-invasiven und invasiven Tumoren	47
4.3.2	ACE und GCAP in intratubulären Keimzellneoplasien (IKZN)	49
4.3.3	ACE und GCAP in invasiven Keimzelltumoren	50
4.3.3.1	Seminome	50
4.3.3.2	Nicht-seminomatöse Tumoren (NKZN)	51
5	Diskussion.....	56
5.1	ACE-Expression im regulären Hoden	56
5.2	ACE-Expression im regulären Nebenhoden.....	58
5.3	Funktionelle Bedeutung von ACE im regulären Hoden.....	60
5.4	ACE als Marker neoplastischer Keimzellen.....	62
5.5	ACE in der Pathogenese der KZT	64
5.6	Funktionelle Bedeutung von ACE in Keimzelltumoren.....	67
6	Zusammenfassung	68
7	Literaturverzeichnis	71
8	Anhang: Anleitungen, Ansätze, Reagenzien	87

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zelluläre Expression von sACE im menschlichen Organismus	5
Tab. 2: ACE-Isoformen und männliche Fertilität	11
Tab. 3: Analysiertes Gewebe und histologische Klassifizierung der Keimzelltumoren	15
Tab. 4: Monoklonale Antikörper gegen ACE und GCAP/PIAP.....	18
Tab. 5: Tabellarisches Schema des Immunreaktiven Scores (IRS)	21
Tab. 6: Primer für die Detektion von ACE-Isoformen und Positivkontrollen.....	25
Tab. 7: Somatisches ACE und GCAP/PIAP in der Hodenentwicklung	33
Tab. 8: Zelluläre Verteilung der ACE-Isoformen im normalen Hodengewebe.....	36
Tab. 9: Messenger-RNA und Protein der ACE-Isoformen in Keimzelltumoren.....	48
Tab. 10: Somatisches ACE und GCAP in IKZN	49
Tab. 11: Vergleich der Markerexpression in IKZN und invasiven Tumoren.....	50

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Gen, mRNAs und Proteinstrukturen	3
Abb. 2: Das Renin-Angiotensin-System (RAS)	6
Abb. 3: SACE und GCAP in Hodengeweben verschiedener Entwicklungsstufen.....	35
Abb. 4: ACE-Isoformen im normalen adulten Hodengewebe	39
Abb. 5: Schema der tACE-Expression in der Spermatogenese	40
Abb. 6: Somatisches ACE in Epithelien von Rete testis und Ductuli efferentes.....	43
Abb. 7: Somatisches ACE im Ductus epididymidis	45
Abb. 8: Schema der sACE -Expression im Nebenhodenepithel.....	46
Abb. 9: Expression von sACE und GCAP in Keimzelltumoren	53
Abb. 10: Analyse der Expression von sACE und GCAP in Keimzelltumoren	54
Abb. 11: Vergleich der Immunreaktivität von sACE und GCAP in Seminomen	55

Abkürzungsverzeichnis

µm, mm, µl, ml, l	Mikrometer, Millimeter, Mikroliter, Milliliter, Liter
µg, mg, g, kg	Mikrogramm, Milligramm, Gramm, Kilogramm
Ak, mAk/pAk	Antikörper, monoklonaler/polyklonaler Antikörper
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin I-Converting Enzym
AcSDKP	Tetrapeptid Acetyl-N-Ser-Asp-Lys-Pro
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Ang I, Ang II	Angiotensin I, Angiotensin II
AP	alkalische Phosphatase
APAAP	alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
AT	Angiotensin-Rezeptor
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
Bk	Bradykinin
Bp	Basenpaare
Ca	Calcium
CD	cluster of differentiation, gefolgt von Antigen-Nummer
CIS	Carcinoma in situ
CRE	cAMP- response element
CREM	cAMP- response element modulator
DNA, cDNA	Desoxyribonukleinsäure, copi DNA
EK	embryonales Karzinom
et al.	et alteri (und andere)
gACE	germinales ACE (= testikuläres ACE)
GCAP	germ cell alkaline phosphatase
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPRT	Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase
HWZ	Halbwertszeit
IH	Immunhistologie
IKZN	intratubuläre Keimzellneoplasien
IRS, mIRS	immunreaktiver Score, medianer immunreaktiver Score
ISH	in situ-Hybridisierung
kD	KiloDalton
KKS	Kallikrein-Kinin-System
KZT	Keimzelltumoren
LACP	Laser-assistiertes Cell Picking
LSAB	labelled Streptavidin / Avidin-Biotin
LZ	Leydig-Zelle
mRNA	messenger RNA
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
Na/NaCl	Natrium/Natriumchlorid
NN	Nebenniere
NSKZT	nicht-seminomatöse Keimzelltumoren
PAS	Perjod-Acid Schiff's-Reaktion
PCR	Polymerase chain reaction
PGCs	primordiale Geschlechtszellen
PIAP	plazentare alkalische Phosphatase
RAS	Renin-Angiotensin-System

RT	Reverse Transkription
sACE	somatisches Angiotensin-Converting Enzym
sc-RT-PCR	single cell RT-PCR
sek, min, h	Sekunde, Minute, Stunde
SPSS	statistical package for the social sciences
Tab.	Tabelle
tACE	testikuläres Angiotensin-Converting Enzym
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan

1 Einleitung

1.1 Angiotensin-Converting Enzym (ACE, Kininase II, CD143)

1.1.1 Molekularer Aufbau, Genregulation und Isoformen

Das Angiotensin-I-Converting Enzym (ACE, CD143) ist eine Zn^{2+} -Metalloprotease, die in zwei verschiedenen Isoformen exprimiert wird. Die längere Proteinvariante wird als somatisches ACE (sACE, sCD143) bezeichnet, enthält zwei enzymatisch aktive Zentren und ist ubiquitär vorhanden. Das kürzere testikuläre ACE (tACE, tCD143) besitzt hingegen eine katalytische Domäne und ist ausschließlich in den männlichen Keimzellen lokalisiert.

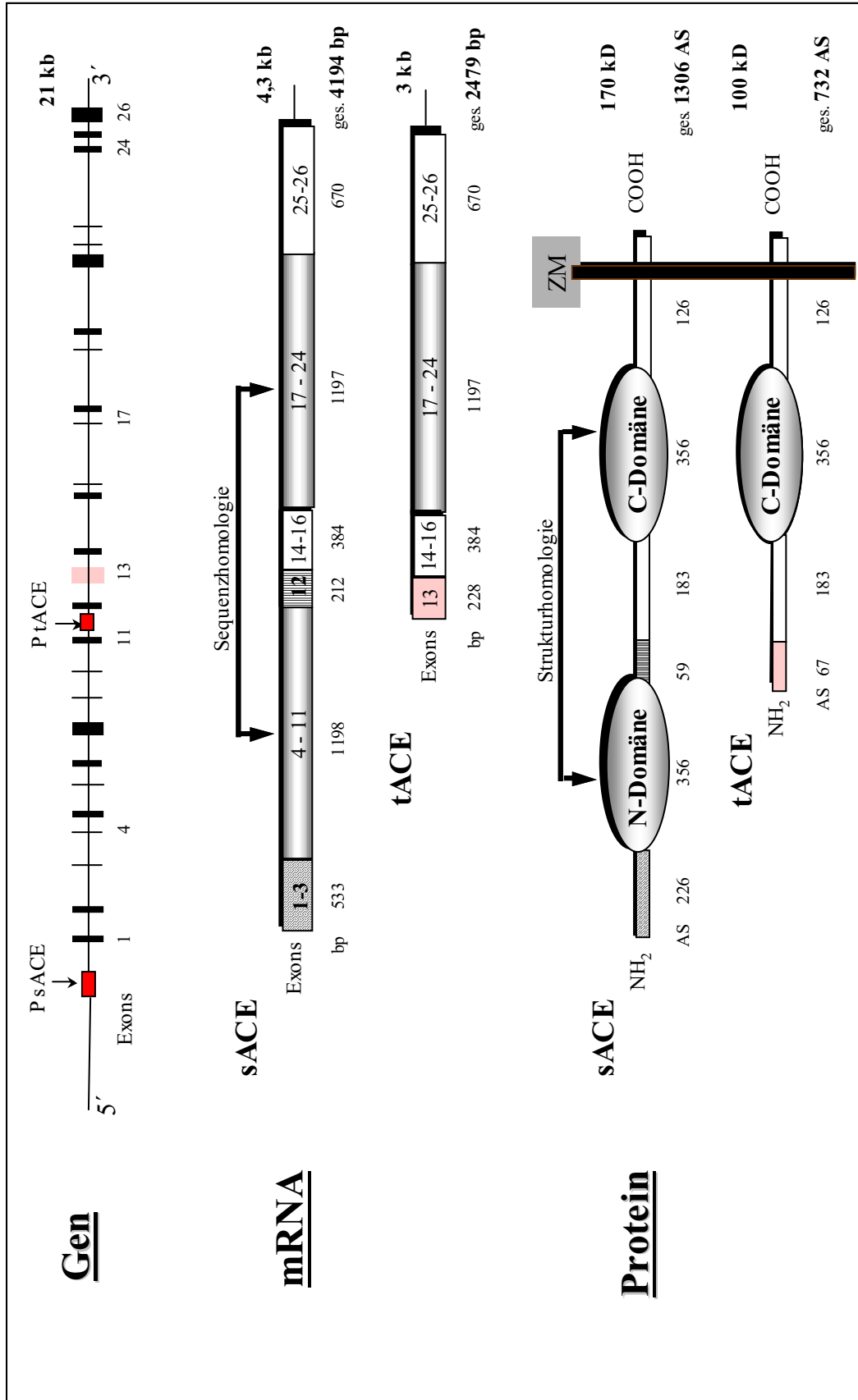
Das ACE-Gen ist phylogenetisch alt und bereits in Insekten nachgewiesen worden (Cornel et al. 1995). Lokalisiert auf Chromosom 17q23, umspannt das Gen 21 kb und enthält 26 Exone (Hubert et al. 1991). Alternative Promotoren regulieren die Transkription der beiden bekannten ACE-Isoformen, der ubiquitär exprimierten somatischen und der testikulären Form (Abb. 1). Die längere somatische mRNA entsteht aus den Exonen 1-12 und 14-26, die testikuläre mRNA aus den Exonen 13-26. Exon 13 des ACE-Gen wird aus der somatischen mRNA-Sequenz durch alternatives Spleißen entfernt und der testikulären mRNA vorbehalten.

Der somatische Promotor befindet sich vor der 5'-Region des ersten Exons und enthält abschwächende Elemente, die vermutlich eine überschießende reaktive Transkription von sACE bremsen (Testut et al. 1993). Da zudem das im Gewebe exprimierte Protein eine hohe molekulare Stabilität aufweist (Metzger et al. 1999), kann von einer langsamen, restriktiv-verhaltenen Expression ausgegangen werden. Das Vorhandensein oder Fehlen eines 287 bp langen DNA-Fragmentes im Intron 16 des ACE-Gens ist verantwortlich für den interindividuell variablen Blutplasma-Spiegel von sACE (Cambien et al. 1988, Alhenc-Gelas et al. 1991).

Der testikuläre Promotor liegt im Intron 12 und enthält das klassisch-regulatorische cAMP-response element (CRE) (Howard et al. 1993). In genetischen Studien führen Mutationen dieser CRE-Sequenz zum Sistieren der mRNA-Transkription (Zhou et al. 1995, Kessler et al. 1998). Das CRE wird durch aktivierend oder repressorisch wirkende CRE-Modulatoren (CREM) gesteuert. Das der CREM-Familie angehörende CREM τ aktiviert während der

Spermatogenese die spermienspezifischen postmeiotischen Gene, z.B. Protamine (Ha et al. 1992). Für den tACE-Promotor wird ebenfalls die positive Regulation durch CREM τ postuliert (Goraya et al. 1995, Zhou et al. 1996).

Die Exon-Gruppen 4 bis 11 bzw. 17 bis 24 kodieren die N- bzw. C-terminalen katalytischen Domänen von ACE. Die symmetrischen Exone dieser Gruppen haben weitgehend homologe Sequenzen und Größen, mit einer Ähnlichkeit sowohl in den Nukleotidsequenzen zwischen den entsprechenden Exonen, die zwischen 55 bis 74 Prozent beträgt, als auch in der Struktur der Exon-Intron-Übergänge (Hubert et al. 1991). Das sACE-Protein enthält zwei katalytische Domänen mit jeweils einem Zinkatom in dem jeweiligen aktiven Zentrum. Trotz einer hohen Sequenzhomologie, die besonders in den Zentralregionen stark ausgeprägt ist und durchschnittlich 68 Prozent beträgt (Soubrier et al. 1988), sind in beiden Domänen Unterschiede in enzymatischen und räumlich-strukturellen Eigenschaften vorhanden (Danilov et al. 1994). Das tACE ist in seiner Struktur größtenteils mit der C-terminalen Hälfte des sACE identisch (Abb. 1). Am N-terminalen Ende liegt die tACE-spezifische Sequenz bestehend aus 66 AS. Diese Sequenz zeigt, als Besonderheit des tACE, eine starke Glykosylierung, die jedoch nicht für die Aktivität oder Stabilität des Enzyms erforderlich ist (Ehlers et al. 1992). Beide Isoformen sind durch die C-terminale hydrophobe Sequenz in die Zellmembran integriert. Daneben wird in Blut, Samenflüssigkeit, Urin und Liquor das sog. plasmatische ACE vorgefunden. Es entsteht aus membranständiger Form durch Aktivität bestimmter Sekretasen, welche die hydrophobe Anker-Region abspalten und eine unterschiedliche Affinität gegenüber den beiden Isoformen aufweisen (Hooper et al. 1997, Woodman et al. 2000). Die strukturelle Ähnlichkeit zwischen der testikulären ACE-Form und der C-terminalen Hälfte von sACE, die Lokalisation des tACE-Promotors in der Zentralregion sowie das Vorkommen einer tACE-ähnlichen Form in niederen Organismen werden durch eine *evolutionäre Duplikation* der 3'-Hälfte des ACE-Gens erklärt (Soubrier et al. 1988, Ehlers et al. 1989a, Lattion et al. 1989, Schoofs et al. 1998).



Ein Gen kodiert sowohl für die somatische als auch für die testikuläre ACE-Isoform. Der Promotor (P) der somatischen Isoform befindet sich am 5' Ende des ersten Introns, der Promotor der testikulären Form liegt im Intron 12. Homologe Exongruppen kodieren die weitgehend homologen Domänen. Exon 13 ist für die testikuläre Isoform spezifisch (alternatives Spleißen bei sACE). Spezifische Proteinsequenzen des sACE und tACE sind am N-terminalen Ende lokalisiert. ZM Zytoplasmamembran.

Abb. 1: Gen, mRNAs und Proteinstrukturen

1.1.2 Enzymkinetik und Substrate

ACE kann Di- oder Tri-Peptide vom Carboxyende der Peptid-Substrate abspalten. Das bekannteste Produkt der ACE-Aktivität, Angiotensin II, entsteht durch Spaltung des His-Leu-Dipeptids von Angiotensin I (Skeggs et al. 1956). Ein anderes bekanntes Substrat für ACE ist das Bradykinin, dessen Akkumulation während der Therapie mit ACE-Hemmern für den persistierenden Husten verantwortlich ist (Sempe et al. 1995). Die enzymatische Aktivität von ACE beschränkt sich jedoch nicht auf das Angiotensin I und das Bradykinin, sondern ist unspezifisch gegenüber vielen Peptiden, z.B. Neurotensin, chemotaktischem Peptid, GnRH, Enkephalinen und Substanz P. Trotz der Promiskuität gegenüber vielen Substraten *in vitro*, spielt das ACE vermutlich keine führende Rolle für den Metabolismus dieser Peptide *in vivo*. Eine Ausnahme ist das Tetrapeptid AcSDKP, das kürzlich als physiologisches Substrat von ACE erkannt worden ist (Rousseau et al. 1995, Azizi et al. 1996).

Die funktionellen aktiven Domänen des sACE sind voneinander unabhängig (Wei et al. 1991) und haben eine unterschiedliche Substratspezifität. Die C-terminale Domäne hat eine 3-4fach höhere katalytische Aktivität gegenüber Bradykinin und Angiotensin I (Jaspard et al. 1993 und 1994). Verglichen mit der Aktivität der C-terminalen Domäne, setzt dagegen die N-terminale Domäne das AcSDKP 50fach effektiver um (Rousseau et al. 1995).

1.1.3 Expression

Das sACE ist im Körper weit verbreitet und wird von einer Vielzahl von Zelltypen in verschiedenen Organen exprimiert (Tab. 1). Der Einsatz von spezifischen mAK und die Verfügbarkeit über ein vielfältiges Materialgut erlaubten unserer Arbeitsgruppe eine systematische Untersuchung der zellulären ACE-Expression in normalen Geweben und in verschiedenen Organerkrankungen (Danilov et al. 1994, Franke et al. 1997, Metzger 1998, Kerkman 2000, Georg 2000). Bedeutend ist die nach Gefäßtyp, Organ und Spezies unterschiedliche Expression der Endothelien:

- 1) In peripheren Widerstandsgefäßen sind Endothelien regelmäßig stark immunreaktiv für sACE, nicht jedoch in anderen Gefäßtypen.
- 2) Interessante Ausnahmen finden sich in Niere und Lunge. Renale Endothelien sind komplett negativ für das Enzym. Im Gegensatz zu der übrigen Mikrozirkulation exprimiert das kapilläre Endothel der Lungenalveolen dagegen stark sACE.

- 3) Dieses Verteilungsmuster ist typisch für viele Spezies (Mensch, Affe, Hund, Katze und Kaninchen), jedoch nicht für die Ratte, die ein eher homogen verteiltes Expressionsmuster auch in allen großen arteriellen und venösen Gefäßen aufweist.

Tab. 1: Zelluläre Expression von sACE im menschlichen Organismus

(nach Franke et al. 1996)

Zelltypen und Lokalisation	Zelluläre Expression
Endothelial	
Periphere Widerstandsgefäße	Vaskuläres Endothel (nicht in der Niere)
Lunge	Kapillarendothel
Epithelial	
Niere	Proximaler Tubulus
Dünndarm	Enterozyten
Plazenta	Synzytiotrophoblasten
Pankreas	Gangepithel
Plexus choroideus	Epithel
Epididymis	Epithel
Mesenchymal	Fibroblasten, aktivierte Makrophagen, Leydig-Zellen
Neuropil	
Basalganglien	Neuronale Zellen
Andere	
Nebenniere	Chromaffine Zellen
Ovar	Granulosa-Zellen

Ein anderer neuartiger Befund ist die speziesspezifische Expression von sACE in granulomatösen Entzündungen. Beim Menschen und Menschenaffen wird in den Epitheloidzellen und aktivierten Makrophagen eine starke sACE-Expression vorgefunden. Vermutlich induziert das sACE über lokale Angiotensin II-Bildung und monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) eine Aktivierung und Akkumulation von Makrophagen und trägt somit zur Ausbildung der granulomatösen Gewebereaktion bei. Kaninchen hingegen können offenbar generell kein histiozytäres sACE bilden, was eine mangelnde Fähigkeit zu einer vergleichbaren epitheloidzellig-granulomatösen Entzündungsreaktion dieser Tierart erklärt (Georg 2000). Darüberhinaus wird die veränderte fibro-histiozytäre und endotheliale Expression von sACE durch Induktion von Gewebeumbau- und Fibrosierungsprozessen mit der Entwicklung von Atherosklerose und verschiedenen Nierenerkrankungen in Verbindung gebracht (Metzger et al. 1999 und 2000).

Während das sACE in vielen Zelltypen und Organsystemen exprimiert wird, ist das tACE spezifisch für das Hodengewebe und wird bei Mensch und Tier ausschließlich in den Keimzellen der fortgeschrittenen Spermatogenesestadien vorgefunden (vgl. Abschnitt 1.3).

1.2 Physiologische Funktionen von ACE

1.2.1 Renin-Angiotensin-System (RAS)

Das RAS stellt eine Kaskade von enzymatischen Reaktionen dar, in der zuerst Angiotensinogen durch Renin gespalten wird und anschließend durch ACE das Effektorpeptid Angiotensin II entsteht (vgl. Abb. 2).

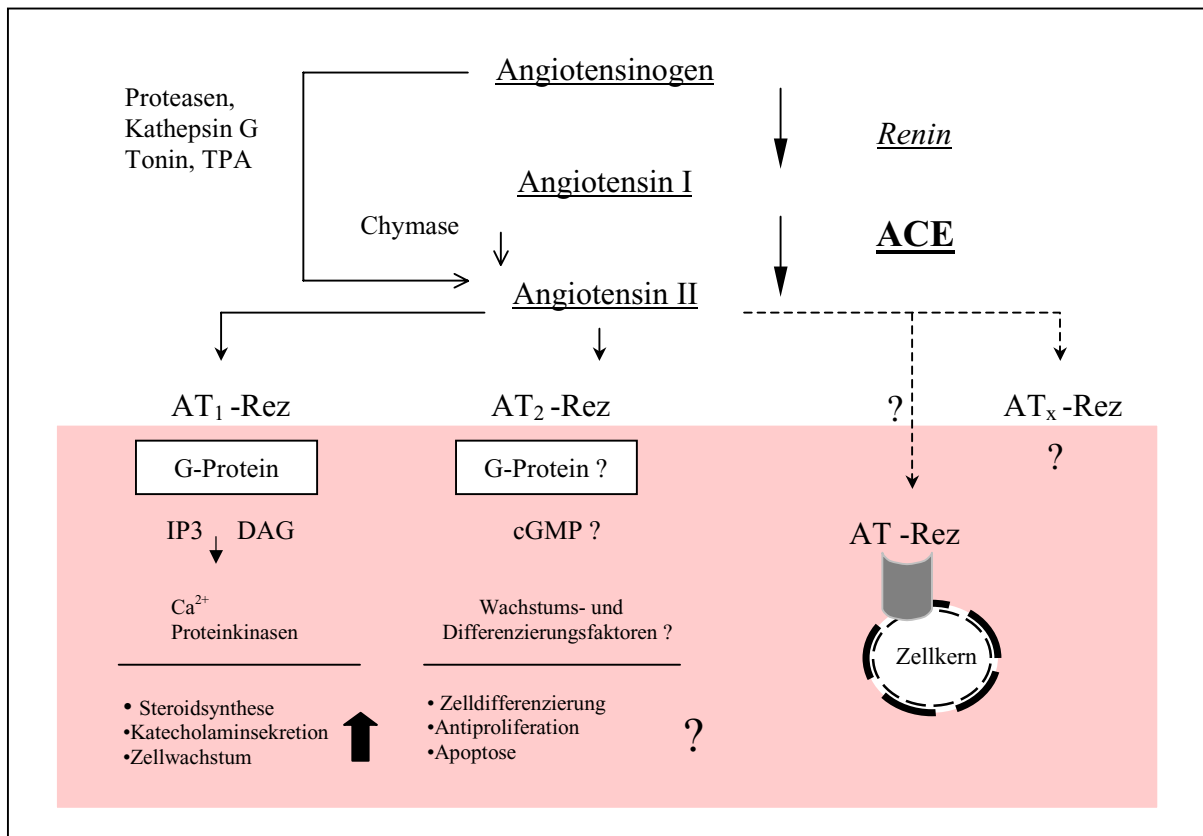


Abb. 2: Das Renin-Angiotensin-System (RAS)

TPA Gewebe-Plasminogen-aktivierender Faktor, *IP₃* (1,4,5)-Inositoltriphosphat, *DAG* Diacylglycerol.

Angiotensinogen (Aogen) wird hauptsächlich in der Leber, daneben auch in vielen anderen Organen, wie Lunge, Herz, Niere, NN, Ovar, Hoden und Gehirn synthetisiert (Campbell et al.

1987, Cassis et al. 1988, Gomez et al. 1988). Die Aspartylprotease Renin spaltet vom N-terminalen Ende des ca. 50 kD schweren Angiotensinogen, dem einzig bekannten Substrat von Renin, das Dekapeptid Angiotensin I ab. Der wichtigste Bildungsort für Renin ist der juxtaglomeruläre Apparat der Niere, daneben arterielle und venöse Gefäße, Herz, Leber, NN, Hoden, Ovar und Hypophyse (Inagami et al. 1982, Ganten et al. 1983, Deschepper et al. 1986, Paul et al. 1993). Seine Sekretion unterliegt komplexen intrarenalen, sympathischen und humoralen Kontrollmechanismen (Hackenthal et al. 1990). ACE spaltet das Dekapeptid Angiotensin I zu dem Octapeptid Angiotensin II. Dies ist der wichtigste Weg der Angiotensin II-Bildung, jedoch kann es auch über andere Stoffwechselwege und von anderen Enzymen als ACE synthetisiert werden (Abb. 2) (Weintroub et al. 1984, Tang et al. 1989, Urata et al. 1989, Dzau et al. 1993). Angiotensin II bindet an die spezifischen zellulären Angiotensin II-Rezeptoren und wird nach seiner Bildung innerhalb weniger Minuten (HWZ ca. 3 min) durch Angiotensinasen zu inaktiven Produkten abgebaut (Admiral et al. 1993).

Es sind zwei Angiotensin II-Rezeptortypen bekannt. Der gegenwärtigen Nomenklatur zufolge werden sie als AT₁- und AT₂-Rezeptoren bezeichnet. Während beide Rezeptortypen in vielen adulten Geweben, z.B. Blutgefäßen, Nebenniere, Herz und Gebärmutter vorkommen (Gibson et al. 1991, Chang et al. 1991, Herblin et al. 1991, Pucell et al. 1991), sind AT₂-Rezeptoren zusätzlich in fetalen Geweben weit verbreitet (Grady et al. 1991, Tsutsumi et al. 1991). AT₁-Rezeptoren kommen in zwei Isoformen vor (AT_{1A} und AT_{1B}) und stellen G-Proteingekoppelte Transmembranproteine dar. Bindung von Angiotensin II führt durch die intrazelluläre Aktivierung der second messenger zum intrazellulären Ca²⁺-Anstieg und zur Aktivierung der Proteinkinasen (Bottari et al. 1993, Ito et al. 1994). Folglich werden Ca²⁺-abhängige Prozesse wie die glattmuskuläre Kontraktion, Steroid- und Kathecholamin-Produktion stimuliert. Es wird angenommen, dass stimulierte AT₁-Rezeptoren das Zellwachstum einer Vielzahl von Zelltypen, z.B. Endothelzellen und Herzmuskelzellen induzieren (Peach et al. 1977, Johnston 1990). Über die strukturellen und funktionellen Eigenschaften des AT₂-Rezeptors ist wenig bekannt. Möglicherweise wirken AT₂-Rezeptoren durch Dephosphorylierung von verschiedenen Zellproteinen anti-proliferativ und damit antagonistisch gegenüber AT₁-Rezeptoren (Dzau et al. 1988, Stoll et al. 1993, Nakajima et al. 1995). Die Beziehung zwischen AT₂-Rezeptor vermittelter Signalübertragung und Tyrosinphosphorylierung sowie die Tatsache, dass der AT₂-Rezeptor vorübergehend in hohem Maße im Gewebe von Föten exprimiert wird und nach der Geburt in den meisten Organen dramatisch abnimmt, legt die Vermutung nahe, dass er eine Rolle in Zellwachstums-

und Zelldifferenzierungsprozessen spielt (Tsutsumi et al. 1991, Grady et al. 1991, Bottari et al. 1992, Dominiak und Unger 1999). Die Entwicklung von spezifischen Angiotensin-II-Rezeptorliganden hat zur Identifizierung von weiteren Angiotensin II-Rezeptoren geführt, deren Funktion und Verteilung allerdings noch unklar ist (Swanson et al. 1992, Harding et al. 1994, Eggena et al. 1993 und 1996).

Das im Blutkreislauf zirkulierende endokrine RAS mit seinem wichtigsten Effektorpeptid Angiotensin II spielt im Zusammenhang mit der Aufrechterhaltung und Regulation der Herz-Kreislauf-Homöostase eine bedeutende Rolle. Angiotensin II bewirkt hierbei eine Reihe synergistischer Effekte an **Gefäßen** (Vasokonstriktion, Hypertrophie), **Herz** (Inotropie, Chronotropie, Hypertrophie), **ZNS** (Freisetzung von ADH und hypophysären Hormonen, Steigerung der sympathischen Aktivität), **Nebenniere** (Aldosteron-Sekretion) und **Niere** (Wasser- und Elektrolyt-Retention) (Johnston et al. 1990, Mitchell et al. 1991, Gomez et al. 1995). Neben einem *zirkulierenden* RAS, das die kurzfristige kardioresnale Homöostase reguliert, wird ein *gewebeständiges* autokrines/parakrines RAS postuliert (Dzau et al. 1988, Cockcroft et al. 1995), welches die lokale Kontrolle des Gefäßtonus und Regulation der Gewebefunktion in der Gefäßwand (Samani et al. 1988, Naftilan et al. 1991, Müller et al. 1997 und 1998), Niere (Ingelfinger et al. 1988), Herz (Dzau et al. 1988, Falkenhahn et al. 1994), Gehirn (Inagami et al. 1982, Unger et al. 1989) und Reproduktionsorganen (Vinson et al. 1997) übernimmt. Die exakte zelluläre Expression von RAS-Komponenten und die organspezifischen Funktionen des parakrinen/autokrinen RAS sind noch weitgehend unklar.

1.2.2 Kinin-Kallikrein-System (KKS)

Neben der neutralen Metalloendopeptidase (Kininase I) degradiert ACE (Kininase II) sehr effizient das Nonapeptid Bradykinin zu inaktiven oder weniger aktiven Produkten (Erdos 1966). Das KKS ist ein komplexes biologisches System mit 4 Hauptkomponenten:

- das hochmolekulare *Kininogen* als Substrat
- *Kininogenasen* (Kallikrein) als proteolytische Enzyme
- *Kinine* (Bradykinin, Kallidin) als spezifische Effektoren dieses Systems und
- *Kininasen* als Kinin-degradierende Enzyme.

Kininogen und die Serin-Protease Kallikrein wurden in vielen Geweben, z.B. Niere, Pankreas, Speicheldrüse, Endothel und Testis lokalisiert (Schill et al. 1989, Figueroa et al. 1992, Carhini et al. 1993, Wolf et al. 1998 und 1999). Das Effektorpeptid Bradykinin stimuliert die G-

Protein-gekoppelten Bradykinin-Rezeptoren B₁ und B₂ und führt zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren und zur Vasodilatation (Marceau et al. 1997). Durch die Degradation des Vasodilatators Bradykinin werden die ACE-Wirkungen im Sinne einer Vasokonstriktion potenziert. Andere wichtige Funktionen des KKS sind Stimulierung der Schmerzempfindung durch Reizung der sensiblen Nervenfasern und Inhibition der Zellproliferation (Bhoola et al. 1992). Analog zum RAS wird zwischen einem zirkulierenden und einem lokalen KKS unterschieden. Vermutlich ist das parakrine KKS der männlichen Reproduktionsorgane in die Regulation der Hodenfunktionen involviert (Schill et al. 1992).

1.2.3 AcSDKP

Erst kürzlich wurde die Rolle von ACE in der Regulation der Stammzellproliferation durch das pluripotente hämoregulatorische Tetrapeptid AcSDKP erkannt (Lenfant et al. 1989). AcSDKP ist ein physiologisches und spezifisches Substrat von ACE und wird im Plasma durch Abspaltung von C-terminalem Dipeptid Lysin-Prolin deaktiviert (Rieger et al. 1993, Rousseau et al. 1995). Das Tetrapeptid inhibiert die Zellproliferation durch Blockade der Progression in die S-Phase. In *vitro* und *in vivo* führen ACE-Hemmer zum Anstieg von AcSDKP und Suppression der hämatopoetischen Zellproliferation (Azizi et al. 1996). ACE-Hemmer und AcSDKP selbst sind potentielle Kandidaten für die Prävention und Therapie der toxischen Schäden an hämatopoetischen Stammzellen durch Chemotherapie, Bestrahlung und Stammzelltransplantation (Comte et al. 1997, Gaudron et al. 1999, Wierenga et al. 2000).

1.2.4 Weitere Funktionen

Als weitere Funktion reguliert das reichlich in Niere, Dünndarm und Nebenhoden vertretene epitheliale ACE die Elektrolyt- und Wasserresorption. Neben Autoregulation durch die lokalen RAS und KKS ist das ACE im proximalen Tubulussystem der Niere in die terminale Digestion von Aminosäuren und ihre Reabsorption vermutlich über die co-exprimierten Peptid-Transporter Pep 1 und Pep 2 involviert (Fei et al. 1994, Boll et al. 1996, Metzger et al. 1999). Die Expression von sACE im ZNS in bestimmten neuronalen und neurohormonalen Zellen in einer lokal aktiven Form und die Umsetzung von Neuropeptiden *in vitro* legen weitere mögliche Funktionen von ACE im Neurotransmittermetabolismus nahe (Ehlers et al. 1989b).

1.3 ACE in testikulären Geweben

1.3.1 Physiologische Expression

Cushman und Cheung entdeckten im Hoden der Ratte eine kleinere Form von ACE, die heute als testikuläre ACE-Isoform (tACE, gACE) bezeichnet wird (Cushman und Cheung 1971). Daraufhin folgten Studien bei Mensch, Ratte und Kaninchen, die zeigten, dass tACE in allen untersuchten Spezies im tubulären Kompartiment des adulten Hodens lokalisiert und dort von den Keimzellen der fortgeschrittenen Spermatogenese exprimiert wird (Vanha-Perttula et al. 1985, Berg et al. 1986, Vivet et al. 1987, Sibony et al. 1993, Pauls et al. 1999). Die Expression des tACE ist hormonell reguliert und erlischt in adulten Tieren nach Hypophysektomie (Strittmatter et al. 1985, Kumar et al. 1989). TACE-mRNA und -Protein werden in der Spermatogenese von Maus und Ratte stadienabhängig und differenziert exprimiert. Während die mRNA-Expression bereits in den späten Spermatozyten vorhanden ist und in den weiter differenzierten Keimzellen versiegt, wird das Protein erst in reifen postmeiotischen Spermatiden und Spermien exprimiert (Langford et al. 1993, Sibony et al. 1994). Eine vergleichbare Studie anderer über mRNA- und Protein-Verteilung von testikulärem ACE in der menschlichen Spermatogenese liegt bis jetzt nicht vor.

Ferner lassen sich alle Komponenten des RAS inklusive des sACE im Hoden/Nebenhoden detektieren, wenngleich eine präzise zelluläre Zuordnung, auch die von ACE, mit wenigen Ausnahmen, nicht bekannt ist. Renin, Angiotensinogen, Angiotensin II und die AT-Rezeptoren werden im Nebenhoden-Epithel lokalisiert (Leung et al. 1997a, 1997b, 1998 und 1999; Vinson et al. 1995). Die spezifische Detektion der ACE-Isoformen im Hoden und Nebenhoden ist jedoch nur sehr eingeschränkt möglich, da beide Formen in ein und demselben Kompartiment in einer engen zellulären Nachbarschaft vorkommen. So finden sich im Hoden und Seminalplasma beide ACE-Isoformen wieder, die mit den unselektiven polyklonalen Ak nicht voneinander unterschieden werden können (Strittmacher et al. 1985, Erdos et al. 1985, Berg et al. 1986, Vivet et al. 1987, Sait-Andre et al. 1988, Köhn et al. 1998a, Gatti et al. 1999). Zudem bestehen methodische Probleme in der Detektion der ACE-mRNA, da sie in vielen Zellen, z.B. Leydig-Zellen, nur in sehr geringen Mengen exprimiert wird (Sibony et al. 1993). Neue Wege, diese Probleme zu lösen, hat die vorliegende Arbeit durch die Kombination von Zellpicking, single cell RT-PCR, vergleichender Immunhistologie und in-situ Hybridisierung beschränkt (Pauls et al. 1999, Steger et al. 2000). Auch über ACE

in der embryonalen und fetalen Hodenentwicklung, zudem bislang keine Informationen vorlagen, kann erstmals berichtet werden. Überraschenderweise exprimieren fetale menschliche Keimzellen regulär die somatische Isoform des Enzyms, das im Verlauf der testikulären Entwicklung runterreguliert wird (Pauls et al. 1999).

1.3.2 Physiologische Funktionen

In vivo-Funktionen von ACE wurden an transgenen und knock-out Mäusen untersucht (vgl. Tab.2). Die spermatologischen Parameter und Fertilität der Mutanten, denen nur die somatische Isoform fehlt, weisen keine Besonderheiten auf (Ramaraj et al. 1998). Im Gegensatz dazu sind Tiere mit Gen-Mutation beider ACE-Isoformen *infertil*, obwohl die Hodenmorphologie und Funktionsparameter im Ejakulat normal erscheinen. Nach der Kopulation finden sich jedoch nur wenige Spermien dieser Tiere im Eileiter der Weibchen. Deswegen werden die Eileiter-Passage und Zona-Bindung als kritische Punkte der ACE-Aktivität angesehen (Krege et al. 1995, Hagaman et al. 1998). Tiere mit tACE -Mutation (bei normaler sACE-Expression) und Tiere mit einer transgenen Expression von enzymatisch aktivem sACE in den Spermien sind *infertil*. Daher wird die entscheidende Rolle von ACE für die Fertilität *in vivo* speziell der testikulären Isoform zugesprochen (Esther et al. 1997, Kessler et al. 2000).

Tab. 2: ACE-Isoformen und männliche Fertilität

Gen-Mutation	Expression in Soma / Spermien	Fertilität	Literaturquelle
sACE	sACE - / tACE +	fertil	Ramaraj et al. 1998
sACE und tACE	sACE - / tACE -	<i>infertil</i>	Krege et al. 1995
tACE	sACE + / tACE -	<i>infertil</i>	Esther et al. 1997
sACE und tACE	sACE - / sACE +	<i>infertil</i>	Kessler et al. 2000

Beim Menschen ist die Funktion vom testikulären ACE bislang nicht bekannt. Die biochemische Umsetzung von Angiotensinogen zu Angiotensin II in Leydig-Zellkulturen spricht für die Expression von aktivem Renin und ACE eines im Hoden lokal wirksamen RAS (Pandey et al. 1984). Im menschlichen Ejakulat induziert ACE einen Ca^{2+} -Influx, die

Akrosomreaktion und fördert die Penetration der Zona-freien Hamster-Oozyten (Singh et al. 1985, Foresta et al. 1987 und 1991, Köhn et al. 1995 und 1998b). Ferner wird dem lokal exprimierten RAS eine wichtige Rolle für die Elektrolyt- und Wasserbalance des Nebenhodens und für die Spermienreifung während der Nebenhodenpassage zugesprochen. Neben Endothelin, Calcitonin-ähnlichem Peptid und Arginin-Vasopressin stimuliert auch Angiotensin II *in-vivo* die Anion-Sekretion im Epididymis-Epithel der Ratte (Wong et al. 1989 und 1990, Wong und Uchendu 1991). Vermutlich induziert Angiotensin II über die AT₁-Rezeptoren des Epididymis-Epithels einen Anstieg von intrazellulärem cAMP und führt zur Anion-Sekretion in das Seminalplasma (Wong et al. 1990, Wong und Ushendu 1990 und 1991).

1.3.3 Expression in Keimzelltumoren (KZT)

Die Expression in Tumoren war bis vor kurzem Neuland für ACE, das pathophysiologisch vor allem mit kardio-vaskulären und renalen Erkrankungen assoziiert wird. Nur sporadische Berichte über Nierenzellkarzinome (Takada et al. 1983 und 1985) und testikuläre Keimzelltumoren (Rohmer et al. 1987, Saint-Andre et al. 1988) belegen anhand von polyklonalen Ak und wenigen Beispielen, dass bestimmte Tumoren ACE produzieren können und dass unter den testikulären Neoplasien offenbar Seminome das Enzym bevorzugt exprimieren.

Letztere Befunde gaben Anlass zur systematischen Untersuchung der ACE-Expression in Keimzelltumoren. Eine immunhistochemische Vorarbeit unserer Arbeitsgruppe zeigte, dass ACE konstant und spezifisch in Keimzelltumoren exprimiert wird (Kerkman 2000). Überraschend und neuartig ist der Befund der somatischen ACE-Isoform in neoplastischen Keimzellen (Kerkman 2000, Pauls et al. 1999). Die pathogenetische Bedeutung dieses Phänomens war vordem nicht geklärt, da mit immunhistochemischen Methoden allein die Expression weder bewiesen noch Isoformen-spezifisch erfasst werden konnte. Aufgrund der ausgeprägten Expression in neoplastischen Keimzellen ist ACE ein potentieller Marker für IKZN und Seminome (Saint-Andre et al. 1988, Kerkman 2000). Darüber hinaus kann ACE diagnostische Vorteile bieten, wie die im Folgenden noch beschriebene Überprüfung an einem größeren Tumorkollektiv und dem Vergleich mit einem gut definierten zellulären Tumormarker ergab (Franke et al. 2000).

Im klinischen Alltag ist in der histologischen Diagnostik von KZT hier die plazentare alkalische Phosphatase (PIAP) etabliert (Mostofi et al. 1987). PIAP wird von Trophoblasten der Plazenta exprimiert und kommt in KZT in einer verwandten aber spezifischen Isoform, dem sog. Nagao-Isoenzym, plazenta-like oder GCAP (Keimzell-AP) vor (Millan et al. 1988, Hofmann et al. 1989, Shigenari et al. 1998). Anti-GCAP/PIAP detektiert zuverlässig und homogen fast alle IKZN und KZT verschiedener histologischer Typen (Ushida et al. 1981). In mehreren Punkten zeigt jedoch dieser viel verwandte Marker "Schwächen":

- unselektive Expression in Seminomen und embryonalen Karzinomen
- Negativität in einem Teil der IKZN und Seminome (Wick et al. 1987, Burke und Mostofi 1988)
- Detektion zumeist mit nur mäßig spezifischen und in ihrer Beschaffung limitierten polyklonalen Antikörpern (Ushida et al. 1981, Jacobsen und Norgaard-Pedersen 1984, Burke und Mostofi 1988, Wick et al. 1987, Rajpert-De Meyts et al. 1996)
- keine Unterscheidung zwischen GCAP und PIAP möglich aufgrund einer zu 98% übereinstimmenden Proteinstruktur (Looijenga und Oosterhuis 1999)

2 Ziele der Arbeit

Zu Beginn dieser experimentellen Arbeit war die feingewebliche Expression der ACE-Isoformen im menschlichen Hoden- und Nebenhodengewebe nur unzureichend untersucht. Ob und in welchen Isoformen testikuläre Keimzelltumoren ACE exprimieren, war ebenfalls noch unbekannt. Ferner stellte sich hier die Frage, ob sACE mit GCAP, dem wohl bestuntersuchten zellulären Marker für verschiedene histologische Typen von KZT, verglichen werden kann. Darüber hinaus ist die Analyse neuer Marker von Interesse für die Untersuchung von pathogenetischen Beziehungen zwischen intratubulären Keimzellneoplasien (IKZN, CIS) und invasiven Keimzelltumoren. Bis heute ist noch nicht abschließend geklärt, ob seminomatöse und nicht-seminomatöse KZT bereits in IKZN determiniert sind, oder ob das Seminom ein transitorisches Übergangsstadium zwischen IKZN und den verschiedenen Erscheinungsformen von nicht-seminomatösen Tumoren einnimmt. Dies ließ folgende Ziele formulieren:

- Untersuchung der stadienspezifischen Protein- und mRNA-Expression von testikulärem ACE in der Spermatogenese und von somatischem ACE im regulären adulten Hoden- und Nebenhodengewebe
- Gewinnung erster Kenntnisse über ACE in der germinalen Entwicklungsperiode
- Sicherstellung der in neoplastischen Keimzellen exprimierten ACE-Isoformen
- Detektion von ACE in verschiedenen Keimzelltumoren im Vergleich zu IKZN und der Expression von GCAP.

Realisiert wird dies durch mRNA- und Protein-Detektion mittels Immunhistologie (IH), *in situ*-Hybridisierung (ISH) und RT-PCR nach UV-Laser assistiertem Cell-Picking von selektiv gewonnenen Zellprofilen (LACP). Neben repräsentativen Tumorkollektiven wird testikuläres Gewebe verschiedener Entwicklungsstufen (embryonal bis adult) eingehend analysiert.

3 Material und Methoden

3.1 Gewebe

3.1.1 Untersuchungsmaterial

Das Untersuchungsmaterial entstammt den Asservaten des Instituts für Pathologie, Justus-Liebig-Universität (JLU) Giessen. Es handelt sich um Operationsmaterial von Patienten, die in der Urologischen Klinik der JLU in einem Zeitraum von 1985 bis 1999 behandelt wurden. Das bereits für eine Vorarbeit zusammengestellte Kollektiv (Kerkman, 2000) wurde durch Paraffin- und Nativmaterial aus dem Institut für Pathologie und durch paraffineingebettetes humanes Biopsie-Material des Instituts für Veterinäranatomie, Justus-Liebig-Universität Giessen, ergänzt.

Tab. 3: Analysiertes Gewebe und histologische Klassifizierung der Keimzelltumoren

Normales Hoden- und Nebenhoden-Gewebe	N=43
Reguläre Spermatogenese	14
Embryonale / fetale / kindliche Hoden (8 SSW bis 4 Jahre post partum)	23
Epididymis	6
KZT und IKZN	N=162
Reine IKZN, kein invasiver Tumor	3
Seminom-Metastasen (in Lymphknoten)	3
Testikuläre KZT	156
Gestörte Spermatogenese aus der Tumorperipherie	82
IKZN	84
Seminome	86
Embryonale Karzinome	30
Teratome	8
Choriokarzinome	2
Kombinationstumoren	33
Tumorkontrollen	N=28
Non-Hodgkin-Lymphome	20
Reaktive Lymphknoten	5
Melanom-Metastasen	3

Die KZT wurden nach WHO klassifiziert und umfaßten 159 testikuläre und 3 extratestikuläre Tumoren (Tab. 3). Unter den testikulären Tumoren waren 33 mischdifferenzierte Kombinationstumoren und 126 KZT eines histologischen Typs, daneben 3 Fälle mit reinem IKZN ohne invasiven Tumoranteil. In den Tumorrandbereichen wurden in 82 Fällen Tubuli mit gestörter Spermatogenese (jedoch ohne Nachweis intratubulärer neoplastischer Keimzellen) zur internen Kontrolle verwendet. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Tumoranteile in kombinierten KZT gliederten sich die untersuchten Keimzelltumoren wie folgt: 91 klassische und 2 spermatozytäre Seminome, 58 embryonale Karzinome (EK), 32 Teratome, 11 Choriokarzinome, 4 Dottersacktumoren und insgesamt 87 IKZN. Weiterhin wurden verschiedene Non-Hodgkin-Lymphome und Metastasen als Tumorkontrollen herangezogen. Neben dem aufgeführten Paraffinmaterial wurden 15 Seminome, 8 embryonale Karzinome, 4 Teratome, 5 IKZN und 8 normale Hoden- und Nebenhodengewebe in frisch eingefrorenem, nicht fixiertem Zustand untersucht.

3.1.2 Gewebepräparation und Lagerung

Das native Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff in speziell gefächerten Stickstofftonnen gelagert. Zu Herstellung von Kryostatschnitten wurde ein etwa 0,5 cm großes gefrorenes Gewebestück entnommen und mittels Tissue-Tec® auf den Objekthalterstempel des Kryotoms (Jung CM3000, Leica, Nussloch) bei -25 bis -28 °C aufgefroren. Kryostatschnitte wurden in einer Dicke von 5 µm angefertigt, für die Immunhistochemie auf unbeschichtete Superfrost®-Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgezogen und zum Trocknen 12 bis 24 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Kryostatschnitte für LACP wurden auf extra dünne (17 µm Dicke) Spezialobjektträger (PALM, Bernried) aufgezogen und zur Darstellung morphologischer Details mit Hämalaun gefärbt, anschließend in der aufsteigenden Alkoholreihe (2x 70%, 2x 96%, 2x 100% Ethanol) fixiert und bis zu ihrer Verarbeitung (maximal für 2 Stunden) in 100% Alkohol aufbewahrt.

Das Paraffinmaterial wurde bei Raumtemperatur verarbeitet und bei durchschnittlich 14°C abgedunkelt aufbewahrt. Zur Sicherstellung einer optimalen Gewebeantigenität von ACE wurden Fixierungszeiten in Formalinlösung von maximal 2 Wochen nicht überschritten (Metzger et al. 1999). Die Paraffinblöcke wurden mit einem Rollen-Mikrotom (Jung SM2000R, Leica, Nussloch) verarbeitet. Präparate von 2-4 µm Dicke wurden angefertigt und

nach Streckung im Wasserbad (Aqua dest., 45°C) auf Poly L-Lysin-beschichtete (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) Superfrost®-Objektträger aufgezogen.

3.2 Immunhistochemie (IH)

Grundlage der mikroskopischen Auswertung aller Proben war jeweils ein Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbter Kontrollschnitt aus der jeweiligen Schnittsequenz. Zusätzlich wurde an jedem Präparat eine PAS-Färbung durchgeführt, die zur Standarddiagnostik der KZT gehört (Hämatoxylin-Eosin-Färbung und PAS-Färbung siehe *Anhang*).

3.2.1 Vorbehandlung der Präparate

Die Vorbehandlung der Schnittpräparate aus formalinfixierten, paraffineingebetteten Geweben mit Mikrowellentechnik löst intermolekulare Vernetzungen der Proteine, die durch den Fixierungs- und Einbettungsprozesse entstehen. Dadurch werden Antigenstrukturen demaskiert und für die Primärantikörper wieder zugänglich gemacht, was insbesondere für die verwendeten Anti-ACE-mAk gilt (Cattoretti al. 1993, Norton et al. 1993, Metzger et al. 1999). Die Paraffinschnitte wurden zunächst 10 min in Xylol entparaffiniert und anschließend 10 min in Aceton nachfixiert. Dann wurden sie 10 min in einem Aceton-Tris-Waschpuffer-Gemisch (im Verhältnis 1:1; Tris-Waschpuffer siehe *Anhang*) gespült. Anschließend wurden die Objektträger gleichmäßig auf mikrowellentaugliche, zuvor mit Citratpuffer gefüllte Kunststoffküvetten (Sigma, Deisenhofen) verteilt. Die Küvetten wurden in der Mikrowelle (SS 566H; Bosch, München) bei 600 Watt in fünf Durchgängen jeweils 5 min erhitzt. Zwischen jedem Durchgang wurde der Flüssigkeitsspiegel geprüft und ggf. mit Aqua dest korrigiert. Danach wurden die Objektträger zum Abkühlen gebracht und in Tris-Waschpuffer gespült.

Die Gefrierschnitte wurden vor der Inkubation mit dem Primärantikörper zunächst bei RT für 10 min in Aceton fixiert und luftgetrocknet. Für die Immunhistochemie mit den mAk CG1, CG2 und CG4 wurden die Kryostatschnitte in 4% Formalin nachfixiert und anschließend wie reguläre Paraffinschnitte einer Vorbehandlung in der Mikrowelle unterzogen.

3.2.2 Monoklonale Antikörper (mAk)

Die verwendeten Anti-ACE-mAk (Tab. 4) sind biochemisch und morphologisch gut charakterisiert, markieren unterschiedliche, jeweils bekannte Epitope und waren z.T.

Grundlage für die Klassifizierung von ACE als CD143 (Danilov et al. 1994 und 1997, Franke et al. 1997). Die Klone CG1 und CG4 erkennen beide Isoformen von ACE. Alle anderen mAk detektieren spezifisch nur die somatische Isoform. Für die Detektion der PIAP/GCAP wurden - nach vorausgegangener Prüfung verschiedener Hersteller und Klone - zwei verschiedene mAk eingesetzt.

Tab. 4: Monoklonale Antikörper gegen ACE und GCAP/PIAP

Klon	Immunogen	Konzentration (µg/ml)	Quelle / Referenz
9B9	sACE, katalytisch	0.4	Danilov et al. 1994
i2H5	- // -	1.0	- // -
3G8	- // -	5.0	- // -
1A8	- // -	33.0	- // -
3A5	- // -	6.7	- // -
5F1	- // -	10.0	- // -
CG1 ⁶	sACE, denaturiert	10.0	Dr. Towbin / Danilov et al. 1994
CG4 ⁶	- // -	10.0	- // -
CG2	- // -	5.0	BMA, Schweiz
PL8-F6	GCAP/PIAP	2.0	BioGenex, San Ramon
8A9	GCAP/PIAP	11.6	Dako, Glostrup

⁶ CG1 und CG4 reagieren sowohl mit sACE als auch mit tACE

3.2.3 APAAP-Technik

Als immunhistochemische Detektionsmethode wurde die hochsensitive alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase (APAAP)-Technik gewählt und in einer leicht modifizierten Form durchgeführt (Cordell et al. 1984, Franke et al. 1991). Bei dieser Technik wird die Amplifikation der Reaktionsstärke durch wiederholte Inkubationen der Brücken (polyklonales Kaninchen-anti-Maus-Ig; Konz 33.0 µg/ml; DAKO) - und Detektionsantikörper (APAAP; Konz 2.0 µg/ml; DAKO) erreicht. Bei der anschließenden Enzymreaktion wird Neufuchsin (100 µg/ml) umgesetzt (rotes Detektionssignal). Gleichzeitig wird die endogene AP durch Laevamisol (400µg/ml) blockiert. Für diese enzymatische Detektion wurde die

Entwicklungslösung speziell hergestellt (siehe *Anhang*). Hierzu wurden volumenabhängig Naphthol-AS-BI-Phosphat (Sigma, Aldrich) in N,N-Dimethylformamid (Merck, Darmstadt) und Natriumnitrit mit Neufuchsin gelöst. Parallel dazu wurde der Entwicklungspuffer mit Propandiol und Laevamisol auf pH 9.75 eingestellt. Die Lösungen wurden gemischt und auf pH 8.8 eingestellt. Die hergestellte Entwicklungslösung wurde rasch filtriert (Rundfilter, Schleicher & Schuell, Dassel) und auf einzelne Glasküvetten verteilt. Die Schnitte wurden in der Entwicklungslösung exakt für 20 min auf dem Rüttler bei ca. 150 min^{-1} inkubiert. Zur optimalen histologischen Orientierung wurden die Präparate 2 min in Hämalaun-Lösung gegengefärbt und abschließend in $60\text{-}80^\circ\text{C}$ heißem Glycergel (Dako, Glostrup) mit Deckgläsern (Menzel-Gläser) eingedeckt. *Praktische Durchführung:*

1. Fixierung:

Paraffinschnitte bei RT in Xylol 10 Minuten entparaffinieren und für 10 Minuten in Aceton nachfixieren. Danach die Schnitte für 10 Minuten in ein Aceton-Tris-Waschpuffer-Gemisch (Verhältnis 1:1) überführen und anschließend in Tris-Waschpuffer (pH 7.6) spülen.

Gefrierschnitte nach der Entnahme aus dem Gefrierschrank zunächst bei RT trocknen. Vor der Inkubation des Primärantikörpers die Gefrierschnitte bei RT für 10 Minuten in Aceton fixieren und dann lufttrocknen.

2. Antigendemaskierung:

Nach der Fixierung erfolgt eine physikalische Vorbehandlung. Zur Demaskierung der ACE-Antigene im Paraffinschnitt wird hier die Mikrowellenvorbehandlung (5x5 Minuten) bei 600 Watt eingesetzt (s.o.).

3. Inkubationen:

Alle verwendeten primären und sekundären Antikörper werden mit RPMI auf ihre Endkonzentration bzw. -verdünnungen gebracht. Folgende Inkubationsschritte werden durchgeführt:

• Primärantikörper	• 30 min.
• Spülen in Tris nach AK getrennt	• 3-mal für je 3 min
• Brückenantikörper (Link) 1:40	• 30 min.
• Spülen in Tris	• 3-mal für je 3 min
• Detektionsantikörper (APAAP) 1:50	• 30 min.
• Spülen in Tris	• 3-mal für je 3 min

•	Brückenantikörper (Link) 1:40	•	10 min.
•	Spülen in Tris	•	3-mal für je 3 min
•	Detektionsantikörper (APAAP) 1:50	•	10 min.
•	Spülen in Tris	•	8-mal für je 3 min

3.2.4 LSAB-Technik

Die LSAB-Technik (Labelled Streptavidin/Avidin-Biotin) wurde zusätzlich zu der APAAP-Technik durchgeführt, da in Kryostatschnitten das in der APAAP-Technik verwendete Laevamisol die endogene PIAP/GCAP-Aktivität nicht ausreichend hemmt. Die immunhistochemischen Färbungen von PIAP am Nativmaterial wurden deswegen alternativ mit der LSAB-Technik (siehe *Anhang*) durchgeführt. Diese Detektionsmethode nutzt die starke Affinität von Streptavidin zu Biotin und wurde mit dem kommerziell erhältlichen LSAB-Kit (DAKO, Clostrup) durchgeführt. *Praktische Durchführung:*

Zunächst werden die Schnitte mit 0.5%-igem H₂O₂ in Methanol überschichtet, um die Aktivität der endogenen Peroxidase zu blockieren. Der Primärantikörper wird mit 2%-iger BSA-Lösung (2g BSA auf 100ml Tris-Waschpuffer) verdünnt. Nach 30 min Inkubation mit dem Primärantikörper werden die Objektträger für jeweils 30 min mit dem biotinylierten Brückenantikörper (Verdünnung 1:40) und dem Streptavidin-Peroxidase-Komplex (Verdünnung 1:250) inkubiert. Zwischen den einzelnen Schritten werden die Schnitte in Tris-Waschpuffer (dreimal für je 3 min) gespült. Dann werden die Präparate mit 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) beschichtet, mit Hämalaun gegengefärbt und eingedeckt (s.o.).

3.2.5 Auswertung

Die lichtmikroskopische Auswertung der IH am Tumormaterial erfolgte für alle untersuchten Präparate gleichartig mit einem Nikon-Mikroskop (Modell Optiphot-2[®], Japan). Quantität und Intensität der IH wurden in jedem Tumorgewebe und jeder Tumordifferenzierung selektiv ermittelt und mit dem gut dokumentierten immunreaktiven Score (IRS)-System bewertet (Remmele et al. 1986, Krajewska et al. 1996, Franke et al. 2000). Der IRS ist eine semiquantitative Skala aus 9 rangskalierten Werten, die aus der Multiplikation von

Expressionsmenge und *Expressionsintensität* der untersuchten Zellen gebildet werden (Tab 5). Die Anwendung des IRS ermöglicht eine objektivere Einschätzung der Expression des untersuchten Moleküls in den Geweben und erlaubt eine semiquantitative Aussage zu der jeweils zu beurteilenden Immunreaktivität. Der prozentuale Anteil immunreaktiver Zellen wird 5 Werten von 0 bis 4 zugeordnet: 0% = 0; 0-10% = 1; 11-50% = 2; 51-80% = 3; 81-100% = 4. Zur Bewertung der Expressionsintensität werden den verschiedenen Ausprägungsstärken Zahlen von 0 bis 3 zugeordnet: keine Expression = 0, geringe (+) = 1, mäßige (++) = 2 und starke (+++) = 3. Für die Einschätzung und Charakterisierung der Markerexpression in den Tumorzellen werden IRS-Werte unter 4 als eine geringgradige, IRS-Werte von 4 bis 8 als eine mittelgradige und Werte 9 und 12 als eine hochgradige Expression definiert (Tab. 5).

Tab. 5: Tabellarisches Schema des Immunreaktiven Scores (IRS) *

		Expression							
		keine	geringgradige			mittelgradige		hochgradige	
IRS	0	1	2	3	4	6	8	9	12
+	-	<10%	10-50%	51-80%	81-100%				
++			<10%		10-50%	51-80%	81-100%		
+++				<10%		10-50%		51-80%	81-100%

*Der IRS-Wert errechnet sich aus dem Produkt immunreaktiver Zellen und der Intensität der Immunreaktivität

3.2.6 Statistik

Die errechneten IRS-Werte dienen einer deskriptiven statistischen Analyse zwecks Vergleich der Expression zwischen den verschiedenen Tumoren und zwischen den eingesetzten Markern. Diese Analyse wurde mit dem Statistikprogramm SPSSTM für Windows 98TM durchgeführt. Neben der Häufigkeitsverteilung wurden der mediane IRS (mIRS), der Pearson's Chi-Quadrat-Test, der Phi-Assoziationskoeffizient und die Rang-Korrelation nach Spearman ermittelt. Die statistische Berechnung erfolgte im Institut für Pathologie unter Anleitung von Herrn Dr. F.E. Franke.

3.3 Molekularbiologische Methoden

Zu Beginn der Arbeit war nicht bekannt, ob und in welchem Ausmaß mRNA der ACE-Isoformen im menschlichen Hoden unter physiologischen oder pathologischen Bedingungen exprimiert wird. Bislang war zudem noch keine vergleichbare Arbeit mit Anwendung von LACP an humanen Hodengewebe durchgeführt worden. Daher mußten zunächst als Erfolgskontrolle etwas größere mRNA-Mengen aus Lysaten einzelner Gefrierschnitte extrahiert und in der RT-PCR analysiert werden. Durch systematische Testung von RT-PCR-Bedingungen, Verdünnungen der cDNA und verschiedener Primerpaare wurden die Rahmenbedingungen für eine optimale single cell-RT-PCR (sc-RT-PCR) ermittelt. Um auszuschließen, dass die genomische DNA Pseudogene enthält, d.h. evolutionär entstandene Sequenzen mit Basen- und Längenidentität von detektierten cDNA-Abschnitten, wurde DNA aus verschiedenen untersuchten Geweben co-extrahiert und jeweils kontrolliert.

3.3.1 Isolierung der mRNA aus Gewebeschnitten

Die mRNA-Isolierung erfolgte mit kommerziell erhältlichen Dynabeads Oligo(dT)₂₅ (Dyna, Oslo, Norwegen). Dies sind uniforme, supermagnetische Polystyren-Partikel (2.8 µm im Durchmesser) mit einer angekoppelten, 25 Nukleotid-langen Kette aus Deoxy-Thymidylat. Die polyadenylierte (poly-A) mRNA, die nur bis zu 5% der totalen zellulären RNA ausmacht, kann durch die komplementären Basenpaar-Bindungen zwischen Adenin der poly-A-Sequenz und Thymin der Oligo(dT)₂₅ an die supermagnetischen Partikel gebunden werden. Durch magnetische Separation bleibt das Hybrid aus Oligo(dT)₂₅ und der mRNA an der Wand des Reagenzröhrchens haften, während andere Zellprodukte mit der Lysat-Flüssigkeit entfernt werden können. Schließlich werden die Oligo(dT)₂₅ von der mRNA eluiert. Die gereinigte mRNA steht dann für die RT zur Verfügung. Der mRNA-Oligo(dT)₂₅-Komplex kann alternativ auch direkt für die cDNA-Synthese genutzt werden, in der die Oligo(dT) als Ansatzpunkt für die reverse Transkriptase dienen. Die stringente Hybridisierung von poly(A)-RNA und Oligo(dT)₂₅, der Einsatz von starken RNase-inhibierenden Substanzen und Waschpuffern erlaubt die Isolierung von intakter, hoch gereinigter mRNA. Der Vorteil dieser Methode liegt zudem auch in der schnellen Durchführbarkeit bei Raumtemperatur. Alle hierfür benutzten Puffer und Lösungen sowie das Protokoll entstammten dem *Dynabeads mRNA direkt Kit* (Dyna, Oslo, Norway). Die Isolierung der mRNA erfolgte in 3 Schritten:

1. Probenvorbereitung

In flüssigem Stickstoff gelagerte Proben werden mittels Tissue-Tec® flach auf den Objekthalterstempel aufgefroren. Zwei bis fünf Kryostatschnitte von ca. 10 µm Dicke werden in ein steriles Reagenzröhrchen mit 100-500 µl Lysis-Binding-Puffer überführt. Das Lysat wird homogenisiert, zentrifugiert und direkt weiterverarbeitet.

2. Hybridisierung mit Oligo (dT)₂₅ und Reinigung der Proben

Zu dem Lysat werden 10 µl Oligo (dT)₂₅ hinzugefügt, gemischt und im Rüttler für 15 min bei RT inkubiert. Das Reagenzröhrchen mit dem Hybrid wird dann auf einem Magnet-Rack plaziert. Die Proben werden zweimal mit Waschpuffer 1 und abschließend zweimal mit Waschpuffer 2 gereinigt. Zwischen den Waschsritten werden die Proben auf dem Magnet-Rack plaziert, um die Waschflüssigkeit vollständig zu entfernen.

3. Elution

Für die Elution wird das Hybrid in 10 µl einer 10 mMolaren Tris-HCl gelöst, für 2 min bei 65°C im Thermomixer inkubiert und anschließend wieder auf dem Magnetrack plaziert, um die Magnetpartikel abzutrennen. Der Überstand wird in ein RNase-freies Reagenzröhrchen aufgenommen. Die Elution wird einmal wiederholt.

3.3.2 Isolierung der DNA aus Gewebeschnitten

Die genomische DNA wurde mit dem QIAamp Tissue Kit isoliert (QIAGEN, Hilden). Die praktische Durchführung erfolgte nach Herstellerprotokoll (QIAamp Tissue Kit Handbuch). Zunächst wird das Gewebe mit Puffern, Proteinase K und Ethanol lysiert. Das Lysat wird in spezielle Reagenzröhrchen (QIAamp spin columns) verbracht, die eine Filtermembran zur DNA-Absorption enthalten. Nach mehrfachem Waschen mit vorgegebenen Puffern kann die DNA eluiert und für weitere Untersuchungen bei -20°C gelagert werden.

3.3.3 UV-Laser assistiertes Cell-Picking (LACP)

Das UV-Laser assistierte Cell-Picking (LACP, UV-Laser-Microbeam-Mikrodissektion) ist ein inzwischen etabliertes Verfahren, das unter mikroskopischer Kontrolle und gezielter Mikrodissektion die präzise Entnahme von "cells of interest" aus einem Zellverband ermöglicht (Fink et al. 1998, Schütze und Lahr 1998). Die Mikrodissektion wird mit einem

UV-Laser Mikrobeam (PALM, Wolfratshausen) unter optischer Kontrolle durch ein Axiovert-Mikroskop (Axiovert 135; Zeiss, Jena) durchgeführt. Der Robot-Mikrobeam ist eine Kombination aus dem UV-Laser Mikrostrahl (Wellenlänge 337 nm) und dem computergesteuerten Mikroskoptisch und Mikromanipulator. Das Prinzip von LACP beruht auf einer hohen Photonendichte, die im Fokus eines Stickstofflasers auftritt. Im Laserfokus liegendes Gewebe wird durch die photochemische Reaktion ohne Wärmeentwicklung zerstört, während die freigelegten Zielzellen intakt bleiben und mit einer feinen sterilen, Mikromanipulator-gesteuerten Stahlkanüle "gepickt" und direkt in das Reaktionsgefäß transferiert werden. Die mikromanipulatorische Arbeit wird digital über eine Video-Kamera kontrolliert und dokumentiert. *Praktische Durchführung:*

Nach Kurzzeittrocknung (30 sek) und Gegenfärbung mit Hämalaun-Lösung (1 min) werden Objektträger mit den aufgebrauchten Schnittpräparaten auf dem computergesteuerten Mikroskoptisch fixiert. Bis der gewünschte Zellverband mikroskopisch erfasst und in die Schußlinie des Lasers positioniert werden kann, wird durch Ethanolzugabe das Austrocknen der Schnittpräparate vermieden. Dann lässt man das Ethanol verdampfen, um auf dem trockenen Schnitt die gewünschten Zellen sorgfältig durch den Laserstrahl freizulegen. Die Zellen werden anschließend auf die sterile Kanülenspitze des Robot-Manipulators aufgenommen. Die gepickten Zellen bleiben an der Kanülenspitze durch Adhäsivkräfte haften. Die Kanülenspitze wird abgeschnitten und vorsichtig in ein Reaktionsgefäß mit 10 µl FSB-Lösungspuffer (siehe *Anhang*) transferiert. Die Reagenzröhrchen sollen zunächst 5 min auf Eis kühlen und danach im flüssigen Stickstoff bis zur weiteren Verarbeitung verbleiben. Zur Sicherstellung einer spezifischen Synthese von Ziel-cDNA und als bestgeeignete Negativkontrolle wird jeweils eine vergleichbare Zell-Probe für die spätere Verwendung ohne Zugabe der reversen Transkriptase mitgeführt.

3.3.4 Primer

Die Detektion von ACE-Isoformen wurde mit verschiedenen Primer-Paaren durchgeführt (Tab. 6). Um eine DNA-Amplifikation innerhalb der cDNA-Produktlängen sicher zu verhindern, wurden die Primer-Paare so gewählt, dass sie mindestens ein Intron flankieren. Die Amplifikate der cDNA und DNA entsprachen den zu erwartenden Produktlängen. Unspezifische Amplifikationen oder Pseudogene wurden durch entsprechende Kontrollen ausgeschlossen. Für jedes Primer-Paar wurde experimentell die optimale

Annealingtemperatur bestimmt, wobei die Schmelztemperatur der Primer als grober Anhaltspunkt diente. Als Positivkontrollen dienten Hypoxanthin Phosphorybosyltransferase (HPRT), Protamine 1 und 2 (Prot1 und 2) und Mucin 1 (Muc1) (Pauls et al. 1999, Steger et al. 2000, Franke et al. 2001).

Tab. 6: Primer für die Detektion von ACE-Isoformen und Positivkontrollen

mRNA	Primer-Sequenz	Exon	Basenpaare		Anneal °C
			cDNA	DNA	
t/s ACE	F 5'-ACGAAATGGGCCACATCCAG-3' R 5'-CACCCCTCACTGCTCAGCAG-3'	14	169	169	53
tACE	F 5'-AGCCAGACAACCACCCACC-3' R 5'-TTGTAGTTCCAGTTGGCCTCG-3'	13-14	130	2479	53
	F 5'-AACCCACCCACCAGGCGAC-3' * R 5'-CGGCATACTCGTTCCACACC-3'	13-14	158	2507	53
sACE	F 5'-CCGTTGCCTGACAACACTACCC-3' * R 5'-TTGTAGTTCCAGTTGGCCTCG-3'	12-14	115	4195	53
	F 5'-CCGTTGCCTGACAACACTACCC-3' * R 5'-CGGCATACTCGTTCCACACC-3'	12-14	134	4214	53
	F 5'-GCAAGGAGGCAGGCTATGAG-3' R 5'-CGGGTAAACTGGAGGATGG-3'	11-17	776	≈ 3870	60
HPRT	F 5'-AAGGACCCCACGAACTGTTG-3' * R 5'-GGCTTTGTATTTTGCCTTTCCA-3'	7-9	157	>2000	53-58
Prot1	F 5'-GCCAAGGTACAGATGCTGTGCGAG-3' * R 5'-TTAGTGTCTTCTACATCTCGGTCTG-3'	1-2	153	1270	58
Prot2	F 5'-GTGAGGAGCCTGAGCGAACGC-3' * R 5'-TTAGTGCCTTCTGCATGTTCTCTTC-3'	1-2	294	457	58
Muc1	F 5'-CCTTTCTTCTGCTGCTG-3' * R 5'-TGGGCACTGAACTTCTCTG-3'	1-2	118	145	62

* Primer-Paare wurden in der scRT-PCR eingesetzt

+ Primer-Paare wurden zusätzlich für die cRNA-Synthese eingesetzt

3.3.5 cDNA- Synthese

Anfänglich traten Probleme in der sc-RT-PCR auf, wogegen die RT-PCR von mRNA-Extrakten problemlos funktionierte. Statt der zu erwartenden Produktlängen war im Agarosegel oft nur ein molekularer Schmier in zahllosen Amplifikationslängen sichtbar. Deswegen wurden verschiedene Bedingungen der RT und PCR geprüft, u.a. verschiedene Primer (Random Hexamere, 5'-Primer und Oligo d(T)₁₆) unter jeweils veränderten RT-Bedingungen getestet. Als Ergebnis einer langen Versuchsreihe zur Optimierung der sc-RT-

PCR wurde das folgende Protokoll für die cDNA-Synthese als am besten geeignetes verwandt.

Vor der reversen Transkription wurden die Proben 10 min bei 70°C inkubiert und sofort auf Eis gekühlt. Für die cDNA-Synthese der mRNA-Extrakte wurden für den Mastermix benötigt: 7 µl H₂O, 4 µl MgCl₂, 2 µl Gene Amp 10x PCR Puffer II, 2 µl dNTPs, 1 µl Random Hexamere (oder andere Primer), 1 µl RNase Inhibitor und 1 µl MuLV reverse Transkriptase (siehe *Anhang, Ansätze für die RT und PCR*). Die cDNA-Synthese aus den gepickten Zellen wurde identisch zubereitet, mit der Ausnahme, dass volumenanteilig 2 µl MgCl₂ benötigt wurden. Als Negativkontrolle dienten u.a. Proben, bei denen lediglich die reverse Transkriptase aus dem Versuchsansatz weggelassen wurde.

Tabellarisches Protokoll für die Durchführung der reversen Transkription mit Random Hexameren, Oligo d(T)s oder 5'-Primer:

RT mit Random Hexamere oder Oligo d(T)s

•	Annealing	• 20°C	• 10 min
•	Reverse Transkription	• 43°C	• 75 min
•	Denaturierung	• 99°C	• 5 min
•	Abkühlung	• 4°C	

RT mit 5'-Primer:

•	Annealing	• 53-60°C	• 5 min
•	Abkühlen	• 0°C	• 5 min
•	Annealing	• 20°C	• 10 min
•	Reverse Transkription	• 43°C	• 75 min
•	Denaturierung	• 99°C	• 5 min
	Abkühlung	4°C	

3.3.6 PCR

In der sc-RT-PCR wurden die einzelnen Parameter der PCR-Technik und die Mastermix-Zusammensetzung der herkömmlichen RT-PCR modifiziert und an die Erfassung geringer mRNA-Mengen angepaßt (siehe *Anhang*). Die (sc-)PCR wurde mit der thermostabilen DNA-Polymerase AmpliTaq Gold (Perkin Elmer, Weiterstadt) in dem automatisch gesteuerten

Thermocycler (Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer, Weiterstadt) durchgeführt. Die thermostabile AmpliTaq Gold-Polymerase ist eine modifizierte Taq Polymerase aus *Thermus aquaticus* und für eine "Hot Start PCR" geeignet (Holland et al. 1991). Dabei wird das Enzym erst in einem pre-PCR-Schritt aktiviert und dann schrittweise freigesetzt, bis nach 50 bis 60 Zyklen in der sc-PCR eine ausreichende Anzahl von DNA-Kopien vorliegen (Fink et al. 1998). Dagegen genügen für die Detektion der cDNA in der herkömmlichen PCR ca. 30 bis 40 Zyklen. Der Mastermix für 2 µl bzw. 8 µl der cDNA für PCR bzw. sc-PCR wurde mit folgenden Reagenzien (Perkin Elmer, Weiterstadt) zubereitet:

Der Mastermix für die herkömmliche PCR : 4 µl MgCl₂, 5 µl Gene Amp 10x PCR Puffer II, 8 µl dNTPs, 0.5 µl AmpliTag Gold, 1.5 µl von jedem Primer und 36 µl H₂O. Der Mastermix für die sc-PCR: 3 µl MgCl₂, 4 µl Gene Amp 10x PCR Puffer II, 8 µl dNTPs, 1 µl AmpliTag Gold, 1.5 µl von jedem Primer und 32 µl H₂O (siehe *Anhang, Ansätze für die RT und PCR*).

Protokoll der PCR und sc-PCR

•	Aktivierung der AmpliTaq Gold	• 94°C	• 2.45-10 min ^a
•	Zyklus: 40-60fach Wiederholung ^b	•	•
•	Denaturierung	• 94°C	• 45 sek
•	Annealing	• 53-60°C ^c	• 45 sek
•	Polymerisation und Extension	• 72°C	• 45 sek
•	Abkühlung	• 4°C	•

^a bis zu 10 min für die herkömmliche PCR und 2.45 min für die sc-PCR

^b 40 Zyklen für die herkömmliche PCR und 60 Zyklen für die sc-PCR

^c je nach bestgeeigneter Annealtemperatur des jeweiligen Primer-Paares

In jeder PCR wurden verschiedene Kontrollen durchgeführt. Neben den bereits erwähnten Negativkontrollen (Proben ohne der reversen Transkriptase) wurden immer PCR-Kontrollen, d.h. Proben ohne cDNA zum Ausschluß einer laborintern möglichen cDNA-Kontamination mitgeführt. Die zelluläre Integrität der mRNA wurde mit HPRT, Prot1 und Prot2 oder Muc1 geprüft. Das Reaktionsprodukt wurde dann nach Auftrennung im Agarosegel (2%) und Färbung mit Ethidiumbromidlösung photographiert (siehe *Anhang*).

3.3.7 In situ-Hybridisierung (ISH)

Die im Rahmen dieser Arbeit angewandte Technik der ISH wurde wegen ihrer besonders schönen und eindeutigen Darstellung von mRNA-Signalen auch in lange gelagertem Paraffinmaterial gewählt. Sie basiert auf DIG-markierten cRNA-Sonden, die von PD Dr. Steger, Institut für Veterinäranatomie, Justus-Liebig-Universität Gießen, und von PD Dr. Klonisch, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Martin-Luther-Universität Halle, hergestellt wurden.

Die 158 bzw. 134 bp langen RT-PCR-Produkte der extrahierten tACE- bzw. sACE-mRNA (s.o.) wurden in pGEM-T-Vektoren (Promega, Heidelberg) subkloniert und die Ligationsprodukte in EcoXL1-Blue (Stratagene, Heidelberg) transformiert. Die transformierten Kolonien wurden auf dem Prinzip der Insertionsinaktivierung selektiert: rekombinanten Bakterien fehlt die β -Galaktosidase und damit die Fähigkeit weißen Farbstoff umzusetzen, wodurch sie sich von nicht rekombinanten EcoXL1-Blue unterscheiden. Die Plasmid-DNA wurde isoliert und mit dem QIA Miniprep-Kit (QIAGEN, Hilden) gereinigt. Der anschließende Restriktions-Endonuklease-Verdau der gereinigten DNA mit Endonukleasen Nco I oder Not I (New England Biolabs, Frankfurt) erzeugte linearisierte DNA-Fragmente als Vorlage für die *in vitro* Transkription zu Sense- bzw. Anti-Sense-cRNA. Für die Transkription und gleichzeitige Digoxigenin (DIG)-Markierung der cRNA aus den hergestellten DNA-Fragmenten wurden die RNA-Polymerasen T7 und SP6 eingesetzt (RNA-DIG-Labeling Mix, Boehringer Mannheim). Die Konzentrationen der DIG-markierten cRNA wurden in einem semiquantitativen Dot-Blot-Verfahren abgeschätzt (Jackson 1991).

Die ISH entsprach einer standardisierten Hybridisierungstechnik (Steger et. al. 1998 und 1999) und wurde an formalinfixierten, entparaffinisierten und mit Proteinase-K (20 μ g/ml 1x PBS) vorbehandelten Schnitten (von 5 μ m Dicke) durchgeführt, die über Nacht bei 37 °C mit den jeweils 1:100 in einem üblichen Hybridisierungs-Mix verdünnten ACE-cRNA-Sonden inkubiert wurden (siehe *Anhang*). Zur Entfernung der einzelsträngigen RNA dienten RNaseA und RNaseT1 und eine stringente Posthybridisierung. Das Bindungsverhalten DIG-markierter Sense- und Anti-Sense-cRNA wurde je Versuch im Folgeschnitt geprüft und über alkalische-Phosphatase-konjugierte anti-DIG-Fab-mAk visualisiert. *Praktische Durchführung:*

1. Vorbehandlung der Präparate

Ziele: Entparaffinierung, Gewebe-Permeabilisierung mit 0.2 M HCl und Proteinase K, Blockade der unspezifischen Reaktion in 20% Essigsäure, Nachfixierung in 4% Paraformaldehyd und zusätzlich Blockade gewebeeigener unspezifischer Reaktionen in 20% DEPC-Wasser.

• Xylol	• 60°C	• 1x 5 min
• Xylol	• RT	• 2 x 5 min
• Aufsteigende Alkoholreihe in Stufen: 30%, 50%, 70%, 96% Alkohol	• RT	• je 1 min
• DEPC-Wasser	• RT	• 15 sek
• 0.2 M HCl	• RT	• 15 sek
• 2x SSC-Lösung (auf 70°C vorgewärmten)	• 70°C	• 20 min
• PBSM-Puffer	• RT	• 15 sek
• Proteinase K	• 37°C	• 30 min
• 20% Essigsäure (4°C vorgekühlt)	• 4°C	• 15 Sek.
• PBSM-Puffer	• RT	• 15 sek
• 4% Paraformaldehyd-Lösung	• RT	• 10 min
• PBSM-Puffer	• RT	• 2 x 5 min
• 20% Glycerol	• RT	• 30-60 min
• 2x SSC-Puffer	• RT	• wenige Sek

2. Hybridisierung

Ziel: Gewebe-RNA zu denaturieren, zu strecken und so zu stabilisieren.

• Schnittpräparate auf Heizblock	• 70°C	• 2-5 min
• Eisblock	• -20°C	• 5 min
• Hybridmix auf 70 °C erwärmen und dann auf Eis bringen		
• Hybridmix und Hybridisierungspuffer vermischen		
• Inkubation	• 37°C	• ca. 18 h
• Schnittpräparate mit sterilen Deckgläsern bedecken		

3. Posthybridisierung

Ziel: Abbau einzelsträngiger, nicht hybridisierter RNA durch RNasen, Hemmung der unspezifischen Hintergrundreaktion, Inkubation mit Anti-DIG-Fab-mAk.

•	4 x SSC-Puffer	• RT	• 15 sek
•	15% RNase (in 4 x SSC)	• 37°C	• 30 min
•	4 x SSC	• 37°C	• 4 x 5min
•	2 x SSC	• 60°C	• 15 min
•	0.2 x SSC	• 48°C	• 15 min
•	0.1 x SSC	• RT	• 5 min
•	2 x SSC	• RT	• 5 min

4. Immunhistochemie

Ziel: Inkubation der Schnitte mit AP-markierten Anti-DIG-Fab-mAk, Blockade der unspezifischen Reaktion der AP mit Levamisol, Detektion mit BCIP/NBT (Bromo-Chloro-Indolylphosphat/Nitrobluetetrazolium)

•	1 x TNMT-Puffer	• 10 min
•	3% BSA (in 1 x TNMT)	• 1 h
•	1 x TNMT	• 10 min
•	Inkubation mit Anti-DIG-Fab-mAk (1:500) bei 4°C	• ca. 18 h
•	1 x TNMT	• 10 min
•	1 x NTB-Puffer	• 5 min
•	1x NBT+ 1 ml Levamisol	• 5 min
•	NBT-BCIP-Lösung	• 4-6 h
•	NTB-Levamisol-Lösung in der feuchten Kammer	• 5 min
•	Bidest	• 5 min
•	Gegenfärben und mit Glycergel eindecken	•

Zu den jeweils verwendeten Puffern, Lösungen und deren Ansätzen siehe weitere Details im Anhang.

4 Ergebnisse

4.1 Somatisches ACE in der Hodenreifung

Im Hodengewebe verschiedener Entwicklungsstufen von der Embryonalzeit bis hin zur Pubertät (8., 9., 14., 16., 18., 19., 20., 21., 22., 23., 25., 33. und 35. Entwicklungswochen; Neugeborene in den 2., 3. und 5. postnatalen Entwicklungswochen; 8 kindliche Hodengewebe) wurde ACE immunhistochemisch detektiert und mit der Expression von GCAP verglichen. Der Hauptbefund ist die Identifizierung einer regulären Expression der somatischen ACE-Isoform in fetalen Keimzellen (im Gegensatz zu der testikulären Form in adulten Gonozyten). Einen weiteren wichtigen Befund stellt die differenziert erfolgende Expression von sACE und GCAP (Keimzellen exprimieren diese Form von PIAP) in bestimmten Phasen der praenatalen Hodenentwicklung dar, die eine Abhängigkeit von der Keimzellentwicklung aufweist.

Keimzellen

Fünf aufeinander folgende Entwicklungsstadien der Keimzellen in der Praespermatogenese können abgegrenzt werden (Wartenberg 1990, Hilscher 1991). In der 8. und 9. Entwicklungswoche finden sich noch sog. primordiale Geschlechtszellen (PGCs). Dies sind kleine, amöboid geformte Zellen, die entweder noch extragonadal, ganz überwiegend jedoch gonadal und bereits in Sex-cord-Strukturen integriert vorgefunden werden. Ende des ersten und Anfang des zweiten Trimenon differenzieren PGCs zu M-Prospermatogonien (M = multiplying, da stark proliferierend), die morphologisch durch eher rundliche Zellformen mit größeren und Nukleolen-haltigen Zellkernen abgegrenzt werden können. Etwa ab der 14. SSW treten in den inzwischen ausgebildeten Hodensträngen erste T-Prospermatogonien auf (T = transitional, Übergangsstadium zu frühen Stamm-Spermatogonien). T1-Prospermatogonien sind ruhende Zellen und zeichnen sich durch große Zellkerne mit breitem hellem Zytoplasmasaum aus. Auf dieses Ruhestadium folgt ein weiterer Proliferationsschub, der zur Ausbildung von T2-Prospermatogonien führt, welche letztlich zu den frühen Stammspermatogonien differenzieren. Da im fetalen Hoden des Menschen Perioden von Proliferation und Mitose-Inaktivität für einzelne Keimzellen zu unterschiedlichen Zeiten einsetzen, findet man im Verlauf der praenatalen Entwicklung in den Hodensträngen Geschlechtszellen mit unterschiedlichen Differenzierungen nebeneinander.

Diese Vorinformation über die morphologischen Details konnte in der zeitlichen Abfolge der Hodenentwicklung an dem eigenen analysierten Material gut nachvollzogen werden. Im Unterschied zu den primordialen Geschlechtszellen, die weder sACE noch GCAP exprimierten, zeigen die M-Prospermatogonien eine starke Immunreaktivität für beide Marker (Abb. 3). Dieser Befund wird besonders deutlich im hier nicht gezeigten direkten Vergleich zu dem M2A-Antigen, das nahezu alle PGCs markiert (Franke et al., Manuskript in Vorbereitung). Die maximale Immunreaktivität für sACE, bezogen auf die Quantität exprimierender Keimzellen, wurde in der Proliferationsphase der M-Prospermatogonien zwischen der 18. und 22. Schwangerschaftswoche (SSW) detektiert. Nach der 22. SSW und mit dem vermehrten Auftreten von transitionalen T1- und T2-Prospermatogonien sowie frühen Stammspermatogonien nahm die Immunreaktivität der Keimzellen deutlich ab, da sich diese Zelldifferenzierungen als negativ für GCAP und sACE darstellten (Abb. 3). Zum Zeitpunkt der Geburt und in der frühen Kindheit wurden nur vereinzelte, durch GCAP und sACE markierte M-Prospermatogonien vorgefunden. Zudem zeigten diese oft regressive Zellveränderungen sowie eine Lagerung im Zentrum der Lumenlichtung der Hodentubuli (Abb. 3).

Prae-Sertoli-Zellen und Leydig-Zellen

Die frühen embryonalen Prae-Sertoli-Zellen zeigten sich negativ für sACE. Die schwache und diffuse Expression war erst ab der 9. Entwicklungswoche nachweisbar, jedoch kontinuierlich deutlich werdend bis hin zur Geburt. Postnatal war sACE in Sertoli-Zellen nur auf wenige Tubuli beschränkt und wurde in den regulären adulten Sertoli-Zellen nicht mehr exprimiert. Die sACE-Expression in den Leydig-Zellen, einer fetalen Variante der Zwischenzellen des adulten Hodens, begann im Laufe ihrer starken Proliferationsphase nach der 14. Entwicklungswoche. Hierbei war das Verteilungsmuster des Enzyms heterogen, mit einer starken perinukleären Immunreaktivität in ca. 10 % der Leydig-Zellen, während die meisten eine schwache und diffuse intrazelluläre Expression von sACE aufwiesen (Abb. 3). Im spätfetalen Hoden nahm die relative Zahl der Leydig-Zellen kontinuierlich ab, bis zu ihrer kompletten Regression beim Neugeborenen. Entsprechend dieser Entwicklung reduzierte sich die Immunreaktivität für sACE im peritubulären Interstitium des spätfetalen Hodens und wurde beim Neugeborenen nur noch von ganz vereinzelten Leydig-Zellen getragen. Sowohl in Gonozyten als auch in Leydig-Zellen war das Verteilungsmuster von PIAP/GCAP vergleichbar mit dem von sACE. Dagegen exprimierten die Sertoli-Zellen weder im fetalen noch im adulten Hoden die PIAP. Die zellulären Immunreaktivitäten für beide Marker in den

verschiedenen Entwicklungsstufen vom embryonalen bis hin zum reifen pubertären Hoden sind in der Tabelle 7 zusammengefaßt.

Tab. 7: Somatisches ACE und GCAP/PIAP in der Hodenentwicklung

Entwicklungsalter	Spermatogonien		Sertoli-Zellen		Leydig-Zellen	
	sACE	GCAP ⁺	sACE	PIAP	sACE	PIAP
1. Trimenon	(+)	(+)	-	-	-	-
2. Trimenon	+++	+++	+	-	+	+
3. Trimenon	(+)	(+)	++	-	+	+
Neugeborene/Kleinkinder	(+) [*]	(+) [*]	(+)	-	-(↓)	-(↓)
Pubertät / Adulte	-	-	-	-	+	+

⁺ Bezeichnung für die alkalische Phosphatase der Keimzellen

^{*} Expression in wenigen noch vorliegenden M-Prospermatogonien

↓ Rückbildung der Leydig-Zell-Population

Abb. 3: Somatisches ACE und GCAP in der Hodenentwicklung

Immunhistologische Darstellung von sACE mit mAk CG2 (A, C, E) und GCAP/PIAP mit mAk Pl8-F6 (B, F) und mAk 8A9 (D); A-F: x 240.

A u. B : Embryonale Hodenanlage in der 8. Entwicklungswoche.

A: Die Mehrheit der Zellen in den Hodensträngen, die hauptsächlich aus primordialen Keimzellen und Sertoli-Vorläuferzellen bestehen, exprimiert kein sACE. Nur wenige runde Zellen mit größeren dunklen Zellkernen werden durch sACE markiert (Pfeil). Es sind die ersten M-Prospermatogonien, welche zu diesem Zeitpunkt der Hodenentwicklung zu 10-20 % der Gonozyten-Population beitragen. **B:** Das Expressionsmuster von GCAP in den Keimzellen ist faktisch identisch.

C u. D: Fetaler Hoden, 19. Entwicklungswoche.

C: Starke Vermehrung sACE-exprimierender M-Prospermatogonien, die in ihrer Zellpopulation im Vergleich zu der 8. Entwicklungswoche quantitativ jetzt überwiegen (Pfeilkopf). Auch die Prae-Sertoli-Zellen lassen zu diesem Zeitpunkt eine noch sehr schwache Immunreaktivität erkennen. Prospermatogonien sind negativ für sACE (Pfeil zeigt T1-Prospermatogonie). Interstitiell ist eine heterogene und gelegentlich kräftige perinukleäre Expression von sACE in einigen Leydig-Zellen zu erkennen (Pfeilkopf). **D:** Vergleichbare Immunreaktivität von GCAP in M-Prospermatogonien, während T-Prospermatogonien (Pfeil) und Prae-Sertoli-Zellen keine GCAP/PIAP exprimieren. Die Leydig-Zellen sind zu diesem Zeitpunkt schwach PIAP-positiv.

E u. F: Reifes Neugeborenes.

E: Stark reduzierte Expression von sACE in Keimzellen bei überwiegendem Vorkommen von fortgeschrittenen Reifungsstufen der Keim- und Sertoli-Zellen. Interstitiell sind Leydig-Zellen bereits rückgebildet. Die immunreaktiven Keimzellen finden sich oft in der Lumenlichtung (Pfeil). **F:** PIAP/GCAP-markierender Folgeschnitt mit vergleichbarer GCAP-Immunreaktion in nur noch wenigen Keimzellen (Pfeil).



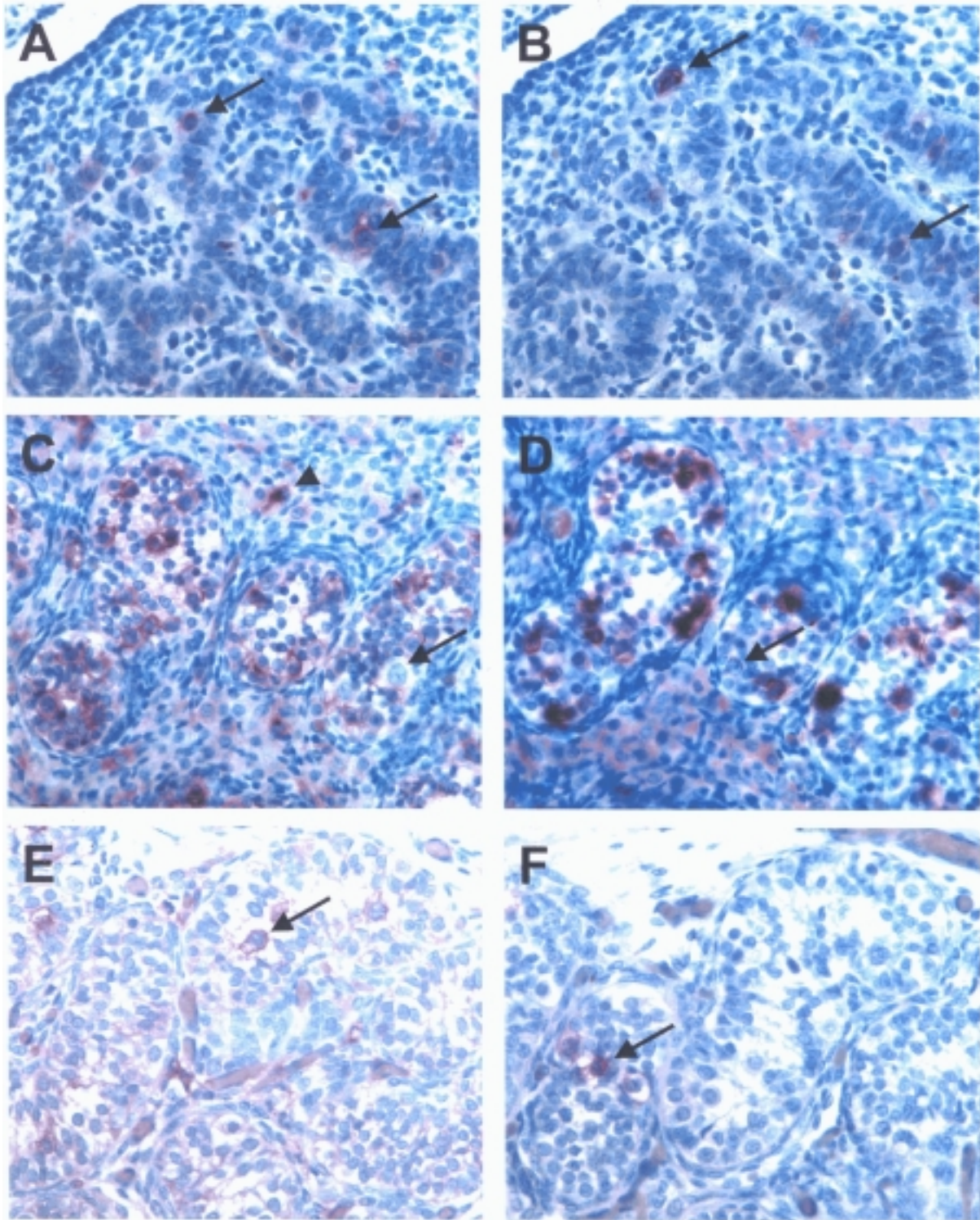


Abb. 3: SACE und GCAP in Hodengeweben verschiedener Entwicklungsstufen

4.2 ACE-Isoformen im normalen Hoden und Nebenhoden

4.2.1 Zelluläre Expression der ACE-Isoformen im adulten Hoden

Im adulten menschlichen Hoden wurde die zelluläre Expression der ACE-Isoformen in 14 Fällen mit regelrechter Spermatogenese untersucht. Die Detektion der mRNA erfolgte am Paraffinmaterial mittels der *in situ*-Hybridisierung mit zwei spezifischen DIG-markierten RNA-Proben für die beiden ACE-Isoformen. Am Nativmaterial diente sc-RT-PCR nach UV-Laser assistiertem Cell-Picking dem mRNA-Nachweis. Die Protein-Expression wurde immunhistochemisch mit verschiedenen mAk am Paraffin- und Gefriermaterial demonstriert. Da noch keine spezifischen Anti-tACE-mAk zur Verfügung stehen, erbrachte hier der Vergleich der Expressionsmuster zwischen sACE und Gesamt-ACE in Folgeschnitten den erwünschten Nachweis der testikulären Isoform.

Interstitiell wurden sACE-mRNA und -Protein in den Endothelien und Leydig-Zellen detektiert. Die Leydig-Zellen zeigten ein heterogenes, inter- und intraindividuell variables Expressionsmuster mit teils fehlendem molekularem Nachweis in der IH und ISH, aber stets positivem Ergebnis in der sc-RT-PCR (Tab. 8). Die Immunreaktion war zumeist deutlich an der Zellmembran lokalisiert (Abb. 4A und 4B).

Tab. 8: Zelluläre Verteilung der ACE-Isoformen im normalen Hodengewebe

Zelltyp	testikuläres ACE			somatisches ACE		
	sc-RT-PCR	ISH	IH	sc-RT-PCR	ISH	IH
Leydig-Zellen	-	-	-	+	±	±
Endothel	-	-	-	+	±	±
Sertoli-Zellen	-	-	-	-	-	-
Spermatiden	+	+	+	-	-	-

Die Analyse einer möglichen Expression in Sertoli-Zellen zeigte mit allen zur Verfügung stehenden Methoden, dass diese sowohl in normalen Tubuli seminiferi als auch in den pathologisch veränderten Tubuli der untersuchten IKZN frei von detektierbarem ACE waren. Im normalen adulten Hoden wurde dagegen ausschließlich die tACE-Isoform im tubulären Kompartiment exprimiert und fand sich dort in bestimmten Entwicklungsstufen der Spermatogenese (Abb. 4C-F).

Der humane Zyklus des Keimepithels verläuft in sechs Stadien (I-VI) mit acht Differenzierungsschritten der Spermatiden (Abb. 5). Der direkte Vergleich zwischen der Markierung der tACE-mRNA in der *in situ*-Hybridisierung und des tACE-Proteins in der Immunhistochemie belegte eine sequenziell erfolgende mRNA- und Protein-Expression von tACE während der Spermatogenese.

In der zeitlichen Abfolge aller Stadien wurde das früheste tACE-mRNA-Signal in den mittleren pachytänen Spermatozyten im Stadium III sichtbar. In den Stadien IV-VI zeigten die mittleren bis späten pachytänen Spermatozyten ein deutlich stärkeres Signal für tACE-mRNA. In späteren Entwicklungsstadien war das cRNA-Signal bis hin zu den elongierenden Spermatiden im Stadium IV verfolgbar, ab dieser Differenzierungsstufe aber nicht mehr sicher nachweisbar (Abb. 4E und 4F, Abb. 5). Das tACE-Protein trat mit einer zeitlichen Verzögerung zur mRNA auf und war erst ab dem Stadium III in ersten runden Spermatiden, vor allem aber in späteren elongierenden Spermatiden exprimiert. In allen Spermatidenformen wurde das tACE-Protein selektiv nur an der luminalen Zytoplasmamembran vorgefunden. In elongierten Spermatiden fand sich das tACE im Hals- und Mittelstückbereich, während sich der Spermienkopf stets frei von tACE zeigte (Abb. 4F). Ferner war tACE-Protein auch in dem abgestoßenen Zytoplasmarest freigesetzter Spermatiden, dem Residualkörper, nachweisbar. Die morphologischen Befunde und Besonderheiten sind schematisch dargestellt (Abb. 5).

Abb. 4: ACE-Isoformen im normalen adulten Hodengewebe

A u. B: *Immunhistologie von testikulärem und somatischem ACE mit Anti-sACE-mAk CG2 (A) und mit dem beide Isoformen markierenden Anti-ACE-mAk CG1 (B).* **A:** Expression von sACE nur in interstitiellen Leydig-Zellen mit Betonung der Zellmembranen und Gefäßendothelien. Im intratubulären Kompartiment ist kein sACE nachweisbar. **B:** Normale Spermatogonien, Spermatozyten und Sertoli-Zellen der Tubuli seminiferi exprimieren keine der beiden ACE-Isoformen, wohingegen im Reifungsstadium der Spermatischen das tACE-Protein auftritt (vgl. mit A). A, B, C: x 120, E: x 240, F: x 480.

C u. D: *Mikrodissektion weniger Zellprofile mit anschließender Detektion der ACE-Isoformen in sc-RT-PCR.* **C:** Zellpicking von LZ-Profilen (L, Pfeil) und wenigen Zellen des Tubulus seminiferus (S, Pfeil). **D:** cDNA-Nachweis in Keimzellen: Spuren 2 u. 3 (tACE+, sACE-); Leydig-Zellen: Spuren 4 u. 5 (tACE-, sACE+); und im Endothel einer kleinen Arteriole: Spuren 6 u. 7 (tACE-, sACE+). Spur 8: interne Positivkontrolle (HPRT); Spuren 9 u. 10: Negativkontrollen; Spuren 1 u. 11: DNA-Marker Φ X 174 (Promega). Testikuläres ACE wird ausschließlich im Keimepithel (Amplikon von 158 bp) detektiert. Somatisches ACE wird in den Leydig-Zellen und Endothelzellen (Amplikon 134 bp) nachgewiesen.

E u. F: *Vergleichende in situ-Hybridisierung und Immunhistologie zur Darstellung der tACE-Expression während der Spermatogenese.* Detektion des tACE-Proteins mit mAk CG4: E/3, E/6, F/3, F/4, F/6. Detektion von tACE-mRNA mit DIG-markierten Sonden: (Sense) E/1, E/4, F/1; (Antisense): E/2, E/5, F/2. **E:** Stadien V (E/1-3) und II (E/4-6) der Spermatogenese (Stadieneinteilung nach Clermont 1963). Positives mRNA-Signal bereits in pachytänen Spermatozyten (E/2) und in runden Spermatischen (E/3) nachweisbar. Das Protein wird erst in den elongierenden Spermatischen detektiert (E/3 u. E/6). **F:** Nachweis der tACE-mRNA vorwiegend in pachytänen Spermatozyten (F/2) wohingegen tACE-Protein ausschließlich in den elongierten Spermatischen und Residualbodies luminal-seitig (F/3). Lokalisation von tACE in den reifenden Spermatischen und Spermien im Hals- und Mittelstück der Spermien (F/4). Dies entspricht der Spermien-Lokalisation der testikulären ACE-Isoform im Seminalplasma, dargestellt für mAk CG1 und CG2 (F/5, Gesamt-ACE u. F/6, sACE). Nur feine beigelagerte Tröpfchen sind schwach immunreaktiv für sACE.



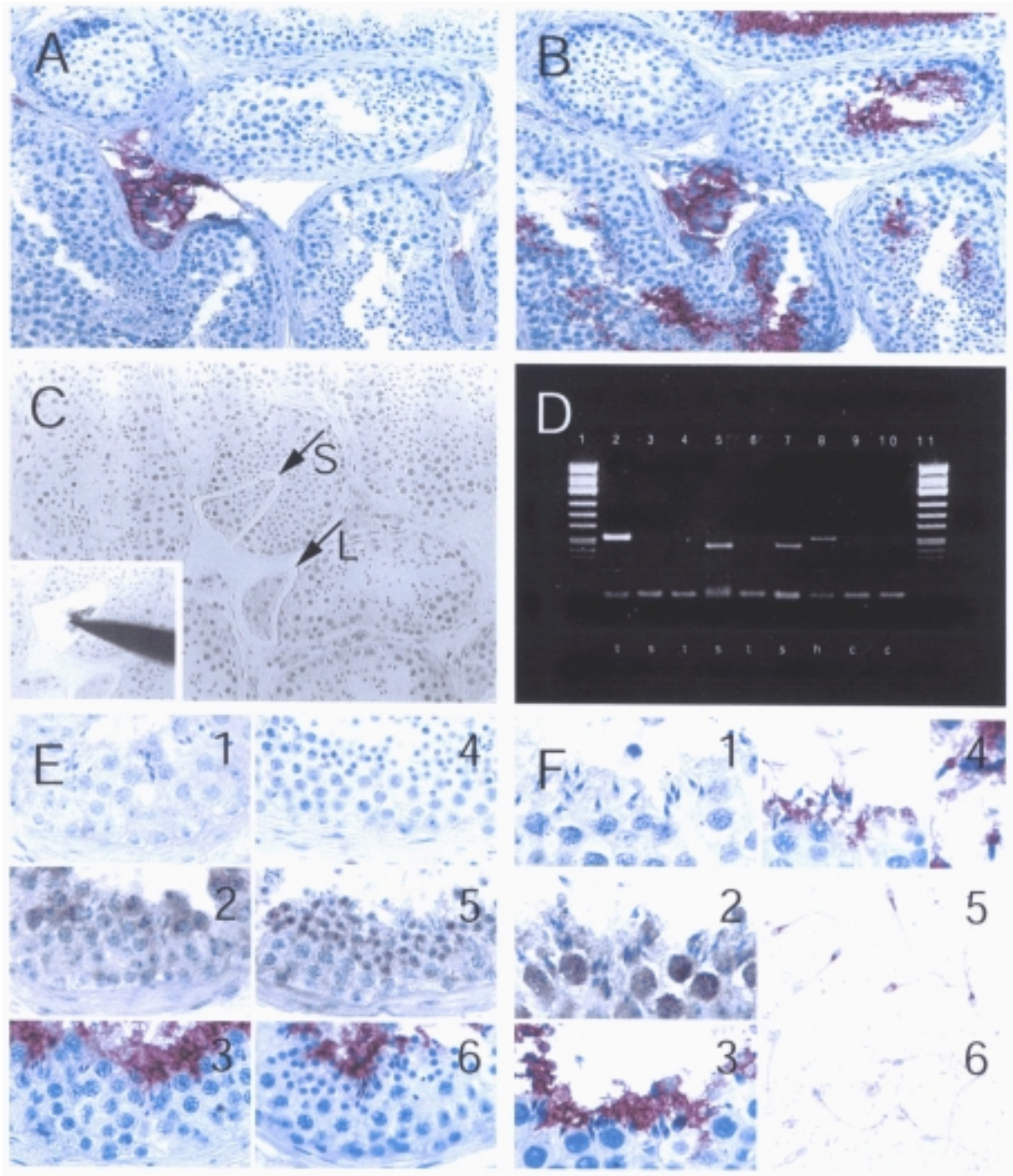


Abb. 4: ACE-Isoformen im normalen adulten Hodengewebe

Schematische Darstellung der in der Immunhistochemie und in situ-Hybridisierung nachgewiesenen tACE-Expression in adulten Keimzellen.

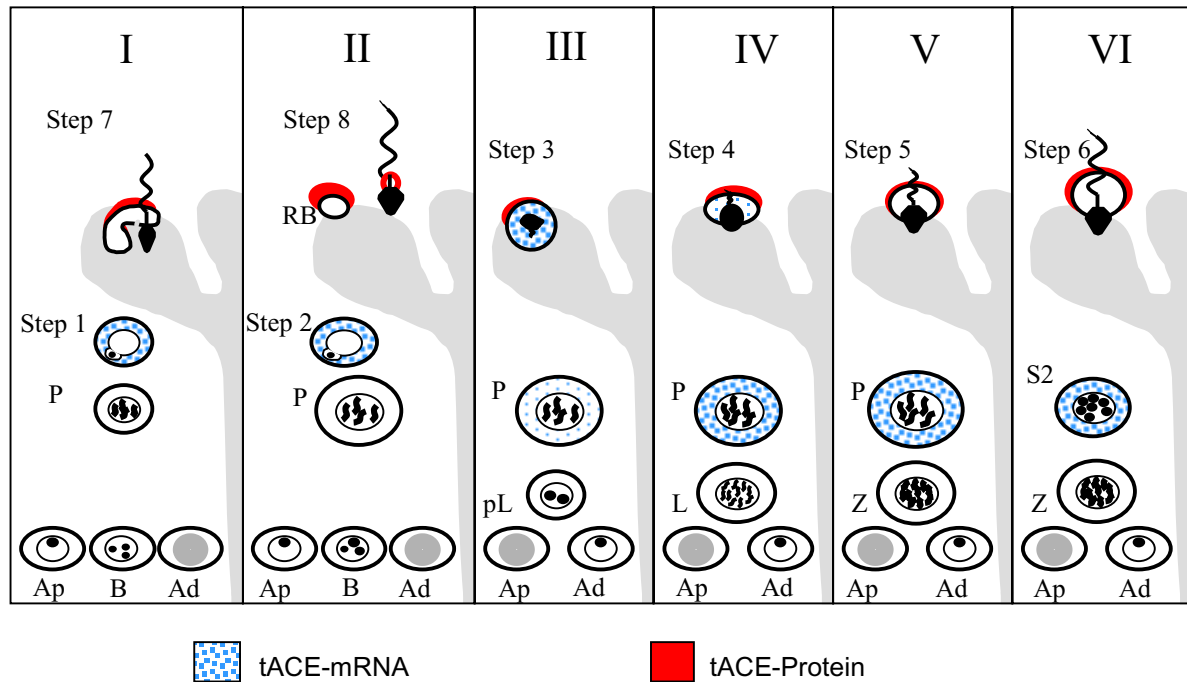


Abb. 5: Schema der tACE-Expression in der Spermatogenese

Stadien I-VI (nach Clermont 1963). *Ad* A-dark Spermatogonien, *Ap* A-pale Spermatogonien, *B* B Spermatogonien, *pL* präleptotäne Spermatozyten, *L* leptotäne Spermatozyten, *Z* zygotäne Spermatozyten, *P* pachytäne Spermatozyten, *S2* Spermatozyt 2. Ordnung, *Step 1-8* Spermatidenreifungsstadien.

4.2.2 Zelluläre Expression von ACE in Rete testis und Nebenhoden

Die Expression von somatischem ACE im Rete testis und in verschiedenen Nebenhodenabschnitten wurde in 6 verschiedenen regulären Geweben mit IH, ISH und LACP untersucht. Bereits im Rete testis fand sich ein überraschender Befund. Das kubische bis hochprismatische Epithel des Rete testis war in allen Fällen frei von detektierbarem sACE-Protein, wohingegen das mRNA-Signal konstant und homogen vorgefunden wurde (Abb. 6A-D).

In dem mehrreihigen mit Mikrovilli und Stereozilien besetzten Epithel der Ductuli efferentes dagegen war eine starke sACE-Protein-Expression an den luminalen Epitheloberfläche stets vorhanden. Auch das entsprechende mRNA-Signal wurde hier typischerweise supranukleär lokalisiert und war, verglichen mit dem Epithel des Rete testis, schwächer ausgebildet (Abb. 6E und 6F). Somatisches ACE-Protein wurde zudem vom Epithel der Ductuli efferentes ins Lumen sezerniert, offenbar durch vesikuläre Abschnürung von Zellmembranbestandteilen (Abb. 6E).

Auffällig war auch die Expression im proximalen Abschnitt des Ductus epididymidis. Dem mit hohen Stereozilien besetzten pseudostratifizierten Epithel fehlte sACE-Protein (Abb. 7A), während ein Signal für sACE-mRNA nur in der histiozytären Zelle zwischen dem basalen und hochprismatischen Epithel lokalisiert wurde (Abb. 7B). Eine entsprechende zelluläre Zuordnung wurde mit anti-CD68 und anti-Keratin durchgeführt (nicht gezeigt). Auch im weiteren Verlauf des Ductus epididymidis in Corpus und Cauda fand sich sACE-mRNA in den histiozytären Zwischenzellen, die jedoch hier im Gegensatz zum Nebenhodenkopf weniger dicht gelagert waren. Auch in diesen ruhenden und nicht aktivierten Zellen konnte das sACE-Protein immunhistochemisch nicht nachgewiesen werden. Die hochprismatischen Epithelzellen im Bereich von Corpus und Cauda wiesen dagegen eine konstante und starke apikale Immunreaktion für das sACE-Protein auf (Abb. 7E). Das Signal für die mRNA war in den korrespondierenden Zellen ebenfalls vorhanden und supranukleär lokalisiert (Abb. 7F). Im Prinzip bestätigte die sc-RT-PCR die vorliegenden Ergebnisse der mRNA-Verteilung in der ISH (Abb. 7C und 7D). Die in den verschiedenen analysierten Fällen jeweils konstanten Befunde der epithelialen ACE-Expression in der IH und ISH sind schematisch in Abb. 8 zusammengefaßt.

Abb. 6: Somatisches ACE in Epithelien von Rete testis und Ductuli efferentes

A u. B: Rete testis, Übersicht. Immunhistologie von sACE-Protein mit mAk CG2 (A) und *in situ*-Hybridisierung mit DIG-markierter sACE-cRNA, Antisense (B). **A:** Im Rete testis mit seinen Labyrinth-ähnlichen Strukturen stellt sich das Rete-Epithel immunhistochemisch weitestgehend negativ dar. Als interne Positivkontrolle dient das Gefäßendothel kleiner Gefäße, die im Bindegewebe verteilt sind. **B:** Dagegen findet sich ein starkes Signal für die sACE-mRNA im gesamten Epithel des Rete testis. A, B: x 120

In C, D und F wird die Expression von sACE im direkten Vergleich von ISH und IH gezeigt. Unter der Subnummer 1 sind die mit Sense-cRNA, unter Subnummer 2 die entsprechenden mit Antisense-cRNA hybridisierten Präparate abgebildet. Unter der Subnummer 3 in C und D wird die immunhistochemische Markierung von sACE mit mAk CG2 dargestellt. In E immunhistochemische Detektion des katalytisch-aktiven sACE im Nativmaterial mit mAk 9B9. C-F: x 480, Ausschnitt in E: x 1000

C u. D: Rete-Epithel. **C:** Das typische kubische bis niedrig-prismatische Rete-Epithel exprimiert kein sACE-Protein. Vergleiche die positive Reaktion für sACE in einer subepithelial liegenden Kapillare als Kontrolle der Immunreaktion (3, in der Mitte des Bildes). In der ISH dagegen wird perinukleär ein deutliches Signal für die sACE-mRNA im gesamten Rete-Epithel detektiert (2). In **D** ist der Übergang vom terminalen Segment eines Samenkanälchens zum proximalen Abschnitt von Rete testis erfasst unter Einschluß einer Insel aus Sertoli-Zellen, dem May'schen Pfropf. Auch hier wird die Spezifität der cRNA-Sonde und eine unterschiedliche epitheliale Expression von sACE-Protein und -mRNA demonstriert.

E u. F: Ductulus efferentis. **E:** Im Nativmaterial zeigt sich eine starke epitheliale sACE-Expression, daneben auch immunreaktives sACE Seminalplasma. Das seminalplasmatische sACE lagert sich oft im Verband mit kleinen Zytoplasmavesikeln an die Spermienoberfläche an (Ausschnitt; vgl. mit Abb. 4F). **F:** Im Vergleich zum Rete testis schwächeres supranukleäres Signal für die mRNA im Epithel des Ductulus efferentis.



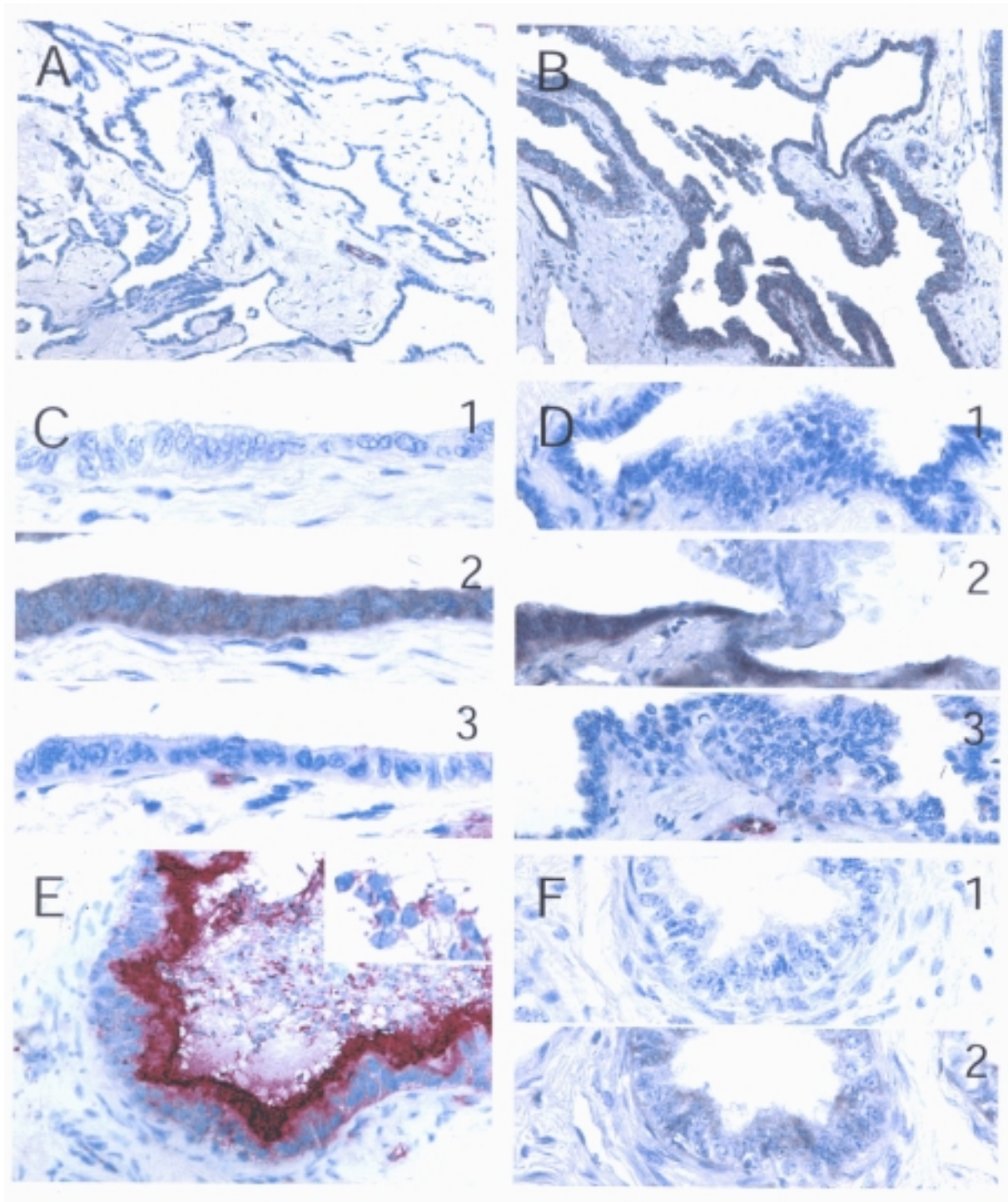


Abb. 6: Somatisches ACE in Epithelien von Rete testis und Ductuli efferentes

Abb. 7: Somatisches ACE im Ductus epididymidis

A u. B: Caput epididymidis. Immunhistologie mit mAk CG2 (A, B/3) und in situ-Hybridisierung mit DIG-markierten Sonden: (Sense) B/1; (Antisense) B/2. Kein Nachweis von sACE im pseudo-stratifizierten Epithel des Nebenhodenkopfes (A u. B/3). Nur in der Zellschicht zwischen den prismatischen und basalen Zellen (ruhende Gewebemakrophagen) wird ein deutliches Signal für die mRNA in der ISH demonstriert (B/2). A: x 120, B: x 480

C: Mikrodissektion und Cell Picking von basalen und adluminalen Epithelzellen des Caput epididymidis. **D:** Sc-RT-PCR von nach Cell Picking von Zellprofilen der Epithelien von Rete testis und verschiedenen Abschnitten des Ductus epididymidis. Rete testis: Spuren 2 u. 3 (sACE +); adluminale Zellen des Caput epididymidis Spur 4 (sACE -); basale Zellen des Caput epididymidis: Spur 5 (sACE +); Corpus epididymidis: Spuren 6 u. 7 (sACE +); Cauda epididymidis: Spuren 8 u. 9 (sACE +). Spuren 10 u. 11: Negativkontrollen. Spuren 1 u. 11: DNA-Marker Φ X 174 (Promega). SACE-cDNA (Amplikon 134 bp) wird in allen untersuchten Nebenhodenepithelien detektiert. Im Epithel des Caput epididymidis ist die adluminale Zellschicht negativ, die basale Zellschicht dagegen positiv für die sACE-mRNA. C: x 240

E u. F: Cauda epididymidis. Immunhistologie und in-situ Hybridisierung. **E:** Detektion von sACE-Protein (mAk CG2) im Bereich der Stereozilien und innerhalb des Lumens. **F:** Detektion von sACE-mRNA in ISH mit DIG-markierten Sonden, Antisense (Sense-Kontrolle im Ausschnitt). E, F: x 240



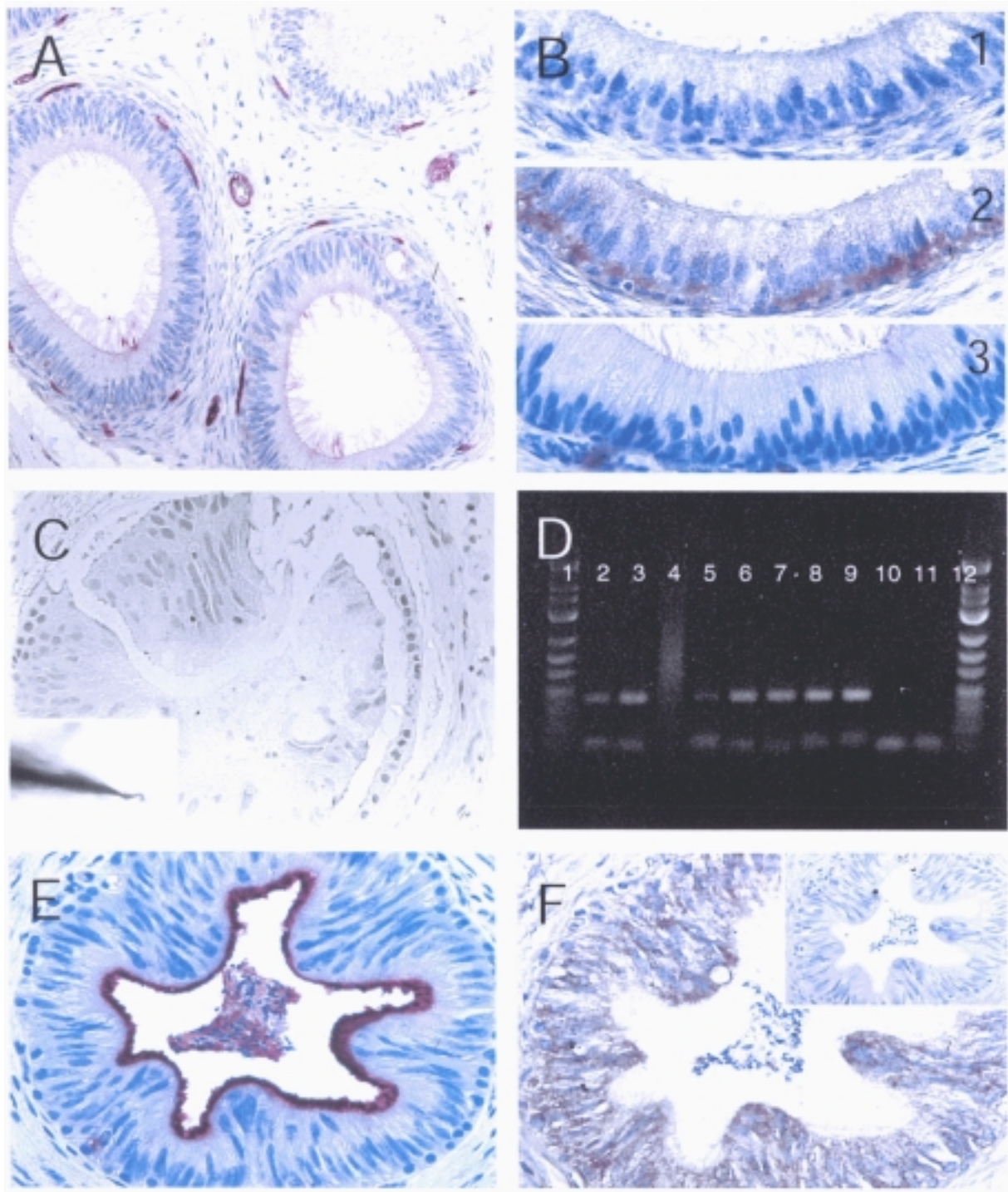


Abb. 7: Somatisches ACE im Ductus epididymidis

Schematische Darstellung der in Immunhistochemie, in situ-Hybridisierung und sc-RT-PCR nachgewiesenen sACE-Expression in Rete testis und verschiedenen Abschnitten des Nebenhodens.

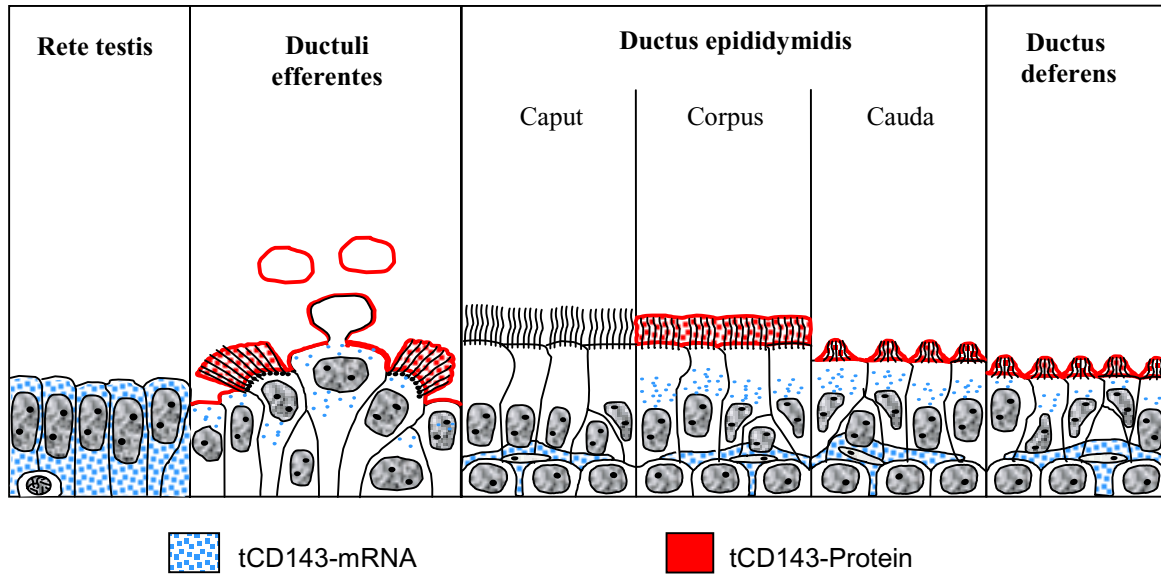


Abb. 8: Schema der sACE -Expression im Nebenhodenepithel

4.3 ACE-Expression in Keimzelltumoren

4.3.1 Isoformen in nicht-invasiven und invasiven Tumoren

Zunächst wurde die Expression von Transkriptions- und Translationsprodukten von ACE-Isoformen im IKZN und invasiven Tumoranteilen untersucht. Hierzu wurde aus nativen Geweben gewonnene mRNA in der (sc-)RT-PCR mit testikulären und somatischen Primer-Paaren detektiert und zugleich das Protein in den gleichen Gewebepräparaten in Folgeschnitten immunhistochemisch dargestellt.

In allen untersuchten Fällen wurde das sACE-Protein in den Tumorzellen nachgewiesen. Die zelluläre Immunreaktivität fand sich in IKZN und Seminomen vorwiegend an der Zellmembran, zusätzlich aber auch diffus oder grob-granulär im Zytoplasma der Tumorzellen. In embryonalen Karzinomen und Teratokarzinomen wurde das Protein nur fokal und heterogen exprimiert und war insbesondere in Teratomanteilen mit bestimmten epithelialen Zelldifferenzierungen assoziiert. Beispiele der gefundenen Expressionsmuster sind in Abb. 9 wiedergegeben. Das Fehlen einer zusätzlichen Expression von tACE-Protein in den untersuchten Tumoren und IKZN kann nicht direkt demonstriert werden. Jedoch zeigte der Vergleich zwischen den Immunreaktivitäten der spezifischen Anti-sACE-mAk und Anti-ACE-mAk keine signifikanten Unterschiede und bestätigte sACE als die dominant exprimierte Protein-Isoform in den Keimzellneoplasien.

In der RT-PCR nach mRNA-Extraktion war neben der somatischen Form die tACE-mRNA in 11 von 18 Fällen nachweisbar. Die Detektion von tACE-mRNA kann in 7 Fällen durch die Miterfassung vereinzelter normaler Tubuli mit reifen Keimzellen am Tumorrand erklärt werden, nicht jedoch in 4 weiteren Fällen mit reinem Tumorgewebe in der histologischen Kontrolle (Tab. 9, Fälle 2, 3, 7 und 15). Die korrekte Beurteilung der mRNA-Expression eines Zelltyps ist mit der hier angewandten Methode der mRNA-Extraktion schwierig, da ganz verschiedene Zelltypen, in diesem Fall neben den Tumorzellen auch Endothel-, Leydig-, und normale Keimzellen in das Analyseergebnis eingehen.

In 4 Fällen mit Nachweis von tACE-mRNA in den Extrakten und 7 weiteren Fällen (Tab. 9) wurde die sc-RT-PCR nach UV-Laser assistiertem Cell Picking durchgeführt. In den Fallnummern 14, 18 und 22 ist in nur wenigen gepickten Zellen des IKZN ausschließlich die sACE-Isoform nachweisbar. In den untersuchten invasiven Tumoren ist mit Ausnahme eines Teratokarzinoms (Tab. 9, Fall Nr. 15) kein eindeutiger Nachweis von mRNA gelungen, was

vermutlich mit ihrer begrenzten Haltbarkeit in den für die sc-RT-PCR ausgesuchten Geweben zusammenhängt.

Tab. 9: Messenger-RNA und Protein der ACE-Isoformen in Keimzelltumoren

N	Diagnose	IH <i>Protein</i>		RT-PCR <i>mRNA</i>		sc-RT-PCR <i>mRNA</i>	
		sACE	tACE	sACE	tACE	sACE	tACE
1	Seminom & IKZN	+	-	+	-	n.d.	n.d.
2	Seminom	+	?	+	+	n.s.	n.s.
3	Seminom	+	?	+	+	n.s.	n.s.
4	Seminom*	+	-	+	+	n.d.	n.d.
5	EK	+	-	+	-	n.d.	n.d.
6	Seminom	+	-	+	-	n.d.	n.d.
7	Seminom	+	-	+	+	n.s.	n.s.
8	EK*	-	-	+	+	n.d.	n.d.
9	Seminom*	+	-	+	+	n.s.	n.s.
10	Seminom	+	-	+	-	n.d.	n.d.
11	Seminom & IKZN*	+	-	+	+	n.d.	n.d.
12	Teratokarzinom	+	-	+	-	n.d.	n.d.
13	Seminom & IKZN*	+	?	+	+	n.d.	n.d.
14	Seminom & IKZN*	+	-	+	+	+	-
15	Teratokarzinom	+	-	+	+	-	-
16	Seminom*	+	-	+	+	n.d.	n.d.
17	Teratokarzinom	+	-	+	-	n.d.	n.d.
18	Seminom & IKZN	+	-	+	-	+	-
19	Seminom & IKZN	+	-	n.d.	n.d.	n.s.	n.s.
20	EK	+	-	n.d.	n.d.	n.s.	n.s.
21	Seminom & IKZN	+	-	n.d.	n.d.	n.s.	n.s.
22	IKZN	+	-	n.d.	n.d.	+	-

*In der histologischen Kontrolle der Tumorpräparate neben dem jeweiligen Tumortyp mitergefasste normale Tubuli seminiferi; *EK*, embryonales Karzinom; ? zusätzliche Immunreaktion für tACE kann nicht sicher ausgeschlossen werden; *n.d.* nicht bestimmt; *n.s.* nicht erfolgreich.

4.3.2 ACE und GCAP in intratubulären Keimzellneoplasien (IKZN)

Alle 87 untersuchten IKZN exprimierten sACE und GCAP. In über 80% der Fälle fanden sich beide Marker homogen in allen intratubulären neoplastischen Zellen. Es ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede in der Immunreaktivität zwischen den beiden Anti-GCAP/PIAP-mAk P18-F6 und 8A9 in IKZN (Franke et al 2000). Der Vergleich zwischen einem inhomogenen und einem homogenen Expressionsmuster ($\leq 80\%$ versus $>81\%$) in IKZN mit der Differenzierung des benachbarten invasiven KZT zeigte jeweils für sACE und GCAP eine zwischen nicht-invasiven und invasiven KZT gleichartige Ausprägung der Expression, die nicht von der speziellen Tumordifferenzierung des KZT abhängig war (Tab. 10).

Tab. 10: Somatisches ACE und GCAP in IKZN

IKZN / Tumortyp	N	sACE (CG2)		GCAP (P18-F6)	
		51-80% inhomogen	>81% homogen	51-80% inhomogen	>81% homogen
IKZN / keinTumor	3	-	3	-	3
IKZN / Seminom	44	11	33	4*	39
IKZN / NSKZT	40	2	38	5	35

In einem Fall lag eine Expression von weniger als 50% vor. *NSKZT* nicht-seminomatöse Keimzelltumore.

Die statistische Analyse der Expression in IKZN der seminomatösen Tumoren im Vergleich zu der Expression in IKZN der nicht-seminomatösen Tumoren zeigte keine signifikanten Unterschiede ($p=0.592$ für sACE und $p=0.554$ für 8A9). Vielmehr korrelierte eine inhomogene Immunreaktivität des IKZN mit der reduzierten Marker-Expression im invasiven Tumor (Tab. 11). So ging eine inhomogene Immunreaktivität für sACE und GCAP in IKZN mit einer starken Reduktion der Expression in den Seminomen einher und resultierte in medianen IRS von 6 statt 12 für sACE und 2 statt 8 für GCAP. Dies zeigt, dass die Heterogenität der Marker-Expression eher auf eine frühe Instabilität der Marker-Expression in Tumoren hinweist als auf eine bestimmte, bereits in IKZN vorgezeichnete Tumordifferenzierung.

Tab. 11: Vergleich der Markerexpression in IKZN und invasiven Tumoren

<u>IKZN</u>	<u>ACE (CG2)</u>				<u>GCAP (P18-F6)</u>			
	<u>Seminom</u>		<u>EK</u>		<u>Seminom</u>		<u>EK</u>	
	N	mIRS	N	mIRS	N	mIRS	N	mIRS
<80% (inhomogene Expression)	11	6	2	1	5	2	2	4
81% (homogene Expression)	33	12	15	2	39	8	15	6

mIRS mediane IRS, *EK* embryonales Karzinom

4.3.3 ACE und GCAP in invasiven Keimzelltumoren

4.3.3.1 Seminome

Im Vergleich zu IKZN war die Immunreaktivität für sACE und GCAP deutlich reduziert in den invasiven Tumoren und variierte in Abhängigkeit von dem histologischen Typ, der Tumorprogression und der Gewebereaktivität der mAk. Von den untersuchten 91 klassischen Seminomen exprimierten 80 zumindest in mäßiger Ausprägung sACE (88%), ähnlich den beiden mAk für GCAP/PIAP (80% für 8A9 und 87% für P18-F6) (Abb. 10). Die zelluläre Expression von sACE-mRNA korrelierte in der *in situ* Hybridisierung mit der Protein-Lokalisation in der Immunhistochemie (Abb. 9D). Insgesamt waren die durchschnittlichen Expressionswerte von sACE und GCAP unter den Seminomen gleichermaßen stark ausgeprägt (mIRS jeweils 8), doch der relative Verlust der Expression im Vergleich zu IKZN war insgesamt deutlicher für GCAP. Fehlende oder schwache Expressionen für beide mAk gegen GCAP war in 10 Fällen, für anti-sACE-mAk CG2 in 11 Fällen nachweisbar. Ein Vergleich der Immunreaktivität für sACE und GCAP dieser 21 Fälle zeigte eine jeweils deutlich stärkere Expression des Markerproteins, d.h. die GCAP-negativen Tumoren exprimierten sACE und die sACE-negativen Seminome waren sicher positiv für GCAP (Abb. 11). In drei Metastasen der klassischen testikulären Seminome wurde eine schwache und inkonstante Immunreaktivität für GCAP, wohingegen sich sACE in diesen Tumoren deutlich positiver zeigte. Diese Befunde sprechen für eine differenzierte Tumorexpression von GCAP und sACE und in zumindest einem Teil der Fälle für eine Downregulation oder erhöhte Anfälligkeit von GCAP während der Tumorprogression. Anders als in den meisten klassischen Seminomen konnte weder GCAP noch sACE in den beiden untersuchten spermatozytären Seminomen gefunden werden. Non-Hodgkin-Lymphome und amelanotische

Melanommetastasen, die v.a. aufgrund ihrer morphologischen Ähnlichkeit mit den Seminomen verwechselt werden können, waren komplett negativ für das sACE.

4.3.3.2 Nicht-seminomatöse Tumoren (NKZN)

Deutliche Unterschiede wiesen dagegen die embryonalen Karzinome und andere NSKZT hinsichtlich der GCAP- und sACE-Expression auf. Unter den 58 embryonalen Karzinomen waren 15 Fälle komplett negativ für sACE, während die übrigen Tumoren eine inhomogene fokale Expression präsentierten (mIRS=2) und in den epithelialen Differenzierungskomponenten häufig eine polar betonte, luminal gerichtete Lokalisation von sACE zeigten. Eine fehlende Translation des Proteins (mRNA+, IH-) war gelegentlich zu beobachten, was weiterhin auf die Möglichkeit einer post-transkriptionalen Regulation von sACE hinweist (Abb. 9G). Im Gegensatz zu sACE war die Immunreaktivität für GCAP in den meisten EK konstant und in der überwiegenden Mehrheit der Tumorzellen vorhanden (mIRS=6) (Abb. 10).

Alle anderen untersuchten Tumortypen von NSKZT (Teratome, Choriokarzinome und Dottersacktumoren) exprimierten keine GCAP. In den Teratomen fand sich eine fokale und selektive Immunreaktivität für sACE in den mesenchymalen und epithelialen Tumorkomponenten. In den Fibroblasten und Endothelien zeigte sich hierbei eine der regulären sACE-Verteilung entsprechende Expression, wohingegen sACE in bestimmten Tumor-Epithelzellen nur gelegentlich vorkam. Hier wurden in Teratomen offenbar unterschiedliche epitheliale Differenzierungslinien durch sACE markiert (Abb. 9H). Selten und vereinzelt fanden sich schwach sACE-positive Tumorzellen in den 11 Choriokarzinomen und 4 Dottersacktumoren.

Abb. 9: Expression von sACE und GCAP in Keimzelltumoren

Immunhistologie und in situ-Hybridisierung von sACE-Protein und sACE-mRNA sowie Vergleich zu GCAP.

A u. B: Intratubuläre Keimzellneoplasie (IKZN). IH. Detektion von sACE mit mAk CG2 (A) und GCAP mit mAk 8A9 (B). **A:** Nicht neoplastisch veränderte Tubuli seminiferi mit Spermato gonien, Spermatozyten und Sertoli-Zellen sind negativ für das sACE (NT). SACE-Expression in zwei benachbarten Tubuli seminiferi durch neoplastische Keimzellen eines IKZN (Pfeile). Reguläre Expression von sACE in interstitiellen Leydig-Zellen und Gefäßendothelien. **B:** Markierung der IKZN durch GCAP im Folgeschnitt. A, B: x 120

C u. D: IKZN und Seminom. IH und ISH. Darstellung des sACE-Proteins mit mAK CG2: C/1, D/1. Detektion von sACE-mRNA mit DIG-markierten Sonden: (Sense) C/2, D/2; (Antisense) C/3, D/3. **C:** Neoplastische Zellen im Tubuluslumen exprimieren sACE-Protein und -mRNA, wohingegen darunterliegende Sertoli-Zellen und atrophische Keimzellen kein sACE aufweisen. **D:** sACE-positives Seminom mit Lokalisation der Expression im Bereich der Zytoplasmamembranen. C: x 480, D: x 120

E u. F: IKZN und Seminom. IH. Detektion von sACE mit mAk CG2 (E) und GCAP mit P18-F6 (F). **E:** Kräftige Immunreaktion für sACE in allen neoplastischen Zellen im Tubulus und im invasiven Tumor. **F:** Vergleich mit GCAP in einem Folgeschnitt zeigt ebenfalls GCAP-exprimierende IKZN und in unmittelbarer Nähe negative Tumorzellen des Seminoms. E, F: x 120

G u. H: Embryonales Karzinom (G) und Teratom (H). IH und ISH. IH mit CG2 (G/1, H). ISH mit DIG-markierten Sonden: (Sense) G/2, (Antisense) G/3. **G:** Embryonales Karzinom mit positivem Signal für sACE-mRNA aber ohne detektierbares sACE-Protein. Im Gegensatz zu negativen Tumorzellen exprimieren Kapillarendothelien sACE-Protein (G/1, Pfeil). **H:** Höher differenzierte Teratomanteile zeigen die Expression von epitheliale m sACE-Protein nur in bestimmten Epithel- bzw. Drüsenformationen. G: x 480, H: x 120



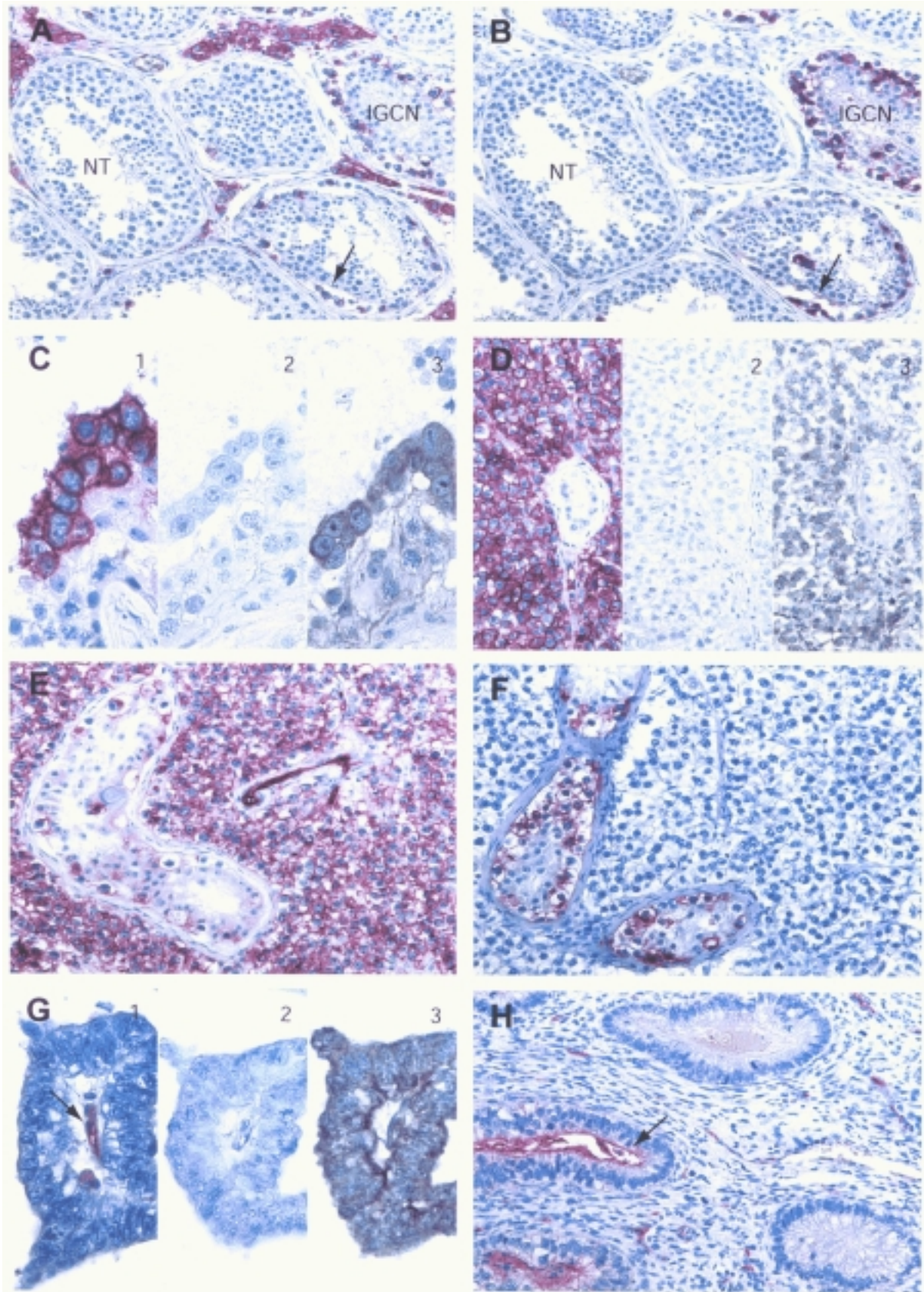


Abb. 9: Expression von sACE und GCAP in Keimzelltumoren

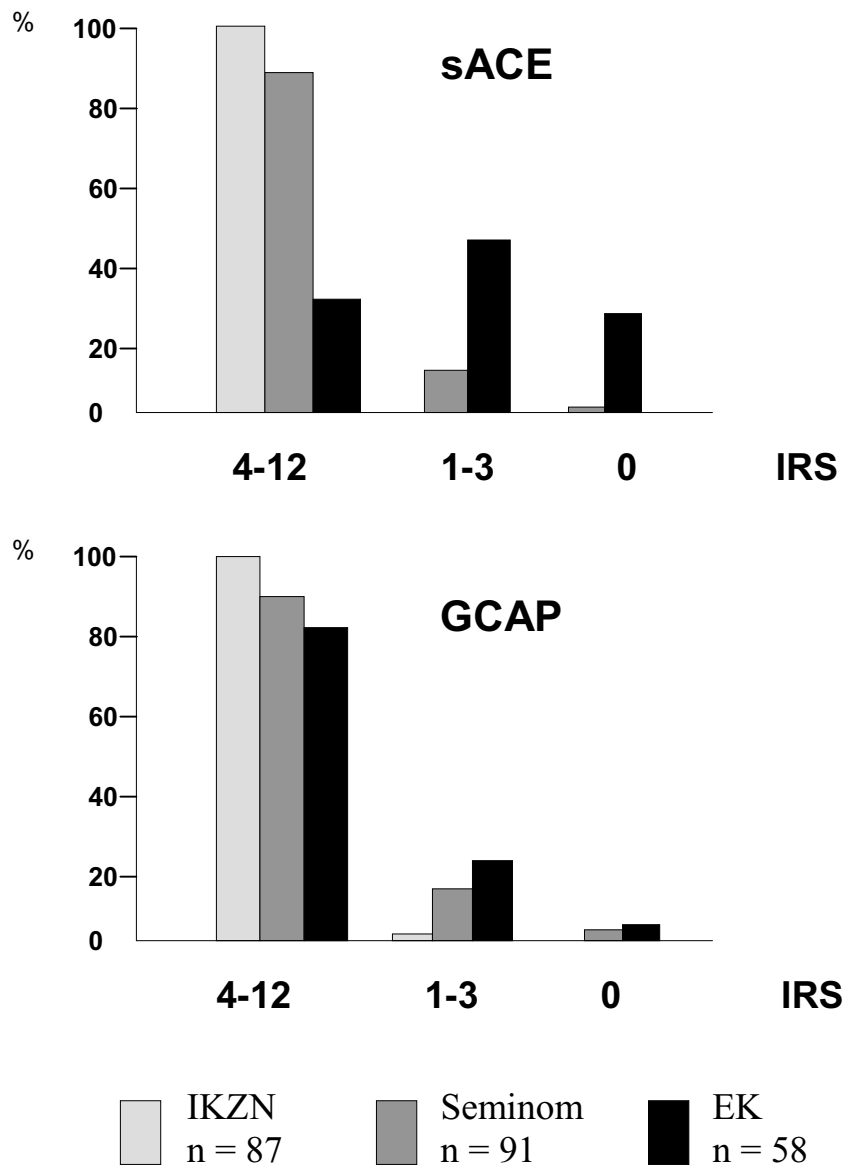


Abb. 10: Analyse der Expression von sACE und GCAP in Keimzelltumoren

Vergleich zwischen Expressionen von sACE (mAk CG2) und GCAP (mAk P18-F6) in IKZN, invasiven Seminomen und embryonalen Karzinomen. In IKZN und Seminomen noch ähnliche Verteilung von sACE und GCAP mit einer zumindest moderaten Expression in den meisten Fällen (IRS größer 4). In embryonalen Karzinomen zeigen die beiden Marker dagegen deutliche Unterschiede mit einem stark rückläufigen IRS für sACE und einer im Vergleich zu Seminomen nur gering veränderten GCAP-Expression.

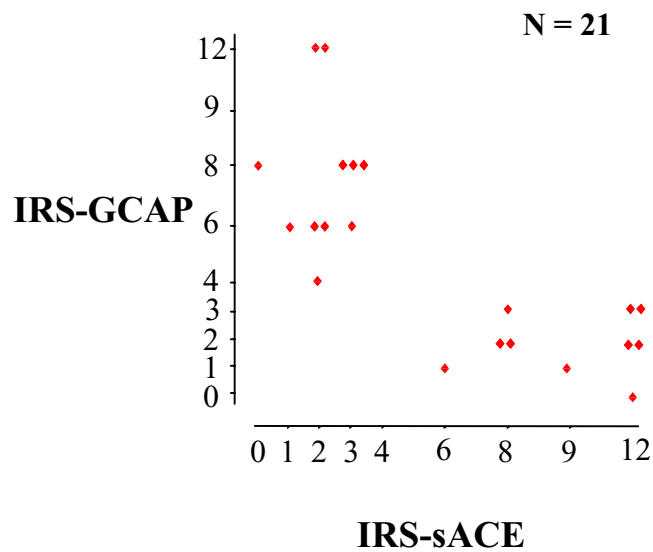


Abb. 11: Vergleich der Immunreaktivität von sACE und GCAP in Seminomen

Analysierte Seminome mit einer schwachen Immunreaktivität (IRS <4) für sACE oder GCAP. In 11 Fällen mit einer geringen Immunreaktivität für sACE findet sich eine deutlich stärkere Expression für GCAP (IRS>4). Umgekehrt zeigen die 10 Fälle mit einer schwachen Expression von GCAP (darunter drei untersuchte Seminom-Metastasen) deutlich sACE (IRS 6).

5 Diskussion

5.1 ACE-Expression im regulären Hoden

Die morphologischen Kenntnisse über die zelluläre Lokalisation von ACE-Isoformen in den testikulären Zellen waren bisher lückenhaft und zum Teil widersprüchlich. So wurde ACE mit biochemischen Methoden in der Sertoli-Zellkultur detektiert (Monsees et al. 1996), während andere kein ACE in den Sertoli-Zellen nachweisen konnten (Vivet et al. 1987, Sibony et al. 1993). Die immunhistochemische Unterscheidung der beiden ACE-Isoformen mit polyklonalen Ak ist schwierig, gerade im Hinblick auf das Auftreten beider Formen im Hoden und Nebenhoden und im Seminalplasma (Köhn et al. 1998a). Geprüft durch verschiedene Techniken kann nun eindeutig gezeigt werden, dass die regulären adulten Sertoli-Zellen tatsächlich kein ACE exprimieren (IH -, LACP -, ISH -). Nur prae natal wird vorübergehend in den Sertoli-Vorläuferzellen das sACE exprimiert, aber vermutlich auch in bestimmten pathophysiologischen Veränderungen, was den oben erwähnten positiven Kulturbefund erklären kann (Franke et al., submitted). Unter den verschiedenen Keimzellstadien der Praespermatogenese sind im Prinzip nur die mitotisch aktiven M-Prospermatogonien, daneben auch vereinzelte apoptotische Keimzellen im Tubuluslumen immunreaktiv für das sACE. Mit ihrer weiteren Differenzierung verlieren fetale Keimzellen zunehmend das Enzym, kindliche Keimzellen sind ACE-negativ. In Übereinstimmung mit anderen Arbeiten wird das somatische ACE im adulten Hodengewebe des Menschen ausschließlich in den Leydig- und Endothel-Zellen und das testikuläre ACE im intratubulären Kompartiment vorgefunden (Sibony et al. 1993, Pauls et al. 1999).

Das tACE-Protein wird in elongierenden und elongierten Spermatischen und in den abgeschnürten Residualkörperchen lokalisiert. Interessanterweise ist das Protein hier strikt an die luminalseitige Zone der reifenden Keimzellen gebunden. Der zwischen den Sertoli-Zellen eingebundene Spermienkopf bleibt frei von detektierbarer Immunreaktivität. Abweichend von der bisher im Spermischwanz und der Kopfreion lokalisierten Expression (Sibony et al. 1994, Köhn et al. 1998a) wird das tACE in der Folge nur im Hals und in der Mittelstückregion der Spermien vorgefunden (vgl. Abb. 4 und 5). Die Transkription von tACE beginnt bereits in den mittleren pachytänen Spermatozyten. Das mRNA-Signal nimmt in den späten pachytänen Spermatozyten an Stärke zu und kann noch in den runden

Spermatiden bis Stadium 3 detektiert werden, während die elongierenden Spermatiden frei von tACE-mRNA sind (Abb. 4 und 5).

Die stadienspezifische und zeitlich versetzte Expression von mRNA und Protein ist ein bekanntes Phänomen der Spermatogenese und wurde bereits für viele andere Gene nachgewiesen, z. B. Protamine und Transitionsproteine (Steger et al. 1998, Steger 1999). Die mRNA kann nur während bestimmter Reifungsschritte gebildet und translatiert werden, weil durch den Ersatz der Histone durch Protamine die DNA in den elongierenden Spermatiden kompakt verpackt wird und die Transkription jeglicher Gene sistiert. Durch stringente transkriptionale Regulation wird in einer limitierten Zeit genügend mRNA produziert und später während der Spermio-genese translatiert. Offenbar wird auch die tACE-mRNA zunächst gespeichert, da das Protein erst zeitlich versetzt in den runden und elongierenden Spermatiden erscheint. Die Transkription der tACE-mRNA wird durch die 8 bp lange palindrome CRE-box reguliert und ist in Genen für tACE, Protamine und Transitionsproteine der Bindungsort für den Transkriptionsaktivator CREM τ (Kessler et al. 1998). Die hormonelle Steuerung der tACE-Expression, die an hypophysectomierten Tieren demonstriert wurde (Velletri et al. 1985), ist wahrscheinlich durch das FSH vermittelt, da durch FSH in den pachytänen Spermatozyten und runden Spermatiden reprimierende Formen von CREM durch aktivierendes CREM τ ersetzt werden (Foulkes et al. 1993, Steger 1999). Das vorgefundene Expressionsmuster der mRNA der testikulären ACE-Isoform ergänzt logisch die bereits bestehenden Kenntnisse über die Transkription von tACE und die zellulären Regulationsmechanismen des hypophysären FSH.

Die translationale Regulation von tACE ist z. Z. noch nicht geklärt. In der Spermatogenese wird die Repression der mRNA durch verschiedene Proteine postuliert, die am poly-A-Schwanz oder an spezifische Sequenzen der RNA binden können (Steger 1999). Kürzlich wurde am Beispiel der Protamine demonstriert, dass der Einsatz geeigneter Techniken zur näheren Charakterisierung von Regulationsmechanismen der Genexpression in der Spermatogenese beitragen kann (Steger et al. 2000). Aus dieser Perspektive und im Hinblick auf seine vermutlich kritische Rolle für die Fertilität sind auch für das tACE in näherer Zukunft weitere Erkenntnisse zu erhoffen.

5.2 ACE-Expression im regulären Nebenhoden

Im Caput und Corpus des Nebenhodens durchlaufen die Spermien einen Reifungsprozeß, der mit einer Reihe von physiologischen, biologischen und morphologischen Veränderungen verbunden ist, welche für die physiologische Fertilisierung notwendig sind. Die den Hoden verlassenden Spermien sind unbeweglich. Bei der Passage durch die Epididymis akquirieren sie die Fähigkeit zur Motilität und zum physiologischen Bewegungsablauf. Die Grundvoraussetzungen für diese Spermienmodifikationen sind die Herstellung eines geeigneten Flüssigkeitsmilieus vom Nebenhodenepithel durch Resorption von Wasser und aktive Veränderung der Ionenkonzentration (Hinton und Palladino 1995, Nieschlach und Behre 2000). Das lokal im Nebenhoden exprimierte RAS nimmt möglicherweise an der Regulation dieser für das Heranreifen der Spermien notwendigen epididymalen Wasser- und Anionensekretion teil, da Angiotensin II in der Zellkultur die Anionensekretion in den Epididymisepithelien stimuliert und AT-Rezeptoren in den basalen Zellen in verschiedenen Abschnitten des Nebenhodens lokalisiert werden (Leung et al. 1997 und 1998, Wong et al. 1990).

In diesem Zusammenhang ist die präzise Lokalisation von ACE im Nebenhodentrakt wichtig. In den vorausgegangenen Studien wurde das testikuläre ACE als die dominante ACE-Isoform des Seminalplasmas angesehen, die den Spermien die Fähigkeit zur Selbstregulation ihrer Mikroumgebung verleiht (Wong und Uchendu 1990). Die sACE-Expression von den Nebenhodenepithelien war zwar bekannt, jedoch nicht für die Hauptaktivität von Seminalplasma-ACE verantwortlich gemacht worden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eindeutig, dass auch das somatische ACE in größeren Mengen in das Seminalplasma gelangt. Das sACE wird hierbei offenbar im Nebenhodenkopf massiv vom Epithel der Ductuli efferentes gebildet und in das Seminalplasma in Form kleiner Vesikel abgegeben. Dagegen ist in der proximalen Region des Ductus epididymidis das Stereozilien-tragende Epithel frei von detektierbarem sACE. Erst im Corpus findet sich das Protein erneut in den Hauptzellen des pseudo-stratifizierten Epithels wieder. Die polare und auf den Stereozilienbesatz ausgerichtete Expression setzt sich kontinuierlich in der Caudaregion und im Ductus deferens fort. Dieses eigentümliche Verteilungsmuster des ACE im Nebenhoden bestätigt die noch als unsicher geltenden immunhistologischen Befunde einer anderen Arbeitsgruppe (Vitet et al. 1987). Deckungsgleich zur Protein-Expression findet sich auch das mRNA-Signal (ISH + , LACP +). Die differenziert erfolgende Expression in Epithelien

entlang des Nebenhodenganges hängt vermutlich mit unterschiedlichen Funktionen der jeweiligen Epitheltypen zusammen. Die einzelnen Spezifitäten der Nebenhodenepithelien sind bislang noch nicht eindeutig identifiziert worden. Ihre molekularen Besonderheiten sind erst in Anfängen bekannt (Kirchhoff 1998). Ultrastrukturelle Untersuchungen deuten jedoch auf eine unterschiedliche funktionelle Ausrichtung abhängig vom Epitheltyp. So ist das Epithel der Ductuli efferentes reich an Mitochondrien, während das pseudo-stratifizierte Epithel des proximalen Nebenhodenganges viele Endozytose-Vesikel und einen prominenten Golgi-Apparat enthält (Moore und Smith 1988, Vendrely and Dadoune 1988, Yeung et al. 1991). Zudem existiert keine strikte Trennung der verschiedenen Epitheltypen des insgesamt sehr komplexen Netzwerkes des tatsächlich aus mindestens fünf unterschiedlichen Epitheltypen zusammengesetzten Nebenhodenganges (Yeung et al. 1991). Das somatische ACE wird in der vorliegenden Arbeit typischerweise in kurz-ziliären Zellen, wie den der Ductuli efferentes und des Nebenhoden-Corpus und der Cauda nachgewiesen, nicht jedoch in dem mit langen Stereozilien besetzten Epithel des Nebenhodenkopfes. Möglicherweise dient sACE im kurz-ziliären Epithel der Resorption und der Aufrechterhaltung einer bestimmten Anionen-Komposition in Corpus und Cauda, während das Kopfepithel des Ductus epididymidis offenbar andere Funktionen, wie z.B. die Glykosylierung von epididymalen Proteinen wahrnimmt (Moore und Smith 1988).

Der Befund der untranslatierten sACE-mRNA im Nebenhoden ist neu. Messenger-RNA der somatischen ACE-Isoform fand sich im gesamten Epithel des Rete testis, ferner in verschiedenen Nebenhodenabschnitten in den zwischen Haupt- und Basalzellen eingestreuten Histiocyten (IH -, ISH + , LACP +, Abb. 6), während das korrespondierende Protein diesen Zellen fehlte. Dieses Phänomen ist aus der Spermiogenese bekannt (Steger 1999, Steger et al. 2000) und kann die selektive zelluläre Vorratshaltung von mRNA im Epithel von Nebenhoden und Rete testis erklären, welche in dem komplexen Gewebeverbund auch Sinn machen würde.

Durch die Blut-Hoden- und Blut-Nebenhoden-Schranken sind Keimzellen vor dem Auslösen einer Autoimmunreaktion geschützt. Diese Schranken werden durch *tight junctions* der Sertoli-Zellen und des Nebenhodenepithels gebildet, wobei der Epithelverband im Nebenhoden jedoch weniger undurchlässig ist. Damit es unter physiologischen Bedingungen zu keiner Antispermienreaktion kommt, existieren im Nebenhoden weitere Abwehrmechanismen. So lassen sich intraepitheliale Makrophagen ultrastrukturell und

immunhistologisch nachweisen (Wang und Holstein 1983, Yeung et al. 1994). Aktivierte Makrophagen, die bekanntermaßen sACE exprimieren (Georg 2000), finden sich zahlreich im Lumen aufgeweiteter Nebenhodengänge bei okklusiver Azoospermie (Franke, persönliche Mitteilung). In diesem Zusammenhang und gestützt durch eigene Befunde, die die Immunreaktivität für Makrophagen-Marker in der Zwischenzellschicht bestätigen, kann das Vorliegen der sACE-mRNA durch mRNA-Lagerung in den ruhenden Makrophagen gut erklärt werden, um normalerweise nur langsam nachgebildete mRNA bei Bedarf sofort translatieren zu können.

Ähnlich kann die Expression von untranslatierter sACE-mRNA im Epithel des Rete testis (IH -, ISH +, LACP +, Abb. 6) interpretiert werden, was im Hinblick auf die unklare Herkunft und Funktion dieses Epithels allerdings noch spekulativ ist. Kürzlich wurde aufgrund von strukturellen und morphologischen Untersuchungen postuliert, dass Rete-Epithelien modifizierte Sertoli-Zellen darstellen (Holstein und Davidoff 2000). Alternativ kann man sich die Keimdrüse analog zu übrigen Drüsen vorstellen. Hierbei würden die Tubuli seminiferi dem klassischen Drüsenazinus, das Rete testis bereits dem Kompartiment des Ausführungsganges entsprechen. Aus diesen anatomisch-morphologischen Gründen ist zu vermuten, dass ein Zusammenhang zwischen dem Rete- und Efferentes-Epithel besteht und dass das Rete-Epithel den Regenerationspool für das Efferentes-Epithel darstellt. In großen Mengen im Rete testis vorgebildete sACE-mRNA könnte so mit der Umdifferenzierung vom Rete- in Efferentes-Epithel rasch und effizient in das hier benötigte sACE-Protein umgewandelt werden.

5.3 Funktionelle Bedeutung von ACE im regulären Hoden

Wie bereits in den einleitenden Abschnitten ausgeführt, ist ACE physiologisch als unspezifische Dipeptidylpeptidase in den allgemeinen Peptidmetabolismus und speziell durch Erzeugung sowie Degradation biologisch hoch wirksamer Peptidhormone unmittelbar an humoral und parakrin vermittelten Regulationsprozessen beteiligt. ACE ist ein zentral wirksames Enzym der lokal im Hoden und Nebenhoden agierenden Kallikrein-Kinin- und Renin-Angiotensin-Systeme (Ehlers et al. 1989b, Schill et al. 1992). Die Expression der RAS- und KKS-Komponenten wird gerade in letzter Zeit besonders intensiv untersucht. So wurde der B₂-Rezeptor in Sertoli-Zellen (Monsees et al. 1999), der AT₁-Rezeptor in Leydig-Zellen, Spermatogonien und ejakulierten Spermien nachgewiesen (Kitami et al. 1992, Paxton et al.

1993, Vinson et al. 1995, Sabeur et al. 2000). Es wird vermutet, dass Aktivierung des AT-Rezeptors der Leydig-Zellen zu einer verminderten Freisetzung des Testosterons führt (Parmentier et al. 1983, Pandey et al. 1986, Speth et al. 1999).

Da die Wirkungsmechanismen der KKS und RAS im Hoden- und Nebenhoden bis heute nicht bekannt sind, bleibt die funktionelle Bedeutung von ACE nach wie vor ungeklärt. Sie wird in verschiedenen Punkten kontrovers diskutiert. Da im Seminalplasma vorhandenes Bradykinin die Spermienmotilität *in vitro* erhöht, könnte das ACE durch Abbau von Bradykinin dessen Effekten entgegenwirken und negative Auswirkungen auf die Spermienmotilität haben (Schill und Miska 1992). Kallikrein, das als Gegenspieler von ACE die Bradykinin-Konzentration erhöht, wird zur Stimulation der Spermienmotilität seit ca. 15 Jahren in der Behandlung der idiopathischen Infertilität eingesetzt. In neueren kontrollierten und randomisierten Studien wurde jedoch keine Verbesserung der Fertilität durch Kallikrein festgestellt (Nieschlach und Behre 2000). Auch die Verabreichung von ACE-Hemmern zur Inhibition des Bradykinin-Abbaus erwies sich in einer randomisierten Doppelblind-Studie als unwirksam für die Behandlung der Infertilität und führte wider Erwarten nicht zur Erhöhung der Schwangerschaftsrate (Schill et al. 1994). Die Unwirksamkeit der ACE-Hemmer-Therapie für die Verbesserung der Spermienmotilität via stimulierendes Bradykinin könnte zwei Ursachen haben. Zum einen kommen in den Tubuli seminiferi und im Seminalplasma neben dem ACE auch andere Kininasen vor, die biochemisch sehr effektiv Bradykinin umsetzen (Erdos et al. 1985, Siems et al. 1991, Monsees et al. 1999). Zum anderen haben ACE-Inhibitoren beim Menschen keinen nachgewiesenen Effekt auf die Spermienfunktionen aufgrund der funktionellen Isolierung und Kompartimentierung von Hoden und Nebenhoden durch die Blut-Hoden- und Blut-Nebenhoden-Schranken (Jackson et al. 1988). Daher ist die funktionelle Auswirkung der Degradation von Spermien-stimulierendem Bradykinin durch ACE unwahrscheinlich.

Andererseits wurden *in vitro* stimulierende Effekte von Angiotensin II auf die Spermienmotilität nachgewiesen (Vinson et al. 1996, Müller et al. 2000). ACE-Hemmer neutralisieren diese Wirkungen und führen nach Zugabe zu humanem Ejakulat zu reduzierten Akrosomreaktion, Spermienmotilität und Penetration der Oozyten (Köhn et al. 1995, Vinson et al. 1996). Die AT₁-Rezeptorblockade in den ejakulierten Spermien führt zu gleichartigen Effekten. *In vivo* zeigen Spermien von oral mit ACE-Hemmern behandelten Ratten eine verminderte Spermienmotilität und Zona-Pellucida-Penetration (Saha et al. 2000).

Aktivierung der Kapazitations-Prozesse und der Akrosomreaktion wird für den AT₁-Rezeptor analog zu dem gut charakterisierten FF-Peptiden (Fertilization-promoting Peptide) durch Freisetzung von cAMP und intrazellulärem Ca²⁺ postuliert (Fraser et al. 2001).

Bei der Maus spielt die testikuläre ACE-Isoform eine entscheidende Rolle für die Fertilität. Die Ursache der Infertilität der tACE-defizienten Tiere liegt aber nicht in einer Änderung der Spermienparameter im Ejakulat, sondern in der fehlenden Eileiterpassage der normal motilen Spermien (Hagaman et al. 1998). Auch andere Studien bestätigen die Vermutung, dass die Wirkung von testikulärem ACE nicht auf Angiotensin II basiert, da die knock-out-Tiere, denen das Angiotensin II fehlt, eine normale Fertilität aufweisen (Tanimoto et al. 1994, Kim et al. 1995). Ob durch Angiotensin II die entscheidende Rolle der testikulären ACE-Isoform für die Fertilität beim Tier vermittelt wird, oder durch bislang unbekannte Substrate, und ob das tACE auch beim Menschen unverzichtbar für die Fertilität ist, bleibt unklar. Fakt ist, dass das tACE beim Menschen und verschiedenen Tierspezies in der Spermatogenese ähnlich exprimiert wird und die in der Spermatogenese verbreitete stadienspezifische und differenzierte mRNA- und Protein-Expression auch für das humane tACE gültig ist.

Vermutlich werden durch ACE-Isoformen ganz verschiedene zelluläre Funktionen ausgeführt, die durch Bradykinin- und Angiotensin-Rezeptoren in Wirkung treten, möglicherweise aber auch über andere Mechanismen. So wurde das Tetrapeptid AcSDKP, ein wirksamer Inhibitor der Zellteilung von hämatopoetischen Stammzellen, kürzlich in hoher Konzentration im Hodeninterstitium der Ratte mit Wirkung auf die Proliferation von A-Spermatogonien nachgewiesen (Stephan et al. 2000). Möglicherweise unterliegen auch die Keimzellen einer lokalen AcSDKP-Wirkung, die durch die Degradation des AcSDKP mittels tACE der heranreifenden Spermien aufgehoben werden kann.

5.4 ACE als Marker neoplastischer Keimzellen

Neoplastisch transformierte Keimzellen weichen von den vorgefundenen regulären Expressionsmustern ab, indem sie die somatische ACE-Isoform exprimieren (Pauls et al. 1999). Sowohl das sACE-Protein als auch die sACE-mRNA werden konstant in den IKZN und Seminomen detektiert. Die in der sc-RT-PCR und ISH erzielten Ergebnisse korrelieren mit dem immunhistochemischen Befund und bestätigen das somatische ACE als die dominant exprimierte Isoform in neoplastischen Keimzellen. Zusätzlich kann tACE-mRNA in wenigen

Fällen vorgefunden werden, während das Protein der testikulären ACE-Isoform aber nicht eindeutig nachweisbar ist. Dieser Befund beruht vermutlich auf Fehlern der unter physiologischen Bedingungen stringenten Kontrolle des tACE-Promotors in den transformierten neoplastischen Keimzellen (Pauls et al. 1999). Möglicherweise wird die transkribierte mRNA lediglich gespeichert und nicht notwendigerweise translatiert, ein Phänomen, das auch für das sACE in embryonalen Karzinomen und physiologischerweise im Rete testis- und Epididymis-Epithel demonstriert werden kann (Abb. 6 und 7).

Andererseits wird durch die vorliegende Arbeit die Expression von sACE in den regulären Tubuli seminiferi weitgehend ausgeschlossen. Vielmehr erweist sich das sACE als ein zuverlässiger Marker von neoplastischen Keimzellen der IKZN und Seminome (Franke et al. 2000). In allen 87 untersuchten IKZN findet sich sACE in der Mehrheit der neoplastischen Zellen. Wenngleich das sACE hier z.T. inhomogener als GCAP exprimiert wird, ist seine Anwendung für die Diagnostik der lichtmikroskopisch nicht immer leicht zu erkennenden IKZN hilfreich. Auch in den Seminomen ist die Immunreaktivität für sACE und GCAP ähnlich verteilt, mit einer zumindest moderaten Expression in 88% der Fälle für das sACE und in 80 bis 87% der Fälle für PIAP/GCAP. Dagegen sind die Immunreaktionen in den NSKZT unterschiedlich ausgeprägt. Während in der Mehrheit der embryonalen Karzinome GCAP konstant exprimiert wird und die Immunreaktivität hier sich kaum gegenüber Seminomen abhebt, ist sACE nur fokal in den somatisch differenzierten Zellen der embryonalen Karzinome oder Teratome vorhanden (Abb. 10).

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse für GCAP (mit z. T. noch nicht publizierten mAk) sind deckungsgleich mit früheren Studien, in denen polyklonale Ak verwendet wurden (Burke und Mostofi 1988, Jacobsen et al. 1984, Niehans et al. 1988). Trotz einer starken Immunreaktivität in den meisten Seminomen werden auch solche mit einer geringen oder fehlenden Expression dokumentiert. In dem untersuchten Tumorkollektiv von 91 Seminomen sind 10 nur sehr schwach positiv für GCAP. Andererseits wird eine geringe oder fehlende Expression von sACE in 11 weiteren Fällen vorgefunden. In diesen Tumoren kann aber die diagnostische Lücke des einen Markers durch die Immunreaktion des anderen Markers geschlossen werden (Abb. 11). So kann die offenbar unterschiedliche Regulation von sACE und GCAP zur sicheren Erkennung von Seminomen selbst in schwierigen Fällen mit nicht eindeutiger Immunreaktion genutzt werden.

Die spermatozytären Seminome unterscheiden sich in klinischen, morphologischen und molekularen Kriterien von den klassischen Seminomen (Eble 1994). Dennoch ist die histologische Abgrenzung dieses Seminomtyps schwierig. Zwei untersuchte Seminome dieses Typs sind komplett immunonegativ, sowohl für die beiden ACE-Isoformen als auch für GCAP, womit der besondere Status dieser Tumoren unterstrichen und die richtige Diagnosestellung durch Immunhistochemie erleichtert werden kann. Nicht unbedeutend für den Pathologen ist auch das Problem der Abgrenzung von typischen Seminomen und hochmalignen Lymphomen. Aus dieser Sicht ist die fehlende Expression von ACE in den allermeisten malignen Lymphomen ebenfalls vorteilhaft für die differentialdiagnostische Routinearbeit.

5.5 ACE in der Pathogenese der KZT

Testikuläre Keimzelltumoren treten in der durchschnittlichen männlichen Population zwar selten auf, sind jedoch die häufigsten Malignome junger Männer. Sie werden hauptsächlich in der dritten und vierten Lebensdekade diagnostiziert. Die intratubuläre Keimzelleoplasie (IKZN, CIS), zuerst 1972 von Skakkebaek beschrieben, ist heute als Ursprung der invasiven testikulären KZT allgemein akzeptiert (Skakkebaek 1972, Skakkebaek et al. 1987, Giwercman et al. 1988, Oosterhuis et al. 1993). Eine Ausnahme bildet das spermatozytäre Seminom, welches sich nicht von der IKZN, sondern vermutlich von den adulten Keimzellen des Typs der B-Spermatogonie ableitet (Looijenga et al. 1998). Gestützt auf verschiedene epidemiologische, klinische und morphologische Beobachtungen wird z. Z. eine bereits in der pränatalen Entwicklungsperiode determinierte KZT-Genese postuliert. Erhöhte Östrogenexposition während der Schwangerschaft, gonadale Dysgenese, familiäre Prädisposition und testikuläre Atrophie sind nachweislich Risikofaktoren für die Entwicklung von KZT (Looijenga und Oosterhuis 1999). Als ein weiterer Hinweis auf die frühe Entstehung der Keimzelleoplasien wird die Expression von verschiedenen antigenen Markern für KZT wie M2A, TRA-1-60 und 43-9F und definierten Molekülen, z.B. GCAP und c-kit-Protein von den normalen embryonal-fetalen Keimzellen interpretiert (Bailey et al. 1991, Rajpert-De Meyts et al. 1994, Rudolph et al. 1999). Vorausgegangen Studien zufolge wird GCAP bereits während der frühen embryonalen Entwicklungsperiode in den ersten Differenzierungsstufen der Geschlechtszellen, den primordialen Keimzellen, exprimiert. Nach der 9. Entwicklungswoche soll die Immunreaktivität für GCAP während der fetalen

Entwicklung rapide zurückgehen und in Prospermatogonien nur geringfügig nachweisbar sein (Jorgensen et al. 1995).

In Übereinstimmung mit früheren Studien wird in der vorliegenden Arbeit das Vorkommen von GCAP in der pränatalen Hodenentwicklung bestätigt. Auch das somatische ACE wird im regulären fetalen Hoden demonstriert (Pauls et al. 1999). Jedoch erweisen sich tatsächlich nicht die in der Literatur beschriebenen primordialen Keimzellen, sondern die regulär und vorwiegend im zweiten Trimenon aus den primordialen Keimzellen differenzierten M-Prospermatogonien als immunreaktiv sowohl für GCAP als auch sACE. Die quantitative maximale Expression beider Marker wird während der Proliferationsphase der M-Prospermatogonien zwischen der 18. und 22. Woche erreicht. Spätere Differenzierungsstufen, T-Prospermatogonien und Stamm-Spermatogonien, verlieren die Fähigkeit zur sACE- und GCAP-Expression. Im Prinzip ist die Expression beider Marker auf die fetale Periode beschränkt. Die direkte pränatale Transformation einer fetalen Keimzelle in eine Tumorzelle während dieser Periode ist zwar möglich, jedoch bei der langen Latenzzeit bis zum Jugend- und Erwachsenenalter kaum denkbar. Andererseits könnte durch eine allgemeine Störung des Hodengewebes während der fetalen Phase ein von der regulären Entwicklung abweichendes Milieu geschaffen werden. Dieses schädigende Milieu würde die Entstehung von unkontrollierten Transformations- und Progressionsprozessen begünstigen, welche sich z.B. in der fokalen Persistenz von Tubuli seminiferi mit fetalen Zellcharakteristika zeigen könnten (Kliesch et al. 1998). Dadurch könnten sich Keimzellen dem normalen Reifungsprozeß entziehen und nach einer langen Persistenz durch bislang unbekannte Promotionsstimuli während der sensiblen Proliferationsphasen wie der Pubertät und der adulten Spermatogenese einen malignen Phänotyp erwerben.

Die Progression der IKZN zu invasiven Tumoren ist zwar im allgemeinen gesichert, ihre pathogenetische Beziehung zu den Seminomen und nicht-seminomatösen KZT ist jedoch noch unklar. Hierzu werden zwei Modelle vorgeschlagen. In dem älteren Modell sind seminomatöse und nicht-seminomatöse Differenzierungslinien von Anbeginn getrennt, womit alle histologischen Varianten der adulten KZT direkt aus IKZN entstehen, während das andere, aktuellere Modell eine primäre Beziehung von IKZN zu den seminomatösen Keimzelltumoren und das Seminom als ein Intermediärstadium zwischen IKZN und den verschiedenen nicht-seminomatösen KZT vorschlägt. Nach dem letzteren, linearen Modell ist das Auftreten von embryonalen Karzinomen oder anderen Tumoren einer nicht-seminomatösen Differenzierung nur eine fakultative Potenz, die in jeder Entwicklungsstufe

eines primär seminomatösen Keimzelltumors auf der Stufe des IKZN, eines klassischen Seminoms (Kombinationstumoren) oder sogar auf dem Boden von Seminometastasen auftreten kann (Damjanov 1993).

Tatsächlich sind mindestens 15% aller KZT Kombinationstumoren, bestehend aus seminomatösen und nicht-seminomatösen Komponenten (Looijenga et al. 1999). Verschiedene zytomorphologische Studien, die auf chromosomalen Analysen sowie morphologischen und klinischen Daten beruhen (z.B. die Identifizierung von Seminomen mit nichtseminomatösen Charakteristika und das Auftreten von nicht-seminomatösen Metastasen von primär reinen Seminomen), favorisieren das lineare Modell der Tumorentwicklung (Oosterhuis et al. 1989 und 1993, Looijenga et al. 1999). Andere immunhistochemische Arbeiten dagegen stellen eine Heterogenität der Markerexpression in IKZN und eine Beziehung zu histologischen Tumortypen fest und interpretieren sie als eine frühe Instabilität von IKZN bei der bereits intratubulär stattfindenden Differenzierung zu den Seminomen oder NSKZT (Rajpert-De Meyts et al. 1996, Skakkebaeck et al. 1998).

Aus dieser Sicht ist eine gezielte Analyse der Expression von neuen Tumorzellmarkern wie sACE besonders interessant. Die Mehrheit der IKZN und der Seminome exprimieren zumindest in mittelgradigem Ausmaß sACE, aber nur fokal findet sich eine Immunreaktion in embryonalen Karzinomen. In den NSKZT erscheint die Expression zudem weniger als Residuum des IKZN-Vorläufers, sondern eher als ein erworbenes Differenzierungsmerkmal (Abb. 3). Die Expression von sACE in Seminomen erinnert an die der IKZN, wohingegen schwache Immunreaktivität nicht-seminomatöser Tumoren deutlich mit der starken Reaktion parallel vorliegender IKZN kontrastiert. Diese Unterschiedlichkeit in der Expression ist für sACE viel deutlicher im Vergleich als für GCAP, die weitaus homogener in den embryonalen Karzinomen verteilt ist. Zudem steht die Heterogenität einer sACE- und GCAP-Expression in IKZN in keiner erkennbaren Verbindung zu der terminalen Differenzierung des invasiven Keimzelltumors, korreliert dagegen aber mit einer allgemeinen Abnahme der Expression im invasiven Tumoranteil. Dies spricht für eine frühe Instabilität der Expression, die sich dann im invasiven Tumor fortsetzt, aber nicht für die These, IKZN seien pathogenetisch frühzeitig determiniert. Vielmehr unterstützen die vorliegenden Befunde das lineare Tumorentstehungsmodell und lassen im Zusammenhang mit verschiedensten chromosomalen und morphologischen Befunden zunehmend erkennen, dass das klassische Seminom des Menschen der pluripotenten IKZN sehr nahe steht und dass im biologischen Sinne die

intratubuläre Keimzellneoplasie tatsächlich ein "Seminoma in situ" darstellt (Bailey et al. 1991).

5.6 Funktionelle Bedeutung von ACE in Keimzelltumoren

Vor dem Hintergrund der selbst in normalen Keimzellen noch nicht verstandenen Rolle des ACE ist eine Abschätzung seiner Funktion in der Hodenentwicklung und den testikulären KZT sicher schwierig. Es ist jedoch denkbar, dass das reichlich in den fetalen und neoplastischen Keimzellen exprimierte sACE verschiedene Funktionen erfüllt. Eine Regulation von Differenzierungsprozessen während der testikulären Entwicklung ist möglich, insbesondere im Zusammenhang mit einer differenzierten Expression der AT₂-Rezeptoren während der Hodenentwicklung (Kanehara et al. 1998, Hirai et al. 1998).

Theoretisch ist auch ein Einfluß des haematopoetischen Regulatorpeptids AcSDKP auf germinale Differenzierungsprozesse möglich und im Hinblick auf die Ähnlichkeiten zwischen den haematopoetischen Stammzellen, den totipotenten fetalen Keimzellen und den intratubulären neoplastischen Zellen sogar wahrscheinlich (Donovan et al. 1998). In der embryonalen Gonadenentwicklung proliferieren zunächst die PGCs vor ihrer Differenzierung zu den Prospermatogonien. In den männlichen Gonaden treten die PGCs dann in eine Ruhephase ein, während der sie sich in der G₁-Phase befinden. Vorausgesetzt, dieser Proliferationsstop wird durch AcSDKP verursacht oder mitbeeinflusst, kann die nächste Proliferationswelle der männlichen Gameten auf der Differenzierungsstufe der M-Prospermatogonien durch die Expression von sACE in diesen Zellen erklärt werden. Die neoplastischen Keimzellen würden ebenfalls das sACE nützen, um sich von den proliferationsnegativen Einflüssen des AcSDKP zu entziehen und auf diese Weise ungehemmt zu teilen. Zudem besteht über die lokale AcSDKP-Degradation, neben der bekannten Überexpression des Wildtyp-p53 (Lutzker und Levine 1996, Heidenreich et al. 1998), eine weitere Erklärung für die Sensibilität der seminomatös differenzierten Tumorzellen und IKZN gegenüber Bestrahlung und Chemotherapie (Franke et al. 2000). Letzlich kann zu gegenwärtigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass auch durch sACE gebildete Angiotensine und Kinine parakrin Einfluss auf Differenzierung und Proliferation von Keimzelltumoren nehmen.

6 Zusammenfassung

Angiotensin-Converting Enzym (ACE, CD143) ist eine in Mensch und Tier wichtige Zn^{2+} -Metallopeptidase, die insbesondere über den Metabolismus von Angiotensinen und Kininen in die hormonelle und parakrine Regulation verschiedener Organ- und Zellfunktionen eingebunden ist. Nur im adulten Hoden finden sich die beiden bekannten Isoformen des Enzyms, wobei die somatische Isoform (sACE) ubiquitär im Körper exprimiert wird, die testikuläre Isoform (tACE) dagegen nur in reifenden Keimzellen vorkommt und für die Fertilität im Tiermodell entscheidend ist. Über die zelluläre Verteilung der ACE-Isoformen im menschlichen Hoden und Nebenhoden sowie in Keimzelltumoren (KZT) ist allerdings nur wenig bekannt, die Hodenentwicklung wurde bzgl. ACE noch nicht untersucht. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, die Expression und Verteilung von ACE im unteren männlichen Reproduktionstrakt, im Laufe seiner Entwicklung, in der Spermatogenese und in den verschiedenen KZT des adulten Mannes zu studieren.

Die ACE-Isoformen wurden durch kombinierten Einsatz von Immunhistologie (IH), *in-situ*-Hybridisierung (ISH) und PCR/RT-PCR detektiert und charakterisiert. Für ihren Nachweis auf Protein- und mRNA-Ebene wurden 9 definierte monoklonale Antikörper, speziell generierte c-RNA-Sonden und verschiedene Intron-spannende Primer eingesetzt. Alle Untersuchungen unterlagen einer strengen histologischen Kontrolle, wobei die zelluläre Spezifität der RT-PCR-Analysen durch UV-Laser assistiertes Cell-Picking (LACP) garantiert wurde. Insgesamt gingen Frischgewebe von 37 Patienten (29 Keimzelltumoren, 8 normale Hoden und Nebenhoden) und Paraffin-eingebettete Gewebe von 23 fetalen und frühkindlichen Hodenentwicklungsstufen (8. SSW bis Pubertät), 162 KZT-Patienten, 20 Fällen mit regulärer Spermatogenese und normalem Nebenhodengewebe sowie 28 Tumorkontrollen in die Analysen ein. Unter Berücksichtigung verschiedener Tumordifferenzierungen in 33 Kombinationstumoren wurden 91 klassische und 2 spermatozytäre Seminome, 58 embryonale Karzinome, 32 Teratome, 11 Choriokarzinome und 4 Dottersacktumoren untersucht. Darüber hinaus ließen sich in 87 Fällen intratubuläre Keimzellneoplasien (IKZN), die Vorläufer-Läsionen invasiver KZT, parallel zu den invasiven KZT analysieren. Die Keimzell-alkalische Phosphatase (GCAP) diente in allen Tumoranalysen als immunhistologische Kontrolle und Vergleichsmaß.

Die testikuläre Isoform des ACE wurde in allen analysierten Fällen nur im adulten menschlichen Hoden detektiert und hier ausschließlich in reifenden Keimzellen. Protein und mRNA dieser Isoform zeigten sich in der Spermiogenese stadienspezifisch und zeitlich versetzt exprimiert. Während ihre Transkriptionsprodukte bereits in mittleren pachytänen Spermatozyten nachzuweisen waren, trat das tACE-Protein erst in späteren Stadien der Keimzellendifferenzierung auf, erstmals in runden Spermatiden. Bereits in diesen Keimzellen war die Expression des Proteins polar ausgerichtet und ebenso wie in elongierenden und elongierten Spermatiden ausschließlich im adluminalen Bereich der Zytoplasmamembran lokalisiert. Die zwischen Sertoli-Zellen eingefasste Kopfregion der Keimzellen erwies sich dagegen als stets negativ für tACE. Nach ihrer Freisetzung war tACE membrangebunden in Residualkörperchen und, mit einer gewissen morphologischen Variabilität, in der Hals- und Mittelstückregion von intratubulären als auch ejakulierten Spermien nachzuweisen. Dies paßt zu der Vorstellung einer CREM-regulierten Transkription, mRNA-Vorratshaltung und, auf Ebene einzelner Keimzellen und Spermien, spezifischen Proteinverteilung von tACE.

Im Gegensatz hierzu konnte die somatische Isoform des ACE in Keim- und Sertoli-Zellen des normalen adulten Hodens nicht nachgewiesen werden, weder immunhistologisch noch mit molekularen Methoden zur Detektion ihrer mRNA. Nur außerhalb der Tubuli seminiferi fand sich sACE in bestimmten Endothelien und Leydig-Zellen. Auffällig war das Expressionsmuster von sACE im weiteren Verlauf des unteren männlichen Reproduktionstrakts. Während das Epithel des Rete testis und ortsständige intraepitheliale Makrophagen des Nebenhodens nur sACE-mRNA aufwiesen (mRNA+/Protein-), zeigten die Epithelien der Ductuli efferentes (mRNA+/Protein+) eine massive, polar und adluminal ausgerichtete Expression mit Sekretion immunreaktiver Vesikel in das Seminalplasma. Auch die in der Corpus- und Cauda-Region des Nebenhodens lokalisierten Epithelien und die Epithelien des Ductus deferens exprimierten sACE im Bereich der Stereozilien, nicht dagegen aber die lang-ziliären Epithelien der Caput-Region des Nebenhodens (mRNA-/Protein-). Dies dokumentiert die spezifische Beimischung von epitheliale sACE zum Seminalplasma mit regionalen Besonderheiten im Bereich von Nebenhoden und ableitendem Reproduktionstrakt.

Unerwartet fand sich sACE aber auch in Keimzellen. Abweichend von der regulär fehlenden Expression in Spermatogonien und Spermiogenese des adulten Mannes wurde diese Isoform nur in einer bestimmten Entwicklungsstufe fetaler Keimzellen gefunden, den Prospermatogonien vom M-Typ. In weiterer Analogie zu der onkofetalen GCAP wurde sACE

zudem in allen 87 analysierten IKZN adulter Männer detektiert. Die selektive Expression dieser ACE-Isoform in neoplastischen Keimzellen konnte zudem erstmals an isolierten IKZN-Zellen mittels LACP und PCR/PT-PCR demonstriert und gesichert werden. Nur mit Ausnahme spermatozytärer Seminome, die nicht immunreaktiv waren (sACE-/GCAP-), exprimierte auch die Mehrheit aller klassischen Seminome sowohl deutlich sACE als auch GCAP, d.h. in 88% bzw. in 87%. Beide Marker erwiesen sich somit als recht verlässlich in der Detektion dieser KZT, zeigten aber Besonderheiten: sACE und GCAP erwiesen sich in IKZN und Seminomen voneinander unabhängig exprimiert bzw. reguliert und die Expressionsmuster in IKZN korrelierten jeweils nicht mit dem histologischen Typ des benachbarten invasiven KZT. Dagegen zeigten die analysierten nicht-seminomatösen KZT die deutlichsten Unterschiede zwischen sACE und GCAP. Im Gegensatz zu GCAP war das sACE-Protein in den allermeisten embryonalen Karzinomen nicht oder nur schwach nachweisbar und wurde in nicht-seminomatösen KZT, abhängig von der epithelialen Differenzierung, offenbar fakultativ neoexprimiert.

Die Ergebnisse zeigen erstmals, dass sACE in der Prä spermatogenese des Menschen eine Rolle spielt und von M-Prospermatogonien temporär gebildet wird. Die allgemein diskutierte pathogenetische Beziehung zwischen einer gestörten fetalen Hodenentwicklung und der neoplastischen Keimzell-Transformation wird weiter erhärtet. Beim Erwachsenen kann der Nachweis von sACE in der histologischen KZT-Diagnostik gut Verwendung finden, wobei diese Isoform sowohl in IKZN als auch klassischen Seminomen auftritt und eine seminomatöse Tumordifferenzierung anzeigt. Letztlich belegen die eigenen Befunde das lineare Tumormodell, das eine seminomatöse Differenzierung als obligate Vor- bzw. Zwischenstufe einer nicht-seminomatösen KZT-Differenzierung begreift. Die funktionelle Bedeutung beider ACE-Isoformen in normalen testikulären Zellen und in Keimzelltumoren ist zur Zeit aber noch weitgehend unklar. Ihre differenzierte Expression in verschiedenen epithelialen, mesenchymalen und germinalen Zellformen, wie in der vorliegenden Arbeit demonstriert, unterstützt die Vorstellung einer para- und/oder autokrinen Funktion von ACE im männlichen Reproduktionstrakt. Über die mögliche Steuerung eines lokalen RAS und KKS hinaus ist hier sehr wahrscheinlich auch die Regulation des kürzlich entdeckten Stammzellinhibitors AcSDKP von Bedeutung, der spezifisch durch ACE inaktiviert wird.

7 Literaturverzeichnis

- Admiral PJJ, Danser AHJ, Sjoukje-Jong M, Pieterman H, Derkx FHM: Regional angiotensin II production in essential hypertension and renal artery stenosis. *Hypertension* 21:173-184, 1993
- Alhenc-Gelas F, Richard L, Courbon D, Warnet J, Corvol P: Distribution of plasma angiotensin I-converting enzyme levels in healthy men: relationship to environmental and hormonal parameters. *J Lab Clin Med* 117:33-39, 1991
- Azizi M, Rousseau A, Ezan E, Guyene TT, Michelet S, Grognet JM, Lenfant M, Corvol P, Menard J: Acute angiotensin-converting enzyme inhibition increases the plasma level of the natural stem cell regulator N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline. *J Clin Invest* 97:839-844, 1996
- Bailey D, Marks A, Stratis M, Baurnal R: Immunohistochemical staining of germ cell tumors and intratubular malignant germ cells of the testis using antibody to placental alkaline phosphatase and a monoclonal anti-seminoma antibody. *Mod Pathol* 4:167-171, 1991
- Berg T, Sulner J, Lai CY, Soffer RL: Immunohistochemical localization of two angiotensin I-converting isoenzymes in the reproductive tract of the male rabbit. *J Histochem Cytochem* 34:753-760, 1986
- Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K: Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* 44:1-80, 1992
- Boll M, Herget M, Wagener M, Weber WM, Markovich D, Biber J, Clauss W, Murer H, Daniel H: Expression cloning and functional characterization of the kidney cortex high-affinity proton-coupled peptide transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:284-289, 1996
- Bottari SP, King IN, Reichlin IS, Dahlstroem I, Lyden N, de-Gasparo M: The angiotensin AT2 receptor stimulates protein tyrosine phosphatase activity and mediates inhibition of particulate guanylate cyclase. *Biochem Biophys Commun* 183:206-211, 1992
- Bottari SP, de Gasparo M, Steckelings UM, Levens NR: Angiotensin II receptor subtypes: characterization, signalling mechanisms, and possible physiological implications. *Frontiers Neuroendocrinol* 14:123-171, 1993
- Burke AP, Mostofi FK: Placental alkaline phosphatase immunohistochemistry of intratubular malignant germ cells and associated testicular germ cell tumors. *Hum Pathol* 19:663-670, 1988
- Cambien F, Alhenc-Gelas F, Herberth B, Andre JL, Rakotovao R, Gonzales MF, Allegrini J, Bloch C: Familial resemblance of plasma angiotensin I-converting enzyme level: the NANCY study. *Am J Hum Gen* 43:774-780, 1988

- Campbell DJ: Circulating and tissue angiotensin systems. *J Clin Invest* 79:1-6, 1987
- Carbini LA, Scicli AG, Carretero OA: The molecular biology of the kallikrein-kinin system: III. The human kallikrein gene family and kallikrein substrate. *J Hypertens* 11:893-898, 1993
- Cassis LA, Saye JA, Peach MJ: Location and regulation of rat angiotensinogen messenger RNA. *Hypertension* 11:591-596, 1988
- Cattoretti G, Pileri S, Parravicini C, Becker MH, Poggi S, Bifulco C, Key G, D'Amato L, Sabattini E, Feudale E, et al: Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J Pathol* 171:83-98, 1993
- Chang RSL, Lotti V: Two distinct angiotensin receptor subtypes in rat, rabbit and monkey tissues: relative distribution and species dependency. *Life Sci* 49:1485-1490, 1991
- Clermont Y: The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat* 112:35-51, 1963
- Cockcroft JR, O'Kane KP, Webb DJ: Tissue angiotensin generation and regulation of vascular tone. *Pharmac Ther* 65:193-213, 1995
- Comte L, Lorgeot V, Volkov L, Allegraud A, Aldigier JC, Praloran V: Effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitor enalapril on blood haematopoietic progenitors and Acetyl-N-Ser-Asp-Lys-Pro concentration. *Europ J of Clin Invest* 27:788-790, 1997
- Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KA, Stein H, Mason DY: Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 32:219-229, 1984
- Cornel MJ, Williams TA, Lamango NS, Coates D, Corvol P, Soubrier F, Hoheisel J, Lehrach H, Isaac RE: Cloning and expression of an evolutionary conserved single-domain angiotensin converting enzyme from *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 270:13613-13618, 1995
- Cushman DW, Cheung HS: Concentrations of angiotensin-converting enzyme in tissues of the rat. *Biochim Biophys Acta* 250:261-267, 1971
- Damjanov I: Pathogenesis of testicular germ cell tumours. *Eur Urol* 23:2-5, 1993
- Danilov S, Jaspard E, Churakova T, Towbin H, Savoie F, Wei L, Alhenc-Gelas F: Structure-function analysis of angiotensin I-converting enzyme using monoclonal antibodies. Selective inhibition of the amino-terminal active site. *J Biol Chem* 269:26806-26814, 1994
- Danilov SM, Franke FE, Erdos EG: CD143 (angiotensin-converting enzyme) Workshop Panel report. In *Leucocyte Typing VI*, edited by Kishimoto T, et al., p 746. New York & London, Garland Publishing, Inc., 1997

- Deschepper CF, Mellon SH, Cumin F, Baxter JD, Ganong WF: Analysis by immunocytochemistry and in situ hybridization of renin and its mRNA in kidney, testis, adrenal, and pituitary of the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:7552-7556, 1986
- Dominiak P und Unger Th: AT1-Rezeptor-Antagonisten Angiotensin II. Steinkopf, Darmstadt, 1999
- Donovan PJ, de-Miguel M, Cheng L, Resnick JL: Primordial germ cells, stem cells and testicular cancer. *APMIS* 106:134-141, 1998
- Dzau VJ: Circulating versus local renin-angiotensin systems in cardiovascular homeostasis. *Circulation* 77:13-14, 1988
- Dzau VJ, Gibbons GH: Vascular remodeling: mechanisms and implications. *J Cardiovasc Pharmacol* 21 Suppl 1:1-5, 1993
- Eble JN: Spermatocytic seminoma. *Hum Pathol* 25:1035-1042, 1994
- Eggena P, Zhu JH, Clegg K, Barrett JD: Nuclear angiotensin receptors transduce transcription of renin and angiotensin mRNA. *Hypertension* 22:496-501, 1993
- Eggena P, Zhu JH, Sereevinyayut S, Giordani M, Clegg K, Andersen PC, Hyun P, Barrett JD: Hepatic angiotensin II nuclear receptors and transcription of growth-related factors. *J Hypertension* 14:961-968, 1996
- Ehlers MR, Fox EA, Strydom DJ, Riordan JF: Molecular cloning of human testicular angiotensin-converting enzyme: the testis isozyme is identical to the C-terminal half of endothelial angiotensin-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7741-7745, 1989a
- Ehlers MR, Riordan JF: Angiotensin-converting enzyme: new concepts concerning its biological role. *Biochemistry* 28:5311-5118, 1989b
- Ehlers MR, Chen YN, Riordan JF: The unique N-terminal sequence of testis angiotensin-converting enzyme is heavily O-glycosylated and unessential for activity and stability. *Biochem Biophys Res Commun* 183:199-205, 1992
- Erdos EG: Release and inactivation of kinins. *Gastroenterology* 51:893-900, 1966
- Erdos EG, Schulz WW, Gafford JT, Defendini R: Neutral metalloendopeptidase in human male genital tract. *Lab Invest* 52:437-447, 1985
- Esther CR, Howard TE, Marino EM, Howard TE, Machaud A, Corvol P, Capecchi MR: The critical role of tissue angiotensin-converting enzyme as revealed by gene targeting in mice. *J Clin Invest* 99:2375-2385, 1997
- Falkenhahn M, Franke F, Bohle RM, Zhu YC, Stauss HM, Bachmann S, Danilov S, Unger T: Cellular distribution of angiotensin-converting enzyme after myocardial infarction. *Hypertension* 25:219-226, 1994

- Fei YJ, Kanai Y, Nussberger S, Ganapathy V, Leibach FH, Romero MF, Singh SK, Boron WF, Hediger MA: Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature* 368:563-566, 1994
- Figueroa CD, Gonzalez CB, Muller EW, Bhoola KD: Cellular localization of human kininogens. *Agents Actions Suppl* 38:617-627, 1992
- Fink L, Seeger W, Ermert L, Hänze J, Stahl U, Grimminger F, Kummer W, Bohle RM: Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. *Nature Med* 11:1329-1333, 1998
- Foresta C, Indino M, Manoni F, Scandellari C: Angiotensin-converting enzyme content of human spermatozoa and its release during capacitation. *Fertil Steril* 47:1000-1003, 1987
- Foresta C, Manoni F, Rossato M, Varotto A, Zorzi M: Evidence for the involvement of sperm angiotensin-converting enzyme in fertilization. *Int J Androl* 14:333-339, 1991
- Foulkes NS, Schlotter F, Pevet P, Sassone-Corsi P: Pituitary hormone FSH directs the CREM functional switch during spermatogenesis. *Nature* 18:264-267, 1993
- Franke FE, Schachenmayr W, Osborn M, Altmannsberger M: Unexpected immunoreactivities of intermediate filament antibodies in human brain and brain tumors. *Am J Pathol* 139:67-79, 1991
- Franke FE, Reuter SS, Metzger R, Towbin H, Danilov SM, Bohle RM: Cellular localization of angiotensin-converting enzyme. *Tissue Antigens* 48:416, 1996
- Franke FE, Metzger R, Bohle RM, Kerkman L, Danilov SM: Angiotensin-I-Converting Enzyme (CD143) on endothelial cells in normal and in pathological conditions. In *Leucocyte Typing VI*, edited by Kishimoto T et al., p749, New York, Garland Publishing Inc., 1997
- Franke FE, Pauls K, Kerkman L, Steger K, Klonisch T, Metzger R, Alhenc-Gelas F, Burkhardt E, Bergmann M, and Danilov SM: Somatic isoform of angiotensin I-converting enzyme in the pathology of testicular germ cell tumors. *Hum Pathol* 31:1466-1476, 2000
- Franke FE, Kraus S, Eiermann C, Pauls K, Lalani EN, Bergmann M: Muc1 in normal and impaired spermatogenesis. *Mol Human Reprod* 7:502-512, 2001
- Fraser LR, Pondel MD, Vinson GP: Calcitonin, angiotensin II and FFP significantly modulate mouse sperm function. *Mol Human Reprod* 7:245-253, 2001
- Ganten D, Hermann K, Unger T, Lang RE: The tissue renin-angiotensin systems: focus on brain angiotensin, adrenal gland and arterial wall. *Clin Exp Hypertens A* 5:1099-1118, 1983
- Gatti JL, Druart X, Guerin Y, Dacheux F, Dacheux JL: A 105- to 94-kilodalton protein in the epididymal fluids of domestic mammals is angiotensin I-converting enzyme

- (ACE); evidence that sperm are the source of this ACE. *Biol Reprod* 60:937-945, 1999
- Gaudron S, Grillon C, Thierry J, Riches A, Wierenga PK, Wdzieczak BJ: In vitro effect of acetyl-N-Ser-Asp-Lys-Pro (AcSDKP) analogs resistant to angiotensin I-converting enzyme on hematopoietic stem cell and progenitor cell proliferation. *Stem Cells* 17:100-106, 1999
- Georg M: ACE (CD143) im Vergleich von Mensch und Tier sowie in der zellulären Reaktion granulomatöser Entzündungen. Justus-Liebig Universität Giessen. *Dissertationsarbeit*, 2000
- Gibson RE, Thorpe HH, Cartwright ME: Angiotensin II receptor subtypes in renal cortex of rats and rhesus monkeys. *Am J Physiol* 261:512-518, 1991
- Giwerzman A, Marks A, Bailey D, Baumal R, Skakkebaek NE: A monoclonal antibody as a marker for carcinoma in situ germ cells of the human adult testis. *APMIS* 96:667-670, 1988
- Gomez RA, Cassis L, Lynch KR, Chevalier RL, Wilfong N, Carey RM, Peach MJ: Fetal expression of the angiotensinogen gene. *Endocrinology* 123:2298-2302, 1988
- Gomez RA, Norwood VF: Developmental consequences of the renin-angiotensin system. *Am J Kidney* 26:409-431, 1995
- Goraya TY, Kessler SP, Stanton P, Hanson RW, Sen GC: The cyclic AMP response elements of the genes for angiotensin-converting enzyme and phosphoenolpyruvate carboxykinase (GPT) can mediate transcriptional activation by CREM tau and CREM alpha. *J Biol Chem* 270:19078-19085, 1995
- Grady EF, Sechi LA, Griffin CA, Schambelan M, Kalinyak JE: Expression of AT-2 receptors in the developing rat fetus. *J Clin Invest* 88: 921-933, 1991
- Ha H, van Wijnen AJ, Hecht NB: Tissue-specific protein-DNA interactions of the mouse protamine 2 gene promoter. *J Clin Biochem* 13:18-27, 1992
- Hagaman JR, Moyer JS, Bachman ES, Sibony M, Magyar PL, Welch JE, Smithies O, Krege JH, O'Brien DA: Angiotensin-converting enzyme and male fertility. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2552-2557, 1998
- Hackenthal E, Paul M, Gantan D, Taugner R: Morphology, physiology and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev* 70:1067-1116, 1990
- Harding JW, Wright JW, Swanson GN, Hanesworth JM, Krebs LT: AT4 receptors: specificity and distribution. *Kidney Int* 46:1510-1512, 1994
- Heidenreich A, Schenkman NS, Sesterhenn IA, Mostofi KF, Moul JW, Srivastava S, Engelmann UH: Immunohistochemical and mutational analysis of the p53 tumour suppressor gene and the bcl-2 oncogene in primary testicular germ cell tumours. *APMIS* 106:90-99, 1998

- Herblin WF, Diamond SM, Timmermans PB: Localization of angiotensin II receptor subtypes in the rabbit adrenal and kidney. *Peptides* 12:581-584, 1991
- Hilscher W: The genetic control and germ cell kinetics of the female and male germ cell line in mammals including man. *Hum Reprod* 6:1416-25, 1991
- Hinton BT und Palladino MA: Epididymal Epithelium: its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment. *Microscopy Research and Technique* 30:67-81, 1995
- Hirai K, Song K, Kanehara H, Shiota N: Pituitary-dependent expression of the testicular angiotensin II receptor and its subtypes in rats. *Int J Androl* 21:177-185, 1998
- Hofmann MC, Jeltsch W, Brecher J, et al: Alkaline phosphatase isozymes in human testicular germ cell tumors, their precancerous stage, and three related cell lines. *Cancer Res* 49:4696-4700, 1989
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH: Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7276-7280, 1991
- Holstein AF und Davidoff MS: Die Epithelien im Rete testis des Menschen haben Merkmale von Sertoli-Zellen. *Verh. Anat Ges* 183:241, 2000
- Hooper NM, Karran EH, Turner AJ: Membrane protein secretases. *Biochem J* 321:265-279, 1997
- Howard TE, Shai SY, Langford KG, Martin BM, Bernstein KE: Transcription of testicular angiotensin-converting enzyme (ACE) is initiated within the 12th intron of the somatic ACE gene. *Mol Cell Biol* 10:4294-4302, 1990
- Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F: Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J Biol Chem* 266:15377-15381, 1991
- Inagami T, Clemens T, Hirose S, Okamura T, Naruse K, Takii Y, Yokasawa H: Brain renin. *Clin Exp Hypertens* 4:607-622, 1982
- Ingelfinger JR, Fon EA, Ellison KE, Dzau VJ: Localization of the intrarenal renin angiotensin system (RAS) by in situ hybridization of renin and angiotensinogen mRNAs. *Kidney Int* 33:269, 1988
- Ito M, Oliverio MI, Mannon PJ, Best CF, Maeda N, Smithies O, Coffman TM: Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:3521-3525, 1994
- Jackson B, Cubela RB, Sakaguchi K, Johnston CI: Characterization of angiotensin converting enzyme (ACE) in the testis and assessment of the in vivo effects of the ACE inhibitor perindopril. *Endocrinology* 123:50-55, 1988
- Jackson MP: Detection of shigella toxin-producing *Shigella dysenteriae* type 1 and incorporation of digoxigenin-11-dUTP. *J Clin Microbiol* 29:1910-1914, 1991

- Jacobsen GK, Norgaard-Pedersen B: Placental alkaline phosphatase in testicular germ cell tumours and in carcinoma-in-situ of the testis. An immunohistochemical study. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand A* 92:323-329, 1984
- Jaspard E, Wei L, Alhenc-Gelas F: Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides. *J Biol Chem* 268:9496-9503, 1993
- Jaspard E, Alhenc-Gelas F: Catalytic properties of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme on the cell surface. *Biochem Biophys Res Commun* 211:528-534, 1994
- Johnston CI: Biochemistry and pharmacology of the renin-angiotensin system. *Drugs* 39:21-31, 1990
- Jorgensen N, Rajpert-De Meyts E, Graem N, Muller J, Giwercman A, Skakkebaek NE: Expression of immunohistochemical markers for testicular carcinoma in situ by normal human fetal germ cells. *Lab Invest* 72:223-231, 1995
- Kanehara H, Song K, Hirai K, Ueda H, Shiota N, Kasuoka Y, Miyazaki H, Miyazaki M: Involvement of angiotensin II receptor subtypes during testicular development in rats. *Int J Androl* 21:186-195, 1998
- Kerkman L: Angiotensin-Converting Enzyme (CD143) in der Tumorpathologie von Mensch und Tier. Justus-Liebig Universität Giessen. *Dissertationsarbeit*, 2000
- Kessler SP, Rowe TM, Blendy JA, Erickson RP, Sen GC: A cyclic AMP response element in the angiotensin-converting enzyme gene and the transcription factor CREM are required for transcription of the mRNA for the testicular isozyme. *J Biol Chem* 273:9971-9975, 1998
- Kessler SP, Rowe TM, Gomos JB, Kessler PM, Sen GC: Physiological non-equivalence of the two isoforms of angiotensin-converting enzyme. *J Biol Chem* 275(34):26259-26264, 2000
- Kim HS, Krege JH, Kluckman KD, Hagaman JR, Hodgins JB, Best CF, Jenette JC, Coffman TM, Maeda N, Smithies O: Genetic control of blood pressure and angiotensinogen locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:2735-2739, 1995
- Kirchhoff C: Molekular characterization of epididymal proteins. *Reviews of Reproduction* 3:86-95, 1998
- Kitami Y, Okura T, Marumoto K, Wakaiya R, Hiwada K: Differential gene expression and regulation of type-1 angiotensin II receptor subtypes in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 188:446-452, 1992
- Kliesch S, Behre HM, Hertle L: Alteration of Sertoli cell differentiation in the presence of carcinoma in situ in human testes. *J Urol* 160:1894-1898, 1998

- Köhn FM, Miska W, Schill WB: Release of angiotensin-converting enzyme (ACE) from human spermatozoa during capacitation and acrosome reaction. *J Andrology* 16:259-263, 1995
- Köhn FM, Dammshäuser I, Neukamm C, Renneberg H, Siems WE, Schill WB, Aumüller G: Ultrastructural localization of angiotensin-converting enzyme in ejaculated human spermatozoa. *Hum Reprod* 13:604-610, 1998a
- Köhn FM, Müller C, Drescher D, Neukamm C, ElMulla KF, Henkel R, Hagele W, Hinsch E, Habenicht UF, Schill WB: Effect of angiotensin converting enzyme (ACE) and angiotensin on human sperm functions. *Andrologia* 30:207-215, 1998b
- Krajewska M, Krajewski S, Epstein JI, Shabaik A, Sauvageot J, Song K, Kitada S, Reed JC: Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers. *Am J Pathol* 148:1567-1576, 1996
- Krege JH, John SW, Langenbach LL, Hodgins JB, Hagaman JR, Bachman ES, Jennette JC, O'Brien DA, Smithies O: Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. *Nature* 375:146-148, 1995
- Kumar RS, Kusari J, Roy SN, Soffer RL, Sen GC: Structure of testicular angiotensin-converting enzyme. A segmental mosaic isozyme. *J Biol Chem* 264:16754-16758, 1989
- Langford KG, Zhou Y, Russell LD, Wilcox JN, Bernstein KE: Regulated expression of testis angiotensin-converting enzyme during spermatogenesis in mice. *Biol Reprod* 48:1210-1218, 1993
- Lattion AL, Soubrier F, Allegrini J, Hubert C, Corvol P, Alhenc-Gelas F: The testicular transcript of the angiotensin I-converting enzyme encodes for the ancestral, non-duplicated form of the enzyme. *FEBS Lett* 252:99-104, 1989
- Lenfant M, Wdzieczak BJ, Guittet E, Prome JC, Sotty D, Frindel E: Inhibitor of hematopoietic pluripotent stem cell proliferation: purification and determination of its structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:779-782, 1989
- Leung PS, Chan HC, Fu LX, Leung PY, Zhou WL, Wong PY: Angiotensin II receptors, AT1 and AT2 in the rat epididymis. Immunocytochemical and electrophysiological studies. *Biochem Biophys Acta* 1357:65-72, 1997a
- Leung PS, Yao XQ, Chan HC, Fu LX, Wong PY: Angiotensin II receptors: localization of type I and type II in the rat epididymis of different developmental stages. *J Memb Biol* 157:97-103, 1997b
- Leung PS, Chan HC, Fu LX, Leung PY, Chew SB, Wong PY: Differential gene expression of angiotensin II receptor subtypes in the epididymis of mature and immature rats. *Life Sci* 62:461-468, 1998
- Leung PS, Wong PT, Serna C: Angiotensinogen expression by rat epididymis: evidence for an intrinsic, angiotensin-generating system. *Mol Cell Endocrinol* 155:115-122, 1999

- Looijenga LH, Verkerk AJ, Dekker MC, van Gurp RJ, Gillis AJ, Oosterhuis JW: Genomic imprinting in testicular germ cell tumours. *APMIS* 106:187-195, 1998
- Looijenga LH, Oosterhuis JW: Pathogenesis of testicular germ cell tumours. *Rev Reprod* 4:90-100, 1999
- Lutzker SG, Levine AJ: A functionally inactive p53 protein in teratocarcinoma cells is activated by either DNA damage or cellular differentiation. *Nat Med* 2:804-810, 1996
- Marceau F, Larrivee JF, Saint JE, Bachvarov DR: The kinin B1 receptor: an inducible G protein coupled receptor. *Can J Physiol Pharmacol* 75:725-730, 1997
- Metzger R: Angiotensin-Converting-Enzym (ACE, CD143) in der Pathogenese vaskulärer und renaler Erkrankungen. Justus-Liebig Universität Giessen. *Dissertationsarbeit*, 1998
- Metzger R, Bohle RM, Pauls K, Eichner G, Alhenc-Gelas F, Danilov SM, Franke FE: Angiotensin-converting enzyme in non-neoplastic kidney diseases. *Kidney Int* 56:1442-1454, 1999
- Metzger R, Bohle RM, Chumachenko P, Danilov SM, Franke FE: CD143 in the development of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 150:21-31, 2000
- Millan JL, Manes T: Seminoma-derived Nagao isozyme is encoded by a germ-cell alkaline phosphatase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:3024-3028, 1988
- Mitchell KD, Navar LG: Influence of intrarenally generated angiotensin II on renal hemodynamics and tubular absorption. *Renal Physiol Biochem* 14:155-163, 1991
- Monsees TK, Miska W, Schill WB: Enzymatic digestion of bradykinin by rat Sertoli cell cultures. *J Androl* 17:375-381, 1996
- Monsees TK, Miska W, Blocher S, Schill WB, Winkler A, Siems WE: Elements of the kallikrein-kinin system are present in rat seminiferous epithelium. *Immunopharmacol* 45:107-114, 1999
- Moore HDM und Smith CA: The role of the epididymis during maturation of mammalian spermatozoa in vivo and in vitro. *Reprod Nutr Develop* 28:1217-1224, 1988
- Mostofi FK, Sesterhenn IA, Davis CJ: Immunopathology of germ cell tumors of testis. *Seminars in diagnostic Pathology* 4:320-341, 1987
- Müller DN, Bohlender J, Hilgers KF, Dragun D, Costerousse O, Menard J, Luft FC: Vascular expression of the angiotensin converting enzyme gene regulates the local angiotensin II formation. *Hypertension* 29:98-104, 1997
- Müller DN, Fischli W, Clozel JP, Hilgers KF, Bohlender J, Menard J, Busjahn A, Ganten D, Luft FC: Local angiotensin II generation in the rat heart - Role of renin uptake. *Circ Res* 82:13-20, 1998

- Müller C, Drescher D, Schill WB, Köhn FM: Angiotensin II influences human sperm motility. *Reprod Domestic Animals* 35:38, 2000
- Naftilan AJ, Zuo WM, Ingelfinger J, Ryan TJ, Pratt RE, Dzau VJ: Localization and differential regulation of angiotensinogen mRNA expression in the vessel wall. *J Clin Invest* 87:1300-1311, 1991
- Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W: The angiotensin II type 2 receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:10663-10667, 1995
- Niehans GA, Manivel JC, Copland GT, et al: Immunohistochemistry of germ cell and trophoblastic neoplasms. *Cancer* 62:1113-1123, 1988
- Nieschlag E und Behre HM: *Andrologie*. Springer Verlag, 2000
- Norton AJ: Microwave oven heating for antigen unmasking in routinely processed tissue sections. *J Pathol* 171:79-80, 1993
- Oosterhuis JW, Castedo SM, de-Jong B, Cornelisse CJ, Dam A, Sleijfer DT, Schraffordt KH: Ploidy of primary germ cell tumors of the testis. Pathogenetic and clinical relevance. *Lab Invest* 60:14-21, 1989
- Oosterhuis JW, Gillis AJ, van-Putten WJ, de-Jong B, Looijenga LH: Interphase cytogenetics of carcinoma in situ of the testis. Numeric analysis of the chromosomes 1, 12 and 15. *Eur Urol* 23:16-21, 1993
- Pandey KN, Misono KS, Inagami T: Evidence for intracellular formation of angiotensins: coexistence of renin and angiotensin-converting enzyme in Leydig cells of rat testis. *Biochem Biophys Res Commun* 122:1337-1341, 1984
- Pandey KN, Inagami T: Regulation of renin angiotensins by gonadotropic hormones in cultured murine leydig tumor cells. *J Biol Chem* 26:3934-3938, 1986
- Parmentier M, Inagami T, Pochet R, Desclin JC: Pituitary dependent renin-like immunoreactivity in rat testis. *Endocrinology* 112:1318-1323, 1983
- Paul M, Wagner J, Dzau VJ: Gene expression of the renin-angiotensin system in human tissues. Quantitative analysis by the polymerase chain reaction. *J Clin Invest* 91:2058-2064, 1993
- Pauls K, Fink L, Franke FE: Angiotensin-converting enzyme in neoplastic germ cells. *Lab Invest* 79:1425-1435, 1999
- Paxton WG, Runge M, Horaist C, Cohen C, Alexander RW, Bernstein KE: Immunohistochemical localization of rat angiotensin II AT1 receptor. *Am J Physiol* 264:989-995, 1993
- Peach MJ: Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev* 57:313-370, 1977

- Pucell AG, Hodges JC, Sen I, Bumpus FM, Husain A: Biochemical properties of the ovarian granulosa cell type 2 angiotensin receptor. *Endocrinology* 128:1947-1959, 1991
- Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE: Expression of the c-kit protein product in carcinoma-in-situ and invasive testicular germ cell tumours. *Int J Androl* 17:85-94, 1994
- Rajpert-De Meyts E, Kvist M, Skakkebaek NE: Heterogeneity of expression of immunohistochemical tumour markers in testicular carcinoma in situ: pathogenetic relevance. *Virchows Arch* 428:133-139, 1996
- Ramaraj P, Kessler SP, Colmenares C, Sen GC: Selective restoration of male fertility in mice lacking angiotensin-converting enzymes by sperm-specific expression of the testicular isozyme. *J Clin Invest* 102:371-378, 1998
- Remmele W, Hildebrand U, Hienz HA, Klein PJ, Vierbuchen M, Behnken LJ, Heicke B, Scheidt E: Comparative histological, histochemical, immunohistochemical and biochemical studies on oestrogen receptors, lectin receptors, and Barr bodies in human breast cancer. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 409:127-147, 1986
- Rieger KJ, Saez-Servent N, Papet MP, Wdzieczak-Bakala J, Morgat JL, Thierry J, Voelter W, Lenfant M: Involvement of human plasma angiotensin I-converting enzyme in the degradation of the haemoregulatory peptide N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline. *Biochem J* 296:373-378, 1993
- Rohmer V, Saint-Andre JP, Alhenc-Gelas F, Corvol P, Bigorgne JC: Angiotensin I-converting enzyme in a suprasellar germinoma. *Am J Clin Pathol* 87:281-284, 1987
- Rousseau A, Michaud A, Chauvet MT, Lenfant M, Corvol P: The hemoregulatory peptide N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro is a natural and specific substrate of the N-terminal active site of human angiotensin-converting enzyme. *J Biol Chem* 270:3656-3661, 1995
- Rudolph P, Kellner U, Schmidt D, Kirchner V, Talerma A, Harms D, Parwaresch R: Ki-A10, a germ cell nuclear antigen retained in a subset of germ cell-derived tumors. *Am J Pathol* 154:795-803, 1999
- Sabeur K, Vo AT, Ball BA: Effects of angiotensin II acrosome reaction in equine spermatozoa, *J Reprod Fertil* 2000, 120:135-142
- Saha L, Garg SK, Bhargava VK, Mazumdar S: Role of angiotensin-converting enzyme inhibitor, lisinopril, on spermatozoal functions in rat. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 22:159-162, 2000
- Saint-Andre JP, Alhenc-Gelas F, Rohmer V, Chretien MF, Bigorgne JC, Corvol P: Angiotensin-I-converting enzyme in germinomas. *Hum Pathol* 19:208-213, 1988
- Samani NJ, Brammar WJ, Swales JD: Expression of renin gene in extra-renal tissues of the rat. *Biochem J* 253:907-910, 1988

- Schill WB, Miska W, Parsch EM, Fink E: Significance of the kallikrein-kinin system in andrology. The kallikrein-kinin system in health and disease Fritz H, Schmidt F, Dietze G (eds) Limbach, Braunschweig 171-203, 1989
- Schill WB, Miska W: Possible effects of the kallikrein-kinin system on male reproductive functions. *Andrologia* 24:69-75, 1992
- Schill WB, Parsch EM, Miska W: Inhibition of angiotensin-converting enzyme-a new concept of medical treatment of male infertility? *Fertility Sterility* 61:1123-1128, 1994
- Schoofs L, Veelaert D, De Loof A, Huybrechts R: Immunocytochemical distribution of angiotensin I-converting enzyme-like immunoreactivity in the brain and testis of insects. *Brain Res* 785:215-227, 1998
- Schütze K, Lahr G: Identification of expressed genes by laser-mediated manipulation of single cells. *Nat Biotechnol* 16:737-742, 1998
- Sempe PF: Putative mechanisms of cough after treatment with angiotensin converting enzyme inhibitors. *J Hypertens* 3:17-21, 1995
- Shigenari A, Ando A, Baba T: Characterization of alkaline phosphatase genes expressed in seminoma by cDNA cloning. *Cancer Res* 58:5079-5082, 1998
- Sibony M, Gasc JM, Soubrier F, Alhenc-Gelas F, Corvol P: Gene expression and tissue localization of the two isoforms of angiotensin I converting enzyme. *Hypertension* 21:827-835, 1993
- Sibony M, Segretain D, Gasc JM: Angiotensin-converting enzyme in murine testis: step-specific expression of the germinal isoform during spermiogenesis. *Biol Reprod* 50:1015-1026, 1994
- Siems WE, Heder G, Hilse H, Baeger I, Engel S, Jentsch KD: Angiotensin-converting enzyme and other peptidolytic enzymes in human semen and relations to its spermatologic parameters. *Andrologia* 23:185-189, 1991
- Singh US, Kumar MV, Panda JN: Angiotensin converting enzyme in semen and its possible role in capacitation. *Andrologia* 17:472-475, 1985
- Skakkebaek NE: Possible carcinoma-in-situ of the testis. *Lancet* 2:516-517, 1972
- Skakkebaek NE, Berthelsen JG, Giwercman A, Muller J: Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. *Int J Androl* 10:19-28, 1987
- Skakkebaek NE, Rajpert-De-Meyts E, Jorgensen N, Carlsen E, Petersen PM, Giwercman A, Andersen AG, Jensen TK, Andersson AM, Muller J: Germ cell cancer and disorders of spermatogenesis: an environmental connection? *APMIS* 106:3-11, 1998
- Skeggs L, Kahn J, Shumway N: The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J Exp Med* 295-299, 1956

- Soubrier F, Alhenc-Gelas F, Hubert C, Allegrini J, John M, Tregear G, Corvol P: Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:9386-9390, 1988
- Speth RC, Daubert DL, Grove KL: Angiotensin II: a reproductive hormone too? *Reg Pept* 79:25-40, 1999
- Steger K, Klonisch T, Gavenis K, Drabent B, Doenecke D, Bergmann M: Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod* 4:939-945, 1998
- Steger K: Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. *Anat Embryol* 199:471-587, 1999
- Steger K, Pauls K, Klonisch T, Franke FE, Bergmann M: Expression of protamine-1 and -2 mRNA during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod* 6:219, 2000
- Stephan J, Melaine N, Ezan E, Hkovirta H, Maddocks S, Toppari J, Garnier D, Wdzieczak-Bakala J, Jegou B: Source, catabolism and role of the tetrapeptide N-acetyl-ser-asp-lys-Pro within the testis. *J Cell Sci* 113:113-121, 2000
- Stoll M, Steckelings UM, Bottari SP, Unger Th: Regulation of endothelial cell growth: role of the angiotensin II AT2 receptor. *Circulation* 88:463-469, 1993
- Swanson GN, Hanesworth JM, Sardinia MF, Coleman JK, Wright JW, Hall KL, Miller WA, Stobb JW, Cook VI, Harding EC, et al: Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor. *Reg Pept* 40:409-419, 1992
- Strittmatter SM, Thiele EA, De-Souza EB, Snyder SH: Angiotensin-converting enzyme in the testis and epididymis: differential development and pituitary regulation of isozymes. *Endocrinology* 117:1374-1378, 1985
- Tanimoto K, Sugiyama F, Goto Y: Angiotensinogen-deficient mice with hypotension. *J Biol Chem* 269:331-334, 1994
- Takada Y, Hiwada K, Kokubu T: Characterization and immunohistologic demonstration of angiotensin-converting enzyme in human renal cell carcinoma. *Oncodev Biol Med* 4:327-334, 1983
- Takada Y, Hiwada K, Yokoyama M, Ochi K, Takeuchi M, Kokubu T: Angiotensin converting enzyme. A possible histologic indicator for human renal cell carcinoma. *Cancer* 56:130, 1985
- Tang SS, Loscalzo J, Dzau VJ: Tissue plasminogen activator activates renin-angiotensin in vitro. *J Vasc Med Biol* 1:67-741, 1989
- Testut P, Soubrier F, Corvol P, Hubert C: Functional analysis of the human somatic angiotensin I-converting enzyme gene promoter. *Biochem J* 293:843-848, 1993

- Tsutsumi K, Saveedra JM: Characterisation and development of angiotensin II rezeptor subtypes (AT 1 and AT 2) in rat brain. *Am J Physiol* 261:209-216, 1991
- Unger T, Horst PJ, Bauer M, Demmert G, Rettig R, Rohmeiss P: Natriuretic action of central angiotensin II in conscious rats. *Brain Res* 486: 33-38, 1989
- Urata H, Healy B, Stewart RW, Bumpus FM, Husain A: Angiotensin II rezeptors in normal and failing human hearts. *J Clin Endocrinol Metab* 69: 54-66, 1989
- Uchida T, Shimoda T, Miyata H, et al: Immunoperoxidase study of alkaline phosphatase in testicular tumor. *Cancer* 48:1455-1462, 1981
- Vanh-Perttula T, Mather JP, Bardin GW, Moss SB, Bellve AR: Localization of the angiotensin-converting enzyme activity in testis and epididymis. *Biol Reprod* 33:870-877, 1985
- Vendrely E, Dadoune JP: Quantitative ultrastructural analysis of the principal cells in the human epididymis. *Reprod Nutr Develop* 28:1225-1235, 1988
- Velletri PA, Aquilano DR, Bruckwick E, Tsai-Morris CH, Dufau ML, Lovenberg W: Endocrinological control and cellular localization of rat testicular angiotensin-converting enzyme (EC 3.4.15.1). *Endocrinol* 116:2516-2522, 1985
- Vinson GP, Puddefoot JR, Ho MM, Barker S, Mehta J, Saridogan E, Djahanbakhch O: Type 1 angiotensin II receptors in rat and human sperm. *J Endocrinol* 144:369-378, 1995
- Vinson GP, Mehta J, Evans S, Matthews S, Pudderfoot JR, Sraidogan E, Holt WV, Djahanbakch O: Angiotensin II stimulates sperm motility. *Reg Pept* 67:131-135, 1996
- Vinson GP, Saridogan E, Puddefoot JR, Djahanbakch O: Tissue renin-angiotensin systems and reproduction. *Human Reprod* 12:651-662, 1997
- Vivet F, Callard P, Gamoudi A: Immunolocalization of angiotensin 1 converting enzyme in the human male genital tract by the avidin-biotin-complex method. *Histochemistry* 86:499-504, 1987
- Wang YF und Holstein AF: Intraepithelial lymphocytes and macrophages in the human epididymis. *Cell Tissue Res* 233:517-521, 1983
- Wartenberg H: Entwicklung der Genitalorgane und Bildung der Gameten. In: *Humanembryologie*, Hinricksen KV (Editor). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York; pp 745-763, 1990
- Wei L, Alhenc-Gelas F, Corvol P, Clausner E: The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. *J Biol Chem* 266:9002-9008, 1991

- Weintraub B, Klickstein LB, Dzau VJ, Watt KWK: Granulocyte-angiotensin system. Identification of angiotensinogen as substrate of leucocyte cathepsin G. *Biochemistry* 23:227-232, 1984
- Wick MR, Swanson PE, Manivel JC: Placental-like alkaline phosphatase reactivity in human tumors: an immunohistochemical study of 520 cases. *Hum Pathol* 18:946-954, 1987
- Wierenga PK, Seitroikromo R, Vellenga E, Kampinga HH: Purging of acute myeloid leukaemia cells from stem cell grafts by hyperthermia: enhancement of the therapeutic index by the tetrapeptide AcSDKP and the alkyl-lysophospholipid ET-18-OCH (3). *Br J Haematol* 111:1145-1152, 2000
- Wolf WC, Harley RA, Scuce D, Chao L, Chao J: Cellular localization of kallikrein and kallistatin in human pancreas and salivatory glands. *J Histochem Cytochem* 110:477-484, 1998
- Wolf WC, Harley RA, Sluce D, Chao L, Chao J: Localization and expression of tissue kallikrein and kallistatin in human blood vessels. *J Histochem Cytochem* 47:221-228, 1999
- Wong PYD, Fu WO, Huang SJ, Law WK: Endothelin stimulates anion secretion in a cultered epithelium. *Br J Pharmacol* 98:191-196, 1989
- Wong PY, Fu WO, Huang SJ, Law WK: Effect of angiotensins on electrogenic anion transport in monolayer cultures of rat epididymis. *J Endocrinol* 125:449-456, 1990
- Wong PY, Uchendu CN: The role of angiotensin-converting enzyme in the rat epididymis. *J Endocrinol* 125:457-465, 1990
- Wong PYD, Uchendu CN: Studies on renin-angiotensin sytem on primary monolayer cell cultur of the rat epididymis. *J Endocrinol* 131:287-293, 1991
- Woodman ZL, Opong SY, Cook S, Hooper NM, Schwager SL, Brandt WF, Ehlers MR, Sturrock ED: Shedding of somatic angiotensin-converting enzyme (ACE) is inefficient with testis ACE despite cleavage at identical stalk sites. *Biochem J* 347:711-718, 2000
- Yeung CH, Cooper TG, Bergmann M, Schulze H: Organisation of tubules in the human caput epididymidis and the ultrastructure of their epithelia. *American J Anat* 191:261-279, 1991
- Yeung CH, Nashan D, Cooper TG, Sorg C, Oberpenning E, Schulze H, Nieschlag E: Basal cells of the human epididymis-antigenic and ultrastructural similarities to tisue-fixed macrophages. *Biol Reprod* 50:917-926, 1994
- Zhou Y, Delafontaine P, Martin BM, Bernstein KE: Identification of two positive transcriptional elements within the 91-base pair promotor for mouse testis angiotensin converting enzyme. *Dev Genet* 16:201-219, 1995

Zhou Y, Sun Z, Means AR, Sassone CP, Bernstein KE: cAMP-response element modulator tau is a positive regulator of testis angiotensin converting enzyme transcription. Proc Natl Acad Sci USA 93:12262-12266, 1996

8 Anhang: Anleitungen, Ansätze, Reagenzien

Anleitungen

1.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung):

a) Färbung von Paraffinschnitten:

• Entparaffinisierung mittels Xylol	• 10 min
• 100%-iger Alkohol	• 3 min
• Absteigende Alkoholreihe in folgenden Stufen: 96%, 70%, 50%, 30% Alkohol, Aqua destillata	• je 3 min
• Kernfärbung: Hämalaun nach Mayer	• 7 min
• Leitungswasser	• 10 min
• Eosin-Gegenfärbung: 1% Eosin, 0.2% Eisessig	• 4 min
• Aufsteigende Alkoholreihe in folgenden Stufen: 30%, 50%, 70%, 96% Alkohol	• je 3 min
• Xylol und Eindecken der Präparate in Diatex	• 3 min

b) Färbung von Gefrierschnitten:

• Kernfärbung: Hämalaun nach Mayer	• 5 min
• Leitungswasser	• 10 min
• Eosin-Gegenfärbung	• 20 sec
• Aufsteigende Alkoholreihe in folgenden Stufen: 30%, 50%, 70%, 96% Alkohol	• je 3 min
• Xylol und Eindecken der Präparate in Diatex	• 3 min

1.2 PAS-Färbung:

• Entparaffinisierung in Xylol	• 20 min
• Absteigende Alkoholreihe in folgenden Stufen: 30%, 50%, 70%, 96% Alkohol, Aqua destillata	• je 3 min
• 1%-ige Perjodsäure aus Na-Perjodat	• 10 min
• in Leitungswasser spülen	• 2 min
• Aqua destillata	• 3 min
• Schiff'sches Reagenz	• 18 min
• Na-Sulfid-Spülung	• 3 x 5 min
• Aqua destillata	• 10 min
• Hämalaun nach Mayer	• 5 min
• Leitungswasser	• 5 min
• aufsteigende Alkoholreihe in folgenden Stufen: 30%, 50%, 70%, 96% Alkohol	• je 3 min
• Xylol und Eindecken der Präparate in Diatex	• 3 min

1.6 Gelelektrophorese

-
- Agarosegel vorbereiten und polymerisieren lassen
 - DNA-Proben (50 µl) mit 6 µl Laufpuffer versetzen, davon
 - 8µl pro Probe in die slots geben
 - je 8 µl DNA-Marker in die beiden äußeren Slots geben
 - bei 80 V über ca. 1h fahren lassen
-

2. Ansätze

2.1 Immunhistologie

2.1.1 Zitratpuffer (pH 6.0; 10 mM):

Stammlösung A : 0,1M Zitronensäure (21,01g in 1000ml Aqua destillata)

Stammlösung B : 0.1M Tri-Natriumzitat-Dihydrat (29,41g in 1000ml Aqua destillata)

Die Stammlösungen werden bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Kurz vor Verwendung des Zitratpuffers werden 9ml Stammlösung A und 41ml Stammlösung B mit 450ml Aqua destillata auf 500ml aufgefüllt (reicht etwa für 10 MW-Küvetten).

2.1.2 Tris-Waschpuffer (pH 7.4 -7.6):

<i>Stammlösung für 20l</i> :	Tris-Base	18 g	+
	Tris-HCl	137 g	+
	NaCl	175.5 g	+
	Aqua demin.	2.5 l	

Die Stammlösung wird in Kanister gefüllt und mit Aqua demin. auf 20l aufgefüllt.

2.1.3 RPMI (pH 7.4-7.6):

RPMI-Konzentrat	50 ml	+
Aqua demin.	450 ml	+
inaktiviertes Rinderserum	50 ml	+
Natriumazid	0.5 g	

2.1.4 Entwicklungspuffer :

NaCl	87 g	+
Tris-HCl	15 g	+
Tris-Base	49 g	+
Aqua demin.	1750 ml	

Der Entwicklungspuffer wird in einer dunklen Flasche bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.1.5 Propandiol:

Propandiol	21 g	+
Aqua demin.	1000ml	

2.1.6 Neufuchsin:

Neufuchsin	5 g	+
2N HCl	100 ml	

2.1.7 Entwicklerlösung:

Verhältnistabelle für die Entwicklerlösung der APAAP-Färbung

Anzahl der Küvetten		1	2	3	4	5	6	7	8
Entwicklungspuffer	ml	35	70	105	140	175	210	245	280
Propandiol	ml	12,5	25	37,5	50	62,5	75	87,5	100
Laevamisol	mg	20	40	60	80	100	120	140	160
Natriumnitrit	mg	10	20	30	40	50	60	70	80
Aqua destilata	μ l	250	500	750	1000	1250	1500	1750	2000
Naphtol*	mg	25	50	75	100	125	150	175	200
Dimethylformamid	μ l	300	600	900	1200	1500	1800	2100	2400
Neufuchsin	μ l	100	200	300	400	500	600	700	800

* Naphtol-As-Bi-Phosphat

2.2 RT-PCR und sc-RT-PCR

2.2.1 Ansätze für RT und PCR

Komponenten		Volumina (μ l)			
		RT	sc-RT	PCR	sc-PCR
Template	mRNA (in FSB)	2	10		
	cDNA			2	8
10x Puffer II *		2	2	5	4
MgCl ₂ (25mM)		4	2	4	3
dNTPs (je 5mM)		2	1	1	1
Primer	Random Hexamere (50 μ M) oder Oligo d(T) ₁₆ (25 μ M) **	1	1		
	5' Primer (10 μ l) und 3' Primer (10 μ l)			je 1.5	je 1.5
MuLV Reverse Transkriptase (50 U/ μ l)		1	1		
RNase Inhibitor (20 U/ μ l)		1	0.5		
AmpliTaq Gold Polymerase (2.5 U/Reaktion)				0.5	0.5
H ₂ O		7	-	36	32
Gesamtvolumen		21	17.5	50	50

*10x Puffer II (10mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl)

**Falls statt Random Hexamere der 5'-Primer in der RT verwendet wird, muss seine Konzentration in der PCR entsprechend angepaßt werden

2.2.2 <u>FSB-Puffer (pH 8.3):</u>	Tris-HCl	52 mM	+
	KCl	78 mM	+
	MgCl ₂	3.1 mM	+
	1% Igepal CA-630		+
	4% RNase Inhibitor		

2.2.3 Laufpuffer TBE für die Elektrophorese:

Stammlösung für 1l Aqua demin.:

Tris-Base	54 g	+
Borsäure	27.5 g	+
<u>EDTA (pH 8.0)</u>	<u>20 ml</u>	

Vor Gebrauch TBE verdünnen (1/10) mit Aqua demin.

2.2.4 <u>Agarosegel:</u>	TBE(verdünnt 1:10)	50 ml	+
	Agarose	1 g	+
	1min bei Max Watt kochen lassen		
	Aqua demin.	2.5	
	Ethidium Bromid (1%)	2,5 µl	

2.2.5 <u>Probenpuffer (Blaupuffer):</u>	Glycerin	25 g	+
	H ₂ O	2475 ml	+
	Spatelspitze Bromphenolblau (Pulver)		

2.2.6 <u>DNA-Marker-Lösung (14%):</u>	1x TBE (unverdünnt)	20 µl	+
	1x Blaupuffer	20 µl	+
	H ₂ O	40 µl	+
	1x DNA-Marker	20 µl	+
	2x H ₂ O	40µl	

2.3 In situ-Hybridisierung

2.3.1 <u>BSA (3%):</u>	BSA	6 g	+
	TNMT-Puffer (1x)	200 ml	+
	Natriumazid	0.2 g	

2.3.2 <u>Glycin-Lösung (0.2 %):</u>	Glycin	200 mg	+
	PBSM	200 ml	
2.3.3 <u>Denhardt-Reagenz:</u>	BSA	200 mg	+
	Fucol 400	200 mg	+
	Polyvinylpyrrolidon	200 mg	+
	DEPC-Wasser	10 ml	
2.3.4 <u>DEPC-Wasser:</u>	DEPC (Diethylpyrocarbonat)	2 ml	+
	<u>Aqua bidest</u>	<u>2 l</u>	
	Über Nacht in Trockenschrank (37 °C) Autoklavieren		
2.3.5 <u>Dextransulfat (50%):</u>	Dextransulfat	5 g	+
	<u>DEPC-Wasser</u>	<u>10 ml</u>	
	4°C		
2.3.6 <u>EDTA (0.5M, pH 8.0):</u>	EDTA	74.4 g	+
	NaOH	8 g	+
	DEPC-Wasser	400 ml	
2.3.7 <u>Hybridmix (20µl/Schnitt):</u>	DEPC-Wasser	4 µl	+
	DIG-RNA (Antisense/Sense)	4 µl (1:100)	+
	Salmon sperm DNA	4 µl	+
	Yeast t-RNA	8 µl	
2.3.8 <u>Hybridisierungspuffer (30µl):</u>	DEPC-Wasser	56 µl	+
	20x SSC-Lösung	400µl	+
	Dextran (50%)	80 µl	+
	Denhardt-Reagenz	4 µl	+
	Deionisiertes Formamid	200 µl	
2.3.9 <u>MgCl₂-Lösung (1M):</u>	MgCl ₂	81.4 g	+
	DEPC	400 ml	

2.3.10 <u>NTB-Puffer (5x, pH 9.6):</u>	NaCl	29.2 g	+
	Tris-HCl	60.5 g	+
	<u>DEPC</u>	<u>1 ml</u>	
	Über Nacht im Trockenschrank		
	Autoklavieren	+	
	MgCl (1M)	25 ml/500ml	1xNTB
2.3.11 <u>Paraformaldehyd (4%):</u>	Paraformaldehyd	25 g	+
	<u>1x PBSM-Puffer</u>	<u>500 ml</u>	
	auf pH 7.0 einstellen		
2.3.12 <u>PBSM-Puffer:</u>	PBS-Tablette	1	+
	MgCl-Lösung	1 ml	+
	DEPC-Wasser	400 ml	
2.3.13 <u>Proteinase K:</u>	Proteinase K	10 mg	+
	EDTA(0.5 M)	100 µl	+
	PBSM-Puffer	900µl	
2.3.14 <u>SSC-Stammlösung (20x):</u>	Natriumcitrat	88.23 g	+
	<u>NaCl</u>	<u>175.29 g</u>	
	Auf pH 7.0 einstellen		
	Über Nacht im Trockenschrank		
	Autoklavieren		
2.3.15 <u>TNMT-Puffer (10x; pH 7.5):</u>	Tris-HCl	121.1 g	+
	NaCl	29.2 g	+
	MgCl	4.17 g	+
	<u>DEPC</u>	<u>1 ml</u>	
	Über Nacht im Trockenschrank (37 °C)		
	Autoklavieren, Triton-X-100 (5 ml) hinzugeben		

3. Reagenzien

2-Amino-2-Methyl-1,3-Propandiol (Merck, Darmstadt)
Aceton (Roth, Karlsruhe)
Agarose (Boehringer Mannheim, Mannheim)
Albumin Fraktion V / BSA (Merck, Darmstadt)
Alkohol (Roth, Karlsruhe)
Ammoniumchlorid (Merck, Darmstadt)
AmpliTaq Gold (Perkin-Elmer, Weiterstadt)
Aqua destillata (Roth, Karlsruhe)
BSA (Sigma, Deisenhofen)
Calciumchlorid-Dihydrat (Merck, Darmstadt)
DEPC (Merck, Darmstadt)
Dextransulfat (Sigma, Deisenhofen)
Diatex (Ferdinand Hammer, Frankfurt a.M.)
Diepoxid / DER (Serva, Heidelberg)
Dimethylaminoethanol / DMAE (Serva, Heidelberg)
dNTPs (Perkin-Elmer, Weiterstadt)
Dynabeads mRNA direkt Kit (Dynal, Oslo, Norway)
EDTA (Merck, Darmstadt)
Eisessig (Merck, Darmstadt)
Eosin-Lösung (Merck, Darmstadt)
Ethanol (Riedel-deHaen, Seelze)
Ficoll 400 (Sigma, Deisenhofen)
Gene Amp 10x PCR Buffer II (Perkin Elmer, Weiterstadt)
Glycergel (DAKO, Glostrup)
Glycin (Merck, Darmstadt)
Hydrochinon (Fluka Chemie AG, Buchs)
Igepal CA-630 (Sigma, Deisenhofen)
Kaliumhydrogen-Phosphat (Merck, Darmstadt)
Laevamisol (Sigma, Deisenhofen)
Mayer's Hämalaunlösung (Merck, Darmstadt)
Methylenblau (Merck, Darmstadt)

MgCl₂ (Merck, Darmstadt)
MgCl₂ (Perkin Elmer, Weiterstadt)
MuLV Reverse Transkriptase (Perkin-Elmer, Weiterstadt)
N,N-Dimethylformamid (Merck, Darmstadt)
NaOH (Sigma, Deisenhofen)
Naphthol-AS-BI-Phosphat (Sigma, Deisenhofen)
Natriumchlorid (Merck, Darmstadt)
Natriumcitrat (Merck, Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat (Fluka, Buchs)
Natriumdodecylsulfat/ SDS (Sigma, St. Louis)
Natriumnitrit (Merck, Darmstadt)
Natronlauge (Merck, Darmstadt)
NBT/BCIP (KPL, Gaithersburg, MD, USA)
Neufuchsin (Chroma, Köngen)
NotI und NcoI (New England Biolabs, Schwalbach)
Oligo dT16 (Perkin Elmer, Weiterstadt)
Paraformaldehyd (Sigma, Deisenhofen)
PBS (Merck, Darmstadt)
pGEM-DNA Marker (Promega, Madison, Wisconsin)
pGEM-T (Promega, Heidelberg)
Poly-L-Lysin (Sigma, St. Louis)
Polyvinylpyrrolidon (Sigma, Deisenhofen)
Proteinase K (Sigma, Deisenhofen)
QIAmp Blood Kit (QIAGEN, Hilden)
Random Hexamere (Perkin-Elmer, Weiterstadt)
Rattenserum (Dianova, Hamburg)
Rinderserum – inaktiviert (Seromed, Berlin)
RNA-DIG Labelling Kit (Boehringer Mannheim, Mannheim)
RNase A; RNase T1 (Boehringer Mannheim, Mannheim)
RNase Inhibitor (Perkin-Elmer, Weiterstadt)
RPMI (RPMI1640, Life Technologies, Faisley)
Salmon sperm DNA (Sigma, Deisenhofen)
Salzsäure (Merck, Darmstadt)

Schiff'sches Reagenz (Merk, Darmstadt)
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Merck, Darmstadt)
Tris-Base (Sigma, Deisenhofen)
Tris-HCl (USB, Amersham)
Triton X-100 (Sigma, Deisenhofen)
Wasserstoffperoxid 30% (Merck, Darmstadt)
X174 DNA/Hinf I Marker (Promega, Madison, Wisconsin)
XL1-Blue Escherichia coli (Stratagene, Heidelberg,)
Xylolersatzmittel Roti-Histol® / Xylol (Roth, Karlsruhe)
Yeast t-RNA (Sigma, Deisenhofen)
Zitronensäure-Monohydrat (Merck, Darmstadt)

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN:

Name:	Pauls
Vorname:	Katharina
Geburtsdatum:	15.10.1973
Geburtsort:	Dsheskasgan / Kasachstan
Anschrift:	Lindwurmstr. 121, 80337 München

SCHULBILDUNG:

08/1980 - 07/1990	Gymnasium 5, Dsheskasgan, Kasachstan
09/1991 - 07/1994	Westerwald-Gymnasium Altenkirchen

HOCHSCHULBILDUNG:

10/1994 - 09/1996	Vorklinisches Medizinstudium Ärztliche Vorprüfung
09/1996 - 09/1997	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
02/1998 - 02/2000	Durchführung des praktischen Anteils der Dissertation
08/1998 - 09/2000	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/2001 - 11/2001	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

FAMULATUREN:

02/1997 - 03/1997	Chirurgie / Lukas-Krankenhaus, Altenkirchen, Dr. P. Thomas
10/1997 - 12/1997	Innere Medizin / Royal Infirmary Blackburn, Akadem. Lehrkrankenhaus der Universität Manchester, UK
02/1998 - 03/1998	Pathologie / Zentrum für Pathologie am Klinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen, Prof. Dr. med. A. Schulz
08/1998 - 09/1998	Dermatologie / Zentrum für Dermatologie und Andrologie am Klinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen, Prof. Dr. med. W. B. Schill
08/1999 - 09/1999	Gynäkologie / Praxis Dr. med. K. Zeh, Gießen

PRAKTISCHES JAHR:

10/2000 - 02/2001	Chirurgie / Krankenhaus Wetzlar, Akadem. Lehrkrankenhaus der Justus-Liebig-Universität, Prof. Dr. med. Brobmann
02/2001 - 06/2001	Innere Medizin / Krankenhaus Wetzlar, Akadem. Lehrkrankenhaus der Justus-Liebig-Universität, Prof. Dr. med. W. Kramer
06/2001 - 08/2001	Radiologie / Krankenhaus Wetzlar, Akadem. Lehrkrankenhaus der Justus-Liebig-Universität, Prof. Dr. med. K. Rauber

Publikationen / Originalarbeiten / Abstracts:

Metzger RP, Bohle RM, Pauls K, Eichner G, Alhenc-Gelas F, Danilov SM, Franke FE:
 “Angiotensin-converting-enzyme (ACE) in non-neoplastic kidney diseases“
Kidney International, 56:1442, 1999

Pauls K, Fink L, Franke FE:
 “Angiotensin-converting-enzyme (ACE) in neoplastic germ cells“
Laboratory Investigation, 79:1425-1435, 1999

Steger K, Pauls K, Klonisch T, Franke FE, Bergmann M:
 “Expression of protamine-1 and -2 mRNA during human spermiogenesis“
Molecular Human Reproduction, 6:219, 2000

Franke FE, Pauls K, Kerkman L, Steger K, Klonisch T, Metzger R, Alhenc-Gelas F,
 Burkhardt E, Bergmann M, Danilov SM:
 “Somatic isoform of angiotensin I-converting enzyme in the pathology of testicular
 germ cell tumors“
Human Pathology, 31: 1466-1476, 2000

Franke FE, Kraus S, Eiermann C, Pauls K, Lalani EN, Bergmann M:
 ”MUC-1 mucin in normal and pathological human spermiogenesis“
Mol Human Reprod 7:502-12, 2001

Danilov SM, Gavrilyuk VD, Franke FE, Pauls K, Harshaw DW, McDonald TD:
 ”Lung uptake of antibodies to endothelial antigens key determinants of vascular
 immunotargeting“
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 280:1335-47, 2001

Franke FE, Metzger RP, Pauls K, Alhenc-Gelas F, Danilov SM, Bohle RM:
 “The heterogeneous expression of Angiotensin I-Converting enzyme (ACE, CD143,
 kininase II) in endothelial cells may contribute to the regulation of vascular tone“
40. Symposium of the Society for Histochemistry, Gießen, 28. September 1997

Franke FE, Pauls K, Kerkman L, Steger K, Fink L, Klonisch T, Burkhardt E, Bergmann M,
 Danilov SM:
 ”CD143-Expression in testikulären Keimzelltumoren“
Verh. Dtsch. Ges. Path., 84:199-209, 2000

Metzger RP, Pauls K, Alhenc-Gelas F, Danilov SM, Franke FE:
 “Angiotensin-Converting Enzym (ACE, CD143) in Fibrosierungsprozessen der
 menschlichen Niere“
Jahrestagung des Arbeitskreises Kinderurologie, Mainz, Januar 2000

Metzger RP, Pauls K, Alhenc-Gelas F, Danilov SM, Franke FE:
 “Lokalisation des Angiotensin-Converting Enzym (ACE, CD143) in der adulten und
 fetalen Niere des Menschen“
Jahrestagung des Arbeitskreises Kinderurologie, Mainz, Januar 2000

- Eiermann C, Kraus S, Pauls K, Bergmann M, Lalani EN, Weidner W, Franke FE:
"MUC-1 mucin in regular and pathological human spermiogenesis"
33. Jahrestagung "Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung", Abs. V1., Berlin, Februar 2000
- Pauls K, Kerkman L, Steger K, Fink L, Klonisch T, Burkhardt E, Danilov SM,
Bergmann M, Franke FE:
"Angiotensin I-converting enzyme (CD143) in human testicular germ cell tumors"
33. Jahrestagung "Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung", Abs. V2.4, Berlin, Februar 2000
- Pauls K, Steger K, Metzger R, Fink L, Klonisch T, Bergmann SM, Franke FE:
"Angiotensin I-converting Enzyme (CD143) in Testis und Epididymis des Menschen
33. Jahrestagung "Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung", Abs. V3.7, Posterprämierung, Berlin, Februar 2000
- Franke FE, Pauls K, Kerkman L, Steger K, Fink L, Klonisch T, Burkhardt E, Bergmann
M, Danilov SM:
"Expression of CD143 in testicular germ cell tumors"
84. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, Posterprämierung, Kiel, Juni 2000
- Kraus S, Eiermann C, Pauls K, Bergmann M, Lalani EN, Weidner W, Franke FE:
"MUC-1 mucin in normal and pathological human spermiogenesis"
85. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, Münster, Juni 2001

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben. Insbesondere spreche ich meinen Dank aus:

Herrn Prof. Dr. A. Schulz, für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung von Materialien und Mitteln für die Durchführung der Laborarbeit,

Herrn Dr. F.E. Franke, für die kompetente, konstruktive und kreative Tätigkeit, für seine Geduld und wissenschaftliche Förderung,

Herrn Dr. L. Fink, für die Betreuung der molekularbiologischen Untersuchungen,

Herrn Prof. Dr. M. Bergmann und **Herrn PD. Dr. K. Steger** aus dem Institut für die Veterinäranatomie, für die wertvolle Unterstützung und Zusammenarbeit,

Meinen Eltern, Geschwistern und meinem lieben Freund Philipp, die mir diese Ausbildung erst ermöglicht haben, mich aufgemuntert haben und in allen Lebenslagen zu mir standen.