

**Strukturelle und funktionelle Aspekte in Zusammenhang mit der
Segmentierung des Nebenhodens**

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

vorgelegt von Elfgen, Vera Adelheid
aus Aachen

Gießen (2018)

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

1. Gutachter: Univ. Prof. Dr. med. Ralf Middendorff
2. Gutachter: PD Dr. Lutz Konrad

Tag der Disputation: 29.04.2019

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Aufbau des Nebenhodens.....	1
1.1.1 Makroskopische Anatomie des Nebenhodens	1
1.1.2 Mikroskopische Anatomie und Funktion des Nebenhodens	2
1.1.3 Segmentierung des Nebenhodens	4
1.2 Sialinsäuren und Glykosylierung	7
1.2.1 Die Sialinsäuren.....	7
1.2.2 Der Aufbau eines Spermiums in Hinblick auf die Glykosylierung und Sialylierung.....	9
1.2.3 Die funktionelle Bedeutung von Sialinsäuren der Spermien im weiblichen Genitaltrakt	11
1.3 Der Einfluss des cholinergen Systems auf die Kontraktilität und Relaxation	12
1.3.1 Die Innervation des Nebenhodens	12
1.3.2 Acetylcholin.....	13
1.3.3 Muskarinerge und nikotinerge ACh-Rezeptoren.....	13
1.3.4 Der Einfluss cholinergischer Agonisten und Antagonisten auf die Spontankontraktionen	15
1.3.5 Lokalisation und Funktion der Stickstoffmonoxid-Synthase und dessen Einfluss auf die Kontraktilität.....	15
2 Zielsetzung	17
3 Material und Methoden	18
3.1 Material	18
3.1.1 Herkunft des Gewebes.....	18
3.1.2 Behandlung der Proben	18
3.1.3 Geräte.....	18
3.1.4 Programme.....	19

3.1.5 Chemikalien in alphabetischer Reihenfolge	19
3.2. Methoden.....	21
3.2.1 Die morphologischen und strukturellen Aspekte der Segmentgrenzen.....	21
3.2.1.1 Perfusion	21
3.2.1.1.1 Verwendete Reagenzien und Puffer.....	21
3.2.1.1.2 Versuchsdurchführung	21
3.2.1.2 Immunhistochemische Färbung und Immunfluoreszenzfärbung.....	21
3.2.1.2.1 Immunhistochemische Färbung zur Darstellung von Kollagenfasern.....	22
3.2.1.2.1.1 Verwendete Antikörper.....	22
3.2.1.2.1.2 Geräte	22
3.2.1.2.1.3 Versuchsdurchführung	22
3.2.1.2.2 Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung von Kollagen- und Nervenfasern	22
3.2.1.2.2.1 Verwendete Antikörper.....	22
3.2.1.2.2.2 Geräte	23
3.2.1.2.2.3 Versuchsdurchführung.....	23
3.2.1.3 3D-Rekonstruktion von Eosin gefärbten Schnitten	24
3.2.1.3.1 Verwendete Reagenzien.....	24
3.2.1.3.2 Geräte	24
3.2.1.3.3 Versuchsdurchführung	24
3.2.1.4 CLARITY	25
3.2.1.4.1 Verwendete Reagenzien, Puffer und Antikörper	25
3.2.1.4.2 Geräte	26
3.2.1.4.3 Versuchsdurchführung	26
3.2.2 Die biochemische Charakterisierung des Sialinsäure-Gehalts von Spermatozoen in den einzelnen Segmenten	26
3.2.2.1 Laser-Capture-Mikrodissektion (LCM).....	26
3.2.2.1.1. Verwendete Reagenzien und Puffer.....	26

3.2.2.1.2 Geräte	27
3.2.2.1.3 Versuchsdurchführung	27
3.2.2.2 High Performance Liquid Chromotography (HPLC)	28
3.2.2.2.1 Verwendete Reagenzien und Puffer.....	29
3.2.2.2.2 Geräte	29
3.2.2.2.3 Versuchsdurchführung	29
3.2.2.2.4 Statistische Auswertung des Sialinsäure-Gehalts in den einzelnen 19 Segmenten.....	31
3.2.3 Die funktionelle Charakterisierung des Kontraktionsmusters in ausgewählten Segmenten	31
3.2.3.1 Live Imaging.....	31
3.2.3.1.1 Chemikalien und Reagenzien	31
3.2.3.1.2 Geräte.....	32
3.2.3.1.3 Versuchsdurchführung	32
3.2.3.1.4 Statistische Auswertung der Kontraktionsstudien von Segment 6 (Caput) und Segment 18 (Cauda).....	33
4 Ergebnisse	34
4.1 Die morphologischen und strukturellen Aspekte der Segmentgrenzen	35
4.1.1 Darstellung einzelner Segmente mittels Methylenblau	35
4.1.2 Zweidimensionale Darstellung der Segmentgrenze durch Immunfärbungen von Kollagenfasern	36
4.1.3 Dreidimensionale Darstellung der Segmentgrenze: Rekonstruktion nach Eosinfärbung	38
4.1.4 Dreidimensionale Darstellung der Segmentgrenze: CLARITY	40
4.1.5 Nachweis größerer Gefäßäste und Nervenfasern innerhalb einer Segmentgrenze.....	44
4.2 Die biochemische Charakterisierung des Sialinsäure-Gehalts von Spermatozoen in den einzelnen Segmenten	45

4.3 Die funktionelle Charakterisierung des Kontraktionsmusters in ausgewählten Segmenten	51
5 Diskussion	60
5.1 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse	60
5.2 Die morphologischen und strukturellen Aspekte der Segmentgrenzen	61
5.3 Die biochemische Charakterisierung des Sialinsäure-Gehalts von Spermatozoen in den einzelnen Segmenten	66
5.4 Die funktionelle Charakterisierung des Kontraktionsmusters in ausgewählten Segmenten	72
6 Zusammenfassung	78
7 Summary	79
8 Abkürzungsverzeichnis in alphabetischer Reihenfolge	80
9 Abbildungsverzeichnis	82
10 Literaturverzeichnis	84
11 Erklärung zur Dissertation	99
12 Danksagung	100

1 Einleitung

Der Nebenhoden übernimmt die Funktion des Transports, der Reifung und der Speicherung von Spermien. Im Hoden werden Spermatozoen und das männliche Geschlechtshormon Testosteron gebildet. Unbewegliche und unreife Spermien verlassen über die Ductuli efferentes das Rete testis des Hodens und werden weiter in den Nebenhoden transportiert. In den proximalen Anteilen des Nebenhodens sind die Spermatozoen noch unbeweglich und nicht befruchtungsfähig. Während der Passage durch den Nebenhodengang erfahren die Spermatozoen molekulare Veränderungen. Sie benötigen einige Zeit, um den distalen Bereich des Nebenhodens zu erreichen, wo sie gespeichert werden. Bewegliche und befruchtungsfähige Spermien verlassen den Nebenhoden und werden über den Samenleiter und die Harnröhre ausgestoßen (Sobotta und Welsch 2009).

1.1 Aufbau des Nebenhodens

1.1.1 Makroskopische Anatomie des Nebenhodens

Der männliche Reproduktionstrakt wird gebildet aus dem Hoden (Testis), dem Nebenhoden (Epididymis), dem Samenleiter (Ductus deferens), den akzessorischen Geschlechtsdrüsen, und zwar der Bläschendrüse (Glandula vesiculosa), der Vorsteherdrüse, Prostata, und der COWPERschen Drüse (Glandula bulbourethralis), sowie aus dem Penis und dem Hodensack (Scrotum; Holstein 2008).

Der Nebenhoden entwickelt sich wie der Ductus deferens und die Glandula vesiculosa aus dem Wolffschen Gang (Robaire und Hinton 2015). Der Nebenhoden ist ein paarig angelegtes Organ, das dem Hoden an der Hilumseite anliegt. Er ist über die 8 bis 12 Ductuli efferentes, abhängig von der Spezies, mit dem Rete testis des Hodens verbunden (Holstein 2008). Der Nebenhoden enthält einen stark gewundenen Gang, den Ductus epididymis. Die Länge des Nebenhodengangs variiert zwischen den einzelnen Spezies. So ist er beim Menschen 3-6 m, der Ratte 3 m und der Maus 1 m lang (Joseph et al. 2009; Hinton et al. 2011)

Makroskopisch lässt sich der Nebenhoden in Kopf (Caput), Körper (Corpus) und Schwanz (Cauda) gliedern. In einigen Spezies wie bei der Ratte und Maus wurden die Anfangssegmente des Caput als Initialsegment (IS) definiert (Robaire und Hinton 2015).

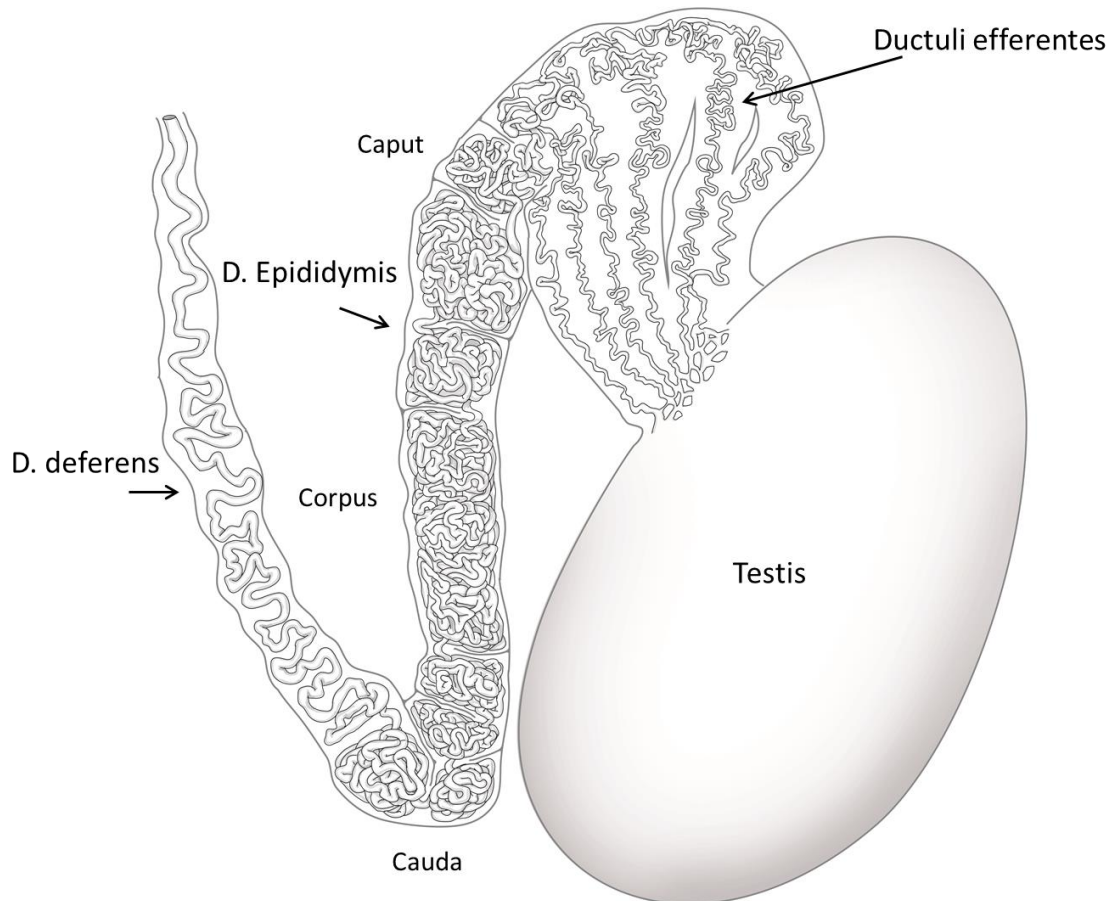


Abb. 1: Schematische Darstellung des Nebenhodens

Über die Ductuli efferentes ist der Nebenhoden mit dem Hoden verbunden. 8-12 Ductuli efferentes münden in einen einzelnen Gang, den Ductus epididymis. Die Hauptregionen des Nebenhodens Caput, Corpus und Cauda sind eingezeichnet. Der Cauda schließt sich der Ductus deferens an.

1.1.2 Mikroskopische Anatomie und Funktion des Nebenhodens

Der Nebenhoden ist von einer dünnen Tunica albuginea umgeben. Diese umfasst auch die Ductuli efferentes, die in den Nebenhodengang, Ductus epididymis, münden. Die Ductuli efferentes bestehen aus einem unterschiedlich hohen, mehrreihigen Epithel und weniger differenzierten glatten Muskelzellen. Die meisten ins Lumen reichenden Epithelzellen besitzen Kinozilien und sollen eine Funktion beim Weitertransport der noch unbeweglichen und unreifen Spermien in den Nebenhodengang übernehmen (Holstein 2008). Eine andere Epithelzellenpopulation besteht aus Mikrovilli-tragenden Zellen, durch welche eine Resorption von ca. 90 % der Hodenflüssigkeit erfolgt. Dadurch werden der Flüssigkeitsstrom im Ductus epididymis verringert sowie die Spermien und die luminalen Bestandteile konzentriert (Jones und Clulow 1987; Clulow et al. 1994).

Die Wand des Ductus epididymis besteht aus einem gleichmäßig hohen, zweireihigen Epithel und glatten Muskelzellen. In den verschiedenen Spezies werden unterschiedliche Typen von differenzierten Epithelzellen im Nebenhodengang beschrieben (Robaire und Hinton 2015). So umfassen die Epithelzellen der Ratte z.B. u.a. die Haupt- und Basalzellen, die im gesamten Nebenhoden präsent sind, und die „clear cells“, die in allen Regionen außer dem IS aufzufinden sind (Shum et al. 2009). Hauptzellen und „clear cells“ sorgen für ein saures Milieu mit einer geringen Bikarbonatkonzentration, damit Spermien während ihrer Reifung und Speicherung im Ruhezustand verweilen (Shum et al. 2011). Ein gestörtes Milieu führt zu Infertilität, da die Spermien sich nicht mehr durch den weiblichen Reproduktionstrakt fortbewegen können (Blomqvist et al. 2006). Die Basalzellen werden für den Nachschub von anderen Epithelzellen in Verbindung gebracht. Zumindest ein Teil der Basalzellen enthält lange schmale Ausläufer in Richtung Lumen (Shum et al. 2008). Die genaue Funktion dieser Zellen muss noch weiter erforscht werden. Man geht davon aus, dass die langen Fortsätze das luminale Milieu prüfen und u.a. die Protonensekretion der „clear cells“ kontrollieren (Shum et al. 2008). In Richtung Ductus deferens verliert das Epithel an Höhe und das Lumen des Nebenhodengangs nimmt zu.

Die glatten Muskelzellen nehmen hinsichtlich der Dicke sowie der Anzahl an Muskelschichten von proximal nach distal zu. Die glatten Muskelzellen sind zirkulär um das Nebenhodengepithel arrangiert. Im Corpus fügen sich längs- und querorientierte Muskelzellen zur zirkulären Muskelschicht an. Im distalen Bereich bilden weitere Muskelzellen einen vollständigen zweiten Muskelmantel mit einer Dominanz an längsorientierten Muskelzellen (Baumgarten et al. 1971). In-vivo und- In-vitro Versuche konnten Spontankontraktionen im Caput und Corpus verschiedener Spezies nachweisen, die für den Transport der Spermien in Richtung Cauda sorgen (Muratori und Contro 1951; Talo et al. 1979; Mewe et al. 2006b; Mietens et al. 2014). Des Weiteren konnte eine Abnahme der Frequenz und eine Zunahme der Amplitude von Caput nach Cauda beobachtet werden. Im distalen Anteil des Nebenhodengangs konnten geringe bis keine Spontankontraktionen nachgewiesen werden (Risley und Skrepetos 1964b; Hib und Ponzio 1977; Talo et al. 1979; Pholpramool und Triphrom 1984; Mewe et al. 2006b). Die in der Cauda befindlichen reifen Spermien werden gespeichert und auf die Emission und Ejakulation vorbereitet (Robaire und Hinton 2015; Breton et al. 2016).

Die nervale Versorgung des Nebenhodens erfolgt über sympathische, parasympathische, peptiderge, purinerge und nitrerge Fasern (Kuntz und Morris 1946; Risley und Skrepetos 1964b; Baumgarten et al. 1968; Nouhouayi und Négulesco 1985; Lakomy et al. 1997) und nimmt zur Cauda hin zu (siehe 1.3.1).

Der Transport der Spermien durch den gesamten Nebenhoden dauert etwa zehn Tage, kann aber zwischen den verschiedenen Spezies variieren. Diese Zeit wird auch benötigt, damit Spermien ihre Beweglichkeit und Befruchtungsfähigkeit erlangen (Orgebin-Crist 1967). Spermien, die aus dem Hoden stammen, sind weniger bis gar nicht befruchtungsfähig. Im Vergleich zu anderen Spezies sind Schwangerschaften mit menschlichen Spermien aus proximal gelegenen Segmentabschnitten auch möglich (Robaire und Hinton 2015).

1.1.3 Segmentierung des Nebenhodens

Neben der makroskopischen Einteilung des Nebenhodens in Caput, Corpus und Cauda erfolgt eine zusätzliche Gliederung des Nebenhodens durch Bindegewebssepten in einzelne Segmente (Abb. 2; Turner et al. 2003; Holstein 2008). Die Bindegewebssepten verleihen dem Nebenhoden Stabilität und sorgen möglicherweise für eine segmentspezifische Genexpression und ein individuelles luminales Milieu, welche für die Reifung der Spermien von Bedeutung sind (Turner et al. 2003; Turner et al. 2007b; Robaire und Hinton 2015). Sie enthalten Kollagenfasern, elastische Fasern, Nervenfasern und Blutgefäße, um tiefer gelegene Organabschnitte zu erreichen und zu versorgen (Thong et al. 2014; Hirashima 2016; Domeniconi et al. 2016). Die Segmentierung bildet sich ab dem 18. Entwicklungstag des Embryos aus und wird postnatal ab dem 5. Tag makroskopisch sichtbar (Hinton et al. 2011; Domeniconi et al. 2016; Hirashima 2016). Es konnten bei der Ratte 19 Segmente (Abb. 2), bei der Maus 10 Segmente und beim Menschen 5-10 Segmente (Holstein 1969; Jelinsky et al. 2007) identifiziert werden.

Auf Grund der besonderen Eigenschaften der ersten Segmente auf histologischer und genetischer Ebene (Fawcett und Hoffer 1979; Scheer und Robaire 1980; Hinton et al. 1998; Sipilä et al. 2006) wurde in einzelnen Spezies das IS als Anfangsteil des Caput speziell definiert. Bei der Ratte wurden die Segmente 1-3, manchmal auch Segment 4 und bei der Maus das erste Segment als IS definiert (Jelinsky et al. 2007). Segment 12 der Ratte, welches sich in der Corpusregion befindet, kann in Segment 12A und 12B aufgeteilt werden (Zhang et al. 2011). Die Kommunikation der einzelnen Segmente

miteinander und die Charakterisierung der Übergangsstelle von einem Segment in das nächstliegende Segment sind noch unbekannt. Dreidimensionale Darstellungen vom Nebenhodengang z.B. durch CLARITY könnten diesen Bereich besser charakterisieren und mehr Informationen liefern.

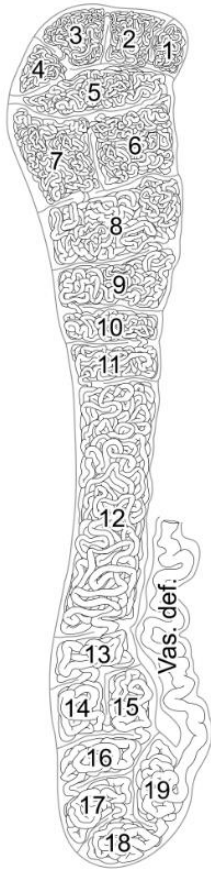


Abb. 2: Schematische Darstellung der Segmentierung des Nebenhodens der Ratte

Eingezeichnet sind die 19 Segmente im Nebenhoden der Ratte. An Segment 19 schließt sich der Ductus (Vas) deferens an.

Der Nebenhoden besteht aus einem zusammenhängenden Gangsystem. Dennoch konnten regionsspezifische Unterschiede in der Genexpression gefunden werden (Turner et al. 2003; Sipilä et al. 2006; Cornwall 2009). Genexpressionsanalysen zeigten im Caput z.B. eine Genomregulierung durch testikuläre Faktoren, die nur im distalen Caput Bereich auch Androgene einschließen (Sipilä et al. 2006).

Die Existenz einer Barriere zwischen zwei direkt benachbarten Segmenten konnten durch Turner et al. 2007a,b und Stammler et al. 2015 nachgewiesen werden. Turner et al. stellten die Hypothese auf, dass die Signalübertragung im Interstitium auf ein Segment beschränkt ist und der Übertritt ins nächstliegende Segment durch Bindegewebssepten

behindert ist. Sie perfundierten in den interstitiellen Raum des ersten oder zweiten Segments eines Rattennebenhodens Wachstumsfaktoren (u.a. EGF, FGF₂ oder VEGFA). Die Kontrollgruppe wurde mit Wachstumsfaktoren und Kollagenase interstitiell perfundiert. Eine mitogen aktivierte Kinaseaktivität wurde nur in dem interstitiell perfundierten Segment festgestellt, während bei der Kontrollgruppe die Kinaseaktivität auch im benachbarten Segment festgestellt werden konnte (Turner et al. 2007b). Des Weiteren konnten sie einen bedeutenden Unterschied in der Genexpression zwischen dem ersten und zweiten Segment nach Ligation der Ductuli efferentes der Ratte nachweisen (Turner et al. 2007a). Das war hauptsächlich dadurch bedingt, dass der Einfluss von luminalen Faktoren aus dem Hoden auf Segment 1 begrenzt war. Sie postulierten also segmentspezifische Unterschiede in der Genexpression (Turner et al. 2007a).

In einem Mausmodell mit aufsteigender *E. coli*-Infektion konnten Stammler et al. nach drei Tagen eine Zerstörung des Epithels im letzten Segment, sowie Bakterien im Lumen des Gangs in diesem Segment nachweisen. In dem darüber befindlichen Segment fehlten Bakterien und der Durchmesser des Gangs war reduziert. Es wird angenommen, dass eine Ausbreitung der Infektion im Nebenhoden durch eine Obstruktion in dem darüber befindlichen Segment verhindert wird und die Septierung somit auch intraluminal eine Barriere bildet (Stammler et al. 2015). Eine genaue Charakterisierung der Barrierefunktion des Septums steht noch aus.

1.2 Sialinsäuren und Glykosylierung

1.2.1 Die Sialinsäuren

Sialinsäuren wurden zeitgleich in den 1930er Jahren das erste Mal von Gunnar Blix und Ernst Klenk entdeckt und erforscht. Blix isolierte Sialinsäurederivate aus Mucinen der Glandulae submaxillares vom Rind (Blix et al. 1957; Lundblad 2015). Klenk wies Sialinsäurederivate in Glykolipiden des menschlichen Gehirns nach (Faillard 1989). Sialinsäuren sind an zahlreichen biologischen Prozessen beteiligt, wie der Zelldifferenzierung und Ausbildung von Metastasen. Sie haben einen großen Stellenwert in der Tumorforschung eingenommen. So konnte ein erhöhter Sialinsäure-Gehalt in verschiedenen Krebszellen identifiziert werden (Bos et al. 2009).

Über 50 verschiedene Derivate der Neuraminsäure kommen in höherentwickelten Säugetieren und Mikroorganismen vor. In Säugetieren sind die zwei häufigsten Sialinsäuren N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) und N-Glykolyneuraminsäure (Neu5Gc; Abb. 3; Angata und Varki 2002). Neu5Gc wird von der Cytidin-Monophosphat-N-Acetylneuraminsäure-Hydroxylase aus Neu5Ac durch Anhängen eines Sauerstoffatoms an den N-Acetylrest synthetisiert (Kawano et al. 1995).

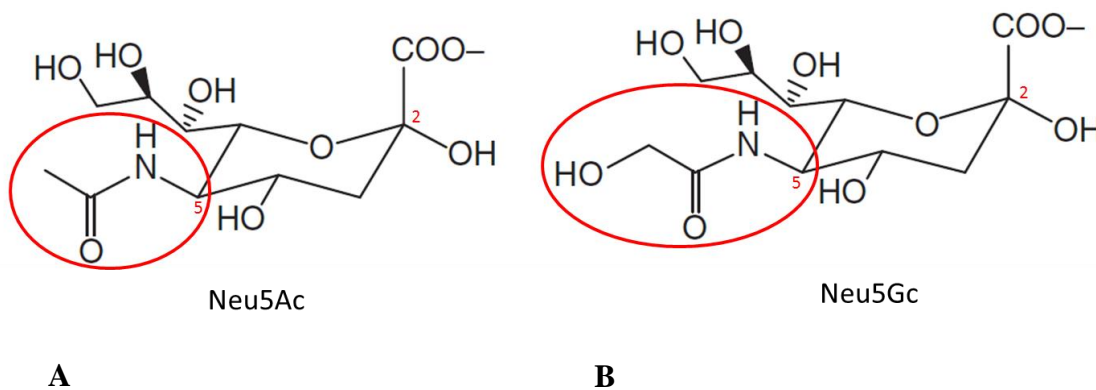


Abb. 3: Molekulare Darstellung von Neu5Ac und Neu5Gc, modifiziert nach Arne Lundblad (2015)

Neu5Ac (A) unterscheidet sich von Neu5Gc (B) durch Hydroxylierung des N-Acetylrestes am C5-Atom. Am C2-Atom tragen sie eine Carboxylgruppe.

Die Sialinsäuren sind elektronegativ geladene α -Ketosäuren bestehend aus einem C9-Grundgerüst (Varki 1992; Münster-Kühnel und Hinderlich 2013). Am C2-Atom enthalten sie eine Carboxylgruppe und an der C5-Position eine Aminogruppe. Neu5Ac

enthält am C5-Atom eine Acetylgruppe und Neu5Gc am C5-Atom eine Glykosylgruppe (Varki und Schauer 2009). Die verschiedenen Derivate der Sialinsäuren entstehen durch Substitution der Hydroxylgruppe mit Acetat, Laktat, Sulfat oder Phosphatester (Angata und Varki 2002).

Sialinsäuren befinden sich in der Regel als Monosialinsäurereste an den terminalen Enden von Glykoproteinen und Glykolipiden, wo sie z.B. der Zellerkennung oder als Mediator für Rezeptor-Ligandenbindungen dienen. Die Sialylierung von Glykokonjugaten findet im Golgi-Apparat und im endoplasmatischen Retikulum (ER) statt. Hier befinden sich die meisten Glykosyltransferasen (Chammas et al. 1996). Bei Glykoproteinen können Sialylierungen sowohl an N-Glykanen (Abb. 4) als auch an O-Glykanen stattfinden. Bei einer Verknüpfung von 2, 3-7 oder mehr als 8 Sialinsäuren, spricht man von Di-, Oligo- oder Polysialylierung (Abb. 5; Sato 2013). Die Gesamtheit an Sialinsäuren auf der extrazellulären Plasmamembran wird als Sialom bezeichnet (Varki und Schauer 2009).

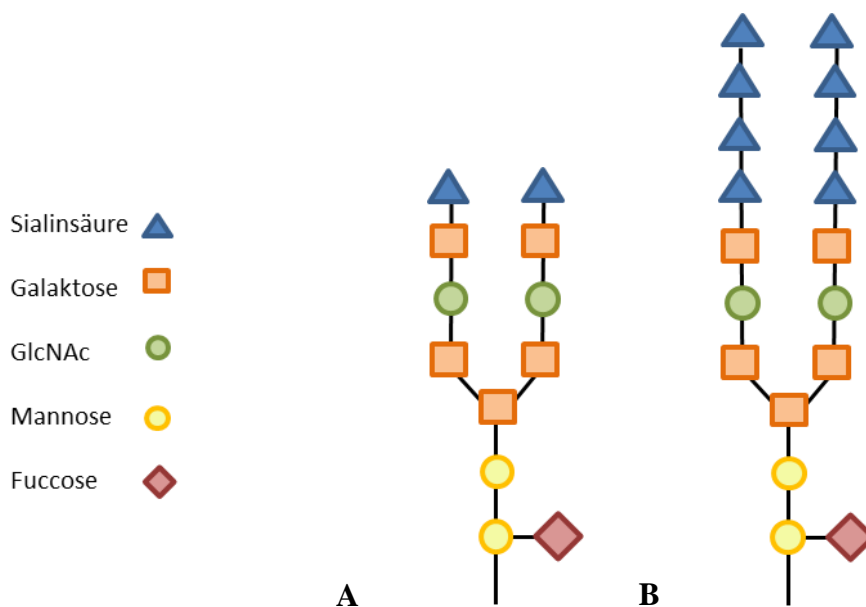


Abb. 4: Schematische Darstellung der Position von Sialinsäuren

Sialinsäuren befinden sich an den terminalen Enden von Glykoproteinen und Glykolipiden. Exemplarische Darstellung der (A) Monosialylierung (B) Oligosialylierung,

1.2.2 Der Aufbau eines Spermiums in Hinblick auf die Glykosylierung und Sialylierung

Spermien lassen sich makroskopisch in Kopf und Schwanz gliedern. Der Kopf enthält das Akrosom und den Zellkern mit dem haploiden Chromosomensatz. Das Akrosom, welches in der Spitze des Kopfes lokalisiert ist, enthält lytische Proteine wie Akrosin zur Durchdringung der Eizellhülle im weiblichen Genitaltrakt. Der Schwanz wird nochmals in Hals, Mittel-, Haupt- und Endstück gegliedert. Der gesamte Schwanz wird von einem Axonema durchzogen, welches im Aufbau der 9 + 2 Struktur von Kinozilien entspricht und der Fortbewegung des Spermiums dient. Der Hals sorgt für die Verankerung des Axonema am Zellkern. Das Mittelstück enthält Mitochondrien zur Bereitstellung von Energie in Form von ATP-Molekülen für den Geißelapparat. Das Hauptstück entspricht dem längsten Anteil des Schwanzes. Das Endstück beinhaltet die Mikrotubuli (Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012). Spermien erreichen beim Menschen eine Länge um die 60 μm , beim Affen um die 70 μm und bei der Ratte um die 160 μm (Prakash et al. 2014).

Die extrazelluläre Schicht der Plasmamembran, die Glykokalix, im Englischen bekannt unter „sugar coat“, bildet die Oberfläche aller Zellen. Sie besteht aus Glykoproteinen und Glykolipiden. Diese setzen sich zusammen aus einem Komplex von Oligo- und Polysacchariden, an denen Protein- und Lipidmoleküle gebunden sind. Sie sind fest oder oberflächlich über polare oder hydrophobe Bindungen mit der Membran verankert (Abb. 5; Schröter et al. 1999).

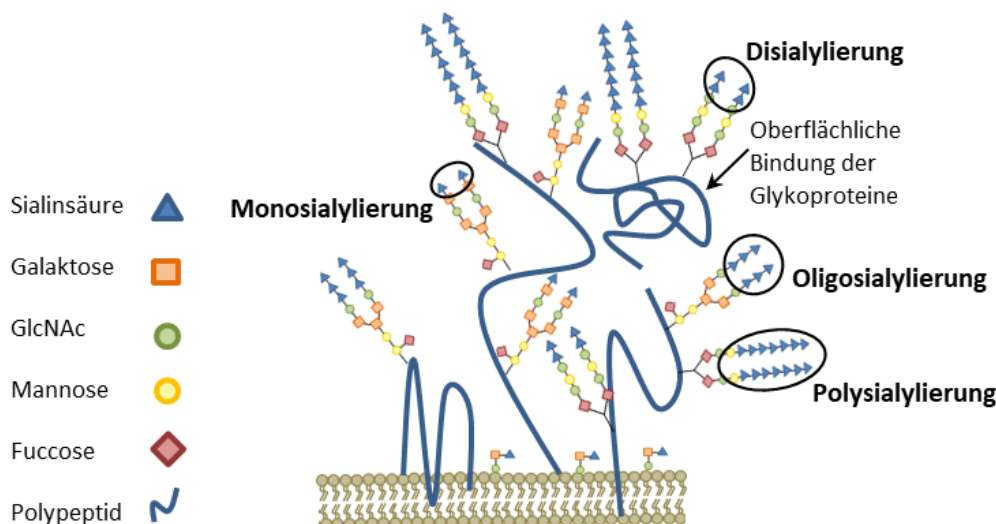


Abb. 5: Exemplarische Darstellung der Spermienglykokalix

Modell der Spermienmembran mit Fokus auf die unterschiedlichen Erscheinungsformen von Sialinsäuren. Dargestellt sind die Mono-, Di-, Oligo- und Polysialylierung.

Die Glykosylierung der Spermien erfolgt sowohl während der Spermatogenese im Hoden, als auch im Nebenhodengang und während der Kapazitation (Cheon und Kim 2015). Die Membran von menschlichen Spermien enthält mehrere hundert verschiedene Proteine (Naaby-Hansen et al. 1997). Ca 91,7 % der extrazellulären Membranproteine aller Zellen sind glykosyliert (Gahmberg und Tolvanen 1996; Benoff 1997). Die Glykokalix von Spermien (aus Meerschweinchen) mit einer Dicke von 20-60 nm (Bearer and Friend, 1990) ist im Vergleich zu somatischen Zellen wie Erythrozyten mit einer Dicke von 10 nm deutlich größer (Yoon und You 2016). Die Glykokalix enthält zahlreiche verschiedene Glykokonjugate. Die Sialinsäuren sind wichtige Bestandteile der Glykokalix von Spermien. Einer der wichtigsten glykosylierten Moleküle für die Befruchtungsfähigkeit eines Spermiums ist der Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI; Kondoh et al. 2005).

In den meisten Fällen führen eine retrograde Ejakulation, Gangobstruktionen und immunologische Infektionen im Reproduktionstrakt zu einer ausbleibenden Schwangerschaft. Spermien können aber auch während ihrer Passage durch den Nebenhoden Defekte erleiden, wie den Verlust von Sialinsäuren. Die Sialylierung von Spermien verhindert zum einen die Phagozytose durch Leukozyten im weiblichen Genitaltrakt (Toshimori et al. 1991), und zum anderen sind sie an der Interaktion mit der Zona pellucida beteiligt (Ma et al. 2012). Ligationsversuche der Ductuli efferentes haben gezeigt, dass die Fertilisierungsrate von Spermien aus den Tubuli seminiferi und aus den proximalen Bereichen des Nebenhodens gegenüber ejakulierten Spermien verringert ist (Robaire und Hinton 2015). Die Passage der Spermien durch den Nebenhoden ist somit unerlässlich, um ihre Reife zu erhalten. Hierbei erfolgt u.a. eine Veränderung des Glykoms (Gatti et al. 2000; Saxena et al. 2002).

Die große Vielzahl an Kombinationsmöglichkeiten der Glykoproteine und Glykolipide machen die Glykokalix für die einzelne Zelle sehr spezifisch. Dadurch übernimmt die Zelle eine ganz individuelle Funktion. Die Glykokalix dient der Kontaktaufnahme zwischen den Zellen, der Zellidentifizierung und der Zellkommunikation (Buselmaier 2015). Die Glykokalix der Spermien ermöglicht die Kapazitation, die Spermienbeweglichkeit, das Überleben des Spermiums im weiblichen und männlichen Genitaltrakt, die Akrosomenreaktion, das Binden der Zona pellucida sowie die Gametenfusion (Schröter et al. 1999).

1.2.3 Die funktionelle Bedeutung von Sialinsäuren der Spermien im weiblichen Genitaltrakt

Der Mucus des Eileiters enthält große Mengen an Glykosaminoglykanen (Suarez et al. 1997). Bei der Passage durch die Tuba uterina verengt sich das Lumen des Eileiters auf den Durchmesser eines Spermiums. Es entsteht eine Interaktion zwischen der Spermenglykokalix und der Oberfläche des Eileiterepithels über Glykokonjugate (Suarez 2002). Die Glykokonjugate sind speziesspezifisch, um eine speziessübergreifende Fertilisierung zu verhindern (Schröter et al. 1999). So erfolgt beim Hamster und der Ratte eine Bindung an das Epithel über Sialinsäuren (DeMott et al. 1995; Cortés et al. 2004) und bei Pferden über Galactose (Dobrinski et al. 1996). Beim Schwein binden Spermien bevorzugt LewisX (LeX) und bi-antennary α 2,6 sialylierte N-acetyllactosamin-Einheiten (bi-SiaLN) des Eileiterepithels (Kadirvel et al. 2012). Im Zusammenhang mit der Ovulation verändern sich die Kohlenhydratreste, die zunächst an der Bindung zwischen Spermien und Eileiterepithel beteiligt waren, sodass nun andere Kohlenhydratreste bei der Interaktion zwischen Spermien und Zona pellucida eine Rolle spielen (Suarez 2002). Bei Spermien vom Rind konnte zum Beispiel eine Affinität zu Fucose bei der Kapazitation und eine Affinität zu Mannose bei Bindung an die Zona pellucida nachgewiesen werden (Revah et al. 2000).

Die Glykokalix verändert sich durch molekulare und biochemische Prozesse während der Passage des Spermiums durch den Nebenhodengang und erhält dabei seine Fertilisierungsfähigkeit (Robaire und Hinton 2015). Zum einen spielt die Zeit des Transportes durch den ganzen Ductus eine tragende Rolle für die Spermienreifung, zum anderen die Interaktion der Spermien mit der luminalen Flüssigkeit (Robaire und Hinton 2015). Wie unter 1.2.2 beschrieben ist eine der biochemischen Veränderungen der Spermienoberflächen die Sialylierung. Eine regionale Analyse des Sialoms der Spermienoberfläche wies eine Zunahme von Caput nach Cauda nach (Ma et al. 2016). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Sialyltransferase-Aktivität im Caput um das 15-fache erhöht ist als in der Cauda (Bernal et al. 1980). Daten zu einer segmentalen Untersuchung des Sialoms auf der Spermenglykokalix existieren nicht. In der hier vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Sialinsäure-Gehalt in allen 19 Segmenten der Ratte auf der Spermienoberfläche untersucht.

1.3 Der Einfluss des cholinergen Systems auf die Kontraktilität und Relaxation

1.3.1 Die Innervation des Nebenhodens

In vielen Organen verlaufen Nervenfasern mit Blutgefäßen in den Bindegewebssepten zu ihren Zielstrukturen, z.B. im Thymus, in der Glandula parotis und auch im Nebenhoden.

Mitchell beschrieb erstmals an totgeborenen Babys die nervale Versorgung des männlichen Genitaltraktes. Dieser wird innerviert durch den N. spermaticus superior, den N. spermaticus intermedius und den N. spermaticus inferior (Mitchell 1935).

Der Nebenhoden wird hauptsächlich durch den N. spermaticus inferior versorgt. Einige zusätzliche Fasern aus dem Plexus vesicalis verlaufen über den Ductus deferens zum Nebenhoden. Große Nervenplexus umschlingen den Nebenhodengang und viele kleinere Nervenfaserbündel versorgen das im Bindegewebe gelegene Gefäßbett. Dickere und dünnere Nervenfasern des Nervenplexus erreichen sowohl die Muskulatur als auch das Epithel. Die Fasern, die zum Epithel verlaufen, haben einen größeren Durchmesser im Vergleich zu den Fasern, die zur Muskulatur ziehen. Durch Exstirpation bzw. Degeneration von Nervenfasern haben Kuntz und Morris gezeigt, dass die efferenten Fasern des N. spermaticus inferior größtenteils sympathisch sind und die Gefäße und Muskulatur neural versorgen. Einige parasymphatische Anteile des Plexus vesicalis verlaufen ebenfalls zur Muskulatur (Kuntz und Morris 1946).

Das Innervationsmuster des Nebenhodens hängt stark mit seiner Funktion zusammen. So erreichen weniger Nervenfasern Caput und Corpus (Mitchell 1935; El-Badawi und Schenk 1967; Kaleczyc et al. 1993), und die glatte Muskulatur ist geringer ausgeprägt als in der Cauda (Baumgarten et al. 1971). Die Nervenfasern vermitteln die Funktion des Spermientransportes (Baumgarten und Holstein 1967) durch Kontraktionen. Der Transport wird über Spontankontraktionen im Nebenhodengang vermittelt (Muratori und Contro 1951). Die Cauda ist deutlich stärker innerviert (Mitchell 1935; El-Badawi und Schenk 1967; Kaleczyc et al. 1993) und die Muskulatur ist dicker (Baumgarten et al. 1971). In diesem Bereich sind wenige bis keine Spontankontraktionen vorhanden. Die Muskulatur muss relaxiert werden, damit Spermien gespeichert und auf die Emission und Ejakulation vorbereitet werden können (Baumgarten et al. 1971).

Die adrenerge und cholinerge Innervation des Nebenhodens wurde in verschiedenen Spezies untersucht (Muratori 1956; Baumgarten und Holstein 1967; Shirai et al. 1973). Studien am Menschen wiesen adrenerge und cholinerge Fasern im Caput, Corpus und Cauda nach. Adrenerge Fasern verliefen zur Muskulatur, ins Interstitium und zum Epithel. Die Datenlage zur cholinergen Innervation des Nebenhodens differiert. Shirai und Kollegen beschrieben den Verlauf der cholinergen Fasern zur Muskulatur und ins Interstitium, aber nicht zum Epithel (Shirai et al. 1973). Andere Studien konnten allerdings cholinergere Nervenfasern auch im Epithel nachweisen (El-Badawi und Schenk 1967; Silva et al. 2002). Weitere Untersuchungen zeigten eine Präsenz von cholinergen Nervenfasern in Corpus und Cauda (Risley und Skrepetos 1964a).

1.3.2 Acetylcholin

Acetylcholin (ACh) ist ein prä- und postsynaptischer Neurotransmitter des zentralen und peripheren Nervensystems, der die Kommunikation zwischen neuronalen Netzwerken, Neuronen und Effektorzellen vermittelt (Wessler et al. 1998; Rassow 2016). ACh kann sowohl von neuronalen als auch von nicht neuronalen Zellen synthetisiert, gespeichert und freigesetzt werden (Wessler et al. 1998). ACh ist nicht nur in höheren Lebewesen zu finden, sondern auch bei primitiven Organismen wie zum Beispiel Bakterien, Algen und Pilzen (Wessler et al. 1998). Das Enzym Cholinacetyltransferase (ChAT) synthetisiert aus Cholin und Acetyl-CoA ACh. Daher wird ChAT oft als Marker für cholinerge Neuronen verwendet. Der Abbau von ACh wiederum wird durch die Acetylcholinesterase (AChE) und Butyrylcholinesterase (BuChE) gesteuert (Koelle 1950) und in Cholin und Essigsäure gespalten.

ACh wird in Speichervesikeln von Neuronen über vesikuläre Acetylcholintransporter (VACht) aufgenommen (Erickson et al. 1996) und über Exozytose auf einen Stimulus hin wieder freigesetzt. Eine Aufnahme von ACh in cholinerge Zellen erfolgt über high-affinity choline transporter (ChT1; Okuda et al. 2000). Eine nicht neuronale Freisetzung von ACh kann über organische Kationentransporter erfolgen (OCTs; Wessler et al. 2001).

1.3.3 Muskarinerge und nikotinerge ACh-Rezeptoren

ACh löst über die verschiedenen Subtypen von muskarinergen oder nikotinergen Rezeptoren unterschiedliche Effekte aus. Muskelkontraktionen und Epithelsekernierungen werden in Organen wie im Gastrointestinaltrakt, in der Lunge oder im Harntrakt über die Aktivierung dieser Rezeptoren kontrolliert (Jositsch et al. 2009).

Es wird vermutet, dass eine Aktivierung muskarinerges ACh-Rezeptoren (mAChR) im Nebenhoden eine Kontraktionssteigerung zur Folge hat (Siu et al. 2006). Bei den mAChR wird zwischen fünf Rezeptortypen unterschieden (M1-M5). M1 bis M3 mAChR konnten in den verschiedenen Zelltypen des Nebenhodens detektiert werden. M3 mAChR konnte als einziger in den glatten Muskelzellen überwiegend im distalen Bereich identifiziert werden (Siu et al. 2006). mAChR wirken über G-Protein gekoppelten Rezeptoren. M1, M3 und M5 werden über G_q -Proteine gesteuert. Eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) führt zu einer Bildung der Signalmoleküle Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). IP_3 bewirkt eine Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem ER. Diese Calciumionen lösen im Nebenhoden wahrscheinlich über M3 mAChR Kontraktionen aus. M2 und M4 mAChR werden hingegen über die G_i -Proteine aktiviert und hemmen die Adenylatzyklase (AC; Abb. 6).

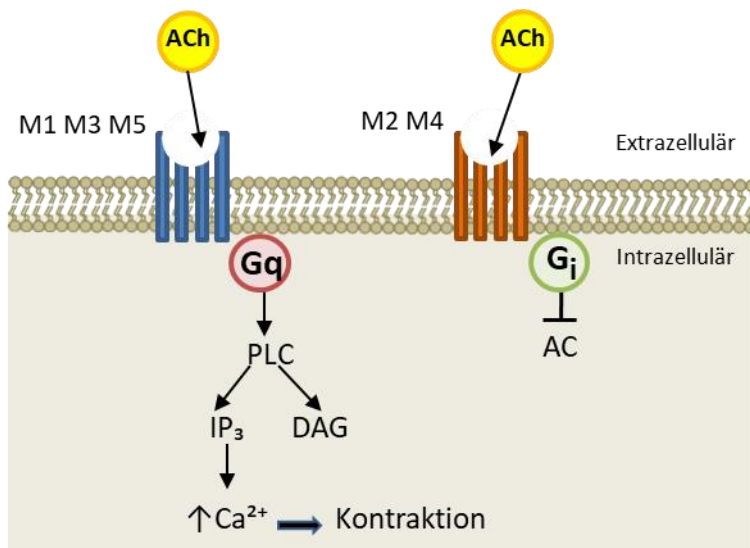


Abb. 6: Muskarinerges ACh-Rezeptor

Muskarinerges ACh-Rezeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die unter anderem über ACh stimuliert werden. Die M1, M3 und M5 mAChRs werden über G_q -Proteine gesteuert und führen zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur über eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels. Eine Aktivierung der M2 und M4 mAChRs über G_i -Proteine führen zu einer Hemmung der AC.

Nikotinerges ACh-Rezeptoren sind im Nebenhoden noch nicht bekannt. Im Hoden hingegen konnten einige Subtypen identifiziert werden. Dort wird vermutet, dass sie an der Zellteilung, am Stoffwechsel und an der Motilität der Spermien involviert sind (Schirmer et al. 2011).

1.3.4 Der Einfluss cholinergischer Agonisten und Antagonisten auf die Spontankontraktionen

In-vitro- und In-vivo Studien an verschiedenen Spezies haben gezeigt, dass cholinerge Agonisten und Antagonisten Spontankontraktionen des Nebenhodengangs beeinflussen (Muratori 1956; Laitinen und Talo 1981; Pholpramool und Triphrom 1984; Siu et al. 2006). ACh schwächte die Spontankontraktionen (Muratori 1956) und erhöhte die Frequenz und Amplitude der Kontraktionen im kaudalen Bereich (Hib 1976). Carbachol, ein ACh-Agonist, erhöhte die Frequenz der Kontraktionen in der Cauda. Atropin, ein ACh-Antagonist, hemmte die Kontraktionszunahme durch Carbachol (Laitinen und Talo 1981; Siu et al. 2006). Pholpramool und Triphrom machten Kontraktionsstudien mit Methacholin, ebenfalls ein Agonist von ACh, und beobachteten eine leichte Zunahme der Frequenz im Caput und Corpus. In der Cauda hingegen konnte keine Veränderung der Frequenz festgestellt werden, aber eine Abnahme der Amplitude (Pholpramool und Triphrom 1984). Differenzierte Untersuchungen hinsichtlich der Unterschiede im Kontraktionsmuster am Rattennebenhoden zwischen den einzelnen Segmenten wurden bisher noch nicht durchgeführt.

1.3.5 Lokalisation und Funktion der Stickstoffmonoxid-Synthase und dessen Einfluss auf die Kontraktilität

Bereits 1980 beschrieben Furchgott und Zawadzki eine Relaxation der glatten Gefäßwandmuskulatur durch einen endothelialen Faktor, der nach Aktivierung des mAChR durch ACh von den Endothelzellen freigesetzt wird (Furchgott und Zawadzki 1980). In nachfolgenden Arbeiten wurde dieser Faktor als endothelium-derived relaxing factor (EDRF) beschrieben (Furchgott et al. 1984) und später als Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert (Culotta und Koshland 1992). Somit erhielten Furchgott und Zawadzki schon 1980 Hinweise auf die Existenz einer endothelialen NO-Synthase (eNOS), die NO freisetzt und über den zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP)-Signalweg eine Relaxation der Gefäßwand auslöst (Waldman und Murad 1987; Moncada et al. 1991; Persson et al. 1993).

NO wird bei Bedarf durch die NO-Synthase gebildet. Drei Isoformen der NO-Synthase sind auf Grund ihres Isolierungsortes klassifiziert worden. Die eNOS, die neuronale NOS (nNOS) und die induzierbare NOS (iNOS). Sie unterscheiden sich in Lokalisation, Struktur und Regulation (Förstermann et al. 1994).

eNOS und nNOS werden konstitutiv gebildet. Sie werden aktiviert durch Calcium in Anwesenheit von Calmodulin (Bredt und Snyder 1990). Die iNOS wird beim Auftreten bestimmter Zytokine oder bakterieller Endotoxine gebildet (Moncada et al. 1991). Des Weiteren zählen iNOS und nNOS zur cytosolischen und eNOS zur membranständigen Fraktion (Kuhn 2016). Die NO-Synthase wurde im gesamten Nebenhoden nachgewiesen (Burnett et al. 1995). Die höchste Konzentration lag in der Cauda vor (Dun et al. 1996).

Einer der Effekte von NO ist die Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels (Waldman und Murad 1987; Moncada et al. 1991; Persson et al. 1993) durch Bindung an die lösliche Guanylatzyklase (sGC). Eine Relaxation der glatten Muskulatur ist die Folge (Bredt et al. 1990). sGC wird sowohl in Epithelzellen, als auch in der glatten Muskulatur des Nebenhodens exprimiert (Mewe et al. 2006a; Shum et al. 2008). Die genauen Mechanismen, die Einfluss auf die Aktivierung der NO-Synthase haben, wurden im NH noch nicht ausreichend beschrieben.

2 Zielsetzung

Die Untersuchungen wurden vor dem Hintergrund durchgeführt, dass Spermien während ihrer Passage durch den Nebenhodengang unterschiedlichen Mikromilieus ausgesetzt sind und dabei ihre Reife erlangen. Es ist bereits bekannt, dass die Epithelzellen im Nebenhodengang eine sogenannte Blut-Nebenhodenschranke bilden. Eine weitere Schranke wird im interstitiellen Raum durch Bindegewebssepten, die sich zwischen einzelnen Nebenhodenabschnitten (Segmenten) befindet, angenommen.

Ziel der vorliegenden Studien war eine weiterführende Charakterisierung der Segmentgrenzen und deren Stellenwert in struktureller, biochemischer und funktioneller Hinsicht. Diese sollte im Einzelnen beinhalten:

- (i) Die morphologischen und strukturellen Aspekte der Segmentgrenzen durch zwei- und dreidimensionale Darstellungen,
- (ii) die biochemische Charakterisierung durch Untersuchung der segmentalen Unterschiede im Sialinsäure-Gehalt der Spermatozoen als Beispiel für Modifikationen, die luminal im Nebenhodengang stattfinden und
- (iii) die funktionelle Charakterisierung des Kontraktionsmusters in ausgewählten Segmenten durch Live Imaging.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Herkunft des Gewebes

Das Untersuchungsgewebe stammte von männlichen Wistar Ratten und einer Kontroll-Maus, welche in den Räumen der Gießener Tierhaltung (Justus-Liebig-Universität) gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz gehalten und in Zusammenarbeit mit der Tierschutzbeauftragten unter der Tiernummer 469M 510M, 505M 506M 507M und A61/2012 geführt wurden. Die Euthanasie des Untersuchungsgewebes erfolgte im Alter von ca. 12 Wochen mit 5 % Isofluran und zervikaler Dislokation gemäß § 4 Abs. 3 des Tierschutzgesetzes, welches das Töten von Wirbeltieren zu wissenschaftlichen Zwecken erlaubt.

3.1.2 Behandlung der Proben

Für den Großteil der Versuche wurden die präparierten Nebenhoden über Nacht in Bouin'scher Lösung (Gemisch aus gesättigter Pikrinsäure, 37 %igem Formalin und 100 %igem Eisessig) fixiert und anschließend über eine Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 %) und Xylole in Paraffin eingebettet. Für weitere Versuche wurden Nebenhoden aufbereitet wie unter 3.2.1.1, 3.2.1.4, 3.2.2 und 3.2.3 beschrieben.

3.1.3 Geräte

Autosampler	Spark VE, Emmen, Holland
Axioskop2 plus-Mikroskop + Axiovision Software	Zeiss, München
Fluoreszenz-Detektor	Merck-Hitachi, Darmstadt
Hochdruckpumpe	Merck-Hitachi, Darmstadt
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM)	Zeiss, München
Lichtmikroskop	Motic, Wetzlar
Mikrotom RM2255	Leica, Wetzlar
PALM Laser Microdissection System	Zeiss, München
Säule LiCroCart 250-2 SuperSpher 100 RP C-18	Merck, Darmstadt
Speed-Vac	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Steuerungseinheit für HPLC	Merck-Hitachi, Darmstadt
Taumler: gyratory-rockers	Stuart, Staffordshire, UK

Vibratom/ Mikrotom HM 650 V

Zeiss, München

3.1.4 Programme

AdobePhotoshop CS2 (Adobe Systems Software, Dublin, Irland)

EuroChrom 2000 HPLC Software Version 1.65 (Knauer, Berlin)

GraphPad Prism 7.02 Software (Inc., Kalifornien, USA)

ImageJ; FiJi (<https://www.fiji.sc>)

Motic Images 2.0 (<https://www.motic.com>)

3.1.5 Chemikalien in alphabetischer Reihenfolge

Aceton	Merck, Darmstadt
Acetylcholin	Sigma-Aldrich, Hamburg
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich, Hamburg
Anilin	VWR International, Pennsylvania, USA
Azokarminlösung	Chroma-Gesellschaft Schmid & Co., Stuttgart-Untertürkheim
Bis -Acrylamid (A363,0050)	AppliChem, Darmstadt
Borsäure	Roth, Karlsruhe
3,3'- D iaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB)	Sigma-Aldrich, Hamburg
DMEM/F 12x10	Invitrogen Gibco, Neuseeland
E ssigsäure	Roth, Karlsruhe
Eosin	Sigma-Aldrich, Hamburg
Eserin	Sigma-Aldrich, Hamburg
Ethanol	Berken AHK, Ludwigshafen
Eukitt	Sigma-Aldrich, Hamburg
F ormaldehydlösung	Roth, Karlsruhe
G lucose	Sigma-Aldrich, Hamburg
Glucose Oxidase	Sigma-Aldrich, Hamburg
Glycerol	Roth, Karlsruhe
H EPES 1M, 4 °C	Sigma-Aldrich, Hamburg
Histodenz	Sigma-Aldrich, Hamburg
I nitiator (VA-044)	Wako Chemical GmbH, Neuss
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Hamburg

2-Mercaptoethanol	Fluka Analytical, Hamburg
Methanol	Roth, Karlsruhe
Mayer's Hämalaun	Merck, Darmstadt
4,5-Methyl-Dioxybenzidin (DMB)	Dojindo, Kumamoto, Japan
Methylenblau	Sigma-Aldrich, Hamburg
Minimal Essential Medium (MEM; Gibco)	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Hamburg
Natronlauge	Merck, Darmstadt
Natriumhydrosulfid	Sigma, Hamburg
Nickelsulfat	Merck, Darmstadt
N ω -Nitro-L-Arginin Methylester (L-NAME; Lot. Nr. 54675)	Biomol, Hamburg
Noradrenalin (Norepinephrin)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Normales Ziegen Serum	Sigma-Aldrich, Hamburg
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe
Peroxidase-markiertes Polymer: EnVision+ System- HRP labelled Polymer	Dako, Hamburg
Pikrinsäure	Sigma-Aldrich, Hamburg
Rinder-Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Hamburg
SDS (C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S)	Roth, Karlsruhe
Tetrahydrofuran	Merck, Darmstadt
Triton	Sigma-Aldrich, Hamburg
Tween-20	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid	Roth, Karlsruhe
Wolframatophosphorsäure	Sigma-Aldrich, Hamburg
Xylol	Roth, Karlsruhe

3.2. Methoden

3.2.1 Die morphologischen und strukturellen Aspekte der Segmentgrenzen

3.2.1.1 Perfusion

Bei der Perfusion werden Flüssigkeiten in Strukturen bzw. Gewebe injiziert. Durch die Verwendung unterschiedlicher Farbstoffe in der Tracer-Lösung können angrenzende Strukturen differenziert werden. In dem vorliegenden Versuch wurde der interstitielle Raum einzelner Segmente eines frisch entnommenen Rattennebenhodens mittels Perfusion von Methyleneblau dargestellt.

3.2.1.1.1 Verwendete Reagenzien und Puffer

PBS (0,136 M NaCl, 0,05 M Na₂ HPO₄ mal 2 H₂O, pH 7,4)

Methyleneblau

3.2.1.1.2 Versuchsdurchführung

- Herstellung der Tracer-Lösung aus Methyleneblau und PBS (Lösung sollte intensiv blau sein)
- Platzierung des frisch entnommenen Nebenhodens in einer Petrischale mit etwas PBS (Verhinderung der Austrocknung des Nebenhodens) unter einem Mikroskop
- Injektion der Tracer-Lösung in den interstitiellen Raum der Segmente 4, 8, 13 und 17 mit einer spitzen Kanüle (Cave: Kanüle nicht zu tief vordringen lassen, um den Gang nicht zu verletzen). Der interstitielle Raum sollte sich vollständig einfärben. Die Menge und Konzentration der Tracer-Lösung hat für diesen Versuch keine Relevanz.

3.2.1.2 Immunhistochemische Färbung und Immunfluoreszenzfärbung

Vorbereitung der Proben

Für die nachfolgenden immunhistochemischen Färbungen und Immunfluoreszenzfärbungen zur Darstellung von Kollagen- und Nervenfasern sowie Muskelzellen wurde das fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebe mit dem Mikrotom in 5 µm dicke Schnitte geschnitten und auf Objektträger gezogen. Nach Trocknung der Schnitte im Wärmeschrank bei 40 °C erfolgte eine Entparaffinierung in Xylol (3x je 5 min). Im Folgenden wird die Durchführung der einzelnen Versuche protokollarisch dargestellt.

3.2.1.2.1 Immunhistochemische Färbung zur Darstellung von Kollagenfasern

3.2.1.2.1.1 Verwendete Antikörper

anti-Collagen I alpha 1, Kaninchen polyklonal; Novusbio, Colorado, USA

- Verdünnung 1:50

3.2.1.2.1.2 Geräte

Axioskop2 plus-Mikroskop mit Axiovision Software

3.2.1.2.1.3 Versuchsdurchführung

- Rehydrierung der Schnitte in absteigender Alkoholreihe (5 min in 100 %, 30 min in 2 ml H₂O₂ 30%/ 50 ml Methanol und je 5 min in 96 % und 70 %)
- kurzes Waschen in Aqua dest., PBS und/oder PB
- Inkubation der Schnitte über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer mit dem im Verdünnungspuffer (PBS+ 0,2 % BSA + 0,1 % NaN₃) vermischten Primärantikörper: anti-Collagen I alpha 1 (s.o.)
- Waschen in PBS
- Zugabe des Peroxidase-markierten Polymers für weitere 30 min
- Entwicklung der Schnitte für 10 min in der Entwicklerlösung (PB 0,1 M pH 7,4, DAB, Ammoniumchlorid, Nickelsulfat, Glucose 10 %, Glucose-Oxidase)
- Waschen
- Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe (je 5 min in 70 %, 96 %, 100 %)
- Eindeckeln der Schnitte mit Eukitt

3.2.1.2.2 Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung von Kollagen- und Nervenfasern

3.2.1.2.2.1 Verwendete Antikörper

Primärantikörper

anti-Actin, alpha smooth muscle (SMA; A5228); Maus monoklonal; Sigma-Aldrich, Hamburg

- Verdünnung 1:1000

anti-Collagen I alpha 1 (s.o.)

- Verdünnung 1:50

anti-Actin, alpha smooth muscle (SMA; A2547), Kaninchen monoklonal; Sigma-Aldrich, Hamburg

- Verdünnung 1:1000

anti-Beta III Tubulin, Maus polyklonal; Merck, Darmstadt

- Verdünnung 1:250

Sekundärantikörper/ DAPI

Alexa Fluor, 488 nm Ziege anti-Kaninchen; Roche, Mannheim

- Verdünnung 1:500

Cy3, 550 nm Ziege anti-Maus; Jackson ImmunoResearch, Hamburg

- Verdünnung 1:500

DAPI (4',6-Diamidine-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid); Sigma, München

- Verdünnung 1:1250

3.2.1.2.2.2 Geräte

Axioskop2 plus-Mikroskop mit Axiovision Software

3.2.1.2.2.3 Versuchsdurchführung

- Entparaffinierung und Dehydrierung wie in 3.2.1.2
- Waschen des Gewebe 3x 10min in PBS
- Auftragen des Blockierungspuffers auf die Schnitte (2 % Normal-Ziege-Serum verdünnt in PBS) und Lagerung für 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
- Inkubation des Gewebes mit den Primärantikörpern über Nacht bei 4 °C:
 - Für die Darstellung der Kollagenfasern:
 - anti-Collagen I alpha 1 (s.o.)
 - SMA (A5228; s.o.)
 - Für die Darstellung der Nervenfasern:
 - anti-Beta III Tubulin (s.o.)
 - SMA (A2547; s.o.)
- Waschen mit PBS 2x 10 min

Bei allen folgenden Schritten wurde eine Lichtexposition der Schnitte vermieden.

- Inkubation der Schnitte mit dem Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur
 - Für die Darstellung der Kollagenfasern:
 - Alexa Fluor, 488 nm (s.o.)
 - Cy3, 550 nm (s.o.)
 - Für die Darstellung der Nervenfasern:
 - Cy3, 550 nm (s.o.)

- Alexa Fluor, 488 nm (s.o.)
- DAPI (s.o.)
- Waschen mit PBS 2x je 10 min, 4 % PFA 10 min und PBS 2x je 10 min
- Eindeckeln der Schnitte mit Glycerol

Die Aufnahmen erfolgten mit dem Axioskop2 plus-Mikroskop. Der Fokus lag auf einer Segmentgrenze.

Vorversuche der immunhistochemischen Färbungen mit dem Kollagen 1-Antikörper zeigten einen Reichtum an Kollagenfasern innerhalb einer Segmentgrenze, sodass bei der dreidimensionalen Rekonstruktion Eosin (3.2.1.3) und bei der CLARITY (3.2.1.4) der Kollagen 1-Antikörper als Bindegewebsmarker verwendet wurden.

3.2.1.3 3D-Rekonstruktion von Eosin gefärbten Schnitten

Eine dreidimensionale Darstellung von Strukturen kann durch ein Alignment (= Ausrichten von Bildern zueinander) von histologischen Schnitten mit dem Programm ImageJ konstruiert werden.

3.2.1.3.1 Verwendete Reagenzien

Eosin

3.2.1.3.2 Geräte

Axioskop2 plus-Mikroskop mit Axiovision Software

3.2.1.3.3 Versuchsdurchführung

Die Vorbehandlung des Gewebes erfolgte wie bei der immunhistochemischen Färbung und Fluoreszenzfärbung (siehe 3.2.1.2). 572 der 5 µm dicken Serienschnitte wurden nach Rehydrierung mit Eosin 5 min lang eingefärbt. Eine Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe (je 5 min in 70 %, 96 %, 100 %) folgte. Das Gewebe wurde mit Eukitt eingedeckelt.

Nach Trocknung der Schnitte erfolgte die Aufnahme aller Schnitte mit dem 10er Objektiv des Axioskop2 plus-Mikroskops von der Segmentgrenze zwischen dem 6. und 7. Segment. Durch ein Alignment des virtuellen Stapels an Fotos mit dem Programm ImageJ konnte eine Image-Sequenz erstellt werden. Eine Umwandlung der Image-Sequenz in ein sog. „flat image“ ermöglichte die Segmentgrenze mit dem 3D-Viewer darzustellen und nachzuverfolgen. Limitationen, die in der Diskussion näher ausgeführt werden, führten zu einer reduzierten Anzahl an Fotos für das Alignment. 94 von den erstellten 572 Fotos ließen sich „alignen“ (verbinden).

3.2.1.4 CLARITY

Die CLARITY ist eine histochemische Methode zum Verbildlichen von mikroskopischen Strukturen in dreidimensionaler Darstellung. Dabei muss das Gewebe nicht geschnitten werden, sondern kann als Ganzes betrachtet werden. Das Prinzip der Methode besteht im Klären von Fettgewebe, welches durch ein transparentes Gel ersetzt wird. Wie bei der klassischen Immunfluoreszenz (siehe 3.2.1.2.2) werden Antikörper mit einem fluoreszierenden Farbstoff verwendet. Der Kollagen 1-Antikörper wurde als Bindegewebsmarker genutzt. Zusätzlich wurde der SMA-Antikörper eingesetzt, um durch Anfärbung der Muskelschicht den Verlauf des Gangs sichtbar zu machen.

3.2.1.4.1 Verwendete Reagenzien, Puffer und Antikörper

4 % PFA

- 4 % PFA in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4

PBS

A3P0 Aliquot

- 3% Acrylamid, 0,25 % Initiator (VA-044), 0,05 % Bis-Acrylamid, PBS, pH 7,4

Clearing-Solution

- 10 % SDS, 200 mM Borsäure, PBS, pH 8,5

PBS+ 0,1 % Triton X

RIMS Puffer

- 88 % Histodenz, 0,1 % v/v Tween-20, 0,01 % NaAzid, PB, pH 7,5

Primärantikörper

SMA (A5228; siehe 3.2.1.2.2)

- Verdünnung 1:100

anti-Collagen I alpha 1 (siehe 3.2.1.2.2)

- Verdünnung 1:100

Sekundärantikörper/ DAPI

Alexa Fluor, 488 nm

- Verdünnung 1:200 (siehe 3.2.1.2.2)

Cy3, 550 nm

- Verdünnung 1:200 (siehe 3.2.1.2.2)

DAPI

- Verdünnung 1:300 (siehe 3.2.1.2.2)

3.2.1.4.2 Geräte

Vibratom

CLSM

3.2.1.4.3 Versuchsdurchführung

Der Nebenhoden wurde den Tieren entnommen, das anliegende Fettgewebe präpariert und die Tunica punktiert. Eine Fixierung in 4 % PFA folgte für einen Tag. Anschließend wurde das Gewebe 3 Tage in A3P0 bei 4 °C inkubiert und bei 37 °C mindestens 3h auf dem Heizblock auspolymerisiert. Nach Entfernung des überschüssigen Gels fand eine Klärung des Gewebes in Clearing-Solution bei Raumtemperatur für mindestens eine Woche statt. Anschließend konnte die Tunica des Nebenhodens abgezogen werden. Das Gewebe wurde entweder durch einen Längsschnitt halbiert oder mit dem Vibratom in 12 Scheiben (Schnitte) geschnitten. Der 1. Schnitt war 100 µm, der 2. 200 µm und die folgenden Schnitte waren 300 µm dick. Nach erneuter Lagerung in Clearing-Solution für 3 Tage wurde das Gewebe transparenter. Es konnte mit der Immunmarkierung fortgeföhren werden. Zunächst erfolgte ein Waschen des Gewebes 5mal über eine Stunde mit PBS+Triton X. Weitere Waschungen mit PBS+Triton X erfolgten nach Zugabe der mit PBS+Triton X verdünnten Primär- und Sekundärantikörper für je eine Woche. Alle zwei Tage mussten die Primär- bzw. Sekundärantikörper ausgewechselt werden, um eine intensive Färbung zu erhalten. Die Inkubation wurde abwechselnd im Kühlschrank, bei Wärme oder Raumtemperatur durchgeführt. Nach Zugabe der Sekundärantikörper fanden die weiteren Arbeitsschritte im Dunkeln statt. Anschließend wurde das Gewebe in RIMS-Puffer bei Raumtemperatur für mindestens einen Tag inkubiert und mit derselben Substanz eingedeckelt.

3.2.2 Die biochemische Charakterisierung des Sialinsäure-Gehalts von Spermatozoen in den einzelnen Segmenten

3.2.2.1 Laser-Capture-Mikrodissektion (LCM)

Bei der Lasercapturemikrodissektion handelt es sich um eine kontaminationsfreie Methode, um Gewebeproben oder einzelne Zellen zu isolieren. Anschließend erfolgt eine biochemische Analyse des gesammelten Probenmaterials.

3.2.2.1.1. Verwendete Reagenzien und Puffer

Azokarminlösung

Anilinalkohol

5 %ige Wolframatophosphorsäure

Anilin-Orange-Gemisch

96 %iges Isopropanol

Mayer´s Hämalaun

3.2.2.1.2 Geräte

Mikroskop Axiostar plus

Mikrotom

PALM Laser Microdissection System

Epson-Scanner

3.2.2.1.3 Versuchsdurchführung

Für die Lasermikrodissektion wurden mit dem Mikrotom 5 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt und auf herkömmliche Objektträger gezogen. Jeder zweite Folgeschnitt wurde auf einen mit Polyethylenaphthalat beschichteten Membranträger (MembraneSlide 1.0 PEN, Carl Zeiss) gezogen und im Wärmeschrank bei 40 °C über Nacht getrocknet.

Eine Azanfärbung nach Heidenhain erfolgte mit den auf herkömmlichen Glasobjektträgern gezogenen Schnitten und eine Hämalaunfärbung für die speziell beschichteten Membranobjektträger. Die nachfolgenden Färbungen werden schematisch aufgeführt.

Azanfärbung nach Heidenhain

- Entparaffinierung in Xylol (3x je 5 min)
- Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (je 5 min in 100 %, 96 %, 70 %)
- Waschen der Schnitte in Aqua dest.
- Vorbehandlung der Schnitte in Anilinalkohol für 5 min
- Waschen in Aqua dest.
- Kernfärbung in Azokarminlösung (12 min bei 56 °C).
- Differenzierung des Gewebes für 3 min in Anilinalkohol
- Waschen in PBS
- Einfärbung und Beizen des Bindegewebes auf den Schnitten mit 5 %iger Wolframatophosphorsäure für 1 h 30 min
- Bindegewebs- und Zytoplasmafärbung in Anilin-Orange-Gemisch für 1 h 30 min
- Entwässern des Gewebes in 96 %igem Isopropanol für 5 min
- Dehydrierung in Xylol (3x je 5 min)

- Eindeckeln der Schnitte mit Eukitt

Die getrockneten Schnitte wurden eingescannt und entlang der Bindegewebssepten entsprechend der Segmentgrenzen in 19 Abschnitte eingeteilt. Segment 12 wurde zusätzlich in proximal und distal diskriminiert (siehe Abb. 13).

Hämalaunfärbung für membranbeschichtete Objektträger

- Entparaffinierung in Xylol (2x je 2 min)
- Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (je 1 min in 100 %, 96 %, 70 %)
- Waschen in Aqua dest.
- Färbung mit Mayer´s Hämalaun für 1 min 30 sec
- Bläuen unter fließenden Aqua dest. für weitere 1 min
- Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe (je 30 sec in 70 %, 96 %; 5 min in 100 %)
- Trocknung der Schnitte

Durchführung der Lasermikrodissektion

Segmentweise wurden Spermien mit einem UV-Laser in 20-facher Vergrößerung des PALM-Mikroskops ausgeschnitten und in die Deckel von Adhesive Caps (Adhesive Cap 500 clear, Zeiss, München) katapultiert und gesammelt. Im Anschluss erfolgte eine Analyse der Sialinsäuren auf der Spermienoberfläche mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.

3.2.2.2 High Performance Liquid Chromotography (HPLC)

Die HPLC, auch als Hochleistungsflüssigkeitschromatographie bezeichnet, dient der Auftrennung von heterogenen Stoffen aus einer Probe. Die Auftrennung erfolgt zwischen einer festen und flüssigen Phase innerhalb einer Säule. Die Säule mit enthaltenen porösen Teilchen stellt die feste Phase und ein Lösungsmittel die flüssige Phase dar. Das Lösungsmittel liegt in zwei unterschiedlichen Konzentrationen vor. Eine Voreinstellung der HPLC sorgt für einen ansteigenden Gradienten oder eine isokratische Elution während des Durchflusses. Erst ab bestimmten Mischverhältnissen der Lösungsmittel werden die an der Säule gebundenen Sialinsäuren getrennt. Zum Schluss sorgen höhere Konzentrationen für das vollständige Entfernen der Bestandteile aus der Säule. Nach Injektion der zuvor hydrolysierten Probe in die Säule werden die Bestandteile der Probe unterschiedlich schnell von der Säule eluiert, da sie durch Wechselwirkungen mit der

festen Phase verschieden stark aufgehalten werden. Nach Passage der Säule detektiert ein Fluoreszenzdetektor die einzelnen Substanzen und eine spezielle HPLC-Software erstellt ein Chromatogramm am Computer. Als Referenzwerte dienen Standardreihen, die ebenfalls von der HPLC erfasst wurden. In der hier vorliegenden Doktorarbeit wurde der Sialinsäure-Gehalt auf der Spermienoberfläche bestimmt. Als Standardreihen wurden die Sialinsäuren Neu5Ac, Neu5Gc und 3-Desoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranulosonsäure (KDN) verwendet.

3.2.2.2.1 Verwendete Reagenzien und Puffer

Hydrolyse

- Essigsäure 100 %

Derivatisierung

- DMB-Reagenz
 - 4,5-Methyl-Dioxybenzidin (DMB)
 - Natriumhydrosulfid
 - Tetrahydrofuran (TFA)
 - 2-Mercaptoethanol
 - Natronlauge 30 %

Laufmittel A

- 4 % AcN, 4 % MeOH, 92 % H₂O, 0,1 % TFA

Laufmittel B

- 45 % AcN, 45 % MeOH, 10 % H₂O, 0,1 % TFA

3.2.2.2.2 Geräte

Speed-Vac

Steuerungseinheit

Hochdruckpumpe

Säule LiCroCart

Autosampler

Fluoreszenz-Detektor

ESI-MS

3.2.2.2.3 Versuchsdurchführung

Die abgetrennten Deckel mit den gesammelten Spermienproben von den „Adhesiv Caps 500 clear“ wurden jeweils in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß gegeben. Als Referenzwerte für die spätere Auswertung dienten Standardreihen mit Neu5Ac, Neu5Gc und KDN in

unterschiedlichen Konzentrationen. Ein Deckel ohne gesammelte Probe wurde parallel behandelt wie die zu analysierenden Proben und als Leerwert bezeichnet. Die Hydrolyse und Fluoreszenzmarkierung werden nachfolgend stichpunktartig aufgeführt.

Bei der Hydrolyse werden die Sialinsäurereste abgespalten, sodass später die Menge der einzelnen Sialinsäuren bestimmt werden kann:

- Trocknung der Proben
- Auffüllen der Proben mit 500 μ l 2 N Essigsäure
- Inkubation der Proben 90 min lang bei 80 °C
- mit einer Pipette 450 μ l der Lösung in ein Glas-Vial geben
- Trocknung der in den Glas-Vials enthaltenen Proben mittels Vakuums in einer Speed-Vac (1,5 h bei 7 °C) bis ein Feststoff übriggeblieben ist

Im Anschluss erfolgte eine Fluoreszenzmarkierung der Proben. Die Proben mit den enthaltenen Sialinsäuren wurden mit Fluorophor DMB markiert, um später im Detektor ein Signal für Neu5Ac, Neu5Gc und KDN zu erhalten:

- Zugabe von 40 μ l doppelt destilliertem Wasser und DMB-Puffer in die Glas-Vials
- die Proben vortexen und in ein Ultraschallbad legen
- Inkubation der Proben bei 55 °C, 2 h
- Reaktionsstopp durch Zugabe von 20 μ l 0,2 N NaOH
- erneutes Zentrifugieren

Die Proben waren nun für die HPLC-Analyse aufbereitet. Abwechselnd wurden die Proben und die Standardreihen in den Autosampler der HPLC platziert, um eventuelle Abweichungen im Chromatogramm zu erkennen. Das Injektionsvolumen betrug 20 μ l. Der Autosampler enthielt eine LiCroCart-Säule mit einer Temperatur von 45 °C. Die Flussgeschwindigkeit betrug 0,3 ml/min. Als Laufmittel wurden zwei Lösungen aus AcN, MeOH und H₂O benutzt. Das Erfassen der Signale erfolgte mittels Fluoreszenzdetektor (Ex: 372 nm; Em: 456 nm). Die gesamten Probendurchläufe benötigten 65 min.

Nach Beendigung der HPLC-Durchläufe konnten die Daten mit der EuroChrom 2000 HPLC Software analysiert werden. Ein Übereinstimmen der Retentionszeiten der einzelnen Ionen von der Probe mit den Standardreihen und der Leerwertprobe konnten die Anwesenheit von Sialinsäuren bestätigen. Die Berechnung des Sialinsäure-Gehalts

der einzelnen Segmente erfolgte über eine Flächenbestimmung unterhalb des Chromatogramms.

Es wurden fünf Tiere an verschiedenen Tagen innerhalb von sechs Monaten untersucht.

3.2.2.2.4 Statistische Auswertung des Sialinsäure-Gehalts in den einzelnen 19 Segmenten

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software GraphPad Prism 7.02. Die graphischen Darstellungen der Daten wurden mit demselben Programm erzeugt. Die Normalverteilung der Daten zwischen den einzelnen 19 Segmenten und innerhalb der verschiedenen Gruppen wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft. Mittels einfaktorieller ANOVA mit nachfolgenden post-hoc paarweisen Vergleichen mit Dunnett's-Test wurden Unterschiede zwischen den 19 einzelnen Segmenten und den verschiedenen Gruppen überprüft. Das Signifikanzniveau der Ergebnisse wurde wie folgt gekennzeichnet: $p \leq 0,001$ - *** (hoch signifikant); $p \leq 0,01$ - **; $p \leq 0,05$ - * und $p > 0,05$ - n.s. (nicht signifikant)

Der Gruppenvergleich wurde mit den einzelnen 19 Segmenten sowie mit den Regionen IS (Segment 1-3), Caput (Segment 4-9, ohne IS), Corpus (Segment 10-13) und Cauda (Segment 14-19) durchgeführt.

3.2.3 Die funktionelle Charakterisierung des Kontraktionsmusters in ausgewählten Segmenten

3.2.3.1 Live Imaging

Mittels Videomikroskopie wurden Spontankontraktionen sowie Kontraktionen nach Zugabe von Substanzen in einzelnen Gangstücken des Nebenhodens der Ratte aufgezeichnet.

3.2.3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Kollagen (eigene Herstellung aus Rattenschwänzen) mit Zugabe von

10xDMEM/F12, EE 0,1 %, NaOH 0,5 M, HEPES 1M, 4 °C

Minimal Essential Medium (MEM)

10 µM Noradrenalin (NA)

1 mM und 20 µM Acetylcholin (ACh)

10 µM Eserin

1 mM N ω -Nitro-L-Arginin Methylester (L-NAME)

3.2.3.1.2 Geräte

Motic-Mikroskop mit Motic Images 2.0

3.2.3.1.3 Versuchsdurchführung

Für die Kontraktionsstudien an einzelnen Gangabschnitten des Nebenhodens der Ratte wurden diese in einem delta-T-Dish mit 300 µl Kollagen eingebettet und bei 33 °C, welches der physiologischen Temperatur des Nebenhodens entspricht, auspolymerisiert. Nach 30 min wurden die Nebenhodengangstücke mit 1 ml Medium bedeckt und im Wärmeschrank bei 33 °C gelagert. Die Videomikroskopie erfolgte unter dem Motic-Videomikroskop auf einer Wärmeplatte mit einer Temperatur von 33-34 °C. Die weitere Durchführung der einzelnen Kontraktionsstudien wird protokollarisch dargestellt.

Erfassen der Spontankontraktionen von Gangabschnitten aus Segment 14 und 15

- Aufnahmeeinstellungen mit Motic Images 2.0 festlegen: 5-fache Vergrößerung, 1 Bild pro Sekunde, Zeitspanne der Aufnahme 20 min
- wie beschrieben Nebenhodengangstücke vorbereiten und unter dem Videomikroskop platzieren
- Aufnahme starten
- Vitalitätsprobe des Gewebes nach 15 min durch Zugabe von 10 µM NA

Um Hinweise auf mögliche Unterschiede in der Spontankontraktion zwischen einzelnen Segmenten zu erhalten, wurden diese explorativ in den Segmenten 14 und 15 dargestellt. Eine optische Analyse an Hand von Reslices wurde zur Auswertung herangezogen.

Erfassen der Spontankontraktionen von Nebenhodengangstücken aus Segment 6 (Caput) und Segment 18 (Cauda) nach Zugabe von Substanzen

- Aufnahmeeinstellung mit Motic Images 2.0 festlegen: 5-fache Vergrößerung in Segment 6 und 2- bis 5-fache Vergrößerung in Segment 18, 1 Bild pro Sekunde, Zeitspanne der Aufnahme 35 min
- wie unter 3.2.3.1.3 beschrieben Nebenhodengangstücke vorbereiten und unter dem Videomikroskop platzieren
- Aufnahme starten
- nach 10 min Aufnahme 1 mM L-NAME ins Dish geben
- nach weiteren 10 min Hinzugabe von 1 mM ACh oder 20 μ M ACh in Kombination mit oder ohne 10 μ M Eserin
- nach weiteren 10 min erfolgte eine Vitalitätsprüfung des Gewebes über 5 min durch Zugabe von 10 μ M NA

Als Vergleichskontrolle diente eine Aufzeichnung der Kontraktionen in den Nebenhodengangstücken nach Zugabe von ACh ohne Vorbehandlung des Gewebes mit L-NAME.

Die anschließende Auswertung der Kontraktionsmuster erfolgte mit dem Computerprogramm ImageJ. Um die Kontraktionen darstellen zu können, wurde aus einer Image Sequenz ein Time-Stack erstellt, d.h. eine Abfolge aller Bilder aus einem definierten Areal wurde erstellt, der sog. Reslice. Die Kontraktionen korrespondierten mit den Bewegungen des Gangs, die über die Zeit als kleine peaks sichtbar wurden. Die Frequenzen der Kontraktionen ließen sich über das Auszählen der peaks bestimmen.

Es wurden fünf Tiere an verschiedenen Tagen innerhalb von drei Wochen untersucht.

3.2.3.1.4 Statistische Auswertung der Kontraktionsstudien von Segment 6 (Caput) und Segment 18 (Cauda)

Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft. Einerseits wurde bei mehreren Vergleichen der Daten (Spontankontraktion vs. L-NAME vs. ACh-Gabe (mit/ ohne Kombination von Eserin)) der globale Unterschied mit einer einfaktoriellem Varianzanalyse getestet. Post-hoc paarweise Vergleiche wurden mit dem Tukey's multiple comparison Test ermittelt. Andererseits wurde bei den paarweisen Vergleichen (Spontankontraktion vs. ACh-Gabe (mit/ ohne Kombination von Eserin)) ein einseitiger t-Test für verbundene Stichproben angewendet.

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die Segmentgrenzen eines Ratten- und/oder Mäusenebenhodens zwei- und dreidimensional dargestellt und definiert. Weiterhin wurden die Spermien in allen 19 Segmenten des Rattennebenhodens per Lasermikrodissektion ausgeschnitten und mittels High Performance Liquid Chromatography auf ihren N-Acetylneuraminsäure-Gehalt analysiert. Die Regulation der Muskelkontraktionen wurde ex vivo mit Hilfe der Videomikroskopie exemplarisch in benachbarten Segmenten (Segment 14 und 15) sowie in den Segmenten 6 (Caput) und 18 (Cauda) im Rattennebenhodengang untersucht.

4.1 Die morphologischen und strukturellen Aspekte der Segmentgrenzen

4.1.1 Darstellung einzelner Segmente mittels Methylenblau

Der Nebenhodengang wird durch Bindegewebssepten in einzelne Segmente untergliedert. Im Nebenhodengang einer Ratte konnten bereits 19 Segmente identifiziert werden (Jelinsky et al. 2007). Durch Perfusion von Methylenblau als Indikatorlösung in den interstitiellen Raum konnte eine Barriere zwischen den einzelnen Segmenten ermittelt werden (Abb. 7). Die Indikatorlösung füllte den interstitiellen Raum eines perfundierten Segments ohne ins nächstliegende Segment weiter zu fließen.

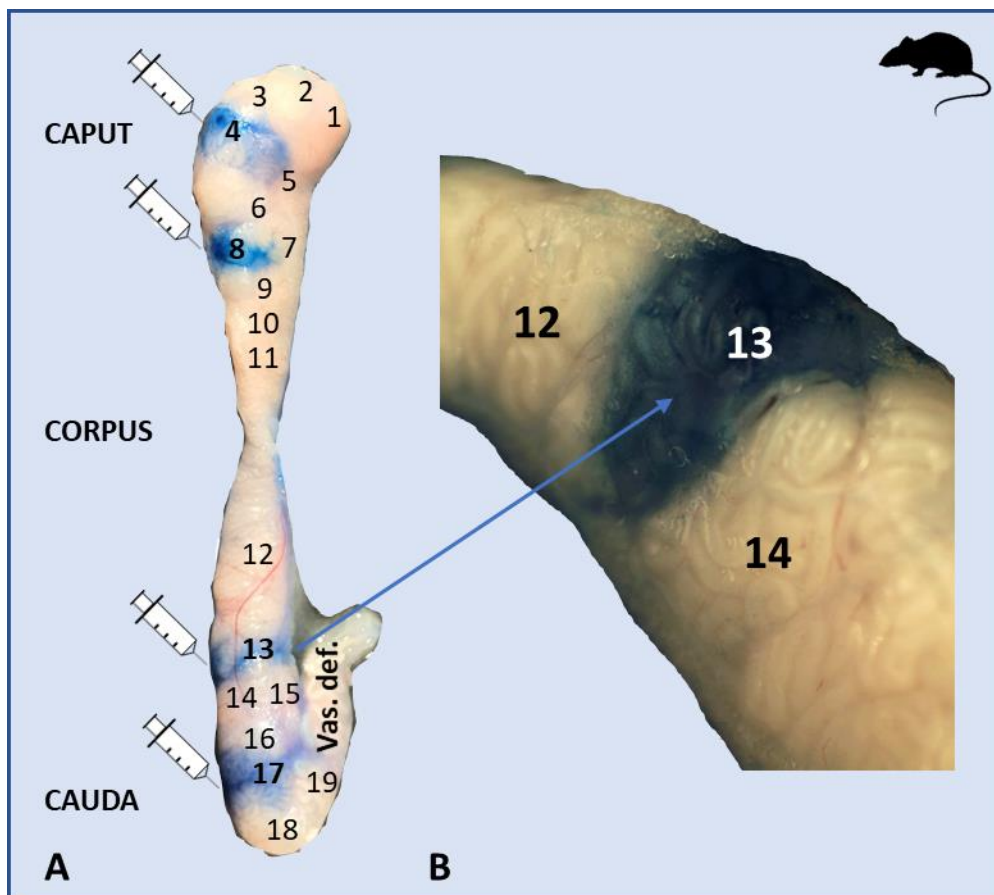


Abb. 7: Perfusion einzelner Segmente eines Nebenhodens

A: Ein komplett frisch entnommener Rattennebenhoden mit anatomischer Einteilung in Caput, Corpus und Cauda. Die 19 Segmente sind eingezeichnet. Die Kanülen markieren die Segmente 4, 8, 13 und 17, in die jeweils Methylenblau als Indikatorlösung in den interstitiellen Raum perfundiert wurde. B: Vergrößerte Darstellung der Segmente 12-14. Perfusion von Segment 13. Die Indikatorlösung füllte den interstitiellen Raum von Segment 13.

4.1.2 Zweidimensionale Darstellung der Segmentgrenze durch Immunfärbungen von Kollagenfasern

Nach Identifikation einzelner Segmente im Nebenhoden (Abb. 7) wurde bei den folgenden Untersuchungen speziell die Anordnung von Kollagenfasern innerhalb einer Segmentgrenze im Nebenhoden betrachtet.

Die immunhistochemischen Untersuchungen der Kollagenfasern erfolgte mit dem Kollagen 1-Antikörper (Abb. 8A und B), wohingegen die Immunfluoreszenzfärbungen mit den Kollagen 1- und SMA-Antikörpern durchgeführt wurden (Abb. 8C und D). Die Abbildung 8 zeigt eine Ansammlung von Kollagenfasern (markiert durch Pfeile) innerhalb des gesamten Nebenhodengangs. Die Septen sind identifizierbar durch eine vermehrte und dichtere Ansammlung von Kollagenfasern (markiert durch Sternchen).

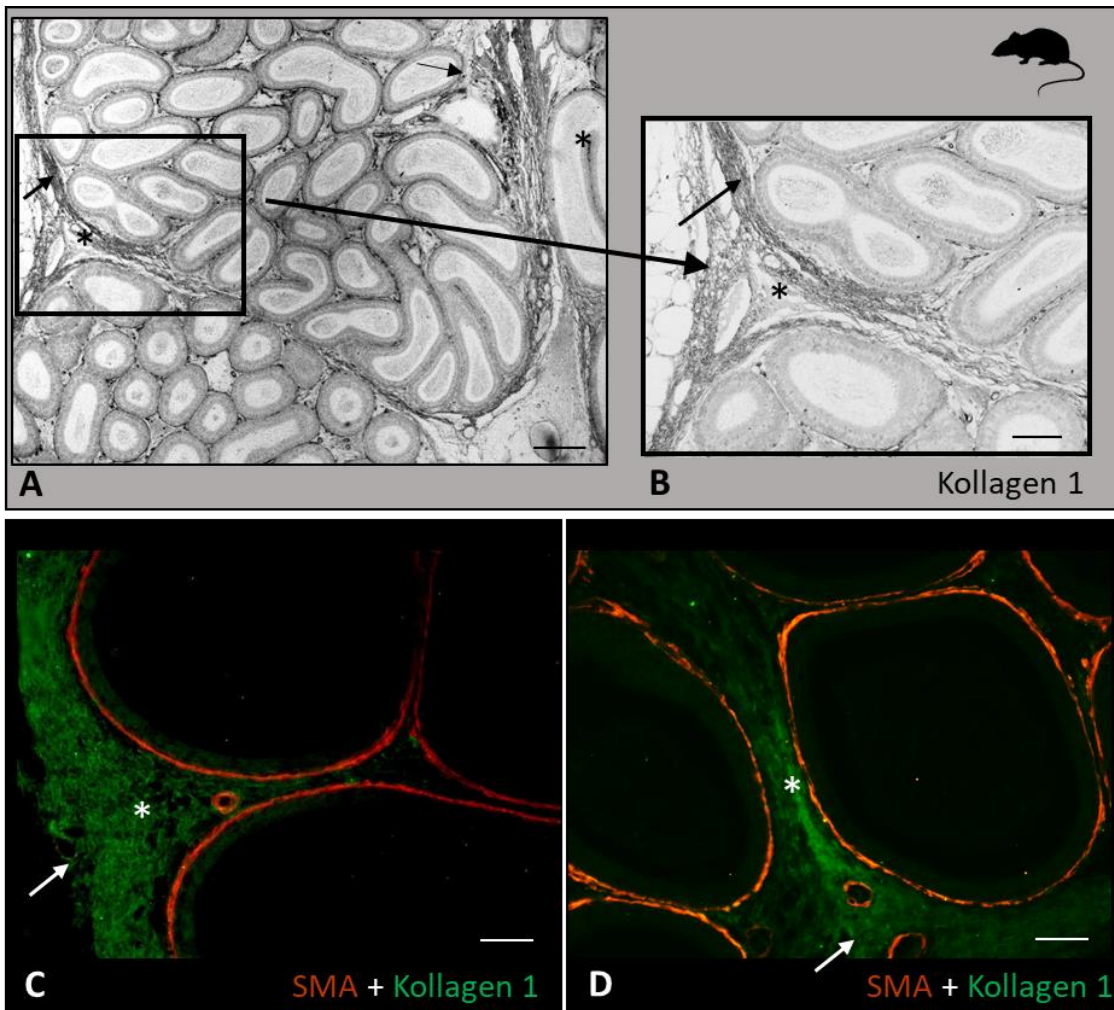


Abb. 8: Nachweis einer Kollagenverdichtung innerhalb der Segmentgrenzen

A-B: Immunhistochemische Färbung von Kollagenfasern (Pfeile) im Nebenhoden mit einem Antikörper gegen Kollagen 1. Die Septen sind identifizierbar durch eine vermehrte Kollagen 1-Färbung (Sternchen). A: Balken: 200 μm . B: Vergrößerung der Septumsgrenze. Balken: 100 μm . C-D: Immunfluoreszenzfärbung von Kollagenfasern (Pfeile) mit dem Kollagen 1-Antikörper in Corpus (C) und Cauda (D). Der Nebenhodengang wurde durch die SMA-positiven Muskelzellen sichtbar gemacht. Die Septen sind identifizierbar durch eine vermehrte Kollagen 1-Färbung (Sternchen). Balken: 50 μm .

4.1.3 Dreidimensionale Darstellung der Segmentgrenze: Rekonstruktion nach Eosinfärbung

Nach einer Aneinanderreihung der 94 histologischen Schnitte des Nebenhodens war es möglich, durch die Schnittebene mit Hilfe eines z stacks in vertikaler Richtung zu fahren. In der Abbildung 9A und B ist die Segmentgrenze (markiert durch einen Pfeil) zwischen Segment 6 und 7 dargestellt. Beim Verfolgen der Segmentgrenze in die Tiefe wird deutlich, dass sich das Bindegewebe innerhalb eines Segments gabelförmig aufteilt und weitere Anteile eines Segments pyramidenförmig zum Vorschein treten (Abb. 9B und C). In der Nachbarschaft zur verschobenen Segmentgrenze tritt ein einzelner Anteil des Nebenhodengangs durch das Bindegewebe (Abb. 9C). Dieser Befund könnte die mögliche Übergangsstelle des Nebenhodengangs in das nächstliegende Segment markieren. Die dreidimensionale Darstellung des Bindegewebes innerhalb der Segmentgrenze verdeutlicht das gabelförmige Aufteilen des Bindegewebes in der Tiefe (markiert durch einen sich aufzweigenden Pfeil, Abb. 9D).

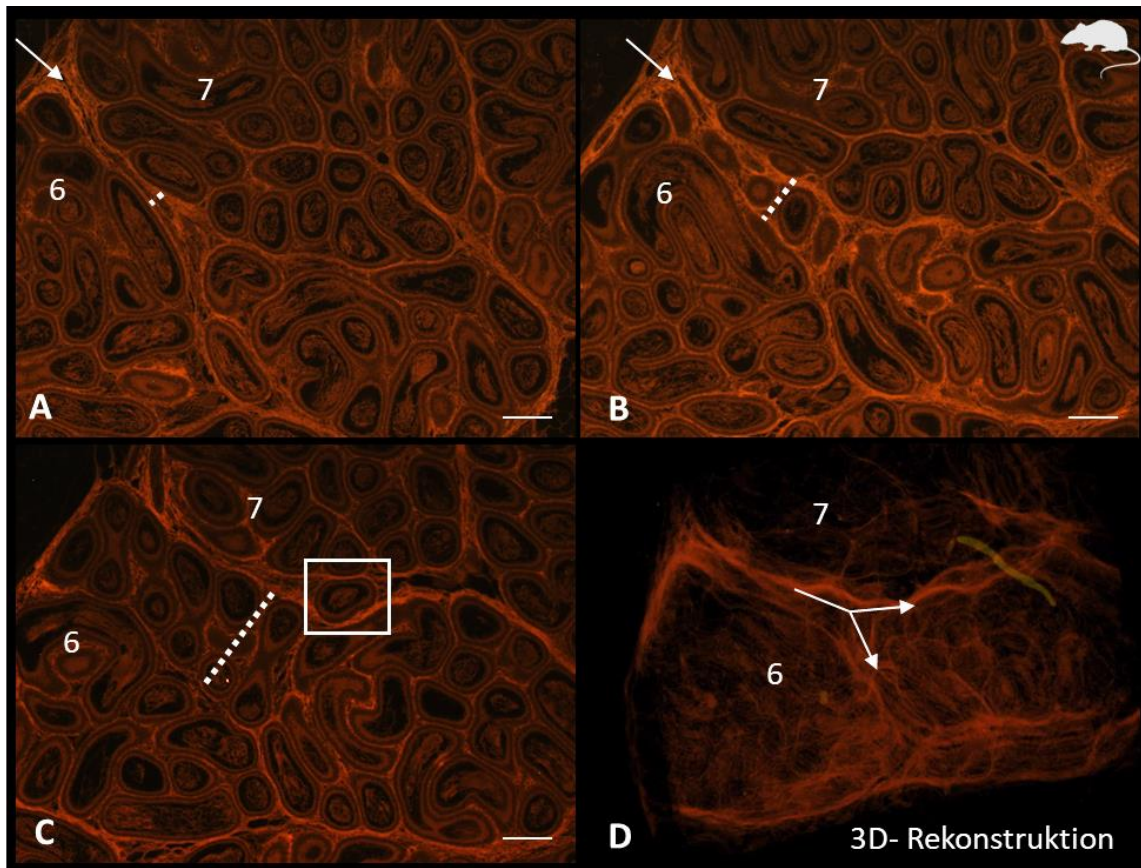


Abb. 9: Sichtbarmachung der Segmentgrenze zwischen Segment 6 und 7 durch Eosinfärbung

A-C: Auswahl von 3 histologischen Schnitten von insgesamt 94. Einzelne mit Eosin gefärbte histologische Schnitte aus verschiedenen Schnittebenen durch den Nebenhoden. Die Segmentgrenze zwischen Segment 6 und 7 ist abgebildet (Pfeil). Der gestrichelte Balken verdeutlicht das Hervortreten weiterer Segmentanteile eines bestimmten Segments aus der Tiefe (hier nicht zu identifizieren, ob Anteile aus Segment 6 oder 7 stammen). A: Bindegewebsstränge trennen Segment 6 und 7 voneinander. B: Die Segmentgrenze trennt sich auf und weitere Anteile des Nebenhodengangs treten zum Vorschein. C: Das Bindegewebe hat sich in der Tiefe aufgeteilt, sodass weitere Anteile eines selben Segments zum Vorschein treten. Der weiße Kasten zeigt die mögliche Übergangsstelle des Gangs durch Bindegewebsstränge ins nächstliegende Segment. A-C: Balken: 200 μm . D: Darstellung der Segmentgrenze nach 3D-Rekonstruktion. Der Verlauf der Septumsgrenze zeigt eine gabelförmige Aufteilung des Bindegewebes in der Tiefe (aufgetrennter Pfeil).

4.1.4 Dreidimensionale Darstellung der Segmentgrenze: CLARITY

Um eine dreidimensionale Darstellung über die morphologische Architektur der Segmentgrenze zu erhalten, wurde die Methode der CLARITY angewandt.

Mittels fluoreszierender Sekundärantikörper, die an die Primärantikörper Kollagen 1 und SMA binden, konnten Kollagenfasern und Proteine der glatten Muskulatur im Nebenhoden nachgewiesen werden.

Die folgenden Abbildungen 10 und 11 zeigen eine Färbung des SMA-Antikörpers entlang des gesamten Tubulus. Der Kollagen 1-Antikörper färbte sowohl Kollagenfasern um den Nebenhodengang als auch Gefäße an.

Vermeehrt befanden sich Kollagenfasern innerhalb der Segmentgrenzen (Abb. 10). Hauptgefäßäste (markiert durch Pfeilspitzen) verliefen in Kollagen eingebettet entlang der Segmentgrenze (markiert durch Pfeile, Abb. 10 und 11), welche kleinere Seitenäste zu den Tubuli abgaben. Diese bildeten ein komplexes Gefäßnetzwerk um den gesamten Nebenhodengang aus.

In den Abbildungen wird der Verlauf des Ductus epididymidis in Nachbarschaft zur Segmentgrenze deutlich. Die intrasegmentalen Anteile des Nebenhodengangs verlaufen zunächst auf die Segmentgrenze zu, wenden sich kurz vor der Segmentgrenze ab und bilden Schleifen (markiert durch Sternchen), ohne die Segmentgrenze zu passieren (Abb. 11).

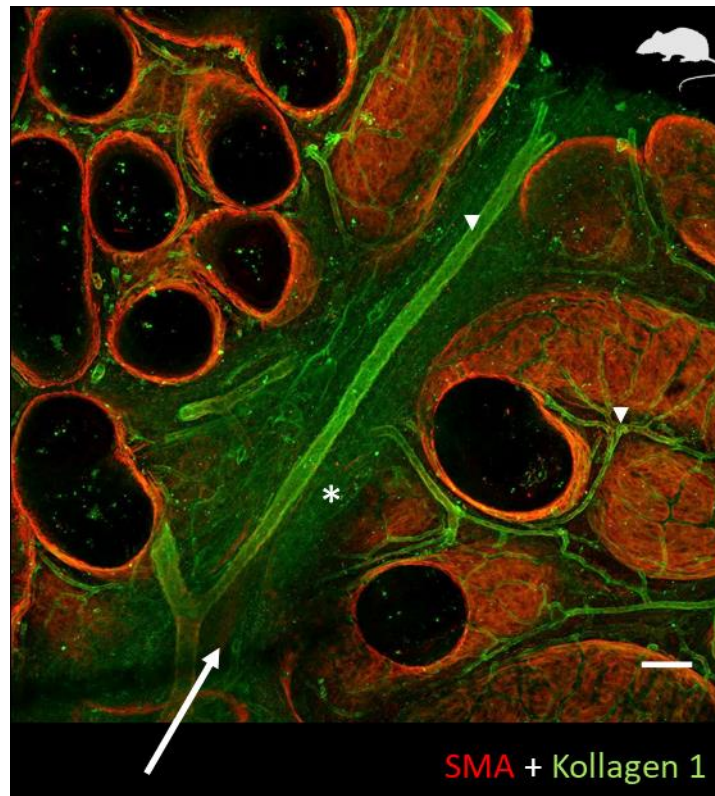


Abb. 10: Dreidimensionale Darstellung einer Segmentgrenze mit angrenzendem Ductus eines Nebenhodengangs mittels CLARITY

Immunfluoreszenzfärbung von glatten Muskelzellen (SMA-Färbung, rot) und Kollagenfasern (Kollagen 1-Färbung, grün) des Nebenhodens einer Ratte. Der Pfeil markiert die Segmentgrenze. Neben dem Bindegewebe des Septums (mit Sternchen markiert) ist durch Kollagen-1 auch der Gefäßverlauf nachweisbar (markiert durch Pfeilspitzen). Das peritubuläre Gefäßnetzwerk umschlingt den gesamten Tubulus. Balken: 100 µm.

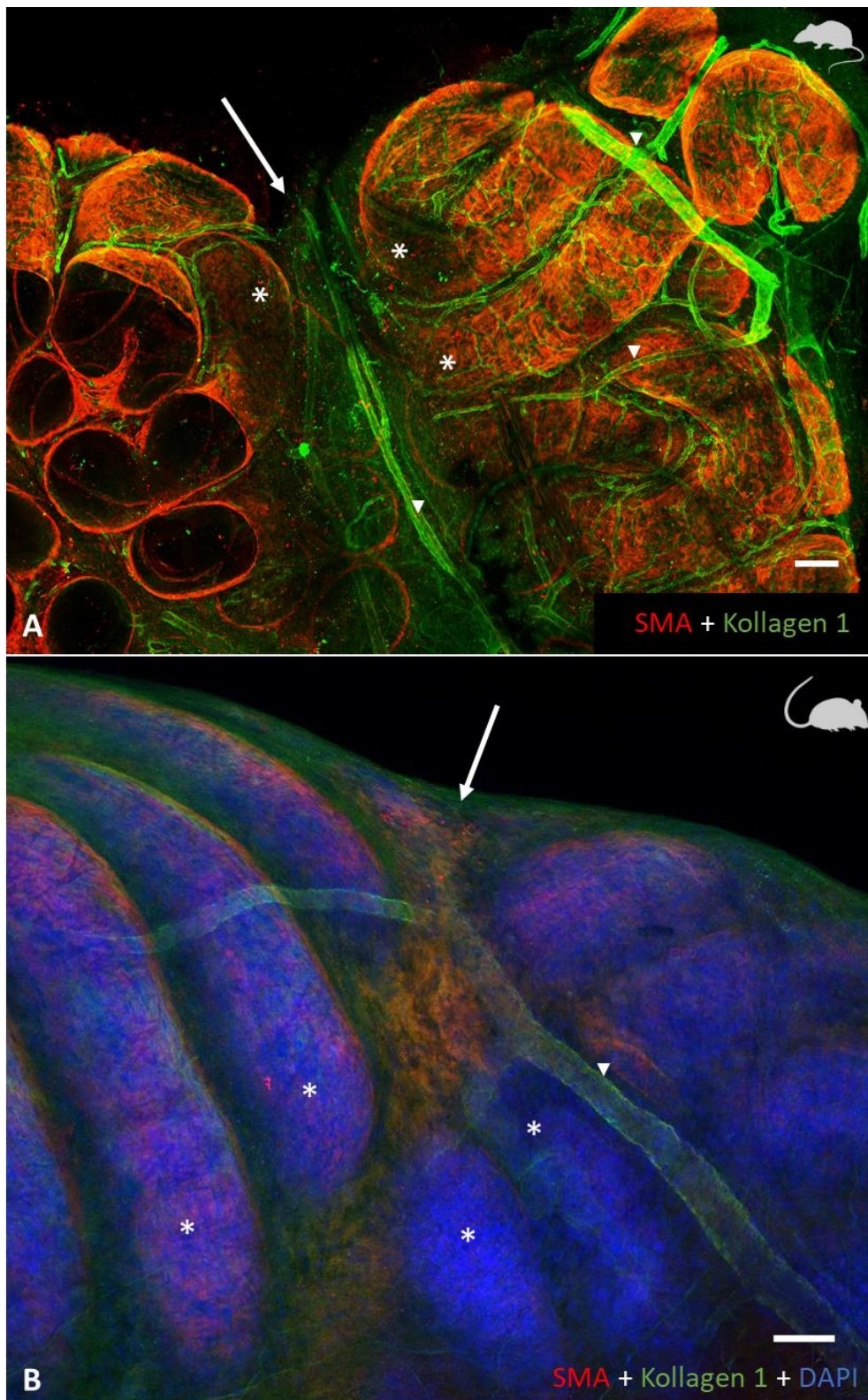


Abb. 11: Nebenhodengangschlingen, die die Segmentgrenze nicht passieren, sind jeweils vom Septum abgewendet.

A-B: Immunfluoreszenzfärbung von glatten Muskelzellen (SMA-Färbung, rot) und Kollagenfasern (Kollagen 1-Färbung, grün) des Nebenhodengangs. Zellkerne wurden mit dem Kernfarbstoff DAPI (blau) detektiert (B). Balken: 100 μm . Die Segmentgrenzen

(Pfeile) eines Rattennebenhodens aus dem Initialsegment (A) sowie eines Mäusenebenhodens (B) sind im Vergleich dargestellt. Neben dem Bindegewebe des Septums ist durch Kollagen-1 auch der Gefäßverlauf nachweisbar (markiert durch Pfeilspitzen). Hauptgefäßäste verlaufen entlang der Septumgrenze. Die nicht übertretenden Nebenhodenschlingen eines Segments sind jeweils vom Septum abgewendet (Sternchen).

4.1.5 Nachweis größerer Gefäßäste und Nervenfasern innerhalb einer Segmentgrenze

Die CLARITY gab Aufschluss über den Verlauf von Gefäßen innerhalb der Segmentgrenze des Nebenhodens (Abb. 10-12A). Um die Lokalisation von Nervenfasern innerhalb einer Segmentgrenze zu bestimmen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Es wurde der Antikörper gegen Beta Tubulin III verwendet, um Nervenfasern darzustellen (orange), sowie der Antikörper gegen SMA, um Proteine der glatten Muskulatur (grün) anzufärben (Abb. 12B).

Die Immunfluoreszenzaufnahmen zeigten regionale Unterschiede in der Verteilung und Anzahl an Nervenfasern innerhalb einer Segmentgrenze in Caput, Corpus und Cauda des Nebenhodens (hier nur Cauda in Abb. 12B dargestellt). In Caput und Corpus konnten einzelne voneinander separierte Nervenfasern nachgewiesen werden. In den distalen Bereichen der Cauda konnten dickere Nervenfaserbündel festgestellt werden. Die Nervenfasern reichten bis an die glatte Muskulatur heran (siehe Abb. 21). Innerhalb der Septumsgrenzen bestanden Anhäufungen von Nervenfasern, sowie Nachbarschaften zu Gefäßen.

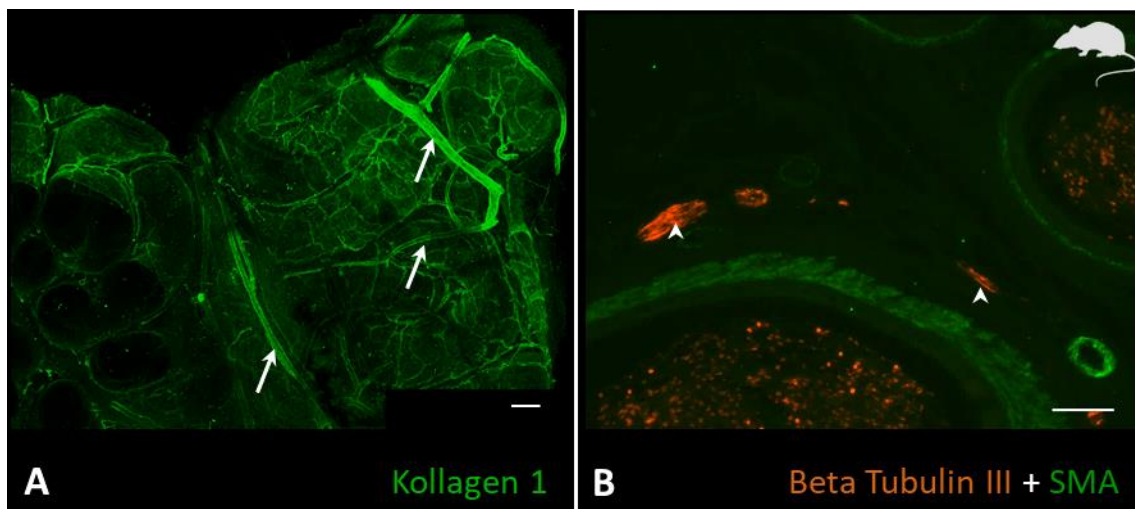


Abb. 12: Verlauf größerer Gefäße und Nervenfasern innerhalb einer Segmentgrenze

A: Nachweis größerer Gefäßäste (Pfeile) innerhalb einer Segmentgrenze im Initialsegment durch eine Kollagen 1-positive Immunfluoreszenzfärbung (CLARITY). Balken: 100 μm . B: Immunfluoreszenzfärbung von Nervenfasern mit dem Beta Tubulin III-Antikörper (orange) und glatten Muskelzellen mit dem SMA-Antikörper (grün). Nachweis von größeren Nervenfaserbündeln (Pfeilspitze) innerhalb einer Segmentgrenze zwischen Segment 18 und 19 in der Cauda. Balken: 50 μm .

4.2 Die biochemische Charakterisierung des Sialinsäure-Gehalts von Spermatozoen in den einzelnen Segmenten

Segmentweiser Nachweis des Neu5Ac-Gehalts in Spermien mit Hilfe der LCM und der HPLC-Analyse

Um die Theorie der Turner-Gruppe zu überprüfen (Turner et al. 2007a,b), dass auch die luminal Zusammensetzung der in den einzelnen Segmenten zu findenden Anteile des Nebenhodengangs von Segment zu Segment signifikante Unterschiede aufweist, wurde der Neu5Ac-Gehalt in Spermien untersucht. Für diese Glykosylierung wurden innerhalb des Nebenhodens bereits zuvor Konzentrationsunterschiede beschrieben (Khosravi et al. 2016). Eine explorative Untersuchung des Sialinsäure-Gehalts in den einzelnen Segmenten wurde in der hier vorliegenden Studie durchgeführt. Der Neu5Ac-Gehalt auf der Spermienoberfläche konnte in den 19 Segmenten des Rattennebenhodengangs (Abb. 13) mit Hilfe der LCM (Abb. 14) in Kombination mit einer HPLC-Analyse untersucht werden.

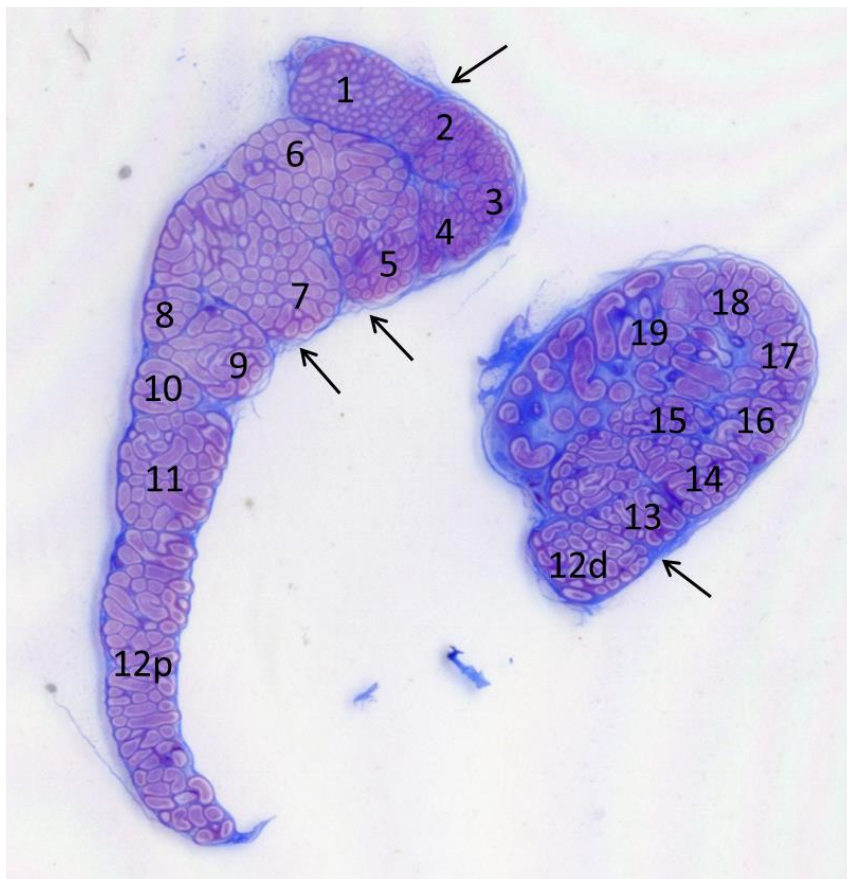


Abb. 13: Darstellung der Segmente und Segmentgrenzen nach Azanfärbung

Dargestellt ist ein 5 µm dicker Paraffinschnitt eines Rattennebenhodens mit Einteilung in die 19 Segmente nach einer Azanfärbung. Bei Segment 12 wurden proximale (12p) und

distale (12d) Anteile des Nebenhodengangs-Lumens differenziert. Die Pfeile zeigen exemplarisch auf eine Segmentgrenze. Die Azanfärbung diente der LCM als Vorlage zur Orientierung der Segmentgrenzen.



Abb. 14: LCM einzelner Nebenhodengang-Lumina aus allen 19 Segmenten

A-C: Hämalaunfärbung des Nebenhodens. A: Ausschnittsvergrößerung des Segments 6 vor der LCM. B: Die leeren Nebenhodengang-Lumen zeigen exemplarisch die ausgeschnittenen Bereiche des Segments 6. C: Übersichtsdarstellung der leeren Nebenhodengang-Lumen nach Beendigung der LCM in allen 19 Segmenten.

Etablierung einer neuen Methode

Die LCM ermöglicht eine kontaminationsfreie und zellspezifische Isolierung von Probenmaterial. Die Spermien wurden segmentweise aus den Nebenhodengang-Lumen mikrodissiziert und in Caps gesammelt. Eine Bestimmung des Probenmaterials erfolgte anhand von Fotografien der Nebenhodengangs-Lumen bevor diese mikrodissiziert wurden. Zur Orientierung des ausgewählten Bereichs wurden die auszuschneidenden Nebenhodengangs-Lumen grün umrandet (Abb. 15A). Die Fotografien wurden mit dem Programm AdobePhotoshop CS2 bearbeitet und die Flächen außerhalb der grünen Umrandung entfernt. Der übrig gebliebene Inhalt des Nebenhodengangs (Abb. 15B) konnte nun zur Auswertung der Probenmenge herangezogen werden. Im Anschluss erfolgte die LCM.

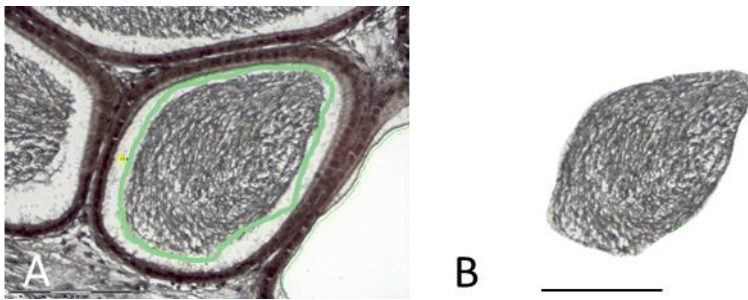


Abb. 15: Definition der Flächen zur Bestimmung des luminalen Inhalts

A: Foto eines Nebenhodengangs-Lumens vor der LCM. Die grüne Umrandung gibt den auszuschneidenden Bereich an. B: Bereiche außerhalb der grünen Umrandung wurden mit AdobePhotoshop CS2 entfernt. Balken: 150 µm.

Ein Schwellenwert (Threshold) aus dem Programm ImageJ (tool: color-threshold) wurde zur Ermittlung der Spermienfläche angewandt. Einheitliche Farbwerte wurden mit Hilfe dieses Kommandos detektiert. Nach Festsetzung der Intensität des Schwellenwertes (rot, Abb. 16A), wurde dieser individuell so ausgewählt, dass alle Spermien innerhalb der zu bestimmenden Fläche des jeweils ausgeschnittenen Nebenhodengangs-Bereichs lagen (gelb, Abb. 16B). Die Größe der Fläche wurde in Pixel angegeben (Abb. 16C) und ins Verhältnis zum Sialinsäure-Gehalt (in ng) gesetzt, welcher durch die HPLC ermittelt wurde.

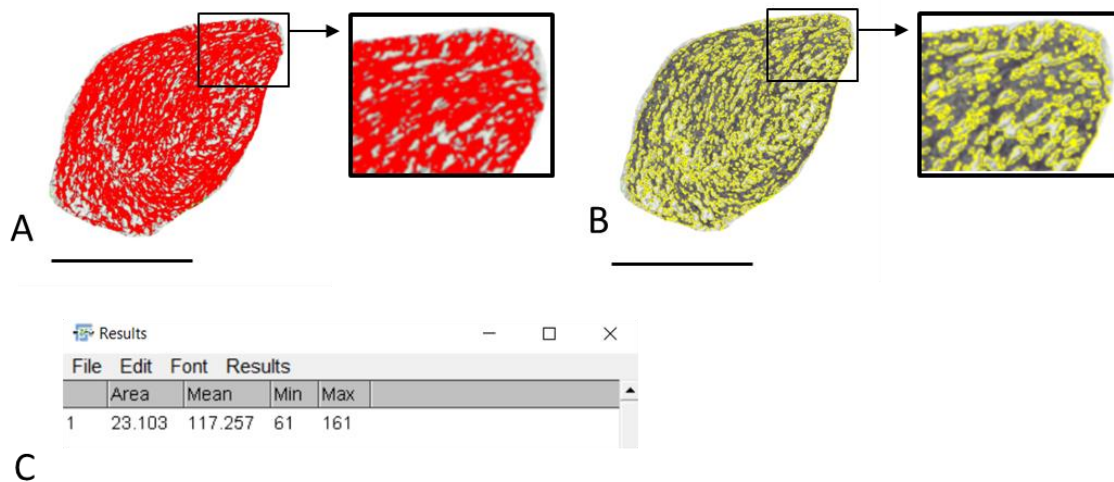


Abb. 16: Markierung eines Nebenhodengangs-Lumens mit einem Schwellenwert und anschließender Flächenbestimmung

Nach Festsetzung der Intensität des Schwellenwertes (rot, A mit Ausschnittsvergrößerung), wurde dieser individuell so ausgewählt, dass alle Spermien innerhalb der zu bestimmenden Fläche des jeweils ausgeschnittenen Nebenhodengangs-Bereichs lagen (gelb, B mit Ausschnittsvergrößerung). C: Berechnung der Fläche in Pixel. Balken: 150 µm.

Ergebnis

Um einen Vergleich zu existierenden Daten zu erstellen, wurden die einzelnen Segmente entsprechend ihrer Regionen zusammengefasst (Abb. 17). Das IS umfasst die Segmente 1-3, das Caput die Segmente 1-9 (aber hier ohne die Segmente 1-3), der Corpus die Segmente 10-13 und die Cauda die Segmente 14-19. Ein signifikanter Unterschied der Konzentration von der Neu5Ac-Expression konnte jeweils zwischen IS und Corpus ($p \leq 0,05$) sowie zwischen Cauda und Caput bzw. Corpus ($p \leq 0,05$) festgestellt werden. Im IS befand sich der höchste Gehalt an Neu5Ac. Im Caput und Corpus lagen die Werte verhältnismäßig niedrig und innerhalb eines Spektrums. Zur Cauda hin kam es zu einem erneuten Anstieg des Neu5Ac-Gehalts (Abb. 17 und 18).

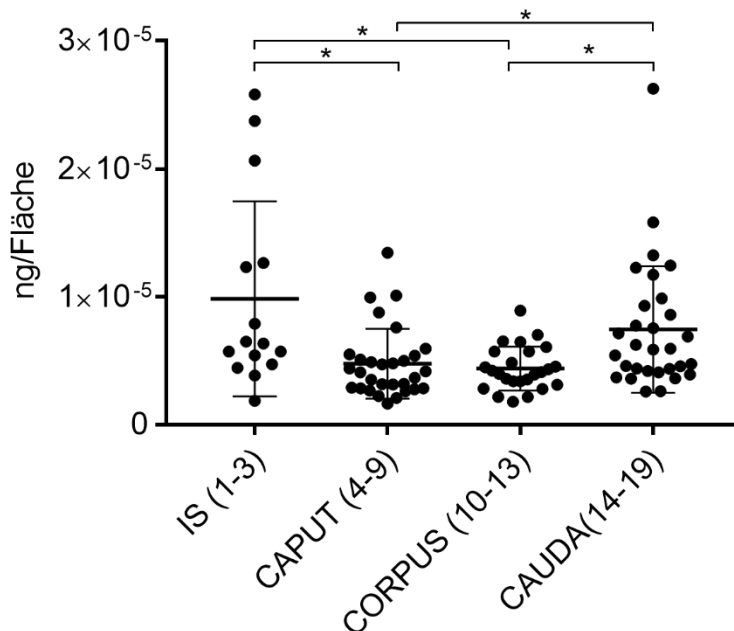


Abb. 17: Die Neu5Ac-Expression in IS, Caput (ohne IS), Corpus und Cauda des Nebenhodens

Darstellung der Neu5Ac-Expression auf der Spermienoberfläche als Streudiagramm. Signifikante Unterschiede von IS jeweils zu Caput und Corpus ($p \leq 0,05$) sowie von Cauda jeweils zu Caput und Corpus ($p \leq 0,05$). Die Streuung der Werte im IS und im Cauda sind bedingt durch den höheren Gehalt an Neu5Ac in den Segmenten 1, 18 und 19. Das Signifikanzniveau wurde wie folgt gekennzeichnet: $p \leq 0,001$ - *** (hoch signifikant); $p \leq 0,01$ - **; $p \leq 0,05$ - * und $p > 0,05$ - n.s. (nicht signifikant); SD, Standardabweichung; N= 5

Direkt benachbarte Segmente ab dem zweiten Segment zeigten keine signifikanten Unterschiede der Neu5Ac-Expression ($p > 0,05$). Das deutet darauf hin, dass die Sialylierung hauptsächlich im ersten Segment des Caputs stattfindet (Abb.18).

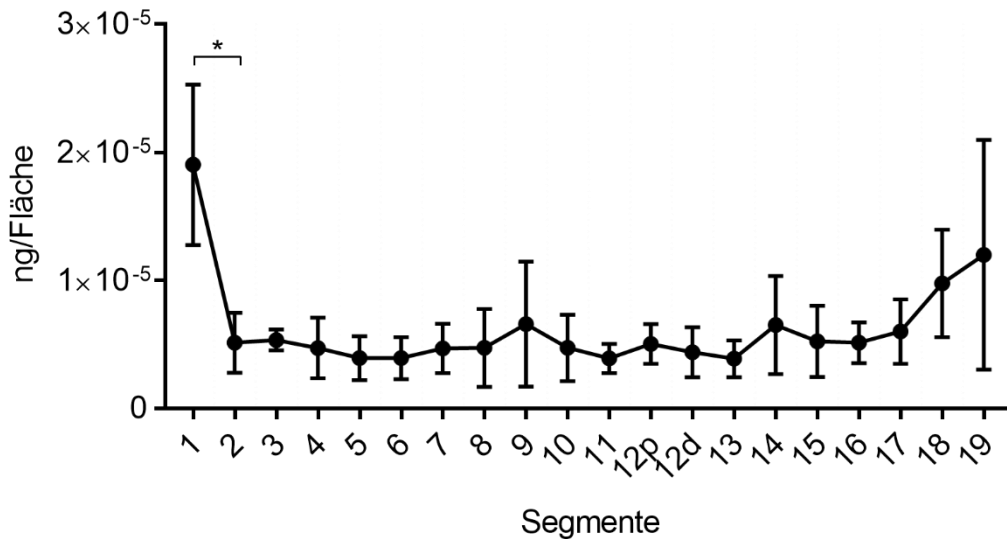


Abb.18: Der Sialylierungsstatus in den einzelnen Segmenten

Segmentweise Expression des Neu5Ac-Gehalts auf der Spermienoberfläche als Kurvendiagramm dargestellt. Ein U-förmiger Verlauf ist ersichtlich mit signifikanten Unterschieden zwischen dem ersten und zweiten Segment ($p < 0,05$). Das Signifikanzniveau wurde wie folgt gekennzeichnet: $p \leq 0,001$ - *** (hoch signifikant); $p \leq 0,01$ - **; $p \leq 0,05$ - * und $p > 0,05$ - n.s. (nicht signifikant); SD, Standardabweichung; N= 5

Die stärkste Expression des Neu5Ac-Gehalts konnte im ersten Segment nachgewiesen werden. Ein signifikanter Abfall des Neu5Ac-Gehalts erfolgte direkt im benachbarten zweiten Segment ($p \leq 0,05$, Abb. 18). Die Expression des Neu5Ac-Gehalts blieb in den folgenden Segmenten 2 bis 17 auf einem ähnlich niedrigen Niveau. Ein leichter Anstieg, aber statistisch nicht signifikanter Unterschied, konnte in den distalen Segmenten 18 bis 19 analysiert werden (Abb. 17-19).

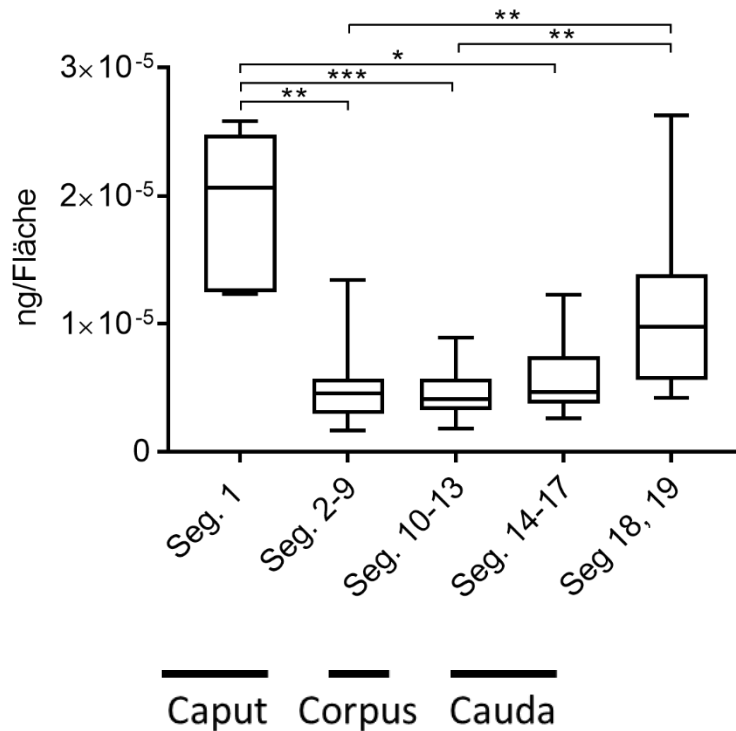


Abb. 19: Erhöhte Neu5Ac-Expression in Segment 1, sowie Seg. 18 und 19 im Vergleich zu den restlichen Teilen von Caput, Corpus und Cauda des Nebenhodens

Darstellung der Neu5Ac-Expression auf der Spermienoberfläche als Balkendiagramm. Segment 1 weist den höchsten Gehalt an Neu5Ac auf. Es kommt zu einem signifikanten Abfall des Neu5Ac-Gehalts in den nachfolgenden Segmenten ($p \leq 0,01$). Ein erneuter Anstieg des Neu5Ac-Gehalts erfolgt in den Segmenten 18 und 19. Das Signifikanzniveau wurde wie folgt gekennzeichnet: $p \leq 0,001$ - *** (hoch signifikant); $p \leq 0,01$ - **; $p \leq 0,05$ - * und $p > 0,05$ - n.s. (nicht signifikant); SD, Standardabweichung; N= 5

4.3 Die funktionelle Charakterisierung des Kontraktionsmusters in ausgewählten Segmenten

Mögliche funktionelle Unterschiede zwischen ausgewählten Segmenten erfolgten durch Darstellung der Nebenhodengangkontraktionen. Mittels Time-Lapse Imaging konnte über einen erstellten Reslice die Frequenz und das Muster der Spontankontraktionen visualisiert werden. Zunächst wurde exemplarisch das Kontraktionsmuster zweier benachbarter Segmente verglichen (Abb. 20). In beiden Segmenten unterschieden sich die spontanen Kontraktionen. Diese waren in Segment 14 im Vergleich zu Segment 15 erhöht. Innerhalb eines ausgewählten Segments spielte die Stelle für den erstellten Reslice bei der Auswertung eine untergeordnete Rolle, da an verschiedensten Stellen entlang des präparierten Gangabschnitts die Frequenz ähnlich war (hier nicht dargestellt).

Neben diesen nur die Wand betreffenden Kontraktionen zeigten sich in den zur Auswertung zu Grunde liegenden Videos auch die zusätzliche Existenz peristaltischer Bewegungen des gesamten Ganges (nicht gezeigt). Diese Bewegungen verliefen in der Mehrzahl in eine Richtung. Es konnte auch eine Bewegung des luminalen Inhalts beobachtet werden. Dieser bewegte sich vor und zurück, aber mit einem gerichteten Netto-Transport in eine Richtung.

In Zusammenhang mit diesen Kontraktionen fanden sich Nervenfasern als dicke Nervenfaserbündel im Interstitium (Abb. 21A) und innerhalb einer Segmentgrenze (siehe Abb. 12) der Cauda sowie als einzelne Fasern in enger Nachbarschaft zur Muskulatur (Abb. 21B und C).

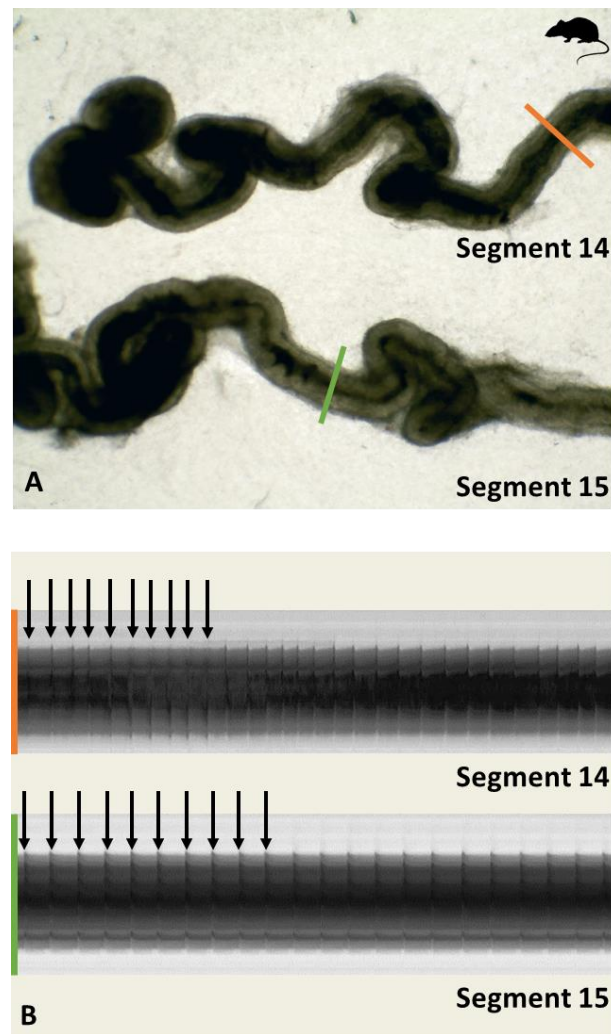


Abb. 20: Exemplarische Darstellung der Spontankontraktionen in zwei benachbarten Segmenten des Nebenhodengangs

A-B: Die segmentalen Unterschiede im Kontraktionsmuster wurden mittels Time-Lapse Imaging analysiert. Wie hier für die benachbarten Segmente 14 und 15 dargestellt wurde, variierte die Frequenz der Spontankontraktionen. A: Darstellung von Gangabschnitten aus den Segmenten 14 und 15 mit eingezeichneter Markierung (oranger und grüner Balken). Die Markierung gab die virtuelle Stelle der Frequenzmessung an. B: Jede Bewegung der Wand (=Kontraktion) des präparierten Gangabschnitts wurde als Linie im Reslice dargestellt.

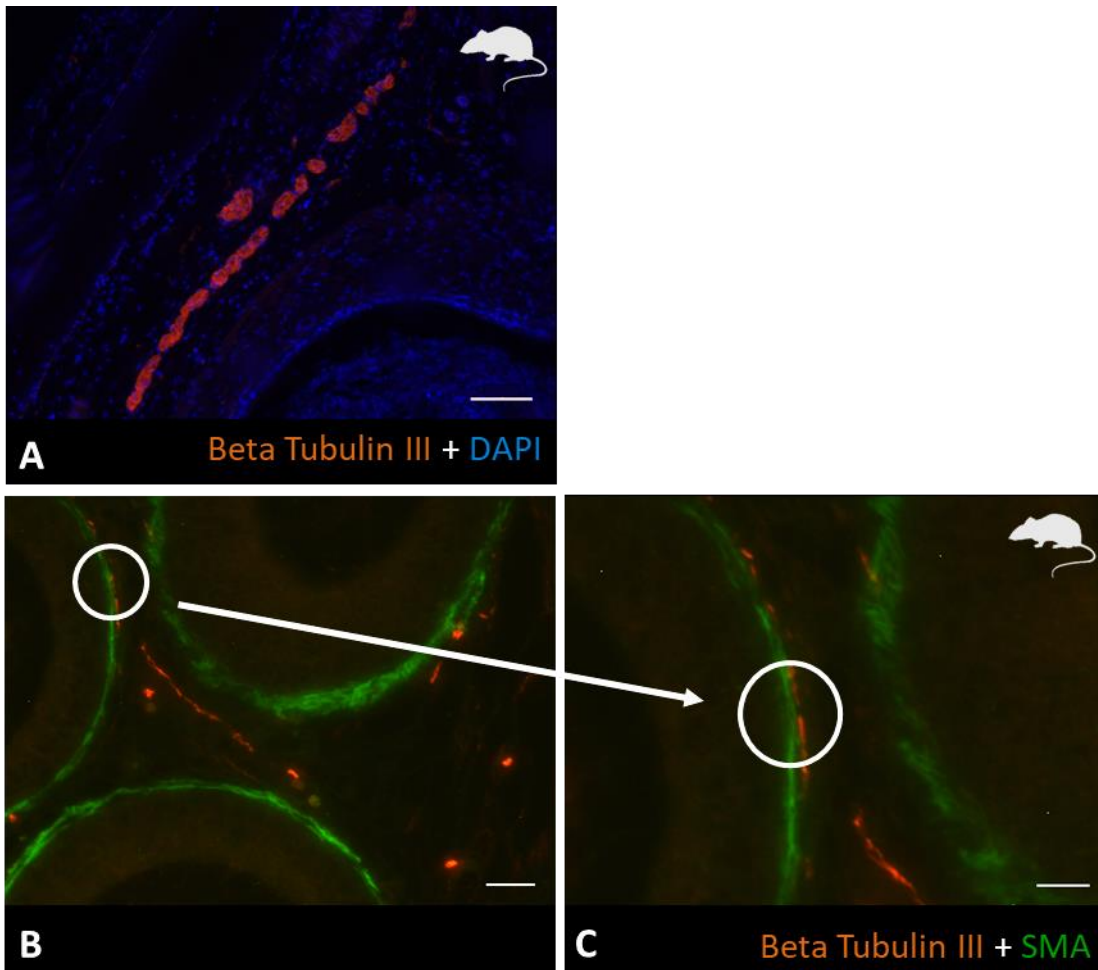


Abb. 21: Darstellung von Nervenfasern in Nachbarschaft zur Muskelzellschicht des Nebenhodengangs

A: Nachweis von Nervenfasern im Interstitium. Dicke Nervenfaserbündel (markiert durch Beta Tubulin III-Antikörper, orange) verlaufen im Interstitium. Zellkerne wurde mittels DAPI angefärbt zur Orientierung der Nervenfasern. Balken: 50 μm

B-C: Immunfluoreszenzfärbung von Nervenfasern mit dem Beta Tubulin III-Antikörper (orange) und glatten Muskelzellen mit dem SMA-Antikörper (grün). B: Darstellung einer Nervenfaser, die an die glatte Muskulatur heranreicht (Kringel). Balken: 20 μm . C: Ausschnittsvergrößerung von B. Balken: 10 μm .

Die Auswertung der Spontankontraktionen von Nebenhodengangstücken aus Segment 6 (Caput) und Segment 18 (Cauda) nach Zugabe von Substanzen

Um die funktionelle Bedeutung von ACh und dessen Wirkung nach Zugabe von L-NAME, einem NO-Synthase-Inhibitor, auf die Spontankontraktionen zu untersuchen, wurden die Kontraktionsmuster von isolierten Gangabschnitten mit Hilfe des Time-Lapse Imagings aufgezeichnet. Untersucht wurden im Caput Segment 6 und in der Cauda Segment 18 des Nebenhodens.

In Segment 6 konnten regelmäßige Spontankontraktionen aufgenommen werden (Abb. 22B und 23). In Segment 18 lagen keine bis geringe Spontankontraktionen vor, die weniger regelmäßig erfolgten (Abb. 24B und 25). Mit Hilfe der Videomikroskopie konnte eine peristaltische Bewegung sowohl in Segment 6 als auch in Segment 18 verzeichnet werden.

Bei einer Vorbehandlung des Gewebestücks mit L-NAME, konnte mit ACh in den meisten Fällen eine Erhöhung der Frequenz der glatten Muskulatur in beiden Segmenten erzielt werden (Abb. 22B, 23A, 24B, 25A und 25B). Im Vergleich zum Caput hatte ACh in der Cauda zumindest in der Mehrzahl der Versuche eine stimulierende Wirkung auf die glatte Muskulatur (Abb. 25C und D). L-NAME allein hatte keinen Effekt auf die Spontankontraktionen. Als Kontrolle der einzelnen Kontraktionsstudien wurde zum Schluss Noradrenalin auf die Gangabschnitte gegeben, um die Vitalität des Gewebes zu überprüfen. Die Frequenz stieg deutlich an (nicht dargestellt).

Als Vergleichsstudie diente die alleinige Zugabe von ACh in verschiedenen Konzentrationen auf die Spontankontraktionen. In Segment 6 und 18 zeigten sich keine signifikanten Veränderungen (Abb. 23B und 25C). Auch eine Co-Inkubation mit ACh und Eserin, einem Acetylcholinesterase-Hemmer, hatte ähnliche Effekte wie die alleinige ACh-Zugabe (Abb. 25D).

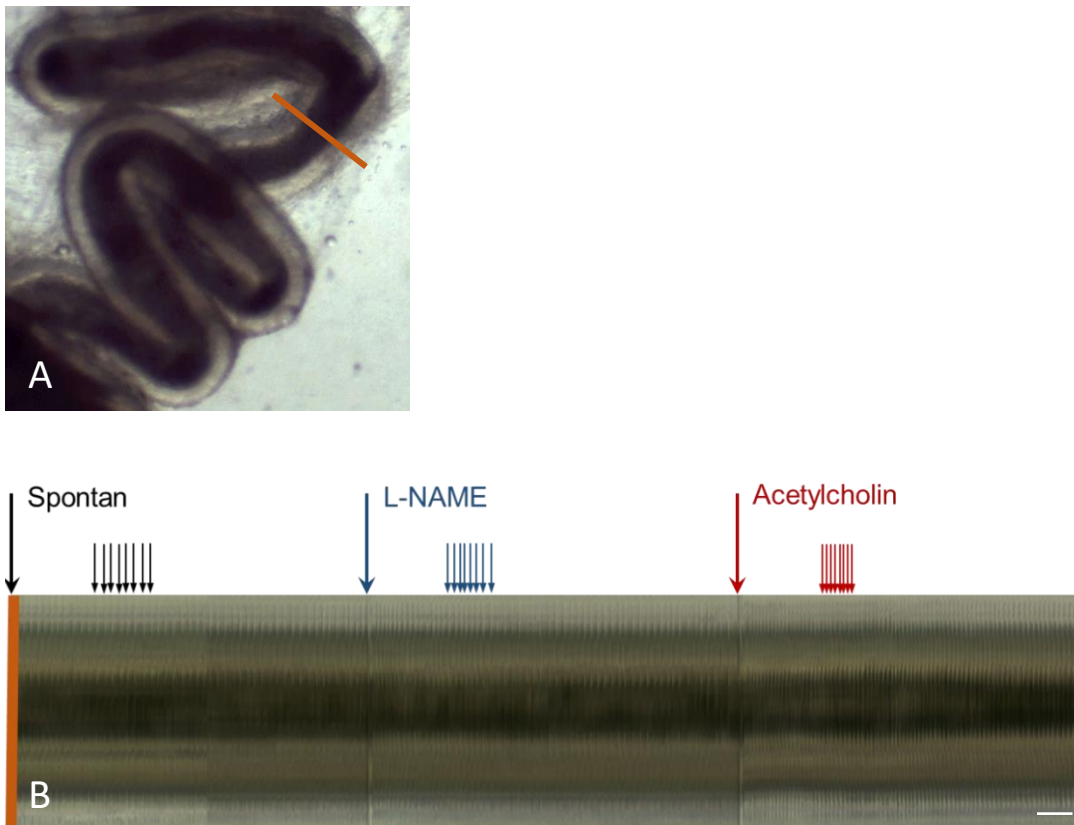


Abb. 22: Effekte von ACh auf die Kontraktionen in Segment 6 nach Inkubation mit dem NO-Synthase-Inhibitor L-NAME

A: Abbildung eines Gangabschnittes aus Segment 6 (Caput)

Darstellung eines Gangabschnittes aus Segment 6 in 5-facher Vergrößerung. Fokussierung auf das Lumen (dunkel) und die Tubuluswand (hell). Der orangene Balken markiert den Bereich, wo der Reslice erstellt wurde.

B: Visualisierung von ACh-Effekten in Segment 6 (Caput)

Die Effekte von L-NAME und ACh auf die Spontankontraktionen von Segment 6 des Nebenhodengangs werden hier mit einem Reslice dargestellt. Der große schwarze Pfeil markiert den Beginn der Aufzeichnung der Spontankontraktionen. Die großen blauen und roten Pfeile machen die Zugabe von L-NAME und ACh nach jeweils 10 min kenntlich. Die Kontraktionen (dargestellt durch die kleinen Pfeile) nehmen bei ACh-Gabe deutlich zu. Der weiße Balken gibt die Zeit von einer Minute an.

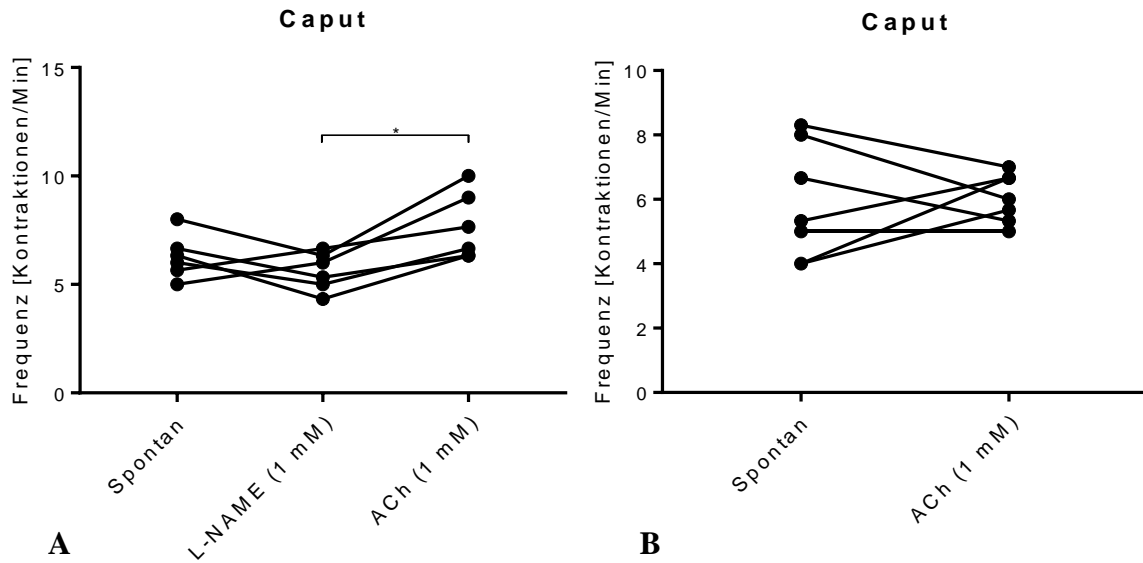


Abb. 23: Vergleich der ACh-Effekte in Segment 6 mit und ohne L-NAME Vorbehandlung

A: Wirkung von ACh auf die Spontankontraktionen nach Vorbehandlung der Gewebestücke mit L-NAME

Grafische Darstellung des ACh-Effekts in Segment 6 des Caput bei unterschiedlichen Konzentrationen (ACh 1 nM; ACh 20 μ M (hier nicht dargestellt)) nach L-NAME-Gabe (1 mM). Eine statistische Analyse verglich die Frequenzen der Spontankontraktionen mit den Frequenzen nach L-NAME und ACh-Zugabe. Signifikante Unterschiede konnten zwischen der L-NAME-Gabe und der ACh-Gabe nachgewiesen werden ($p \leq 0,05$). L-NAME hatte keinen relevanten Einfluss auf die Spontankontraktionen. Die Tendenz zeigt, dass sich die Frequenz nach ACh-Gabe mit Vorbehandlung von L-NAME erhöht.

B: Die Wirkung von ACh allein auf die Spontankontraktionen

Grafische Darstellung des ACh-Effekts auf die Spontankontraktionen in Segment 6 des Caputs bei unterschiedlichen Konzentrationen (ACh 1 nM; ACh 20 μ M (hier nicht dargestellt)). Keine signifikanten Unterschiede konnten nachgewiesen werden.

Das Signifikanzniveau wurde wie folgt gekennzeichnet: $p \leq 0,001$ - *** (hoch signifikant); $p \leq 0,01$ - **; $p \leq 0,05$ - * und $p > 0,05$ - n.s. (nicht signifikant); N= 5

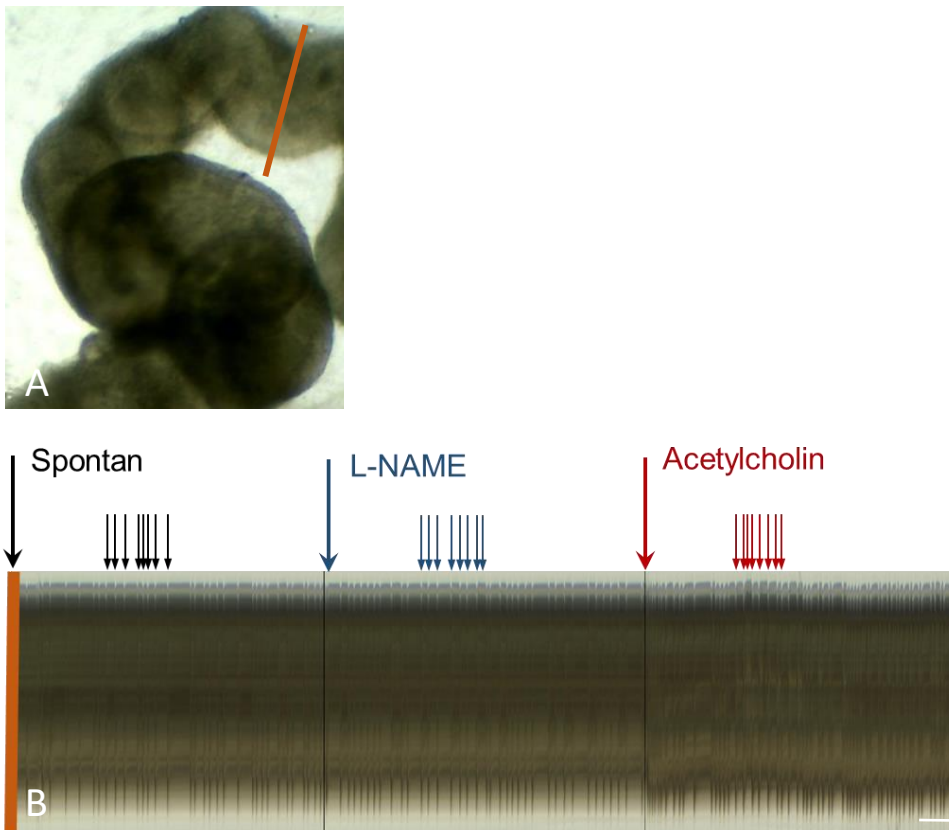


Abb. 24: Effekte von ACh auf die Kontraktionen in Segment 18 nach Inkubation mit dem NO-Synthase-Inhibitor L-NAME

A: Abbildung eines Gangabschnittes aus Segment 18 (Cauda)

Darstellung eines Gangabschnittes aus Segment 18 in 5-facher Vergrößerung. Das Lumen in der Cauda ist von außen nicht sichtbar auf Grund des sehr kompakten Gewebes. Zum Beispiel enthalten die im Cauda befindlichen Segmente einen dickeren Muskelmantel. Der orangene Balken markiert den Bereich, wo der Reslice erstellt wurde.

B: Visualisierung von ACh-Effekten aus Segment 18 (Cauda)

Die Effekte von L-NAME und ACh auf die Spontankontraktionen von Segment 18 des Nebenhodengangs werden mit einem Reslice dargestellt. Der große schwarze Pfeil markiert den Beginn der Aufzeichnung der Spontankontraktionen. Die großen blauen und roten Pfeile machen die Zugabe von L-NAME und ACh nach jeweils 10 min kenntlich. Die Kontraktionen (dargestellt durch die kleinen Pfeile) nehmen bei ACh-Gabe zu. Der weiße Balken gibt die Zeit von einer Minute an.

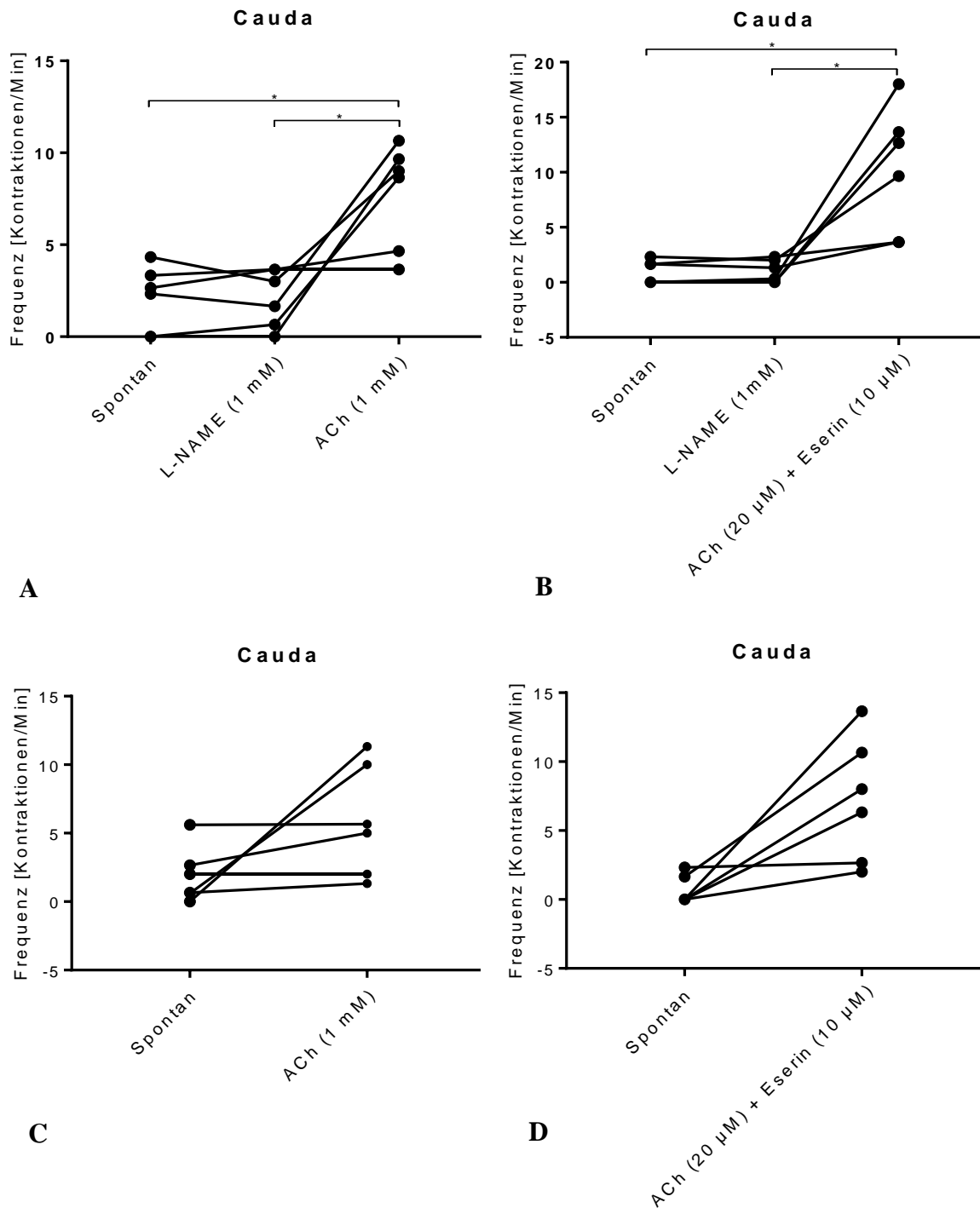


Abb. 25: Vergleich der ACh-Effekte in Segment 18 mit und ohne L-NAME Vorbehandlung

A-B: Wirkung von ACh auf die Spontankontraktionen nach Vorbehandlung der Gewebestücke mit L-NAME

Grafische Darstellung der ACh-Effekte in Segment 18 der Cauda bei unterschiedlichen Konzentrationen (A: ACh 1 nM; B: ACh 20 μM) und in Kombination mit Eserin (10 μM, B) nach L-NAME-Gabe (1 mM). Eine statistische Analyse verglich die Frequenzen der Spontankontraktionen mit den Frequenzen nach L-NAME und ACh-Zugabe. Statistische

Unterschiede konnten sowohl zwischen den Spontankontraktionen und der ACh-Gabe, sowie zwischen der L-NAME-Gabe und der ACh-Gabe nachgewiesen werden ($p \leq 0,05$). L-NAME hatte keinen Effekt auf die Spontankontraktionen.

C-D: Die Wirkung von ACh allein auf die Spontankontraktionen

Grafische Darstellung der ACh-Effekte auf die Spontankontraktionen in Segment 18 der Cauda bei unterschiedlichen Konzentrationen (C: ACh 1 nM; D: ACh 20 μ M) und in Kombination mit Eserin (10 μ M, D). Keine signifikanten Unterschiede konnten nachgewiesen werden. Dennoch zeigte sich in der Cauda im Vergleich zum Caput zumindest in der Mehrzahl der Versuche eine stimulierende Wirkung von ACh auf die glatte Muskulatur.

Das Signifikanzniveau wurde wie folgt gekennzeichnet: $p \leq 0,001$ - *** (hoch signifikant); $p \leq 0,01$ - **; $p \leq 0,05$ - * und $p > 0,05$ - n.s. (nicht signifikant); N= 5

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

Die vorliegenden Untersuchungen befassen sich mit strukturellen, biochemischen und funktionellen Aspekten der Segmentierung des Nebenhodens. Die Segmentierung wurde durch die interstitielle Injektion eines Farbstoffes, der innerhalb eines Interstitiums eines Segments verblieb, optisch dargestellt. Das bindegewebige Septum zwischen den Segmenten wurde durch zwei- und dreidimensionale (CLARITY, 3D-Rekonstruktion) Darstellungen strukturell aufgelöst. Neben einer Verdichtung an Kollagenfasern fanden sich auch eine Anhäufung von Nervenfasern und großen Gefäßästen im Septumbereich. Alle Abschnitte des stark gewundenen Nebenhodengangs, die nicht das Septum passieren, bilden eine konvexe Krümmung zum Septum. Bei der Frage, ob die Segmentierung sich auch auf den Inhalt des Nebenhodengangs erstreckt, wurde die Sialylierung der Spermatozoen in den einzelnen Segmenten untersucht. Hierbei zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen IS, Caput, Corpus und Cauda sowie zwischen Segment 1 und Segment 2. Ein erhöhter Sialinsäure-Gehalt wurde auch in den Segmenten 17 bis 19 gegenüber den vorgelagerten Segmenten gemessen. Dieser Unterschied konnte allerdings nicht als statistisch signifikant nachgewiesen werden. Weiterhin zeigten sich Kontraktionsunterschiede zwischen zwei benachbarten Segmenten (14 und 15). In Segment 18 zeigte sich ein statistisch signifikanter Anstieg der Kontraktionsfrequenz nach Zugabe von ACh.

5.2 Die morphologischen und strukturellen Aspekte der Segmentgrenzen

Der Nachweis einer Barrierefunktion zwischen Nebenhodengangsegmenten, den Turner et al. und Stammler et al. erbracht hatten, wurde in der vorliegenden Studie mittels Perfusion ins interstitielle Bindegewebe bestätigt (Turner et al. 2007b; Stammler et al. 2015). Turner und Mitarbeitern gelang es, durch Perfusionsversuche mit Wachstumsfaktoren und Kollagenase eine limitierte, Bindegewebssepten-bedingte, Durchlässigkeit der Substanzen im Bereich der Segmentgrenzen darzustellen. Des Weiteren wiesen sie der Segmentierung eine funktionelle Bedeutung zu. Jedes Segment soll demnach eine geschlossene Einheit mit eigener Funktion aufweisen. Allerdings konnten sie nur innerhalb der ersten Segmente einen signifikanten Unterschied in der Genexpression zwischen den einzelnen Segmenten nachweisen (Turner et al. 2007b). In Bezug auf den unterschiedlichen Sialinsäure-Gehalt von Spermien zwischen den 19 untersuchten Segmenten war es von Interesse, intersegmentale Barrieren zu ermitteln.

Dreidimensionale Visualisierungen von Organen, insbesondere von tubulären Strukturen wie im Nebenhoden, erleichtern es anatomische Strukturen zu verfolgen und Funktionen zu verstehen. Sie finden bereits Anwendungen in der Diagnostik der Medizin, bspw. beim MRT und CT. Besonders die Charakterisierung der Übergangsstelle des Nebenhodengangs durch das Septum in das nächstliegende Segment ist noch ungeklärt. Durch die dreidimensionale Darstellung der Segmentgrenze sollte erörtert werden, ob vermehrt Bindegewebe eng um die Übergangsstelle vorhanden ist.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden dreidimensionale Rekonstruktionen mit zwei unterschiedlichen Methoden hergestellt und miteinander verglichen. Zum einen erfolgte eine Rekonstruktion des Nebenhodens mit Paraffinschnitten. Zum anderen wurde der unpräparierte Nebenhoden von Fettgewebe geklärt und durch ein transparentes Gel (Acrylamid (A3PO)) ersetzt (CLARITY; Chung et al. 2013). Ähnlich wie bei der Immunfluoreszenz werden Antikörper mit einem fluoreszierenden Farbstoff verwendet. Der gewählte Fokus der dreidimensionalen Darstellung lag jeweils auf einer Segmentgrenze. Ziel der Arbeit war es, den Verlauf der Segmentgrenzen genauer zu verfolgen und Unterschiede in struktureller Beschaffenheit zwischen einzelnen Segmentgrenzen zu analysieren.

Charakterisierung der Segmentgrenzen mittels CLARITY

Mit Hilfe des CLARITY-Verfahrens konnte eine anschauliche Darstellung der wichtigsten anatomischen Strukturen in dreidimensionaler Ansicht erzielt werden. Hervorzuheben ist das ausgeprägte Gefäßnetzwerk um den Nebenhodengang. Große Gefäßäste verliefen in den Bindegewebssepten und gaben viele kleinere Gefäßzweige zu den angrenzenden Nebenhodengangabschnitten. Detailreiche Aufnahmen der Gefäßverläufe von männlichen Geschlechtsorganen wurden 1982 von Suzuki erfasst (Suzuki 1982). Hier wurden die Aorta thoracica und der rechte Herzhof von Mäusen mit speziellen Lösungen perfundiert. Anschließende Rasterelektronenmikroskop (REM)-Aufnahmen zeigten ein komplexes peritubuläres Gefäßsystem. Bei dem hier etablierten CLARITY-Verfahren ließen sich gleichzeitig neben den Gefäßen weitere Strukturen darstellen, wobei es möglich war, virtuelle einzelne Schichten des intakten 300 µm-Blocks zu analysieren.

Das CLARITY-Verfahren gab außerdem Aufschluss über den Verlauf des adulten Gangs. Die Entstehung und Formierung des Nebenhodengangs, beginnend im Caputbereich mit Krümmungen und Schleifenbildung des Nebenhodengangs vom 15.5 bis 18.5 Entwicklungstag, wurden bereits mit anderen Methoden untersucht (Joseph et al. 2009; Hirashima 2014; Robaire und Hinton 2015). Es wurde eine Beziehung der speziellen Windungen des Gangs zum benachbarten Bindegewebe festgestellt (Hirashima 2014, 2016). Aussagen zu der speziellen Lagebeziehung der Windungen zum Bindegewebsseptum wurden hier nicht getroffen (Hirashima 2014, 2016). Die CLARITY-Aufnahmen zeigten zum Septum hin konvex gekrümmte Nebenhodengangschleifen, ohne diese zu passieren. Die Hoffnung mittels CLARITY, die Übergangsstelle des Nebenhodengangs von einem Segment ins nächstliegende Segment genauer zu charakterisieren, wurde nur partiell bestätigt. So konnte keine Einengung des Gangs durch vermehrtes ihm umgebendes Bindegewebe festgestellt werden.

Stärken und Limitationen des Verfahrens

Die CLARITY ist eine Methode, die sich in der Hirnforschung 2013 neu etabliert hatte (Chung und Deisseroth 2013). Der entscheidende Arbeitsschritt bei der CLARITY ist das Ausspülen von Fettgewebe und das Ersetzen dieses Gewebes durch ein kolloidartiges Hydrogel, um eine optimale Klärung des Gewebes zu erreichen. Verglichen mit CLARITY-Präparaten des Gehirns (Chung et al. 2013), wurde das Bindegewebe des Nebenhodens nicht ausreichend klar, da neben der Anwesenheit von Spermien im Lumen,

auch der Fettanteil insgesamt geringer war (Milgroom und Ralston 2016). Der Lichtstrahl des konfokalen Mikroskops konnte das Gewebe nur limitiert durchdringen, sodass in weiteren Versuchen die Tunica des Präparats abgezogen werden musste, um das Eindringen von Substanzen für die Klärung und die spätere Immunmarkierung zu erleichtern. Die unterschiedliche Qualität der Antikörper, die schon bei normalen Immunfluoreszenzverfahren auffällt, zeigten sich in noch auffälligerer Weise bei dem CLARITY-Verfahren. Nachteilig war, dass die zur Verfügung stehenden Antikörper gegen Kollagen 1 entgegen der Erwartungen vermehrt intrazelluläre Strukturen anfärbten. Weitere entscheidende Faktoren für die Klärung sind das Einhalten von Temperatur, pH-Wert und Zeit. Zu hohe Temperaturen bringen das Gewebe zum Schmelzen und zu niedrige Temperaturen lassen das Hydrokolloid nicht auspolymerisieren (Yang et al. 2014; Epp et al. 2015). Ein besonderer Arbeitsschritt der CLARITY ist das „electrophoretic tissue clearing“ (ETC; Chung und Deisseroth 2013). Bei der ETC wird das mit Hydrokolloid benetzte Gewebestück in Clearing Solution gegeben. Elektroden werden an eine Kammer angeschlossen, sodass ein elektrisches Feld entsteht. Mizellen diffundieren in das Gewebe und verlassen es wieder zusammen mit Fettmolekülen und anderen ungebunden Molekülen. Die Gewebeklärung wird dadurch beschleunigt. In unserem Labor wurde das ETC am Nebenhodengewebe nicht durchgeführt. Das Ausspülen von Fettgewebe und anderen ungebundenen Molekülen wurde zwar auch im Nebenhodengewebe erreicht, allerdings fand der beschriebene Prozess langsamer und nicht vollständig statt.

Einer der bedeutendsten Vorteile des CLARITY-Verfahrens ist der Erhalt des komplett geklärten Gewebes, was die Strukturen schon und den Verlust von Informationen an den Schnittstellen vorbeugt (Pichat et al. 2018). Bei bisherigen dreidimensionalen Darstellungen wie sie in der Histologie Anwendung finden, werden von den Präparaten meist 5 bis 15 μm dicke Schnitte hergestellt (Stoltenberg et al. 1997; Singh et al. 2008) und mit speziellen Computerprogrammen virtuell zusammengefügt (Süss et al. 2002). Die nicht vollständige Klärung des Nebenhodengewebes führte dazu, dass bei der Modifizierung des CLARITY-Verfahrens für den Nebenhoden nach initialen Tests 300 μm dicke Scheiben angefertigt wurden, sodass diese Gewebestücke komplett von dem konfokalen Mikroskop durchdrungen werden konnten. Versuche eines Alignments mit dem Ziel, die verschiedenen 300 μm -Scheiben virtuell exakt zusammen zu setzen, wurden in der vorliegenden Arbeit auch unternommen. Diese waren allerdings nicht

erfolgreich, da keine eindeutigen Referenzpunkte von dem Computerprogramm ImageJ berechnet werden konnten.

Charakterisierung der Segmentgrenzen mittels 3D-Rekonstruktion

Eine zweite Methode, die herangezogen wurde, um die Segmentgrenze und die Übergangsstelle des Gangs von einem Segment ins nächstliegende Segment zu veranschaulichen, war die dreidimensionale Rekonstruktion des Nebenhodens mit 5 µm dicken Eosin-gefärbten histologischen Schnitten. Bei der Analyse des virtuellen Stapels zeigte sich, dass der Übergang ins nächstliegende Segment eine dicke Bindegewebsschicht überwinden muss. Eine exakte Definition der Übergangsstelle war durch diese 3D-Rekonstruktion aber nicht möglich.

Bereits 1997 rekonstruierten Stoltenberg et al. den Gang mittels 15 µm dicker, Routine gefärbten Paraffinschnitte (Stoltenberg et al. 1997). Er wollte den anatomischen Verlauf des Nebenhodens erörtern. Die Segmentgrenzen blieben dabei unbeachtet. In der hier vorliegenden Arbeit wurden mehrere hundert Einzelschnitte, Eosin gefärbt, und jeweils Fotos ihrer Eigenfluoreszenz angefertigt. Anschließend wurden die Einzelschnitte virtuell wieder zusammengefügt. Präparateigene Strukturen dienten als interne Marker für das Alignment (Streicher et al. 2000).

Stärken und Limitationen des Verfahrens

Folgende kritische Punkte des Verfahrens konnten beim Schneiden des Gewebes mit dem Mikrotom identifiziert werden: eventuell verloren gegangene Informationen sowie unterschiedlich kräftig gefärbte Einzelschnitte, die das Zusammenfügen der einzelnen Schnitte erschwerten und sich in einer Diskontinuität des Alignments äußerten. Eine Interpolation konnte bis zu einem gewissen Ausmaß Lücken wieder auffüllen (Knabe et al. 2002). Bis zum Erhalt eines Datensatzes ist diese Methode sehr zeitaufwendig. Bei der computergestützten Rekonstruktion kann es durch die unbewusste Erstellung eines falschen Datensatzes zu Fehlinterpretationen kommen. Insbesondere tubuläre Strukturen wie der Nebenhoden sind anfällig für geometrische Verschiebungen (Stoltenberg et al. 1997). Ebenso werden leistungsstarke Rechner benötigt.

Eine Alternative bietet ein automatisches Schneidesystem kombiniert mit einem REM bzw. serial-block-face-scanning electron microscopy (SBEM; Wernitznig et al. 2016). Bei dieser Methode können Schnitte im nm-Bereich hergestellt und gleichzeitig

aufgenommen werden. Ein Färben der einzelnen Schnitte entfällt. Man erhält mit wenig Aufwand einen Datensatz für eine dreidimensionale Rekonstruktion sowie eine viel höhere Auflösung als mit einem Lichtmikroskop.

Vergleich der beiden angewandten Verfahren

Die hier vorgestellten Verfahren der dreidimensionalen Darstellungen vom Nebenhoden unterscheiden sich hinsichtlich Methode/Arbeitsaufwand, Gerätschaften und Ergebnissen. Das CLARITY-Verfahren ist in erster Linie eine optisch anschauliche Methode und verbessert das Verständnis über die räumliche Organisation von bestimmten Proteinen innerhalb eines Organs. Strukturen werden visualisiert. Die fertige Rekonstruktion an histologischen Schnitten ermöglicht eine genauere Analyse des Organs wie eine Volumenberechnung oder eine Längenmessung, da Informationen von jedem Schnitt zugänglich sind.

Virtuelle Rekonstruktionen und aus dem CLARITY-Verfahren hervorgegangene Filme ermöglichen es, das zu untersuchende Objekt in beliebig vielen Ebenen zu analysieren. Eine räumliche Anordnung von Strukturen und/oder Proteinen wird erstellt. Größe und Form des Gewebes werden dann richtig proportioniert zueinander dargestellt. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit, Datensätze zu verschicken und jedem zugänglich zu machen. Eine Kommunikation zwischen Instituten wird erleichtert.

5.3 Die biochemische Charakterisierung des Sialinsäure-Gehalts von Spermatozoen in den einzelnen Segmenten

In der hier vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Neu5Ac-Gehalt in Spermien des Nebenhodens in allen 19 Segmenten der Ratte durch ein kombiniertes Verfahren aus LCM und HPLC-Analyse untersucht. Bisherige Untersuchungen des Sialinsäurestatus auf der Spermienoberfläche und in der luminalen Flüssigkeit beschränkten sich auf Proben aus unterschiedlichen Regionen von Caput, Corpus und Cauda (Tulsiani et al. 1993; Tulsiani 2003; Chandra et al. 2008; Ma et al. 2012; Ma et al. 2016; Khosravi et al. 2016).

Der höchste Gehalt an Neu5Ac wurde im ersten Segment nachgewiesen. Es lag eine statistisch signifikante Abnahme des Neu5Ac-Gehalts von Segment 1 zu Segment 2 vor. In den darauffolgenden Segmenten bis einschließlich Segment 17 war der Gehalt verhältnismäßig niedrig. Eine erneute Zunahme des Neu5Ac-Gehalts wurde bei den Segmenten 18 bis 19 gemessen.

In vorhergehenden Studien wurden eine Zunahme verschiedener Sialinsäuren (Sia α 2,3- sowie α 2,6 und Neu5Gc) von Caput nach Cauda auf der Spermienoberfläche von Mäusen mittels Durchflusszytometrie und immunhistochemischen Verfahren nach Lektinfärbung gemessen (Ma et al. 2016). Des Weiteren wurde die Sialyltransferase-Aktivität durch die Bestimmung des Neu5Ac-Gehalts mittels HPAEC-PAD in der luminalen Flüssigkeit analysiert. Die Sialyltransferase-Aktivität war im distalen Caput und im Corpus am höchsten (Ma et al. 2016). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie konnten bei dem Vergleich des Sialinsäure-Gehalts mit Mäusespermien zunächst nicht bestätigt werden. Bei der Maus konnte eine Zunahme der Sialinsäuren in Richtung Cauda (Ma et al. 2016) und bei der vorliegenden Rattenstudie ein U-förmiger Verlauf festgestellt werden. Die voneinander abweichenden Ergebnisse können z.B. auf speziesabhängigen und methodischen Faktoren beruhen. Bei der Studie von Ma und Kollegen (Ma et al. 2016) ist nicht sicher, ob das Segment 1 mit seinem besonders hohen Neu5Ac-Gehalt eingeschlossen war.

Bezogen auf die zwei verschiedenen Spezies, ist die anatomische Einteilung in die Regionen Caput, Corpus und Cauda gleich, allerdings differiert die Anzahl der Segmente. In der Maus wurden 10 Segmente und in der Ratte 19 Segmente beschrieben (Jelinsky et al. 2007). Im Gegensatz zu der segmentweisen Analyse des Sialinsäure-Gehalts von

Rattenspermien wurden die Spermien von den Mäusen aus den anatomischen Regionen entnommen, sodass eine differenzierte Betrachtung der einzelnen Segmente zueinander und ein direkter Vergleich der beiden Spezies nicht möglich ist. Ein möglicherweise höherer Sialinsäure-Gehalt im ersten Segment der Maus wurde durch die folgenden 4 Segmente, die als Caput in der Maus zusammengefasst wurden, relativiert. Wenn tatsächlich ein höherer Sialinsäure-Gehalt auf der Spermienglykokalix im ersten Segment von Mäusen vorhanden ist, so würde man auch einen U-förmigen Verlauf erwarten. Eine weitere Studie an Rattenspermien belegt diese Annahme, da die höchste Sialyltransferase-Aktivität auf der Spermienoberfläche im proximalen Caputbereich gemessen wurde (Tulsiani et al. 1993).

Ein weiterer bedeutender Aspekt bei dem Vergleich des Sialinsäure-Gehalts in den Regionen der beiden Spezies könnte die Gruppe der Sialinsäuren sein, die analysiert wurden. So wurde bei der Analyse der Rattenspermien der Neu5Ac-Gehalt und bei der Maus α 2,3- sowie α 2,6 gebundene Sialinsäuren und Neu5Gc untersucht (Ma et al. 2016). Der Neu5Gc-Gehalt auf der Spermienoberfläche von Ratten war in der vorliegenden Untersuchung so gering, dass dieser nicht messbar war.

Ein Unterschied der Ergebnisse kann möglicherweise auf die angewandten Verfahren zurückzuführen sein. Die Analyse der Mäusespermien in der Studie von Ma et al. erfolgte mittels Durchflusszytometrie (Ma et al. 2016). Für die Detektion der Neu5Gc wurden spezielle anti-Neu5Gc-Antikörper und für α 2,3- sowie α 2,6-gebundene Sialinsäuren wurden Lektine verwendet. Lektine sind komplexe Glykoproteine, die spezifisch Kohlenhydratstrukturen erkennen und binden. Sie weisen jedoch im Vergleich zu Antikörpern eine deutlich schlechtere Affinität auf (André et al. 2009; Gabius et al. 2011). Sialinsäuren befinden sich an den terminalen Enden von Glykoproteinen und Glykolipiden und liegen innerhalb der Glykokalix eng beieinander. Es könnte für die relativ großen Lektinmoleküle problematisch sein, jede Sialinsäure zu lokalisieren und zu markieren (Gabius et al. 2011). Untersuchungen zur Spezifität des verwendeten anti-Neu5Gc-Antikörpers in der Studie von Ma und Kollegen (Ma et al. 2016) sind nicht möglich, da dieser nicht frei auf dem Markt verfügbar ist. Neu5Gc ist im Vergleich zu Neu5Ac auf Zellen weniger präsent und dementsprechend konnte in der vorliegenden Studie der Neu5Gc-Gehalt nicht bestimmt werden trotz der sensitiven Methode der HPLC-Analyse. Dieses Verfahren ist sehr spezifisch (Bartel et al. 2014), da durch die Hydrolyse alle Sialinsäuren von den Glykoproteinen abgespalten werden und erst im

Anschluss markiert werden. Mit den Retentionszeiten von Standardreihen wie Neu5Ac, Neu5Gc und KDN konnten die vorhandenen Sialinsäuren abgeglichen werden.

Aus funktioneller Sicht kann ein unterschiedliches Vorhandensein der Glykosyltransferasen und Glykohydrolasen, die für den An- und Abbau von Zuckerresten verantwortlich sind, in der luminalen Flüssigkeit und auf der Spermienoberfläche der einzelnen Segmente von Bedeutung sein (Skudlarek et al. 1992; Tulsiani 2003). Analysen bezüglich der Glykosyltransferase- und Glykohydrolase-Aktivität in der Cauda des Nebenhodens der Ratte haben gezeigt, dass 80 % der Aktivität in der luminalen Flüssigkeit vorhanden und 20 % der Aktivität mit den Spermien assoziiert waren (Skudlarek et al. 1993; Tulsiani et al. 1993; Tulsiani et al. 1995; Tulsiani 2003). Sialinsäuren sind sehr empfindliche Moleküle und können schnell abgespalten werden. Bei der Passage durch den Nebenhoden sind Spermien unterschiedlichen pH-Werten und Ionenkonzentrationen ausgesetzt (Robaire und Hinton 2015). Das vorliegende Milieu kann die Aktivität der Glykosyltransferasen und Glykohydrolasen beeinflussen (Skudlarek et al. 1992; Tulsiani 2003, 2006). Zudem besitzen Spermien selber Sialidasen (Ma et al. 2012). Im ersten Segment überwiegt die Sialyltransferase-Aktivität auf der Spermienoberfläche (Tulsiani et al. 1993) und ein hoher Sialinsäure-Gehalt der Rattenspermien aus der vorliegenden Untersuchung liegt vor. Im anschließenden zweiten Segment kommt es zu einem starken Abfall des Sialinsäure-Gehalts der Rattenspermien, möglicherweise bedingt durch eine viel geringere Transferaseaktivität (Tulsiani et al. 1993). Proteolytische Prozesse können die Proteine und Glykoproteine auf der Plasmamembran von Spermien ebenso segmentweise verändern (Tulsiani et al. 1995).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigten eine Sialylierung der Spermienglykokalix direkt im ersten Segment. Das erste Segment ist Teil des IS und hat somit eine wichtige Bedeutung in der Reifung der Spermien. Studien zeigten, dass ein nicht vollständig entwickeltes IS zu Infertilität des Mannes führen (Xu et al. 2016). Faktoren, die mit der luminalen Flüssigkeit aus dem Hoden in den Nebenhodengang gespült werden, sollen u.a. Epithelzellen des IS zur Zellproliferation stimulieren (Xu et al. 2010; Xu et al. 2016). Die Wichtigkeit des IS wird deutlich bei Vorliegen eines Androgenmangels (O'Hara et al. 2011). Das Ausschalten von Androgenrezeptoren im Epithel des Caputs in einem Mausmodell führten zu einer Nichtentwicklung des IS sowie zu einer Beeinträchtigung der Epithelzellfunktion (O'Hara et al. 2011). Hier wurde eine Sekretion von Proteinen aus dem Nebenhodengangepithel ins Lumen unterbunden, was in der Folge auch die

Sialylierung der Epithelzellen reduzieren dürfte. Allerdings sind Spermien selbst in der Lage, Sialinsäuren freizusetzen (Ma et al. 2012). Die hohe Sialyltransferase-Aktivität im Caput stützt die vorliegenden Ergebnisse (Tulsiani et al. 1993). Auch PolySia wurde in den Epithelzellen beschrieben und auch hier im proximalen Bereich des Organs detektiert (Simon et al. 2013).

Die Besonderheiten des IS werden außerdem bei der Darstellung des Nebenhodengangs mit der CLARITY-Methode deutlich (siehe Abb. 12A). Das IS der Ratte zeigt eine sehr starke Vaskularisierung, welche auch mit der gleichen Methode in einem transgenen Mausmodell sichtbar gemacht wurde (Reckmann et al. 2018). Viele peritubuläre Gefäße umschlingen den gesamten Gang (siehe Abb. 12A). In Richtung Corpus und Cauda nimmt die Dichte des Gefäßnetzwerkes ab (Suzuki 1982). Die besondere Gefäßdichte im IS deutet dementsprechend auf eine hohe metabolische Aktivität hin (Robaire und Hinton 2015). So wird z.B. gewährleistet, dass Spermien ausreichend sialyliert werden.

Stärken und Limitationen des Verfahrens

Die beschriebenen Verfahren der LCM und HPLC-Analyse (siehe 3.2.2) sind sehr sensitive und reproduzierbare Methoden. Eine Mindestanzahl von 300 Zellen muss isoliert werden, um eine Auswertung zu ermöglichen. Da es aber zell- und spezieabhängig ist, wie hoch die zelluläre Konzentration der Sialinsäurereste ist, muss gegebenenfalls eine höhere Zellzahl mikrodiseziert werden. Es gelten drei Bedingungen für die Sensitivität dieses Verfahrens. (i) Die LCM muss Zellen spezifisch isolieren können, (ii) das Vorhandensein herauskatapultiertes Zellen in den Adhäsivcaps muss überprüft werden, und (iii) die Adhäsivcaps müssen während der Hydrolyse vollständig mit Essigsäure bedeckt sein (Bartel et al. 2014).

Methodische Fehler können die vorliegenden Neu5Ac-Werte beeinflusst haben. Die distalen Segmente der Cauda speichern Spermien und bereiten diese auf die Emission und Ejakulation vor (Robaire und Hinton 2015). Der Tubulusdurchmesser ist größer und mehr Spermien befinden sich im Lumen. Somit konnten per LCM nicht gleichzeitig alle Spermien eines Gangquerschnittes mikrodiseziert und insbesondere herauskatapultiert werden. Spermien von kleineren und weniger vollen Tubulusquerschnitten, ließen sich leichter sammeln als größere Bereiche. Um ein Herauskatapultieren aller Spermien in den Querschnitten der Segmente 18-19 zu ermöglichen, mussten die Spermienflächen anteilig in mehreren Schritten mikrodiseziert werden. An den Schnittflächen ist ein Verlust von

Spermien somit nicht ausgeschlossen. Da die Fläche vor der LCM bestimmt wurde (siehe Etablierung einer neuen Methode unter 4.2), könnte durch den potenziellen Spermienverlust beim Ausschneiden eine geringgradig größere Spermienoberfläche ins Verhältnis zum Sialinsäure-Gehalt gesetzt worden sein.

In wie weit die luminale Flüssigkeit und die in ihr enthaltenen sialylierten Moleküle, sowie weitere korpuskuläre Bestandteile wie Immunzellen bei der Paraffineinbettung fixiert oder ausgespült worden sind, ist schwer zu beurteilen. Es wäre denkbar, dass Flüssigkeit in dem engen Maschenwerk der dicht gepackten Spermien weniger gut herausgespült worden sind als in Segmenten, die weniger Spermien enthalten. Bei Gangquerschnitten mit nur wenigen Spermien ist der größte Teil der luminalen Moleküle nicht quervernetzt und somit vermutlich im Rahmen der Paraffineinbettung herausgespült worden. Hier konnte der Sialinsäure-Gehalt der Spermien nicht negativ beeinflusst werden.

Neuere Studien haben nachgewiesen, dass eine bakterielle Infektion mit *E. coli*-Bakterien eine Desialylierung auf der Spermienoberfläche und im Nebenhodengangepithel zur Folge hatte. Die Untersuchungen haben ergeben, dass der Neu5Ac-Gehalt auf den Nebenhodenepithelzellen als auch auf den Spermien nach einer Infektion deutlich reduziert war. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass Sialidasen bei einer bakteriellen Infektion für die Abnahme des Sialinsäure-Gehalts im Epithel und auf der Spermienoberfläche verantwortlich waren (Khosravi et al. 2016).

Es wurde bereits in einem Mausmodell beschrieben, dass die luminale Ausbreitung bei einer aufsteigenden bakteriellen Infektion durch *E. coli*-Bakterien segmentweise erfolgte. Die luminale Ausbreitung steht im Zusammenhang mit der Verengung des Nebenhodengangs in dem Segment direkt oberhalb der Infektion (Stammler et al. 2015). Eine vergleichbare Verengung fand sich auch beim entzündeten menschlichen Nebenhoden. Auch in der Urethra wurde eine Verengung des Gangs nach einer bakteriellen Invasion nachgewiesen (Deckmann et al. 2014). Es wäre daher von Interesse zu untersuchen, ob eine Desialylierung der Spermienglykokalix auch oberhalb der Entzündung stattgefunden hat.

Bei den hier vorliegenden Ergebnissen der Dissertation wurde ein Anstieg des Sialinsäure-Gehalts auf der Spermienoberfläche in den distalen Segmenten gezeigt. Vor dem Hintergrund, dass die Sialylierung essentiell ist für eine erfolgreiche Fertilisierung

(Ma et al. 2016), muss am Ende des Nebenhodens sichergestellt sein, dass die Spermien ausgereift, d.h. auch mit einer hohen Sialylierung versehen, den Nebenhodengang verlassen. Zwischen dem zweiten und 17. Segment war der Sialinsäure-Gehalt relativ konstant und gering im Vergleich zu den Segmenten 1 (mit seiner Sonderfunktion) und 18 bis 19. In den mittleren Segmenten ist diese relativ niedrige Konzentration von Vorteil, was mit einer Balance zwischen der Aktivität der Sialidasen und Sialyltransferasen einhergehen dürfte. Eine frühzeitige starke Sialylierung hätte den Nachteil, dass Spermien bei Verlusten von Sialinsäuren erneut sialyliert werden müssen. Somit ist eine maximale Sialylierung vor Austritt aus dem Nebenhodengang energetisch am günstigsten.

5.4 Die funktionelle Charakterisierung des Kontraktionsmusters in ausgewählten Segmenten

Auch in Hinsicht auf die Kontraktionen des Nebenhodengangs sollten segmentale Unterschiede untersucht werden. Mittels Time-Lapse Imaging wurden Spontankontraktionen exemplarisch in zwei benachbarten Segmenten des Nebenhodengangs (Segment 14 und 15) analysiert. Es konnte ein gerichteter Transport des luminalen Inhalts, der bereits durch Messungen des Neu5Ac-Gehalts segmentweise analysiert wurde (siehe 3.2.2), gezeigt werden. Die Spontankontraktionen waren in beiden Segmenten regelmäßig. Diese zeigten in Segment 14 aber eine erhöhte Frequenz gegenüber Segment 15. Die genannte unterschiedliche Frequenz der Kontraktionen in zwei benachbarten Segmenten könnte daraufhin deuten, dass mit segmentweiser abweichender Kontraktion auch die Transportgeschwindigkeit des luminalen Inhalts zwischen einzelnen Segmenten ungleich ist.

Vor dem Hintergrund bekannter ACh-Effekte auf die Kontraktionen z.B. im Magen-Darm-Trakt (Jositsch et al. 2009) und der Beschreibung entsprechender Rezeptoren im Nebenhoden (Siu et al. 2006) wurde die Hypothese eines direkt stimulierenden ACh-Effekts auf die Spontankontraktionen aufgestellt. Dieser zeigte sich nicht. Im Vergleich zum Caput hatte ACh in der Cauda zumindest in der Mehrzahl der Versuche eine stimulierende Wirkung auf die glatte Muskulatur, was durch eine ältere Arbeit (Hib 1976) gestützt wird. Demgegenüber wurde schon ein gegenläufiger relaxierender Effekt in der Literatur beschrieben (Muratori 1956). Im Gefäßsystem gab es schon 1980 Hinweise darauf, dass ein relaxierender ACh-Effekt durch einen endothelialen Faktor ausgelöst wird. Dieser wurde später als NO identifiziert, was von NO-Synthasen produziert wird und über Bindung an muskuläres sGC und einen cGMP-Anstieg zur Relaxation der glatten Gefäßwandmuskulatur führte (Kuhn 2016). Um den Einfluss von ACh auf die NO-Synthase und damit auf NO in der vorliegenden Studie zu untersuchen, wurden die Gewebeprobe des Nebenhodengangs mit dem NO-Synthase-Inhibitor N ω -Nitro-L-Arginin Methylester (L-NAME) vorbehandelt und die Wirkung von ACh wurde erneut untersucht. Es konnte sowohl im Caput als auch in der Cauda eine Erhöhung der Frequenz erzielt werden. Diese war in der Cauda jedoch größer.

Die Hypothese bezüglich der L-NAME/ACh-Effekte konnte nicht bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die NO-Synthase einen bedeutenden Einfluss auf das Kontraktionsmuster im Nebenhodengang haben könnte (siehe Abb. 26). Ältere

Studien zeigten eine Präsenz der NO-Synthase in Epithelzellen, Endothelzellen und Nervenfasern im Nebenhoden der Ratte (Burnett et al. 1995; Dun et al. 1996). In einer Epithelzelle im Nebenhoden könnte über eine Bindung von ACh an mAChR der intrazelluläre Calciumspiegel über Calciumkanäle in der Membran erhöht werden. Calciumionen stimulieren die NO-Synthase NO zu katalysieren. NO diffundiert daraufhin zu den glatten Muskelzellen. Eine Bindung an sGC bewirkt eine Aktivierung des cGMP-Signalweges. Eine Relaxation der glatten Muskulatur ist die Folge. ACh könnte parallel über mAChR direkt in der glatten Muskulatur des Nebenhodengangs eine Aktivierung des G_q - Proteins bewirken. Daraufhin wird die PLC aktiviert und spaltet Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP_2) in IP_3 und DAG. IP_3 bewirkt eine Freisetzung von Calcium aus dem ER, sodass das Gewebe kontrahiert (siehe Abb. 26; Liu und Khalil 2018). Es kann angenommen werden, dass beide genannten Mechanismen parallel in den Zellen des Nebenhodengangs stattfinden. Eine Erhöhung der Spontanfrequenz nach ACh-Gabe resultiert bei geringer NO-Konzentration und umgekehrt.

Es könnte auch die Situation geben, dass beide Signalwege im Gleichgewicht zueinanderstehen und kein Effekt auf das Kontraktionsmuster zu beobachten ist. In der Cauda konnte man tendenziell eine Erhöhung der Frequenz nach ACh-Gabe sehen. Studien haben belegt, dass zur Cauda hin die M3 mAChR in der glatten Muskulatur zunehmen (Siu et al. 2006). Folglich könnte hier der kontraktionsfördernde Effekt von ACh dominieren. Bisherige Kontraktionsstudien fokussierten sich auf den kaudalen Abschnitt des Nebenhodens (Hib 1976; Laitinen und Taló 1981; Siu et al. 2006;). Dadurch könnte die in jenen Studien postulierte Erhöhung der Frequenzen bei Zugabe von ACh und Agonisten wie Carbachol zu erklären sein (Laitinen und Taló 1981; Pholpramool und Triphrom 1984; Siu et al. 2006). Bei Blockade der NO-Synthase mit L-NAME, konnte kein NO mehr generiert werden, ACh wirkte ausschließlich über mAChR in der glatten Muskulatur und führte zu einer Erhöhung der Frequenz sowohl im Caput als auch in der Cauda.

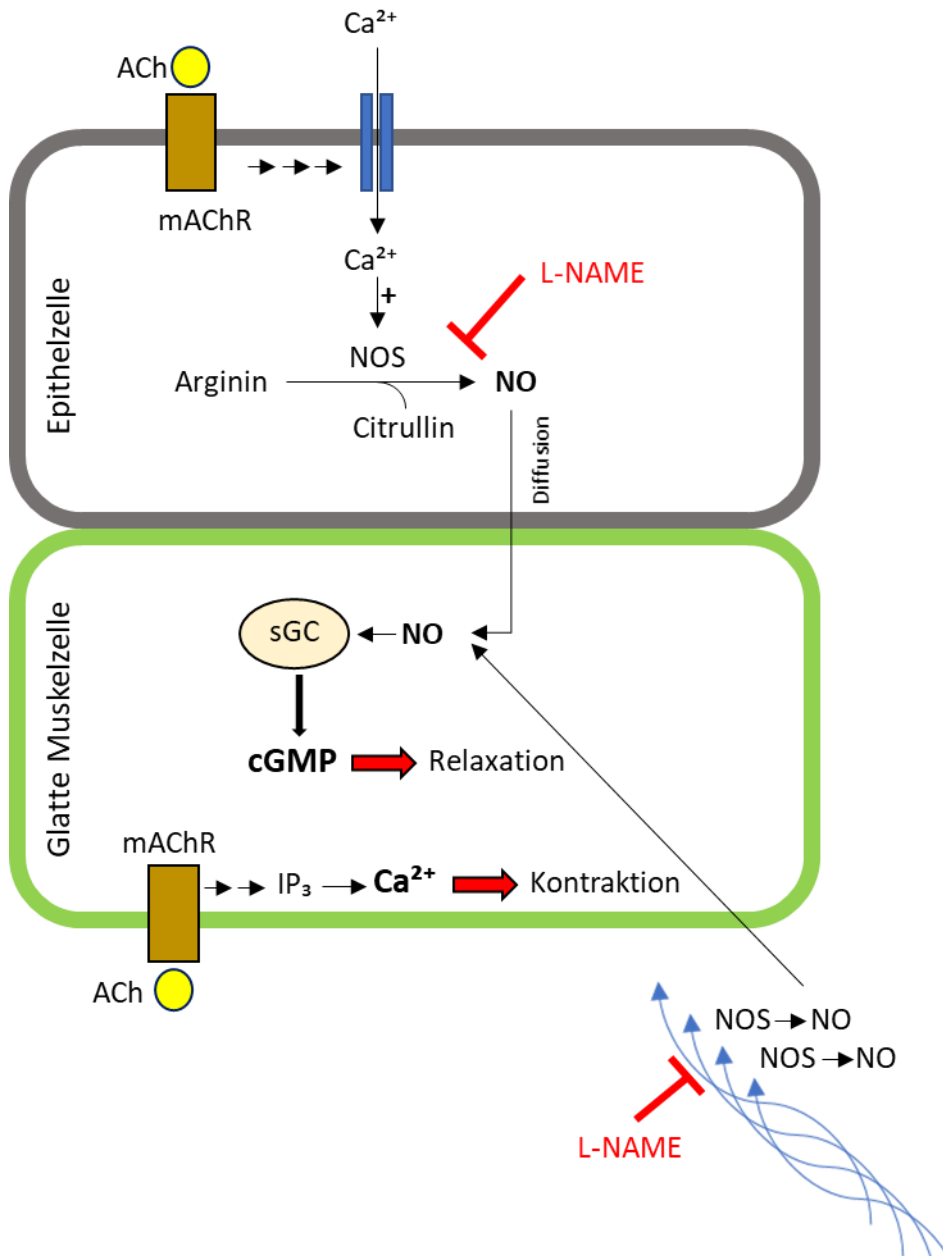


Abb. 26: Hypothese zu den unterschiedlichen Effekten von ACh im Nebenhodengang

ACh könnte eine Aktivierung von zwei gleichzeitig ablaufenden Signalkaskaden über mAChRs an einer Epithelzelle und einer glatten Muskelzelle bewirken. Innerhalb einer Epithelzelle wird NO generiert. NO diffundiert in die glatte Muskelzelle und führt zu einer Relaxation über die Aktivierung von sGC. Alternativ können auch die an die Muskelzelle heranreichende Nervenfasern NO über eine neuronale NO-Synthase bilden, was dann direkt auf die glatte Muskelzelle wirkt. Zeitgleich könnte ACh an der glatten Muskelzelle in einem G_q vermittelten Prozess und über IP₃ und Ca^{2+} zu einer Kontraktion führen.

Der Netto-Effekt von ACh dürfte von der lokalen ACh-Konzentration, sowie der Art und Dichte der Rezeptoren abhängig sein. Eine Hemmung der NO-Synthase über L-NAME verhindert die Neubildung von NO, sodass der kontraktile Effekt überwiegen würde.

Es besteht auch die Möglichkeit, dass NO von der endothelialen NO-Synthase (eNOS) innerhalb der glatten Muskelzelle gebildet wird und somit direkt auf die Spontankontraktionen Einfluss nimmt. Immunhistochemische Untersuchungen haben eine Präsenz von eNOS sowohl im Epithel als auch in der glatten Muskulatur von Caput und Corpus des Bullennebenhodens gezeigt (Mewe et al. 2006a). Ob diese Annahme auf den Nebenhoden der Ratte übertragbar ist, muss noch nachgewiesen werden.

Dun et al. wiesen eine Zunahme von neuronalen NOS (nNOS)-immunreaktiven Nervenfasern in Richtung der Cauda des Nebenhodens der Ratte nach. nNOS-positive Nervenfasern reichten bis zur Muskulatur hin (Dun et al. 1996). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Relaxationen der glatten Muskelzellen auch neuronal vermittelt sein können, was in anderen Organsystemen ausführlich beschrieben wurde (Fernandes und Hernández 2016; Wang et al. 2016). Nach Aktivierung der NO-Synthase über ACh wird NO aus den Nervenendigungen freigesetzt (Guerra et al. 2018). NO wirkt hierbei dann direkt auf die glatten Muskelzellen. Der Einfluss von noch vorhandenen Nervenfasern bzw. -endigungen nach der Gewebepräparation auf die Kontraktionen kann über eine elektrische Feldstimulation im Organbad überprüft werden. Derartige Untersuchungen für die in dieser Studie genutzten Nebenhodengangabschnitte der Ratte wurden bislang nicht durchgeführt.

Entgegen der Hypothese hatte L-NAME in den hier durchgeführten Untersuchungen keinen alleinigen Effekt auf die Spontankontraktionen. Eine Zunahme der Kontraktionen durch Blockade der NO-Synthase war nicht zu beobachten. Nur ein Zusammenspiel von L-NAME und ACh konnten die Spontankontraktionen beim Rattennebenhoden beeinflussen. Dem gegenüber hatten Studien am Caput des Bullennebenhodens mit dem NO-Synthase-Inhibitor L-NAME einen sofortigen Anstieg an Spontankontraktionen der glatten Muskulatur gezeigt. Im Corpus hingegen war bei jener Untersuchung zunächst eine Unterdrückung der Spontankontraktionen von einigen Minuten mit anschließender Beschleunigung der Spontanfrequenz zu sehen (Mewe et al. 2006a). Im Unterschied zu den eigenen Untersuchungen wurden in der hier zitierten Arbeit Organbadstudien durchgeführt (Mewe et al. 2006a).

Nguyen et al. machten vergleichbare Untersuchungen an der Prostata von Kaninchen (Nguyen et al. 2013). Eine ACh-Gabe konnte ebenfalls an der Prostata keinen eindeutigen Effekt auf die Kontraktionsfrequenz nachweisen. Bei Vorbehandlung des Gewebes mit

Sympathikomimetika und anschließender ACh-Gabe konnte eine Abnahme der Frequenz der glatten Muskulatur beobachtet werden. Ein eindeutiger cholinerges Effekt konnte von Nguyen und Kollegen aber durch Zugabe von Atropin vor der ACh-Zugabe bewiesen werden. Ein relaxierender Effekt blieb aus. M2 und M3 AChR würden in der Prostata Einfluss auf die Spontankontraktionen besitzen (Nguyen et al. 2013). Ähnlich wie bei der Nguyen-Gruppe erhöhte der NO-Synthase-Inhibitor L-NAME in Kombination mit ACh auch in den eigenen Studien am Rattennebenhoden die Kontraktionsfrequenz der glatten Muskulatur. In der Prostata wird von einem Region- und Speziesabhängigen Effekt ausgegangen (Nguyen et al. 2013).

Stärken und Limitationen des Verfahrens

Time-Lapse Imaging ist eine sehr gute Alternative, um systematisch Kontraktionsmuster an verschiedenen Organen über einen längeren Zeitraum einfach auszuwerten und zu studieren. Über die Erstellung eines Reslices konnte die Frequenz der Spontankontraktionen am Nebenhodengang visualisiert werden. Bei Verlagerung der virtuellen Linie innerhalb des präparierten Gangabschnitts eines Segments veränderte sich die Frequenz kaum bis gar nicht, was für eine konstante Frequenz über weite Strecken des Segments spricht. Die reine Beobachtung des Videos ohne Erstellen eines Reslices gibt hingegen keinen sicheren Aufschluss über das Kontraktionsmuster und die -frequenz. Wie noch unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigten (Middendorff, persönliche Mitteilung), eignet sich Time-Lapse Imaging sowohl für einen kürzeren als auch für einen längeren Beobachtungszeitraum. Das Kollagen, in welches das Gewebestück eingebettet ist, fixiert das präparierte Gewebestück ohne jedoch dieses in seiner Bewegung einzuschränken. Heizelektroden sorgen für eine physiologische Temperatur. Im Vergleich zu Organbadstudien entfällt das Einklemmen der Gewebestücke zwischen zwei Klammern und es muss nach Einspannen der Proben eine Vorspannung erzeugt werden. Beide Arbeitsschritte können das Gewebe und dessen Funktion manipulieren. Die morphologische Bewertung des Gangabschnitts bezüglich Zelldicke sowie die Bewegung des luminalen Inhalts kann nur durch die Bildaufnahme beim Time-Lapse Imaging erfasst werden. Dennoch bieten Organbadstudien einige Vorteile gegenüber dem Time-Lapse Imaging, wie die Möglichkeit einer parallelen Analyse von mehreren Gewebeproben, die direkt messbare Amplitude sowie den einfachen Zu- und Abfluss verabreichter Substanzen.

Nur wenige Studien fokussierten sich bisher auf die männliche Unfruchtbarkeit in Zusammenhang mit Kontraktionen des Nebenhodengangs. Ältere Studien zeigten aber bereits, dass der Ductus deferens molekular bedingte kontraktionsrelevante Störungen (Mulryan et al. 2000; Lee et al. 2000) aufweisen kann, die zu Infertilität führen. Unklar ist, ob solche Störungen auch die Kontraktionen des Nebenhodengangs beeinflussen. Auch ist nicht klar, ob Medikamente über eine Beeinflussung des Kontraktionsmusters im Nebenhoden zu Infertilität führen können. Es ist bereits bekannt, dass eine Atropingabe auf die glatte Muskulatur wirkt und zu einer Abnahme der Kontraktionen führt (Hib 1976; Sato et al. 2005). Atropin gehört zu den Parasympatholytika, die kompetitiv den Effekt von ACh an den mAChR hemmen (Alabaster 1997). Atropin wird diagnostisch in der Augenheilkunde als auch therapeutisch z.B. bei bradykarden Herzrhythmusstörungen oder Inkontinenz eingesetzt (Alabaster 1997; Caglayan et al. 2013; Barstow und McDivitt 2017). Studien an der Ratte, bei denen nur die Männchen mit Atropin behandelt wurden, zeigten eine vorübergehende Reduktion der Schwangerschaftsrate, die nach Beendigung der Atropingabe reversibel war (Ban et al. 2002). Welches Organ des männlichen Reproduktionstraktes den größten Einfluss auf die Schwangerschaftsrate hatte, wurde in dieser Studie nicht weiter diskriminiert. Die Spermienanzahl in der Cauda des Nebenhodens wurde allerdings nicht beeinflusst (Ban et al. 2002). Weitere Studien zeigten Atropin-abhängige Veränderungen im Ductus deferens und in der Samenblase (Sato et al. 2005). Nach Paarung der Ratten kam es zu einer Zunahme der Spermienanzahl im Ductus deferens sowie des Samenblasensekretes in der Samenblase. Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass während der Emission Muskelkontraktionen durch Atropin gehemmt wurden (Sato et al. 2005). Ob auch Störungen im Nebenhoden für die nach Atropingabe gefundenen Veränderungen mit verantwortlich sind, ist in den genannten Studien nicht untersucht worden. Die eigene Untersuchung zu ACh lässt durchaus eine solche Beteiligung möglich erscheinen.

Die aktuelle Arbeit hat sich bei der Analyse des Kontraktionsmusters im Nebenhodengang auf ausgewählte benachbarte Segmente konzentriert. Weitere Studien sind notwendig, um zu klären ob es über die Gesamtlänge des Gangs segmentspezifische Charakteristika in der Kontraktion mit funktionellen Implikationen gibt.

6 Zusammenfassung

Der Nebenhoden wird neben der klassischen Einteilung in Caput, Corpus und Cauda durch Bindegewebssepten in einzelne Segmente unterteilt. Bei der Ratte sind es z.B. 19 Segmente. Erst während der Passage durch den die Segmentgrenzen passierenden Nebenhodengang erlangen die Spermatozoen ihre Fertilisierungsfähigkeit. In der hier vorliegenden Arbeit wurden mittels unterschiedlicher Methoden im Nebenhoden die Segmentgrenzen und deren Stellenwert in struktureller, biochemischer und funktioneller Hinsicht charakterisiert.

Die Existenz von interstitiellen Nebenhodenbarrieren konnte durch Perfusion ins Interstitium eines Segments dargestellt werden. Die Tracer-Lösung verblieb durch die Bindegewebssepten innerhalb eines einzelnen Segments. Durch zwei- und dreidimensionale Darstellungen (Immunfluoreszenz und -histochemie, CLARITY, Eosineigenfluoreszenz) konnte die Faserstruktur und räumliche Ausbreitung eines Septums genauer charakterisiert werden.

Bei der Frage, ob der Inhalt des Nebenhodengangs auch segmentale Besonderheiten aufweist, wurden segmentweise die Spermatozoen mittels Lasermikrodissektion aus dem Lumen isoliert und deren Sialinsäure-Gehalt durch HPLC-Analyse bestimmt. Eine sich ändernde Sialylierung könnte den Reifeprozess der Spermatozoen bei der Nebenhodenpassage von Caput nach Cauda widerspiegeln. Die größten Unterschiede lagen im Bereich der proximalen und distalen Segmente.

Der gerichtete Transport der noch immotilen Spermatozoen im Nebenhoden wird wesentlich durch Spontankontraktionen vermittelt. Das Kontraktionsmuster des Nebenhodengangs wurde zwischen benachbarten Segmenten verglichen. Es fanden sich Unterschiede in der Kontraktionsfrequenz, was auf eine unterschiedliche Verweildauer der Spermien hindeutet. Auch bei den ACh/NO-Synthase vermittelten Effekten auf die Kontraktilität fanden sich segmentale Unterschiede im Nebenhodengang.

In der Arbeit wurden neue Erkenntnisse über die Struktur der Segmentgrenzen gefunden. Außerdem ergaben sich Hinweise auf funktionelle Unterschiede des Nebenhodenganges in den verschiedenen Segmenten sowie ein segmental differierendes Glykosylierungsmuster der Spermatozoen. Insgesamt sprechen die Befunde für einen wichtigen Einfluss der Nebenhodensegmente auf die Reifung der Spermatozoen.

7 Summary

The Epididymis is divided into caput, corpus and cauda. Furthermore, it can be subdivided into so-called segments, separated by connective tissue septa (CTS). In rats, 19 segments are defined. During transit through the epididymal duct spermatozoa gain fertilizing ability. Thereby the duct itself passes the different segments. In the present study the segmental border and its structural, biochemical and functional significance was characterized by various methods.

The existence of a barrier function of CTS was visualized by injection of tracer solution into the interstitial space. The tracer solution retained in single segments. The spatial expansion of the CTS and its arrangement of collagenous fibers were demonstrated by two- and three-dimensional imaging (immunofluorescence, immunohistochemistry, CLARITY and eosin-auto-fluorescence).

In order to investigate whether the luminal content of the epididymal duct also reflects segmental specificity, spermatozoa were collected from each segment of rat epididymis by LCM and their sialylation status was analyzed by HPLC. Potential differences in the sialylation status from caput to cauda might indicate single steps of sperm maturation. Most important differences of the sialylation status were found in the proximal and distal parts of the epididymis.

The directional flow of spermatozoa towards cauda is essentially mediated by spontaneous contractions. The pattern of duct contraction was compared between neighboring segments. The frequency of spontaneous contractions differs clearly between two segments which point to a different residence time of spermatozoa. ACh/NOS mediated effects on contractility of the duct also showed segmental differences.

In the present study new insights into the structure of the CTS were described. Furthermore, functional differences of the epididymal duct in its single segments as well as a segments-specific glycosylation pattern of sperm were revealed. In summary, results suggest an important role of epididymal segments for sperm maturation.

8 Abkürzungsverzeichnis in alphabetischer Reihenfolge

AC	Adenylatzyklase
ACh	Acetylcholin
AChR	Acetylcholinrezeptoren
AChE	Acetylcholinesterase
A3PO	Acrylamid
ATP	Adenosintriphosphat
Bi-SiaLN	bi-antennary α 2,6 sialylierte N-acetyllactosamin-Einheiten
BuChE	Butyrylcholinesterase
Ca ²⁺	Calcium
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
ChAT	Cholinacetyltransferase
ChT1	high-affinity choline transporter
CT	Computertomographie
DAG	Diaglycerol
DAB	3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
DAPI	4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride
DMB	4,5-Methyl-Dioxybenzidin
3D	Dreidimensional
E. coli	Escherichia coli
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
EGF	epidermal growth factor
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ETC	electrophoretic tissue clearing
FGF₂	fibroblast growth factor 2
G_i	inhibitorische G-Proteine
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
G _q	Phospholipase C gekoppelte G-Proteine

HPAEC-PAD	High performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection
HPLC	high performance liquid chromatography
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IS	Initialsegment
IP₃	Inositoltrisphosphat
KDN	3-Desoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranulosonsäure
LCM	Laser Capture Microdissection
LeX	LewisX
L-NAME	N ω -Nitro-L-Arginin Methylester
mAChR	muskarinergen ACh-Rezeptor
MRT	Magnetresonanztomographie
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
Neu5Gc	N-Glykolylnneuraminsäure
NO	Stickstoffmonoxid
NO-Synthase	Stickstoffmonoxid-Synthase
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
OCTs	organische Kationentransporter
PIP₂	Phosphatidylinositolbisphosphat
PLC	Phospholipase C
REM	Rasterelektronenmikroskop
SBEM	serial-block-face-scanning electron microscopy
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SMA	smooth muscle actin
VAChT	vesikuläre Acetylcholintransporter
VEGFA	vascular endothelial growth factor
VIP	vasoaktive intestinale Peptid

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des Nebenhodens.....	2
Abb. 2: Schematische Darstellung der Segmentierung des Nebenhodens der Ratte.....	5
Abb. 3: Molekulare Darstellung von Neu5Ac und Neu5Gc, modifiziert nach Arne (Lundblad 2015).....	7
Abb. 4: Schematische Darstellung der Position von Sialinsäuren.....	8
Abb. 5: Exemplarische Darstellung der Spermienglykokalix	9
Abb. 6: Muskarinerge ACh-Rezeptor.....	14
Abb. 7: Perfusion einzelner Segmente eines Nebenhodens.....	35
Abb. 8: Nachweis einer Kollagenverdichtung innerhalb der Segmentgrenzen	37
Abb. 9: Sichtbarmachung der Segmentgrenze zwischen Segment 6 und 7 durch Eosinfärbung	39
Abb. 10: Dreidimensionale Darstellung einer Segmentgrenze mit angrenzendem Ductus eines Nebenhodengangs mittels CLARITY	41
Abb. 11: Nebenhodengangschlingen, die die Segmentgrenze nicht passieren, sind jeweils vom Septum abgewendet..	42
Abb. 12: Verlauf größerer Gefäße und Nervenfasern innerhalb einer Segmentgrenze..	44
Abb. 13: Darstellung der Segmente und Segmentgrenzen nach Azanfärbung.....	45
Abb. 14: LCM einzelner Nebenhodengang-Lumina aus allen 19 Segmenten	46
Abb. 15: Definition der Flächen zur Bestimmung des luminalen Inhalts	47
Abb. 16: Markierung eines Nebenhodengangs-Lumens mit einem Schwellenwert und anschließender Flächenbestimmung	47
Abb. 17: Die Neu5Ac-Expression in IS, Caput (ohne IS), Corpus und Cauda des Nebenhodens	48
Abb.18: Der Sialylierungsstatus in den einzelnen Segmenten	49
Abb. 19: Erhöhte Neu5Ac-Expression in Segment 1, sowie Seg. 18 und 19 im Vergleich zu den restlichen Teilen von Caput, Corpus und Cauda des Nebenhodens ...	50
Abb. 20: Exemplarische Darstellung der Spontankontraktionen in zwei benachbarten Segmenten des Nebenhodengangs	52
Abb. 21: Darstellung von Nervenfasern in Nachbarschaft zur Muskelzellschicht des Nebenhodengangs	53
Abb. 22: Effekte von ACh auf die Kontraktionen in Segment 6 nach Inkubation mit dem NO-Synthase-Inhibitor L-NAME.....	55

Abb. 23: Vergleich der ACh-Effekte in Segment 6 mit und ohne L-NAME
Vorbehandlung56

Abb. 24: Effekte von ACh auf die Kontraktionen in Segment 18 nach Inkubation mit dem NO-Synthase-Inhibitor L-NAME.....57

Abb. 25: Vergleich der ACh-Effekte in Segment 18 mit und ohne L-NAME
Vorbehandlung58

Abb. 26: Hypothese zu den unterschiedlichen Effekten von ACh im Nebenhodengang74

10 Literaturverzeichnis

Alabaster VA. (1997) Discovery & development of selective M3 antagonists for clinical use. *Life sciences* 60:1053–1060

André S, Kozár T, Kojima S, Unverzagt C, Gabius HJ. (2009) From structural to functional glycomics. *Biological chemistry* 390:557–565

Angata T, Varki A. (2002) Chemical Diversity in the Sialic Acids and Related α -Keto Acids. *Chemical Reviews* 102:439–470

Ban Y, Sato T, Nakatsuka T, Kemi M, Samura K, Matsumoto H, Cukierski MA, van Zwieten MJ. (2002) Impairment of male fertility induced by muscarinic receptor antagonists in rats. *Reproductive toxicology* 16:757–765

Barstow C, McDivitt JD. (2017) Cardiovascular disease update. *FP essentials* 454:18–23

Bartel J, Feuerstacke C, Galuska CE, Weinhold B, Gerardy-Schahn R, Geyer R, Münster-Kühnel A, Middendorff R, Galuska SP. (2014) Laser microdissection of paraffin embedded tissue as a tool to estimate the sialylation status of selected cell populations. *Analytical chemistry* 86:2326–2331

Baumgarten HG, Falck B, Holstein AF, Owman C, Owman T. (1968) Adrenergic innervation of the human testis, epididymis, ductus deferens and prostate: a fluorescence microscopic and fluorimetric study. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 90:81–95

Baumgarten HG, Holstein AF. (1967) Über die Fluoreszenz der Spermatozoen im Nebenhoden des Kaninchens. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*-78:555–560

Baumgarten HG, Holstein AF, Rosengren E. (1971) Arrangement, ultrastructure, and adrenergic innervation of smooth musculature of the ductuli efferentes, ductus epididymidis and ductus deferens of man. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 120:37–79

- Bearer EL, Friend DS.** (1990) Morphology of mammalian sperm membranes during differentiation, maturation, and capacitation. *Journal of electron microscopy technique* 16:281-297
- Benoff S.** (1997) Carbohydrates and fertilization: an overview. *Molecular human reproduction* 3:599–637
- Bernal A, Torres J, Reyes A, Rosado A.** (1980) Presence and regional distribution of sialyl transferase in the epididymis of the rat. *Biology of reproduction* 23:290–293
- Blix FG, Gottschalk A, Klenk E.** (1957) Proposed nomenclature in the field of neuraminic and sialic acids. *Nature* 179:1088
- Blomqvist SR, Vidarsson H, Söder O, Enerbäck S.** (2006) Epididymal expression of the forkhead transcription factor Foxi1 is required for male fertility. *The EMBO journal* 25:4131–4141
- Bos PD, Zhang XH-F, Nadal C, Shu W, Gomis RR, Nguyen DX, Minn AJ, van de Vijver MJ, Gerald WL, Foekens JA, Massagué J.** (2009) Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature* 459:1005–1009
- Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH.** (1990) Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347:768–770
- Bredt DS, Snyder SH.** (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87:682–685
- Breton S, Ruan YC, Park Y-J, Kim B.** (2016) Regulation of epithelial function, differentiation, and remodeling in the epididymis. *Asian journal of andrology* 18:3–9
- Burnett AL, Ricker DD, Chamness SL, Maguire MP, Crone JK, Bredt DS, Snyder SH, Chang TS.** (1995) Localization of nitric oxide synthase in the reproductive organs of the male rat. *Biology of reproduction* 52:1–7
- Buselmaier W.** (2015) *Biologie für Mediziner*. Berlin: Springer-Verlag 13. Auflage 15-16
- Caglayan HZB, Colpak IA, Kansu T.** (2013) A diagnostic challenge. *Current opinion in ophthalmology* 24:550–557

- Chammas R, McCaffery JM, Klein A, Ito Y, Saucan L, Palade G, Farquhar MG, Varki A.** (1996) Uptake and incorporation of an epitope-tagged sialic acid donor into intact rat liver Golgi compartments. Functional localization of sialyltransferase overlaps with beta-galactosyltransferase but not with sialic acid O-acetyltransferase. *Molecular biology of the cell* 7:1691–1707
- Chandra A, Srinivasan KR, Jamal F, Mehrotra PK, Singh RL, Srivastav A.** (2008) Post-translational modifications in glycosylation status during epididymal passage and significance in fertility of a 33 kDa glycoprotein (MEF3) of rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Reproduction* 135:761–770
- Cheon Y-P, Kim C-H.** (2015) Impact of glycosylation on the unimpaired functions of the sperm. *Clinical and experimental reproductive medicine* 42:77–85
- Chung K, Deisseroth K.** (2013) CLARITY for mapping the nervous system. *Nature methods* 10:508–513
- Chung K, Wallace J, Kim S-Y, Kalyanasundaram S, Andalman AS, Davidson TJ, Mirzabekov JJ, Zalocusky KA, Mattis J, Denisin AK, Pak S, Bernstein H, Ramakrishnan C, Grosenick L, Gradinaru V, Deisseroth K.** (2013) Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature* 497:332–337
- Clulow J, Jones RC, Hansen LA.** (1994) Micropuncture and cannulation studies of fluid composition and transport in the ductuli efferentes testis of the rat: comparisons with the homologous metanephric proximal tubule. *Experimental physiology* 79:915–928
- Cornwall GA.** (2009) New insights into epididymal biology and function. *Human reproduction update* 15:213–227
- Cortés PP, Orihuela PA, Zúñiga LM, Velásquez LA, Croxatto HB.** (2004) Sperm binding to oviductal epithelial cells in the rat: role of sialic acid residues on the epithelial surface and sialic acid-binding sites on the sperm surface. *Biology of reproduction* 71:1262–1269
- Culotta E, Koshland DE.** (1992) NO news is good news. *Science* 258:1862–1865
- Deckmann K, Filipski K, Krasteva-Christ G, Fronius M, Althaus M, Rafiq A, Papadakis T, Renno L, Jurastow I, Wessels L, Wolff M, Schütz B, Weihe E, Chubanov V, Gudermann T, Klein J, Bschleipfer T, Kummer W.** (2014) Bitter triggers acetylcholine release from polymodal urethral chemosensory cells and bladder

reflexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111:8287–8292

DeMott RP, Lefebvre R, Suarez SS. (1995) Carbohydrates mediate the adherence of hamster sperm to oviductal epithelium. *Biology of reproduction* 52:1395–1403

Dobrinski I, Suarez SS, Ball BA. (1996) Intracellular calcium concentration in equine spermatozoa attached to oviductal epithelial cells in vitro. *Biology of reproduction* 54:783–788

Domeniconi RF, Souza ACF, Xu B, Washington AM, Hinton BT. (2016) Is the epididymis a series of organs placed side by side? *Biology of reproduction* 95:10

Dun NJ, Dun SL, Huang RL, Dun EC, Lai CC, Wong PY, Förstermann U. (1996) Distribution of origin of nitric oxide synthase-immunoreactive nerve fibers in the rat epididymis. *Brain research* 738:292–300

El-Badawi A, Schenk EA. (1967) The distribution of cholinergic and adrenergic nerves in the mammalian epididymis: a comparative histochemical study. *The American journal of anatomy* 121:1–14

Epp JR, Niibori Y, Liz Hsiang H-L, Mercaldo V, Deisseroth K, Josselyn SA, Frankland PW. (2015) Optimization of CLARITY for Clearing Whole-Brain and Other Intact Organs. *eNeuro* 2 pii: ENEURO.0022-15.2015

Erickson JD, Weihe E, Schäfer MK, Neale E, Williamson L, Bonner TI, Tao-Cheng JH, Eiden LE. (1996) The VAcHT/ChAT "cholinergic gene locus": new aspects of genetic and vesicular regulation of cholinergic function. *Progress in brain research* 109:69–82

Faillard H. (1989) The early history of sialic acids. *Trends in biochemical sciences* 14:237–241

Fawcett DW, Hoffer AP. (1979) Failure of exogenous androgen to prevent regression of the initial segments of the rat epididymis after efferent duct ligation or orchidectomy. *Biology of reproduction* 20:162–181

Fernandes VS, Hernández M. (2016) The role of nitric oxide and hydrogen sulfide in urinary tract function. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 119 Suppl 3:34–41

- Förstermann U, Pollock JS, Tracey WR, Nakane M.** (1994) Isoforms of nitric-oxide synthase: purification and regulation. *Methods in enzymology* 233:258–264
- Furchgott RF, Cherry PD, Zawadzki JV, Jothianandan D.** (1984) Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *Journal of cardiovascular pharmacology* 6 Suppl 2:336-343
- Furchgott RF, Zawadzki JV.** (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373–376
- Gabius H-J, André S, Jiménez-Barbero J, Romero A, Solís D.** (2011) From lectin structure to functional glycomics. *Trends in biochemical sciences* 36:298–313
- Gahmberg CG, Tolvanen M.** (1996) Why mammalian cell surface proteins are glycoproteins. *Trends in biochemical sciences* 21:308–311
- Gatti JL, Druart X, Syntin P, Guérin Y, Dacheux JL, Dacheux F.** (2000) Biochemical characterization of two ram cauda epididymal maturation-dependent sperm glycoproteins. *Biology of reproduction* 62:950–958
- Guerra G, Lucariello A, Perna A, Botta L, Luca A, Moccia F.** (2018) The role of endothelial Ca²⁺ signaling in neurovascular coupling. *International journal of molecular sciences* 19
- Hib J.** (1976) Effects of autonomic drugs on epididymal contractions. *Fertility and sterility* 27:951–956
- Hib J, Ponzio RO.** (1977) Effect of efferent duct ligation, gonadectomy and testosterone replacement on epididymal contractility in the rat. *Journal of reproduction and fertility* 50:327–329
- Hinton BT, Lan ZJ, Rudolph DB, Labus JC, Lye RJ.** (1998) Testicular regulation of epididymal gene expression. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 53:47–57
- Hinton BT, Galdamez MM, Sutherland A, Bomgardner D, Xu B, Abdel-Fattah R, Yang L.** (2011) How do you get six meters of epididymis inside a human scrotum? *Journal of andrology* 32:558–564
- Hirashima T.** (2014) Pattern formation of an epithelial tubule by mechanical instability during epididymal development. *Cell reports* 9:866–873

- Hirashima T.** (2016) Mathematical study on robust tissue pattern formation in growing epididymal tubule. *Journal of theoretical biology* 407:71–80
- Holstein AF.** (1969) *Morphologische Studien am Nebenhoden des Menschen. Zwanglose Abhandlungen aus dem Gebiet der normalen und pathologischen Anatomie.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag 20:1-91
- Holstein AF.** (2008) Kapitel 8.5 Männliche Geschlechtsorgane. In: Benninghoff A, Drenckhahn D (Hg.): *Anatomie, makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie.* München: Elsevier Urban & Fischer Bd. 1 17. Auflage 799-837
- Jelinsky SA, Turner TT, Bang HJ, Finger JN, Solarz MK, Wilson E, Brown EL, Kopf GS, Johnston DS.** (2007) The rat epididymal transcriptome: comparison of segmental gene expression in the rat and mouse epididymides. *Biology of reproduction* 76:561–570
- Jones RC, Clulow J.** (1987) Regulation of the elemental composition of the epididymal fluids in the tammar, *Macropus eugenii*. *Journal of reproduction and fertility* 81:583–590
- Joseph A, Yao H, Hinton BT.** (2009) Development and morphogenesis of the Wolffian/epididymal duct, more twists and turns. *Developmental biology* 325:6–14
- Jositsch G, Papadakis T, Haberberger RV, Wolff M, Wess J, Kummer W.** (2009) Suitability of muscarinic acetylcholine receptor antibodies for immunohistochemistry evaluated on tissue sections of receptor gene-deficient mice. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 379:389–395
- Kadirvel G, Machado SA, Korneli C, Collins E, Miller P, Bess KN, Aoki K, Tiemeyer M, Bovin N, Miller DJ.** (2012) Porcine sperm bind to specific 6-sialylated biantennary glycans to form the oviduct reservoir. *Biology of reproduction* 87:147
- Kaleczyc J, Majewski M, Calka J, Lakomy M.** (1993) Adrenergic innervation of the epididymis, vas deferens, accessory genital glands and urethra in the boar. *Folia histochemica et cytobiologica* 31:117–123
- Kawano T, Koyama S, Takematsu H, Kozutsumi Y, Kawasaki H, Kawashima S, Kawasaki T, Suzuki A.** (1995) Molecular cloning of cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase. Regulation of species- and tissue-specific expression of N-glycolylneuraminic acid. *The Journal of biological chemistry* 270:16458–16463

- Khosravi F, Michel V, Galuska CE, Bhushan S, Christian P, Schuppe H-C, Pilatz A, Galuska SP, Meinhardt A.** (2016) Desialylation of spermatozoa and epithelial cell glycocalyx is a consequence of bacterial infection of the epididymis. *The Journal of biological chemistry* 291:17717–17726
- Knabe W, Washausen S, Brunnett G, Kuhn H-J.** (2002) Use of "reference series" to realign histological serial sections for three-dimensional reconstructions of the positions of cellular events in the developing brain. *Journal of neuroscience methods* 121:169–180
- Koelle GB.** (1950) The histochemical differentiation of types of cholinesterase and their distributions in the tissues of the cat. *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital* 87:74–77
- Kondoh G, Tojo H, Nakatani Y, Komazawa N, Murata C, Yamagata K, Maeda Y, Kinoshita T, Okabe M, Taguchi R, Takeda J.** (2005) Angiotensin-converting enzyme is a GPI-anchored protein releasing factor crucial for fertilization. *Nature medicine* 11:160–166
- Kuhn M.** (2016) Molecular physiology of membrane guanylyl cyclase receptors. *Physiological reviews* 96:751–804
- Kuntz A, Morris RE.** (1946) Components and distribution of the spermatic nerves and the nerves of the vas deferens. *The Journal of comparative neurology* 85:33–44
- Laitinen L, Talo A.** (1981) Effects of adrenergic and cholinergic drugs on electrical and mechanical activities of the rat cauda epididymidis in vitro. *Journal of reproduction and fertility* 63:205–209
- Lakomy M, Kaleczyc J, Majewski M.** (1997) Noradrenergic and peptidergic innervation of the testis and epididymis in the male pig. *Folia histochemica et cytobiologica* 35:19–27
- Lee HY, Bardini M, Burnstock G.** (2000) P2X receptor immunoreactivity in the male genital organs of the rat. *Cell and tissue research* 300:321–330
- Liu Z, Khalil RA.** (2018) Evolving mechanisms of vascular smooth muscle contraction highlight key targets in vascular disease. *Biochemical pharmacology* 153:91–122
- Lüllmann-Rauch R, Paulsen F.** (2012) Taschenlehrbuch Histologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 4. Auflage 497-498

- Lundblad A.** (2015) Gunnar Blix and his discovery of sialic acids. Fascinating molecules in glycobiology. *Upsala journal of medical sciences* 120:104–112
- Ma F, Wu D, Deng L, Secret P, Zhao J, Varki N, Lindheim S, Gagneux P.** (2012) Sialidases on mammalian sperm mediate deciduous sialylation during capacitation. *The Journal of biological chemistry* 287:38073–38079
- Ma X, Pan Q, Feng Y, Choudhury BP, Ma Q, Gagneux P, Ma F.** (2016) Sialylation Facilitates the Maturation of Mammalian Sperm and Affects Its Survival in Female Uterus. *Biology of reproduction* 94:123
- Mewe M, Bauer CK, Müller D, Middendorff R.** (2006a) Regulation of spontaneous contractile activity in the bovine epididymal duct by cyclic guanosine 5'-monophosphate-dependent pathways. *Endocrinology* 147:2051–2062
- Mewe M, Bauer CK, Schwarz JR, Middendorff R.** (2006b) Mechanisms regulating spontaneous contractions in the bovine epididymal duct. *Biology of reproduction* 75:651–659
- Mietens A, Tasch S, Stammer A, Konrad L, Feuerstacke C, Middendorff R.** (2014) Time-lapse imaging as a tool to investigate contractility of the epididymal duct--effects of cGMP signaling. *PloS ONE* 9:e92603.
- Milgroom A, Ralston E.** (2016) Clearing skeletal muscle with CLARITY for light microscopy imaging. *Cell biology international* 40:478–483
- Mitchell GA.** (1935) The innervation of the kidney, ureter, testicle and epididymis. *Journal of anatomy* 70:10-32.15.
- Moncada S, Rees DD, Schulz R, Palmer RM.** (1991) Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:2166–2170
- Mulryan K, Gitterman DP, Lewis CJ, Vial C, Leckie BJ, Cobb AL, Brown JE, Conley EC, Buell G, Pritchard CA, Evans RJ.** (2000) Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X1 receptors. *Nature* 403:86–89
- Muratori G.** (1956) Preliminary observations on action of adrenalin and acetylcholine on movement of the canal of the epididymis in rat. *Bollettino della Societa italiana di biologia sperimentale* 32:248–249

- Muratori G, Contro S.** (1951) Observations on the movements of the canal of the epididymis. *Bollettino della Societa italiana di biologia sperimentale* 27:538–539
- Münster-Kühnel AK, Hinderlich S.** (2013) Kapitel 3 Sialic Acid Biosynthesis in Vertebrates. In: Tiralongo J, Martinez-Duncker I (Hg.): *Sialobiology: Structure, Biosynthesis and Function. Sialic Acid Glycoconjugates in Health and Disease*. Sharjah: Bentham Science Publishers 76-115
- Naaby-Hansen S, Flickinger CJ, Herr JC.** (1997) Two-dimensional gel electrophoretic analysis of vectorially labeled surface proteins of human spermatozoa. *Biology of reproduction* 56:771–787
- Nguyen HB, Lee SY, Park SH, Lee MY, Chang IH, Myung SC.** (2013) Relaxing effect of acetylcholine on phenylephrine-induced contraction of isolated rabbit prostate strips is mediated by neuronal nitric oxide synthase. *Korean journal of urology* 54:333–338
- Nouhouayi Y, Négulesco I.** (1985) Innervation adrénérique des cellules musculaires lisses de la queue de l'épididyme chez la souris. *Acta anatomica* 121:59–62
- O'Hara L, Welsh M, Saunders PTK, Smith LB.** (2011) Androgen receptor expression in the caput epididymal epithelium is essential for development of the initial segment and epididymal spermatozoa transit. *Endocrinology* 152:718–729
- Okuda T, Haga T, Kanai Y, Endou H, Ishihara T, Katsura I.** (2000) Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. *Nature neuroscience* 3:120–125
- Orgebin-Crist MC.** (1967) Sperm maturation in rabbit epididymis. *Nature* 216:816–818
- Persson MG, Wiklund NP, Gustafsson LE.** (1993) Nitric oxide-more than a vasodilator. *Lakartidningen* 90:1365–1371
- Pholpramool C, Triphrom N.** (1984) Effects of cholinergic and adrenergic drugs on intraluminal pressures and contractility of the rat testis and epididymis in vivo. *Journal of reproduction and fertility* 71:181–188
- Pichat J, Iglesias JE, Yousry T, Ourselin S, Modat M.** (2018) A survey of methods for 3D histology reconstruction. *Medical image analysis* 46:73–105

- Prakash S, Prithviraj E, Suresh S, Lakshmi NV, Ganesh MK, Anuradha M, Ganesh L, Dinesh P.** (2014) Morphological diversity of sperm. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* 12:239–242
- Rassow J.** (2016) *Biochemie (Duale Reihe)*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 4. Auflage 789-794
- Reckmann AN, Tomczyk CUM, Davidoff MS, Michurina TV, Arnhold S, Müller D, Mietens A, Middendorff R.** (2018) Nestin in the epididymis is expressed in vascular wall cells and is regulated during postnatal development and in case of testosterone deficiency. *PLoS ONE* 13:e0194585
- Revah I, Gadella BM, Flesch FM, Colenbrander B, Suárez SS.** (2000) Physiological state of bull sperm affects fucose- and mannose-binding properties. *Biology of reproduction* 62:1010–1015
- Risley PL, Skrepetos CN.** (1964a) Cholinesterase distribution in the rat epididymis and vas deferens after castration and sex hormone treatments. *The Anatomical record* 150:195–207
- Risley PL, Skrepetos CN.** (1964b) Histochemical distribution of cholinesterase in the testis, epididymis and vas deferens of the rat. *The Anatomical record* 148:231–249
- Robaire B, Hinton BT.** (2015) Kapitel 17 The Epididymis. In: Plant TM, Zeleznik AJ (Hg.): *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. Academic Press 4. Auflage 691-771
- Sato T.** (2013) Kapitel 2 Polysialic Acid. In: Tiralongo J, Martinez-Duncker I (Hg.): *Sialobiology: Structure, Biosynthesis and Function. Sialic Acid Glycoconjugates in Health and Disease*. Sharjah: Bentham Science Publishers 33-76
- Sato T, Ban Y, Uchida M, Gondo E, Yamamoto M, Sekiguchi Y, Sakaue A, Kemi M, Nakatsuka T.** (2005) Atropine-induced inhibition of sperm and semen transport impairs fertility in male rats. *The Journal of toxicological sciences* 30:207–212
- Saxena DK, Oh-Oka T, Kadomatsu K, Muramatsu T, Toshimori K.** (2002) Behaviour of a sperm surface transmembrane glycoprotein basigin during epididymal maturation and its role in fertilization in mice. *Reproduction* 123:435–444

- Scheer H, Robaire B.** (1980) Steroid delta 4-5 alpha-reductase and 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat epididymis during development. *Endocrinology* 107:948–953
- Schirmer SU, Eckhardt I, Lau H, Klein J, DeGraaf YC, Lips KS, Pineau C, Gibbins IL, Kummer W, Meinhardt A, Haberberger RV.** (2011) The cholinergic system in rat testis is of non-neuronal origin. *Reproduction* 142:157–166
- Schröter S, Osterhoff C, McArdle W, Ivell R.** (1999) The glycocalyx of the sperm surface. *Human reproduction update* 5:302–313
- Shirai M, Sasaki K, Rikimaru A.** (1973) A histochemical investigation of the distribution of adrenergic and cholinergic nerves in the human male genital organs. *The Tohoku journal of experimental medicine* 111:281–291
- Shum WWC, Da Silva N, McKee M, Smith PJS, Brown D, Breton S.** (2008) Transepithelial projections from basal cells are luminal sensors in pseudostratified epithelia. *Cell* 135:1108–1117
- Shum WWC, Da Silva N, Brown D, Breton S.** (2009) Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. *The Journal of experimental biology* 212:1753–1761
- Shum WWC, Ruan YC, Da Silva N, Breton S.** (2011) Establishment of cell-cell cross talk in the epididymis: control of luminal acidification. *Journal of andrology* 32:576–586
- Silva AM, Queiróz DBC, Castro Neto EF, Naffah-Mazzacoratti MDG, Godinho RO, Porto CS, Gutiérrez-Ospina G, Avellar MCW.** (2002) Segment-specific decrease of both catecholamine concentration and acetylcholinesterase activity are accompanied by nerve refinement in the rat cauda epididymis during sexual maturation. *Journal of andrology* 23:374-383
- Simon P, Bäumner S, Busch O, Röhrich R, Kaese M, Richterich P, Wehrend A, Müller K, Gerardy-Schahn R, Mühlhoff M, Geyer H, Geyer R, Middendorff R, Galuska SP.** (2013) Polysialic acid is present in mammalian semen as a post-translational modification of the neural cell adhesion molecule NCAM and the polysialyltransferase ST8SiaII. *The Journal of biological chemistry* 288:18825–18833
- Singh M, Rajagopalan A, Kim T-S, Hwang D, Chui H, Zhang X-L, Lee A-Y, Zarow C.** (2008) Co-registration of in-vivo human MRI brain images to postmortem Histological

microscopic images. *International journal of imaging systems and technology* 18:325–335

Sipilä P, Pujianto DA, Shariatmadari R, Nikkilä J, Lehtoranta M, Huhtaniemi IT, Poutanen M. (2006) Differential endocrine regulation of genes enriched in initial segment and distal caput of the mouse epididymis as revealed by genome-wide expression profiling. *Biology of reproduction* 75:240–251

Siu ER, Yasuhara F, Maróstica E, Avellar MCW, Porto CS. (2006) Expression and localization of muscarinic acetylcholine receptor subtypes in rat efferent ductules and epididymis. *Cell and tissue research* 323:157–166

Skudlarek MD, Tulsiani DR, Orgebin-Crist MC. (1992) Rat epididymal luminal fluid acid beta-D-galactosidase optimally hydrolyses glycoprotein substrate at neutral pH. *The Biochemical journal* 286 (Pt 3):907–914

Skudlarek MD, Tulsiani DR, Nagdas SK, Orgebin-Crist MC. (1993) Beta-D-galactosidase of rat spermatozoa: subcellular distribution, substrate specificity, and molecular changes during epididymal maturation. *Biology of reproduction* 49:204–213

Sobotta J, Welsch U. (2009) *Lehrbuch Histologie. Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie.* München: Elsevier Urban & Fischer 2. Auflage 406-424

Stammler A, Hau T, Bhushan S, Meinhardt A, Jonigk D, Lippmann T, Pilatz A, Schneider-Hüther I, Middendorff R. (2015) Epididymitis: ascending infection restricted by segmental boundaries. *Human reproduction* 30:1557–1565

Stoltenberg M, Andreasen A, Jensen KB, Juhl S, Danscher G, Ernst E. (1997) PC-assisted three-dimensional description of organs containing tubular structures, applied on the epididymis of the rat. *Computerized medical imaging and graphics : the official journal of the Computerized Medical Imaging Society* 21:323–329

Streicher J, Donat MA, Strauss B, Spörle R, Schughart K, Müller GB. (2000) Computer-based three-dimensional visualization of developmental gene expression. *Nature genetics* 25:147–152

Suarez SS. (2002) Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. *Reproduction in domestic animals* 37:140–143

- Suarez SS, Brockman K, Lefebvre R.** (1997) Distribution of mucus and sperm in bovine oviducts after artificial insemination: the physical environment of the oviductal sperm reservoir. *Biology of reproduction* 56:447–453
- Süss M, Washausen S, Kuhn H-J, Knabe W.** (2002) High resolution scanning and three-dimensional reconstruction of cellular events in large objects during brain development. *Journal of neuroscience methods* 113:147–158
- Suzuki F.** (1982) Microvasculature of the mouse testis and excurrent duct system. *The American journal of anatomy* 163:309–325
- Talo A, Jaakkola UM, Markkula-Viitanen M.** (1979) Spontaneous electrical activity of the rat epididymis in vitro. *Journal of reproduction and fertility* 57:423–429
- Thong A, Müller D, Feuerstacke C, Mietens A, Stammer A, Middendorff R.** (2014) Neutral endopeptidase (CD10) is abundantly expressed in the epididymis and localized to a distinct population of epithelial cells--its relevance for CNP degradation. *Molecular and cellular endocrinology* 382:234–243
- Toshimori K, Araki S, Oura C, Eddy EM.** (1991) Loss of sperm surface sialic acid induces phagocytosis: an assay with a monoclonal antibody T21, which recognizes a 54K sialoglycoprotein. *Archives of andrology* 27:79–86
- Tulsiani DR.** (2003) Glycan modifying enzymes in luminal fluid of rat epididymis: are they involved in altering sperm surface glycoproteins during maturation? *Microscopy research and technique* 61:18–27
- Tulsiani DR.** (2006) Glycan-modifying enzymes in luminal fluid of the mammalian epididymis: an overview of their potential role in sperm maturation. *Molecular and cellular endocrinology* 250:58–65
- Tulsiani DR, Skudlarek MD, Holland MK, Orgebin-Crist MC.** (1993) Glycosylation of rat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Biology of reproduction* 48:417–428
- Tulsiani DR, Nagdas SK, Skudlarek MD, Orgebin-Crist MC.** (1995) Rat sperm plasma membrane mannosidase: localization and evidence for proteolytic processing during epididymal maturation. *Developmental biology* 167:584–595

- Turner TT, Bomgardner D, Jacobs JP, Nguyen QAT.** (2003) Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. *Reproduction* 125:871–878
- Turner TT, Johnston DS, Finger JN, Jelinsky SA.** (2007a) Differential gene expression among the proximal segments of the rat epididymis is lost after efferent duct ligation. *Biology of reproduction* 77:165–171
- Turner TT, Johnston DS, Jelinsky SA, Tomsig JL, Finger JN.** (2007b) Segment boundaries of the adult rat epididymis limit interstitial signaling by potential paracrine factors and segments lose differential gene expression after efferent duct ligation. *Asian journal of andrology* 9:565–573
- Varki A.** (1992) Selectins and other mammalian sialic acid-binding lectins. *Current opinion in cell biology* 4:257–266
- Varki A, Schauer R.** (2009) Kapitel 14 Sialic Acids. In: Varki A (Hg.): *Essentials of glycobiology*. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2. Auflage
- Waldman SA, Murad F.** (1987) Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacological reviews* 39:163–196
- Wang R, Guo LY, Suo MY, Sun Y, Wu JY, Zhang XY, Liu CY.** (2016) Role of the nitrenergic pathway in motor effects of oxytocin in rat proximal colon. *Neurogastroenterology and motility: The official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 28:1815–1823
- Wernitznig S, Sele M, Urschler M, Zankel A, Pölt P, Rind FC, Leitinger G.** (2016) Optimizing the 3D-reconstruction technique for serial block-face scanning electron microscopy. *Journal of neuroscience methods* 264:16–24
- Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racké K.** (1998) Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems. *Pharmacology & therapeutics* 77:59–79
- Wessler I, Roth E, Deutsch C, Brockerhoff P, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Kilbinger H.** (2001) Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters. *British journal of pharmacology* 134:951–956

Xu B, Washington AM, Hinton BT. (2016) Initial Segment Differentiation Begins During a Critical Window and Is Dependent upon Lumicrine Factors and SRC Proto-Oncogene (SRC) in the Mouse. *Biology of reproduction* 95:15

Xu B, Yang L, Lye RJ, Hinton BT. (2010) p-MAPK1/3 and DUSP6 regulate epididymal cell proliferation and survival in a region-specific manner in mice. *Biology of reproduction* 83:807–817

Yang B, Treweek JB, Kulkarni RP, Deverman BE, Chen C-K, Lubeck E, Shah S, Cai L, Gradinaru V. (2014) Single-cell phenotyping within transparent intact tissue through whole-body clearing. *Cell* 158:945–958

Yoon D, You D. (2016) Continuum modeling of deformation and aggregation of red blood cells. *Journal of biomechanics* 49:2267–2279

Zhang YL, Zhang JS, Zhou YC, Zhao Y, Ni MJ. (2011) Identification of microRNAs and application of RNA interference for gene targeting in vivo in the rat epididymis. *Journal of andrology* 32:587–591

11 Erklärung zur Dissertation

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

Wiesbaden, 13.06.2019

Ort, Datum



Unterschrift

12 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Professor Ralf Middendorff für eine sehr gute und lehrreiche Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken. Auch unsere Zusammenarbeit in Hinblick auf andere gemeinsame Projekte hat mir viel Spaß gemacht. Trotz Wechsels des Wohnortes nahm er sich stets die Zeit für mich, was ich sehr an ihm schätze.

Außerdem ist besonders meinem Kollegen Thorben Hau aus unserer Arbeitsgruppe zu danken, der mich in dieses Thema eingearbeitet und in den theoretischen Hintergrund eingeführt hat. Er war auch ganz wesentlich verantwortlich bei der Entwicklung der Spermienanalyse aus Paraffinschnitten mittels LCM unter Nutzung diverser ImageJ-tools.

Unserer medizinisch-technischen Assistentin Sabine Tasch danke ich vielmals für die Hilfestellung bei der CLARITY und des Time-Lapse Imagings. Sie stand als Ansprechpartnerin bei jeglichen Versuchen zur Verfügung.

Außerdem danke ich Daniela Bayer für die Mitwirkung bei der Auswertung meiner Daten sowie für die Hilfe bei den Perfusionsversuchen. Auch möchte ich mich bei allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe (Signaltransduktion) für die vielen Diskussionen bedanken.

Einen großen Dank möchte ich auch Christina und Sebastian Galuska aussprechen für die tolle Zusammenarbeit bezüglich der HPLC-Analyse sowie der guten Betreuung im Leibniz-Institut für Nutztierbiologie in Dummerstorf während der Ausführung der HPLC-Analyse.

Zum Schluss möchte ich mich noch bei meiner Familie und meinem Freund für die mentale Unterstützung bedanken. Sie waren immer für mich da.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**