



**DIE ROLLE DER HISTONACETYLIERUNG FÜR DEN
HISTON-PROTAMIN-AUSTAUSCH WÄHREND
DER SPERMIOGENESE VON MENSCH UND MAUS**

VIOLETTA SONNACK

INAUGURAL-DISSERTATION

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

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2007

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

1st Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

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

www.doktorverlag.de

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

Betreuer: Prof. Dr. Klaus Steger

Die Rolle der Histonacetylierung für den Histon- Protamin-Austausch während der Spermiogenese von Mensch und Maus

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Violetta Sonnack

Tierärztin aus Torun, Polen

Giessen 2007

Gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft

(STE 892/3-1,2)

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

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. K. Steger

Prof. Dr.G. Schuler

Tag der Disputation: 26 April 2007

Meiner Familie

Mojej rodzinie dedykuje

Inhaltverzeichnis

1. EINLEITUNG UND ZIELE.....	1
2. LITERATURÜBERSICHT	3
2.1. Bau des Hodens und Ablauf der Spermatogenese.....	3
2.1.1. Das Keimepithel	3
2.1.1.1. Sertoli-Zellen.....	3
2.1.1.2. Keimzellen.....	5
2.1.2. Leydig-Zellen	6
2.1.3. Stadien der Spermatogenese.....	7
2.1.3.1. Mensch	8
2.1.3.2. Maus	10
2.1.4. Hormonelle Regulation der Spermatogenese	13
2.2. Histon-Protamin-Austausch während der Spermio-genese.....	15
2.2.1. Histone.....	16
2.2.2. Protamine.....	19
2.3. Regulation des Histon-Protamin-Austausches.....	20
2.3.1. Regulation der Protaminexpression.....	20
2.3.2. Histon-Code.....	21
2.4. Störungen der Spermatogenese.....	26
3. MATERIAL UND METHODEN.....	29
3.1. Material/Gewebe.....	29
3.1.1. Humane Hodenbiopsien	29
3.1.2. Versuchstiere	30
3.2. Methoden.....	31
3.2.1. Tierversuch	31
3.2.1.1. Tierhaltung	31
3.2.1.2. Tierbehandlung.....	32
3.2.2. Paraffinmaterial	36
3.2.3. Immunhistochemie	39
3.2.4. In situ Hybridisierung.....	42
3.2.4.1. Herstellung der Sonden	43
3.2.4.2. In situ Hybridisierungs-Protokoll	53
3.2.5. TUNEL	58
3.2.6. Lichtmikroskopie und Auswertung	61
3.2.6.1. Humanes Gewebe	61
3.2.6.2. Murines Gewebe.....	61
3.2.7. Western Blot.....	63
3.2.7.1. Extraktion von Histonen aus Gefriermaterial.....	63
3.2.7.2. Western Blot Protokoll	64
3.2.8. Statistische Auswertung	69

4. ERGEBNISSE	71
4.1. Humanes Gewebe	71
4.1.1. Western Blot Analyse.....	71
4.1.2. Immunhistochemie	72
4.1.2.1. Normale Spermatogenese.....	72
4.1.2.2. Gestörte Spermatogenese	75
4.1.3. Ergebnisse der statistischen Analyse bezüglich des Gruppenvergleichs.....	78
4.2. Murines Gewebe	79
4.2.1. Histologie	81
4.2.1.1. Gruppe 1 (Kontrolle)	81
4.2.1.2. Gruppe 2 (0.8 mg TSA/kg).....	82
4.2.1.3. Gruppe 3 (1.6 mg TSA/kg).....	83
4.2.1.4. Gruppe 4 (2.4 mg TSA/kg).....	84
4.2.1.5. Gruppe 5 (3.2 mg TSA/kg).....	85
4.2.2. In situ Hybridisierung.....	87
4.2.3. Immunhistochemie	88
4.2.3.1. Immunhistochemie gegen hyperacetyliertes Histon H4.....	88
4.2.3.2. PCNA-Immunhistochemie	90
4.2.4. Analyse der Apoptose.....	91
4.2.5. Ergebnisse des Fertilisierungsversuchs	93
4.2.6. Statistische Analyse.....	94
5. DISKUSSION	96
6. ZUSAMMENFASSUNG	106
7. SUMMARY	108
8. LITERATURVERZEICHNIS	110
9. ANHANG	128
Chemikalien, Reagenzien, Antikörper, Behandlungsmaterial, Verbrauchsmaterialien und Geräte	128
10. DANKSAGUNG	132

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Originalarbeiten

Sonnack V, Failing K, Bergmann M, Steger K. Expression of hyperacetylated histone H4 during normal and impaired human spermatogenesis. *Andrologia* 2002; 34: 384-390

Fenic I*, Sonnack V*, Failing K, Bergmann M, Steger K. In-vivo effects of histone-deacetylase inhibitor trichostatin-A on murine spermatogenesis. *J Androl* 2004; 25: 811-818

* Diese Autoren trugen zu gleichen Teilen zu der Publikation bei.

Publizierte Abstracts

Sonnack V, Failing K, Bergmann M, Steger K. Distribution pattern of acetylated histone H4 in normal and impaired human spermatogenesis. *Andrologia* 2002; 34: 285

Steger K, Fenic I, Sonnack V, Bergmann M. Histone hyperacetylation and its role for histone-to-protamine exchange and male fertility. 21. Arbeitstagung der Deutschen Anatomischen Gesellschaft, Würzburg, Oktober 2004

Poster

Sonnack V, Failing K, Bergmann M, Steger K. Distribution pattern of acetylated histone H4 in normal and impaired human spermatogenesis. 14. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Andrologie, Jena, September 2002

Sonnack V, Failing K, Bergmann M, Steger K. In vivo effects of histone-deacetylase inhibitor trichostatin-A on murine spermatogenesis. *Chromatin* 2004, Luxembourg, Januar 2004

Sonnack V, Failing K, Bergmann M, Steger K. In vivo effects of histone-deacetylase inhibitor trichostatin-A on murine spermatogenesis. 37. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung und 29. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung, München, Februar 2004

1. Einleitung und Ziele

Die Spermatogenese läuft im Keimepithel der Tubuli seminiferi an der Oberfläche der somatischen Sertoli-Zellen ab. Es handelt sich um einen streng koordinierten und kontrollierten Proliferations- und Differenzierungsprozess, dessen Ziel die Produktion einer Vielzahl von befruchtungsfähigen Spermien ist. Bereits kleinste Störungen der Regulationsmechanismen können zu Spermatogenesedefekten und männlicher Infertilität führen.

Während die hormonellen Kontrollmechanismen der Keimzelleifung aufgrund intensiver Forschungsanstrengungen während der letzten Jahrzehnte inzwischen nahezu geklärt sind, ist unser Wissen über die genetischen und epigenetischen Regulationsmechanismen der Spermatogenese noch im Anfangsstadium. Eine Erweiterung dieses Wissens ist jedoch aufgrund der Zunahme der assistierten Reproduktion als Behandlungsmethode für Kinderwunschaare dringend erforderlich.

Es ist bereits bekannt, dass der Histon-Protamin-Austausch in haploiden Spermatiden eine zentrale Rolle für die männliche Fertilität spielt. Dies ist umso bedeutender, als bei der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) alle natürlichen Auslesemeechanismen umgangen werden und die Integrität des Kernchromatins als wichtiger Prognosefaktor für den Erfolg einer ICSI-Behandlung gelten kann. Während der Differenzierung unreifer Spermatiden in reife Spermien unterliegt das Kernchromatin großen Veränderungen (STEGGER, 2001a). Zunächst wird ein Teil der DNA-bindenden Histone durch Hodenspezifische Subtypen ersetzt. Zusätzlich erscheinen Transitionsproteine. Schließlich werden Histone und Transitionsproteine durch Protamine ersetzt. Protamin-DNA-Interaktionen führen über eine Zunahme der Chromatinkondensation schließlich zu einem Stopp der Genexpression in elongierenden Spermatiden.

Damit die Protamine mit der DNA interagieren können, müssen zunächst die Histone entfernt werden. Dies geschieht über den Mechanismus der Histonacetylierung. Acetylierung von Core-Histonen führt durch Ladungsverschiebung zu einer Lockerung der Histon-DNA-Interaktionen (DAVIE, 1998). In Maus und Ratte wurde gezeigt, dass in elongierenden Spermatiden, in denen der Histon-Protamin-Austausch erfolgt, hyperacetylierte Histone vorliegen (MEISTRICH et al., 1992; HAZZOURI et al., 2000). Die Acetylierung erfolgt über Histon-Acetyltransferasen (HATs), die Deacetylierung über Histon-Deacetylasen (HDACs). HDAC Inhibitoren wie z.B. Trichostatin A führen durch

Änderung des Acetylierungsstatus der Zelle zu Änderungen der Chromatinkondensation und können somit auch Auswirkungen auf die männliche Fertilität haben. So wurde berichtet, dass Mäuse mit vorzeitiger Expression von Protamin steril sind und histologisch einen Arrest der Spermatogenese auf der Stufe von runden Spermatiden zeigen (LEE et al., 1995). In vitro Behandlung von Keimzellen mit Trichostatin A resultiert in einer Zunahme der Acetylierung in runden Spermatiden (HAZZOURI et al., 2000). Daraus kann man schließen, dass die Regulation der Aktivität der Histondeacetylase für die Kontrolle der Hyperacetylierung und wahrscheinlich auch für den Histon-Protamin-Austausch in den Keimzellen eine entscheidende Rolle spielt. Bislang liegen keine in vivo Untersuchungen über den Einfluss von Trichostatin A auf die Spermatogenese vor.

Im Rahmen dieser Studie soll daher an Maus und Mensch die Rolle der Histon-Acetylierung für den Histon-Protamin-Austausch untersucht werden. Diese Untersuchungen sollen klären:

- wie der Acetylierungszustand der verschiedenen Keimzellpopulationen während der normalen Spermatogenese des Menschen ist,
- ob bei infertilen Männern Änderungen dieses Acetylierungszustandes in den Keimzellen nachgewiesen werden können,
- wie der Acetylierungszustand in den verschiedenen Keimzellpopulationen während der normalen Spermatogenese der Maus ist,
- ob und, wenn ja, wie sich dieser Acetylierungszustand in den Keimzellen nach Trichostatin A Behandlung in vivo ändert,
- welche Effekte diese Änderung auf die Entwicklung der Keimzellen und die Fertilität dieser Tiere hat,
- ob die Wirkung von Trichostatin A reversibel ist.

2. Literaturübersicht

2.1. Bau des Hodens und Ablauf der Spermatogenese

Die Spermatogenese ist ein Prozess, in dessen Verlauf aus diploiden männlichen Stammzellen (Spermatogonien) haploide Spermien entstehen. Es handelt sich um einen kontinuierlichen Prozess, der in den Samenkanälchen der Hoden abläuft.

Die Hoden befinden sich im Skrotum. Jeder Hoden ist von außen von einer Bindegewebskapsel (Tunica albuginea) und einem Mesothel (Epidiorchium) umgeben. Nach innen wird er durch radiär verlaufende Septen (Septula testis) in 250-370 Hodenläppchen (Lobuli testis) unterteilt. Innerhalb der Lobuli liegen die Samenkanälchen (Tubuli seminiferi contorti), in welchen sich das Keimepithel befindet, und das interstitielle Kompartiment (Interstitium). Die Samenkanälchen münden in das Rete testis, von dem aus die Ductuli efferentes in den Nebenhodenkopf (Caput epididymis) ziehen (HEES und SINOWATZ, 2000).

2.1.1. Das Keimepithel

Die Samenkanälchen werden außen von einer myofibrösen Schicht (Lamina propria) abgeschlossen. Das Keimepithel besteht aus verschiedenen Generationen von Keimzellen und somatischen Sertoli-Zellen (Abb.1).

2.1.1.1. Sertoli-Zellen

Die somatischen Sertoli-Zellen fußen auf der Basalmembran und durchziehen das Keimepithel bis zum Lumen. Benachbarte Sertoli Zellen sind in ihrem basalen Drittel über tight junctions (Zonulae occludens) verbunden und bilden die Blut-Hoden-Schranke, eine effektive Diffusionsbarriere zwischen dem basalen Kompartiment (Spermatogonien und präleptotäne Spermatozyten I) und dem adluminalen Kompartiment (alle nachfolgenden Keimzellstadien). Durch diese Barriere wird der Stofftransport im interzellulären Raum zum adluminalen Kompartiment stark eingeschränkt. Meiotische Keimzellen ab dem zygotänen/pachytänen Stadium (primäre Spermatozyten) werden nicht mehr direkt mit Nährstoffen aus der Blutbahn versorgt. Diese Funktion übernehmen Sertoli-Zellen. Sie

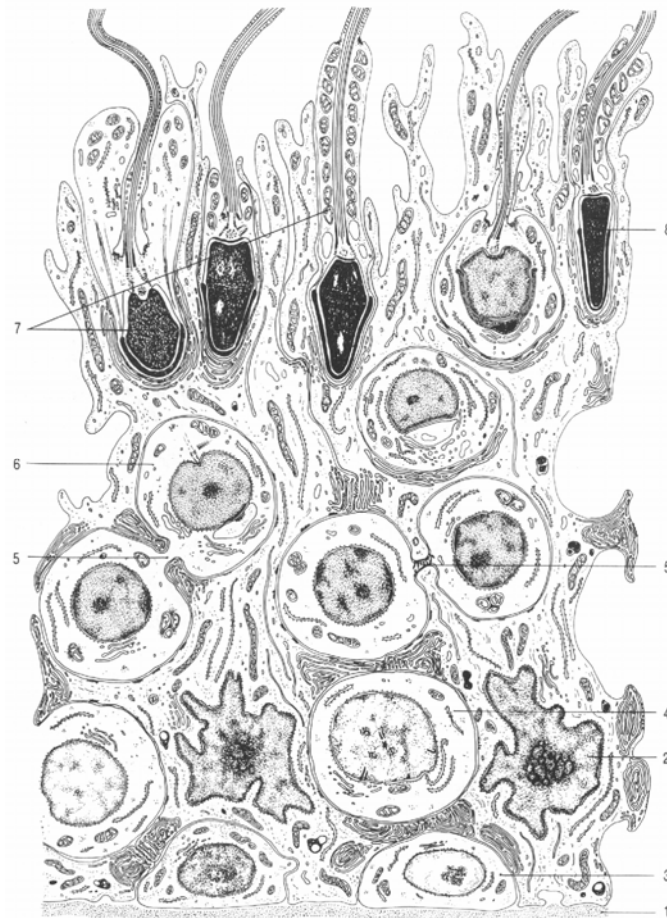


Abbildung 1: Schematische Darstellung des menschlichen Keimepithels (HEES und SINOWATZ, 2000). 1: Basalmembran, 2: Zellkern einer Sertoli-Zelle, 3: Spermatogonien, 4: Spermatozyte I. Ordnung, 5: Interzellularbrücke, 6: runde Spermatoide, 7-8: verschiedene Differenzierungsstufen auf dem Weg von der elongierten Spermatoide zum Spermatozoon.

übertragen auch hormonelle Stimuli, die für die Entwicklung der Keimzellen notwendig sind. Sertoli-Zellen besitzen FSH-(Follikel-stimulierendes Hormon) Rezeptoren und nukleäre Testosteron-Rezeptoren. Von den Sertoli-Zellen wird das Protein Inhibin sezerniert, welches die Freisetzung von FSH aus dem Hypophysenvorderlappen reguliert. Es ist bekannt, dass Sertoli-Zellen neben verschiedenen anorganischen Ionen auch Inositol, Glutamat, Laktat sowie ABP (Androgen-bindendes Protein) synthetisieren. Sertoli-Zellen besitzen die Fähigkeit zur Phagozytose aufgrund derer sie im Verlauf der Spermiogenese Zytoplasmarestkörper der Spermatoiden und abgestorbene Zellen aufnehmen (HEES und SINOWATZ, 2000).

2.1.1.2. Keimzellen

Die Spermatogenese beginnt mit den Stammspermatogonien ($46xy$, $2n$, $2c$ DNA) welche peripher auf der Basalmembran der Samenkanälchen liegen. Sie zeigen unter normalen Umständen nur eine geringe Proliferationsaktivität und werden beim Mensch als Ad (dark=dunkel)-Spermatogonien bezeichnet. Ein Teil der Stammspermatogonien differenziert sich durch mehrere mitotische Zellteilungen in Spermatogonien des Typs Ap (pale = hell), intermediäre Spermatogonien und Spermatogonien des Typs B. Bei der Ratte werden folgende Typen von Spermatogonien unterschieden: Stammspermatogonien (A_{is} = isolated), proliferative Spermatogonien (A_{pr} = paired und A_{al} = aligned) und differenzierende Spermatogonien [A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , I_n = Intermediate (Intermediäre Spermatogonien) und B-Spermatogonien] (HUCKINS, 1971). Die Spermatogonien vom Typ B lösen sich von der Basallamina und treten in die Meiose ein. In der Prophase der Meiose findet die Verdopplung des DNA Gehalts statt. Aus den Spermatogonien des Typs B ($46xy$, $2n$ $2c$ DNA) entstehen tetraploide primäre Spermatozyten (Spermatozyten I. Ordnung; $46xy$, $2n$ $4c$ DNA). In den nächsten Stadien Leptotän, Zygotän und Pachytän findet die Chromosomenpaarung und die Rekombination statt. Nach der ersten Reifeteilung entstehen aus einer primären Spermatozyte zwei haploide Tochterzellensekundäre Spermatozyten ($23x$ oder y , $1n$ $2c$ DNA) (Spermatozyten II. Ordnung), die die zweite Reifeteilung durchlaufen. Dabei wird der DNA Gehalt auf $1c$ reduziert. Das Produkt sind je zwei Tochterzellen-Spermatiden ($23x$, $1n$ $1c$ DNA oder $23y$, $1n$ $1c$ DNA) (Abb. 2). Während des gesamten Entwicklungsprozesses sind alle Keimzellen, die aus einer gemeinsamen Stammspermatogonie hervorgehen, durch Zytoplasmabrücken miteinander verbunden, die die Synchronisation der Spermatogenese garantieren.

In der letzten Phase der Spermatogenese (Spermiogenese) kommt es zur Bildung von Spermien. In diesem Prozess kommt es zu einer Zunahme der Chromatinkondensation, d.h. zu einer Verkleinerung des Kernvolumens. Vom Golgi-Apparat wird das Akrosom gebildet. Innerhalb des Akrosoms befinden sich hydrolytische Enzyme, die bei der Penetration der Zona pellucida der Eizelle benötigt werden. Gleichzeitig mit der Ausbildung des Akrosoms beginnt die Differenzierung des Flagellums. Der Zytoplasmarest wird abgeschnürt. Die Spermatozoen werden in das Lumen des Samenkanälchens entlassen und über das Rete testis und die Ductuli efferentes in den Nebenhoden zur weiteren Reifung transportiert.

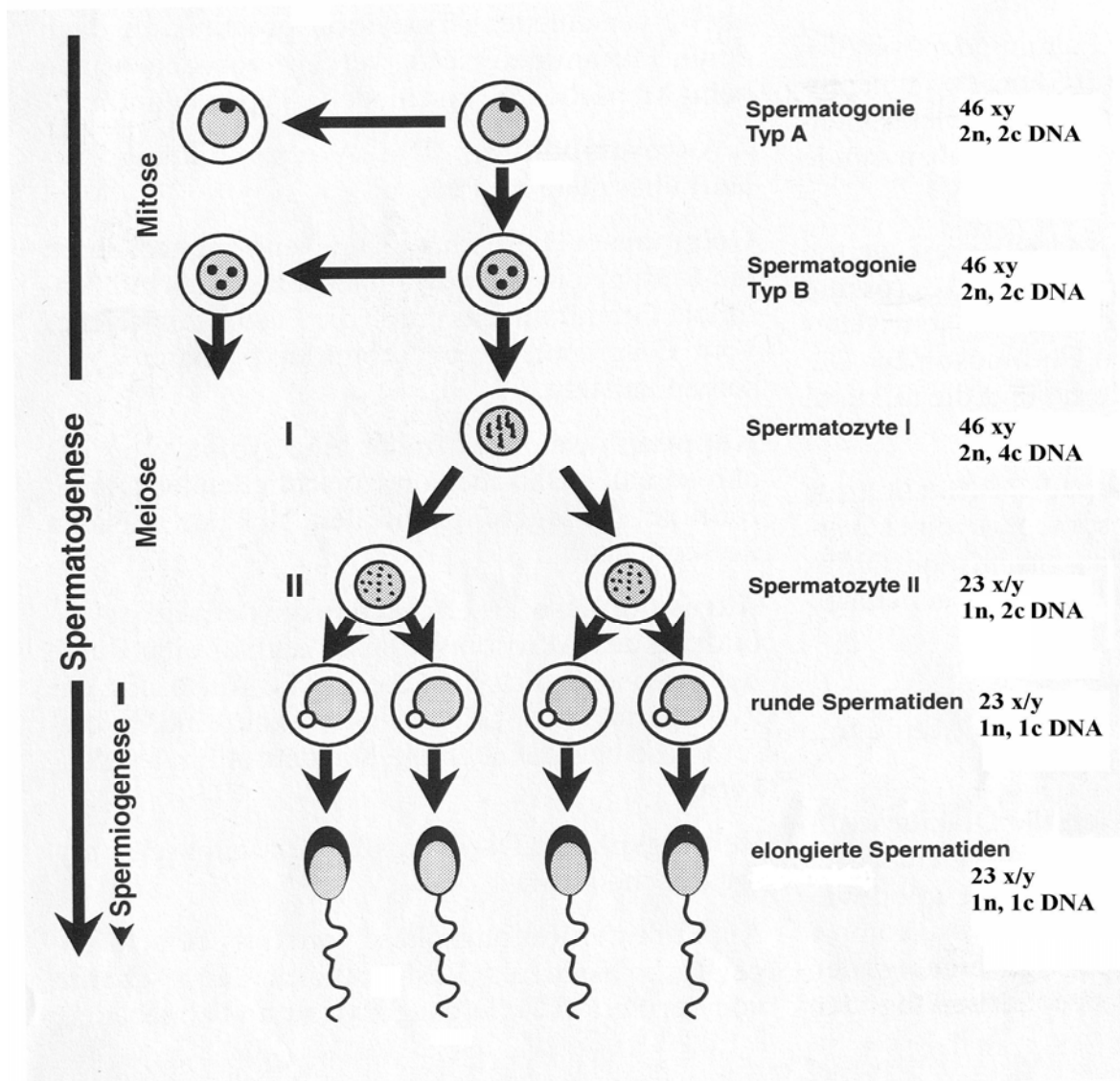


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Spermatogenese (BERGMANN, 2006). Spermatogonien teilen sich mehrfach mitotisch. Am Ende ihrer Differenzierungsphase teilen sich die B-Spermatogonien und treten als diploide primäre Spermatozyten in die Meiose I ein. Nach der ersten Reifeteilung werden die primären Spermatozyten zu sekundären Spermatozyten und durchlaufen die II. meiotische Teilung. Am Ende der Meiose liegen haploide runde Spermatisiden vor, die über Zytoplasmabrücken miteinander verbunden sind. Die Spermatisiden durchlaufen weitere Differenzierungsschritte (Spermio-genese) und werden als Spermatozoen in das Tubuluslumen entlassen (Spermiation).

2.1.2. Leydig-Zellen

Im interstitiellen Kompartiment befinden sich neben Bindegewebezellen, Nerven, Blut- und Lymphgefäßen mit Makrophagen, hauptsächlich Leydig-Zellen. Diese sezernieren Testosteron. Gebunden an ABP gelangt das Testosteron über die Sertoli-Zelle in das Tubuluslumen und beeinflusst so direkt die Sertoli-Zellen. Das Testosteron ist für die

Initiierung und Aufrechthaltung der Spermatogenese verantwortlich (NIESCHLAG und BEHRE, 2000).

2.1.3. Stadien der Spermatogenese

Charakteristische Keimzelloassoziationen, die in einem histologischen Schnitt immer zusammen auftreten, werden Stadien genannt (RUSSELL et al., 1990). Sie werden mit römischen Ziffern bezeichnet. Die Zahl der Stadien sowie deren Häufigkeit ist Tierart-spezifisch. Man unterscheidet beim Mensch 6 und bei der Maus 12 Stadien (OAKBERG, 1956; CLERMONT, 1963). Diese Einteilung beruht auf der unterschiedlichen Kernmorphologie der Spermatozoen und der unterschiedlichen Anfärbbarkeit der Kerne von Spermatozoen mit der Periodic Acid-Schiff (PAS)-Methode. Die Differenzierung runder Spermatozoen wird nochmals in Entwicklungsstufen unterteilt und mit arabischen Ziffern beschrieben (Stufen der Spermiogenese).

Alle Entwicklungsschritte der Keimzellen, von den Spermatozyten zu den reifen Spermatozoen, bezeichnet man als Zyklus des Keimepithels.

Tabelle 1: Stadien der Spermatogenese und ihre Dauer bei Maus, Ratte und Mensch (nach ADLER, 1996).

Spezies	Zahl der Stadien	Differenzierende Spermatozyten (in Tagen)	Spermatozyten (meiotische Teilungsphasen) (in Tagen)	Spermatozoen (postmeiotische Reifungsphase) (in Tagen)	Gesamte Spermato-genese (in Tagen)	Verweildauer der Spermien im Nebenhoden (in Tagen)
Maus	12	6	14	9	35	4-6
Ratte	14	10,5	19	12	50	7
Mensch	6	16	25	16	64	8-17

2.1.3.1. Mensch

CLERMONT (1963) beschrieb die Keimzelloassoziationen, die er in Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Schnitten beim Mensch beobachtete. Diese Kriterien dienen zur Stadieneinteilung der Spermatogenese (Abb. 3):

Stadium I: Hier sind zwei Generationen von Spermatiden sichtbar. Die erste Generation, hier „junge“ Spermatiden genannt, besteht aus Spermatiden, in denen der sphärisch geformte Nukleus durch das akrosomale Bläschen eingedrückt ist. Die „älteren“ Spermatiden (zweite Generation) sind in Bündeln angeordnet. Pachytäne Spermatozyten treten in die Meiose ein, peripher an der Tubulusmembran befinden sich Spermatogonien Typ A (Ap, Ad) und Typ B.

Stadium II: Die jüngere Generation von Spermatiden mit sphärischen Kernen bildet eine reguläre und kompakte Schicht. Kurz vor der Spermiation legen die elongierten Spermatiden ihre Zytoplasmareste ab, die in HE Schnitten als stark gefärbte Flecke sichtbar sind. Die Spermatozyten befinden sich im pachytänen Stadium der Meiose. Entlang der Basalmembran sind alle drei Typen von Spermatogonien (Ap, Ad, B) sichtbar.

Stadium III: Dieses Stadium enthält nur eine Spermatidengeneration, deren Chromatin dunkler und homogener ist als bei den Spermatiden in Stadium II. Hier kann man zwei Generationen von Spermatozyten beobachten: pachytänes Stadium der meiotischen Prophase und preleptotäne Spermatozyten. Die letzteren Zellen sind von der Basalmembran abgelöst. Ihre Kerne sind eiförmig oder sphärisch geformt und enthalten Chromatin, das in chromophilen Klumpen ausgebildet ist. An der Basalmembran sind die Spermatogonien Typ A (Ap, Ad) sichtbar.

Stadium IV: In diesem Stadium treten die Spermatiden in die Elongationsphase ein. Ihre Zellkerne nehmen Kontakt mit der Zellmembran auf, wobei sich die „ältere“ Spermatozytengeneration immer noch im Pachytänstadium der Meiose befindet, während die „jüngere“ Generation in die Prophase der Meiose eintritt. Das Chromatin der leptotänen Spermatozyten ist granulös und faserartig. Beide Typen (A und B) von Spermatogonien sind zahlreich an der Basalmembran vorhanden.

Stadium V: Diese Keimzelloassoziation zeigt eine Generation elongierender Spermatiden, die mit spitzgeformtem und stark gefärbtem Nukleus in Richtung Basalmembran gedreht sind. Die Spermatozyten befinden sich in der späten Pachytänphase der meiotischen Prophase. Die Zellkerne sind sehr groß und enthalten dicke Chromosomen. Die zygotänen Spermatozyten sind durch lange chromosomale Fäden charakterisiert. Es sind die selben Spermatogonien-Typen wie im vorherigen Stadium entlang der Basalmembran zu sehen.

Stadium VI: Dieses Stadium zeigt primäre und sekundäre Spermatozyten während der ersten und zweiten Reifeteilung sowie sekundäre Spermatozyten, die sich in der Interphase befinden. Die langen und dicken Chromosomen der primären Spermatozyten lassen sich von sekundären Spermatozyten unterscheiden. Das Interphase-Chromatin der sekundären Spermatozyten ist homogen und enthält große globuläre Chromatinmassen. Die elongierenden Spermatiden stecken tief zwischen sich teilenden Spermatozyten. Die „jüngere“ Spermatozytengeneration erscheint im Zygotän oder bereits im frühen Pachytän der Prophase. An der Basalmembran sind Typ A Spermatogonien vorhanden.

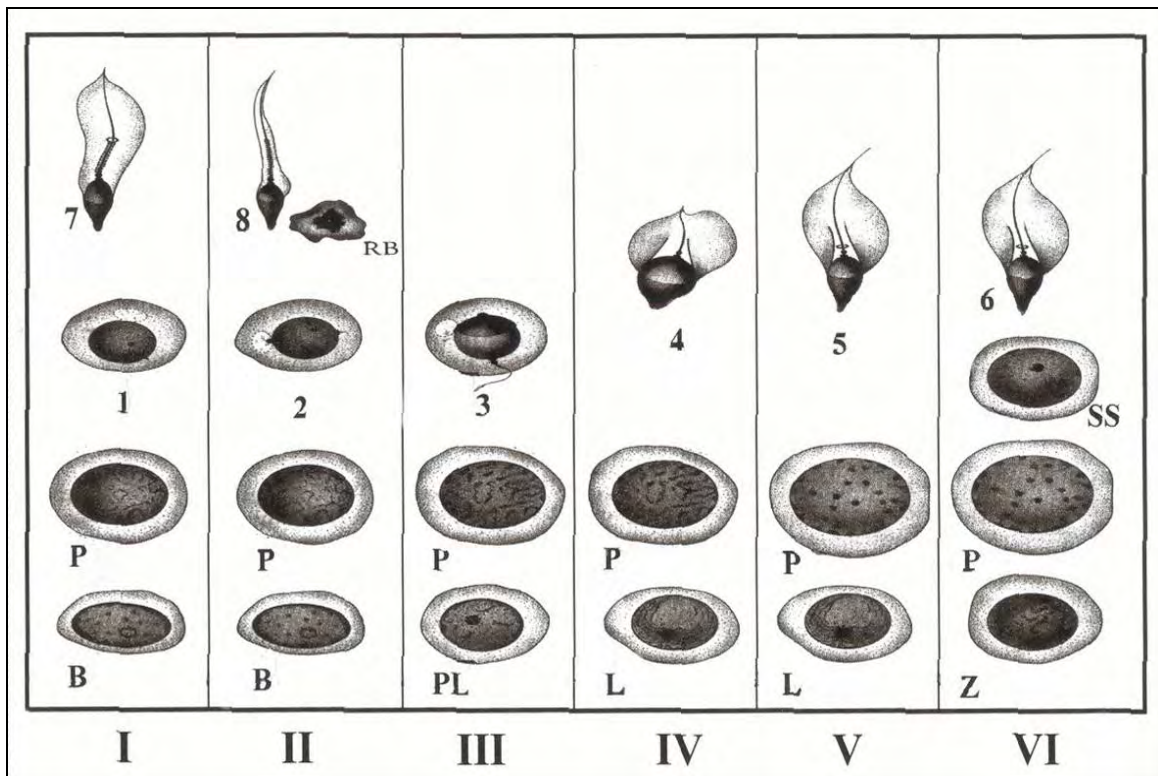


Abbildung 3: Stadien der Spermatogenese beim Mensch (nach CLERMONT, 1963). B: Spermatogonien Typ B, PL: präleptotäne Spermatozyten, L: leptotäne Spermatozyten, Z: zygotäne Spermatozyten, P: pachytäne Spermatozyten, SS: Sekundäre Spermatozyten. 1-8 Stufen der Spermiogenese, RB: Residual Body.

2.1.3.2. Maus

Bei der Maus beträgt die Dauer der Spermatogenese ca. 35 Tage. Es existieren 12 Stadien der Spermatogenese. Morphologisch lassen sich die Spermatozyten in 16 Stufen der Spermiogenese einteilen (Abb. 4).

Einteilung der Stadien im Keimepithel der Maus nach RUSSELL et al. (1990):

Stadium I: Dieses Stadium zeigt zwei Spermatozytenpopulationen. Aufgrund der Chromatinkondensation und der damit veränderten Form des Zellkerns ist in den Stufe 13 Spermatozyten im Vergleich zu den Stufe 12 Spermatozyten die Länge des Kopfes um ca. 30% reduziert. Lichtmikroskopisch ist in den Stufe 1 Spermatozyten noch kein Akrosom sichtbar. Diese Zellen besitzen einen gut ausgeprägten Golgi-Apparat und stark gefärbte Nukleoli. Pachytäne Spermatozyten in diesem Stadium sind rund und ihr Chromatin bildet

wolkenförmige Flecken. Entlang der Basalmembran befinden sich die Spermatogonien vom Typ A.

Stadium II-III: Diese beiden Stadien werden zusammengefasst, da sich die Stufe 2 und 3 Spermatiden nur elektronenmikroskopisch unterscheiden lassen. Die Zellkerne der Spermatiden auf der Stufe 14 sind dicker und kürzer und haben bereits die Form von reifen Spermatozoen. In den Stufe 2 Spermatiden sind erste proakrosomale Bläschen sichtbar. In der Stufe 3 befinden sich die akrosomalen Bläschen in der Nähe der Kernmembran und nehmen mit dieser Kontakt auf. Das dicht gepackte Chromatin der pachytänen Spermatozyten ist im Zellkern gut sichtbar. Intermediäre Spermatogonien besitzen einen eiförmigen Zellkern mit homogenem Chromatin.

Stadium IV: In diesem Stadium entstehen nach der mitotischen Teilung der intermediären Spermatogonien die Spermatogonien vom Typ B. Morphologisch ähneln sich die beiden Spermatogonien-Typen, die B-Spermatogonien besitzen aber mehr Zytoplasma.

Stadium V: Die Mitochondrien in den elongierten Spermatiden (Stufe 15) werden entlang des Flagellums organisiert. Die Spermatiden in der Stufe 5 sind durch die stufige Ausbreitung der akrosomalen Bläschen charakterisiert. Die mitotischen Teilungen der intermediären Spermatogonien dauern bis zum Ende des Stadiums V an.

Stadium VI: Um die Mitochondrien, die sich entlang des Flagellums angesammelt haben, bildet sich das Mittelstück des Spermatozoons. Elongierte Spermatiden bleiben zunächst in den Krypten der Sertoli-Zellen. In den Stufe 6 Spermatiden bedeckt das Akrosom etwa ein Drittel der Kernoberfläche. Der Kern der pachytänen Spermatozyten ist rund oder leicht eiförmig. B-Spermatogonien differenzieren sich zu präleptotänen Spermatozyten, die deutlich kleiner als die B-Spermatogonien sind.

Stadium VII: Die Spermatiden in Stufe 16 wandern nun in Richtung Lumen, der Zellkern wird hakenförmig. Die Zellkerne der runden Spermatiden haben noch keinen Kontakt mit der Zellmembran. Der Golgi-Apparat in den pachytänen Spermatozyten ist gut ausgeprägt. Die Differenzierung der B-Spermatogonien zu präleptotänen Spermatozyten kann bis zu Beginn von Stadium VII andauern.

Stadium VIII: Hier erfolgt die Spermiation. Die Akrosomalregion der runden Spermatiden (Stufe 8) nimmt Kontakt mit der Zellmembran auf. Während dieses Stadiums beginnt die Elongation des Kerns. Die Zellkerne orientieren sich mit ihrem Akrosombereich in Richtung Sertoli-Zellkern. Der Golgi-Apparat verlagert sich an das kaudale Ende der Zelle. Die pachytänen Spermatozyten werden noch größer, die präleptotänen Spermatozyten gehen in das Leptotän über.

Stadium IX: Die Kerne der runden Spermatiden werden eiförmig. Es kommt zur Elongation und beidseitiger Abflachung des Kerns. Während dieses Stadiums wird ca. 50% der dorsalen Oberfläche des Kerns vom Akrosom bedeckt, während der ventrale Teil des Akrosoms nur die Spitze des Kopfes bedeckt. Das Chromatin der leptotänen Spermatozyten bildet dicke, dunkel gefärbte Fasern.

Stadium X: Die Elongation und beidseitige Abflachung des Spermienkopfes wird fortgesetzt. Die Kopfspitze wird nun deutlicher sichtbar. Der Zellkern ist im Vergleich zu den Stufe 11 Spermatiden kleiner und das Chromatin der pachytänen Spermatozyten ist im Vergleich zu ihrem stark gefärbten Nukleolus nur leicht angefärbt. Aus den leptotänen Spermatozyten entstehen zygotäne Spermatozyten. Sie sind rund und haben runde Zellkerne. Das Chromatin der zygotänen Zellen bildet dicke, stark gefärbte Massen.

Stadium XI: In diesem Stadium kommt es zur weiteren Vorwölbung der Spitze des Spermienkopfes. Die diplotänen Spermatozyten sind groß, haben einen gut ausgeprägten Golgi-Apparat und einen eiförmigen Kern.

Stadium XII: Während der Spermiogenese erreicht der Kopf der elongierten Spermatiden Stufe 12 seine maximale Länge, die Kopfspitze wird deutlicher und runder. Die Spermatozyten durchlaufen die II Reifeteilung. Die sekundären Spermatozyten unterscheiden sich von den haploiden Spermatiden in Größe und Chromatinstruktur, sie sind ca. 30 % größer und besitzen ein inhomogenes Chromatin.

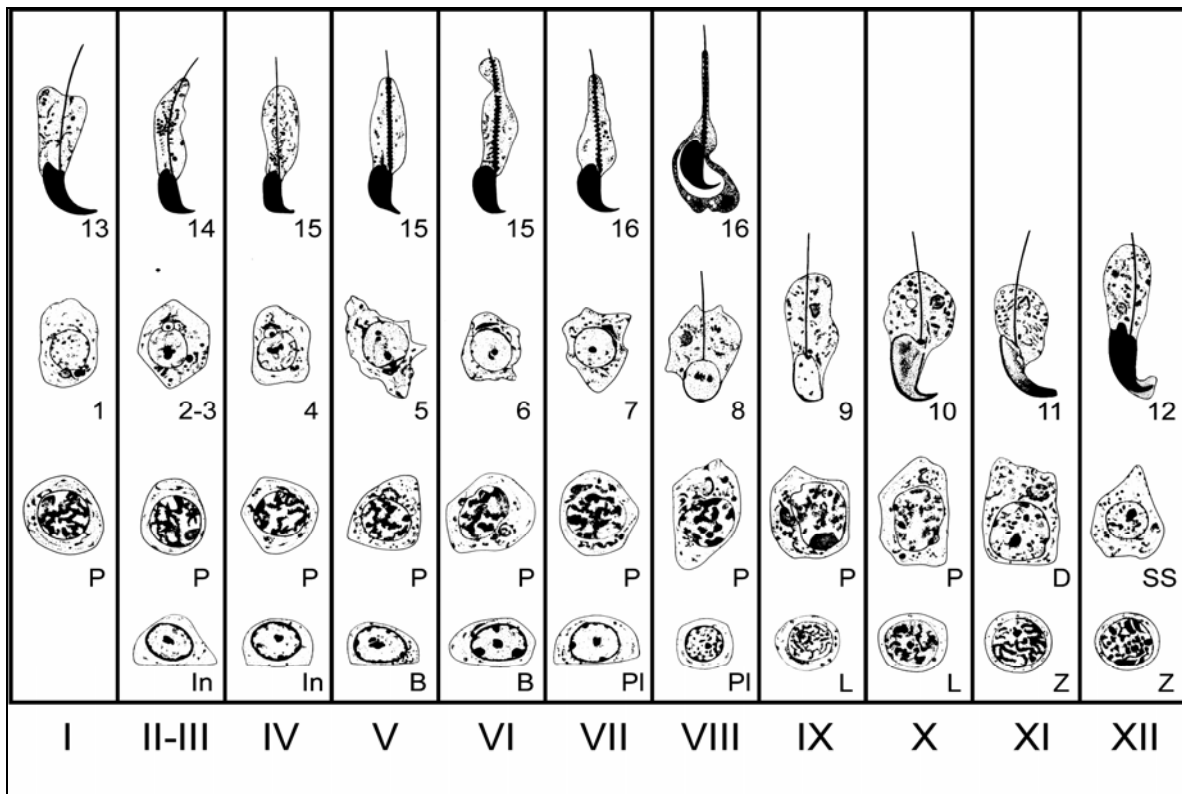


Abbildung 4: Stadien der Spermatogenese bei der Maus (aus RUSSELL et al., 1990). In: Intermediäre Spermatogonien, B: Spermatogonien Typ B, PL: präleptotäne Spermatozyten, L: leptotäne Spermatozyten, Z: zygotäne Spermatozyten, P: pachytäne Spermatozyten, D: diplotänen Spermatozyten, SS: Sekundäre Spermatozyten. 1-16: Stufen der Spermiozytogenese.

2.1.4. Hormonelle Regulation der Spermatogenese

Die Produktion von Testosteron und die Regulation der Spermatogenese setzen einen funktionsfähigen Regelkreis (Hypothalamus-Hypophysen-Hoden-Achse) voraus. Unter der Kontrolle des Peptidhormons GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone) werden die Gonadotropine LH (Luteinisierendes Hormon) und FSH (Follikel-stimulierendes Hormon) durch gonadotrope Zellen des Adenohypophysenvorderlappens ausgeschüttet. LH steuert über LH-Rezeptoren die Testosteronproduktion der Leydig-Zellen im Hoden und FSH über FSH-Rezeptoren in Sertoli-Zellen ist an die Regulation der Spermatogenese beteiligt. Über einen negativen Rückkopplungsmechanismus bewirkt ein hoher Testosteronspiegel eine Hemmung der GnRH-Freisetzung im Hypothalamus und vermindert die LH und FSH-Ausschüttung in der Hypophyse. Ein niedriger Testosteronspiegel bewirkt das Gegenteil. FSH wirkt auf die Sertoli-Zellen (FSH-Rezeptor) und stimuliert sie zur Bildung des

Androgen-Binding-Proteins (ABP), das dem Transport von Testosteron in das Tubulusflüssigkeit des adluminalen Tubuluskompartiments dient. Mit Hilfe von ABP kann Testosteron die Blut-Hoden-Schranke überwinden. Das Testosteron übt seine Funktion über den nuklären Androgenrezeptor in Sertoli-Zellen aus, der im Zellkern als Transkriptionsfaktor fungiert. Die Bindung von Androgenen an den Androgenrezeptor führt zur erhöhten Transkription von spezifischen Genen, welche die Hauptwirkung der Androgene vermitteln. Die Androgene sind für die Unterdrückung der Ausbildung einer Vagina, die Stabilisierung der Wolffschen Gänge, das Wachstum der Prostata, die Ausbildung der äußeren männlichen Genitalorgane, die Unterdrückung der Entwicklung der Milchdrüse und die Differenzierung des Sexualzentrums erforderlich. Die Sertoli-Zellen synthetisieren weitere Peptidhormone: Inhibin und Aktivin, die einen anderen Feedbackmechanismus innerhalb der Hypothalamus-Hypophysen-Hoden-Achse bilden. Inhibin hemmt die FSH-Freisetzung in der Adenohypophyse und Aktivin führt zur vermehrten Ausschüttung von FSH (Abb. 5) (NIESCHLAG und BEHRE, 2000).

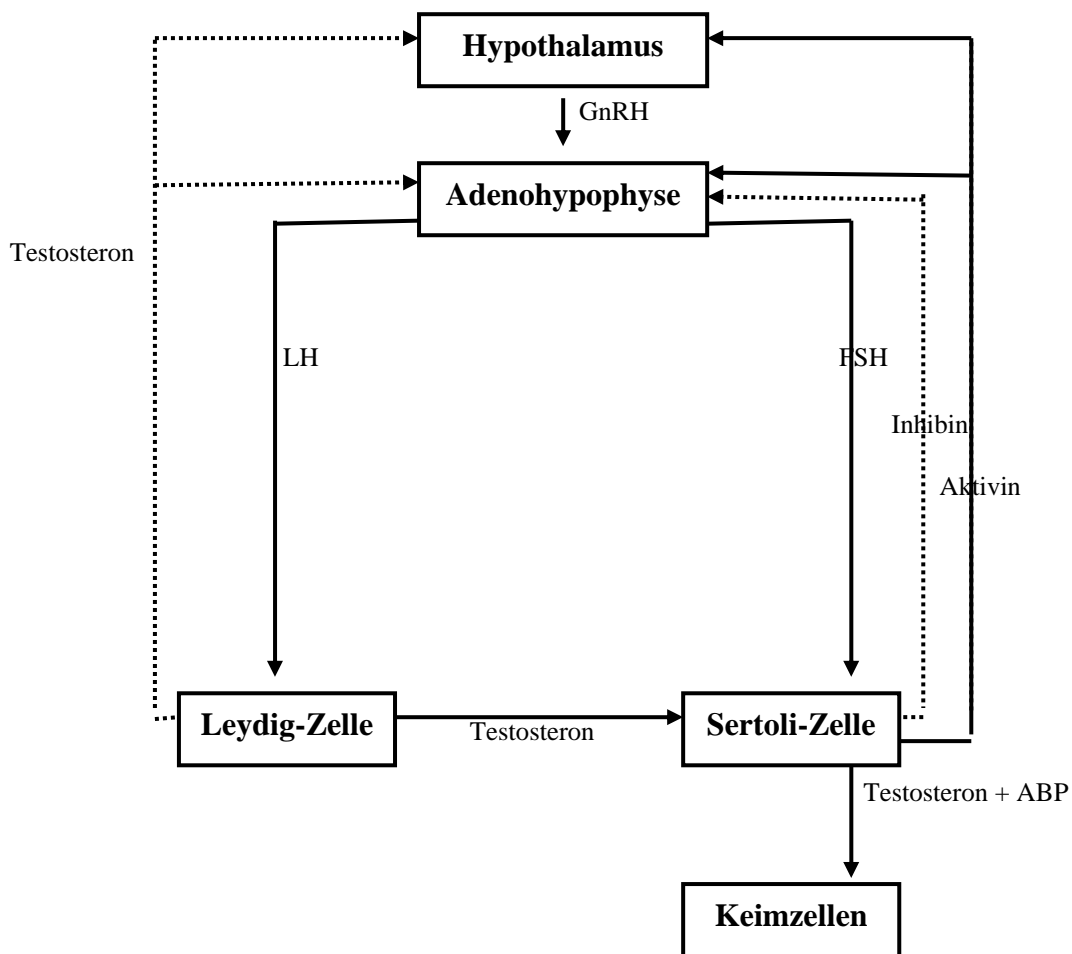


Abbildung 5: Schematische Darstellung der hormonellen Regulation der Spermatogenese. ABP- Androgen-Binding Protein (STEGGER, 2001b). \rightarrow - positive Rückkopplung, $\dots\rightarrow$ - negative Rückkopplung.

2.2. Histon-Protamin-Austausch während der Spermiogenese

Kondensation des Zellkerns in haploiden Spermatiden und spezifische Ausbildung des Spermienkopfes erfolgen nach korrektem Austausch der Histone gegen Protamine (TANPHAICHITR et al., 1978; GATEWOOD et al., 1987). Die Protamin-DNA-Interaktionen führen zu einer Zunahme der Chromatinkondensation und schließlich zu einem Stopp der Transkription. Dieser Stopp erfolgt zu einem Zeitpunkt, an dem noch viele Proteine für die vollständige Kondensation des Chromatins, die Entwicklung des Akrosoms und die Ausbildung des Flagellums synthetisiert werden müssen. Die Gene dieser Proteine müssen zuvor in pachytänen Spermatozyten und runden Spermatiden transkribiert werden. Die Translation erfolgt erst in elongierenden und elongierten

Spermatiden. Diese zeitlich versetzte Expression von Transkript und assoziiertem Protein ist typisch für haploide Spermatiden und beruht auf der zeitlichen Entkopplung von Transkription und Translation während der Spermiogenese (STEGGER 1999, 2001a).

2.2.1. Histone

In Spermatozyten und runden Spermatiden werden Nicht-Core-Histone (H1) und Core-Histone (H2A, H2B und H3) durch Hoden-spezifische Subtypen ersetzt (MEISTRICH et al., 1985; ZALENSKY et al., 2002; WITT et al., 1996). Von H4 sind keine Hoden-spezifischen Varianten bekannt. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Klassen von Histonen bestehen nur im Austausch weniger Aminosäuren an den N- und C-terminalen Enden.

Bislang wurden drei Hoden-spezifische Linker-Histone beschrieben: H1t, H1t2 und HILS1 (KHOCHBIN, 2001; DRABENT et al., 1996; IGUCHI et al., 2003; MARTIANOV et al., 2005). Die Expression von H1t wurde bei Maus (DRABENT et al., 1996) und Ratte beschrieben (GRIMES et al., 1990). Die in situ Hybridisierung zeigte H1t-mRNA in pachytänen Spermatozyten, das Protein konnte immunhistochemisch in pachytänen Spermatozyten bis zu elongierten Spermatiden nachgewiesen werden (DRABENT et al. 1996; STEGER et al.; 1998a). Knockout Mäuse für das Hoden-spezifische Histon H1t sind fertil (LIN et al., 2000; FANTZ et al., 2001; RABINI et al., 2000; DRABENT et al., 2000). Diese Tatsache beruht auf einer Redundanz der Genexpression, da die Menge von anderen H1-Subtypen erhöht und somit wieder ein normales Verhältnis von H1t zu Nukleosom hergestellt ist (DRABENT et al., 2000; LIN et al., 2000, 2004). Die Entfernung von H1 und H1.1 führte zu einer signifikanten Senkung des Verhältnisses von H1 zu Core-Histonen, es konnten jedoch keine Defekte in der Spermatogenese festgestellt werden (LIN et al., 2004). Eine normale Keimzellentwicklung findet auch bei einem gestörten Verhältnis von H1 Histon zu Core-Histonen statt.

Hoden-spezifisches Histon H1t verursacht im Vergleich zu somatischen H1 Subtypen eine stärkere Chromatin-Dekompaktierung und dadurch eine leichtere Zugänglichkeit für andere Chromatinmodulatoren. In Spermatogonien wurde zusätzlich eine starke Expression des somatischen Histons H1.1 (H1a) beobachtet, die im Verlauf mitotischer und meiotischer Zellteilungen abnimmt (MEISTRICH et al., 1985; FRANKE et al., 1998). In Maus und Ratte wurde ein anderer Hoden-spezifischer H1 Subtyp, das sog. HILS1 (H1-like protein in spermatids 1) nachgewiesen (IGUCHI et al., 2003; YAN et al., 2003),

dessen Anwesenheit in elongierten Spermatiden auf eine Bedeutung für die Chromatinkondensation hinweisen könnte.

Hoden-spezifisches Histon H3 wurde beim Mensch beschrieben (ALBIG et al., 1995, 1996; WITT et al., 1996) und H3t genannt. Die mRNA dieser H3 Variante konnte in primären Spermatozyten lokalisiert werden. TH3 ist ein anderer Hoden-spezifischer H3 Subtyp, der bei der Ratte durch TROSTLE-WEIGE et al. (1984) detektiert wurde.

Im Hoden kommen auch andere Nicht-Hoden-spezifische H3 Subtypen vor, wie H3.3. Die zwei H3.3 Gene H3.3A und H3.3B sind in Maushoden exprimiert (ALBIG et al., 1995, BRAMLAGE et al., 1997). H3.3A mRNA kommt vor und nach der Meiose vor. Die Expression von H3.3B-mRNA ist beschränkt auf Zellen in der Prophase der Meiose (BRAMLAGE et al., 1997). In homozygoten transgenen Mäusen der H3.3 Linie wurde Subfertilität festgestellt. Bei männlichen H3.3^{-/-} Mutanten konnte man eine verringerte Zahl der trächtigen Weibchen beobachten. Jedoch konnten keine Unterschiede in der Histologie von Hoden, Nebenhoden, Samenleiter und in der Zahl der Spermien bei transgenen Mäusen nachgewiesen werden (COULDREY et al. 1999). AKHMANOVA et al. (1997) konnten in *Drosophila* H3.3 in Keimzellen während der ersten meiotischen Teilung nachweisen. Es fiel auf, dass dieses Histon auf einzelne Chromatinregionen dieser Keimzellpopulation beschränkt war. Zudem konnte mit der Elongation der Spermatiden eine Abnahme der Histon H3.3-Expression festgestellt werden. Transkriptional aktive Regionen der somatischen Zellen zeigen besonders große Mengen von H3.3 (MCKITTRICK et al., 2004). Eine hohe Expression von diesem Histon in Spermatozyten ist wahrscheinlich mit den intensiven Transkriptionprozessen während der Meiose verbunden (LEWIS et al., 2003).

Erstmals wurden Hoden-spezifische H2B Histone 1975 bei der Ratte gefunden (SHIRES et al., 1975). Hier wird somatisches H2B in pachytänen Spermatozyten zu 90% durch Hoden-spezifisches rTH2B ersetzt (MEISTRICH et al., 1985). Bei der Maus kann man ein ähnliches Verteilungsmuster für TH2B in pachytänen Spermatozyten beobachten (CHOI et al., 1996). In humanen Hoden ist TH2B in Spermatogonien und runden Spermatiden exprimiert und nimmt langsam während der Elongation der Spermatiden ab (VAN ROIJEN et al., 1998). Bekannt sind auch nicht-nukleäre H2B Subtypen während der Spermatogenese. Beim Bullen befinden sich somatische Histone in Verbindung mit der *perinuclear theca* der Spermatozoen (TOVICH und OKO, 2003). Ein anderer H2B Subtyp, SubH2Bv, wurde als eine Komponente der *theca* der Spermatozoen beim Bullen

beschrieben (AUL und OKO, 2001). Die Funktion der nicht-nukleären Histone ist bislang nicht bekannt.

Von H2A Histonen ist nur der Hoden-spezifische Subtyp TH2A beschrieben, der bei der Ratte in pachytänen Spermatozyten lokalisiert ist (MEISTRICH et al., 1985; RAO et al., 1983). H2A.X und makroH2A gehören zu Nicht-Hoden-spezifischen Histonen, die jedoch in der Spermatogenese vorkommen. In somatischen Zellen ist H2A.X an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüch beteiligt (LEWIS et al., 2003; RAGAKOU et al., 1998). Knockout Mäuse für dieses Gen sind infertil (CELESTE et al., 2002). In diesen Mutanten kommt es zu einem Spermatozytenarrest. Im zygotänen und pachytänen Stadium von H2A.X ^{-/-} Mäusen wurde eine gestörte Synapsis und ein Defekt in der Segregation der Geschlechtchromosomen beobachtet (CELESTE et al., 2002).

MacroH2A wurde in hohen Konzentrationen in Maushoden gefunden (PEHRSON et al., 1997, RASMUSSEN et al., 1999). Während der Spermatogenese kommt MacroH2A in Kernen von pachytänen Zellen vor (HOYER-FENDER et al., 2000; TURNER et al., 2000). H2A1.2 und HP-1-like Protein M31 können die Paarung von X- und Y-Chromosomen und die Bildung von Sex-vesicles beeinflussen, die kritisch für den erfolgreichen Verlauf der Meiose sind. Die Anwesenheit von H2A1.2 in Spermatozoen bei der Maus (HOYER-FENDER et al., 2000) könnte auf die Bedeutung dieses Histons für andere Prozesse, nicht nur in der meiotischen Rekombination, hinweisen. Jedoch kommt bei den Tieren, die Histone in reifen Spermien völlig behalten (Wels-*Ictalurus ocelatus*, Ochsenfrosch-*Rana caresbeiana*) H2A1.2 nicht vor (ABBOTT et al., 2004).

Obwohl keine Hoden-spezifische Histon H4 Proteinvariante bekannt ist, gibt es das H4t-Gen, das nur während der Spermatogenese bei Säugern exprimiert wird. Dieses Gen, H4t (Hist1h4c), wurde erstmals im Genom der Ratte gefunden (GRIMES et al., 1987). Später isolierten DRABENT et al. (1995) das H4 Gen von Maus und Mensch. Die höchste H4t mRNA Expression wurde in pachytänen Spermatozyten nachgewiesen (WOLFE et al., 1989; DRABENT et al., 1995). Die somatische Variante dieses Gens wurde in diesen Zellen nicht gefunden (WOLFE et al., 1989). Die Funktion des H4t Gen ist nicht bekannt, weil die Primärstruktur des Proteins zu 100% identisch mit evolutionär konserviertem somatischem H4 ist.

2.2.2. Protamine

In humanem Ejakulat sind zwei Protaminklassen bekannt, Protamin 1 (Prm 1) und Protamin 2 (Prm 2). Prm1 kommt in Spermatozoen aller Säuger vor. Es besteht aus 50 Aminosäuren und besitzt einen hohen Gehalt an Arginin und Cystein. Zur Prm 2 Familie gehören drei Proteine, die von individuellen Genen abgeleitet sind und unterschiedliche Längen besitzen. Das Prm 2 Gen wurde bei allen bislang untersuchten Säugern gefunden, außer bei Bulle und Eber. Das Prm 2 Protein kommt nur bei Mensch, Maus und Pferd vor. Das Verhältnis von Prm 1/Prm 2 variiert zwischen verschiedenen Spezies, beim Mensch beträgt es ca. 1 (BARONE et al., 1994).

Beim Mensch wurden die Transkripte für Prm 1 und Prm 2 in Spermatiden auf der Stufe 1 bis 4 nachgewiesen (STEGER et al., 2000). Proteine für beide Prm wurden von Stufe 4 bis 8 Stufe Spermatiden beobachtet (ROUX et al., 1987, GATEWOOD et al., 1990; LELANNIC et al., 1993; LESCOAT et al., 1993; PRIGENT et al., 1996, SIFFROI et al., 1999).

BEDFORD et al. (1973) beschrieben erstmals eine mögliche Verbindung zwischen der Kondensation des Kernchromatins in reifen Spermien und der reduzierten männlichen Fertilität. Der Grad der Chromatinkondensation ist umgekehrt proportional zur Befruchtungsfähigkeit der Spermien (CARRELL et al., 1998). Unvollständige Chromatinkondensation wurde in testikulären Spermien bei Männern mit nicht-obstruktiver Azoospermie beobachtet (HAMMADEH et al., 1999). Ejakulierte Spermien mit gestörter Chromatinkompaktierung wurden mit Infertilität, Frühabort (EVENSON, 1999) und niedriger Fertilisationsrate nach intracytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) in Verbindung gebracht (SAKKAS et al., 1999).

SILVESTRONI et al. (1976) berichteten, dass Störungen beim Austausch von Histonen während der Spermatogenese Infertilität bei Männern verursachen können. Spätere Studien zeigten bei infertilen Männern eine Senkung der Prm 2 Menge im Sperma, die auf Grund inkompletter Entwicklung von Prm 2 Vorläufermolekülen entsteht (CHEVAILLIER et al., 1987; BALHORN et al., 1988; BELOKOPYTOVA et al., 1993; DE YERBA und OLIVA, 1993; DE YERBA et al., 1998).

Bei infertilen Männern wurde eine Senkung des Protamingehalts (LESCOAT et al., 1987; BLANCHARD et al., 1990; SAKKAS et al., 1996; ZIYYAT et al., 1999) und ein steigendes Verhältnis von Prm 1 zu Prm 2 (BALHORN et al., 1988; BELOKOPYTOVA et

al., 1993) beobachtet. Bei infertilen Männern mit einem Spermatogenese-arrest auf der Stufe von runden Spermatozoen wurde gezeigt, dass der Prozentsatz der für TP1 (Transitions Protein 1) positiven Spermatozoen erniedrigt ist (STEGER et al., 1999). Bei infertilen Patienten existierte eine signifikante Beziehung zwischen dem Verhältnis von Prm 1-mRNA zu Prm 2-mRNA und der Fertilisationsrate (STEGER et al., 2003). Ein abnormales Verhältnis Prm 1/Prm 2 Protein bei Männern verursacht Infertilität (BALHORN et al., 1988; KHARA et al., 1997; CARRELL and LIU, 2001). Die Quotienten Prm 1/Prm 2 Protein und Prm 1/Prm 2-mRNA scheinen eine wichtige Rolle für die männliche Fertilität zu spielen (CHO et al., 2001). STEGER et al. (2003) zeigten, dass der Gehalt von Prm 1 Transkripten in einzelnen Spermatozoen bei infertilen Patienten reduziert ist. Bei Männern mit nicht-obstruktiver Azoospermie wurde im Vergleich zu obstruktiver Azoospermie eine deutlich geringere Expression von Prm 1 beobachtet (MITCHELL et al., 2005). Diese Patienten besitzen auch eine geringere Chance, nach TESE/ICSI Behandlung ein Kind zu zeugen. Die Schwangerschaftsrate nach Befruchtung mit Spermatozoen mit niedrigem Prm 1 Gehalt war signifikant geringer als mit Spermatozoen mit hohem Gehalt (MITCHELL et al., 2005). Prm 1 Mangel in Spermatozoen kann zudem kritisch für die Implantation des Embryos sein (MITCHELL et al., 2005). Zeitlich versetzte Protaminexpression kann auch eine entscheidende Rolle für die korrekte Spermatozoidendifferenzierung und die männliche Fertilität spielen. Studien an Mäusen zeigten, dass eine vorzeitige Translation von Prm 1-mRNA zu vorzeitiger nukleärer DNA Kondensation in Spermatozoen und abnormaler Morphogenese des Kopfes führte. Diese frühzeitige Expression der Protamine wurde gefolgt von einem kompletten Arrest in der Spermatozoidendifferenzierung und Sterilität (LEE et al., 1995). Verzögerte Expression von Protaminen (ZHONG et al., 1999; WU et al., 2000) oder das Fehlen eines der beiden Protamine (CHO et al., 2001) führte zu Infertilität.

2.3. Regulation des Histon-Protamin-Austausches

2.3.1. Regulation der Protaminexpression

Der Transkriptionsfaktor cAMP-responsive-element modulator (CREM) hat für die Regulation der Genexpression in männlichen haploiden Keimzellen eine große Bedeutung, u.a. kontrolliert er die Transkription von Protaminen. Durch alternatives Spleißen und alternative Startpunkte für die Translation können aus dem CREM-Gen sowohl

Aktivatoren als auch Repressoren gebildet werden (DELMAS et al., 1992, 1993; MASQUILIER et al., 1993; LAOIDE et al., 1993; WALKER et al., 1994). Knockout Mäuse für den CREM Aktivator CREM sind steril (BLENDY et al. 1996; NANTEL et al., 1996). Bei infertilen Patienten mit Spermatidenarrest wurde eine reduzierte CREM τ -mRNA (STEGGER et al., 1999) und CREM τ Protein (WEINBAUER et al., 1998) Expression beobachtet. Zudem wurden zusätzliche CREM-Repressoren identifiziert (BLOECHER et al., 2003, 2005).

2.3.2. Histon-Code

Im Zellkern eukaryotischer Zellen liegt DNA in Form von Chromatin vor. Der Nukleoproteinkomplex (Nukleosom) besteht aus den vier Histon-Dimeren (Core-Histonen) H2A, H2B, H3 und H4 und DNA, die um dieses Histonoktamer gewunden ist (1,65 Windungen entspricht 146 bp). Einzelne Nukleosome sind über Linker-DNA-Einheiten unterschiedlicher Länge miteinander verbunden. DNA-Core-Histon Verbindungen werden durch das Linker H1 stabilisiert.

Alle Core-Histone sowie das Linker Histon H1 besitzen mehrere Stellen für potentielle chemische Modifikationen wie Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinierung. Der Histon-Code postuliert eine Rolle von posttranslationalen Modifikationen von Core-Histonen für die Kontrolle der Funktion und der Struktur von Chromatin (STRAL und ALLIS, 2000; TURNER, 2002). Diese können die Ladung, sowie die Konformation von Histonen verändern und somit die Stärke der Bindung von Histonen an die DNA beeinflussen (BRADBURY, 1992) und dadurch für die Genregulation eine wichtige Rolle spielen. So wurde gezeigt, dass Gene in männlichen Keimzellen spezifisch mit hypo- bzw. hyperacetylierten Histonen assoziiert sind (GARDINER-GARDEN et al., 1998).

Der Histon-Code spielt wahrscheinlich eine Rolle in Keimzellen als Stadien-spezifische Histonmodifikation während der postmeiotischen Umstrukturierung des Genoms. Jedoch ist die genaue Bedeutung und Funktion für die Chromatinreorganisation und den Histon-Protamin-Austausch in elongierten Spermatiden nicht klar. Die Studien von MARQUES et al. (2004) legen eine Assoziation von abnormalen epigenetischen Informationen mit Störungen der Spermatogenese nahe.

Methylierung von Lysin 9 in Histon H3 erfolgt in den somatischen Zellen durch zwei Methyltransferasen, Suv39h1 und Suv39h2 (SIMS et al., 2003). Im Hoden ist Suv39h2 überexprimiert (O'CARROLL et al., 2000) und wurde in heterochromatischen Regionen der leptotänen Spermatozyten und runden Spermatiden nachgewiesen. Bei Knockout Mäusen wurden für beide Methyltransferasen Defekte in der Meiose festgestellt (PETERS et al., 2001). Die Phosphorylierung von Lysin 10 in Histon H3 wurde während der Meiose beobachtet und mit der Kondensation des Chromatins in Verbindung gebracht (PRIGENT und DIMITROV, 2003). Eine vorübergehende Phosphorylierung des Histons H2AX tritt während der meiotischen Rekombination auf (MAHADEVIAIAH et al., 2001). Darüber hinaus scheint auch die Phosphorylierung von Protaminen eine wichtige Rolle bei der Chromatinkondensierung zu spielen. Prm 2 wird durch Camk4 (Ca⁺² /calmodulin-dependent protein kinase IV) phosphoryliert. Männliche Mäuse mit einer Deletion im Camk4-Gen sind infertil, wobei die Spermatogenese zunächst bis zum Stadium XII ungestört verläuft. Ab diesem Zeitpunkt ist die aufeinander folgende Ablagerung der Spermio-genese-spezifischen DNA-bindenden Proteine unterbrochen (WU et al., 2000). Das Prm 2-Vorläuferprotein kann nicht zum reifen Prm 2 prozessiert werden. Hierdurch unterbleibt der Austausch von TP 2 (Transitions-Protein 2) gegen Prm 2. Es resultiert eine deutliche Reduktion der Spermienzahl.

Ubiquitinierung ist eine Modifikation, die als Marker für die Proteindegradierung via Proteasome bekannt ist. Man vermutet, dass die Ubiquitinierung an der DNA-Reparatur, der Kontrolle des Zellzykluses und dem Histon-Code beteiligt ist (BAARENDS et al., 1999). Ubiquitinierung von Histonen während der Spermatogenese wurde bei Maus, Ratte, Hahn und Forelle beschrieben (JASON et al., 2002). Ubiquitiniertes H2A Histon wird bei der Maus in pachytänen Spermatozyten und elongierten Spermatiden exprimiert (BAARENDS et al., 1999). In elongierten Spermatiden der Ratte wurden die Histone H2A, H2A.Z, H2B, H3 und TH3 mono- und poly-ubiquitiniert gefunden (BAARENDS et al., 1999; CHEN et al., 1998). Deletion des Gens für HR6 (Ubiquitin-konjugiertes Enzym) verursacht einen Spermatogenese-arrest auf der Stufe von Spermatiden und Sterilität von männlichen Mäusen (ROEST et al., 1996).

Die am besten untersuchte posttranslationale Modifizierung ist die Acetylierung von Core-Histonen. Sie wurde erstmals durch ALLFREY et al. (1964) beschrieben. Der Acetylierungszustand der Kernhistone wird durch zwei Enzymklassen determiniert: Histonacetyltransferasen (HATs) und Histondeacetylasen (HDACs). HATs übertragen die aktivierte Acetylgruppe von Acetyl-Coenzym A auf die ε-Aminogruppe konservierter

Lysinreste in der N-terminalen Region der Core-Histone. Die Einführung einer Acetylgruppe neutralisiert die unter physiologischen Bedingungen positiv geladene ϵ -Aminogruppe durch Ausbildung einer Amidbindung. In der umgekehrten Reaktion vermitteln HDACs die Hydrolyse der Amidbindung (Abb. 6).

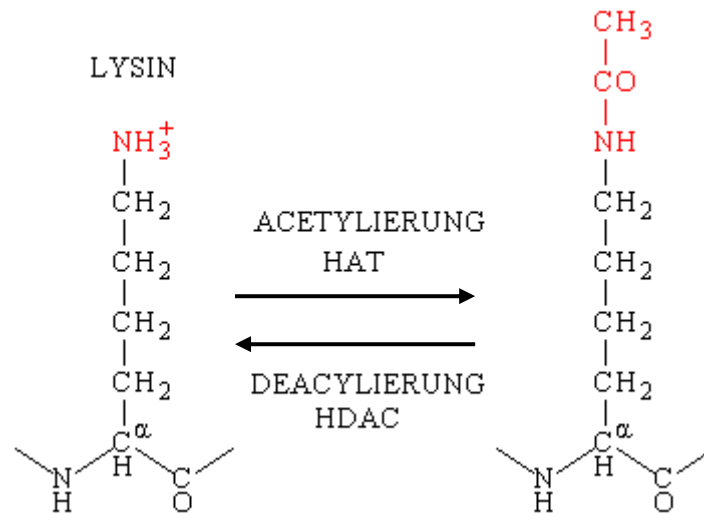


Abbildung 6: Acetylierung und Deacetylierung der ϵ -Aminogruppe in Core-Histonen (nach. www.web-books.com). Das Gleichgewicht der Acetylierung von Lysinresten in den N-terminalen Regionen der Core-Histone wird durch Histon-Acetyltransferasen und Histon-Deacetylasen gesteuert. Die Acetylierung neutralisiert positiv geladene ϵ -Aminogruppe der N-terminalen Regionen in einer Amidbindung.

Acetylierung der Core-Histone führt über eine Veränderung der biophysikalischen Eigenschaften des Chromatins zu einer Abnahme der Affinität von Histonen zur DNA (DAVIE, 1998; TURNER, 1991) (Abb.7) und zu einer Veränderung der internukleosomalen Wechselwirkungen (WORKMAN und KINGSTON, 1998; KORNBERG und LORCH, 1999). Nach Acetylierung wurde eine Veränderung des „supercoilings“ nukleosomaler DNA (NORTON et al., 1989; KRAJEWSKI und BECKER, 1998) und eine generelle Destabilisierung höher geordneter Strukturen wie z.B. der 30 nm-Chromatinfaser beobachtet (NIGHTINGALE et al., 1998; TSE et al., 1998).

Acetylierung von spezifischen Lysinresten in den N-terminalen Enden ist in drei physiologischen Prozessen der Zelle impliziert. Der erste Prozess ist die Deposition der Histone während der Synthese der DNA (PARTHUN et al., 1996; LOIDL und GROBNER, 1987). So können die Transkriptionsfaktoren leichter an die entsprechende Erkennungssequenzen innerhalb des Chromatins binden, nachdem die Core-Histone acetyliert wurden (WOLFFE und DIMITROV, 1993). HAZZOURI et al. (2000) zeigten

Replikations-abhängige Histonacetylierung in mitotisch aktiven Zellen während der Spermatogenese bei der Maus. Positive Signale für acetyliertes Histon H4 wurden in Kernen von Spermatogonien und Spermatozyten im Stadium II bis VIII beobachtet. Der zweite Prozess ist die Regulation der Genexpression. Durch Acetylierung und Deacetylierung des Chromatins wird das Ablesen der Gene an der DNA reguliert (JENUWEIN und ALLIS, 2001). Es wird vermutet, dass die Histon-Acetylierung am „Gen-Silencing“ durch DNA-Methylierung beteiligt ist (NAN et al., 1998).

Der dritte Prozess ist der Austausch der Histone gegen Transitionsproteine und Protamine während der Spermiogenese. Das Kernchromatin von haploiden Spermatisden durchläuft eine starke Kondensation, die die Folge des Austausches DNA-bindender Histone gegen Protamine (TANPHAICHITR et al., 1978, GATEWOOD et al., 1987) ist. Damit Protamin an die DNA binden kann, müssen zunächst die an die DNA gebundenen Histone entfernt werden. Hyperacetylierung in postmeiotischen Zellen wurde bei verschiedenen Tierarten, einschließlich der Fliege (*Megaselia scalaris*) (WOLF et al., 1993), der Forelle (CHRISTENSEN und DIXON, 1982; CHRISTENSEN et al., 1984), dem Hahn (OLIVA und MEZQUITA, 1982) und der Ratte (GRIMES und HENDERSON, 1984a, b) beobachtet. Bei der Ratte wurde in situ Hyperacetylierung von Histon H4 von elongierenden (Stufe 9-10) bis elongierten Spermatisden (Stufe 11-12) nachgewiesen (MEISTRICH et al., 1992). HAZZOURI et al. (2000) konnte in Maushodengewebe immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen acetyliertes Histon H4 positive Signale in elongierenden Spermatisden der Stufen 8 bis 12 (Stadium VIII-XII) nachweisen. Bei der Winterflunder (*Pseudopleuronectes americanus*) und dem Karpfen, bei denen es während der Spermiogenese zu keinem Austausch von Histonen gegen Protamine kommt, sind die Histone nicht acetyliert (KENNEDY et al., 1980, 1981).

Histone zeigen eine höhere Empfindlichkeit für die Proteolyse (MARUSHIGE et al., 1976). Diese Eigenschaft könnte den Ersatz der Histone durch Protamine unterstützen.

Proteine mit sogenannten Bromodomänen (Acetyl-Lysin-bindende Module) sollen die Acetylierung von Lysinen erkennen (DHALLUIN et al., 1999, JACOBSON et al., 2000). So bewirkt das Protein BRDT, das zwei Bromodomänen enthält, abhängig vom Acetylierungsgrad von Histonen eine Kondensation von Chromatin (PIVOT-PAJOT et al., 2003). Bei der Maus wurde gezeigt, dass die Expression von BRDT während der Spermatogenese Stadien- und Zell-spezifisch ist (SHANG et al., 2004). Die Hoden-spezifische BRDT Variante (BRDT-NY) scheint eine große Rolle in der Spermatogenese

zu spielen und kann mit Infertilität zusammenhängen. Bei azoospermen Patienten fehlt BRDT-NY-mRNA (ZHENG et al., 2005).

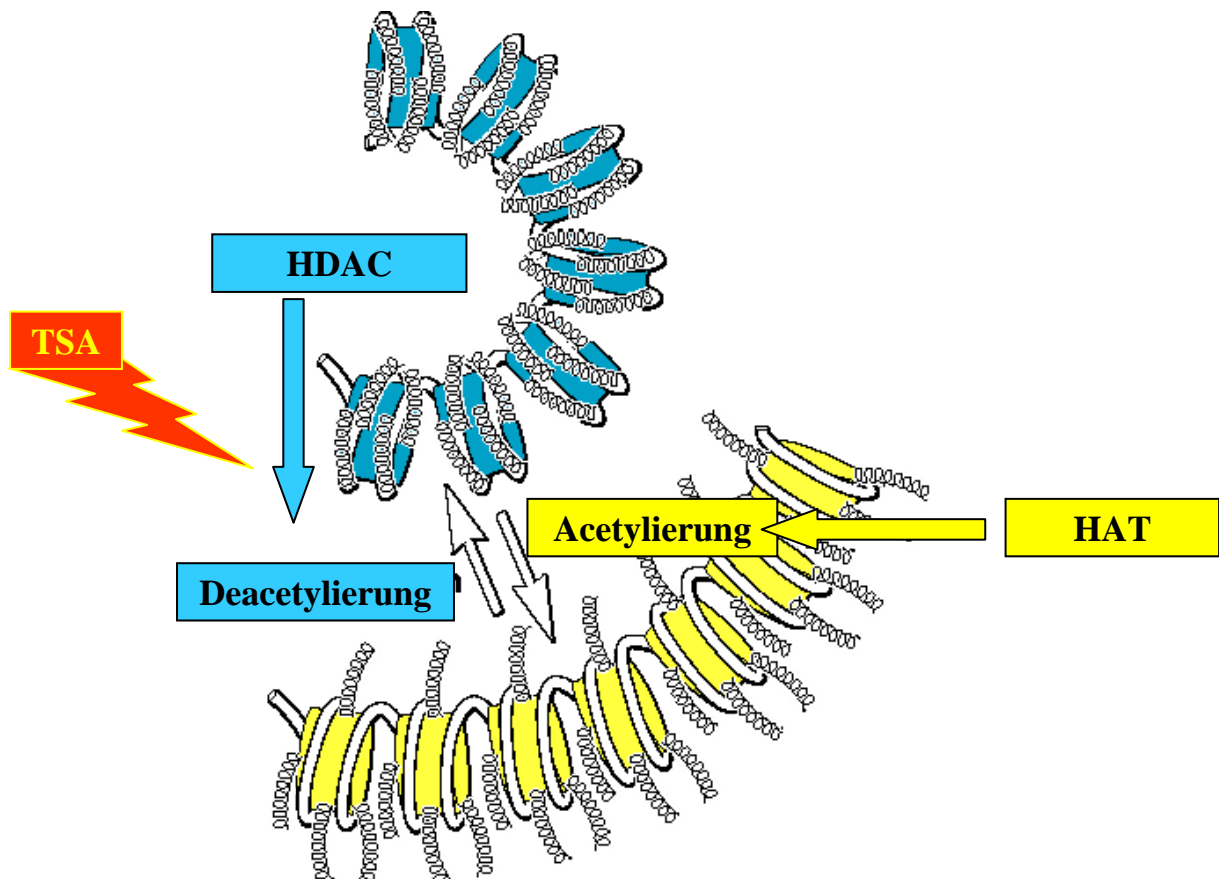


Abbildung 7: Reversible Acetylierung und Deacetylierung der Core-Histone durch Histon-Acetyltransferasen (HAT) und Histon-Deacetylasen (HDAC) (modifiziert nach: www.average.org). Acetylierung der Histone führt zu einer Auflockerung der DNA-Histon Verbindung und erleichtert dadurch den Zugang z.B. für DNA-bindende Transkriptionsfaktoren zur Promotorregion oder Entfernung von Histonen während der Spermio-genese. Histondeacetylase Inhibitoren, wie z.B. Trichostatin A (TSA) hemmt die HDAC Aktivität und ändert den Acetylierungsstatus der Core-Histon. Die Spirale stellen die N-terminalen Enden der Core-Histone dar.

Die Entdeckung von Substanzen, die durch Inhibierung von HDACs eine Veränderung im Acetylierungszustand von Histonen in Richtung Hyperacetylierung herbeiführen (Abb.7), ermöglichte die Untersuchung der Bedeutung dieser Chromatinmodifikation (YOSHIDA et al., 1990).

Trichostatin A (TSA) ist ein reversibler HDAC-Inhibitor, der in vitro bereits in nanomolaren Konzentrationen wirksam ist (YOSHIDA et al., 1990, YOSHIDA und HORINOUCI, 1995). Es handelt sich um ein antimykotisches Antibiotikum (TSUJI et

al., 1976), das vom Bakterium *Streptomyces* produziert wird. HDAC-Inhibitoren wie TSA oder Trapoxin zeigten in vivo eine drastische Veränderung des Expressionsmuster von vielen Genen (YOSHIDA und HORINOUCI, 1995). Hier wird die Induktion nicht-exprimierter Gene, die Repression bereits aktiver Faktoren und die Modulation von Expressionsraten beobachtet (VAN LINT et al., 1996). In der Regel führt eine Hemmung der Histon-Deacetylase zu einer Genaktivierung und kann in Differenzierung und/oder Apoptose von Tumorzellen resultieren (MARKS et al., 2000). Eine Induktion der Differenzierung wird bereits in der Chemotherapie und Chemoprävention von Tumoren erfolgreich eingesetzt (VILLAR-GAREA und ESTELLER, 2004). Die Wirkung der HDAC-Inhibitoren auf die Spermatogenese ist bislang nicht bekannt. Die Studie von HAZZOURI et al. (2000) zeigte, dass eine Inkubation der isolierten Spermatozyten von Hoden der Maus mit einer TSA-Konzentration von 100 ng/ml eine Hyperacetylierung der Histone in diesen Zellen verursacht. Dieses Experiment zeigt, dass für den physiologischen Acetylierungsstatus in reifen Spermatozyten die Histondeacetylasen verantwortlich sind.

2.4. Störungen der Spermatogenese

Die Ursachen von Spermatogenesestörungen können auf verschiedenen Ebenen lokalisiert sein, wie dem Hypothalamus, der Hypophyse oder dem Hoden. Aus infektiologischer Sicht können Spermatogenesestörungen bei Infektionskrankheiten, Orchitis und Epididymo-Orchitis auftreten. Auch vaskuläre Begleitreaktionen bei entzündlichen Prozessen oder Nebenwirkungen einer Antibiotikatherapie sind denkbar. Die Störungen zeigen verschiedene Krankheitsbilder, zu denen das SCO-Syndrom, der Spermatogeneseareost sowie die Hodentumore zählen. Unabhängig von ihrer Ursache führen Spermatogenesestörungen aber stets zu einer quantitativ und qualitativ verminderten Spermienproduktion und Sub- bzw. Infertilität.

Die Diagnose erfolgt meist durch eine Ejakulatanalyse (Spermiogramm). Der häufigste Befund ist die Oligoastheno-teratozoospermie (OAT-Syndrom), die durch eine Samenzelldichte von < 20 Mio/ml (Oligozoospermie), einen Anteil beweglicher Samenzellen von $< 50\%$ (Asthenozoospermie) und einen Anteil normal geformter Samenzellen von $< 30\%$ (Teratozoospermie) definiert ist (WHO 1999). Zur Beurteilung der Spermatogenese wird nach Indikation, z.B. Kinderwunsch bei Azoospermie, eine Hodenbiopsie durchgeführt. Bei Patienten mit OAT Syndrom ist die häufigste histologische Diagnose die sog. „bunte Atrophie“ (SIGG, 1979). Die Histologie zeigt

verschiedene Spermatogenesestörungen in benachbarten Tubuli. Die Beurteilung der Spermatogeneseeffektivität erfolgt mit Hilfe verschiedener „score count“ Verfahren (JOHNSON, 1970; HOLSTEIN und SCHIRREN, 1983; BERGMANN und KLIESCH, 1998). Beim heute gängigsten Verfahren (BERGMANN und KLIESCH, 1998) wird der prozentuelle Anteil der Tubuli seminiferi mit elongierten Spermatisden bestimmt. Dieser Score lässt jedoch keine Aussage über die Quantität der Spermienproduktion zu.

Beim SCO-Syndrom, auch Germinalzellaplasie genannt, handelt es sich um ein charakteristisches histopathologisches Bild. Die betroffenen Keimtubuli enthalten nur Sertoli-Zellen (DEL CASTILLO et al., 1947; HOLSTEIN et al., 1988). Als Hauptursache vermutet man kongenitale Faktoren. Es wird unterschieden zwischen einem primären SCO, welches sich durch das primäre Fehlen der Zellen der Spermatogenese auszeichnet, und einem sekundären SCO, bei welchem sich die Germinalzellaplasie durch sekundäre Atrophie erst später im Leben ausbildet. NISTAL et al. (1990) teilten das SCO-Syndrom in 4 Typen ein.

Typ I: Normale ausdifferenzierte Sertoli-Zellen, bei denen ein kongenitales Fehlen oder eine spätere Involution der Stammzellen ursächlich verantwortlich sein könnte.

Typ II: Hier finden sich Sertoli-Zellen, die ähnlich den Sertoli-Zellen in präpubertären Hoden angeordnet sind. Als mögliche Ursache wird hier ein Gonadotropinmangel vermutet.

Typ III: Das Zytoplasma dieser Sertoli-Zellen gleicht dem maturaer Zellen, jedoch ist das Zellvolumen geringer. Für diesen Typus scheint ein Kryptochismus oder andere frühkindliche Faktoren von ätiologischer Bedeutung zu sein.

Typ IV: Involution der Sertoli-Zellen mit irregulären Zellkernen wird durch Strahlung, zytotoxische Pharmaka oder andere Faktoren verursacht.

Als Spermatogenesearearrest bezeichnet man den Stopp der Ausreifung der Keimzellen auf einer definierten Stufe der Spermatogenese (Spermatogonien, primäre oder sekundäre Spermatozyten oder runde Spermatisden) (HOLSTEIN et al., 1988). In der Mehrzahl der Fälle ist die Ursache idiopathisch (ca. 30%). Zu den bekannten Ursachen zählen: Chromosomenanomalien, Mikrodeletionen im AZF (Azoospermiefaktor) -Locus des Y-Chromosoms sowie Mutationen im Gen für die zystische Fibrose (CF) (NIESCHLAG und BEHRE, 2000). Der Multigenlocus Yq11.21-23 kann in 3 Regionen (AZFa, AZFb und AZFc) eingeteilt werden. Eine Deletion von AZFa, dessen Genprodukt bislang nicht bekannt ist, führt zu einer Germinalzellaplasie (LUETIENS et al., 2002). AZFb kodiert für

RNA-binding-motif (RBM)-Protein, AZFc für Deleted-in-azoospermia (DAZ)-Protein. Deletionen von AZFb sind mit einem Spermatogenese-arrest auf der Stufe von primären Spermatozyten assoziiert (ELLIOTT et al., 1997). Am häufigsten treten AZFc-Deletionen auf, die zu quantitativ verminderter, aber qualitativ intakter Spermatogenese führen (REIJO et al., 1995). Histologisch zeigen AZFc-Deletionen das Bild des fokalen SCO (SIMONI et al., 1998; VOGT, 1998).

Bei Patienten mit einem Arrest der Spermatogenese auf der Stufe von runden Spermatisiden wurden Störungen der transkriptionalen Regulationsmechanismen beobachtet. Der Transkriptionsfaktor CREM (cAMP Responsive Element Modulator) reguliert durch Bindung an die CRE-Box in der Promotorregion von z.B. Transitionsproteinen oder Protaminen deren Expression in runden Spermatisiden (LALLI et al., 1996; WALKER und HABENER, 1996). Bei infertilen Patienten ist die Expression von CREM reduziert oder fehlt sogar völlig (WEINBAUER et al., 1998; STEGER et al., 1999).

Weitere Ursachen eines Spermatogenese-arrests sind Radiotherapie, Chemotherapie, Antibiotika, Hitze oder Allgemeinerkrankungen (Leber- oder Niereninsuffizienz) (MARTIN-DU PAN und CAMPANA, 1993).

Zu den genetischen Ursachen der Sterilität gehört u.a. das Klinefelter-Syndrom. Die Krankheit beruht auf einer angeborenen numerischen Chromosomenaberration mit der Karyotypformel 47, XXY. Die numerischen Aberrationen entstehen durch sog. Non-Disjunction entweder in den meiotischen Teilungen während der Keimzellenentwicklung oder in frühembryonalen mitotischen Zellteilungen. Bei diesen Patienten treten Androgenmangelsymptome auf. Man stellt histologisch eine fehlende Spermatogenese und im Ejakulat eine Azoospermie fest.

3. Material und Methoden

3.1. Material/Gewebe

3.1.1. Humane Hodenbiopsien

Die menschlichen Hodenbiopsate wurden an den Urologischen Kliniken Giessen und Münster zu diagnostischen Zwecken entnommen und zur histologischen Beurteilung an das Institut für Veterinär-Anatomie, Histologie und Embryologie Giessen (Prof. Dr. M. Bergmann) weitergeleitet. Das Restgewebe wurde mit Zustimmung der Ethikkommission für wissenschaftliche Untersuchungen verwendet.

Das Material für die vorliegende Arbeit stammte von 79 infertilen Patienten (Alter 23–54 Jahre). 10 Proben kamen von Patienten mit einer obstruktiven Azoospermie nach Vasektomie. Histologisch zeigten sie qualitativ und quantitativ normale Spermatogenese (Score 10). Sie dienten in dieser Studie als Kontrolle (Gruppe 1). 55 Proben stammten von infertilen Patienten, die sich einer testikulären Spermienextraktion (TESE) unterzogen haben. Diese Patientengruppe wurde in zwei Gruppen unterteilt. Gruppe 2 bestand aus 28 Patienten mit qualitativ normaler Spermatogenese (Score 10-8), Gruppe 3 aus 27 Patienten mit einer gestörten Spermatogenese („Bunte Atrophie“) (Score 7-1). Die restlichen 14 Hodenbiopsien zeigten histologisch einen fokalen oder totalen Arrest der Spermatogenese auf der Stufe von runden Spermatozyten. Auch hier erfolgte eine Unterteilung in zwei Gruppen. Gruppe 4 bestand aus 7 Proben mit fokalem Arrest (Score 7-1) und Gruppe 5 aus 7 Proben mit totalem Arrest (Score 0). Die Einteilung der Patienten ist in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Einteilung der Patienten.

Gruppe	Proben Zahl	Alter (Jahre)		Histologie		Score
		Mittelwert	Min-Max	Normale Spermatogenese	Gestörte Spermatogenese	
1	10	34.4	28-42	Quantitativ	-	10
2	28	35.2	28-48	Qualitativ		10-8
3	27	33.7	23-54	-	Bunte Atrophie	7-1
4	7	36.5	25-76	-	Fokaler Arrest auf der Stufe von runden Spermatiden	7-1
5	7	30.5	26-35	-	Totaler Arrest auf der Stufe von runden Spermatiden	0

3.1.2. Versuchstiere

Es wurden ausschließlich geschlechtsreife männliche Balb C Mäuse (Harlan-Winkelmann, Borcheln) im Alter von 9 Wochen verwendet. Die Tiere hatten zu Versuchbeginn etwa das gleiche Gewicht (24 g–26 g).

Die Tiere wurden auf 5 Gruppen zu je 5 Tieren aufgeteilt und über einen Zeitraum von 35 Tagen mit verschiedenen Konzentrationen TSA behandelt: 0.8 mg/kg (Gruppe 2), 1.6 mg/kg (Gruppe 3), 2.4 mg/kg (Gruppe 4) und 3.2 mg/kg (Gruppe 5). Der Kontrollgruppe wurde nur das TSA-Lösungsmittel (DMSO in PBS-Puffer) injiziert (Gruppe 1).

Für den Fertilisierungsversuch standen 20 geschlechtsreife weibliche Tiere zur Verfügung.

3.2. Methoden

3.2.1. Tierversuch

Der Tierversuch gliederte sich in zwei Teile.

Versuch I: Bestimmung der Minimal-Konzentration von TSA, um die Bildung von Spermatozoen zu unterdrücken. Nach histologischer Beurteilung der Hodenproben sollte die dafür geeignete Konzentration ausgewählt werden.

Versuch II: Paarungsversuch (Fertilisierungsversuch) und Überprüfung der Reversibilität der Wirkung von TSA. In diesem Versuch wurden die Mäuse mit der ausgewählten TSA-Konzentration (siehe Versuch I) täglich 35 Tage lang gespritzt. Um die Reversibilität zu überprüfen, wurden die Mäuse anschließend 35 Tage ohne TSA Behandlung gehalten. Vor und nach der Behandlung, sowie nach der Erholungszeit wurden Paarungsversuche durchgeführt.

Die Mäuse (männliche und weibliche) wurden wie folgt aufgeteilt:

Tabelle 3: Aufteilung der Versuchsgruppen.

	männlich	weiblich
Versuch I	25 (5 Gruppen á 5 Mäuse)	-
Versuch II	10 (2 Gruppen á 5 Mäuse)	10 (2 Gruppen á 5 Mäuse)

3.2.1.1. Tierhaltung

Die Mäuse wurden in keimarmer Umgebung gehalten. Die Raumtemperatur betrug 24 °C, die relative Luftfeuchtigkeit 60-70 %. Die Tiere unterlagen einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus. Futter und Wasser standen ihnen „ad libitum“ zur Verfügung. Alle Arbeiten wurden in Schutzkleidung durchgeführt.

3.2.1.2. Tierbehandlung

TSA wurde in DMSO aufgelöst, aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Von dieser Stammlösung wurden täglich kurz vor Gebrauch die entsprechenden Verdünnungen hergestellt (Abb. 8) und zur selben Zeit verabreicht.

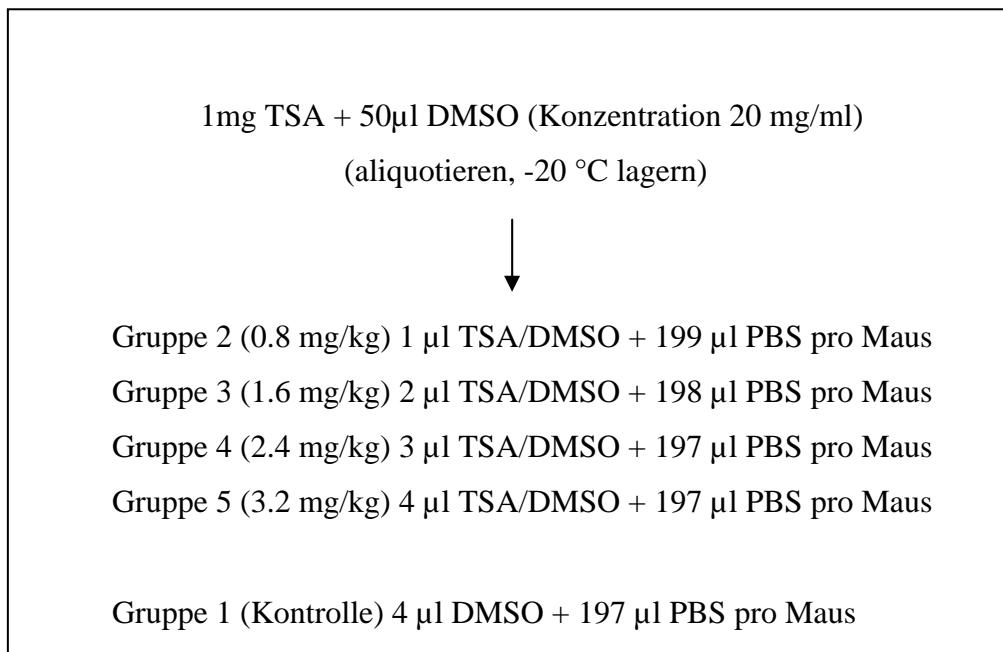


Abbildung 8: Vorbereitung der TSA-Verdünnungen.

Versuch I

Die Applikation von TSA erfolgte durch tägliche subkutane Injektion über einen Zeitraum von 35 Tagen. Dies entspricht einem Keimepithelzyklus (RUSSEL et al., 1990). Es wurden vier Testgruppen ($n=5$) mit den Konzentrationen 0.8 mg/kg, 1.6 mg/kg, 2.4 mg/kg und 3.2 mg/kg TSA in 0.2 ml PBS pro Maus und eine Kontrollgruppe ($n=5$) mit DMSO in 0.2 ml PBS pro Maus behandelt.

Nach 35 Tagen wurden die Tiere euthanasiert und anschließend Hoden, Nebenhoden und andere Organe (Prostata, akzessorische Geschlechtsdrüsen, Nieren, Milz, Leber, Darm, Pankreas) entnommen (Abb. 9).

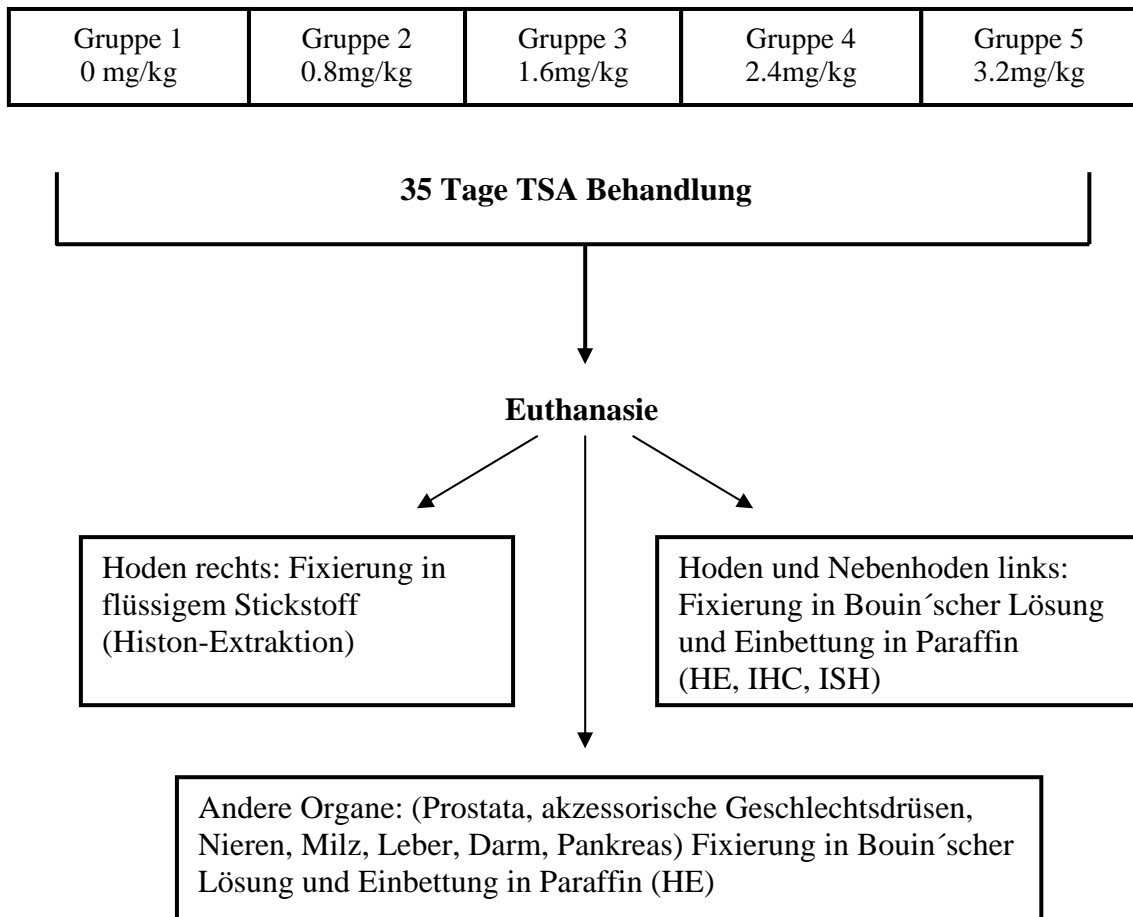


Abbildung 9: Aufbau des I. Versuches. HE: Hämatoxylin-Eosin Färbung, IHC: Immunhistochemie, ISH: in situ Hybridisierung

Nach dem I. Versuch wurden die HE (Hämatoxylin-Eosin) gefärbten Schnitte der Hoden und Nebenhoden histologisch beurteilt.

Versuch II

Nach histologischer Beurteilung der Hoden von Versuch I wurden die Konzentrationen 2.4 mg/kg und 3.2 mg/kg als optimal für unsere Fragestellung ausgewählt. Die Konzentrationen 0.8 mg/kg und 1.6 mg/kg hatten einen nicht ausreichenden Effekt zur Unterdrückung der Spermatogenese.

Es wurden zwei Gruppen (n=5) mit den Konzentrationen 2.4 mg/kg und 3.2 mg/kg TSA in 0.2 ml PBS pro Maus unter denselben Bedingungen wie in Versuch I behandelt.

In diesem Experiment wurden vier Paarungsversuche durchgeführt:

- I) vor TSA Applikation (Tag 0), Überprüfung der Ausgangsfertilität der Männchen,
- II) nach TSA Behandlung (Tag 35), Entfernung der restlichen Spermien aus Nebenhoden,
- III) nach TSA Behandlung (Tag 36), Überprüfung der Fertilität der Männchen vor Erholungsphase,
- IV) ohne TSA Behandlung (Tag 71), Überprüfung der Fertilität der Männchen nach Erholungsphase.

Bei den weiblichen Mäusen wurde der Geschlechtszyklus stimuliert und synchronisiert, indem Weibchen und Männchen über Nacht im selben Raum gehalten wurden („Bockgeruch“). Am nächsten Tag wurden die weiblichen Mäuse mit einem Marker auf dem Rücken gekennzeichnet und mit den Männchen über Nacht verpaart. Am nächsten Tag wurden die Weibchen in separate Käfige überführt.

Die Behandlung der Männchen mit TSA begann sofort nach Absetzung von den Weibchen unter denselben Bedingungen wie in Versuch I. Nach 35 Tagen TSA Behandlung wurden die Mäuse zwei Mal verpaart. Die Histologie der Hoden aus Versuch I zeigte nach der Behandlung in den Nebenhoden viele Spermien. Um falsch-positive Ergebnisse des Paarungsversuches auszuschließen, wurden deshalb die männlichen Mäuse zuerst mit einer anderen Weibchengruppe (Gruppe B) verpaart. Für alle Paarungsversuche wurde immer dieselbe Weibchengruppe A genommen. Nach dem dritten Paarungsversuch folgte eine 35-tägige Erholungsphase, in der die Mäuse kein TSA erhielten. Im Anschluss wurde der vierte Paarungsversuch durchgeführt und die männliche Mäuse euthanasiert. Ihre Hoden wurden zur Untersuchung entnommen. Die weiblichen Tiere wurden über drei Wochen (Trächtigkeitsdauer) in separaten Käfigen gehalten. Die Weibchen und ihre Nachkommen wurden gemäß Tierversuchsantrag Nr. GI/1 – Nr.22/2001 (II 25.3 – 19 c 20-15 (1)) nach der Geburt euthanasiert (Abb.10).

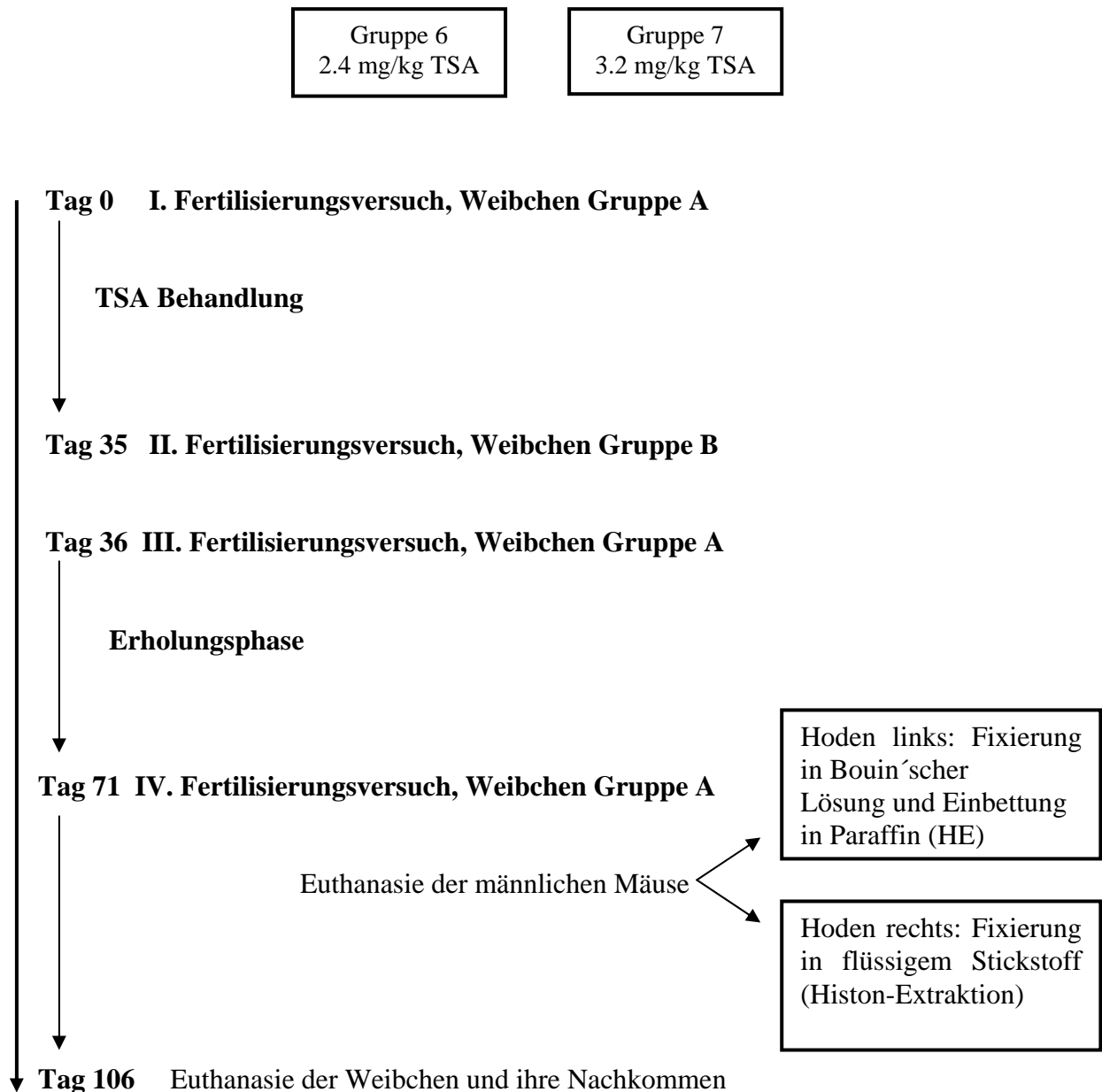


Abbildung 10: Aufbau des II. Versuches.

3.2.1.3. Euthanasie der Tiere

Die Euthanasie der Tiere erfolgte durch Narkose-Überdosierung (Xylazin/Ketamin, i.p.). Die tote Maus wurde zuerst gewogen, dann mit Stecknadeln auf einer Korkunterlage fixiert. Der rechte Hoden wurde sofort entnommen, gewogen, in sterile beschriftete 2 ml Tubes übertragen und in flüssigen Stickstoff überführt. Nach Eröffnung der Brusthöhle wurde das Brustbein mit den Blutgefäßen abgeklemmt und das Herz mit einer Pinzette

fixiert. Um den Kreislauf zu öffnen, wurde die rechte Vorkammer mit einer feinen Schere eingeschnitten. Danach wurde 0.9%ige Kochsalzlösung mit einer Nadel durch die linke Kammer und die Aorta in den Kreislauf eingeführt. Sobald der Ausfluss aus der rechten Vorkammer klar war (d.h. ohne Blutspuren), wurde Kochsalzlösung durch Bouin'sche Lösung ersetzt. Anschließend wurden der linke Hoden und die anderen Organe entnommen, gewogen (nur Hoden) und in ein Gefäß mit Bouin'scher Lösung übertragen.

3.2.2. Paraffinmaterial

Fixierung der Proben

Nach Entnahme der Hodenbiopate wurde das Gewebe in Bouin'scher Lösung fixiert. Bei dieser Lösung handelt es sich um ein Gemisch aus gesättigter, wässriger Pikrinsäure, 35 %igem Formalin und Eisessig.

Ansatz der Bouin'schen Lösung:

Pikrinsäurelösung	15 ml
Formalin 35%	5 ml
Eisessig (kurz vor Gebrauch zusetzen)	1 ml

Die Fixierzeit der Proben betrug 24 h. Für eine bessere Penetration von Bouin'scher Lösung wurden die Maushoden einmal quer geschnitten. Nach dem Fixieren wurde das Gewebe 7 Tage lang täglich mit frischem 70%igem Ethanol bis zur kompletten Entfernung der gelben Farbe gespült. Danach wurden alle Proben in Plastik-Biopsiekorbchen verbracht und mit dem Entwässerungsgerät entwässert.

Entwässerung der Proben

Nach Fixierung in Bouin'scher Lösung wurden die Proben 24 Stunden lang über eine Alkoholreihe von aufsteigender Konzentration entwässert, mit Xylol fixiert und anschließend mit Paraffin durchtränkt. Die Proben durchliefen das Programm mit folgenden Stationen:

- 80%iges Ethanol für 2h
- 96 %iges Ethanol für 2h
- Abs. (absolutes) Ethanol für 3h
- Abs. Ethanol für 3h

- Abs. Ethanol für 3h
- Xylol für 1h
- Xylol für 45 Minuten
- Xylol für 45 Minuten
- Paraffin 59 °C für 40 Minuten
- Paraffin 59 °C für 40 Minuten
- Paraffin 59 °C für 40 Minuten

Einbettung der Proben

Das Einbetten der Proben erfolgte in einem Einbettgerät, in welchem die Proben in 3 cm x 2 cm x 2 cm große Stahlförmchen verbracht und mit 60 °C heißen Paraffin übergossen wurden. Danach wurden sie zur Härtung auf die Kühlplatte des Geräts gelegt.

Beschichtung der Objektträger (OT)

Für die Herstellung von Paraffinschnitten wurden die Glas-OT zum Erreichen einer besseren Haftung der Schnitte mit APTEX nach folgendem Protokoll beschichtet:

- OT in Küvettenhalter einsortieren
- 1x in Aqua bidest. spülen, trocken lassen
- 1x in Aceton spülen, abdampfen lassen
- OT für 5 Minuten in 2%iges APTEX (4 ml APTEX auf 196 ml Aceton) stellen
- OT für 2 Minuten in frisches Leitungswasser stellen
- OT für 2 Minuten unter fließendem Leitungswasser spülen
- OT für 2 Minuten in Aqua bidest. stellen
- OT über Nacht bei 37 °C in Trockenschrank stellen

Mikrotomie

Von den in Paraffin eingebetteten Proben wurden mit dem Schlittenmikrotom ca. 5µm dicke Schnitte angefertigt und in einem 37 °C warmen, mit Aqua dest. gefüllten Wasserbad gestreckt. Anschließend wurden jeweils zwei Schnitte auf einen OT gezogen und über Nacht in einen Trockenschrank bei 37 °C gestellt.

Hämatoxilin-Eosin (HE) Färbung

Zur Beurteilung der Gewebeproben wurden HE-Präparate angefertigt. Die Zellkerne wurden von basischem Hämalaun blau angefärbt, alle anderen Strukturen erschienen in verschiedenen Farbabstufungen durch Eosin rot.

OT in Küvettenhalter einsortieren und nach folgendem Protokoll bearbeiten:

- 3 x 10 Minuten Xylol
- 2 x 5 Minuten Abs. Ethanol
- 1 x 5 Minuten 96%iges Ethanol
- 1 x 5 Minuten 80%iges Ethanol
- 1 x 5 Minuten 70%iges Ethanol
- 1 x 5 Minuten 50%iges Ethanol
- 1 x 5 Minuten Aqua dest.
- 7 Minuten Hämatoxylin nach Mayer
- 15 Minuten in fließendem Leitungswasser bläuen
- 7 Minuten in 1%iges Eosin
- 1 x kurz in Leitungswasser spülen
- kurz in 70%iges Ethanol
- kurz in 80%iges Ethanol
- 1 x 2 Minuten 80%iges Ethanol
- 1 x 2 Minuten 96%iges Ethanol
- 3 x 2 Minuten Abs. Ethanol
- 3 x 10 Minuten Xylol

Eindecken der Schnitte mit Glycerin-Gelatine

3.2.3. Immunhistochemie

Für den immunhistochemischen Nachweis von hyperacetyliertem Histon H4 und PCNA wurde die ABC (Avidin-Biotin-Komplex)-Methode angewandt (Abb. 11). Diese Färbmethode basiert auf der hohen Affinität von Avidin für Biotin.

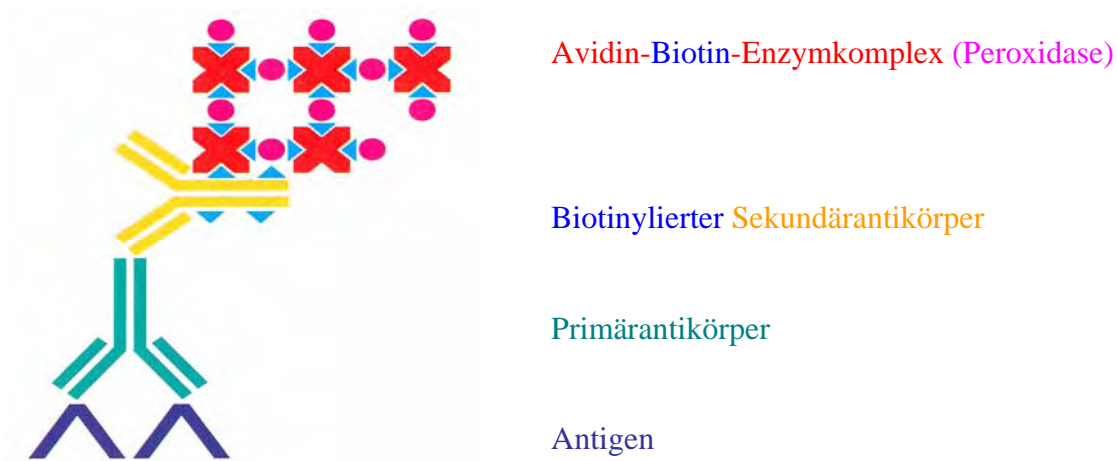


Abbildung 11: Avidin-Biotin-Komplex Methode. Bei der ABC-Methode reagiert der Avidin-Biotin-Enzymkomplex mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (modifiziert nach Boenisch, 1989).

Lösungen ansetzen:

- Waschpuffer: Tris-HCl-Puffer

10 x Tris-HCl-Puffer-Stammlösung

Tris-HCl 121.1 g

NaCl 58.4 g

in 800 ml Aqua bidest. lösen

mit konz. HCl auf pH 7.6 einstellen

mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen

-1 x Tris-HCl-Puffer

100 ml 10 x Tris-HCl-Puffer (pH 7.6)

1 ml Tween 20

mit Aqua bidest auf 1 l auffüllen und lösen

- BSA-Blockpuffer: 5%ige BSA-Lösung (5g BSA in 100 ml 1 x Tris-HCl-Puffer lösen) + 3%iges Ziegen Serum

- Proteinase K (Konzentration 20 µg/ml): 20 µl Proteinase K Stammlösung (Konzentration 4000 µg/ml: 10 mg Proteinase K + 1 ml PBS Puffer, aliquotieren) in 10 ml 1 x Tris-HCl-Puffer lösen, vor dem Gebrauch frisch ansetzen

Vorbereitung am Vortag:

Paraffinschnitte in Küvettenhalter einsortieren und in Trockenschrank (60 °C) stellen

Xylol in Trockenschrank (60 °C) stellen

Tag 1:

Gewebevorbehandlung - Entparaffinieren und Rehydrieren der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe

- 1 x 5 Minuten Xylol (60 °C)
- 2 x 5 Minuten Xylol (RT)
- 2 x 5 Minuten 96%iges Ethanol
- 1 x 5 Minuten 80%iges Ethanol
- 1 x 5 Minuten 70%iges Ethanol
- 1 x 5 Minuten Aqua bidest.
- OT in Standküvette übertragen
- 1 x 5 Minuten in Waschpuffer (Schüttler) waschen

Demaskierung der Antikörper-Bindungsstellen mit Proteinase K

- Schnitte mit Dako-Pen umkreisen
- 25 Minuten bei 37 °C mit Proteinase K (20 µg/ml) (in feuchter Kammer) inkubieren
- die Reaktion in kaltem 1 x Tris-HCl-Puffer abstoppen
- 2 x 5 Minuten in Waschpuffer (Schüttler) waschen

Blockierung endogener Peroxidase

Methanol/ H₂O₂ frisch ansetzen: 45 ml Methanol + 5 ml 30%iges H₂O₂

- 30 Minuten in Methanol/H₂O₂ bei Raumtemperatur (RT) (Schüttler) inkubieren

- 3 x 5 Minuten in Waschpuffer (Schüttler) waschen

Blockierung unspezifischer Bindungsstellen

- 60 Minuten mit BSA-Blockpuffer in feuchter Kammer bei RT inkubieren

Inkubation mit primärem Antikörper

Für alle Antikörper wurden immunhistochemische Färbungen getrennt durchgeführt (Einzelfärbung).

Primärantikörperlösung herstellen:

- Antikörper: polyklonales Kaninchenantiserum gegen hyperacetyliertes Histon H4 (penta) (Biomol, Hamburg); Verdünnung 1:3000 mit Blockpuffer
- Antikörper: polyklonales Kaninchenantiserum gegen PCNA (Santa Cruz, Heidelberg); Verdünnung 1:100 mit Blockpuffer
- über Nacht bei 4 °C in feuchter Kammer inkubieren

Auf den jeweils mitgeführten Kontrollschnitten wurde der Primärantikörper durch Blockpuffer ersetzt.

Tag 2:

Inkubation mit sekundärem Antikörper

Sekundärantikörperlösung herstellen: biotinylierte Ziege-anti-Kaninchen Immunoglobuline (DAKO, Hamburg); Verdünnung 1:200 mit Waschpuffer

- 3 x 5 Minuten in Waschpuffer (Schüttler) waschen
- 30 Minuten in feuchter Kammer bei RT inkubieren

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

ABC-Lösung ansetzen: (30 Minuten vor Gebrauch) 1 Tropfen Lösung A + 1 Tropfen Lösung B in 2.5 ml Waschpuffer lösen

- 3 x 5 Minuten in Waschpuffer (Schüttler) waschen
- 30 Minuten mit ABC-Lösung in feuchter Kammer für bei RT inkubieren

Farbreaktion

- 3 x 5 Minuten in Waschpuffer (Schüttler) waschen
- 3 Minuten mit Stable-DAB (Research Genetics, Karlsruhe) in feuchter Kammer für bei RT entwickeln
- die Reaktion mit kaltem Waschpuffer abstoppen

Gegenfärben

- 1 x 5 Minuten Aqua dest. waschen
- 15 Sekunden mit Hämatoxylin inkubieren
- 15 Minuten in fließendem Leitungswasser bläuen

Eindecken

- die Schnitte mit Glycerin-Gelatine eindecken

3.2.4. In situ Hybridisierung

Diese Methode verwendet Digoxigenin-markierte cRNA-Sonden, an die komplementäre mRNA in der Zelle binden. Der entstandene Komplex wird mit einem Anti-Digoxigenin-Antikörper detektiert und mit Hilfe einer Farbreaktion visualisiert. Durch dieses Verfahren können spezifische mRNA Spezies in situ nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurden die zu Prm 1 und Prm 2 mRNA komplementären „antisense“-Sonden hergestellt, die Prm 1 und Prm 2 mRNA in der Zelle detektieren. Die „sense“-Sonden haben eine zu Prm 1 und Prm 2 mRNA identische Sequenz und dienen als Negativkontrolle.

Für die Sondenherstellung wurde mRNA von einer humanem Hodenprobe mit normaler Spermatogenese benutzt, mit TRIzol® Reagent extrahiert und mit DNase behandelt. Ein 153 bp-langes Prm 1 und 294 bp-langes Prm 2 mRNA-Fragment wurde mittels RT-PCR amplifiziert. Für diese Verfahren wurden folgende Primer verwendet:

Prm 1: GenBank accession number Y00443

Forward: 5'-GCCAGGTACAGATGCTGTCGCAG-3' (Exon 1, bp 4-26)

Reverse: 5'-TTAGTGTCTTCTACATCTCGGTCTG-3' (Exon 2, bp 132-156)

Prm 2: GenBank accession number X07862

Forward: 5'-GTGAGGAGCCTGAGCGAACGC-3' (Exon 1, bp 16-36)

Reverse: 5'-TTAGTGCCTTCTGCATGTTCTCTTC-3' (Exon 2, bp 285-309)

Die PCR-Fragmente wurden in einer 2%igen Agarose-Gelelektrophorese separiert, unter UV-Licht aus dem Gel geschnitten und mit einem DNA-Reinigungssystem aufgereinigt.

Die gewonnenen Prm1 und Prm2-Fragmente wurden kloniert: erst in ein Plasmid (pGEM-T Vektor) (Abb. 14) inseriert und anschließend in einem Bakterium (Escherichia coli, Eco XL-1 Blue) vervielfältigt.

Nach der Klonierung folgte die Separierung der Plasmide aus dem Bakterium mit Hilfe des QIAprep Spin Plasmid Kits nach Anleitung des Herstellers. Um nachzuprüfen, ob die Klonierung erfolgreich und spezifisch war, trennt man das Prm1 und Prm2-Insert von dem Plasmid mit zwei Restriktionsenzymen (Not-I, Nco-I), deren spezifische Schnittstellen die Insertionsstelle abgrenzen. Die Prm 1 und Prm 2-Inserts werden in einer 2%igen Agarose-Gelelektrophorese unter UV-Licht nachgewiesen.

Der nächste Schritt beinhaltet die Linearisierung der Plasmide jeweils mit Not-I und Nco-I. Es entstehen zwei „lineare“ Plasmide mit endständigen Inserts. Die Inserts werden dann durch Hinzufügen von zwei RNA-Polymerasen (T7 und SP-6) in „antisense“- bzw. „sense“-Richtung transkribiert, deren spezifische Initiationsstellen und Promotoren sich auf dem Plasmid befinden (Abb. 13).

Die Identität der Prm 1- und Prm 2-Inserts wurde durch Sequenzierung geprüft und bestätigt (Qiagen Sequenzier Service).

Die einzelnen Arbeitsschritte der Sondenherstellung, sowie der in situ Hybridisierung sind chronologisch aufgeführt.

3.2.4.1. Herstellung der Sonden

RNA-Extraktion mit TRIzol® Reagenz:

Lösungen ansetzen:

- DEPC-behandeltes Wasser: 2 l Aqua bidest. + 2 ml Diethylpyrocarbonat, kräftig schütteln; für 1 h bei 37 °C in den Brutschrank stellen, autoklavieren
- 0.2 N HCl: 5.2 ml 25%ige HCl + 200 ml DEPC-behandeltes Wasser

- 100 mg Gewebe abwiegen
- Gefriermaterial mit 1ml TRIzol® Reagent homogenisieren
- 5 Minuten bei RT stehen lassen

- 200 µl Chloroform zugeben, gut mischen
- 5 Minuten bei RT stehen lassen
- 15 Minuten bei 4 °C mit 12.000 x g zentrifugieren

Nach Zentrifugation sind drei Phasen zu erkennen: die obere wässrige ist farblos (RNA/DNA), die mittlere Phase ist weiß (Interphase) und die untere Phase ist rot, enthält Proteine (Abb. 12).

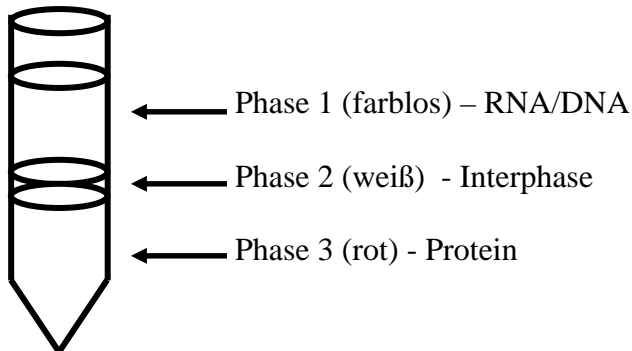


Abbildung 12: Phasentrennung nach Zentrifugation.

- Phase 1 vorsichtig abpipettieren und in neues Eppendorf-Tube überführen (Verunreinigung durch Interphase vermeiden!)
- Phasen 2 + 3 bis zur weiteren Verarbeitung im Kühlschrank lagern
- ca. 500 µl Isopropanol (-20 °C) zu Phase 1 pipettieren und mischen
- 30 Minuten bei -20 °C stehen lassen und anschließend mischen
- 10 Minuten bei 4 °C mit 12.000 x g zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet mit 1 ml 70%igem Ethanol in DEPC-behandeltem Wasser (-20 °C) lösen
- 10 Minuten auf Eis stellen und anschließend mischen
- diesen Schritt (★) 1 x wiederholen
- 10 Minuten bei 4 °C mit 12.000 x g zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet ca. 20 - 30 Minuten in Brutschrank bei 37 °C trocknen
- Pellet in Wasserbad bei 70 °C in 50 µl DEPC-behandeltem Wasser resuspendieren

Lagerung der RNA in Flüssigstickstoff

Konzentrationsbestimmung der RNA

Für die Bestimmung der RNA-Konzentration werden UVette® Einmalküvetten verwendet.
Für jede Probenwertmessung wurde der Leerwert bestimmt.

Leerwertbestimmung: 69 µl sterilen 0.1M Tris-HCl-Puffer in UVette® pipettieren und messen

Probenwertbestimmung: 1 µl RNA in gleiche UVette® pipettieren und durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette gut mischen und messen

DNase Behandlung der RNA-Extrakte

-10 x DNase I Puffer ansetzen:

Tris-HCl	1.2 mg
KCl	3.7 g
MgCl ₂	0.3 g

in 100 ml DEPC-behandeltem Wasser lösen

aliquotieren, bei -20 °C lagern

20 µl Ansatz:

x µl RNA (ca. 15 µg)

3 µl DNase I

2 µl 10 x DNase I Puffer

x µl DEPC-behandeltes Wasser (Differenz zu 20 µl)

- 30 Minuten im Wasserbad bei 37 °C inkubieren
- 10 Minuten im Wasserbad bei 72 °C inaktivieren

RT-PCR, Erste-Strang-Synthese (reverse transcription)

20 µl Ansatz:

x µl DEPC-behandeltes Wasser (Differenz zu 12 µl)

1 µl Oligo dT-15 Primer

x µl RNA (ca. 8 µg)

- 10 Minuten im Wasserbad bei 70 °C inkubieren
- 3 Minuten im Eiswasser inkubieren

4 µl 5 x „first strand buffer“ (Gibco BRL, Eggenstein)

2 µl 0,1 M Dithiothreitol (DTT)

1 µl 10 mM dNTP (aus: dATP, dCTP, dGTP, dUTP)

- 1 Minute in Wasserbad bei 37 °C inkubieren

1 µl Superscript II Reverse Transkriptase; (als Kontrolle Reverse Transkriptase durch DEPC-behandeltes Wasser ersetzen)

- 1 h im Wasserbad bei 37 °C inkubieren

Lagerung bei -20 °C

Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction - PCR)

50 µl Ansatz:

38.5 µl DEPC-behandeltes Wasser

5 µl 10x PCR-Puffer

2 µl 50 mM MgCl₂-Lösung

1 µl 10 mM dNTP

1 µl 5´ Forward-Primer (10 pmol)

1 µl 3´ Reverse-Primer (10 pmol)

1 µl cDNA

0.5 µl Taq DNA-Polymerase

Im T3-Thermocycler wurde folgendes Programm erstellt:

Einstellung der Deckelheizung auf 104 °C

1. Schritt: 94 °C, 2 Minuten, Denaturierung
2. Schritt: 94 °C, 1 Minute, Denaturierung
3. Schritt: 55 °C, 1 Minute, Annealing (primerspezifisch)
4. Schritt: 72°C, 1 Minute, Amplifikation
5. Schritt: 72 °C, 8 Minuten, Verlängerung der Amplifikation

Schritte (2 - 4) 35 x wiederholen

Agarosegelelektrophorese

Laufpuffer herstellen:

- 10 x TAE: 48.4 g Tris-base, 11.4 ml Essigsäure, 20 ml 0.5 M EDTA mischen, pH 8.4 einstellen und auf 1 l mit Aqua bidest. auffüllen

- 1 x TAE: 50 ml 10 x TAE + 450 ml Aqua bidest. mischen, pH 8.4 einstellen

2%ige DNA–Agarosegele herstellen:

- 1 g 1%ige Agarose in einem Becherglas in 50 ml 1 x TAE suspendieren
- ca. 1 Minute in Mikrowelle erhitzen (bis die Lösung kocht)
- 10 µl SYBR[®]Green dazu geben (nach Abkühlung), sorgfältig mischen
- in ein 6,5 x 10,0 x 1.5 cm UV-transparentes Geltaflett gießen
- einen Kamm (Taschenschablone) mit 12 Zähnen einsetzen
- ca. 20 Minuten polymerisieren lassen

Probenvorbereitung:

Zusammensetzung des Auftragspuffers:

Bromphenolblau	0.05 g
Xylencyanol	0.05 g
Ficol 400	3 g
EDTA (0.5M)	3 ml

mit 1 x TAE Puffer auf 20 ml auffüllen, filtrieren

- 20 µl PCR-Produkt mit 4 µl Auftragspuffer mischen

Zur Bestimmung der Fragmentgröße der zu untersuchenden DNA-Proben wurde DNA-Größenstandard (100 bp DNA-Ladder) verwendet.

- 2µl DNA-Ladder mit 18 µl Aqua bidest. und 4 µl Auftragspuffer mischen
- alle Proben und DNA-Ladder in Geltaschen pipettieren

Elektrophorese

- Elektrophoresekammer mit Laufpuffer (1 x TAE) füllen (bis die Oberfläche des Gels ca. 0.5 cm mit Puffer überschichtet ist)
- Elektrophoresekammer mit Stromquelle verbinden

Elektrophorese solange durchführen, bis Farbstoffmarker etwa $\frac{3}{4}$ der Trennstrecke zurückgelegt hat

Nachweis der geelektrophoretisch getrennten DNA-Proben unter UV-Licht

Aufreinigung des PCR-Fragmentes (QIAEX II Kit) (Qiagen, Hilden)

- gewünschte Bande unter UV-Licht-Kontrolle aus dem Gel mit einem sterilen Skalpell ausschneiden
 - Gelstück in ein 1.5 ml Eppendorf Tube einwiegen
 - 3 x Volumen Puffer QX1 zu 1 x Gewicht des Gelstückes dazu geben
 - QIAEX II-Lösung resuspendieren (30 Sekunden vortexen)
 - 30 – 60 µl QIAEX II-Lösung zupipettieren, mischen
 - 10 Minuten im Wasserbad bei 50 °C inkubieren (während der Inkubation alle 2 Minuten kurz vortexen)
 - 30 Sekunden bei 16.000 x g zentrifugieren
 - Überstand verwerfen
 - 500 µl Puffer QX1 dazu geben, vortexen
 - 30 Sekunden bei 16.000 x g zentrifugieren
 - Überstand verwerfen
 - 500 µl Puffer PE dazu geben, vortexen
 - 30 Sekunden bei 16.000 x g zentrifugieren
 - Überstand verwerfen
- } ★
- diesen Schritt (★) 1 x wiederholen
 - Pellet 10 – 15 Minuten bei 37 °C trocken lassen
 - 20 µl Aqua bidest. zupipettieren, mischen
 - 5 Minuten bei RT stehen lassen
 - 30 Sekunden bei 16.000 x g zentrifugieren => DNA im Überstand

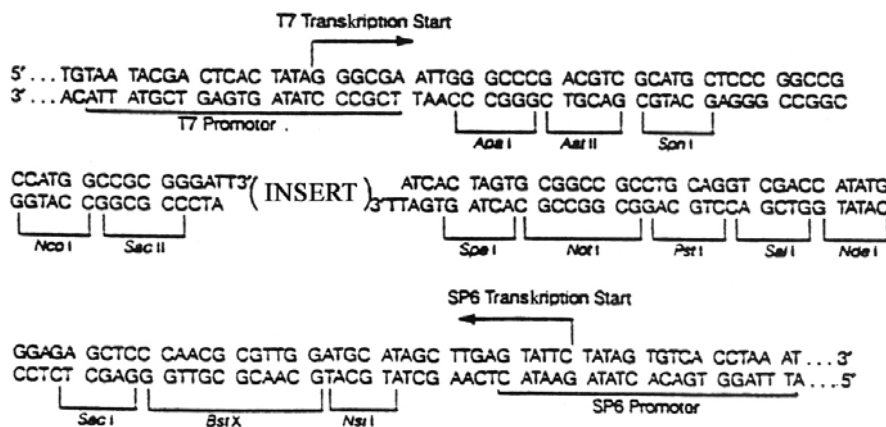
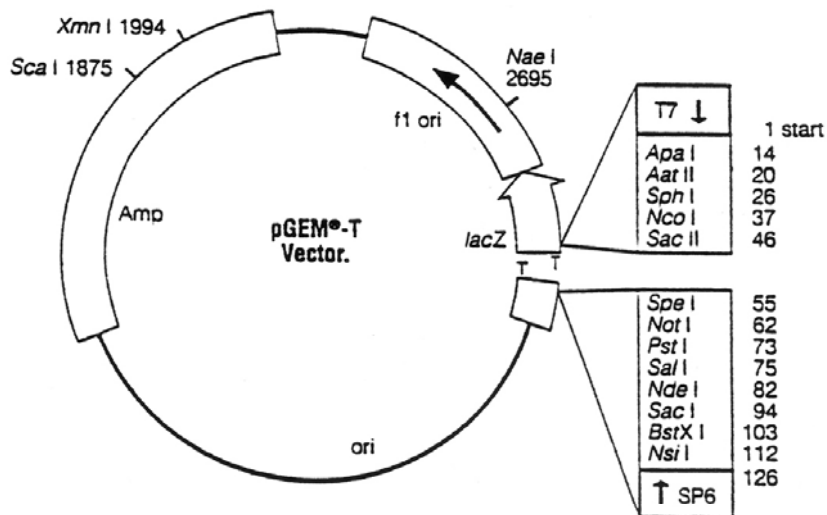


Abbildung 13: pGEM[®]-T Vector (Promega, Mannheim).

Klonierung

Lösungen ansetzen:

- LB-Medium: 25 Kapseln LB-Medium auf 1 l Aqua bidest., autoklavieren, im Kühlschrank aufbewahren
- LB-Agar-Medium: 40 Kapseln LB-Agar-Medium auf 1 l Aqua bidest., autoklavieren, im Kühlschrank aufbewahren

Herstellung kompetenter Zellen (ECO XL1-Blue)

- 2 ml LB-Medium in steriles Reagenzglas geben
- ECO XL1-Blue (Stratagene) Bakterien mit einer Öse dazu geben
- über Nacht bei 37 °C auf Schüttler inkubieren

Am nächsten Tag:

- 19.5 ml LB-Medium bei 37 °C vorwärmen
- 0.5 ml Bakterien (über Nacht inkubierten) dazu geben
- 1-2 h bei 37 °C auf Schüttler inkubieren
- 30 Minuten auf Eiswasser inkubieren
- 5 Minuten bei 4 °C und 6.000 x g zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet mit 20 ml CaCl₂ 50mM mischen
- 30-60 Minuten auf Eis stellen und häufig mischen
- Zentrifugieren 5 Minuten bei 4 °C und 6.000 x g
- Überstand verwerfen
- Pellet in 2-3 ml CaCl₂ resuspendieren => 20 ml kompetente Zellen

Ligation von pGEM-T Vektor (Promega, Mannheim) und Insert (PCR-Produkt)

Ansatz:

5 µl 2 x Ligase-Puffer

1 µl pGEM-T Vektor

3 µl Insert

1 µl T4 DNA-Ligase

- bei 4 °C über Nacht in Wasserbad inkubieren=> 10 µl Ligationsprodukt

Transformation des Plasmids (mit Insert)

- Ligationsprodukt (10 µl) mit 200 µl kompetenten Zellen mischen
- 30 Minuten auf Eis stehen lassen
- 2 Minuten bei 42 °C im Wasserbad inkubieren
- 2 Minuten im Eiswasser inkubieren
- 300 µl LB-Medium zugeben
- 30 Minuten bei 37 °C inkubieren

Während der Inkubation-Vorbereitung der Platten:

- LB-Agar-Medium in Schnellkochtopf 10 Minuten kochen
- 1-2 Stunden bei 60 °C im Wasserbad inkubieren
- 30 µg/ml Tetrazyklin und 100 mg/ml Ampicillin zugeben und lösen
- 30 ml pro Platte gießen und lassen bis das Medium fest wird

- Platten 15 – 30 Minuten bei 37 °C inkubieren
- 40 µl X-Gal (20 mg/ml in Dimethylformamid) pro Platte auftragen und einziehen lassen
- 40 µl von IPTG: (200 mg/ml in Aqua bidest.) pro Platte auftragen und einziehen lassen

Auftragen von transformierten ECO XL-1 Blue auf LB-Agar-Tet-Amp-XGal-IPTG Platten

- ca. 150 µl transformierte ECO XL-1 Blue mit Trigalski-Spatel auf Platten verteilen
- bei 37 °C über Nacht inkubieren (Deckel nach unten, damit kein Kondenswasser auf den Agar tropft)

Auswertung der Platten

- weiße Kolonien (durch Insertion des Plasmids verlieren die Kolonien ihre blaue Farbe) ernten
- in steriles Reagenzglas mit 5 ml LB Medium + 500 µl Ampicillin geben
- bei 37 °C über Nacht auf Schüttler inkubieren

Plasmid-Extraktion (QIAprep Spin Plasmid Kit) (Qiagen, Hilden)

- 5 ml über Nacht - Kultur 2 Minuten bei 4 °C und 6.000 x g zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet in 250 µl Puffer 1 resuspendieren (mischen)
- 250 µl Puffer 2 zugeben, 3-6 x kippen
- 350 µl N3-Puffer zugeben, 3-6 x kippen
- 10 Minuten bei 4 °C und 30.000 x g zentrifugieren => Plasmid ist im Überstand
- Überstand in Spin Columns geben
- 1 Minute bei 4 °C und 16.000 x g zentrifugieren
- Durchfluss verwerfen
- 750 µl PE-Puffer auf Sieb geben
- 1 Minute bei 4 °C und 16.000 x g zentrifugieren
- Durchfluss verwerfen
- 1 Minute bei 4 °C und 16.000 x g zentrifugieren
- Spin Columns auf neue 1.5 ml Tubes setzen
- 50µl EB-Puffer (oder Aqua bidest., pH 7.0–8.5) auf Sieb geben

- 1 Minute bei RT stehen lassen
- 1 Minute bei 4 °C und 16.000 x g zentrifugieren => Plasmid in Durchfluss

Trennung der Prm 1 und Prm 2-Inserte von dem Plasmid mit Hilfe von Not-I und Nco-I

Spaltung des Plasmid mit Not-1 und Nco-1 (Doppelverdau)

Ansatz:

9 µl Aqua bidest.

1 µl 100 x BSA-Lösung

2 µl Restriktionspuffer für Not-I und Nco-I (Puffer 3)

5 µl Plasmid

0.5 µl Not-I

0.5 µl Nco-I

- bei 37 °C über Nacht im Wasserbad inkubieren
- 20 Minuten bei 65 °C im Wasserbad inkubieren (Hitzeinaktivierung)

Nachweis des Transkriptes mittels einer 2%ige Agarose-Gelelektrophorese

Spaltung des Plasmid jeweils mit Not-I und Nco-I (Einzelverdau)

Ansatz mit Not-I:

10.5 µl Aqua bidest.

2 µl 100 x BSA-Lösung

5 µl Plasmid

2 µl Restriktionspuffer für Not-I (Puffer 3)

0.5 µl Not-I

Ansatz mit Nco-I

12.5 µl Aqua bidest.

5 µl Plasmid

2 µl Restriktionspuffer für Nco-I (Puffer 4)

0.5 µl Nco-I

- bei 37 °C über Nacht im Wasserbad inkubieren (beide Ansätze)
- 20 Minuten bei 65 °C im Wasserbad inkubieren (Hitzeinaktivierung)

Transkription in vitro-Herstellung und Markierung der „sense“ und „anti-sense“ Sonden

Ansatz:

8 µl DEPC-behandeltes Wasser

4 µl 5 x Transkriptionspuffer

2 µl 10 x Digoxigenin RNA-Labeling-Mix

2 µl 100 x DTT

2 µl linearisiertes Plasmid

2 µl RNA-Polymerase (T7 für das Not-I-geschnittene Plasmid, SP-6 für das Nco-I geschnittene Plasmid)

- 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubieren
- 0.5 µl 0,5M EDTA-Lösung zugeben
- 1.2 µl 8M Lithium-Chlorid-Lösung zugeben
- 70.7 µl kaltes (-20 °C) 100%iges Ethanol zugeben
- 1 h bei -80 °C im Gefrierschrank ausfallen lassen
- 20 Minuten bei 4 °C und 16.000 x g zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- 200 µl gekühltes 70%iges Ethanol zugeben
- 15 Minuten bei 4 °C und 16.000 x g zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet bei 37 °C trocknen
- 50 µl DEPC-behandeltes Wasser zugeben
- 10 Minuten bei 70 °C im Wasserbad resuspendieren

Die Sonden bei -20 °C lagern

3.2.4.2. In situ Hybridisierungs-ProtokollLösungen ansetzen:

- 0.2 N HCl: 5.2 ml 25%ige HCl + 200 ml DEPC-behandeltes Wasser

- 20 x SSC Stammlösung:.

Natriumcitrat ($C_6H_5O_7Na_3 \times 2H_2O$) 88.23g

NaCl 175.29 g

mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen

pH 7.0 einstellen

1 ml DEPC-behandeltes Wasser zugeben

bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubieren, autoklavieren

- 1 M MgCl₂- Lösung:

MgCl₂ 81.4 g

in 400 ml DEPC-behandeltem Wasser, lösen

- PBSM-Puffer: 1 Tablette PBS in 200 ml DEPC-behandeltem Wasser lösen + 1 ml 1 M MgCl₂

- 0,2%ige Glycin-Lösung:

Glycin 200 mg

in 100 ml PBSM-Puffer lösen

- 4%ige Paraformaldehydlösung:

Paraformaldehyd 25 g

in 500 ml 1 x PBSM-Puffer lösen (unter dem Abzug, auf einem Magnetrührer bei 70°C)

4 N NaOH zugeben (bis die Lösung klar wird)

mit konzentriertem HCl auf pH 7.0 einstellen

aliquotieren, bei -20 °C lagern

- 50%iges Dextransulfat:

Dextransulfat 5 g

in 10 ml DEPC-behandeltem Wasser lösen (einige Tage im Kühlschrank stehen lassen)

aliquotieren, bei -20 °C lagern

-3%iger BSA in 1 x TNMT:

BSA 3g

in 100 ml TNMT Puffer lösen

aliquotieren, bei -20 °C lagern

- Denhardt-Reagenz (BFP):

BSA	200 mg
Ficoll 400	200 mg
Polyvinylpyrolidon	200 mg

in 10 ml DEPC-behandeltem Wasser lösen
aliquotieren, bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ lagern

- 10 x TNMT-Puffer:

Tris-HCl	121.1 g
NaCl	58.4 g
MgCl ₂	4.17 g

in 1 l Aqua bidest. lösen

- 5 x NTB Puffer:

Tris-HCl	60.5 g
NaCl	29.2 g

in 1 l Aqua bidest. lösen,
pH 9.6 einstellen
1 ml DEPC-behandeltes Wasser zugeben
bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht im Brutschrank inkubieren, autoklavieren

- 1 M Levamisol:

Levamisol	2.4 g
-----------	-------

In 10 ml 1 x NTB-Puffer lösen
aliquotieren, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ lagern

- TBS-Puffer:

Tris-HCl	121.1 g
NaCl	58.4 g

in 1 l Aqua bidest. lösen
pH 7.4 einstellen

Vorbereitung am Vortag

Die Schnitte und einen Xylolbehälter getrennt voneinander bei 60 °C in Brutschrank über Nacht stehen lassen

Tag 1

Vorbereitung der Schnitte

Entparaffinieren und Rehydrieren der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe

- 5 Minuten Xylol (60) °C
- 2 x 5 Minuten Xylol (RT)
- 2 x 5 Minuten abs. Ethanol
- 1 x 5 Minuten 96%iges Ethanol
- 1 x 5 Minuten 70%iges Ethanol

Im weiteren Verlauf wurden ausschließlich sterile Behälter, steriles Besteck und sterile Lösungen verwendet, um eine RNase-Kontamination zu vermeiden. Die Sterilisation der Instrumente erfolgte bei 180 °C für 4 Stunden in einem Sterilisator. Die Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt.

- Schnitte 1 x in DEPC-behandeltem Wasser waschen
- 20 Minuten in 0.2N HCl inkubieren
- 15 Minuten bei 70 °C in 2 x SSC inkubieren
- 1 x 5 Minuten in PBSM-Puffer waschen

Demaskierung der Bindungsstellen mit Proteinase K

- 25 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer (befeuchtet mit DEPC-behandeltem Wasser) mit Proteinase K (20 µg/ml) inkubieren
- 1 x 5 Minuten in 0.2%igem Glycin abstoppen

Blockierung endogener Phosphatase

- 15 Sekunden in 20%iger Essigsäure in DEPC-behandeltem Wasser inkubieren
- 1x 5 Minuten in PBSM-Puffer waschen

Nachfixierung

- 10 Minuten in 4%iger Paraformaldehyd-Lösung inkubieren
- 1 x 5 Minuten in PBSM-Puffer waschen

- 1 h in 20%igem Glycerol in DEPC-behandeltem Wasser prähybridisieren

Vorbereitung der Sonden

Sondenmischung herstellen:

Die Konzentration der Sonden für Prm 1 und Prm 2 beträgt 1:100.

Ansatz:

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

Hybridisierungspuffer herstellen:

Ansatz.

- 52 µl DEPC-behandeltes Wasser
- 40 µl 20 x SSC
- 80 µl 50%iges Dextransulfat
- 8 µl Denhardt-Reagenz
- 200 µl deionisiertes Formamid

- Sonden-Gemisch und Hybridisierungspuffer zusammenmischen
- Sonden (getrennt Not-1 und Nco-1) auf die Schnitte geben
- 10 Minuten bei 70 °C denaturieren (Heizplatte)
- OT sofort auf einer Eisplatte abkühlen
- bei 37 °C über Nacht in einer feuchten Kammer (DEPC-behandeltes Wasser) inkubieren

Auf mitgeführten Kontrollschnitt wurde die Sonde durch Hybridisierungspuffer ersetzt.

Tag 2

Posthybridisierung

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

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

- 1 x 15 Minuten in 0.2 x SSC bei 42 °C waschen
- 1 x 5 Minuten in 0.1 x SSC bei RT waschen
- 1 x 5 Minuten in 2 x SSC bei RT waschen

Immunhistochemie (Nachweis der gebundenen DIG-markierten Sonden)

Lösungen ansetzen:

- 1 x TNMT: 100 ml 10 x TNMT in 900 ml Aqua bidest. lösen
- anti-DIG-Antikörperlösung herstellen: Verdünnung 1:500 mit TNMT-Puffer
 - 10 Minuten in 1 x TNMT-Puffer bei RT waschen
 - 1 h bei RT in 3%igem BSA in 1 x TNMT-Puffer inkubieren
 - mit anti-DIG-Antikörper in feuchter Kammer über Nacht bei 4 °C inkubieren

Tag 3

Farbreaktion

Lösungen ansetzen:

- 1 x NTB: 20 ml 5 x NTB + 5ml 1 M MgCl₂+ 75 ml Aqua bidest.
- 1 x TNMT: 100 ml 10 x TNMT + 900 ml Aqua dest.
 - 2 x 10 Minuten in 1 x TNMT-Puffer waschen
 - 5 Minuten in 1 x NTB-Puffer waschen
 - 5 Minuten in 50 ml 1 x NTB mit 250 µl 1M Levamisol
 - mit NBT-BCIP in einer feuchten Kammer im Dunkeln entwickeln
 - die Reaktion mit 1 x NBT abstoppen

Eindecken

- Schnitte mit DAKO Glycergel eindecken

3.2.5. TUNEL

Der Nachweis apoptotischer Zellen erfolgte mittels TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling)-Technik in Anlehnung an die von GAVRIELI et al. (1992) entwickelte Methode. Diese Methode beruht auf der Verlängerung von freien DNA-Enden in den Zellkernen durch das Enzym Terminale Desoxynucleotidyltransferase (TdT) und Anbau von biotinyliertem Desoxyuridin (dUTP) an diese Verlängerungen (Abb.14).

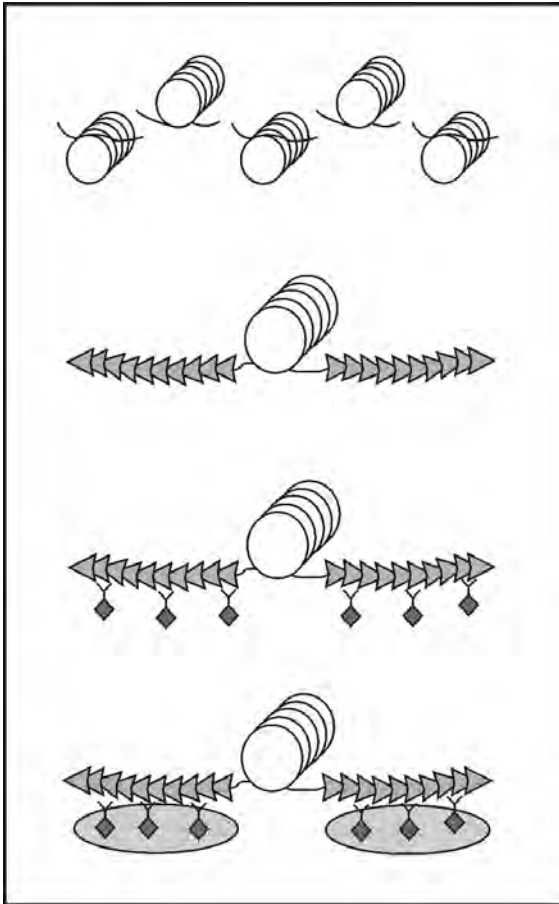


Abbildung 14: Prinzip der TUNEL-Methode

- Das Resultat der Apoptose: Nuklosome mit freien DNA-Enden.
- TdT katalysiert die Reaktion der Digoxigenin-markierten Nucleotide mit 3'OH DNA-freien Enden.
- Digoxigenin-markierte DNA Fragmente werden mit Peroxidase-konjugierten anti-Digoxigenin Antikörper verbunden.
- Entwicklung der Reaktion mit dem Peroxidasesubstrat.

Diese Methode wurde nach dem Protokoll des Herstellers (Chemicon, Hofheim) durchgeführt:

Tag 1

Lösungen ansetzen:

- PBS-Puffer: 1 Tablette PBS in 200 ml Aqua dest. lösen
- Proteinase K (20µg/ml): µl Proteinase K Stammlösung (Konzentration 4000 µg/ml: 10 mg Proteinase K + 1ml PBS Puffer, aliquotieren) in 10 ml 1 x Tris-HCl-Puffer lösen, vor dem Gebrauch frisch ansetzen
- Stopp/Wasch-Puffer: Stopp/Wasch-Puffer-Stammlösung 1 ml + 34 ml Aqua bidest.

Gewebevorbehandlung - Entparaffinieren und Rehydrieren in einer absteigenden Alkoholreihe

- 1 x 5 Minuten Xylol (60 °C)
- 2 x 5 Minuten Xylol (RT)

- 2 x 5 Minuten 96%iges Ethanol
- 1 x 5 Minuten 80%iges Ethanol
- 1 x 5 Minuten 70%iges Ethanol
- 1 x 5 Minuten Aqua bidest.
- OT in Standküvette übertragen
- 1 x 5 Minuten in PBS waschen

Demaskierung der Bindungsstellen mit Proteinase K

- Schnitte mit Dako-Pen umkreisen
- 15 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer mit Proteinase K (20 µg/ml) inkubieren
- 2 x 2 Minuten Aqua dest. waschen

Blockierung endogener Peroxidase

Puffer H₂O₂/PBS frisch ansetzen: 45 ml PBS + 5 ml 30%iges H₂O₂

- 1 x 5 Minuten in 3%igem H₂O₂ in PBS bei RT inkubieren
- 2 x 5 Minuten in PBS waschen

Inkubation mit Äquilibrierungspuffer

- 10 Sekunden mit Äquilibrierungspuffer in feuchter Kammer bei RT inkubieren
- Äquilibrierungspuffer entfernen

Inkubation mit TUNEL-Reagenz

TUNEL-Reagenz frisch ansetzen: 3 Teile Enzym und 7 Teile Reaktionspuffer mischen

- 1 h mit TUNEL-Reagenz in feuchter Kammer bei 37 °C inkubieren
- Reaktion in Stop/Wasch-Puffer abstoppen
- 10 Minuten bei RT inkubieren
- 3 x 1 Minute in PBS waschen

Anti-Digoxigenin-Konjugat auftauen und auf RT bringen

Inkubation mit Anti-Digoxigenin-Konjugat

- 30 Minuten mit Anti-Digoxigenin-Konjugat in feuchter Kammer bei RT inkubieren
- 4 x 2 Minuten in PBS waschen

Farbreaktion

- 3 Minuten mit Stable-DAB in feuchter Kammer bei RT entwickeln
- 3 x 5 Minuten mit Aqua dest. waschen

Gegenfärben

- 15 Sekunden mit Hämatoxylin inkubieren
- 10 Minuten in fließendem Leitungswasser bläuen

Eindecken

- Schnitte mit Glycerin-Gelatine eindecken

3.2.6. Lichtmikroskopie und Auswertung**3.2.6.1. Humanes Gewebe**

Die Einteilung der Keimzellen für die immunhistochemische Auswertung erfolgte nach dem Schema von CLERMONT (1963).

Die immunhistochemische Auswertung für hyperacetyliertes Histon H4 wurde an je 10 Tubuli pro Schnitt durchgeführt. Positive und negative runde Spermatiden (Stufe 1 – 3) wurden getrennt ausgezählt. Die Daten wurden mit den Ergebnissen von Prm 1-mRNA, Prm 2-mRNA, Quotient aus Prm 1-mRNA zu Prm 2-mRNA und Score von STEGER et al. (2001) verglichen und statistisch ausgewertet.

3.2.6.2. Murines Gewebe

Die Einteilung der Keimzellen für die Auswertung der HE- und TUNEL-Färbung, die Immunhistochemie und in situ Hybridisierung erfolgte nach dem Schema von RUSSELL et al. (1990).

Auswertung der HE Färbung

Von jeder Maushodenprobe wurde der Prozentsatz der Tubuli mit gestörter Spermatogenese bestimmt. Um zu lokalisieren auf welche Zellpopulationen (Spermatogonien, leptotäne – zygotäne Spermatozyten, pachytäne-diplotäne

Spermatozyten, Metaphase Spermatozyten und Spermatiden) TSA gewirkt hat, wurden die Zellgruppen an je 10 Tubuli pro Schnitt getrennt ausgezählt. Von jeder Zellgruppe wurde ein Mittelwert pro Tubulus gesetzt. Für die Beurteilung, welche Zellgruppe betroffen worden ist, wurde der Verhältnis zwischen den Zellgruppen (pachytäne-diplotäne Spermatozyten zu leptotäne-zygotäne Spermatozyten, Metaphase Spermatozyten zu pachytäne-diplotäne Spermatozyten, Spermatiden zu pachytäne-diplotäne Spermatozyten) bestimmt.

Auswertung der immunhistochemischen Färbung und der in situ Hybridisierung

Der Prozentsatz Histon H4 hyperacetylierter, Prm 1-mRNA und Prm 2-mRNA positiver runden Spermatiden auf der Stufe 9 – 11 (Stadium IX-XII) wurde an jedem Schnitt in 10 Tubuli ausgezählt und der Mittelwert bestimmt.

Auswertung der TUNEL-Färbung

Bei der Apoptose kommt es zum Zerfall der Zellkerne. Es entstehen apoptotische Körperchen, die sich mit der TUNEL Färbung markieren lassen. Die Identifizierung des Keimzellstadiums ist daher nicht möglich. Die Auswertung erfolgte durch Auszählung der positiven Signale für Apoptose in der externen [Spermatogonien (SPG), leptotäne-zygotäne Spermatozyten (LEPT)] und internen Zellschicht [pachytäne-diplotäne Spermatozyten (PAH), Spermatiden (SPD)].

In jede Probe wurden die positive Zellen in der externen Zellschicht (hier APOext genannt) und in der internen Zellschicht (hier APOint genannt) an 10 Tubuli seminiferi ausgezählt. rAPOext (relative APOext) stellt den Quotient aus den apoptotischen Zellen in der externen Zellschicht und Spermatogonien und leptotänen Spermatozyten (Zahl der Spermatogonien und leptotänen Spermatozyten von HE Auswertung) dar.

$$\text{rAPOext} = \frac{\text{APOext}}{\text{SPG} + \text{LEPT}} \times 10 \text{ pro } 100 \text{ Zellen}$$

rAPOint (relative APOint) stellt den Quotient aus den apoptotischen Zellen der internen Zellschicht zu Spermatiden und pachytänen Spermatozyten (Zahl der Spermatiden und pachytänen Spermatozyten von HE Auswertung) dar.

$$rAPO_{int} = \frac{APO_{int}}{SPD + PAH} \times 10 \text{ pro } 100 \text{ Zellen}$$

Die Gesamtzahl der apoptotischen Arealen (APO_{int} und APO_{ext}) wird APO_{tot} (APO_{total}) genannt. $rAPO_{tot}$ (relative APO_{tot}) stellt den Quotient aus den apoptotischen Zellen der externen und internen Zellschicht zu Spermatozoen, leptotänen Spermatozyten, pachytänen Spermatozyten und Spermatozoen (die Zahl der Spermatozoen, leptotänen Spermatozyten, pachytänen Spermatozyten und Spermatozoen von HE Auswertung) dar.

$$APO_{tot} = APO_{int} + APO_{ext}$$

$$rAPO_{tot} = \frac{APO_{ext} + int}{SPG + LEPT + PAH + SPD} \times 10 \text{ pro } 100 \text{ Zellen}$$

3.2.7. Western Blot

Beim Western Blot (WB) Verfahren werden die einzelnen Komponenten einer Proteinmischung gelelektrophoretisch getrennt, auf eine Membran überführt und dort einer Nachweisreaktion unterzogen, die für bestimmte Proteine der getrennten Mischung spezifisch ist. Diese Methode wurde für den Nachweis von hyperacetyliertem Histon H4 in Hoden verwendet. Als Positivkontrolle wurde das Gewebe von Humantonsillen verwendet (WATERBORG und HARRINGTON, 1987).

3.2.7.1. Extraktion von Histonen aus Gefriermaterial

Für die Extraktion der Histone aus den Kernen wird verdünnte Schwefelsäure verwendet. Die säurehaltige Extraktion entfernt Histone von DNA und trennt die Core-Histone innerhalb des Nukleosoms voneinander.

Puffer ansetzen:

- Lysis Puffer:

Tris - HCl	0.605 g
NaHSO ₃	2.6 g
Triton X-100	5 ml

MgCl₂ 1.02 g
Saccharose 43 g
mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen und lösen
pH 6.5 einstellen

- Tris-EDTA Puffer:

Tris 0.242 g
EDTA 0.967 g

mit Aqua dest. auf 70 ml auffüllen und pH 7.4 einstellen

- etwa 100 mg Gewebe abwiegen
- Gewebe in 2 ml Eppendorf-Tube mit 1 ml eiskaltem Lysis Puffer überführen
- Gewebe mit Ultra Turrax auf höchster Geschwindigkeitsstufe homogenisieren
- 10 Minuten bei 4 °C mit 6.000 x g zentrifugieren
- 3 x mit Lysis Puffer waschen
- Zellkerne in 100µl Tris-EDTA Puffer suspendieren
- 1.1µl konz. H₂SO₄ zugeben, vortexen
- 1 h (oder länger) bei 4 °C inkubieren
- 10 Minuten bei 4 °C mit 22.000 x g zentrifugieren
- Überstand in neues Eppendorf Tube überführen
- 1ml Aceton zugeben
- bei RT über Nacht inkubieren
- 10 Minuten bei 4 °C mit 6.000 x g zentrifugieren
- 1 x mit Aceton waschen
- bei 37 °C Trocknen lassen

Weißes Pulver enthält Histone H1, H2A, H2B und H4.

3.2.7.2. Western Blot Protokoll

Lösungen ansetzen:

- Laufpuffer Stammlösung (x 10):

Tris-HCl 30.25 g
Glycin 187.67 g

SDS 10 g

mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen

1 x Laufpuffer: 100 ml Stammlösung mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen

- Transferpuffer:

Puffer 1:

Tris-HCl (0.3M) 36.3 g

Methanol 200 ml

auf 1 l mit Aqua bidest. auffüllen

Puffer 2:

Tris-HCl (25mM) 3 g

Methanol 200 ml

auf 1 l mit Aqua bidest. auffüllen

Puffer 3:

Tris-HCl (25mM) 3 g

Amino-Caprinsäure 5.2 g

Methanol 200 ml

auf 1 l mit Aqua bidest. auffüllen

- 3%BSA-Blockpuffer: 3g BSA in 100 ml 0.1 M PBS lösen

- Milch-Blockpuffer (5%iges): 0.75 g entfettetes Trockenmilchpulver in 15 ml 0.1 M PBS (pH 7.4) lösen

- 0.1 M PBS Puffer: 1 Tablette PBS in 200ml Aqua bidest. lösen

- PBS-Waschpuffer :

0.1 M PBS (pH 7.4) 100 ml

BSA (1%ig) 1.0 g

Tween 20 5 ml

- 10%ige APS-Lösung: 0.1 g APS + 1 ml Aqua dest., vor Gebrauch frisch ansetzen

Zusammensetzung des 2 x Laemmli-Probenpuffers: 4% SDS, 20% Glycerol, 10% β -Mercaptoethanol, 0.004% Bromphenolblau, 0.125 M Tris-HCl (pH 6.8)

Herstellung eines 15%igen SDS- Polyacrylamidgels (Mini-Gel: 0.75 mm x 7.3 cm x 8.3 cm)

Laufgel herstellen:

Aqua bidest.	2.3 ml
30%iger Acrylamid-Mix (Acralamid/NN ⁻ -Methylenbisacrylamid) (29:1)	5.0 ml
Tris-HCl-Puffer (pH 8.8)	2.5 ml
10%ige SDS Lösung (10 g SDS in 100 ml Aqua bidest.)	100 μ l
10%ige APS-Lösung (vor Gebrauch frisch ansetzen: 0.1 g APS + 1 ml Aqua dest.)	100 μ l
TEMED	4 μ l

- Glasplatten von Gelkassette und Kämme gründlich mit Aqua dest. und 70%igem Ethanol reinigen
- Laufgellösung bis zur Markierung luftblasenfrei in Gelkassette einfüllen
- Laufgellösung vorsichtig mit Aqua dest. überschichten
- Laufgellösung 30 Minuten bei RT polymerisieren lassen
-

Sammelgel herstellen:

Aqua bidest.	2.1 ml
30%iger Acrylamid-Mix	500 μ l
Tris-HCl-Puffer (pH 6,8)	380 μ l
10%ige SDS Lösung	30 μ l
10%ige APS-Lösung	30 μ l
TEMED	3 μ l

- Sammelgellösung bis zum oberen Rand der Gelkassette einfüllen
- Kämme für Taschenproben einsetzen
- Sammelgellösung 30 Minuten bei RT polymerisieren lassen

Probenvorbereitung

- Proteinproben auftauen und vortexen
- 10 µl Proteinprobe mit 10 µl 2 x Laemmli-Probenpuffer mischen
- 5 Minuten im Wasserbad bei 95 °C denaturieren
- Proben vortexen, kurz zentrifugieren
-

Gelelektrophorese

- Gelkassetten in Elektrophoreseapparatur einbauen
- Elektrodenkammern mit 1 x Laufpuffer füllen
- Kämmen aus Sammelgel vorsichtig entfernen
- Probenflaschen mit 1 x Laufpuffer mit Hamiltonspritze spülen (Luftblasen aus Probenflaschen entfernen)
- Proteinproben (10 µl pro Spur) mit Hamiltonspritze auf Taschenboden eintragen
- Hamiltonspritze zwischen einzelnen Probenauftragungen mit Laufpuffer spülen
- Elektroden mit Stromgeber verbinden
- 45-60 Minuten bei konstanter Spannung von 200 V und in RT laufen lassen, sobald Bromphenolblau-Bande den unteren Gelrand erreicht

Ein Gel wurde direkt nach der Elektrophorese (ohne Blotting) in Coomassie Blue gefärbt und diente als Marker für Histone, das zweite Gel wurde geblotted.

Elektroblotting „Semi-Dry-Blotting-Verfahren“Membranvorbereitung:

- eine PVDF-Membran und sechs Filterpapiere entsprechend der Gelgröße zuschneiden
- Inkubationsschalen mit Puffer 1-3 und Methanol befüllen
- PVDF-Membran einige Sekunden mit 100%igem Methanol benetzen
- PVDF-Membran vor dem Blotting für 15 Minuten in Puffer 2 überführen

Filterpapiervorbereitung:

- 3 Filterpapiere in Schale mit Puffer 3 benetzen
- 2 Filterpapiere in Schale mit Puffer 1 benetzen
- 1 Filterpapier in Schale mit Puffer 2 benetzen

Gelvorbereitung:

- nach der Elektrophorese Glaskassette mit Gel aus Kammer nehmen

- obere Glasplatte abnehmen und Reste von Sammelgel entfernen
- Gel für 15 Minuten in Puffer 2 äquilibrieren

Blotting-Sandwich aufbauen:

- Elektrodenplatte (Anode) der Blotting-Aparatur mit Aqua bidest. befeuchten
- 2 Filterpapiere aus Puffer 1
- 1 Filterpapier aus Puffer 2
- PVDF-Membran aus Puffer 2
- Gel aus Puffer 2
- 3 Filterpapiere aus Puffer 3
- nach jeder Lage (außer Membran) durch vorsichtiges Rollen mit Glasstab Luftblasen entfernen
- überschüssigen Puffer um Blotting-Sandwich mit Filterpapier entfernen
- Kathode mit Aqua bidest. befeuchten und aufsetzen
- Apparatur mit Stromgeber verbinden
- 45-60 Minuten bei konstanter Stromstärke von 150 mA und in RT laufen lassen (Spannung darf 25 V nicht überschreiten)

Immunhistochemie

- nach Beendigung die Transfer PVDF-Membran an einer Seite mit Bleistift markieren
- Membran 2 Minuten in Aqua bidest. schwenken
- Membran kurz mit 100%igem Methanol benetzen
- Membran 15 Minuten bei RT vollständig trocknen lassen
- Membran kurz mit 100%igem Methanol und Aqua bidest. rehydrieren
- Membran sofort mit Milch-Blockpuffer überfüllen
- 60 Minuten unter langsamen Schwenken bei RT inkubieren (Schüttler)
- Blockpuffer entfernen

Inkubation mit primärem Antikörper:

Primärantikörperlösung herstellen: Anti-hyperacetyliertes Histon 4 (penta), Verdünnung 1:10000 mit BSA-Blockpuffer

- Membran mit Primärantikörperlösung unter langsamen Schwenken über Nacht bei RT inkubieren

Tag 2

Inkubation mit sekundärem Antikörper

Sekundärantikörperlösung herstellen: Biotinylierte Ziege-anti-Kaninchen, Verdünnung 1:1000 mit Waschpuffer

- primären Antikörper entfernen
- Membran 3 x 10 Minuten mit Waschpuffer waschen
- Membran mit sekundärem Antikörper 1 h bei RT inkubieren
- Membran 3 x 10 Minuten mit Waschpuffer waschen

Inkubation mit ABC-Komplex

ABC-Lösung ansetzen: (30 Minuten vor Gebrauch) 1 Tropfen Lösung A + 1 Tropfen Lösung B in 2.5 ml Waschpuffer

- Membran mit ABC 1 h bei RT inkubieren
- Membran 3 x 10 Minuten mit Waschpuffer waschen

Farbreaktion:

- Membran mit TMB/H₂O₂ (True Blue Peroxidase Substrate) bei RT inkubieren
- Membran mit Aqua dest. waschen
- Membran im Trockenschrank trocknen lassen

Die Dokumentation der Signale der Farbreaktion erfolgte mit Hilfe eines Scanners.

Bei der Negativkontrolle des WB wurde der Primärantikörper durch PBS Puffer ersetzt.

3.2.8. Statistische Auswertung

Für die statistischen Auswertungen wurden die Statistik-Software-Pakete BMDP/Dynamic Release 7.0 (DIXON, 1993) und TESTIMATE (RAHLFS, 2002) angewendet.

Von dem Versuch mit humanem Gewebe wurden zur Beschreibung der untersuchten Variablen der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die Mittelwertunterschiede in immunpositiven Spermatozoen für die Markierung mit dem hyperacetylierten Histon H4 Antikörper zwischen den Gruppen 1 bis 5 wurden mittels einfaktorierter Varianzanalyse untersucht (ANOVA Programm BMDP7D). Nicht normalverteilte Variablen wurden durch eine Arcus-Sinus-Transformation (arc sin) angenähert in eine Normalverteilung überführt (SACHS, 1982). Um die Unterschiede zwischen den

Gruppen näher einzugrenzen wurde anschließend ein paarweiser Gruppenvergleich mit Hilfe des Tukeys-Tests durchgeführt (BMDP 7D). Die Korrelation zwischen dem Prozentsatz der für hyperacetyliertes Histone H4 positiven Spermatozoen, dem Score Wert und dem Prozentsatz von Prm1-mRNA und Prm 2-mRNA positiven Spermatozoen wurden mit Hilfe des Spearman-Korrelationskoeffizienten (r_s) (BMDP3D) ausgewertet. $p < 0.05$ wurde als signifikant betrachtet.

Für die Beschreibung der Daten des Tierversuches wurden zwei-dimensionale Häufigkeitstabellen (BMDP4F) gebildet. Der Zusammenhang zwischen TSA Konzentration und Körpergewicht, APOext und APOtot wurde mittels linearer Regressionsanalyse untersucht. Nicht lineare, monotone Zusammenhänge wurden zwischen der TSA-Konzentration und folgenden Variablen beobachtet: relatives Hodengewicht (RHG), Anzahl der Tubuli mit gestörter Spermatozoenbildung, APOint, H4- und Prm 1 und Prm 2-mRNA positive Spermatozoen. Diese Assoziationen zwischen den Daten wurde mit Hilfe des Spearman-Rang-Korrelationskoeffizienten (r_s) (BMDP3D) ausgewertet.

Die statistische Verteilung der relativen Apoptosewerte wies eine rechtsschiefe Form auf. Um näherungsweise eine Normalverteilung zu erhalten wurden diese Daten logarithmisch transformiert. Die Gruppenvergleiche wurden mit einer einfaktoriellem Varianzanalyse mit anschließendem Tukey-Test (zum paarweisen Gruppenvergleich) durchgeführt. Zur Beschreibung der Daten wurden der geometrische Mittelwert und der Streufaktor angegeben.

Für die Auswertung der Fertilisierungsversuche wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney Test (BMDP3D) angewandt.

4. Ergebnisse

4.1. Humanes Gewebe

4.1.1. Western Blot Analyse

Mit dem Antikörper gegen hyperacetyliertes Histon H4 konnte im Hodenhomogenat eine stark positive Bande für Histon H4 detektiert werden. Zusätzliche schwache Banden für H2A, H2B und H3 beruhen auf einer Kreuzreaktion des Antikörpers mit diesen Core-Histonen. Als Positivkontrolle diente ein Histonextrakt aus humanen Tonsillen. Die Banden entsprachen den Ergebnis von WATERBORG und HARRINGTON (1987) (Abb. 15).

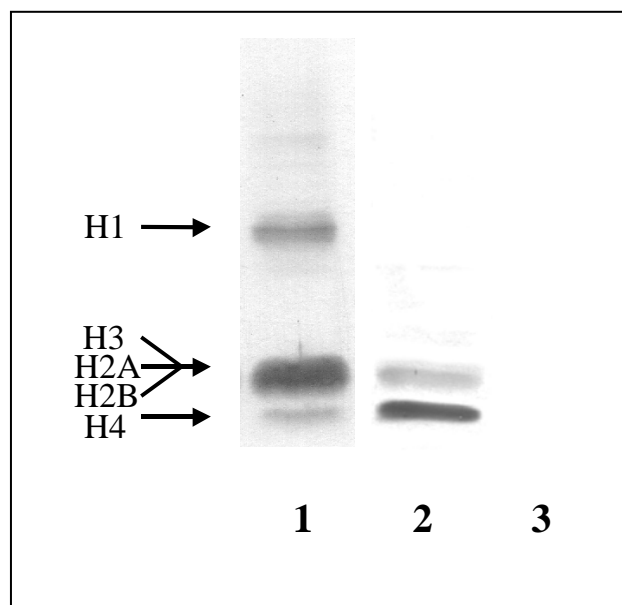


Abbildung 15: Western Blot Analyse von humanem Hodenhomogenat. Als Marker für die Histone diente Proteinextrakt aus humanem Tonsillengewebe (Lane 1). Der Proteinextrakt von Patienten mit normaler Spermatogenese zeigte eine starke Bande für Histon H4, sowie zusätzliche schwache Banden für die Histone H2A, H2B und H3, die auf einer Kreuzreaktion mit dem hyperacetylierten Histon H4 Antikörper beruhen (Lane 2). Die Negativkontrolle (ohne Primärantikörper) zeigte keine Banden (Lane 3).

4.1.2. Immunhistochemie

4.1.2.1. Normale Spermatogenese

Das Keimepithel von Patienten mit quantitativ normaler Spermatogenese (Score 10, Gruppe 1) und mit zumindest qualitativ normaler Spermatogenese (Score 10-8, Gruppe 2) zeigten ein identisches Expressionsmuster für hyperacetyliertes Histon H4. In den Zellkernen von Spermatogonien und elongierenden Stufe 4 Spermatiden können stark positive Signale beobachtet werden. Schwächere Signale treten in runden Stufe 3 Spermatiden, elongierten Stufe 5 Spermatiden und präleptotänen Spermatozyten auf. Die somatischen Sertoli-Zellen und Leydig-Zellen sind immunnegativ (Abb. 16).

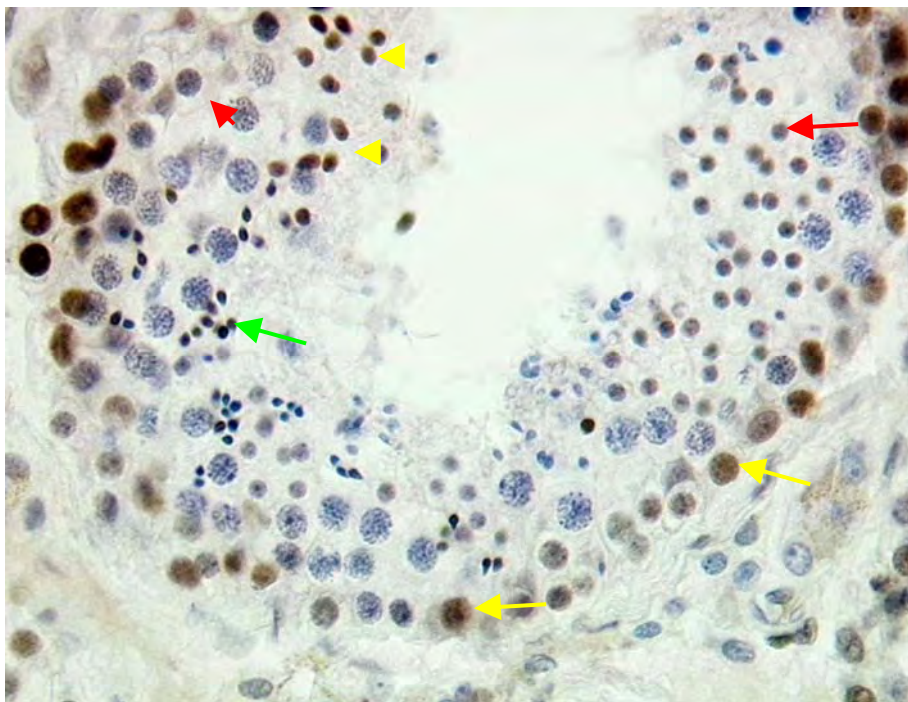


Abbildung 16: Immunhistochemie gegen hyperacetyliertes Histon H4 bei normaler Spermatogenese. Man erkennt stark positive Signale in den Zellkernen von Spermatogonien (gelbe Pfeile) und elongierenden Stufe 4 Spermatiden (gelbe Pfeilköpfe). Zusätzliche schwache Signale können in präleptotänen Spermatozyten (roter Pfeilkopf), sowie in runden Stufe 3 (roter Pfeil) und elongierten Stufe 5 Spermatiden (grüner Pfeil) beobachtet werden (Primärvergrößerung x40).

Die immunhistochemische Auswertung zeigte, dass bei Männern mit quantitativ normaler Spermatogenese 98.2 % \pm 1.1 % der runden Spermatiden immunpositiv für hyperacetyliertes Histon H4 waren. Dieser Prozentsatz sank bei Männern mit qualitativ normaler Spermatogenese auf 93.1 % \pm 6.6 % (Tab. 4).

Die Daten der immunhistochemischen Auswertung für hyperacetyliertes Histon H4 wurden mit der Expression von Prm 1- und Prm 2-mRNA in denselben Zellen verglichen (STEGGER et al., 2001). Der Prozentsatz der für Prm 1- und Prm 2-mRNA positiven Spermatiden betrug in Gruppe 1 80.9 % für Prm 1 und 79.5 % für Prm 2, in Gruppe 2 58.4 % für Prm 1 und 56.4 % für Prm 2 (Tab. 4).

Tabelle 4: Auswertung der immunhistochemischen Färbung (Ac H4: hyperacetyliertes Histon H4) der Hodenschnitte von Patienten mit quantitativ (Gruppe 1, Score 10) und qualitativ (Gruppe 2, Score 10-8) normaler Spermatogenese. Mittelwerte (aus 10 Tubuli) der für Prm 1-mRNA, Prm 2-mRNA und Ac H4 immunpositiven runden Spermatozyten (Stufe 1-3). Prm 1/Prm 2: Prm 1-mRNA zu Prm 2-mRNA Verhältnis, MW: Mittelwert, SA: Standardabweichung.

Gruppe	Score	Prm 1 %	Prm 2 %	Prm1/Prm2	Ac H4: %
1	10	73.3	74.2	0.98	99.1
1	10	89.6	90.9	0.98	98.7
1	10	85.6	79.2	1.08	96.2
1	10	77.9	75.1	1.03	97.4
1	10	77.3	77.4	0.99	98.9
1	10	81.6	80.4	1.01	98.8
MW ± SA		80.9 ± 5.4	79.5 ± 5.5	1.01 ± 0.04	98.2 ± 1.1
2	10	72.7	57.7	1.25	98.7
2	10	43.5	40.4	1.07	98.0
2	10	42.9	34.7	1.23	98.0
2	10	84.0	72.1	1.16	97.5
2	10	82.3	71.9	1.14	97.4
2	10	58.8	63.3	0.92	95.5
2	10	49.7	42.4	1.17	95.2
2	10	70.2	66.3	1.05	93.8
2	10	36.7	35.5	1.03	89.9
2	10	68.6	70.4	0.97	88.9
2	10	64.4	63.5	1.01	81.4
2	9	63.1	63.0	1.00	99.0
2	9	60.6	59.9	1.01	98.9
2	9	62.3	56.8	1.09	97.7
2	9	53.4	79.5	0.67	97.3
2	9	86.3	47.7	1.80	97.7
2	9	49.8	53.0	0.93	97.4
2	9	41.2	47.2	0.87	97.3
2	9	49.4	50.6	0.97	95.1
2	9	63.0	58.0	1.08	94.5
2	9	66.4	68.4	0.97	93.1
2	9	30.7	40.3	0.76	89.2
2	9	59.4	55.0	1.08	88.0
2	9	68.9	58.7	1.17	83.2
2	8	43.7	52.0	0.84	97.9
2	8	46.5	65.9	0.70	90.1
2	8	58.6	55.2	1.06	86.4
2	8	57.3	50.7	1.13	71.0
MW ± SA		58.4 ± 13.8	56.4 ± 11.5	1.04 ± 0.2	93.1 ± 6.6

4.1.2.2. Gestörte Spermatogenese

Die Immunhistochemie zeigte – wie bei der normalen Spermatogenese - positive Signale für hyperacetyliertes Histon H4 in den Zellkernen von Spermatogonien und – wenn vorhanden - elongierenden Stufe 4 Spermatischen. Außerdem traten in den Tubuli seminiferi mit Spermatischenarrest zusätzliche Signale in pachytänen Spermatozyten auf (Abb. 17).

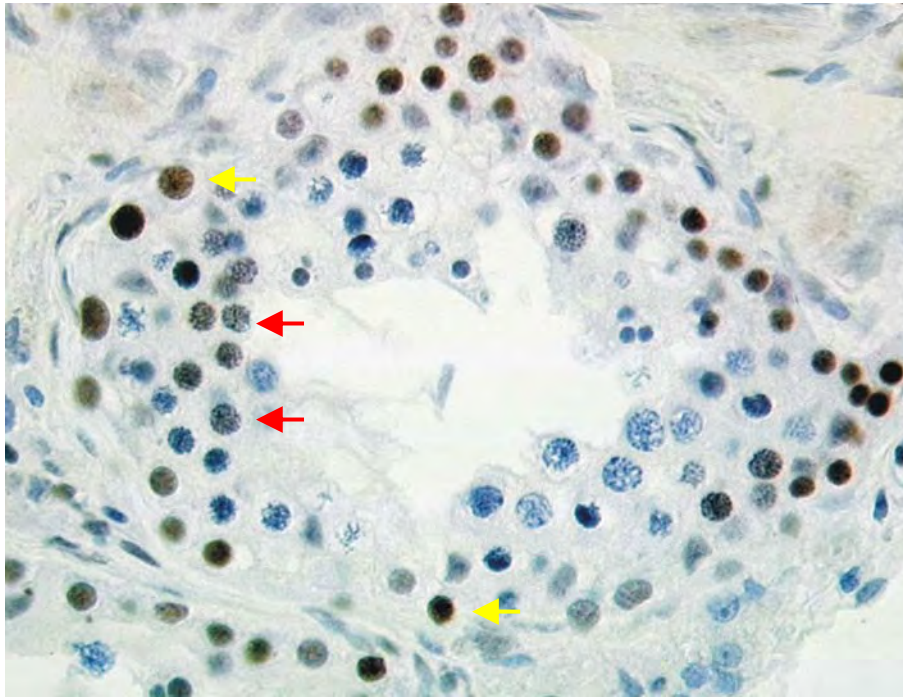


Abbildung 17: Immunhistochemie gegen hyperacetyliertes Histon H4 bei Arrest der Spermatogenese auf der Stufe von runden Spermatischen. Man erkennt stark positive Signale in den Zellkernen von Spermatogonien (gelbe Pfeile). Zusätzliche starke Signale können in pachytänen Spermatozyten beobachtet werden (rote Pfeile) (Primärvergrößerung x40).

Der Prozentsatz der immunpositiven Spermatischen war bei den infertilen Männern mit gestörter Spermatogenese im Vergleich zu denen mit normaler Spermatogenese um bis zu 60 % reduziert. Er betrug in Gruppe 3 $74.9 \% \pm 23.4 \%$, in Gruppe 4 $58.6 \% \pm 10.5 \%$ und in Gruppe 5 $60.4 \% \pm 22.4 \%$ (Tab. 5). In Gruppe 3 war der Prozentsatz der für Prm 1- und Prm 2-mRNA positiven Spermatischen 32.6% bzw. 31.7% . In den Gruppen 4 und 5 wurde Prm 1 und Prm 2 aufgrund der fehlenden Spermatischen nicht ausgewertet (Tab. 5).

Tabelle 5: Auswertung der immunhistochemischen Färbung (Ac H4: hyperacetyliertes Histon H4) der Hodenschnitte von Patienten mit gestörter Spermatogenese (Score 7-0). Histologisch zeigte sich das Bild einer bunten Atrophie (Gruppe 3) bzw. eines Spermatogenese-arrests auf der Stufe von runden Spermatiden, bei Gruppe 4 fokal, bei Gruppe 5 total. Mittelwerte (aus 10 Tubuli) der für Prm 1-mRNA, Prm 2-mRNA und Ac H4 immunpositiven runden Spermatiden (Stufe 1-3). Prm 1/Prm 2: Prm 1-mRNA zu Prm 2-mRNA Verhältnis. In Gruppen 4 und 5 wurden Prm 1 und Prm 2 aufgrund der fehlenden Spermatiden nicht ausgewertet (*). MW: Mittelwert, SA: Standardabweichung

Gruppe	Score	Prm 1 %	Prm 2 %	Prm1/Prm2	AcH4: %
3	7	44.3	52.1	0.85	96.9
3	6	51.2	41.9	1.22	95.6
3	6	26.1	32.7	0.79	87.8
3	5	28.0	37.6	0.74	97.2
3	5	44.7	44.1	1.01	95.6
3	5	33.5	34.0	0.98	81.0
3	4	48.8	45.1	1.08	90.9
3	4	27.8	46.8	0.59	89.7
3	4	29.9	22.8	1.31	77.9
3	3	37.9	37.6	1.00	90.4
3	3	31.2	35.8	0.87	43.5
3	2	51.4	42.3	1.21	94.4
3	2	39.7	22.9	1.73	93.0
3	2	33.3	46.0	0.72	82.1
3	2	18.7	22.6	0.82	81.9
3	2	30.1	15.5	1.94	80.0
3	2	26.2	24.4	1.07	74.1
3	2	21.6	33.6	0.64	69.1
3	2	37.1	37.3	0.99	63.2
3	2	30.1	35.4	0.85	59.2
3	2	13.0	14.4	0.90	32.1
3	1	46.9	29.9	1.56	94.0
3	1	26.5	31.8	0.83	92.2
3	1	36.6	19.6	1.86	72.9
3	1	37.8	12.8	2.95	40.7
3	1	14.6	24.2	0.60	33.8
3	1	13.6	12.3	1.10	13.0
MW ± SA		32.6 ± 10.8	31.7 ± 11.1	1.10 ± 0.5	74.9 ± 23.4
4	0	*	*	*	66.0
4	0	*	*	*	63.7
4	0	*	*	*	44.5
4	0	*	*	*	57.6
4	0	*	*	*	60.0
4	0	*	*	*	72.9
4	0	*	*	*	45.6
MW ± SA		-	-	-	58.6 ± 10.5
5	0	*	*	*	93.3
5	0	*	*	*	37.0
5	0	*	*	*	33.4
5	0	*	*	*	60.9
5	0	*	*	*	82.3
5	0	*	*	*	67.2
5	0	*	*	*	48.9
MW ± SA		-	-	-	60.4 ± 22.4

4.1.3. Ergebnisse der statistischen Analyse bezüglich des Gruppenvergleichs

Die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) zeigte signifikante Unterschiede bezüglich der Expression von hyperacetyliertem Histon H4 in runden Spermatozoen in den Gruppen 1-5 ($p < 0.0001$). Der anschließende paarweise Gruppenvergleich mit dem Tukey-Test deckte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen 1 und 2 sowie zwischen den Gruppen 3, 4 und 5 auf. Jedoch unterscheiden sich die Gruppen 1 und 2 statistisch signifikant von jeder der Gruppen 3-5 ($p < 0.01$). Die Expression von hyperacetyliertem Histon H4 in runden Spermatozoen korrelierte mit dem Score ($r_s = 0.758$, $p < 0.001$) und dem Prozentsatz der für Prm 1-mRNA ($r_s = 0.663$, $p < 0.001$) und Prm 2-mRNA ($r_s = 0.647$, $p < 0.001$) positiven runden Spermatozoen.

4.2. Murines Gewebe

Während der 35-tägigen Behandlung mit TSA trat bei den Mäusen weder ein Verlust des Körpergewichts, noch sichtbare Verhaltensänderungen auf. Das relative Hodengewicht sank jedoch mit steigender TSA Konzentration. Es betrug $0.88 \% \pm 0.05 \%$ in Gruppe 1, $0.76 \% \pm 0.15 \%$ in Gruppe 2, $0.58 \% \pm 0.11 \%$ in Gruppe 3, $0.43 \% \pm 0.08 \%$ in Gruppe 4 und $0.32 \% \pm 0.02 \%$ in Gruppe 5 (Tab. 5).

Tabelle 6: Ergebnisse des Mäuseversuchs bezüglich Hodengewicht. Gruppe 1 (Kontrolle), Gruppe 2 (0.8 mg TSA/kg), Gruppe 3 (1.6 mg TSA/kg), Gruppe 4 (2.4 mg TSA/kg), Gruppe 5 (3.2 mg TSA/kg). RH: rechter Hoden, LH: linker Hoden, RHG: relatives Hodengewicht; MW: Mittelwert, SA: Standardabweichung

Gruppe	Körpergewicht: g	RH: g	LH: g	RHG
1	24.1	0.106	0.127	0.89
1	25.4	0.116	0.112	0.80
1	27.4	0.124	0.122	0.86
1	27.2	0.108	0.111	0.96
1	29.1	0.135	0.115	0.89
MW ± SA	26.6 ± 1.7	0.118 ± 0.01	0.117 ± 0.01	0.88 ± 0.05
2	25.5	0.079	0.113	0.88
2	27.0	0.117	0.114	0.85
2	25.0	0.113	0.109	0.65
2	25.3	0.079	0.085	0.85
2	24.8	0.103	0.108	0.75
MW ± SA	25.5 ± 0.8	0.980 ± 0.02	0.105 ± 0.01	0.76 ± 0.15
3	24.6	0.070	0.070	0.79
3	27.8	0.077	0.075	0.48
3	24.2	0.095	0.098	0.54
3	24.6	0.059	0.076	0.57
3	24.8	0.051	0.070	0.54
MW ± SA	25.2 ± 1.3	0.070 ± 0.02	0.077 ± 0.01	0.58 ± 0.11
4	24.7	0.045	0.047	0.32
4	27.4	0.072	0.068	0.51
4	26.0	0.062	0.069	0.50
4	24.8	0.040	0.040	0.49
4	25.9	0.064	0.065	0.37
MW ± SA	25.8 ± 1.0	0.056 ± 0.06	0.057 ± 0.01	0.43 ± 0.08
5	22.1	0.041	0.037	0.35
5	28.2	0.049	0.052	0.35
5	23.6	0.033	0.040	0.30
5	26.2	0.037	0.043	0.30
5	23.6	0.042	0.040	0.34
MW ± SA	24.7 ± 2.2	0.040 ± 0.01	0.042 ± 0.01	0.32 ± 0.02

4.2.1. Histologie

4.2.1.1. Gruppe 1 (Kontrolle)

Die Kontrollgruppe zeigte histologisch eine normale Spermatogenese (Abb. 18). Der Prozentsatz von Tubuli, deren Stadien nicht bestimmbar waren betrug $0.9 \% \pm 0.9 \%$. Die Zellzahl pro Tubulusquerschnitt betrug für Spermatogonien 24.2 ± 6.0 , für leptotäne-zygotäne Spermatozyten 70.4 ± 2.8 , für pachytäne-diplotäne Spermatozyten 71.0 ± 1.8 , für Metaphase Spermatozyten 18.8 ± 5.2 und für Spermatisden 223.8 ± 32.0 . Das Verhältnis zwischen den einzelnen Zellgruppen war wie folgt verteilt: pachytäne-diplotäne Spermatozyten zu leptotäne-zygotäne Spermatozyten 1.01, Metaphase Spermatozyten zu pachytäne-diplotäne Spermatozyten 0.26, Spermatisden zu pachytäne-diplotäne Spermatozyten 3.16 (Tab. 7).

Im Nebenhoden konnten Spermien nachgewiesen werden. Auf histologischer Ebene wurden keine Veränderungen in anderen Organen (Prostata, Leber, Milz, Akzessorische Geschlechtsdrüsen, Darm, Niere) festgestellt.

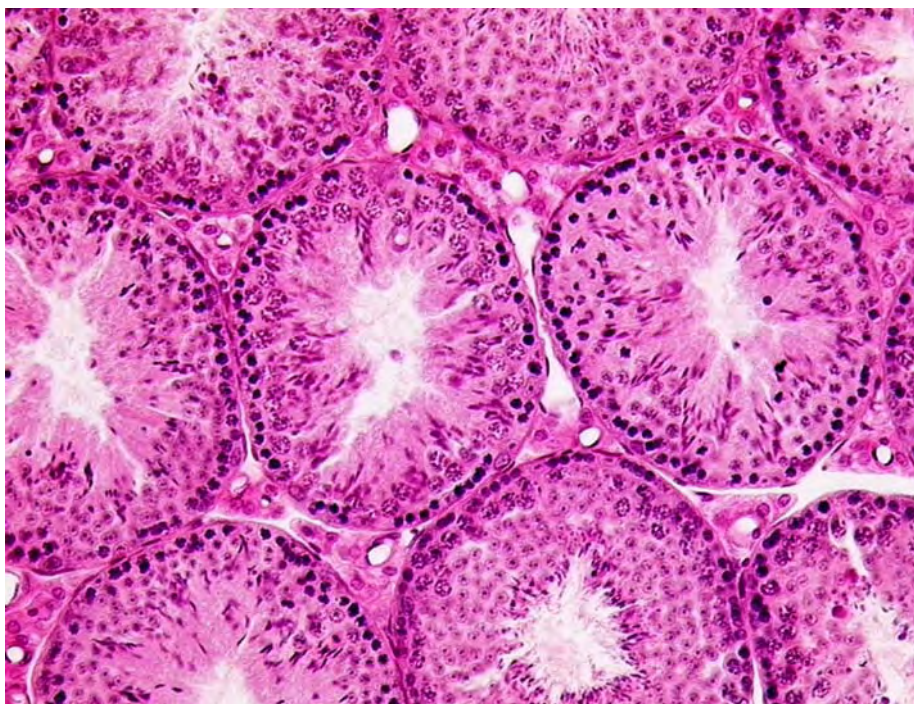


Abbildung 18: HE Färbung eines Paraffinschnittes aus Gruppe 1. In den Tubuli sind die für eine intakte Spermatogenese typischen Stadien von Keimzellpopulationen erkennbar (Primärvergrößerung x20).

4.2.1.2. Gruppe 2 (0.8 mg TSA/kg)

In dieser Gruppe konnte kein Effekt von TSA auf die Hodenhistologie nachgewiesen werden. Die Mehrzahl der Tubuli zeigte eine normale Größe und eine intakte Spermatogenese (Abb. 19). Der Prozentsatz der Tubuli mit Veränderungen in den Keimzellstadien betrug $1.4 \% \pm 0.9 \%$. Die Zellzahl pro Tubulusquerschnitt betrug für Spermatogonien 23.0 ± 2.1 , für leptotäne-zygotäne Spermatozyten 70.8 ± 7.3 , für pachytäne-diplotäne Spermatozyten 56.6 ± 11.8 , für Metaphase Spermatozyten 13.6 ± 2.8 und für Spermatisden 201.6 ± 29.0 . Das Verhältnis zwischen den einzelnen Zellgruppen war wie folgt verteilt: pachytäne-diplotäne Spermatozyten zu leptotäne-zygotäne Spermatozyten 0.81, Metaphase Spermatozyten zu pachytäne-diplotäne Spermatozyten 0.24, Spermatisden zu pachytäne-diplotäne Spermatozyten 3.70 (Tab. 7). Im Nebenhoden konnten Spermien nachgewiesen werden.

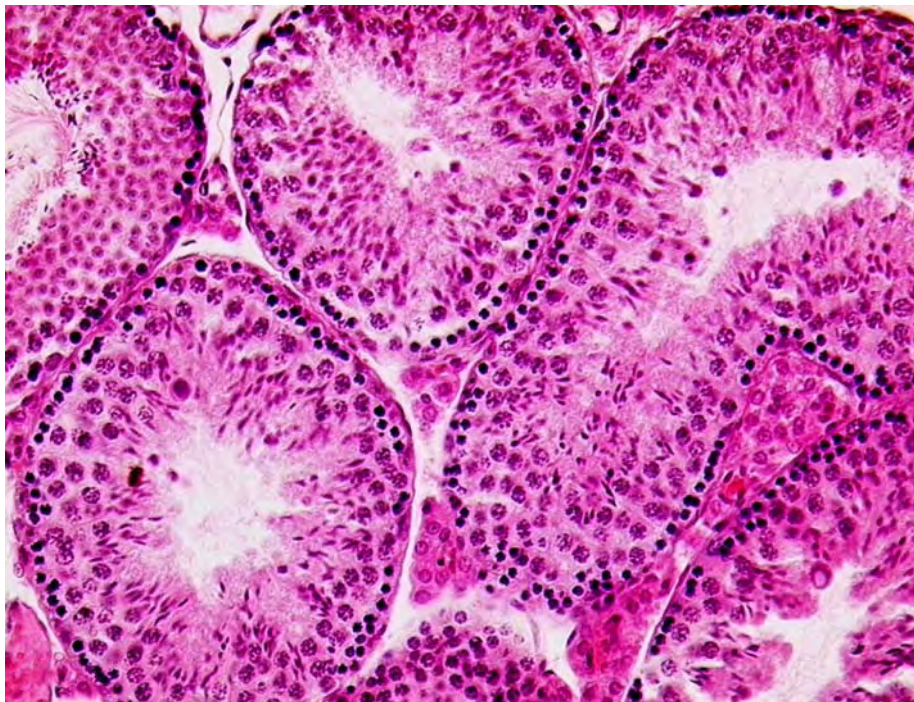


Abbildung 19: HE Färbung eines Paraffinschnittes aus Gruppe 2. Man erkennt, wie bei Gruppe 1, eine histologisch intakte Spermatogenese (Primärvergrößerung x20).

4.2.1.3. Gruppe 3 (1.6 mg TSA/kg)

Ab dieser Gruppe konnte ein deutlicher Effekt von TSA auf die Spermatogenese nachgewiesen werden. So zeigten 45.0 % \pm 36.0 % der Tubuli Veränderungen der Spermatogenese. Diese variierten von normaler Spermatogenese bis hin zu verschiedenen Spermatogenese-arresten (Abb. 20). Zudem konnte man eine Abnahme der Zahl der Keimzellen beobachten. Die Zellzahl pro Tubulusquerschnitt betrug für Spermatogonien 19.8 ± 6.9 , für leptotäne-zygotäne Spermatozyten 72.8 ± 5.7 , für pachytäne-diplotäne Spermatozyten 46.6 ± 18.9 , für Metaphase Spermatozyten 8.6 ± 6.2 und für Spermatisden 85.6 ± 42.0 . Das Verhältnis zwischen den einzelnen Zellengruppen war wie folgt verteilt: pachytäne-diplotäne Spermatozyten zu leptotäne-zygotäne Spermatozyten 0.63, Metaphase Spermatozyten zu pachytäne-diplotäne Spermatozyten 0.19, Spermatisden zu pachytäne-diplotäne Spermatozyten 1.94 (Tab. 7). Im Nebenhoden befanden sich Spermien.

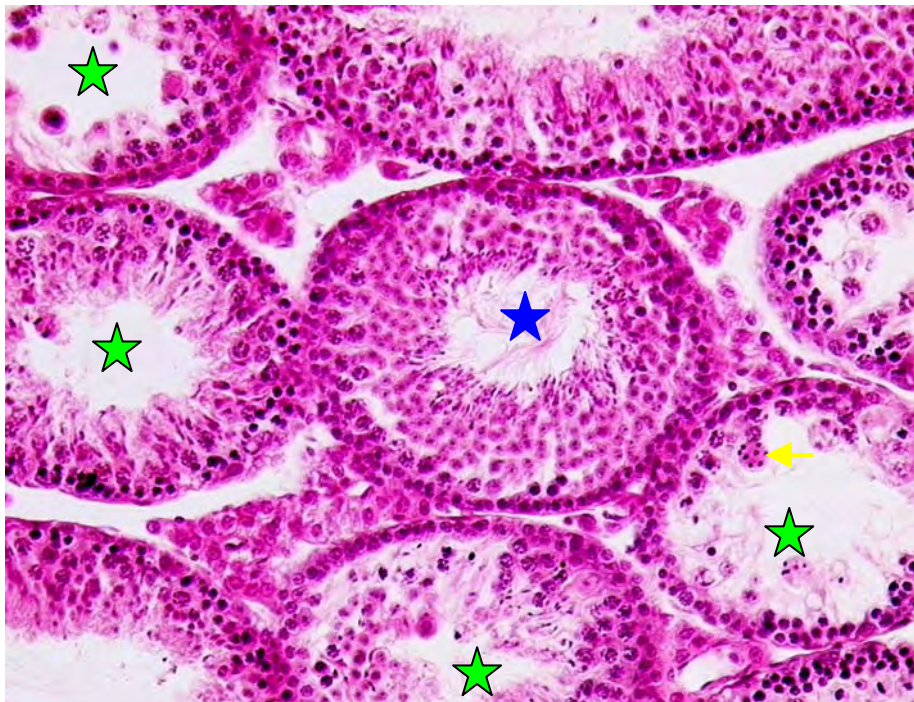


Abbildung 20: HE Färbung eines Paraffinschnittes aus Gruppe 3. Man erkennt das Nebeneinander von Tubuli mit intakter Spermatogenese (blauer Stern) und Tubuli mit verschiedenen Spermatogenesestörungen („bunten Atrophie“) (grüne Sterne). Zusätzlich konnte man auch mehrkernige runde Spermatisden beobachten (gelber Pfeil) (Primärvergrößerung x20).

4.2.1.4. Gruppe 4 (2.4 mg TSA/kg)

In dieser Gruppe zeigten 72 % \pm 34.0 % der Tubuli Veränderung des Keimepithels. In vielen Fällen waren die runden Spermatozoen mehrkernig (Abb. 21). Die Zellzahl pro Tubulusquerschnitt betrug für Spermatozoen 17.3 \pm 5.0, für leptotäne-zygotäne Spermatozoen 60.2 \pm 9.0, für pachytäne-diplotäne Spermatozoen 23.0 \pm 9.5, für Metaphase Spermatozoen 5.2 \pm 3.0, für Spermatozoen 33.4 \pm 20.0. Das Verhältnis zwischen den einzelnen Zellgruppen war wie folgt verteilt: pachytäne-diplotäne Spermatozoen zu leptotäne-zygotäne Spermatozoen 0.37, für Metaphase Spermatozoen zu pachytäne-diplotäne Spermatozoen 0.21, für Spermatozoen zu pachytäne-diplotäne Spermatozoen 1.38 (Tab. 7). In Nebenhoden befanden sich Spermien.

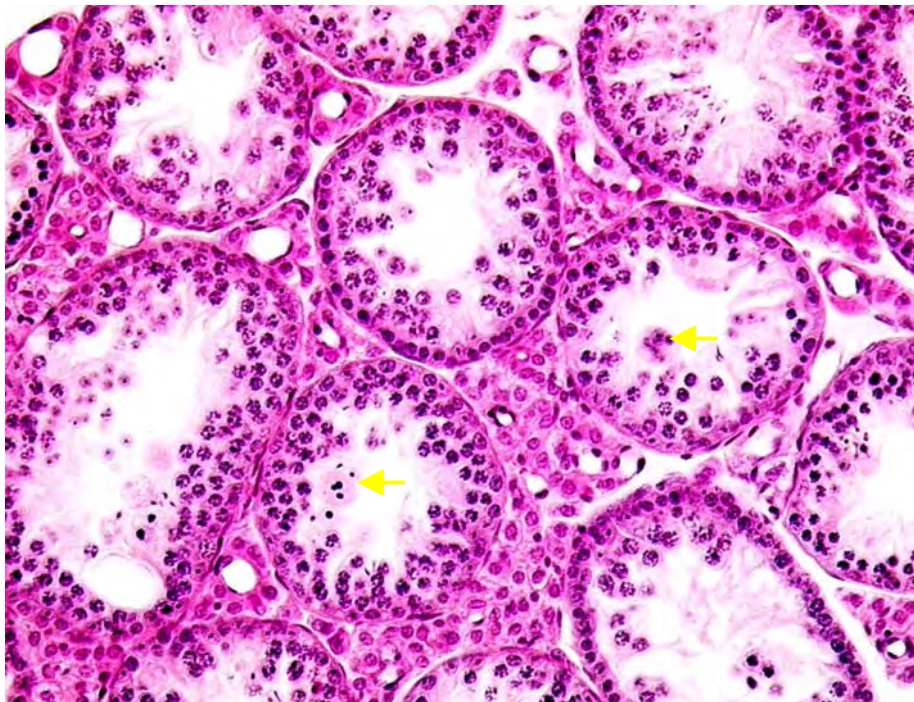


Abbildung 21: HE-Färbung eines Paraffinschnittes aus Gruppe 4. Die Mehrheit der Tubuli im Schnitt zeigt Veränderungen des Keimepithels. Auffällig ist das Fehlen von einzelnen Zellpopulationen, hauptsächlich den Spermatozoen und Spermatozoen. Zudem konnte man auch mehrkernige runde Spermatozoen beobachten (gelbe Pfeile) (Primärvergrößerung x20).

4.2.1.5. Gruppe 5 (3.2 mg TSA/kg)

In dieser Gruppe zeigten alle Tubuli Veränderungen des Keimepithel (Abb. 22). Die Zellzahl pro Tubulusquerschnitt betrug für Spermato gonien 14.8 ± 4.5 , für leptotäne-zygotäne Spermatozyten 62.2 ± 12.1 , für pachytäne-diplotäne Spermatozyten 6.2 ± 4.5 , für Metaphase Spermatozyten 1.2 ± 0.9 , für Spermatoziden 12.6 ± 8.7 . Das Verhältnis zwischen den einzelnen Zellgruppen war wie folgt verteilt: pachytäne-diplotäne Spermatozyten zu leptotäne-zygotäne Spermatozyten 0.10, Methaphase Spermatozyten zu pachytäne-diplotäne Spermatozyten 0.20, Spermatoziden zu pachytäne-diplotäne Spermatozyten 2.16 (Tab. 7). In Nebenhoden befanden sich keine Spermien.

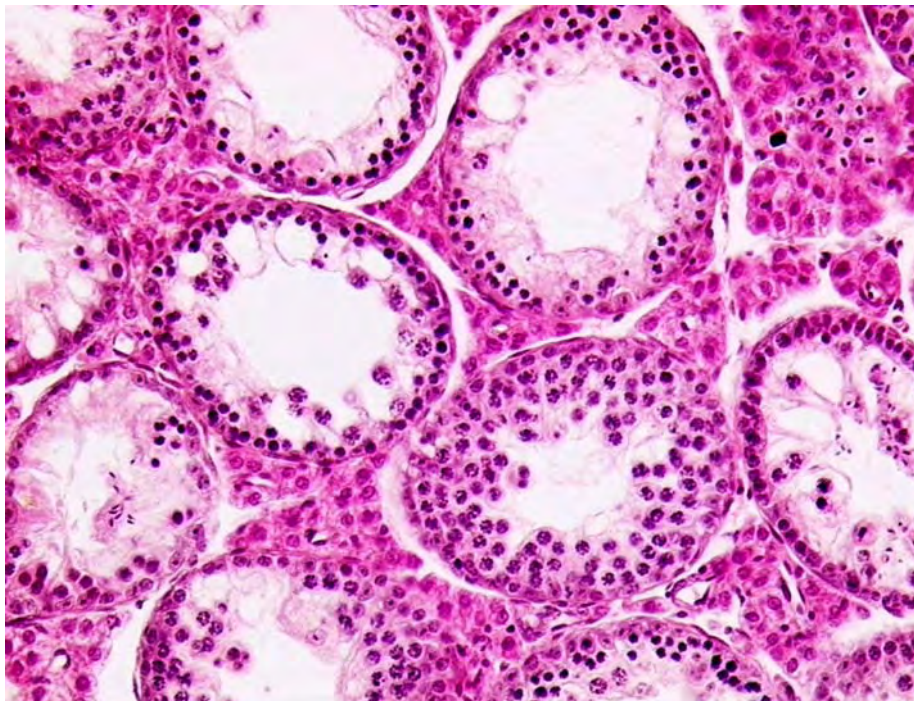


Abbildung 22: HE-Färbung eines Paraffinschnittes aus Gruppe 5. Alle Tubuli zeigen eine gestörte Spermatogenese (Primärvergrößerung x20).

Tabelle 7: Morphometrische Auswertung (Zellzahl) der Hodenparaffinschnitte für die Gruppen 1-5. SPG: Spermato gonien, LEPT: leptotäne-zygotäne Spermatozyten, PAH: pachytäne-diplo täne Spermatozyten, PAH/LEPT: Quotient aus pachytänen zu leptotänen Spermatozyten, SPD: Spermatiden, SPD/PAH: Quotient aus Spermatiden zu pachytänen Spermatozyten, METAPH: Metaphase Spermatozyten, MW: Mittelwert, SA: Standardabweichung.

Gr.	SPG	LEPT	PAH	PAH/LEPT	SPD	SPD/PAH	METAPH
1	17	68	68	1.00	222	3.26	13
1	22	73	73	1.00	201	2.75	22
1	30	69	71	1.03	252	3.55	15
1	31	74	72	0.97	184	2.56	18
1	21	68	71	1.04	260	3.66	26
MW±SA	24.2±6.0	70.4±2.8	71.0±1.8	1.01±0.02	223.8±32.0	3.16±0.43	18.8±5.2
2	21	68	56	0.82	169	3.02	17
2	23	78	39	0.50	215	5.51	10
2	24	77	71	0.92	244	3.44	16
2	26	60	54	0.90	200	3.70	13
2	21	71	63	0.89	180	2.86	12
MW±SA	23.0±2.1	70.8±7.3	56.6±11.8	0.81±0.16	201.6±29.0	3.71±0.95	13.6±2.8
3	14	78	61	0.78	139	2.28	17
3	16	69	17	0.25	47	2.76	4
3	16	78	50	0.64	44	0.88	1
3	22	74	64	0.86	118	1.84	10
3	31	65	41	0.63	80	1.95	11
MW±SA	19.8±6.9	72.8±5.7	46.6±18.9	0.63±0.21	85.6±42.0	1.94±0.62	8.6±6.2
4	14	50	8	0.16	10	1.25	1
4	14	68	30	0.44	56	1.87	5
4	15	71	31	0.44	54	1.74	7
4	17	54	20	0.37	22	1.10	4
4	26	58	27	0.47	25	0.93	9
MW±SA	17.3±5.0	60.2±9.0	23.0±9.5	0.38±0.11	33.4±20.0	1.38±0.37	5.2±3.0
5	10	62	11	0.18	2	0.18	2
5	13	67	9	0.13	26	2.89	0.9
5	13	57	0	0.00	9	0.00	0
5	16	79	8	0.10	14	1.75	2.2
5	22	46	3	0.07	12	4.00	0.8
MW±SA	14.8±4.5	62.2±12.1	6.2±4.5	0.10±0.06	12.6±8.7	1.76±1.54	1.2±0.9

4.2.2. In situ Hybridisierung

Die ISH für Protamin 1 und Protamin 2 zeigte positive Signale in Spermatischen der Stadien VIII - XII und I - II (Stufe 8 - 14 Spermatischen) (Abb. 23). Das Expressionsmuster für die beiden Protamin-Transkripte war bei allen Gruppen identisch, jedoch sank der Prozentsatz der positiven Spermatischen deutlich von Gruppe 1 zu Gruppe 5 (Abb. 24). Gruppe 1, Prm 1-mRNA $96.6 \% \pm 0.5 \%$ und Prm 2-mRNA $97.5 \% \pm 0.3 \%$;

Gruppe 2, Prm 1-mRNA $95.9 \% \pm 2.6 \%$ und Prm 2-mRNA $96.8 \% \pm 1.3 \%$;

Gruppe 3, Prm 1-mRNA $89.0 \% \pm 5.2 \%$ und Prm 2-mRNA $92.5 \% \pm 4.9 \%$;

Gruppe 4, Prm 1-mRNA $87.3 \% \pm 5.3 \%$ und Prm 2-mRNA $92.3 \% \pm 1.8 \%$;

Gruppe 5, Prm 1-mRNA $73.2 \% \pm 15.8 \%$ und Prm 2-mRNA $85.6 \% \pm 4.9 \%$ (Tab. 8).

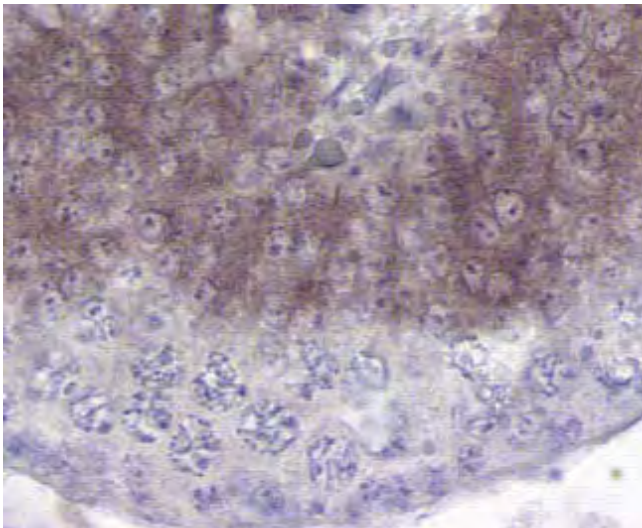


Abbildung 23: In situ Hybridisierung für Prm 1 und Prm 2 der Gruppe 1. Man erkennt positive Signale im Zytoplasma der Spermatischen, Stadium IX-X (Primärvergrößerung x40)

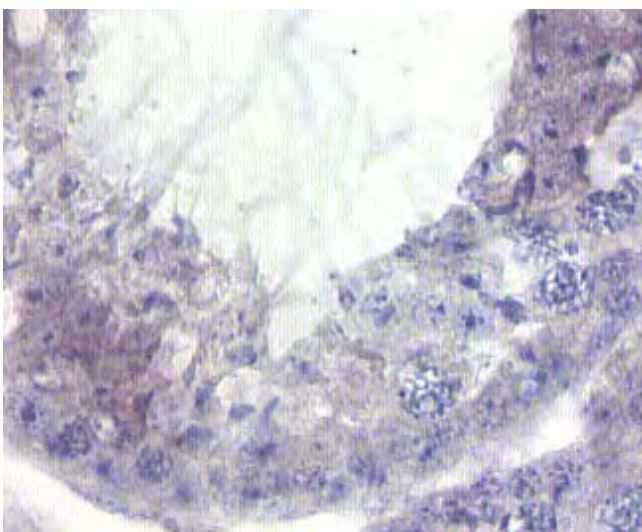


Abbildung 24: In situ Hybridisierung für Prm 1 und Prm 2 der Gruppe 5. Man erkennt positive Signale im Zytoplasma der Spermatischen, Stadium IX-X (Primärvergrößerung x40).

4.2.3. Immunhistochemie

4.2.3.1. Immunhistochemie gegen hyperacetyliertes Histon H4

Die Immunhistochemie gegen hyperacetyliertes Histone H4 zeigte bei allen Versuchsgruppen das selbe Expressionsmuster. Positive Signale wurden in den Zellkernen von Spermatogonien, leptotänen Spermatozyten und elongierten Spermatischen der Stadien IX-XII (Stufe 9 - 12 Spermatischen) gefunden (Abb. 25 und Abb. 26). Der Prozentsatz der positiven Spermatischen sank mit steigender TSA Konzentration und betrug bei

Gruppe 1: 97.5 % \pm 2.2 %,

Gruppe 2: 94.1 % \pm 4.6%,

Gruppe 3: 90.2 % \pm 4.9%,

Gruppe 4: 89.3 % \pm 6.7 %,

Gruppe 5: 64.8 % \pm 8.1 % (Tab. 8).

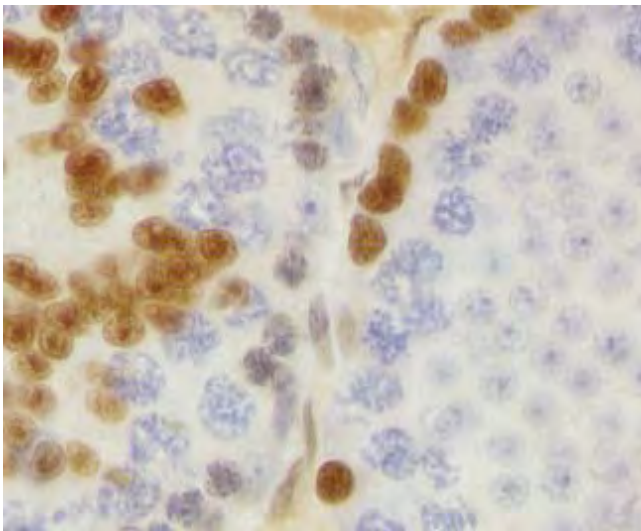


Abbildung. 25: Immunhistochemie für hyperacetyliertes Histon H4 der Gruppe 1. Man erkennt positive Signale in den Kernen von Spermatischen der Stadien IX-X und in Spermatischen (Primärvergrößerung x40).

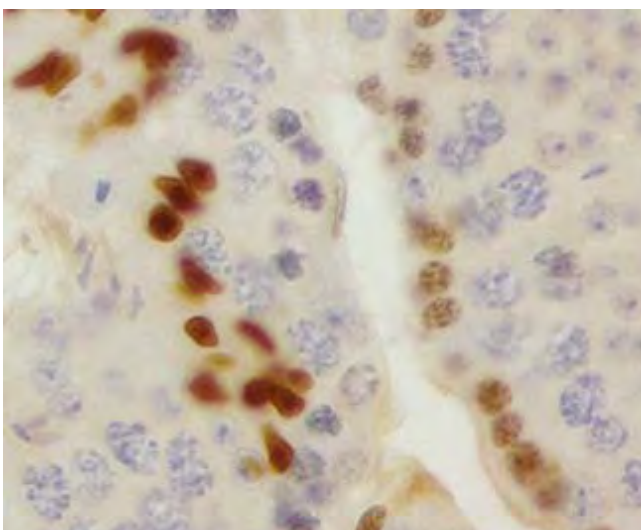


Abbildung 26: Immunhistochemie für hyperacetyliertes Histon H4 der Gruppe 5. Man erkennt positive Signale in Spermatischen der Stadien IX-X und in Spermatischen (Primärvergrößerung x40).

Tabelle 8: Auswertung der Immunhistochemie und der in situ Hybridisierung. Ac H4: Mittelwert der für hyperacetyliertes Histon H4 positiven runden Spermatiden (Stadien IX-XII). Prm 1: Mittelwert der für Prm 1-mRNA positiven runden Spermatiden (Stadien IX-X). Prm 2: Mittelwert der für Prm 2-mRNA positiven runden Spermatiden (Stadien IX-X), MW: Mittelwert, SA: Standardabweichung.

Gruppe	Ac H4 %	Prm 1 %	Prm 2 %
1	98.1	97.3	97.3
1	99.0	97.0	97.8
1	93.5	95.8	97.4
1	100.0	96.5	97.1
1	97.1	96.8	98.0
MW ± SA	97.5±2.2	96.6±0.5	97.5±0.3
2	98.0	93.0	95.4
2	85.2	92.9	96.8
2	96.8	96.0	96.3
2	94.1	98.9	99.5
2	96.7	98.7	96.3
MW ± SA	94.1±4.6	95.9±2.6	96.8±1.3
3	93.9	95.0	98.6
3	84.1	79.5	86.5
3	89.8	92.2	93.3
3	97.5	88.1	97.2
3	85.8	90.5	87.3
MW ± SA	90.2±4.9	89.0±5.2	92.5±4.9
4	94.5	81.9	91.1
4	94.3	90.9	92.7
4	93.4	88.5	91.0
4	86.0	94.6	95.7
4	73.7	80.6	91.0
MW ± SA	89.3±6.7	87.3±5.3	92.3±1.8
5	49.9	70.0	80.1
5	62.7	83.1	83.6
5	72.5	79.7	82.4
5	71.2	89.1	94.1
5	67.7	44.1	87.8
MW ± SA	64.8±8.1	73.2±15.8	85.6±4.9

4.2.3.2. PCNA-Immunhistochemie

Das Protein für „proliferating cell nuclear antigen“ (PCNA) konnte immunhistochemisch in Spermato gonien und primären Spermatozyten bis zu Stadium VII des Keimepithelzykluses nachgewiesen werden. Es zeigte sich in allen Gruppen ein identisches Expressionsmuster (Abb. 27 und Abb. 28).

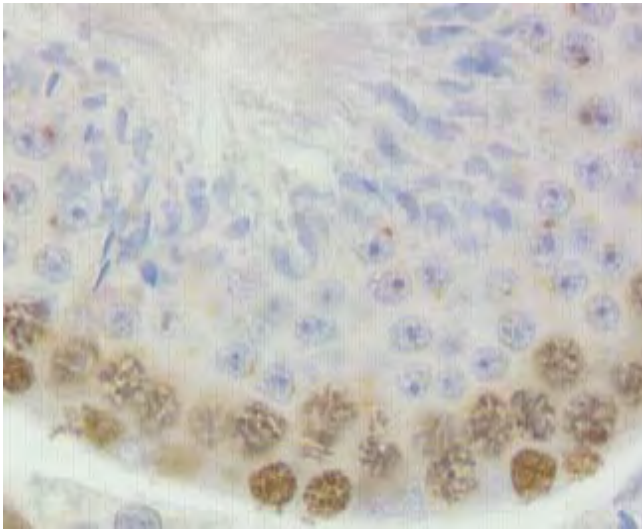


Abbildung 27: Immunhistochemie für PCNA der Gruppe 1. Man erkennt eine positive Reaktion in den Kernen der Spermato gonien und primären Spermatozyten (Primärvergrößerung x40).

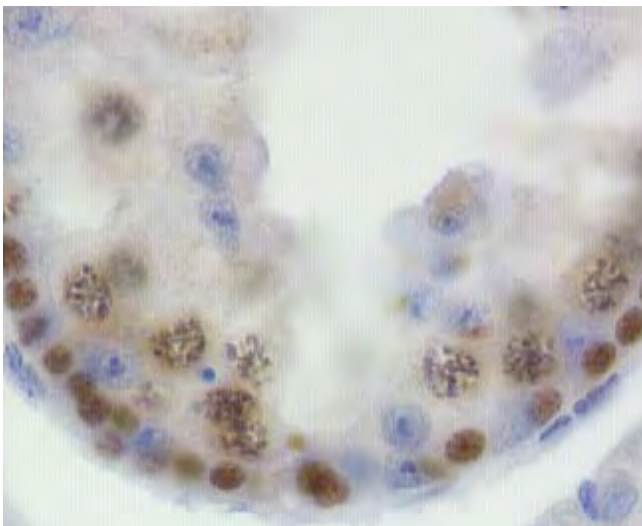


Abbildung 28: Immunhistochemie für PCNA der Gruppe 5. Man erkennt eine positive Reaktion in den Kernen von Spermato gonien und primären Spermatozyten (Primärvergrößerung x40).

4.2.4. Analyse der Apoptose

Die TUNEL-Methode zeigte bei unbehandelten Mäusen positive Signale für apoptotische Zellen überwiegend im basalen Kompartiment der Tubuli (externe Zellschicht, hier APOext genannt) (Abb. 29). Bei TSA behandelten Tieren wurden positive Signale dagegen überwiegend im adluminalen Kompartiment beobachtet (interne Zellschicht, hier APOint genannt) (Abb. 30). Die morphometrische Auswertung zeigte eine Abnahme der relativen apoptotischen Zellen in der externen Zellschicht (ausgedrückt als rAPOext) von Gruppe 1 (\bar{x}_g ; SF) (0.833; 2.05) zu Gruppe 5 (0.577; 1.64). Parallel hierzu wurde in der internen Zellschicht (ausgedrückt als rAPOint) eine Zunahme der apoptotischen Zellen beobachtet (Gruppe 1: 0.229; 2.37 und Gruppe 5: 14.258; 2.01). Die Gesamtzahl der apoptotischen Zellen (ausgedrückt als rAPOtot) stieg von Gruppe 1 (0.402; 2.07) zu Gruppe 5 (2.639; 1.43) (Tab.9).

Tabelle 9: Auswertung der TUNEL-Färbung angegeben als geometrischer Mittelwert (\bar{x}_g) und Streufaktor (SF). rAPOtot: relative Apoptose total, rAPOint: relative Apoptose intern, rAPOext: relative Apoptose extern.

Gruppe	rAPOtot	rAPOint	rAPOext
1	0.74	0.49	1.42
1	0.23	0.12	0.50
1	1.05	0.64	2.27
1	0.22	0.09	0.51
1	0.27	0.19	0.49
\bar{x}_g ; SF	0.402; 2.07	0.229; 2.37	0.833; 2.05
2	0.77	0.49	1.37
2	0.35	0.18	0.70
2	0.51	0.43	0.69
2	0.35	0.25	0.61
2	0.61	0.35	1.16
\bar{x}_g ; SF	0.492; 1.41	0.319; 1.51	0.860; 1.43
3	0.73	0.75	0.69
3	1.25	2.48	0.50
3	0.73	0.99	0.51
3	1.65	1.88	1.41
3	1.31	1.53	1.04
\bar{x}_g ; SF	1.075; 1.44	1.396; 1.62	0.762; 1.58
4	2.66	1.22	0.77
4	0.98	1.21	0.80
4	1.08	1.59	0.68
4	0.89	2.14	0.29
4	3.93	8.04	1.50
\bar{x}_g ; SF	1.579; 1.96	3.265; 2.72	0.711; 1.80
5	4.42	32.92	0.71
5	2.36	6.43	0.95
5	2.51	23.89	0.32
5	2.96	14.18	0.82
5	1.65	7.93	0.36
\bar{x}_g ; SF	2.639; 1.43	14.258; 2.01	0.577; 1.64

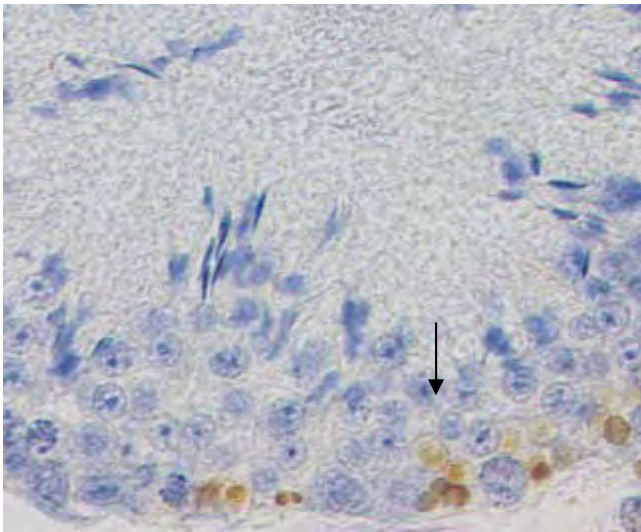


Abbildung. 29: TUNEL der Gruppe 1. Man erkennt apoptotische Zellen in der externen Zellschicht (Pfeil) (Primärvergrößerung x40).

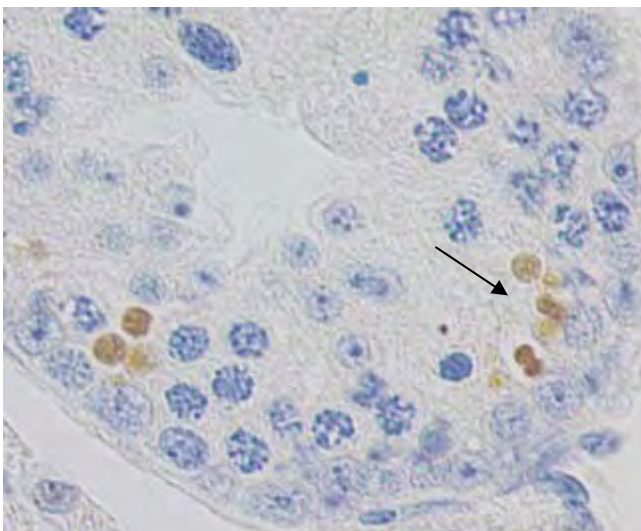


Abbildung 29: TUNEL der Gruppe 4. Man erkennt apoptotische Zellen in der internen Zellschicht (Pfeil) (Primärvergrößerung x40).

4.2.5. Ergebnisse des Fertilisierungsversuchs

Die erste Paarung (zur Bestimmung der Ausgangsfertilität) zeigte, dass alle Mäuse fertil waren. Die Mäuse aus Gruppe 6 bekamen durchschnittlich 6.8 ± 1.3 , die aus Gruppe 7 durchschnittlich 7.0 ± 1.0 Nachkommen. Nach TSA Behandlung wurden zwei Paarungsversuche durchgeführt: FV II zur Entfernung eventuell vorhandener Restspermien aus dem Nebenhoden (Vermeidung falsch-positiver Ergebnisse) und FV III zur Überprüfung der männlichen Fertilität nach TSA Behandlung bzw. vor Erholungsphase. In beiden Fällen waren die Mäuse infertil. Nach der Erholungsphase konnte die Wiederherstellung der Fertilität der TSA behandelten Mäusen beobachtet werden. Mäuse

aus Gruppe 6 bekamen durchschnittlich 7.5 ± 2.4 , die aus Gruppe 7 durchschnittlich 5.2 ± 3.7 Nachkommen (Tab. 10).

Tabelle 10. Ergebnisse des Fertilisierungsversuchs (FV). Angegeben sind jeweils die Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

Gruppe	TSA-Konzentration	I. FV	II. FV	III. FV	IV. FV
6	2.4 mg/kg	6.8 ± 1.3	0	0	7.5 ± 2.4
7	3.2 mg/kg	7.0 ± 1.0	0	0	5.2 ± 3.7

4.2.6. Statistische Analyse

Die statistische Analyse zeigte eine signifikante negative Korrelation zwischen der TSA Konzentration und dem relativen Hodengewicht (RHG) ($r_s = 0.91$, $p < 0.001$). Darüber hinaus korrelierte die TSA Konzentration mit der Abnahme der Keimzellen. Der Prozentsatz der Tubuli mit gestörter Spermatogenese stieg signifikant mit der TSA Konzentration ($r_s = -0.91$, $p < 0.001$). Die Regressionsgerade und der p-Wert bezüglich der statistischen Signifikanz des Anstiegs oder Abfalls dieser Geraden betrug für Spermatiden (y) in Abhängigkeit von der TSA – Konzentration (x) $y = 229.5 - 2.95 \cdot x$ ($p < 0.001$), für Metaphase Spermatozyten $y = 18.2 - 0.22 \cdot x$ ($p < 0.001$) und für pachytäne-diplotäne Spermatozyten $y = 73.3 - 0.81 \cdot x$ ($p < 0.001$). Die Zahl der leptotänen-zygotänen Spermatozyten und der Spermatogonien zeigte nur eine schwache Abhängigkeit mit der TSA Konzentration $y = 72.7 - 0.13 \cdot x$ ($p < 0.03$) und $y = 41.2 - 0.09 \cdot x$ ($p < 0.002$).

Der Quotient aus der Zahl der Spermatiden zur Zahl der pachytänen-diplotänen Spermatozyten korrelierte negativ mit der TSA Konzentration ($r_s = -0.52$, $p = 0.009$). Der Quotient pachytäner-diplotäner Spermatozyten zu leptotäner-zygotäner Spermatozyten sank signifikant mit steigender TSA Konzentration $y = 1 - 0.01 \cdot x$ ($p < 0.001$).

Die statistische Analyse zeigte ferner eine signifikante Korrelation der positiven Spermatiden für hyperacetyliertes Histon H4, sowie für die Transkripte von Prm 1 ($r_s = -0.82$, $p < 0.001$) und Prm 2 ($r_s = -0.77$, $p < 0.001$) und der TSA Konzentration ($r_s = -0.78$, $p < 0.001$).

Die statistische Analyse der TUNEL Ergebnisse zeigte eine positive Korrelation von rAPOint ($r_s = -0.67$, $p < 0.001$), aber nicht von rAPOext ($p = 0.23$) mit der TSA Konzentration. rAPOtot stieg signifikant mit der TSA Konzentration ($y = 0.09 + 0.37 \cdot x$ ($p < 0.001$)).

Die Unterschiede in der Nachkommenzahl zwischen den Gruppen 6 und 7 (Fertilisierungsversuche) waren statistisch nicht signifikant ($p=0.31$).

5. Diskussion

Einige Studien legten die Vermutung nahe, dass die Acetylierung von Core-Histonen während der Spermatogenese eine Rolle für den Histon-Protamin-Austausch spielen kann (HAZZOURI et al., 2000; PIVOT-PAJOT et al., 2003). Daher wurde in der vorliegenden Untersuchung der Acetylierungszustand des Histons H4 in Keimzellen während der normalen und gestörten Spermatogenese bei Mensch und Maus vergleichend analysiert.

Während der normalen Spermatogenese bei Mensch und Maus zeigte die Immunhistochemie mit dem polyklonalen Antikörper gegen hyperacetyliertes Histon H4 starke Signale in Spermatogonien und elongierenden Spermatiden. Das positive Signal in Spermatogonien beruht auf der mitotischen Aktivität dieser Zellen. Es ist bekannt, dass eine Acetylierung von Core-Histonen während der S-Phase der DNA-Replikation auftritt (BRADBURY, 1992; LOIDL und GROBNER, 1987). STEGER et al. (1998b) und HAZZOURI et al. (2000) zeigten mit Hilfe der Proliferationsmarker Ki-67 und PCNA, dass Spermatogonien mitotisch aktive Zellen sind. Die Markierung in den elongierenden Spermatiden fällt hingegen mit dem Histon-Protamin-Austausch zusammen. In vielen Tierarten (Fliege, Forelle, Hahn, Ratte) wurde die Hyperacetylierung von Histon H4 bereits mit der Kondensation des Chromatins während der Spermatogenese in Verbindung gebracht (WOLF et al., 1993; CHRISTENSEN et al., 1984; OLIVA und MEZQUITA, 1982; GRIMES und HENDERSON, 1984a, b). Beim Menschen findet dieser Prozess in Spermatiden der Stufe 4/5 statt (ROUX et al., 1988; LESCOAT et al., 1993; PRIGENT et al., 1996; STEGER et al., 2000). Dies stimmt mit den Daten von Ratte und Maus überein, bei denen hyperacetyliertes Histon H4 in elongierenden Spermatiden nachgewiesen wurde (MEISTRICH et al., 1992, HAZZOURI et al., 2000).

Es stellte sich nun die Frage, ob bei infertilen Männern der Acetylierungszustand der Keimzellen verändert ist. Die Untersuchungen hierzu zeigten, dass das Expressionsmuster für hyperacetyliertes Histon H4 bei diesen Patienten identisch mit dem von Männern mit normaler Spermatogenese war. Jedoch lag bei infertilen Männern der Prozentsatz immunpositiver Spermatiden signifikant unter dem Wert von Männern mit normaler Spermatogenese. Bei Männern mit Spermatidenreifungsdefekt sank er auf ca. 60 % im Vergleich zu ca. 100 % bei Männern mit normaler Spermatogenese. Von STEGER et al. (2001) wurde das Verteilungsmuster der für Prm 1- und Prm 2-mRNA positiven Spermatiden bei Patienten mit normaler und gestörter Spermatogenese ermittelt. Für Patienten mit quantitativ normaler Spermatogenese (in dieser Studie Gruppe 1) betrug die

Zahl ca. 80 %, bei qualitativ normaler Spermatogenese (in dieser Studie Gruppe 2) ca. 60% und bei gestörter Spermatogenese ca. 30 %. In der vorliegenden Arbeit wurde eine positive Korrelation zwischen dem Prozentsatz der positiven Spermatiden für hyperacetyliertes Histon H4 und dem Prozentsatz der für Prm 1- und Prm 2-mRNA positiven Spermatiden gefunden. Daraus lässt sich schließen, dass Störungen der Acetylierung in Spermatiden mit einer abnormalen Expression von Protaminen assoziiert sind, was schließlich zu einem inkorrekten Austausch der Histone gegen Protamine und zu Infertilität führt.

LAHN et al. (2002) berichteten, dass das humane CDY Gen und das Maus-homologe CDYL Gen für eine Histon-Acetyltransferase kodieren, die in die Hyperacetylierung von Histon H4 involviert ist. Das Genprodukt hat in vitro eine Acetyltransferaseaktivität und wurde in den Kernen von Spermatiden nachgewiesen. Die Verbindung von CDY mit dem Histon-Protamin-Austausch bietet eine mögliche Erklärung für die gestörte Spermatogenese bei Patienten mit einer Deletion des CDY-Gens.

In dieser Studie konnten bei infertilen Patienten zusätzlich für hyperacetyliertes Histon H4 positive pachytäne Spermatozyten gefunden werden, d.h. der Stopp der Spermatogenese könnte durch einen verfrühten Histon-Protamin-Austausch verursacht worden sein. Dies stimmt mit Daten bei transgenen Mäusen mit vorzeitiger Expression von Prm 1 überein, bei denen eine frühzeitige Chromatinkondensation und Sterilität beobachtet wurde (LEE et al., 1995).

Um weitere Informationen über die Bedeutung der Acetylierung für den Ablauf der Spermatogenese zu erlangen, wurde in der vorliegenden Studie die Wirkung des Histondeacetylase (HDAC) Inhibitors Trichostatin A (TSA) bei in vivo Applikation in der Maus untersucht.

Zu Beginn der Studie waren kaum Informationen über den Wirkmechanismus von TSA verfügbar. Nacktmäuse, denen verschiedene Tumorklinien implantiert wurden und denen anschließend über eine Periode von 40 Tagen täglich 25 µg (entspricht 1 mg/kg) TSA in 0.2 ml PBS injiziert wurde, zeigten keinen Gewichtsverlust und keine Anzeichen von Toxizität (QIU et al., 1999). Selbst eine tägliche subkutane Injektion von TSA in Höhe von 5 mg/kg über einen Zeitraum von 40 Tagen zeigte keine Anzeichen von Toxizität (VIGUSHIN et al., 2001). In der vorliegenden Studie wurde daher eine Konzentrationsreihe von TSA zwischen 0.8 mg/kg und 3.2 mg/kg gewählt. Aufgrund fehlender Informationen über die Pharmakokinetik wurde TSA subkutan gespritzt. Die

subkutane Gabe sollte eine möglichst gleichmäßige Versorgung mit dem Wirkstoff über einen längeren Zeitraum gewährleisten.

Die Histondeacetylasen sind in der Lage die Acetylgruppe an Lysinresten von Histonen und nicht-Histon Proteinen zu entfernen. So besitzt die Enzymfamilie durch Veränderung des Acetylierungsstatus der Histone die Fähigkeit, die Struktur des Chromatins zu modifizieren (NORTON et al., 1989; KRAJEWSKI und BECKER, 1998).

HAZZOURI et al. (2000) berichteten, dass es in Zellkulturen mit männlichen Keimzellen der Maus bei Zugabe von TSA zu einer Hyperacetylierung in runden Spermatiden kommt. Sie stellten die Hypothese auf, dass für die Produktion fertiler Spermatozoen sowohl die Hyperacetylierung in elongierenden Spermatiden, als auch die Hypoacetylierung in runden Spermatiden gewährleistet sein muss. Es stellte sich somit die Frage, ob die Applikation von TSA auch in vivo eine Hyperacetylierung von runden Spermatiden hervorrufen kann, und ob der damit verbundene verfrühte Histon-Protamin-Austausch zu männlicher Infertilität führt. Im Gegensatz zu der in vitro Studie von HAZZOURI et al. (2000) konnte in vivo nach TSA Behandlung immunhistochemisch keine Hyperacetylierung in runden Spermatiden festgestellt werden. Interessanter Weise konnte man mit steigender TSA Konzentration eine Abnahme der Markierung für hyperacetyliertes Histon H4 in elongierenden Spermatiden beobachten. Diese Werte stimmten mit der Expression der Prm 1- und Prm 2-mRNA in diesen Zellen überein. Vermutlich verursacht eine inkorrekte (Hyper)Acetylierung in elongierten Spermatiden bei der Maus eine abnormale Expression von Protaminen und einen gestörten Austausch der Histone gegen Protamine. Warum ein HDAC-Inhibitor in einer Zelle eine Hypoacetylierung verursacht, ist bislang jedoch unklar. Darüber hinaus nahm mit steigender TSA Konzentration die Zahl der Spermatiden signifikant ab. Ferner wurde in TSA-behandelten Hoden ein drastischer Verlust von pachytänen-diplotänen Spermatozyten beobachtet, während die Anzahl an Spermatogonien nicht signifikant verändert war. Diese Abnahme der Keimzellen könnte die morphologische Grundlage für die Infertilität und den Verlust des Hodengewichts der Tiere (Gruppe 4 und 5) sein.

Im Gegensatz zur Wirkung von TSA auf die Mitose existiert nur wenig Information über den Effekt auf die Meiose. Auch die Rolle acetylierter Kernhistone in der Meiose ist nicht ausreichend geklärt. Studien an Histon H4 zeigten, dass hyperacetylierte H4 Isoformen in pachytänen Spermatozyten nicht auftreten (GRIMES und HENDERSON 1984a; MEISTRICH et al., 1992; HAZZOURI et al., 2000; KIM et al., 2003; MAGNAGHI-

JAULIN und JAULIN, 2006). MAGNAGHI-JAULIN und JAULIN (2006) berichteten, dass bei *Xenopus laevis* die Histondeacetylase eine essentielle Rolle für die Kondensierung der Chromosomen während der Meiose spielt. Die Meiose-spezifische Deacetylierung durch HDAC1 beruht auf der Affinität des HDAC zu den Chromosomen in der Meiose (KIM et al., 2003).

Es ist bekannt, dass TSA und andere HDAC-Inhibitoren in immortalisierten Zellen einen Zellzyklusarrest, sowie eine Differenzierung und/oder Apoptose auslösen können (MARKS et al., 2000). Als Ursache hierfür wird eine selektive Transkription von Genen, die den Zellzyklus inhibieren, vermutet (JOHNSTONE et al., 2002). Dieser Effekt wird auf eine Acetylierung der Kernhistone und die Schaffung von offenen Chromatinarealen, die eine Transkription begünstigen, zurückgeführt (SPENCER und DAVIE, 1999; JENUWEIN und ALLIS, 2001). Veränderungen des Acetylierungsgrades von Histonen in diskreten Bereichen des Chromatins, die der Promotorregion verschiedener Gene entsprechen, können direkt mit der Aktivierung und Repression dieser Loci in Verbindung gebracht werden (KADOSH und STRUHL, 1998; RUNDLETT et al., 1998). Eine andere Möglichkeit besteht in der direkten Aktivierung durch Acetylierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie p53, GATA, TFIIE und TFIIF (IMHOF et al., 1997; VIGUSHIN und COOMBES, 2002).

Eigene Studien zeigen jedoch, dass die Meiose durch eine TSA Behandlung erheblich beeinflusst wird, was sich in einem veränderten Verhältnis von pachytänen-diplotänen zu leptotänen-zygotänen Spermatozyten zeigte. Da das Verhältnis von Metaphase-Spermatozyten zu pachytänen-diplotänen Spermatozyten konstant bleibt, scheint TSA in erster Linie während der Prophase der Meiose I zu wirken. Auch die Apoptose von Spermatozyten und Spermatiden korrelierte positiv mit steigender TSA Konzentration. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass pachytäne Spermatozyten in der Prophase der I. meiotischen Teilung sehr empfindlich auf TSA reagieren und zur Apoptose geführt werden.

Apoptose ist der programmierte Zelltod, bei dem die Zellen nach einem festgelegtem Programm in sog. Apoptosekörperchen zerfallen und im Falle des Keimepithels von Sertoli-Zellen phagozytiert werden (KERR et al., 1972). Im präpubertalen Hoden ist die Apoptose ein physiologischer Vorgang und findet spontan in verschiedenen Phasen der Keimzellentwicklung und -reifung statt. Die Häufigkeit und das Verteilungsmuster von apoptotischen Zellen sind von den ontogenetischen Entwicklungsstadien jeder Spezies

abhängig. Im Keimepithel vom 8.-22. postnatalen Tag bei der Maus (MORI et al., 1997) und vom 16.-28. postnatalen Tag bei der Ratte (BILLIG et al., 1995) befinden sich doppelt so viele apoptotische Zellen wie im Hoden adulter Tiere. Bei älteren Männern wurde gezeigt, dass eine erhöhte Apoptoserate der primären Spermatozyten für die Abnahme der Keimzellen und Störungen in der Spermatogenese verantwortlich ist (BRINKWORTH et al., 1997; KIMURA et al., 2003). Der Grund für diese beschleunigte Apoptoserate ist die geringere Expression von Apoptose-Hemmern, wie der B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)-Familie in primären Spermatozyten (KIMURA et al., 2003).

Die Apoptose im Keimepithel zeigt eine Abhängigkeit vom Serumspiegel der Gonadotropine LH und FSH, sowie von Testosteron. Bei Maus und Ratte verursacht der Entzug von LH und FSH einen Anstieg der Apoptoserate vorwiegend in Spermatozyten und Spermatischen (MARATHE et al., 1996; BILLIG et al., 1995). Die Hemmung des Testosterons durch den Einsatz des Leydig-Zell-Toxins Ethan-Dimethan-sulfonat (EDS) verursacht bei Spermatozyten und Spermatischen ebenfalls eine Erhöhung der Apoptoserate (HENRIKSEN et al., 1995). In dieser Studie zeigten Sertoli-Zellen und Leydig-Zellen eine intakte Histologie und keine Apoptosesignale. Zusätzliche histologische Untersuchungen der restlichen Reproduktionsorgane zeigten keine morphologischen Veränderungen gegenüber den Kontrolltieren, was vermuten läßt, daß die TSA-Wirkung auf den Hoden nicht durch Sexualhormone vermittelt wurde.

In den einzelnen Entwicklungsstadien durchlaufen die Keimzellen aufeinander folgende Prozesse der Differenzierung und der Proliferation und weisen dabei morphologisch und funktionell stadienspezifische Unterschiede auf. Die Apoptose ist durch die Eliminierung von fehlerhaften Mitose- und Meiose-Produkten ein wichtiger Bestandteil im Selektionsapparat von gesunden Keimzellen (ODORISIO et al., 1998; PRINT und LOVELAND, 2000; WOLGEMUTH et al., 2002). In der Literatur ist nur wenig über die Mechanismen, die eine apoptotische Reaktion in den einzelnen Spermatogenesestadien auslösen können bekannt. Die Tatsache, dass sowohl Fas, als auch Fas-Ligand im Hoden nachgewiesen werden könnten, deutet auf eine wichtige Rolle des Fas-Systems für die Apoptoseregulation bei Keimzellen hin. Im Maushoden exprimieren die Sertoli-Zellen den Fas-Liganden und die Keimzellen den Fas-Rezeptor (LEE et al., 1997). Die Expression des Fas-Liganden in Sertoli-Zellen führt zur Apoptose der Keimzellen, die durch ein Apoptosesignal stimuliert werden, Fas zu exprimieren. Andere Studien zeigten Gene, die bei der männlichen Keimzellapoptose eine Rolle spielen: p53 (YIN et al., 1998), Bcl-2 (FURUCHI et al., 1996; RODRIGUEZ et al., 1997), Bcl-w (PRINT et al., 1998) und Bax

KNUDSON et al., 1995). Es ist bekannt, dass TSA die Expression der mitochondrialen pro- und anti-apoptischen Gene reguliert. In vivo Behandlung mit TSA verursacht eine Aktivierung der pro-apoptischen (SAWA et al., 2001; HEROLD et al., 2002) und eine Reprimierung der anti-apoptischen Gene (ROSATO et al., 2003; DUAN et al., 2005).

Weitere Studien zur Wirkung von TSA auf die Spermatogenese (cRNA Microarray) zeigten, dass ein downstream Effektor von p53 (pmaip1/noxa) (ODA et al., 2000) nach TSA Behandlung hochreguliert war. Daraus lässt sich schließen, dass TSA die Apoptose der Keimzellen durch Aktivierung des p53-noxa-caspase 3 Weges verursacht. Es ist bekannt, dass das Protein p53 im Hoden hoch exprimiert ist (ALMON et al., 1993). Die Anwesenheit der p53-mRNA und des p53 Proteins in Spermatozyten deutet auf eine Rolle von p53 in der Prophase der Meiose hin (SCHWARTZ et al., 1993; SJOBLÖM und LAHDETIE, 1996).

Das p53 Protein ist ein Transkriptionsfaktor und wird als „Wächter des Genoms“ bezeichnet. Die Hauptaufgabe des p53-Proteins besteht während der Zellproliferation und der Zelldifferenzierung in der Sicherung der Genomintegrität in geschädigten Zellen durch Einleiten des G1-Arrestes oder der Apoptose. Das p53 Protein kommt normalerweise nur in geringer Konzentration im Zellkern der Zelle vor. Als Antwort auf zelluläre Stresssignale wird p53 aktiviert und im Zellkern akkumuliert (MALTZMAN und CZYZYK, 1984; REICH et al., 1983). Die Funktion des p53 Proteins beruht auf der Fähigkeit, sich spezifisch an doppelsträngige DNA zu binden. Dadurch ist es in der Lage, die DNA-Replikation und die DNA-Transkription von Genen zu regulieren (DONEYHOWER und BRADLEY, 1993) (Abb. 31).

Nach einer DNA-Schädigung kommt es zum Anstieg des intrazellulären p53 Spiegels. Beim Übergang von der Ruhe (G1)- in die Synthese (S)-Phase greift das p53-Protein in den Zellzyklus ein. Am Ende der G1-Phase wird der Zellzyklus gestoppt, so dass vor einer DNA-Replikation eine DNA-Reparatur möglich ist. Bei irreparablen Schäden der DNA löst das p53-Protein in den Zellen Apoptose aus. Man kann hier zwei Signalwege unterscheiden. Zum einen kontrolliert p53 die Expression von „death receptors“ an der Oberfläche der Zellen. Bindung der entsprechenden Liganden an diese Rezeptoren führt zur Aktivierung der Caspasen-Kaskade und dem Tod der Zelle. Zum anderen reagiert das p53-Protein mit der Bcl-2-Familie. Zu dieser Familie gehören Proteine, die sowohl anti-apoptische- (Bcl-2; Bcl-XL), als auch pro-apoptische- (Bax, Bak) oder regulatorische- (Bid, Bim, Noxa, Puma) Wirkung besitzen. Alle Proteine der Bcl-2 Familie regulieren die

Freisetzung des Cytochroms c aus Mitochondrien. p53 verursacht durch Bildung eines Komplexes mit Bcl-2 und Bcl-XL eine Instabilität der mitochondrialen Membran und dadurch eine Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien. Gleichzeitig wird die proapoptotische Aktivität der Proteine Bak und Bax durch mitochondriales p53 unterstützt. Das Bax-Gen besitzt an der Promotorregion eine Bindungsstelle für p53, demzufolge wird die Bax-Expression von p53 reguliert (MIYASHITA und REED, 1995). Unabhängig von der Transkription kann p53 Bax direkt im Zytosol aktivieren, was zur Freisetzung von Cytochrom c führt. Cytochrom c bildet mit (d)ATP, Apaf-1 (apoptotic protease activating factor) und Pro-Caspase-9 das sog. Apoptosom. Die aktive Caspase 9 löst die ganze Caspasen-Kaskade im Apoptosom aus. In vitro wurde ein Anstieg der Apaf-1-Expression nach TSA Behandlung beobachtet (SOENGAS et al., 2001).

Die Aktivität von p53 wird durch Partnerproteine reguliert, von denen das MDM2 (Murine Double Minute Gen 2)-Protein ein wichtiger Bindungspartner ist. Zusätzlich wird die Aktivität des p53-Proteins über eine Reihe miteinander verknüpfter posttranslationaler Mechanismen reguliert (BALINT und VOUSDEN, 2001; JAYARAMAN und PRIVES, 1999; OREN, 1999; OMASUNDARAM, 2000; VOUSDEN, 2002).

Die DNA-Schädigung führt zu einer Acetylierungskaskade des p53-Proteins, bei der die Koaktivatoren/Histonacetyltransferasen (p300/CBP, PCAF) einbezogen werden, die für die transkriptionelle Funktion von p53 entscheidend sind (BARLEV et al., 2001). Eine Acetylierung am C-Terminus durch die Acetyltransferase PCAF verursacht eine sequenzspezifische Bindung des p53-Proteins an die DNA (LIU et al., 1999). Der Co-Aktivator p300/CBP acetyliert sowohl die Core-Histone (erleichtert den Zugang von Transkriptionsfaktoren zur DNA), als auch Transkriptionsfaktoren wie p53 (LIU et al., 1999; BARLEV et al., 2001) (Abb. 31).

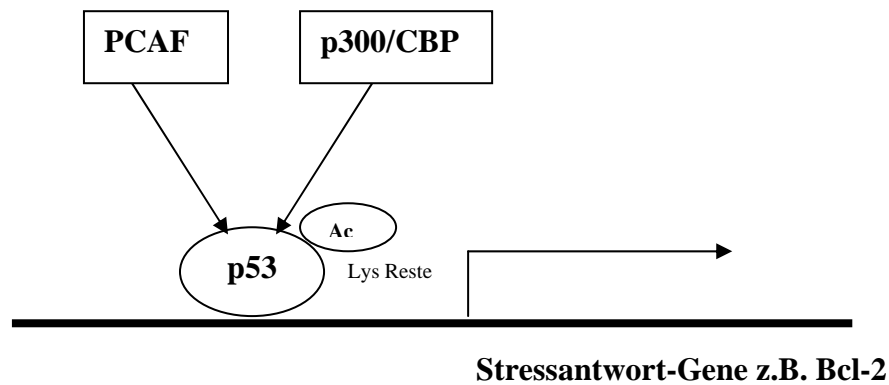


Abbildung 31: Aktivierung von p53 durch Acetylierung. Acetyltransferase PCAF und Koaktivator p300/CBP sind in der Lage durch Änderungen der Acetylierung die Aktivität des p53 zu beeinflussen.

Histondacetylasen sind für die Absenkung der p53-Aktivität verantwortlich (JUAN et al., 2000). Vermutlich führt eine Inhibition der HDAC-Aktivität zu einer Hochregulierung der p53-Aktivität. In dieser Studie konnten keine Änderungen im Acetylierungsstatus der Histone nach TSA Behandlung nachgewiesen werden. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Apoptose der Spermatozyten durch eine direkte Acetylierung der Genpromotoren oder/und Proteine verursacht wird. ITO et al. (2001) berichteten, dass die Zugabe von TSA in vitro eine Acetylierung des p53-Proteins verursacht. Bislang ist jedoch nicht bekannt, ob eine in vivo Applikation von TSA zur Acetylierung des p53-Proteins führen kann.

Physiologisch wird der p53 Signalweg, der in Zellen zur Apoptose führt, nach DNA-Schäden eingeschaltet. Das DNA-Toxin Cisplatin führt durch eine Vernetzung von DNA-Strängen bei der Maus zu einem massiven Verlust der Keimzellen und schließlich zur Infertilität (SAWHNEY et al., 2005). Interessanter Weise waren hauptsächlich Spermatozyten und Spermatisden betroffen. Neben diesen Wirkungen führt Cisplatin auch zur Hemmung der DNA-Reparatur und der Telomeraseaktivität. In diesen Studien könnte die Meiose spezifische Wirkung von TSA auf eine direkte Verbindung mit der DNA hinweisen. Die Frage, ob TSA während der Prophase in den Umbau der DNA involviert ist, bleibt jedoch offen. In der vorliegenden Studie zeigte TSA eine deutliche Spezifität für Spermatozyten. Aus der Literatur ist bekannt, dass Störungen in verschiedenen Stufen der Prophase zur Apoptose der Spermatozyten führen können. Bei SCP3 (Synaptonemal

Komplex Protein 3) Knockout Mäusen tritt eine massive Apoptose in pachytänen Spermatozyten auf (YUAN et al., 2000). Bei der Maus wurde das Protein FKBP6 (FK506 binding protein-6) bei der Paarung der homologen Chromosomen identifiziert. Die Inaktivierung des FKBP6 Genes führt zum Verlust der Spermatozyten und zu Azoospermie (CROCKOWER, 2003). BRCA1 (breast tumor suppressor gene1) spielt für die DNA-Reparatur und das „crossing over“ eine entscheidende Rolle. Bei männlichen Brcal-Mausmutanten wurde ein Arrest der Spermatogenese und Apoptose ausschließlich der Spermatozyten auf der Stufe des Pachytäns beobachtet, die über den p53-Signalweg eliminiert wurden (XU et al., 2003). Bei infertilen Männern führen Störungen in der Chromosomenpaarung und -rekombination zu Infertilität (SUN et al., 2005). In einer Studie von EVERET et al. (1996) wurde eine positive Korrelation der Häufigkeit der fehlerhaften Paarung der Chromosomen während des Pachytäns, sowie Non-Disjunction in der Anaphase mit spontanem Zelltod nachgewiesen.

Die Prophase der Meiose ist durch die Kondensierung des Chromatins charakterisiert. Ein genereller Defekt der Kondensierung des Chromatins nach TSA Behandlung ist daher nicht auszuschließen.

TSA zeigte eine Hodenspezifität. Selbst bei der höchsten TSA Konzentration konnte kein negativer Effekt auf das Wohlbefinden, sowie das Verhalten der Tiere beobachtet werden. Histologische Untersuchungen anderer Organe (Prostata, akzessorische Geschlechtsdrüsen, Nieren, Milz, Leber, Darm, Pancreas) zeigten keine Veränderungen.

Viele Studien zeigen, dass Chemotherapeutika eine negative Wirkung auf die Spermatogenese haben. Durch Aktivierung verschiedener molekularer Signalwege kann es zu vorübergehender oder persistenter Infertilität kommen. Akuter Verlust der Keimzellen resultiert in vorübergehender Infertilität. Die verbleibenden Spermatogonien sind in der Lage, das Keimepithel neu aufzubauen, sofern die Stammzellen unbeschädigt bleiben. Dauerhafte Infertilität kommt bei totalem Verlust der Stammspermatogonien vor. Spermatozyten sind die mitotisch aktiven Zellen im Keimepithel (STEGER et al., 1998 b). In der vorliegenden Studie zeigte dieser Zelltyp im Vergleich zur Kontrollgruppe eine unveränderte proliferative Aktivität (PCNA-Markierung). Auch konnte keine gesteigerte Anzahl von Apoptose (TUNEL-Markierung) festgestellt werden. Die Fertilität der Mäuse wurde in einem zweiten Experiment überprüft. Hierbei zeigte sich, dass bei täglicher Applikation von TSA über einen Zeitraum von 35 Tagen – dies entspricht der Dauer eines Keimepithelzyklusses bei der Maus – sämtliche männliche Tiere infertil waren. Darüber

hinaus fand sich nach Absetzen des Medikamentes eine komplette Regeneration der Spermatogenese, sowie eine Regeneration der Fertilität. Aus diesen Beobachtungen ist zu vermuten, dass die Spermatogonien erhalten bleiben und TSA keinen Effekt auf den mitotischen Zellzyklus männlicher Keimzellen ausübt.

Die Wirkung von TSA auf Zellen, die sich im adluminalen Kompartiment befinden, kann auf eine durch Sertoli-Zellen vermittelte Übertragung hinweisen. Die Resistenz der Spermatogonien auf TSA bekräftigt zudem die Vermutung, dass TSA seine Wirkung auf Keimzellen eventuell durch Sertoli-Zellen ausübt. Funktionelle Störungen der Sertoli-Zellen durch Mono-(2-ethylhexyl)-phthalat (MEHP) resultieren in einer Induktion der Apoptose in Spermatozyten (LEE et al., 1999). In dieser Studie konnten in den Sertoli-Zellen keine morphologischen Änderungen oder Zeichen von Apoptose gefunden werden.

Resumé

Während der normalen Spermatogenese konnte hyperacetyliertes Histon H4 bei Mensch und Maus in Spermatogonien (Mitose) und elongierenden Spermatischen (Histon-Protamin-Austausch) nachgewiesen werden.

Bei infertilen Männern mit Spermatischenreifungsdefekt zeigten bereits pachytäne Spermatozyten ein positives Signal für hyperacetyliertes Histon H4. Die vorzeitige Histonacetylierung könnte durch einen verfrühten Histon-Protamin-Austausch ursächlich für die männliche Infertilität verantwortlich sein.

Bei Mäusen führte eine in vivo Applikation des HDAC-Inhibitors TSA zu männlicher Infertilität, die nach Abschluss der Medikation jedoch vollständig reversibel war. Histologische Untersuchungen zeigten einen spezifischen Effekt auf die pachytäne Spermatozyten, die durch Apoptose eliminiert wurden. Zur Klärung des genauen Wirkmechanismus sind jedoch weitere Untersuchungen nötig.

6. Zusammenfassung

Der Histon-Protamin-Austausch ist für die männliche Fertilität von entscheidender Bedeutung. Während die Expression von Protaminen in erster Linie durch den Transkriptionsfaktor CREM reguliert wird, spielt für den Histon-Protamin-Austausch die Acetylierung von Histonen eine wichtige Rolle. Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Untersuchung von hyperacetyliertem Histon H4. Immunhistochemische Untersuchungen an menschlichem Biopsiematerial zeigten während der normalen Spermatogenese ein starkes Signal für hyperacetyliertes Histon H4 in den Kernen von Spermatogonien und elongierenden Spermatiden. Der Prozentsatz an immunpositiven Spermatiden lag bei $98.2\% \pm 1.1\%$ und war signifikant erniedrigt bei infertilen Männern mit zumindest qualitativ normaler Spermatogenese (Score 10-8, $93.1\% \pm 6.6\%$) und gestörter Spermatogenese (Score 7-1, $74.9\% \pm 23.4\%$). In Hodentubuli mit Spermatogenese-arrest auf der Stufe von runden Spermatiden waren sogar nur $59.5\% \pm 16.5\%$ der Spermatiden positiv für hyperacetyliertes Histon H4. Hier zeigte sich zudem ein zusätzliches Signal in den Zellkernen von pachytänen Spermatozyten. Diese Ergebnisse zeigten, dass eine gestörte Spermatogenese mit einer signifikanten Verringerung von für hyperacetyliertes Histon H4 positiven Spermatiden verbunden ist. Das vorzeitige Auftreten von hyperacetylierten Histon H4 in pachytänen Spermatozyten könnte über einen vorzeitigen Histon-Protamin-Austausch die Infertilität verursachen. So wurde in transgenen Mäusen gezeigt, dass die vorzeitige Expression von Protamin-1 zu Sterilität führt.

Der Grad der Acetylierung von Core-Histonen wird durch zwei Enzyme kontrolliert, Histon-Acetyltransferasen (HATs) und Histon-Deacetylasen (HDACs). In isolierten Spermatiden der Maus wurde gezeigt, dass eine Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor Trichostatin A (TSA) zu einem Anstieg der Acetylierung in runden Spermatiden führt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der in vivo Effekt von subkutan injiziertem TSA auf die Spermatogenese/Fertilität der Maus untersucht. Es zeigte sich eine dosis-abhängige Abnahme des relativen Hodengewichts, die auf eine gestörte Spermatogenese zurückgeführt werden konnte. Männliche Mäuse wurden durch die TSA-Behandlung vollkommen infertil. Dieses Phänomen war komplett reversibel. Interessanter Weise konnten keine Anzeichen einer Histon H4 Hyperacetylierung in runden Spermatiden gefunden werden. Jedoch nahm die Zahl der Spermatiden mit steigender TSA-Dosis signifikant ab. Zudem konnte eine dramatische Abnahme der Spermatozyten im Pachytän-Diplotän beobachtet werden, was auf eine gesteigerte Apoptose zurückgeführt werden

konnte. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß TSA auf der Ebene der Meiose wirkte. Es konnte kein toxischer Effekt von TSA beobachtet werden. Die restlichen Reproduktionsorgane zeigten keine morphologischen Veränderungen gegenüber den Kontrolltieren, was darauf schließen läßt, dass die TSA Wirkung auf den Hoden nicht durch Sexualhormone vermittelt wurde.

Männer mit Spermatidenreifungsdefekt zeigten eine signifikant verminderte Anzahl von Protamin positiven Spermatiden, assoziiert mit einer verfrühten (in Spermatozyten) und reduzierten (in Spermatiden) Hyperacetylierung von Histon H4. In vivo Applikation des HDAC-Inhibitor Trichostatin A führte in männlichen Mäusen zu einer reversiblen Infertilität. Histologische Untersuchungen zeigten eine Abnahme der Zahl der Spermatiden und pachytänen Spermatozyten, was vermuten lässt, dass TSA primär auf die Meiose wirkt.

7. Summary

Histone-to-protamine exchange in haploid spermatids plays a vital role for male fertility. While protamine expression is primarily regulated by the transcription factor CREM, acetylation of core histones is important for histone displacement. The present study focussed on hyperacetylated histone H4. Immunohistochemical investigations on human testis biopsies revealed a strong signal for hyperacetylated histone H4 in the nuclei of spermatogonia and elongating spermatids during normal spermatogenesis. The percentage of immunopositive spermatids was $98.2 \% \pm 1.1 \%$ and was significantly decreased in infertile men with at least qualitative normal spermatogenesis (score 10-8, $93.1 \% \pm 6.6 \%$) and impaired spermatogenesis (score 7-1, $74.9 \% \pm 23.4 \%$). In seminiferous tubules with spermatogenic arrest at the level of round spermatids, only $59.5 \% \pm 16.5 \%$ of spermatids were positive for hyperacetylated histone H4. Here, an additional signal was present in the nuclei of pachytene spermatocytes. These data demonstrate that impaired spermatogenesis is associated with a significant decrease of hyperacetylated histone H4 in spermatids. The precocious occurrence of hyperacetylated histone H4 in pachytene spermatocytes may result in a premature histone-to-protamine exchange causing infertility. It has been demonstrated in transgenic mice that precocious expression of protamine-1 results in sterility.

The acetylation status of core-histones is regulated by two enzymes, histone-acetyltransferases (HATs) and histone-deacetylases (HDACs). In isolated murine spermatids, it has been demonstrated that treatment with the HDAC-inhibitor trichostatin-A is followed by an increase of acetylation in round spermatids.

In the present study, the in-vivo effect of subcutaneously injected TSA on spermatogenesis/fertility of the mouse has been investigated. A dose-dependent decrease of the relative testis weight due to impaired spermatogenesis could be demonstrated. During the TSA treatment, male mice became infertile, a phenomenon that was completely reversible. No signs of histone H4 hyperacetylation in round spermatids could be observed, however, the number of spermatids significantly decreased with increasing TSA dose. In addition, a dramatic decrease of pachytene-diplotene spermatocytes could be observed. This was caused by apoptosis. Data suggest that TSA affects primarily meiosis. No toxic effect of TSA could be observed. In addition, other reproductive organs revealed no

morphological changes when compared with control animals suggesting that the effect of TSA on the testis does not act via sexual hormones.

Men with round spermatid maturation arrest exhibited a significantly decreased number of protamine positive spermatids and a both precocious (in spermatocytes) and decreased (in spermatids) hyperacetylation of histone H4. In-vivo application of the HDAC-inhibitor trichostatin-A resulted in reversible infertility in male mice. Histological examinations revealed a decreased number of spermatids and pachytene spermatocytes suggesting that TSA primarily affects meiosis.

8. Literaturverzeichnis

- Abbott DW, Laszczak M, Lewis JD, Su H, Moore SC, Hills M, Dimitrov S, Ausio J. Structural characterization of macroH2A containing chromatin. *Biochemistry* 2004; 43: 1352-1359
- Adler ID. Comparison of the duration of spermatogenesis between male rodents and humans. *Mutat Res* 1996; 352: 169-172
- Akhmanowa A, Miedema K, Wang Y, van Bruggen M, Berden JH, Moudrianakis EN, Hennig W. The localization of histone H3.3 in germ line chromatin of *Drosophila* males as established with a histone H3.3-specific antiserum. *Chromosoma* 1997; 106: 335-347
- Albig W, Bramlage B, Gruber K, Klobeck HG, Kunz J, Doenecke D. The human replacement histone H3.3B gene (H3F3B). *Genomics* 1995; 264-272
- Albig W, Ebentheuer J, Klobeck G, Kunz J, Doenecke D. A solitary human H3 histone gene on chromosome 1. *Hum Genet* 1996; 97: 486-491
- Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1964; 51: 786-794
- Almon E, Golgfinger N, Kapon A, Schwartz D, Levine AJ, Rotter V. Testicular tissue-specific expression of the p53 suppressor gene. *Dev Biol* 1993; 156: 107-116
- Aul RB, Oko RJ. The major subacrosomal occupant of bull spermatozoa is a novel histone H2B variant associated with the forming acrosome during spermiogenesis. *Dev Biol* 2001; 239: 376-387
- Baarends WM, Hoogerbrugge TW, Roest HP, Ooms M, Vreeburg J, Hoeijmakers JHJ; Grootegoed JA. Histone ubiquitination and chromatin remodeling in mouse spermatogenesis. *Dev Biol* 1999; 207: 322-333
- Balhorn R, Reed S, Tanphaichitr N. Aberrant protamine1/protamine2 ratios in sperm of infertile human males. *Experientia* 1988; 44: 52-55
- Balint E E, Vousden K H. Activation and activities of the p53 tumor suppressor protein. *Br J Cancer* 2001; 85: 1813-1823
- Barlev NA, Liu L, Chehab NH, Mansfield K, Harris KG, Halazonetis TD, Berger SL. Acetylation of p53 Activates Transkription through Recruitment of Coactivators/Histone Acetyltransferases. *Mol Cell* 2001; 8: 1243-1254

- Barone J, De Lara J, Cummings K, Ward S. DNA organization in human spermatozoa. *J Androl* 1994; 15: 139-144
- Bedford JM, Calvin HI, Cooper GW. The maturation of spermatozoa in human epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* 1973; 18: 199-213
- Belokopytova IA, Kostyleva EI, Tomilin AN, Vorob'ev VI. Human male infertility may be due to a decrease of the protamine P2 content in sperm chromatin. *Mol Reprod Dev* 1993; 34: 53-57
- Bergmann M, Kliesch S. 1.2. Spermatogenese. In: *Andrologie* 3. Auflage, Hrg. Krause W, Weidner W. F. Enke Verlag Stuttgart 1998; 9-14
- Bergmann M. II.1.3. Physiology of spermatogenesis. In: *Andrology for the clinician*. Schill W, Comhaire FH, Hargreave TB(Eds). Springer Verlag Berlin, Heidelberg 2006; 272-281
- Billig H, Furuta I, Rivier C, Tapanainen J, Parvinen M, Hsueh A J. Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology* 1995; 136: 5-12
- Blanchard Y, Lescoat D, LeLannou D. Anomalous distribution of nuclear basic proteins in round-headed human spermatozoa. *Andrologia* 1990; 22: 549-555
- Bloecher S, Behr R, Weinbauer GF, Bergmann M, Steger K. Different CREM-isoform gene expression between equine and human normal and impaired spermatogenesis. *Theriogenology* 2003; 60: 1357-69
- Bloecher S, Fink L, Bohle RM, Bergmann M, Steger K. CREM activator and repressor isoform expression in human male germ cells. *Int Androl* 2005; 28: 215-223
- Blendy JA, Kaestner KH, Weinbauer GF, Nieschlag E, Schütz G. Severe impairment of spermatogenesis in mice lacking the CREM gene. *Nature* 1996; 360: 162-165
- Boenisch T. Färbemethoden. In: *Handbuch II immunchemischer Färbemethoden*, Naish SJ (Hrsg.). DAKO Corporation, Carpinteria, 1989; 22-27
- Bradbury, E.M. Reversible histone modifications and the chromosome cell cycle. *Bioessays* 1992; 14: 9-16
- Bramlage B, Kosciessa U, Doenecke D. Differential expression of the murine histone genes H3.3A and H3.3B. *Differentiation* 1997; 62: 13-20
- Brinkworth MH, Weinbauer GF, Bergmann M, Nieschlag E. Apoptosis as a mechanism of germ cell loss in elderly men. *Int Androl* 1997; 20: 222-228

- Carrell DT, Emery BR, Peterson CM. The correlation of sperm chromatin decondensation following in vitro exposure to heparin and sperm penetration rates. *J Assist Reprod Genet* 1998; 15: 560-564
- Carrell DT, Liu L. Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. *J Androl* 2001; 22: 604-610
- Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Sedelnikova OA, Reina-San-Martin B, Coppola V, Meffre E, Difilippantonio MJ, Redon C, Pilch DR, Oлару A, Eckhaus M, Camerini-Otero RD, Tessarollon L, Livak F, Manova K, Bonner WM, Nussenzweig MC, Nussenzweig A. Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 2002; 296: 922-927
- Chen HY, Sun JM, Zhang Y, Davie JR, Meistrich ML. Ubiquitination of histone H3 in elongating spermatids of rat testes. *J Biol Chem* 1998; 273: 13165-13169
- Chevallier PH, Mauro N, Feneux D, Jouannet P, David G. Anomalous protein complement of sperm nuclei in some infertile men. *Lancet* 1987; 8562: 806-807
- Cho C, Willis WD, Goulding EH, Jung-Ha H, Choi YC, Hecht NB, Eddy EM. Haploinsufficiency of protamine-1 or-2 causes infertility in mice. *Nat Genet* 2001; 28: 82-86
- Choi YC, Gu W, Hecht NB; Feinberg AP, Chae CB. Molecular cloning of mouse somatic and testis-specific H2B histone genes containing a methylated CpG island. *DNA Cell Biol* 1996; 15: 495-504
- Christensen ME, Dixon GH. Hyperacetylation of histone H4 correlates with the terminal, transcriptionally inactive stages of spermatogenesis in rainbow trout. *Dev Biol* 1982; 93: 4040-415
- Christensen ME, Rattner JB, Dixon GH. Hyperacetylation of histone H4 promotes chromatin decondensation prior to the histone replacement by protamines during spermatogenesis in rainbow trout. *Nucl Acid Res* 1984; 12: 4575-4592
- Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat* 1963; 112: 35-51
- Couldrey C, Carlton MB, Nolan PM, Colledge WH, Evans MJ. A retroviral gene trap insertion into the histone H3.3A gene causes partial neonatal lethality, stunted growth, neuromuscular deficits and male sub-fertility in transgenic mice. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 2489-2495

- Crackower MA, Kolas NK, Noguchi J, Sarao R, Kikuchi K, Kaneko H, Kobayashi E, Kawai Y, Koziaradzki I, Landers R, Mo R, Hui CC, Nieves E, Cohen PE, Osborne LR, Wada T, Kunieda T, Moens PB, Penninger JM. Essential role of Fkbp6 in male fertility and homologous chromosome pairing in meiosis. *Science* 2003; 300: 1291-1295
- Davie JR. Covalent modifications of histones: expression from chromatin templates. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8:173-178
- Del Castillo EB, Trabuco A, de la Balze FA. Syndrome produced by absence of the germinal epithelium without impairment of the Sertoli or Leydig cells. *J Clin Endocr* 1947; 7: 493-502
- Delmas V, Laoide BM, Masquillier D, de Groot RP, Foulkes NS, Sassone-Corsi P. Alternative usage of initiation codons in mRNA encoding the cAMP-responsive-element modulator generates regulators with opposite functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 4226-30
- Delmas V, van der Hoorn F, Mellstrom B, Jegou B, Sassone-Corsi P. Induction of CREM activator proteins in spermatids: down-stream targets and implications for haploid germ cell differentiation. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 1502-14
- de Yerba L, Oliva R. Rapid analysis of mammalian sperm nuclear proteins. *Anal Biochem* 1993; 209: 201-203
- de Yerba L, Balleca JL, Vanrell J, Corzett M, Balhorn R, Oliva R. Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine P2 levels. *Fertil Steril* 1998; 69: 755-759
- Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, Zhou MM. Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* 1999; 491-496
- Dixon JR. *BMDP Statistical Software Manual*. Vols 1 and 2. Berkeley, Calif: University of California Press 1993
- Donehower LA, Bradley A. The tumor suppressor p53. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1155: 181-205
- Drabent B, Kardalidou E, Bode C, Doenecke D. Association of histone H4 genes with the mammalian testis-specific H1t histone gene. *DNA Cell Biol* 1995; 14: 591-597
- Drabent B, Bode C, Bramlage B, Doenecke D. Expression of the mouse testicular histone gene H1t during spermatogenesis. *Histochem Cell Biol* 1996; 106: 247-251
- Drabent B, Saftig P, Bode C, Doenecke D. Spermatogenesis proceeds normally in mice without linker histone H1t. *Histochem Cell Biol* 2000; 113: 433-442

- Duan H, Heckman CA, Boxer LM. Histone deacetylase inhibitors down-regulate bcl-2 expression and induce apoptosis in t(14;18) lymphomas. *Mol Cell Biol* 2005; 25:1608-1619
- Elliott DJ, Millar MR, Oghene K, Ross A, Kiesewetter F, Pryor J, McIntyre M, Hargreave TB, Saunders PT, Vogt PH, Chandley AC, Cooke H. Expression of RBM in the nuclei of human germ cells is dependent on a critical region of the Y chromosome long arm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 3848-3853
- Evenson DP. Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. *Reprod Fertil Dev* 1999; 11: 1-15
- Everet CA, Searle JB, Wallace BM. A study of meiotic pairing, nondisjunction and germ cell death in laboratory mice carrying Robertsonian translocations. *Genet Res* 1996; 67: 239-247
- Fantz DA, Hatfield WR, Horvath G, Kistler MK, Kistler WS. Mice with a targeted disruption of the H1t gene are fertile and undergo normal changes in structural chromosomal proteins during spermiogenesis. *Biol Reprod* 2001; 64: 425-431
- Franke K, Drabent B, Doenecke D. Testicular expression of the mouse histone gene H1.1. *Histochem Cell Biol* 1998; 109: 383-390
- Furuchi T, Masuko K, Nishimune Y, Obinata M, Matsui Y. Inhibition of testicular germ cell apoptosis and differentiation in mice misexpressing Bcl-2 in spermatogonia. *Development* 1996; 122: 1703-1709
- Gardiner-Garden M, Ballesteros M, Gordon M, Tam PPL. Histone- and protamine-DNA association: conservation of different patterns within the β -globin domain in human sperm. *Mol Cell Biol* 1998; 6: 3350-3356
- Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, Bradbury EM, Schmid CW. Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science* 1987; 236: 962-964
- Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, Schmid CW, Bradbury EM. Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histone. *J Biol Chem* 1990; 265: 20665-20666
- Gavrielli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119: 493-501
- Grimes SR, Henderson N. Hyperacetylation of histone H4 in rat testis spermatids. *Exp Cell Res* 1984a; 152: 91-97
- Grimes SR, Henderson N. Acetylation of rat testis histones H2B and TH2B. *Dev Biol* 1984b; 101: 516-521

- Grimes SR, Weisz-Carrington P, Daum H 3rd, Smith J, Green L, Wright K, Stein G, Stein J. A rat histone H4 gene closely associated with the testis-specific H1t gene. *Exp Cell Res* 1987; 173: 534-545
- Grimes SR, Wolfe SA, Anderson JV, Stein GS, Stein JL. Structural and functional analysis of the rat testis-specific histone H1t gene. *J Cell Biochem* 1990; 44: 1-17
- Hammadeh ME, al-Hasani S, Doerr S, Stieber M, Rosenbaum P, Schmidt W, Diedrich K. Comparison between chromatin condensation and morphology from testis biopsy extracted and ejaculated spermatozoa and their relationship to ICSI outcome. *Hum Reprod* 1999; 14: 363-367
- Hazzouri M, Pivot-Pajot C, Faure AK, Usson Y, Pelletier R, Sele B, Khochbin S, Rousseaux S. Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *Eur Cell Biol* 2000; 79: 950-960
- Henriksen K, Hakovirta H, Parvinen M. Testosterone inhibits and induces apoptosis in rat seminiferous tubules in a stage-specific manner: in situ quantification in squash preparations after administration of ethane dimethane sulfonate. *Endocrinology* 1995; 136: 3285
- Herold C, Ganslmayer M, Ocker M, Hermann M, Geerts A, Hahn EG, Schuppan D. The histone-deacetylase inhibitor Trichostatin A blocks proliferation and triggers apoptotic programs in hepatoma cells. *J Hepatol* 2002; 36: 33-40
- Hees H, Sinowatz F. *Histologie. Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln 2000
- Holstein AF, Schirren C. Histological evidence of testicular biopsies. In Schirren C, Holstein AF (eds), *Fortschritte der Andrologie*. Grosse Verlag Berlin 1983; 8: 108-117
- Holstein AF, Roosen-Runge EC, Schirren C. *Illustrated Pathology of human spermatogenesis*. Grosse Verlag Berlin 1988
- Hoyer-Fender S, Costanci C, Pehrson JR. Histone MacroH2A1.2 is concentrated in the XY-body by the early pachytene stage of spermatogenesis. *Exp Cell Res* 2000; 258: 254-260
- Huckins C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology proliferation, and maturation. *Anat Rec* 1971; 169: 533-558
- Iguchi N, Tanaka H, Yomogida K, & Nishimune Y. Isolation and characterization of a novel cDNA encoding a DNA-binding protein (Hils1) specifically expressed in testicular haploid germ cells. *Int J Androl* 2003; 26: 354-365

- Imhof A, Yang XJ; Ogryzko VV, Nakatani Y, Wolffe AP, Ge H. Acetylation of general transkription factors by histone acetyltransferase. *Curr Biol* 1997; 7: 689-692
- Ito A, Lai CH, Zhao X, Saito S, Hamilton MH, Appella E, Yao TP. p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *EMBO* 2001; 20: 1331-1340
- Jacobson RH, Ladurner AG, King DS, Tjian. Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science* 2000; 288: 1422-1425
- Jason LJ, Moore SC, Lewis JD, Lindsey G, Ausio J. Histone ubiquitination: a tagging tail unfolds? *Bioessays* 2002; 24: 166-174
- Jayaraman L, Prives C. Covalent and noncovalent modifiers of the p53 protein. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 76-87
- Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001; 293: 1074-1080
- Johnson SG. Testicular biopsy score count-a method for registration of spermatogenesis in human testis: normal values and results in 355 hypogonadal males. *Hormones* 1970; 1: 2-25
- Johnstone RW. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1: 287-299
- Juan LJ, Shia WJ, Chen MH, Yang WM, Seto E, Lin YS, Wu CW. Histone deacetylases specifically down-regulate p53-dependent gene activation. *J Biol Chem* 2000; 275: 20436-20443
- Kadosh D, Struhl K. Histone deacetylase activity of Rpd3 is important for transcriptional repression in vivo. *Genes Dev* 1998; 12: 797-805
- Kennedy BP, Davies PL. Acid-soluble nuclear proteins of the testis during spermatogenesis in the winter flounder. Loss of the high mobility group proteins. *J Biol Chem* 1980; 255: 2533-2539
- Kennedy BP, Davies PL. Phosphorylation of a group of high molecular weight basic nuclear proteins during spermatogenesis in the winter flounder. *J Biol Chem* 1981; 256: 9254-9259
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257
- Khara KK, Vlad M, Griffiths M, Kennedy CR. Human protamines and male infertility. *J Assist Reprod Genet* 1997; 14: 282-290
- Khochbin S. Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function. *Gene* 2001; 271:1-12

- Kimura M, Itoh N, Takagi S, Sasao T, Takahashi A, Masumori N, Tsukamoto T. Balance of apoptosis and proliferation of germ cells related to spermatogenesis in aged men. *J Androl* 2003; 24: 185-191
- Kim JM, Liu H, Tazaki M, Nagata M, Aoki F. Changes in histon acetylation during mouse oocyte meiosis. *J Cell Biol* 2003; 162: 37-46
- Knudson CM, Tung KS, Tourtellotte WG, Brown GA, Korsmeyer SJ. Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* 1995; 270: 96-99.
- Kornberg RD, Lorch Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 1999; 98: 285-294
- Krajewski WA, Becker PB. Reconstruction of hyperacetylated, DNase I-sensitive chromatin characterized by high conformational flexibility of nucleosomal DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 1540-1545
- Lahn BT, Tang ZL, Zhou J, Barndt RJ, Parvinen M, Allis CD, Page DC. Previously uncharacterized histon acetyltransferases implicated in mammalian spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 8707-8712
- Lalli E, Lee JS, Lamas M, Tamai K, Zazopoulos E, Nantel F, Penna L, Foulkes NS, Sassone-Corsi P. The nuclear response to cAMP: role of transcription factor CREM. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1996; 351: 201-209
- Laoide BM, Foulkes NS, Schlotter F, Sassone-Corsi P. The functional versatility of CREM is determined by its modular structure. *EMBO J* 1993; 12: 1179-1191
- Lee K, Haugen HS, Clegg CH, Braun RE. Premature translation of protamine 1 mRNA causes precocious nuclear condensation and arrest spermatid differentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 12451-12455
- Lee J, Richburg JH, Younkin SC, Boekelheide K. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology* 1997; 138: 2081-2088
- Lee J, Richburg JH, Shipp EB, Meistrich ML, Boekelheide K. The Fas system, a regulator of testicular germ cell apoptosis, is differentially up-regulated in Sertoli cell versus germ cell injury of the testis. *Endocrinology* 1999; 140: 852-858
- LeLannic G, Arkhis A, Vendrely E, Chevaillier P, Dadoune JP. Production, characterization, and immunocytochemical applications of monoclonal antibodies to human sperm protamines. *Mol Reprod Dev* 1993; 36: 106-112
- Lescoat D, Blanchard Y, Lavault MT, Querne D, LeLanou D. Ultrastructural and immunocytochemical study of P1 protamine localization in human testis. *Andrologia* 1993; 25: 93-99

- Lescoat D, Colleu D, Boujard D, LeLannou D. Electrophoretic characteristic of nuclear proteins from human spermatozoa. *Arch Androl* 1987; 20: 35-40
- Lewis JD, Abbott DW, Ausio J. A haploid affair: core histone transitions during spermatogenesis. *Biochem Cell Biol* 2003; 81: 131-140
- Lin Q, Sirotkin A, Skoultchi AI. Normal spermatogenesis in mice lacking the testis-specific linker histone H1t. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 2122- 2128
- Lin Q, Inselman A, Han X, Xu H, Zhang W, Handel MA, Skoultchi AI. Reductions in linker histone levels are tolerated in developing spermatocytes but cause changes in specific gene expression. *J Biol Chem* 2004; 279: 23525-25532
- Liu L, Scolnick DM, Trievel RC, Zhang HB, Marmorstein R, Halozonetis TD; Berger SL. p53 sites acetylated in vitro PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol Cell* 1999; 19: 1202-1209
- Loidl P, Grobner P. Postsynthetic acetylation of histones during the cell cycle: a general function for the displacement of histones during chromatin rearrangements. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 8351-8366
- Luetjens CM, Gromoll J, Engelhardt M, Eckardstein S, Bergmann M, Nieschlag E, Simoni M. Manifestation of Y-chromosomal deletions in the human testis: a morphometrical and immunohistochemical evaluation. *Hum Reprod* 2002; 17: 2258 - 2266
- Magnaghi-Jaulin L, Jaulin C. Histon deacetylase activity is necessary for chromosome condensation during meiotic maturation in *Xenopus laevis*. *Chromosome Res* 2006; 14: 319-332
- Mahadevaiah SK, Turner JM, Baudat F, Rogakou EP, de Boer P, Blanco-Rodrigues J, Jasin M, Keeney S, Bonner WM, Burgoyne PS. Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat Genet* 2001; 27: 271-276
- Maltzman W, Czyzyk L. UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol Cell Biol* 1984; 4: 1689-1694
- Marathe GK, Shetty J, Dighe RR. Specific immunoneutralization of FSH leads to apoptotic cell death of the pachytene spermatocytes and spermatogonial cells in the rat. *Endocrinology* 1996; 137: 2179-2182
- Marks PA, Richon VM, und Rifkind RA. Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1210-1216
- Martin-du Pan RC, Campana A. Physiopathology of spermatogenic arrest. *Fertil Steril* 1993; 60: 937-946

- Martianov I, Brancorsini S, Catena R, Gansmuller A, Kotaja N, Parvinen M, Sassone-Corsi P, Davidson I. Polar nuclear localization of H1T2, a histone H1 variant, required for spermatid elongation and DNA condensation during spermiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 2808-2813
- Marques CJ, Carvalho F, Sousa M, Barros A. Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. *Lancet* 2004; 363: 1700-1702
- Marushige K, Marushige Y, Wong TK. Complete displacement of somatic histones during transformation of spermatid chromatin: A model experiment. *Biochemistry* 1976; 15: 2047-2053
- Masquillier D, Foulkes NS, Mattei MG, Sassone-Corsi P. Human CREM gene: evolutionary conservation, chromosomal localization, and inducibility of the transcript. *Cell Growth Differ* 1993; 4: 931-937
- McKittrick E, Gafken PR, Ahmad K, Henikoff S. Histone H3.3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101: 1525-1530
- Meistrich ML, Bucci LR, Trostle-Weige PK, Brock WA. Histone variants in rat spermatogonia and primary spermatocytes. *Dev Biol* 1985; 112: 230-340
- Meistrich ML, Trostle-Weige PK, Lin R, Bhatnagar YM, Allis CD. Highly acetylated H4 is associated with histone displacement in rat spermatids. *Mol Reprod Dev* 1992; 31: 170-181
- Mitchell V, Steger K, Marchetti C, Herbaut JC, Devos P, Rigot JM. Cellular expression of protamine 1 und 2 transkripts in testicular spermatids from azoospermic men submitted to TESE-ICSI. *Mol Hum Reprod* 2005; 11: 373-379
- Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995; 80: 293-299
- Mori C, Nakamura N, Dix DJ, Fujioka M, Nakagawa S, Shiota K, Eddy EM. Morphological analysis of germ cell apoptosis during postnatal testis development in normal and hsp 70-2 knockout mice. *Dev Dyn* 1997; 208: 125-136
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 1998; 393: 386-9
- Nantel F, Monaco L, Foulkes NS, Masquillier D, LeMeur M, Henriksen K, Dierich A, Parvinen M, Sassone-Corsi P. Spermiogenesis deficiency and germ-cell apoptosis in CREM-mutant mice. *Nature* 1996; 380: 159-162

- Nieschlag E, Behre HM. *Andrologie. Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Singapur, Tokio 2000
- Nightingale KP, Wellinger RE, Sogo JM, und Becker PB. Histone acetylation facilitates RNA polymerase II transcription of the *Drosophila hsp26* gene in chromatin. *Embo J* 1998, 17: 2865-2876
- Nistal M, Jimenez F, Paniagua R. Sertoli-cell-only syndrome: relationships between Sertoli cell morphology and etiology. *Histology* 1990; 16: 173-180
- Norton VG, Imai BS, Yau P, Bradbury EM. Histone acetylation reduces nucleosome core particle linking number change. *Cell* 1989; 57: 447-457
- Oakberg EF. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycles of the seminiferous epithelium. *Am J Anat* 1956; 99: 507-516
- O'Carroll D, Scherthan H, Peters AH, Opravil S, Haynes AR, Laible G, Rea S, Schmid M, Lebersorger A, Jerratsch M, Sattler L, Mattei MG, Denny P, Brown SD, Schweizer D, Jenuwein T. Isolation and characterization of *Su39h2*, a second histone H3 methyltransferase gene that displays testis-specific expression. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 9423-9433
- Oda E, Ohki R, Mursawa H, Nemoto J, Shiube T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced Apoptosis. *Science* 2000; 12: 1053-1058
- Odorisio T, Rodrigues, Evans EP, Clarke AR, Burgoyne PS. The meiotic checkpoint monitoring synapsis eliminates spermatocytes via p53-independent apoptosis. *Nat Genet* 1998;18:202-204
- Oliva R, Mezquita C. Histone H4 hyperacetylation and rapid turnover of its acetyl groups in transcriptionally inactive rooster testis spermatids. *Nucleic Acids Res* 1982; 10: 8049-8059
- Omasundaram K. Tumor suppressor p53: regulation and function. *Front Biosci* 2000; 5: D424-D437
- Oren M. Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 1999; 274: 36031-36034
- Qiu L, Kelso MJ, Hansen C, West ML, Fairlie DP, Parsons PG. Anti-tumour activity in vitro and in vivo of selective differentiating agents containing hydroxamate. *Br J Cancer* 1999; 80: 1252-1258

- Parthun MR, Widom J, Gottschling DE. The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: link to chromatin replication and histone metabolism. *Cell* 1996; 87: 85-94
- Pehrson JR, Costanzi C, Dharia C. Developmental and tissue expression patterns of histone macroH2A1 subtypes. *J Cell Biochem* 1997; 65: 107-113
- Peters AH, O'Carroll D, Scherthan H, Mechtler K, Sauer S, Schofer C, Weipoltshammer K, Pagani M, Lachner M, Kohlmaier A, Opravil S, Doyle M, Sibilia M, Jenuwein T. Loss of the suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* 2001; 107: 323-337
- Pivot-Pajot C, Caron C, Govin J, Vion A, Rousseaux S, Kochbin S. Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 5354-5365
- Prigent Y, Müller S, Dadoune JP. Immunoelectron microscopical distribution of histones H2B and H3 and protamines during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 929-935
- Prigent C, Dimitrov S. Phosphorylation of serine 10 in histone h3, what for? *J Cell Sci* 2003; 116: 3677-3685
- Print CG, Loveland KL, Gibson L, Meehan T, Stylianou A, Wreford N, de Kretser Metcalf D, Kontgen F, Adams JM, Cory S. Apoptosis regulator bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 12424-12431
- Print CG, Loveland KL. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *Bioessays* 2000; 22: 423-430
- Rabini S, Franke K, Saftig P, Bode C, Doenecke D, Drabent B. Spermatogenesis in mice is not affected by histone H1.1 deficiency. *Exp Cell Res* 2000; 255: 114-124
- Ragakou EP, Pilch DR, Orr AH, Iwanowa VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 1998; 273: 5858-5868
- Rahlfs VW. TESTIMATE 6. Munich: Idv-Datenanalyse und Vesuchsplanung; 2002
- Rao BJ, Brahmachari SK, Rao MR. Structural organization of the meiotic prophase chromatin in the rat testis. *J Biol Chem* 1983; 258: 13478-13485
- Rasmussen TP, Huang T, Mastrangelo MA, Loring J, Panning B, Jaenisch R. Messenger RNAs encoding mouse histone macroH2A1 isoforms are expressed at similar levels in male and female cells and result from alternative splicing. *Nucleic Acid Res* 1999; 27: 3685-3689

- Reich N C, Oren M, Levine A J. Two distinct mechanisms regulate the levels of a cellular tumor antigen, p53. *Mol Cell Biol* 1983; 3: 2143-2150
- Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M, Rozen S, Jaffe T, Straus D, Hovatta O, de la Chapelle A, Silber S, Page DC. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet* 1995; 10: 383-393
- Rodrigues I, Ody C, Araki K, Garcia I, Vassalli P. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J* 1997; 16: 2262-2270
- Rosato RR, Almenara JA, Grant S. The histone deacetylase inhibitor MS-275 promotes differentiation or apoptosis in human leukemia cells through a process regulated by generation of reactive oxygen species and induction of p21CIP1/WAF1 1. *Cancer Res* 2003; 63: 3637-3645
- Roest HP, van Klaveren J, de Wit J, van Gurp CG, Koken MH, Vermey M, van Roijen JH, Hoogerbrugge JW, Vreeburg JT, Baarends WM, Bootsma D, Grootegoed JA, Hoeijmakers JH. Inactivation of the HR23B ubiquitinatin-conjugating DNA repair enzyme in mice causes male sterility associated with chromatin modification. *Cell* 1996; 86: 799-810
- Roux C, Mathieson J, Dadoune JP. Immunocytological distribution of HP1 group protamines in human testes and ejaculated spermatozoa. *Bull Assoc Anat Nancy* 1987; 71: 65-69
- Rundlett SE, Carmen AA, Suka N, Turner BM, Grundstein M. Transcriptional repression by UME6 involves deacetylation of lysine 5 of histone H4 by RPD3. *Nature* 1998; 392: 831-835
- Russel LD, Ettl RA, SinhaHikim AP, Clegg ED. *Histological and Histopathological evaluation of the testis*. Cache River Press, Clearwater FL 1990
- Sachs L. *Applied Statistic. A Handbook of Techniques*. Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin 1982
- Sakkas D, Urner F, Bianchhi PG, Bizzaro D, Wagner I, Jaquenoud N, Manicardi G, Campana A. Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996; 11: 837-843
- Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchhi PG, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 1999; 4: 31-37

- Sawa H., Murakami H, Ohshima Y, Sugino T, Nakajyo T, Kisanuki T, Tamura Y, Satone A, Ide W, Hashimoto I., Kamada H. Histone deacetylase inhibitors such as sodium butyrate and trichostatin A induce apoptosis through an increase of the bcl-2-related protein Bad. *Brain Tumor Pathol.* 2001; 18: 109–114
- Sawhney P, Giammona CJ, Meistrich ML, Richburg JH. Cisplatin-induced long-term failure of spermatogenesis in adult C57/BI/6Jmice. *J Androl* 2005; 26: 136-145
- Schwartz D, Goldfinger N, Rotter V. Expression of p53 protein in spermatogenesis is confined to the tetraploid pachytene primary spermatocytes. *Oncogene* 1993; 8: 1487-1494
- Shang E, Salazar G, Crowley TE, Wang X, Lopez RA, Wang X, Wolgemuth DJ. Identification of unique, differentiation stage-specific patterns of expression of the bromodomain-containing genes Brd2, Brd3, Brd4, and Brdt in the mouse testis. *Gene Expr Patterns* 2004; 4: 513-519
- Shires A, Carpenter MP, Chalkley R. New histones found in mammalian testes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975, 72: 2714-2718
- Siffroi JP, Alfonsi MF, Dadoune JP. Co-localization of HP1 and TP1 transcripts in human spermatids by double electron microscopy in situ hybridization. *Int J Androl* 1999; 22: 83-90
- Sigg C. Klassifizierung tubulärer Hodenatrophien bei Sterilitätabklärungen. Bedeutung der sogenannten bunten Atrophie. *Schweiz med Wschr* 1979; 109: 1284-1293
- Silvestroni L, Frajese G, Fabrizio M. Histones instead of protamines in terminal germ cells of infertile, oligospermic men. *Fertil Steril* 1976; 27: 1428-1437
- Simoni M, Kamischke A, Nieschlag E. Current status of the molecular diagnosis of Y chromosomal microdeletions in the work-up of male infertility. *Hum Reprod* 1998; 13: 1764-1768
- Sims RJ, Nishioka K, Reinberg D. Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet* 2003; 19: 629-639
- Sjoblom T, Lahdetie J. Expression of p53 in normal and gamma-irradiated rat testis suggests a role for p53 in meiotic recombination and repair. *Oncogene* 1996; 12: 2499-2505
- Soengas MS, Capodieci P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, McCombie R, Herman JG, Gerald WL, Lazebnik YA, Cordon-Cardo C, Lowe SW. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 2001; 409: 207-211

- Spencer VA, Davie JR. Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression. *Gene* 1999; 15: 1-12
- Steger K, Klonisch T, Gavenis K, Drabent B, Doenecke D, Bergmann M. Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod* 1998a; 4: 939-945
- Steger K, Aleithe I, Behre H, Bergmann M. The proliferation of spermatogonia in normal and pathological human seminiferous epithelium: an immunohistochemical study using monoclonal antibodies against Ki-67 protein and proliferating cell nuclear antigen. *Mol Hum Reprod* 1998b; 4: 227-233
- Steger K, Klonisch T, Gavenis K, Behr R, Schaller V, Drabent B, Doenecke D, Nieschlag E, Bergmann M, Weinbauer GF. Round spermatids show normal testis-specific H1t but reduced cAMP-responsive element modulator (CREM) and transition protein 1 (TP1) expression in men with round spermatid maturation arrest. *J Androl* 1999; 20: 747-754
- Steger K. Transkriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. *Anat Embryol* 1999; 199: 471-487
- Steger K, Pauls K, Klonisch T, Franke FE, Bergmann M. Expression of protamine-1 and 2 mRNA during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 219-225
- Steger K, Failing K, Klonisch T, Behre HM, Manning M, Weidner W, Hertle L, Bergmann M, Kliesch S. Round Spermatids from fertile men exhibit decreased levels of protamine-1 and 2 mRNA. *Hum Reprod* 2001; 16 :709-716
- Steger K. Haploid spermatids contain translationally repressed mRNAs. *Anat Embryol* 2001a; 203: 323-334
- Steger K. Spermatogenese und Spermatogenesestörungen. *Andrologie* 2001b; 17: 137-148
- Steger K, Fink L, Failing K, Bohle RM, Kliesch S, Weidner W, Bergman M. Decreased protamine -1 transcript levels in testes from infertile men. *Mol Hum Reprod* 2003; 9: 331-336
- Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000; 403: 41-45
- Sun F, Greene C, Turek PJ, KO E, Rademaker A, Martin RH. Immunofluorescent synaptonemal complex analysis in azoospermic men. *Cytogenet Genome Res* 2005; 111: 366-370
- Tanphaichitr N, Sohbon P, Taluppeth N, Chalermisarachai P. Basic nuclear protein in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. *Exp Cell Res* 1978; 117: 347-50

- Tovich PR, Oko RJ. Somatic histones are components of the perinuclear theca in bovine spermatozoa. *J Biol Chem* 2003; 278: 32431-32438
- Trostle-Weige PK, Meistrich ML, Brock WA, Nishioka K. Isolation and characterization of TH3, a germ cell-specific variant of histone 3 in rat testis. *J Biol Chem* 1984; 259: 8769-8776
- Tse C, Sera T, Wolffe AP, Hansen JC. Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 629-38.
- Tsuji N, Kobayashi M, Nagashima K, Wakisaka Y, Kaizumi K. A new antifungal antibiotic, trichostatin. *J Antibiot (Tokyo)* 1976; 29: 1-6
- Turner BM. Histone acetylation and control of gene expression. *J Cell Sci* 1991; 99: 13-20
- Turner JM, Mahadevaiah SK, Benavente R, Offenberg HH, Heyting C, Burgoyne PS. Analysis of male meiotic "sex body" proteins during XY female meiosis provides new insights into their functions. *Chromosoma* 2000; 109: 426-32
- Turner BM. Cellular memory and the histone code. *Cell* 2002; 111: 285-291
- van Lint C, Emiliani S, Verdin E. The expression of the small fraction of cellular genes is changed in response to histone acetylation. *Gen Expr* 1996; 5:245-253
- van Rooijen HJ, Ooms MP, Spaargaren MC, Baarends WM, Weber RF, Grootegoed JA, Vreeburg JT. Immunoexpression of testis-specific histone 2B in human spermatozoa and testis tissue. *Hum Reprod* 1998; 13: 1559-1566
- Villar-Garea A, Esteller M. Histone deacetylase inhibitors: understanding a new wave of anticancer agents. *Int J Cancer* 2004; 112: 171-178
- Vigushin DM, Ali S, Pace PE, Mirsaidi N, Ito K, Adcock I, Coombes RC. Trichostatin A is a histone deacetylase inhibitor with potent antitumor activity against breast cancer *in vivo*. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 971-976
- Vigushin, Coombes RC. Histone deacetylase inhibitors in cancer treatment. *Anticancer Drugs* 2002; 13: 1-13
- Vogt PH. Human chromosome deletions in Yq11, AZF candidate genes and male infertility: history and update. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 739-744
- Vousden K H. Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1602: 47-59
- Walker WH, Sanborn BM, Habener JF. An isoform of transcription factor CREM expressed during spermatogenesis lacks the phosphorylation domain and represses cAMP-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 12423-12427

- Walker WH, Habener JF. Role of transkription factors CREB and CREM in cAMP-regulated transcription during spermatogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 1996; 7: 133-138
- Waterborg JH, Harrington R. Western blotting of histones from acid-urea-Triton- and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1987; 162: 430-434
- Weinbauer GF, Behr R, Bergmann M, Nieschlag E. Testicular cAMP responsive element modulator (CREM) protein is expressed in round spermatids but is absent or reduced in men with round spermatid maturation arrest. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 9-15
- WHO Laborbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulats und der Spermien-Zervixschleim-Interaktion. Übersetzung: Nieschlag E, Nieschlag S, Bals-Pratsch M, Behre HM, Knuth UA, Meschede D, Niemeier M, Scick A. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Singapur, Tokio 1999
- Witt O, Albig W, Doenecke D. Testis-specific expression of a novel human H3 histone gene. *Exp Cell Res* 1996; 229: 301-306
- Wolgemuth DJ, Laurion E, Lele KM. Regulation of mitotic and meiotic cell cycles in the male germ line. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57: 75-101
- Wolf KW, Jeppesen P, Mitchell A. Spermatid nucleus of *Megaselia scalaris* Loew (Insecta, Diptera, Phoridae): a study using anti-histone antibodies, scanning electron microscopy and a centromer-specific oligonucleotide. *Mol Reprod Dev* 1993; 35: 272-276
- Wolfe SA, Anderson JV, Grimes SR, Stein GS, Stein JS. Comparison of the structural organization and expression of germinal and somatic rat histone H4 genes. *Biochim Biophys Acta* 1989; 1007: 140-150
- Wolffe AP, Dimitrov S. Histone-modulated gene activity: developmental implications. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1993; 3: 167-191
- Workman JL, Kingston RE. Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 545-579
- Wu JY, Ribar TJ, Cummings DE, Burton KA, McKnight GS, Means AR. Spermiogenesis and exchange of basic nuclear proteins are impaired in male germ cells lacking Camk4. *Nat Genet* 2000; 25: 448-452
- Xu X, Aprelikova O, Moens P, Deng C, Furth PA. Impaired meiotic DNA-damage repair and lack of crossing-over during spermatogenesis in BRCA1 full-length isoform deficient mice. *Development* 2003; 130: 2001-2012

- Yan W, Ma L, Burns KH, Matzuk MM. HILS1 is a spermatid-specific linker histone H1-like protein implicated in chromatin remodeling during mammalian spermiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 10546-10551
- Yin Y, Stahl BC, DeWolf WC, Morgentaler A. p53-mediated germ cell quality control in spermatogenesis. *Dev Biol* 1998; 204: 165-171
- Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem* 1990; 265: 17174-17179
- Yoshida M, Horinouchi S. Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function. *BioEssays* 1995; 17: 423-430
- Yuan L, Liu JG, Zhao J, Brundell E, Daneholt B, Hoog C. The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol Cell* 2000; 5: 73-83
- Zalensky AO, Siino JS, Gineitis AA, Zalenskaya IA, Tomilin NV, Yau P, Bradbury EM. Human testis/sperm-specific histone H2B (hTSH2B). Molecular cloning and characterization. *J Biol Chem* 2002; 277: 43474-43480
- Zheng Y, Yuan W, Zhou Z, Xu M, Sha JH. Molecular cloning and expression of a novel alternative splice variant of BRDT gene. *Int J Mol Med* 2005; 15: 315-21
- Zhong J, Peters AH, Lee K, Braun RE. A double stranded RNA-binding protein required for activation of repressed messages in mammalian germ cells. *Nat Genet* 1999; 22: 171-174
- Ziyyat A, Lassalle B, Testart J, Briot P, Amar E, Finaz C, Lefevre A. Flow cytometry isolation and reverse transcriptase-polymerase chain reaction characterization of human round spermatids in infertile patients. *Hum Reprod* 1999; 14: 379-387

9. Anhang**Chemikalien, Reagenzien, Antikörper, Behandlungsmaterial,
Verbrauchsmaterialien und Geräte**

Allgemeine Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid 30 % (Acrylamid/N, N-Methylenbisacrylamid); Sigma, München

Agarose; Roth, Karlsruhe

Amoniumpersulfat (APS); Sigma, München

Amino-Capronsäure (40 Mm); Sigma, München

Ampicillin (2,5 mg); Stratagene, Heidelberg

(3-Aminopropyl)triethoxysilane 3-Aminopropyl-ethoxysilan; Sigma, Steinheim

Bovines Serumalbumin (BSA); Fluka Chemie AG Buchs, Schweiz

100x BSA-Lösung; New England Biolabs, Frankfurt

Chloroform; Roth, Karlsruhe

Diaminobenzidin (DAB); Research Genetics, Karlsruhe

Dextransulfat; Sigma, München

Diethylpyrocarbonat (DEPC); Sigma, München

Digoxigenin RNA-Labeling; Roche

Dimethylformamid; Sigma, München

DNA-Purifikationssystem QIAEX II, Qiagen, Hilden

DNA-Ligase; Promega, Mannheim

DTT (Dithiothreitol); Sigma, Steinheim

EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)-Lösung; Sigma-Aldrich, Steinheim

Eisessig; Merck, Darmstadt

Ethanol; Schmitt, Dillenburg

Ficoll 400; Serva, Heidelberg

First strand buffer; Gibco BRL, Eggenstein

Formamid; Sigma, München

Formalin 35%ig; Sigma, München

Glycin; Sigma, München

HCl; Merck, Haar

Isopropylthiogalactosid (IPTG); Bioline, Luckenwalde

Isopropanol; Roth, Karlsruhe

Laemmli-Probenpuffer; Sigma, Steinheim

LB-Medium; Quantum Appligene
LB-Agar-Medium; Quantum Appligene
Levamisol; Sigma, München
Ligase-Puffer; Promega, Mannheim
Lithiumchlorid-Lösung (LiCl); Sigma, München
Magnesiumchlorid (MgCl₂)-Lösung; Serva, Heidelberg
Methanol; Merck, Darmstadt
Milchpulver; Milchwirtschaft, Marburg
MgCl₂-Lösung; Promega, Mannheim
Natriumcitrat (C₆H₅O₇Na₃ x 2H₂O); Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl); Merck, Haar
NBT/BCIP (Nitro-Blau-Tetrazolium / Bromo-Chloro-Indolyl-Phosphat) (Phosphatase Substrat); KPL, Wedel
Paraformaldehyd; Merck, Haar
Phosphate buffered saline (PBS); Sigma, München
PCR-Puffer; Gibco BRL, Eggenstein
Pikrinsäurelösung; Riedel-deHaen, Seelze
Polyvinylpyrolidon; Sigma, München
Proteinmarker „Prestained Precision Protein Standard“; Bio-Rad, München
Salmon-sperm-DNA; Sigma, München
Sybr[®]Green; Sigma, München
Tetracyclin (1,5 mg); Stratagene, Heidelberg
Tris-HCl; Sigma, München
Triton; Merck, Darmstadt
TRIzol[®]; Invitrogen, Karlsruhe
True Blue Peroxidase Substrate (TMB/H₂O₂)
Tween 20-R, Roth, Karlsruhe
5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galaktosidase (X-Gal); Invitrogen, Karlsruhe
Xylol; Roth, Karlsruhe
Yeast-t-RNA; Sigma, München
Ziegen Serum; Vector, Burlingame, USA

Antikörper

Anti-hyperacetyliertes Histon 4 (penta); Biomol, Hamburg

Anti-PCNA; Santa Cruz, Heidelberg

Anti-Digoxigenin-AP Fab-Fragment; Roche, Mannheim

Ziege-Anti-Kaninchen Sekundär Antikörper; DAKO; Hamburg

Behandlungsmaterial

Trichostatin A (TSA), {R-(E,E)}-7-{4-(Dimethyloamino)phenyl}-N-hydroxy-4,6-dimethyl-7-oxo-2,4-heptadienamid, C₁₇H₂₂N₂O₃, Biomol, Hamburg

Ketamin 10 % (Ketaminhydrochlorid); Medistar, Holzwickede

Ksylazin 2 % (Xylazinhydrochlorid); Serumwerk, Bernburg AG

NaCl; Sigma, München

Verbrauchsmaterialien

Spritzen, Braun, Melsungen

Nadel, Braun, Melsungen

Objektträger; R. Langenbrink, Teningen

Geräte

Blotting-Apparatur (Trans-Blot® SD-Dry Transfer Cell); Bio-Rad, München

Einbettgerät Leica EG 1160; Leica, Bensheim

Entwässerungsgerät Leica TP 1050; Leica, Bensheim

Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomat; Leica, Bensheim

Gelelektrophorese-Apparatur Agal Mini®; Biometra, Göttingen

Heizplatte; MAGV, Rabenau-Londorf

Lichtmikroskop „, Leica DM LB“; Leica Wetzlar

3-CCD Color Video Camera KY-F55B; JVC Friedberg

Mini-Protean 3® Electrophoresis Cell-Systems; Bio-Rad, München

Scanner AV630; Avison Inc, Taiwan

Schlittenmikrotom, Leica SM 2000 R; Leica, Bensheim

Sterilisator; Heraeus, Rabenau.

PowerPac 200 Power Supply; Bio-Rad, München

T3-Thermocycler; Biometra, Göttingen

Trockenschrank; Memmert, Schwabach
Ultra-Turrax-Gerät T8; IKA Labortechnik, Staufen
Wasserbad; Memmert, Schwabach
Zentrifuge MIKRO 22R; Hettich, Tuttlingen

Andere Materialien

Einmalküvetten (Eppendorf UVetten®); Eppendorf, Hamburg
Digoxigenin RNA-Labeling-Mix; Boehringer, Mannheim
DNase I; Roche, Mannheim
DNA-Größenstandard („100bp DNA-Ladder“); New England Biolabs, Frankfurt
dNTP; Promega, Mannheim
Primer Oligo dT-15; Promega, Mannheim
PVDF-Membran (Westran® Schleicher & Schuell); Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Filterpapiere; Whatman 3MM; Whatman GmbH, Rothenburg
pGEM-T Vektor; Promega, Mannheim
Escherichia coli, Eco XL-1 Blue; Stratagene, Heidelberg
Restriktionsenzyme (Not-I, Nco-I); New England Biolabs, Frankfurt
Superscript II Reverse Transkriptase; Gibco BRL, Eggenstein
RNA-Polymerasen (T7 und SP-6); Promega, Mannheim
Taq DNA-Polymerase; Gibco BRL, Eggenstein
Transkriptionspuffer; Boehringer Mannheim, Mannheim

Kits

TUNEL, ApopTag 7100 Kit; Chemicon, Hofheim
QIAEX II Kit; Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Plasmid Kit; Qiagen, Hilden

10. Danksagung

Ich möchte mich bei folgenden Personen, die an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt waren, sehr herzlich bedanken:

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Klaus Steger, möchte ich ganz herzlich danken für die Überlassung des Themas, für seine Unterstützung bei den wissenschaftlichen Arbeiten und dem Erstellen dieser Dissertation, für seine Ratschläge, sein Verständnis und seine Geduld.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin Bergmann für seine Hilfsbereitschaft sowie seine zahlreichen Anregungen und Diskussionen beim Erstellen der Veröffentlichungen und für die kritische Durchsicht dieses Manuskripts.

Weiterhin danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) ohne deren Förderung (STE 892/3-1,2) diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Herzlich danken möchte ich auch den Koautoren der aus diesem Projekt entstandenen Publikationen, Frau Irina Fenic und Herrn Klaus Failing, für die kooperative Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Ralph Brehm, Frau Sonja Hartmann und Frau Oksana Lekhkota für die freundschaftliche Zusammenarbeit, ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der Durchführung meines Forschungsprojektes.

Bei Frau Gerlinde Erhardt, Frau Alexandra Hax und Frau Anne Hild bedanke ich mich für ihre Hilfestellungen im Labor.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Anatomie, -Histologie und –Embryologie der JLU Giessen möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die jederzeit freundliche Unterstützung danken.

Zuletzt möchte ich meinem Mann Mariusz und meinem Sohn Jacob für ihr Verständnis und ihre liebevolle, moralische Unterstützung in allen Phasen dieser Dissertation DANKEN.

Erklärung

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

Giessen, den.....



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

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

ISBN 3-8359-5156-4



9 783835 195156 3 