

Charakterisierung der testikulären PolySia- NCAM Expression während der saisonalen Spermatogenese des Rehbocks

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

vorgelegt von Manka Svea Hänsch
aus Bielefeld

Gießen 2014

Aus dem Biochemischen Institut des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Leiter: Prof. Dr. Lienhard Schmitz

Gutachter: PD. Dr. Sebastian Galuska

Gutachter: Prof. Dr. Klaus Steger

Tag der Disputation: 03.03.2015

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Polysialinsäure (PolySia).....	1
1.1.1. Aufbau und Struktur.....	1
1.1.2. Biosynthese	2
1.1.3. Eigenschaften und Funktionen.....	3
1.2. <i>Neural cell adhesion molecule</i> (NCAM).....	4
1.2.1. Aufbau und Isoformen	4
1.2.2. Vorkommen und Funktion von PolySia-NCAM.....	5
1.3. Anatomie, Histologie und Physiologie des Hodens.....	8
1.3.1. Mikroskopischer Aufbau	8
1.3.2. Histologie des Keimepithels	9
1.3.3. Spermatogenese	11
1.4. Die saisonale Spermatogenese des Rehbocks	12
1.4.1. Grundprinzipien der saisonalen Spermatogenese	12
1.4.2. Der Rehbock als Studienmodell	13
2. Studienziel	16
3. Material und Methoden	17
3.1. Material	17
3.1.1. Probenmaterial	17
3.1.2. Chemikalien.....	18
3.1.3. Kits.....	19
3.1.4. Puffer und Lösungen	20
3.1.5. Verbrauchsmaterialien.....	21
3.1.6. Laborgeräte	22
3.1.7. Antikörper und Enzyme	23
3.2. Methoden.....	24
3.2.1. Western Blot.....	24
3.2.2. Immunhistochemie	28
3.2.3. Kettenlängenanalyse (HPLC).....	30
4. Ergebnisse	32
4.1. Quantität der PolySia- und NCAM-Expression im Gesamthomogenat des Rehhodens	32
4.1.1. Nachweis von PolySia im Rehhoden.....	32
4.1.2. PolySia Expression im Jahresverlauf	33

4.1.3.	Identifizierung des PolySia Trägerproteins	34
4.1.4.	NCAM Expression im Jahresverlauf	36
4.1.5.	Statistische Auswertung der Western Blot-Analysen	37
4.2.	Kettenlängenbestimmung von PolySia	38
4.3.	Lokalisation von PolySia-NCAM im Rehhodengewebe	40
4.3.1.	Negativkontrolle	40
4.3.2.	Qualitative Beschreibung der histologischen Bilder	41
5.	Diskussion	49
5.1.	Die saisonale PolySia-Expression im Rehhoden	49
5.2.	Identifizierung von NCAM als PolySia-Trägerprotein	51
5.3.	Die saisonale NCAM-Expression	52
5.4.	Histologische Lokalisation von PolySia-NCAM.....	53
5.5.	Kettenlängenbestimmung von PolySia	55
5.6.	Mögliche Funktion von PolySia-NCAM bei der saisonalen Spermatogenese.....	56
5.7.	Kritische Bewertung.....	59
5.8.	Klinische Bedeutung und Ausblick	60
6.	Zusammenfassung.....	61
7.	Summary	62
8.	Abkürzungsverzeichnis	63
9.	Abbildungsverzeichnis	65
10.	Tabellenverzeichnis	66
11.	Literaturverzeichnis	67
12.	Publikationsverzeichnis	79
13.	Ehrenwörtliche Erklärung.....	80
14.	Danksagung.....	81
15.	Tabellarischer Lebenslauf	82

1. Einleitung

1.1. Polysialinsäure (PolySia)

1.1.1. Aufbau und Struktur

Polysialinsäuren (PolySia) sind Homopolymere aus mindestens acht verknüpften Sialinsäureresten [Finne 1982, Galuska et al. 2006]. Bei Sialinsäuren handelt es sich um α -Ketosäuren mit einem C9-Grundgerüst, welches eine Carboxylgruppe in C1-Position und eine Ketogruppe in C2-Position aufweist (Abbildung 1). Bislang konnte das Vorkommen von mehr als 50 verschiedenen Sialinsäure-Derivaten bei Wirbeltieren, Wirbellosen und Bakterien nachgewiesen werden [Angata und Varki 2002, Schauer 2004].

Nachdem die Existenz einzelner Sialinsäurereste schon in den 1930er Jahren beschrieben wurde, taucht PolySia erst 1957 als Colominsäure in den Studien von Barry und Goebel auf, die PolySia aus *Escherichia coli* (*E. coli*) isolierten [Barry und Goebel 1957, Faillard 1989]. Dass es sich dabei um α 2,8-verknüpfte Acetylneuraminsäure handelte, bewiesen McGuire et al. 1964 [McGuire und Binkley 1964]. Sialinsäuren können sowohl als terminale Monosialylreste von Glykokonjugaten vorkommen als auch zu Di- (zwei Sialinsäuren), Oligo- (drei bis sieben Sialinsäuren) und Polysialinsäuren ($\geq$ acht Sialinsäuren) verknüpft werden [Sato 2004].

PolySia kann aus den Derivaten N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), N-Glykolyneuraminsäure (Neu5Gc) und Deaminoneuraminsäure (KDN) bestehen [Muhlenhoff et al. 1998]. Die häufig vorkommende α 2,8-Verknüpfung von Neu5Ac ist in Abbildung 1 dargestellt.

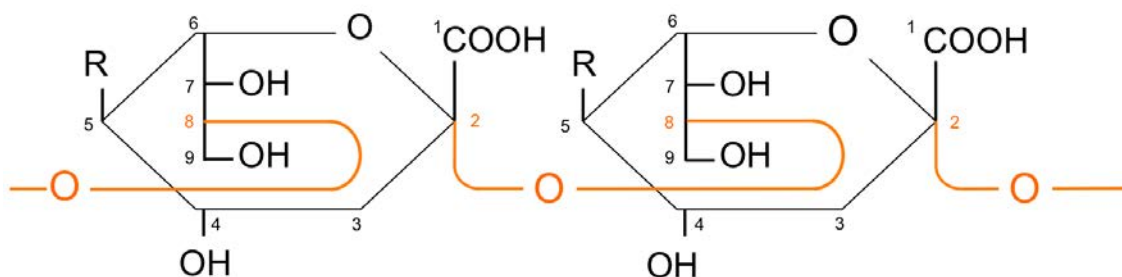


Abbildung 1: Darstellung der Struktur von α 2,8-verknüpften N-Acetylneuraminsäuren.

In Organismen kommt PolySia vor allem als posttranslationale Modifikation am terminalen Ende von N-Glykanen vor und wird hauptsächlich auf dem neuralen Adhäsionsmolekül NCAM exprimiert [Finne 1982, Liedtke et al. 2001, von Der Ohe et

al. 2002]. In Abbildung 2 ist ein N-Glykan mit naszierender PolySia-Kette beispielhaft dargestellt.

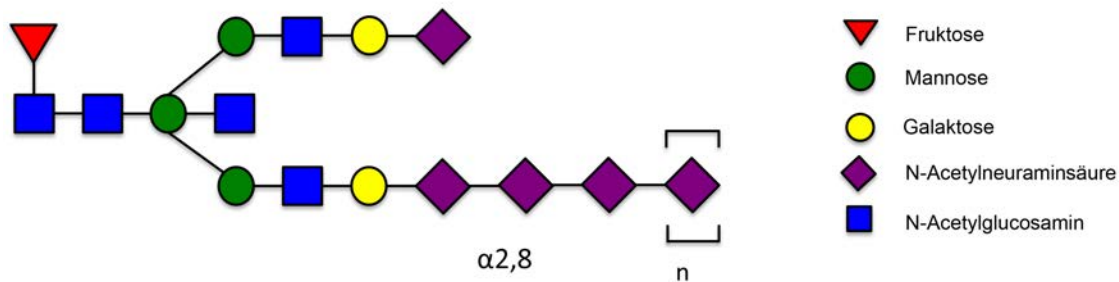


Abbildung 2: Strukturbeispiel eines polysialylierten N-Glykans von NCAM.

1.1.2. Biosynthese

In Wirbeltieren erfolgt die Synthese von PolySia durch die beiden Polysialyltransferasen ST8SialII und ST8SialIV [Kean 1991, Munster et al. 1998]. Diese Golgi-Apparat-assoziierten Transmembranproteine gehören zur großen Sialyltransferasen-Familie der Wirbeltiere und können als einzige aller α 2,8-Sialyltransferasen Kettenlängen von mehr als acht Sialinsäureresten synthetisieren [Angata et al. 2000, Sato et al. 2000, Harduin-Lepers et al. 2001]. Der terminale Sialinsäurerest dient ihnen dabei als Akzeptormolekül für die aktivierte Sialinsäure. Von allen Mitgliedern der Sialyltransferasen-Familie verfügen nur die beiden Polysialyltransferasen über eine bestimmte Region, die reich an basischen Aminosäuren ist und ihnen die Interaktion mit den naszierenden Sialinsäure-Polymeren ermöglicht [Nakata et al. 2006]. Diese Region wird daher als Polysialyltransferasendomäne bezeichnet. Beide Polysialyltransferasen sind darüber hinaus zur Autopolysialylierung der enzymeigenen N-Glykane fähig, was wohl der Regulierung der Enzymaktivität dient [Muhlenhoff et al. 1996]. In Studien mit Knockout(ko)-Mäusen konnte gezeigt werden, dass ST8SialII und ST8SialIV unabhängig von einander funktionieren und je nach Bedarf exprimiert werden können [Weinhold et al. 2005, Galuska et al. 2006]. Beide Transferasen sind auch in Abwesenheit der anderen zur Polysialylierung fähig, unterscheiden sich aber in ihren Arbeitsmustern. In ST8SialIV-defizienten Mäusen ist ST8SialII in der Lage, NCAM zu 90% zu polysialylieren und dabei Kettenlängen von bis zu 40 Sialinsäureresten zu synthetisieren. ST8SialIV allein polysialylierte nur ca. 45% des NCAMs, synthetisierte aber PolySia-Ketten mit bis zu 60 Untereinheiten [Galuska et al. 2006, Galuska et al. 2008]. Weiterhin wird ST8SialII in der prä- und perinatalen Neurogenese stärker

exprimiert als ST8SialIV. Im adulten Hirn hingegen ist ST8SialII in geringerer Konzentration zu finden als ST8SialIV [Angata et al. 1997, Ong et al. 1998]. Die optimale PolySia-NCAM-Menge und -Regulation basiert jedoch auf der Anwesenheit und Zusammenarbeit beider Polysialyltransferasen und unterliegt einem feinregulierten Expressionsmuster [Galuska et al. 2006, Galuska et al. 2008].

1.1.3. Eigenschaften und Funktionen

Die hohe Anzahl an Carboxylgruppen pro Neuraminsäure-Untereinheit verleiht dem PolySia-Molekül eine stark negative Gesamtladung, welche ihrerseits dazu führt, dass sich die auf Zelloberflächen exprimierten polysialylierten Proteine gegenseitig abstoßen. Dieser polyanionische Charakter und die voluminöse Struktur machen PolySia zu einem wichtigen Negativregulator von Zell-Zell-Interaktionen und Zelladhäsionen [Rutishauser et al. 1988, Fujimoto et al. 2001]. Lange Zeit galt PolySia-NCAM als feststehender Begriff, da angenommen wurde, dass PolySia einzig in Kombination mit diesem Glykoprotein existiert. Heute weiß man, dass in Säugetieren außer NCAM noch weitere Glykoproteine polysialyliert werden können. Neben dem 2010 identifizierten synaptischen Zelladhäsionsmolekül SynCAM 1 [Galuska et al. 2010], zählen dazu das in Muttermilch nachgewiesene CD36 [Yabe et al. 2003], das auf dendritischen Zellen vorkommende Neuropilin 2 [Curreli et al. 2007] sowie die Polysialyltransferase ST8SialII [Simon et al. 2013].

PolySia kann außerdem mit verschiedenen Wachstumsfaktoren interagieren [Vutskits et al. 2001]. Die Arbeitsgruppe von Kitajima konnte erstmals zeigen, dass die Kettenlänge von PolySia dessen biologische Funktion beeinflusst. Erst ab einem Polymerisierungsgrad von 12 Sialinsäuren ist PolySia beispielsweise in der Lage, den *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) zu binden. Der entstandene Komplex aus BDNF und PolySia kann an den BDNF-Rezeptor binden und so die Synapsen-Plastizität erhöhen, aber auch das Wachstum eines Neuroblastoms positiv beeinflussen. Es wird vermutet, dass PolySia als eine Art Reservoir für neuronale Wachstumsfaktoren, wie BDNF, Neurotrophin 3 und *nerve growth factor* (NGF) dient und deren extrazelluläre Konzentration reguliert [Kanato et al. 2008, Sato und Kitajima 2013].

Isomura et al. fanden 2011 heraus, dass PolySia auch mit dem Neurotransmitter Dopamin interagiert [Isomura et al. 2011] und schufen so einen Erklärungsansatz für die bereits bekannte Assoziation von fehlregulierter PolySia-Expression mit

psychischen Erkrankungen wie Schizophrenie und Alzheimer [Barbeau et al. 1995, Mikkonen et al. 2001].

Weiterhin soll PolySia als kompetitiver Antagonist am Glutamatrezeptor-Subtyp N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) wirken und so der Zerstörung von neuronalem Gewebe durch eine vermehrte Glutamat-Ausschüttung bei neuronalen Erkrankungen (Traumata, neurodegenerative Erkrankungen, Schlaganfall) entgegenwirken [Hammond et al. 2006].

Bisher wurden PolySia vor allem positive Effekte auf die Zellproliferation, das Zellwachstum und die Zellmigration zugeschrieben. Eine direkte Interaktion des *basic fibroblast growth factor* (bFGF) mit PolySia bestehend aus Kettenlängen von mindestens 17 Sialinsäureresten konnte in einer *in vitro* Studie 2012 durch Ono et al. bewiesen werden. Hierbei zeigte sich erstmals eine negative Wirkung von PolySia auf die Zellproliferation [Ono et al. 2012]. Der Wachstumsfaktor bFGF ist ein wichtiger Vertreter der großen FGF Familie, stimuliert die Proliferation verschiedener Zelltypen und ist an biologischen Prozessen wie der Wundheilung, der Angiogenese, der Neurogenese, aber auch der Tumorentstehung beteiligt [Itoh 2007, Mudo et al. 2009].

1.2. Neural cell adhesion molecule (NCAM)

1.2.1. Aufbau und Isoformen

Das Adhäsionsmolekül NCAM ist ein Vertreter der Immunglobulin(Ig)-Superfamilie, welche über 100 Zelladhäsionsproteine umfasst [Jorgensen und Bock 1974, Rutishauser et al. 1976, Brackenbury et al. 1977, Thiery et al. 1977]. Durch alternatives Spleißen entstehen die drei Hauptisoformen NCAM-180, NCAM-140, beides Transmembranproteine, und NCAM-120, welches durch einen Glukosyl-Phosphatidyl-Inositol(GPI)-Anker in der Zellmembran befestigt ist [Cunningham et al. 1987, Goriadis und Brunet 1992, Hinsby et al. 2004].

Jede NCAM-Form besteht in ihrem extrazellulären Teil aus fünf Immunglobulin(Ig)-ähnlichen und zwei Fibronectin Typ III (FNIII) Domänen, die jeweils über Glykosylierungsstellen verfügen (N- oder O-Glykane). Lediglich zwei N-Glykosylierungsstellen der fünften Ig-ähnlichen Domäne aller NCAM-Isoformen können jedoch polysialyliert werden (Abbildung 3) [Franceschini et al. 2001, Liedtke et al. 2001, Wuhrer et al. 2003].

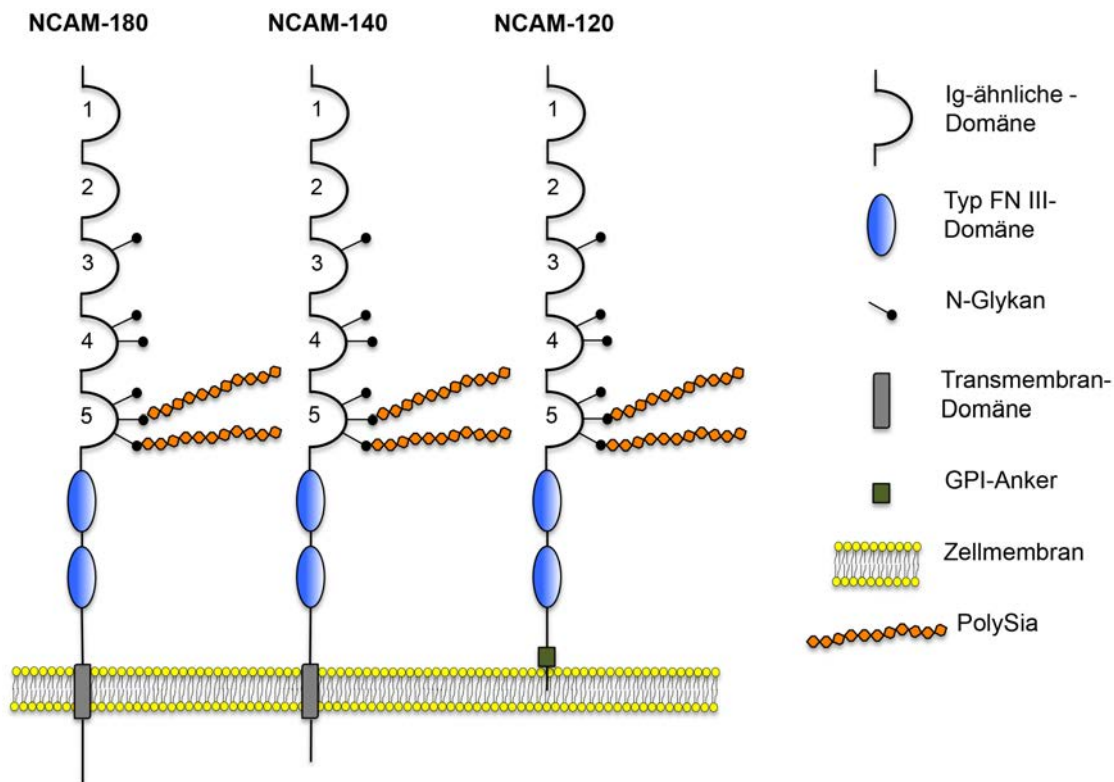


Abbildung 3: Schematische Darstellung der drei Hauptisoformen von NCAM.

Aufgeführt sind die drei Isoformen NCAM-120, NCAM-140 und NCAM-180. Extrazellulär weisen alle Isoformen zwei FN III-Domänen und fünf Ig-ähnliche Domänen auf. Die fünfte Ig-ähnliche Domäne kann an zwei N-Glykosylierungsstellen polysialyliert werden (orange). Darstellung modifiziert nach [Kleene und Schachner 2004].

1.2.2. Vorkommen und Funktion von PolySia-NCAM

Unpolysialyliertes NCAM ist in der Lage, homophile Bindungen mit anderen NCAM-Molekülen einzugehen und so für eine stabile Zelladhäsion zu sorgen. Dabei besteht sowohl die Möglichkeit, dass NCAM-Moleküle der selben Zelle (in cis-Konfiguration) als auch die, dass solche verschiedener Zellen (trans-Konfiguration), miteinander interagieren [Rao et al. 1992, Rao et al. 1993].

Je nach Polysialylierungsgrad wird die homophile Bindung zwischen NCAM-Molekülen abgeschwächt bzw. vollständig inhibiert. Durch den sich vergrößernden Zellabstand werden auch andere Zelladhäsionssysteme (z.B. Cadherine) in ihrer Funktion gestört [Fujimoto et al. 2001, Johnson et al. 2005].

Die homophile Bindung von NCAM und die PolySia-induzierte Inhibition kommen in Abbildung 4 zur Darstellung. Neben der Fähigkeit, homophile Verbindungen einzugehen, kann NCAM auch mit heterophilen Liganden wie dem *glia cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF)-Rezeptor oder dem FGF-Rezeptor in Kontakt treten

[Kiselyov et al. 2003, Paratcha et al. 2003]. Auch hier nimmt PolySia Einfluss, indem es wiederum die homophilen NCAM-Bindungen inhibiert und so indirekt die Interaktion mit heterophilen Liganden verstärkt [Hinsby et al. 2004].

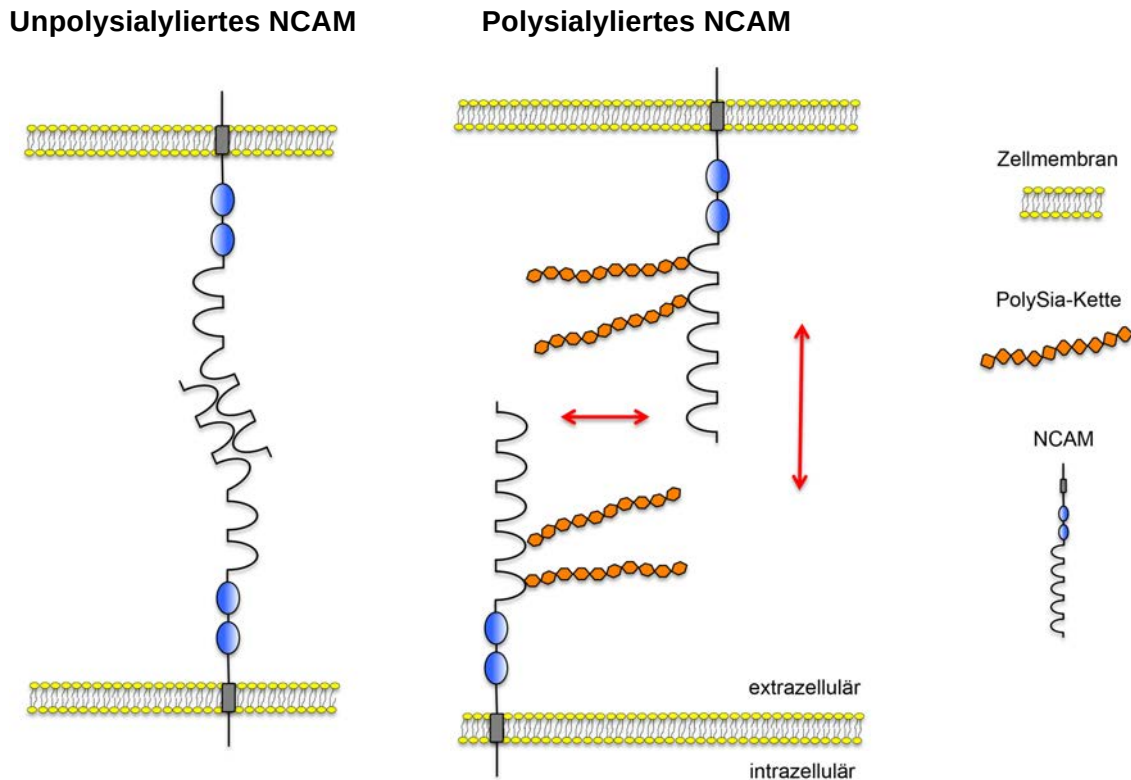


Abbildung 4: Darstellung der NCAM-Interaktion (unpolysialyliert/polysialyliert).

NCAM-Moleküle können homophile Bindungen zueinander eingehen. Ist NCAM polysialyliert, werden diese Verbindungen inhibiert und der Zell-Zellabstand wird vergrößert. PolySia nimmt so Einfluss auf die Zelladhäsion. Modifiziert nach [Gascon et al. 2007].

In den letzten Jahren konnten viele neue Erkenntnisse über das Vorkommen und die Funktionen von PolySia und PolySia-NCAM gewonnen werden. Eine pathologische Bedeutung hat PolySia zum Beispiel bei Tumoren wie dem oben bereits erwähnten Neuroblastom, dem Rhabdomyosarkom [Gluer et al. 1998], dem kleinzelligen Bronchialkarzinom [Moolenaar et al. 1990, Campodonico et al. 2010] oder dem Wilms-Tumor [Roth et al. 1988], bei denen eine hohe PolySia-Menge mit einem erhöhten Metastasierungspotential einhergeht und so die Malignität beeinflusst. Die bereits beschriebene inhibierende Wirkung von polysialyliertem NCAM auf andere Adhäsionsmoleküle wie den Cadherinen führt bei Pankreastumoren dazu, dass Tumorzellen sich leichter lösen und so ebenfalls die Metastasierung begünstigen [Schreiber et al. 2008].

Dass polysialyliertes NCAM eine essentielle Rolle bei der Entwicklung und Regeneration von neuronalem Gewebe spielt, ist lange bekannt. So konnten bei Versuchen in der Entwicklungsphase von Mäusehirnen stets große Mengen an PolySia nachgewiesen werden, während sich bei adulten Tieren fast nur noch unpolysialyliertes NCAM zeigte [Rutishauser und Landmesser 1996, Gascon et al. 2007]. Lediglich in Bereichen wie dem Hippocampus oder dem Bulbus olfactorius, die einer ständigen Umstrukturierung unterliegen, fand sich noch PolySia. In Studien mit NCAM- bzw. PolySia-ko-Mäusen zeigte sich, dass PolySia-ko-Mäuse schwere postnatale Wachstumsdefekte aufwiesen, sich ihr Gehirn nicht richtig entwickelte und sie nur wenige Wochen überlebensfähig waren [Weinhold et al. 2005]. Bei NCAM-ko-Mäusen hingegen wurden zwar einige strukturelle Veränderungen des Gehirns sowie schwere Verhaltensstörungen detektiert, die Tiere waren aber überlebensfähig und sogar fertil [Cremer et al. 1994, Cremer et al. 1997]. Dies zeigt die enorme Bedeutung von PolySia auf die Entwicklung und Regeneration des Nervensystems, die wichtiger zu sein scheint als ihr Trägerprotein selbst. Welche Funktionen PolySia in neuronalem Gewebe noch übernimmt und wie man sich diese ggf. therapeutisch zu Nutze machen kann ist Gegenstand aktueller Forschung.

Außerdem wird PolySia-NCAM auch während der embryonalen Entwicklung auf Epithelzellen von Lunge, Herz und Nieren exprimiert. Der Polysialylierungsgrad von NCAM korreliert dabei immer umgekehrt proportional mit der Organreife [Lackie et al. 1990, Lackie et al. 1991, Lackie et al. 1994].

Zur selben Zeit (1990er Jahre) untersuchten zwei Arbeitsgruppen die NCAM-140-Expression während der postnatalen Hodenentwicklung von Ratten. NCAM konnte dabei an allen Sertoli-Sertoli-Zellgrenzen und Sertoli-Keimzellgrenzen nachgewiesen werden, verschwand aber mit zunehmendem Reifungsgrad des Keimepithels. Das Vorkommen von PolySia konnte in diesen Studien nicht bestätigt werden [Moller et al. 1991, Orth und Jester 1995, Li et al. 1998].

Ebenfalls wurde festgestellt, dass SynCAM-ko-Mäuse infertil sind [van der Weyden et al. 2006]. Die Frage ob SynCAM möglicherweise polysialyliert vorliegt, wird in der Studie nicht beantwortet. 2007 wiesen Miyata et al. das Vorkommen von PolySia auf Seeigelspermien nach [Miyata et al. 2007], bevor 2013 gezeigt werden konnte, dass α 2,8-verknüpftes-PolySia auch auf humanen Säugetierspermien zu finden ist [Simon et al. 2013].

Dass die Polysialylierung von NCAM bzw. SynCAM und deren Expression eine Bedeutung für die Entwicklung und Funktion von Säugetier-Keimepithel hat, ist denkbar. Genaue Studien hierzu wurden bislang aber noch nicht veröffentlicht.

1.3. Anatomie, Histologie und Physiologie des Hodens

Der Hoden (Testis) ist ein paarig angelegtes Geschlechtsorgan vieler Gewebetiere und beinhaltet die männlichen Keimzellen (Gonaden). Neben der Produktion von Spermien ist der Hoden auch für den Großteil der Synthese von Testosteron, dem männlichen Geschlechtshormon, verantwortlich. Obwohl die Hodengröße zwischen den verschiedenen Säugetierarten variiert und sie bei Tieren, deren Reproduktion einer saisonalen Periodik folgt, zur Paarungszeit deutlich größer sind als in der Ruhezeit, ist der histologische Aufbau bei allen sehr ähnlich [Sinowatz 2001].

1.3.1. Mikroskopischer Aufbau

Hoden und Nebenhoden (Epididymis) liegen, von mehreren Schichten umgeben, zusammen im Hodensack (Skrotum). Der Nebenhoden liegt dem Hoden dabei mützenartig auf und ist durch das Rete testis (von lat. rete – Netz) mit ihm verbunden. Die derbe Tunica albuginea bildet die Organkapsel und teilt den Hoden mit feinen, Blut- und Lymphgefäß-führenden Septen (Septuli) in mehr als 300 Hodenläppchen (Lobuli) auf. Jeder Lobulus enthält wiederum ein oder mehrere eng verschlungene Hodenkanälchen (Tubuli seminiferi), deren Enden sich im Rete testis vereinen, um von dort als Ducti efferentes in den Nebenhoden zu ziehen (Abbildung 5).

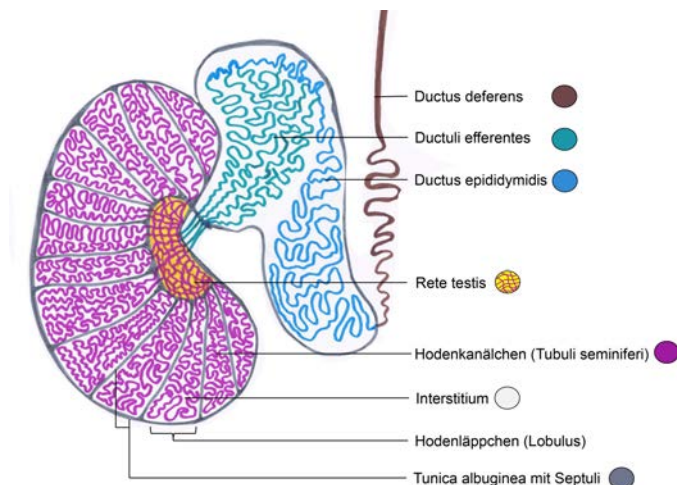


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Hodens und Nebenhodens.

Die Tubuli seminiferi (pink) der Hodenläppchen werden von Interstitium (weiß) umgeben und vereinen sich im Rete testis (gelb/pink). Von dort ziehen sie als Ducti efferentes (grün) in den Nebenhodenkopf (Caput), wo sie im Ductus epididymidis (blau) münden, der den Körper (Corpus) und Schwanz (Cauda) des Nebenhodens bildet. Schließlich wird der Ductus epididymidis kaudal zum Ductus deferens (braun). Hoden und Nebenhoden sind von Tunica albuginea (grau) überzogen. Modifiziert nach [Lüllmann-Rauch 2003].

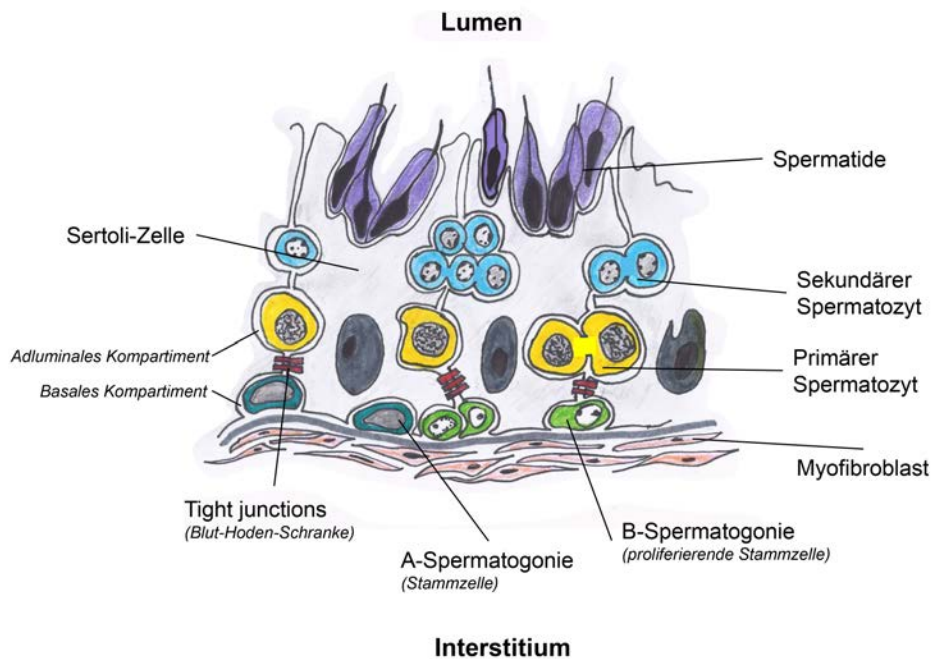
Die Hodenkanälchen sind mit Keimepithel ausgekleidet (1.3.2) und werden außerhalb der Basalmembran von mehreren Lagen Myofibroblasten (peritubuläre Zellen) ummantelt, die durch ihre regelmäßigen Kontraktionen zum Weitertransport der noch bewegungsunfähigen Spermatozoen beitragen. Zwischen den Hodenkanälchen befindet sich interstitielles Gewebe, welches neben Blutgefäßen, Lymphgefäßen, Nerven und Makrophagen auch die Testosteron bildenden Leydig-Zellen enthält. Der Nebenhoden wird in Kopf (Caput), Körper (Corpus) und Schwanz (Cauda) unterteilt und beinhaltet die oben genannten Ducti efferenti und den eng geknäulten Ductus epididymidis. Hier findet eine Reifung und Speicherung der Spermien statt, bevor sie schließlich im Ductus deferens aus dem Hoden transportiert werden [Holstein 2002].

1.3.2. Histologie des Keimepithels

Im Keimepithel findet die Vermehrung und Reifung von männlichen Keimzellen statt (Spermatogenese). Man unterscheidet zwei grundsätzlich unterschiedliche Zelltypen: die Keimzellen (Spermatogonien, Spermatozyten und Spermatiden) und die somatischen Zellen (Sertoli-Zellen). Sertoli-Zellen sind mit der Basallamina verbunden, durchspannen das Keimepithel bis zum Lumen und bilden dabei eine Art Stützstruktur für die sich entwickelnden Keimzellen. Außerdem sind sie auch für die Bereitstellung des richtigen Reifungsmilieus zuständig und bilden mit den benachbarten Sertoli-Zellen über sogenannte *Tight junctions* die wichtige Blut-Hodenschranke, welche das Keimepithel in ein basales und adluminales Kompartiment unterteilt. Während im basalen Kompartiment Spermatogonien liegen und ein körpereigenes immunologisches Milieu herrscht, befinden sich im adluminalen Kompartiment die reiferen Spermatozyten und Spermatiden mit einem eigenen Immunmilieu. Durch die in der Meiose stattfindende genetische Neukombination würden die Keimzellen ohne intakte Blut-Hoden-Schranke vom Körper als Antigen erkannt und durch immunologische Prozesse ggf. zerstört werden. Das Übertreten der Keimzellen vom basalen ins adluminale Kompartiment funktioniert wie in einer Schleuse, indem sich die *Tight junctions* vor den Zellen öffnen und hinter ihnen wieder schließen [Holstein 2002, Lüllmann-Rauch 2003, Nieschlag und Behre 2009].

Abbildung 6 zeigt eine schematische (A) und eine lichtmikroskopische (B) Darstellung des Keimepithels.

A



B

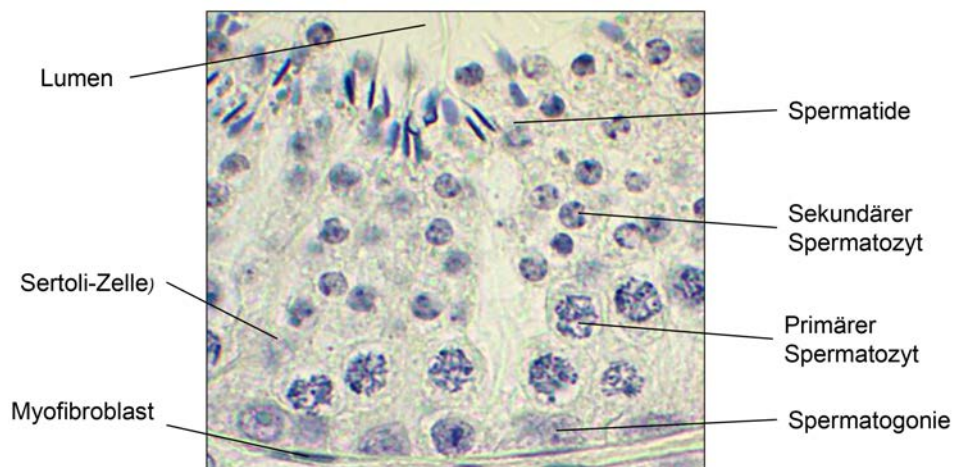


Abbildung 6: Histologischer Aufbau des Keimepithels.

Die Abbildung zeigt eine schematische **(A)** und eine lichtmikroskopische **(B)** Darstellung eines angeschnittenen Tubulus seminiferus. Die Pfeile kennzeichnen die jeweilige Struktur. **(B)**: Hämalaunfärbung eines 5µm dicken Rehbock-Hodenschnitts (Juni). **(A)** Modifiziert nach [Lüllmann-Rauch 2003].

1.3.3. Spermatogenese

Die Spermatogenese ist ein äußerst komplexer biologischer Prozess, der von Mediatoren wie Hormonen und Wachstumsfaktoren reguliert wird und in seiner Gänze immer noch nicht komplett verstanden ist [Culty 2009].

Spermatogenese bezeichnet die Bildung von Spermien und kann in drei Abschnitte unterteilt werden.

1. Vermehrung (mitotische Teilung) → basales Kompartiment
 2. Reifung (Meiose)
 3. Differenzierung
- } adluminales Kompartiment

Bei der im basalen Kompartiment ablaufenden **Vermehrung** der Keimzellen unterscheidet man $A_{(dark)}$ -, $A_{(pale)}$ - und B-Spermatogonien, wobei sich die englischen Begriffe „dark“ und „pale“ auf ihre Färbbarkeit in der Histologie beziehen. Die $A_{(pale)}$ -Spermatogonien gehen aus den eigentlichen Stammzellen ($A_{(dark)}$ -Spermatogonien/ SSC=*spermatogonial stem cell*) hervor und teilen sich im Gegensatz zu diesen ständig. Die seltenen Teilungen der $A_{(dark)}$ -Spermatogonien dienen der Generierung neuer Keimzellgenerationen, der Selbsterneuerung und der Aufrechterhaltung eines soliden Stammzell-Vorrats [Clermont 1963, Rolland et al. 2008].

Die schließlich entstehenden B-Spermatogonien teilen sich ebenfalls mehrfach mitotisch, bevor sie als primäre Spermatozyten (Spermatozyten I) in die Meiose eintreten. Die Abkömmlinge einer $A_{(pale)}$ -Spermatogonie bleiben dabei in den folgenden Reifeschritten über Zytoplasmabrücken miteinander verbunden und bilden so Ketten von 4, 8 oder 16 Zellen (Abbildung 7) Nach dem oben beschriebenen Schleusenmechanismus wandern die B-Spermatogonien während des Eintritts in die **Meiose** durch die Blut-Hoden-Schranke und werden ab jetzt als Spermatozyten I bezeichnet. Diese Zellen besitzen einen diploiden Chromosomensatz (2 Chromosomenpaare, 4 Chromatiden = $2nC4$) und brauchen ca. 3 Wochen, um die Prophase zu durchlaufen. Aufgrund der langen Verweildauer in diesem Stadium und ihrer Größe sind die Spermatozyten I lichtmikroskopisch sehr gut zu identifizieren. Nach Abschluss dieser 1. Reifeteilung sind aus einem Spermatozyt I zwei sekundäre Spermatozyten (Spermatozyt II) entstanden, die sich wiederum mitotisch (2. Reifeteilung) in vier Spermatiden mit haploidem Chromosomensatz teilen. In der letzten Phase, der **Differenzierung**, kommt es in den Spermatiden zu einer dramatischen Änderung der Zellform. Lichtmikroskopisch sind die Zellen kopfüber in Sertoli-Zellbuchten steckend und mit stark DNA-kondensiertem Zellkern in exzentrischer Lage zu erkennen. Das Zytoplasma ist weitgehend verdrängt und es kommt zur Akrosom- und Schwanzbildung auf den gegenüberliegenden Seiten der

Spermatide. Die Ablösung der Spermatiden von den Sertoli-Zellen wird als Spermiation bezeichnet. Ein Großteil der Zytoplasma-Bestandteile verbleibt dabei als Residualkörper in der Sertoli-Zelle. Mit Hilfe der durch peritubuläre Myofibroblasten ausgelösten Peristaltik wandern die nun als Spermatozoen bezeichneten Zellen Richtung Rete testis und von dort in den Nebenhoden [Clermont 1963, Holstein 2002, Nieschlag und Behre 2009].

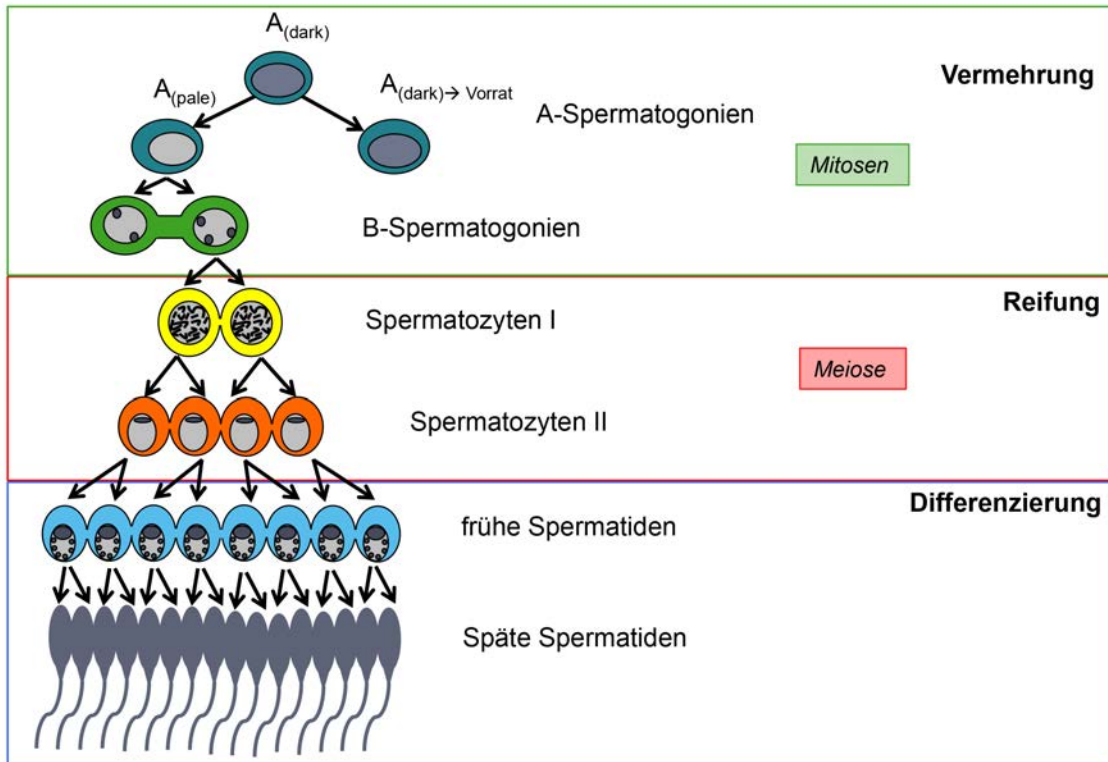


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Spermatogenese.

Farbige Kästen symbolisieren die drei Phasen der Spermatogenese. Aus einer B-Spermatogonie entwickeln sich bis zu 16 Spermatiden. Eine Tochterzelle der $A_{(pale)}$ -Spermatogonie wird stets zu einer neuen $A_{(pale)}$ -Spermatogonie, wodurch der Stammzellvorrat ständig erneuert wird. Modifiziert nach [Lüllmann-Rauch 2003].

1.4. Die saisonale Spermatogenese des Rehbocks

1.4.1. Grundprinzipien der saisonalen Spermatogenese

Ab dem Erreichen der Geschlechtsreife produziert der Mann kontinuierlich Spermien und ist prinzipiell bis ins hohe Alter zeugungsfähig. Bei vielen Wirbeltieren, wie dem Rehbock (*Capreolus capreolus*), folgt die Spermatogenese jedoch einer saisonalen Periodik. Dies ist vor allem als Anpassung an die klimatischen Bedingungen zu

verstehen und ermöglicht den Tieren, ihren Nachwuchs unter bestmöglichen äußeren Konditionen (Wetter, Nahrungsangebot) aufzuziehen. Die sich verändernde Tageslichtlänge (Photoperiode) wirkt sich dabei auf die Melatoninausschüttung der Zirbeldrüse im Gehirn aus. Dies beeinflusst die Gonadoliberein(GnRH)-Sekretion aus dem Hypothalamus, welche wiederum die Lutropin(LH)-Produktion der Hypophyse stimuliert. LH wirkt auf die Leydig-Zellen im Interstitium des Hoden und regt dort die Testosteronsynthese und damit die Hodenfunktion an. Abbildung 8 zeigt diese Mechanismen in einer schematischen Darstellung. Die Photoperiode gilt als Hauptregulator der saisonalen Reproduktionsaktivität [Bronson 1985, Lincoln 1989].

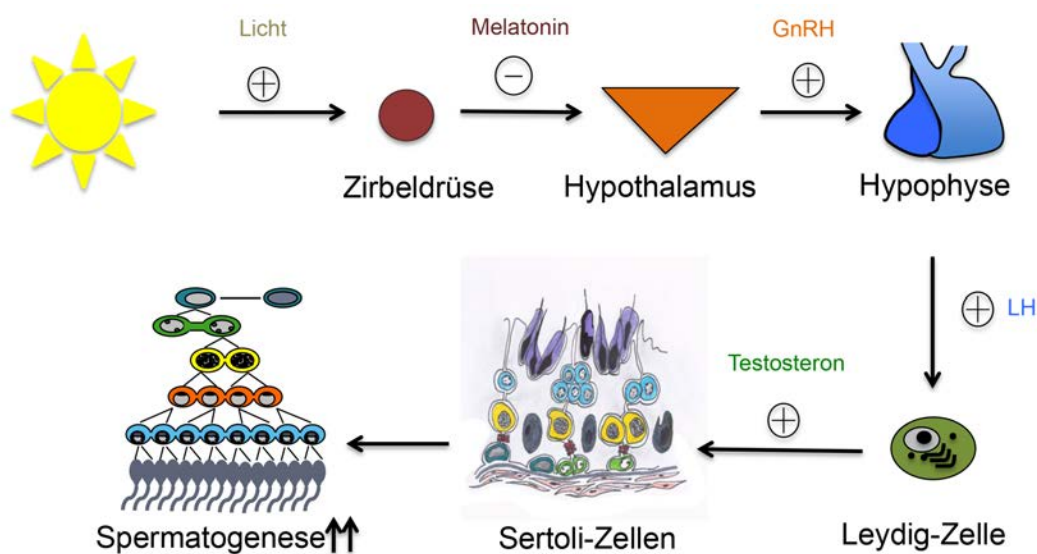


Abbildung 8: Schema der saisonalen Spermatogenese-Steuerung.

Obwohl die Prägnanz der Veränderungen zwischen den Spezies variiert, ist doch allen gemein, dass die Hodengröße zur Brunftzeit zunimmt, sich die Tubuli seminiferi in Durchmesser und Länge vergrößern und die Zahl der germinativen Zellen im Keimepithel steigt. Trotz dieser Veränderungen sind bei vielen Tieren, wie dem Rothirsch, alle Keimzelltypen über das ganze Jahr hinweg zu finden, es ändert sich nur die Häufigkeit der einzelnen Spermatogenesestadien [Tahka et al. 1983, Blottner und Roelants 1998].

1.4.2. Der Rehbock als Studienmodell

Der Reproduktionszyklus des Rehbocks folgt einem besonders strengen Rhythmus. Während das Keimepithel zur Brunftzeit im Sommer stark proliferiert und aktiviert ist, entwickelt es sich während der Wintermonate komplett zurück bis nur noch Sertoli-

Zellen und Spermatogonien zu finden sind [Hartung und Schoppmeyer 1986, Klonisch et al. 2006]. Die saisonalen Veränderungen des Rehhodengewebes wurden bereits in mehreren Studien analysiert, wobei die 2004 von Schön et al. veröffentlichte Arbeit eine besonders umfangreiche und genaue histomorphologische Beschreibung des sich zyklisch verändernden Keimepithels darstellt [Short und Mann 1966, Hartung und Schoppmeyer 1986, Marchlewska-Koj und Kruczek 1988, Hartung und Schoppmeyer 1994, Schön et al. 2004].

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Studien sollen hier kurz beschrieben werden. Die Monate Januar und Februar werden in allen Studien als überwiegend inaktiv beschrieben, das Hodengewebe befindet sich noch im Winterarrest. In den noch kleinen und dicht gepackten Tubuli finden sich nur Spermatogonien und Sertoli-Zellen. Im Frühjahr (März/April) beginnt die Proliferation des Keimepithels. Die Mitoserate der Spermatogonien ist im Frühjahr am höchsten. Die Tubuli nehmen an Größe zu, neben Spermatogonien und Sertoli-Zellen sind nun auch primäre Spermatozyten zu erkennen. Im Juni ist die Spermatogenese dann in allen Tubulusabschnitten vollständig aktiviert. Alle Mitose- und Meiosestadien der Keimzellen (Spermatogonien, Spermatozyten, Spermatiden) können identifiziert werden. Während der eigentlichen Brunftzeit im Juli und August, wenn die mitotische Aktivität der Keimzellen schon rückläufig ist und sich die Durchmesser der Tubuli wieder verringern, findet sich die höchste Anzahl an Spermatiden.

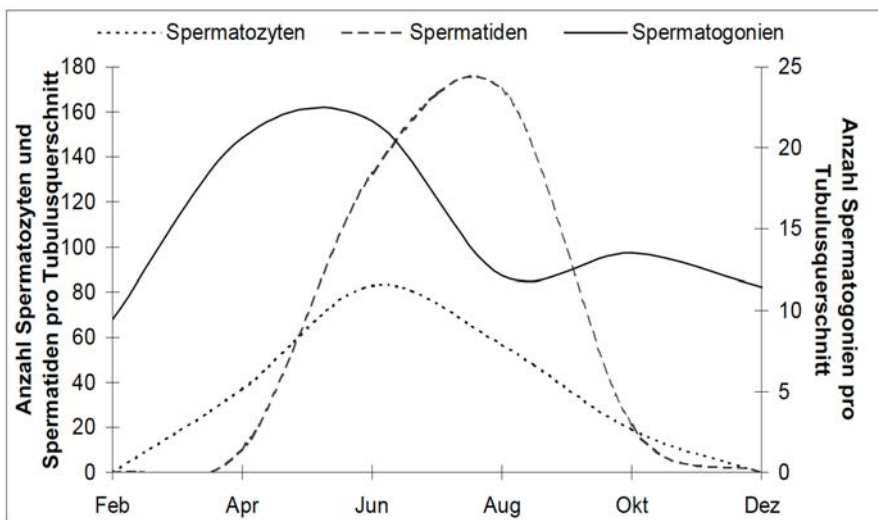


Abbildung 9: saisonale Veränderung der Keimzellpopulationen des Rehbocks.

Halbschematische Darstellung aus der Dissertation [Schön 2003] mit freundlicher Genehmigung von Dr. J. Schön.

In den Monaten September und Oktober zeigt sich ein sehr heterogenes histologisches Bild des Hodengewebes. Einige Tubuli weisen noch alle Entwicklungsstufen der germinativen Zellen auf, während andere Tubuli nur Spermatogonien und Sertoli-Zellen

enthalten. Im Dezember schließlich kommt die Spermatogenese vollständig zum Erliegen. Die Tubuli bestehen, wie auch im Februar, nur aus Spermatogonien und Sertoli-Zellen. In Abbildung 9 ist die Dynamik der sich im Jahresverlauf verändernden Keimzellpopulationen halbschematisch dargestellt.

Die absolute Anzahl der Leydig-Zellen und Sertoli-Zellen bleibt während des gesamten Jahres weitgehend konstant.

Da sich aber die Proportionen des tubulären und interstitiellen Kompartiments und auch die tubuläre Zell-Zusammensetzung selbst verändern, variieren die absoluten und prozentualen Anteile der einzelnen Zelltypen stark. So nimmt die Zahl der Spermatogonien pro Flächeneinheit zur Brunft hin deutlich ab, während ihre absolute Anzahl vor der Brunftzeit im April und Juni ihr Maximum erreicht. Die Anteile von tubulärem und interstitiellem Kompartiment betragen im Winterarrest jeweils ungefähr 50%. Im August nimmt der tubuläre Anteil 80% des gesamt Volumens im Hoden ein [Schön et al. 2004].

Aufgrund dieser radikalen und zyklisch wiederkehrenden Veränderungen von Morphologie und Funktion, die sowohl den Reifungsprozess des Keimepithels als auch die Rückbildung in einen embryonalen Phänotyp abbildet, stellt der Rehbock ein besonders interessantes Studienmodell zur Untersuchung von generellen Regulationsmechanismen der Spermatogenese dar [Klonisch et al. 2006].

2. Studienziel

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der PolySia-Expression im Rehhodengewebe in Korrelation mit seiner saisonalen Spermatogenese.

Die Expression von PolySia hat in vielen Organismen einen großen Einfluss auf die Zell-Zell-Adhäsion und Zellmigration und ist dabei sowohl in physiologische Prozesse, wie der Entwicklung von neuronalem Gewebe, als auch in pathologische Prozesse wie der Entstehung von Tumoren involviert. Die Möglichkeit, dass PolySia bei der Proliferation bzw. der Rückbildung von germinativen Zellen im Keimepithel regulatorisch beteiligt sein könnte, scheint denkbar. Die ermittelten Daten sollen dem genaueren Verständnis von generellen Regulationsmechanismen und -faktoren der Spermatogenese dienen. Der Rehbock eignet sich dabei besonders gut als Studienmodell, da die Aktivität seiner Spermatogenese einer kontinuierlichen Veränderung unterliegt, die sich über den gesamten Jahreszyklus erstreckt.

Folgende Punkte waren in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse:

- Nachweis der Expression von PolySia im Rehhodengewebe
- Identifizierung des PolySia-Trägerproteins
- Nachweis der saisonal variierenden PolySia- und NCAM-Expressionen
- Bestimmung des Polymerisierungsgrads der PolySia-Ketten
- Identifizierung der polysialylierten Zelltypen

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Probenmaterial

Das verwendete Probenmaterial stammt von adulten Rehböcken (*Capreolus capreolus*) der IZW-Feldforschungsstation Niederfinow und wurde über die Arbeitsgruppe „Reproduktionsbiologie“ des Leibniz-Instituts für Zoo- und Wildtierforschung in Berlin bezogen. Die übermittelten Proben wurden im Zeitraum von 1998 bis 2004 in den Monaten Februar, April, Juni, August, Oktober und Dezember gewonnen und bilden so den kompletten Jahreszyklus ab. Die Tiere wurden in großen Außengehegen einzeln gehalten, erhielten eine einheitliche Fütterung und wurden gemäß den Richtlinien des Tierschutzgesetzes behandelt [Goeritz et al. 2003, Schön und Blottner 2008].

Nach der Probengewinnung wurden Teile des nativen Hodenparenchyms in flüssigen Stickstoff überführt und bei -80 °C tiefgefroren. Weitere Teile des Gewebes wurden in Bouin'scher Lösung fixiert und später in Paraffin eingebettet.

Insgesamt standen 27 native, tiefgefrorene und 18 Paraffin-fixierte Gewebeproben für unsere Analysen zur Verfügung.

3.1.2. Chemikalien

Tabelle 1: Chemikalien	
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO,USA)
2-Propanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
30% Acrylamid (37,5:1 Bisacrylamid)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ammoniumacetat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO,USA)
Apotinin	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO,USA)
BCA assay kit	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Blockpuffer „Roti®-Block“	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Bovine Serum Albumine	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO,USA)
Colominsäure	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO,USA)
Di- Natriumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
1,2-Diamino-4,5-Methylenedioxybenzol	Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japan)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Eindeckmedium: Eukitt®	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO,USA)
Ethanol 99% vergällt	Stockemeyer (Bielefeld, Deutschland)
Glycin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Hämalaun-Lösung	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Laemmli	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Leupeptin	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO,USA)
Methanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethan-1,2-diamin (TEMED)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO,USA)
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natrium-Dechlorat	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO,USA)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO,USA)

Natriumniazid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumhydrosulfite	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Phenylmethylsulfonyl-Fluorid (PMSF)	Pierce (Rockford, IL, USA)
Proteinladder	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
RotiClear®	Roth Karlsruhe, Deutschland)
RotiHistol®	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Salzsäure 30% (HCl)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Suprapur Hydrogen peroxide 30%	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Roth, (Karlsruhe, Deutschland)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Trifluoressigsäure	Promochem (Wesel, Deutschland)
Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat (Tween)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

3.1.3. Kits

Tabelle 2: Kits		
Chemilumineszenz	SuperSignal®	Thermo-Scientific (Waltham, MA, USA)
DAB+ Kit	Liquid DAB+	Dako (Glostrup, Dänemark)
Proteinbestimmung	BCA Protein Assay Kit	Thermo-Scientific (Waltham, MA, USA)

3.1.4. Puffer und Lösungen

Tabelle 3: Puffer und Lösungen	
Lysepuffer	50 mM Tris/HCl pH:7,5 150 mM NaCl 5 mM EDTA 1 % (w/v) Triton X-100 0,5 % (w/v) Na-Deoxycholat Proteinase-Inhibitoren 2 mM PMSF 1 mM Aprotinin 1 mM Leupeptin
Elektrodenlaufpuffer	50 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % (v/v) SDS-Lösung
Laemmli Probenpuffer	3 Teile: Laemmli 4fach konz. 1 Teil: 2-Mercaptoethanol
Transferpuffer	39 mM Glycin 48 mM Tris 0,02 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Methanol
PBS	136 mM NaCl 50 mM Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O
PBS-T	165 mM NaCl 24 mM NaH ₂ PO ₄ 1% Tween-20 ((Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat)
Waschpuffer 1	20 mM Tris, pH:8 150 mM NaCl 0,5% (v/v) Triton-X-100
Waschpuffer 2	20 mM Tris, pH:8 150 mM NaCl
Eluierpuffer	100 mM Trethylamin 150 mM NaCl

Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, pH: 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl, pH: 6,8
APS-Lösung	Ammoniumperoxidsulfat 10%
Histopuffer	PBS 0,2% BSA 0,1% Natriumazid
DMB-Puffer	18 mM Natriumhydrosulfid 1 M Mercaptoethanol 40 mM Trifluoressigsäure
DMB-Reagenz	1 Teil DMB-Puffer 1 Teil Aqua dest.

3.1.5. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien	
Filmpapier	GE-Healthcare (Chalfont, Großbritannien)
Filterpapier „Whatman-Paper“	Schleicher & Schuell (Dassel, Deutschland)
Glasplatten	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Mikrotiterplatten	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Objektträger	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Paraffinfilm „Parafilm“	Bemis (Neenah, WI, USA)
Petrischalen	Greiner (Kremsmünster, Österreich)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Polypropylenröhrchen (15ml, 50ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
PVDF Membran	GE-Healthcare (Chalfont, Großbritannien)
Reaktionsgefäße (2ml, 1,5 ml, 0,5 ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Trennkämme	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)

3.1.6. Laborgeräte

Tabelle 5: Laborgeräte		
Auto-Sampler	Midas	Spark (Emmen, Niederlande)
Blottingapparatur	Trans Blot SD cell	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Feinwaage	PM 200	Mettler (Gießen, Deutschland)
Gelelektrophorese	Mini-PROTEAN 3	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
HPLC Säule	DNA Pak 100	Dionex (Sunnyvale, CA, USA)
Lichtmikroskop	B3-Serie	Motic (Wetzlar, Deutschland)
Magnetrührer	Ikamag Reo	Ika (Staufen, Deutschland)
Mikro Plate Reader	ELx800	BioTek (Bad Friedrichshall, Deutschland)
Mikroskopkamera	Moticam 2300	Motic (Wetzlar, Deutschland)
Mikrotom	RM 2255	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Paraffinstreckbad	HI1210	Leica (Wetzlar, Deutschland)
pH-Meter	Five Easy	Mettler (Gießen, Deutschland)
Reinstwasseranlage	Millipore Advantage A10	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Rütteltisch	Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
SpeedVac	Jouan RC 10.10	Thermo-Scientific (Waltham, MA, USA)
Ultraschallbad	Bandelin SONORE	Bandelin (Berlin Deutschland)
Vortex	Reax top	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Waage	AJ 150	Mettler (Gießen, Deutschland)
Wärmeschrank	Memmert B500	Memmert (Schwabach, Deutschland)
Wasserbad	Thermomix 1460	B. Braun (Melsungen Deutschland)
Wipptisch	ST5	CAT M. Zipperer (Staufen, Deutschland)
Zentrifuge	Universal 32 R	Hettrich (Bäch, Schweiz)

3.1.7. Antikörper und Enzyme

3.1.7.1. Primärantikörper

Anti-PolySia (735)	Der monoklonale IgG2A Antikörper (mAk) 735 stammt aus der Maus und erkennt α 2,8-verknüpfte Neu5Ac-Homopolymere ab einer Kettenlänge von acht Sialinsäureresten und bindet PolySia Spezies übergreifend [Frosch et al. 1985]. Der Antikörper wurde bereitgestellt von der Arbeitsgruppe Gerardy-Schahn der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH). Für die Western Blot-Analyse wurde eine Konzentration von 1 μ g/ml und für die Immunhistochemie eine Konzentration von 6,7 μ g/ml verwendet.
Anti-NCAM (123C3)	Der mAk IgG1 Antikörper 123C3 stammt aus der Maus und bindet ein Epitop mit intakter Fibronectin III ähnlicher Domäne im NCAM Exon 11-13 [Gerardy-Schahn und Eckhardt 1994]. Der Antikörper wurde bereitgestellt von der Arbeitsgruppe Gerardy-Schahn der MHH. Für die Western Blot-Analyse wurde eine Konzentration von 1,3 μ g/ml verwendet.
Anti-SynCAM	Der polyklonale Antikörper (pAk) aus dem Kaninchen bindet die C-terminalen Aminosäuren 431-445 von SynCAM1 (S4945, Sigma, St. Louis, USA). Für die Western Blot-Analyse wurde eine Konzentration von 1 μ g/ml verwendet.

3.1.7.2. Sekundärantikörper

Für die Western Blot-Analyse kamen pAk HRP*-konjugierte Antikörper der Firma Dako (Glostrup, Dänemark) zum Einsatz (**horseradish peroxidase*, deutsch: Meerrettichperoxidase). Dabei wurde der pAk Ziege-anti-Maus-Ig in einer Konzentration von 0,2 μ g/ml und der pAk Schwein-anti-Kaninchen-Ig in einer Konzentration von 0,26 μ g/ml verwendet. Der anti-Maus Sekundärantikörper für die Immunhistochemie wurde gebrauchsfertig angeliefert (EnVision+ System-HRP K4007, Dako Glostrup, Dänemark)

3.1.7.3. Enzym

Endoneuraminidase N (EndoN) Die aus einem *E-coli* K1 Phagen stammende EndoN spaltet α 2,8-verknüpfte Sialinsäuren ab einer Kettenlänge von acht Säureresten [Stummeyer et al. 2005]. Die entstehenden Bruchstücke werden vom PolySia Antikörper 735 nicht mehr erkannt. Das Enzym wurde bereitgestellt von der Arbeitsgruppe Gerardy-Schahn der MHH.

3.2. Methoden

3.2.1. Western Blot

3.2.1.1. Vorbereitung der Proben

Von den tiefgefrorenen Proben werden jeweils circa 80 mg aliquotiert, mit 1 ml Lysepuffer + Protease-Inhibitoren versetzt und mit 2 Stahlkugeln in der Kugelmühle für 10 min bei 30 Hz homogenisiert. Über Nacht erfolgt die Inkubation auf dem Rütteltisch bei 4°C. Die Kugeln werden anschließend entfernt und nicht gelöste Anteile der Proben bei 4°C abzentrifugiert (14400 x g, 60 min). Die gewonnenen Lysate werden in neue Gefäße überführt, die aus den ungelösten Anteilen entstandenen Pellets verworfen.

3.2.1.2. Proteinbestimmung

Für die Proteinbestimmung wird ein PCA Protein Assay Kit verwendet.

Zur Erstellung der Standardreihe mit BSA Konzentrationen von 0, 25 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 und 2000 μ g/ml wird der selbe Lysepuffer (ohne Proteinasen) verwendet wie für die Proben. Die beiden im Kit enthaltenen Reagenzien (Reagenz A: Na_2CO_3 , NaHCO_3 , Bicinchoninsäure, Natriumtartrat gelöst in 0,1M NaOH, Reagenz B: 4% Kupfersulfat) werden zur gebrauchsfertigen Lösung im Verhältnis 1:50 gemischt. 25 μ l der Standards und 25 μ l der zu untersuchenden Proben werden jeweils mit 200 μ g der Reagenzlösung vermischt, in Doppelbestimmung auf eine 96 Mikrotiterplatte aufgetragen und 30 min bei 37°C inkubiert. Mit Hilfe des Mikro Plate Reader erfolgt die Proteinbestimmung durch Messung der Absorption von Licht der Wellenlänge 562 nm. Die Konzentrationen werden durch hinzufügen von Lysepuffer angeglichen.

3.2.1.3. Enzymverdau

Als Negativkontrolle wird das Enzym Endoneuraminidase (EndoN) verwendet, welches Homopolymere, bestehend aus mindestens acht α 2,8-verknüpften Sialinsäurenresten (PolySia), erkennt und spaltet. Die entstehenden, kürzeren Sialinsäureketten werden vom Anti-PolySia mAk 735 nicht mehr gebunden. Für die Western Blot-Analyse werden Teile jeder Probe im Verhältnis 250:1 mit EndoN vermischt und anschließend eine Stunde bei 37°C verdaut.

3.2.1.4. Immunpräzipitation/Affinitätspräzipitation

Dieses Verfahren wird zur Identifizierung der PolySia tragenden Proteine in der Western Blot-Analyse dem Enzymverdau vorgeschaltet und außerdem vor der Kettenlängenbestimmung mittels HPLC durchgeführt. Eine Immunpräzipitation dient der Isolierung eines bestimmten Antigens samt seiner Interaktionspartner aus einer Lösung. Ist ein Protein das gesuchte Antigen, wird ein spezifischer Antikörper *in vitro* an eine feste Phase gekoppelt und bindet die in der Lösung enthaltenen Antigene über seine Affinität. Wird, wie in diesem Fall, kein Antikörper sondern eine Bindungsdomäne eines Enzyms verwendet, spricht man von einer Affinitätspräzipitation. Das zuvor inaktivierte Enzym Endoneuraminidase N (EndoN) wird dabei als Antigen-spezifischer Ligand benutzt. Hierfür wurde die inaktivierte EndoN, die PolySia zwar noch erkennen und binden, jedoch nicht mehr schneiden kann, [Schwarzer et al. 2009] zuvor durch Christina Ulm (ehemalig AG Geyer) gemäß Protokoll an magnetische, tosylaktivierte Dynabeads® (Invitrogen, Karlsbad, Germany) kovalent gekoppelt. Die entstanden EndoN-Dynabeads lagen für den weiteren Gebrauch in einer Konzentration von 20 mg/ml in PBS-BSA 0,1% vor und wurden bei 4°C gelagert.

Die Beads werden vor ihrer Verwendung zunächst resuspendiert, nacheinander jeweils 2x für ca. 3 min mit 500 μ l Waschpuffer 1 und Waschpuffer 2 gewaschen und schließlich in 250 μ l Waschpuffer 2 aufgenommen. Für die Waschschrte macht man sich die magnetische Eigenschaft der Beads zunutze, indem man die Suspension an einen Magneten hält und den zurückbleibenden Überstand abpipettiert. Je 80 μ l der Beads werden mit 500 μ l Probenlysat vermischt und, um die Bindung zwischen Antigen und Bead-Komplex zu ermöglichen, über Nacht bei 4°C auf dem Rütteltisch inkubiert.

Mit Hilfe des Magneten wird der Überstand entfernt und verworfen, bevor die Beads erneut 2x für ca. 3 min mit Waschpuffer 1 und 2x mit Waschpuffer 2 gewaschen werden. Um die an EndoN-Dynabeads® reversibel gebunden polysialylierten Proteine wieder zu lösen werden sie schließlich in 50 μ l des basischen Eluierpuffers aufgenommen. Das entstandene Gemisch wird mittels eines Magneten von den Beads

getrennt, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und in der SpeedVac trocken gezogen. Die so isolierten polysialylierten Proteine können für die anschließende Analytik nun in die entsprechenden Lösungen aufgenommen werden. Die Beads können nach erneuten Waschungen mit Waschpuffer 1 und 2 bis zu 20x wieder verwendet werden.

3.2.1.5. SDS-Gelelektrophorese

Diese analytische Methode dient der Größenauftrennung von Proteingemischen durch Anlage eines elektrischen Spannungsfelds, bei der ein Polyacrylamidgel als Trennmedium dient. Durch Zugabe von SDS werden alle Proteine negativ geladen und wandern unter reduzierenden Verhältnissen je nach Größe unterschiedlich schnell durch das Feld. Die so aufgetrennten Proteine können in anschließenden Verfahren besser sichtbar gemacht werden. Hier kommt das Verfahren der diskontinuierlichen SDS-PAGE (englisch: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, deutsch: Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) zum Einsatz, bei dem die mit Probenpuffer versetzten Proben zunächst in einem Sammelgel konzentriert werden, bevor sie durchs Trenngel wandern [Laemmli 1970]. Das im Probenpuffer enthaltene Mercaptoethanol spaltet Disulfidbrücken innerhalb der Proteine, was dafür sorgt, dass alle Proteine entfaltet vorliegen. Zwei SDS-Polyacrylamid-Gele werden nach folgendem Schema pipettiert:

Tabelle 6: Pipettierschema für zwei SDS-Polyacrylamid-Gele		
	Trenngel 8%	Sammelgel 3%
Acrylamidlösung	2,4 ml	650 µl
Trenngelpuffer	3 ml	
Sammelgelpuffer		1,25 ml
SDS-Lösung	120 µl	50 µl
Aqua dest.	6,5 ml	3 ml
APS-Lösung	20 µl	50 µl
TEMED	12 µl	5 µl

Zuerst wird das Trenngel zwischen die in die Vorrichtung eingespannten Glasplatten gegossen und, um einer Austrocknung vorzubeugen und eine glatte Gelgrenze zu erhalten, bis zur Auspolymerisierung mit Aqua dest. überschichtet. Nach Entfernung des Aqua dest. wird das Sammelgel auf das feste Trenngel gegossen und mit Trennkämmen bestückt. Die zu untersuchenden Proben werden im Verhältnis 4:1 mit Laemmli-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 60°C im Wasserbad inkubiert. In

jedem Gel läuft ein Proteinstandard als Referenz mit. Die Geltaschen werden entweder mit 1 µg Protein (für die PolySia-Bestimmung) oder 5 µg Protein (für die NCAM-Bestimmung) befüllt. Die Gelelektrophorese erfolgt in zwei Schritten:

1. Aufkonzentrierung der Proteine im Sammelgel bei 50 Volt für 15 min
2. Trennung der Proteine im Trenngel bei 140 Volt für 45 min.

3.2.1.6. Western Blot und Immunmarkierung

Als Blottingapparatur wird das Semi Dry Blot System „Trans blot SD cell“ von Bio-Rad verwendet. Durch Anlage einer elektrischen Spannung erfolgt hier der Proteintransfer vom Gel auf eine PVDF Membran, bei dem sich das Trennmuster nicht verändert. Die Zielstrukturen können mit Hilfe von Antikörpern auf der PVDF-Membran markiert und später sichtbar gemacht werden.

Die verwendete PVDF-Membran zeichnet sich durch eine hohe Festigkeit, eine gute Proteinadsorption sowie eine geringe Background-Färbung aus. Für die Detektion mit Chemilumineszenz sollen sie besonders geeignet sein (GE, Healthcare).

Zunächst wird die Apparatur mit zugeschnittenen und in Transferpuffer getränkten Whatman-Filterpapieren bestückt und die in 100% Methanol und Transferpuffer geschwenkte PVDF Membran darauf gelegt. Das nach der Gelelektrophorese ebenfalls in Transferpuffer überführte Gel wird passgenau auf der Membran platziert und mit weiteren Filterpapieren bedeckt. Die entstandene Schichtung (Filterpapier, PVDF-Membran, Gel, Filterpapier) ist wichtig, da der Proteintransfer von der Kathode im Deckel der Apparatur zur Anode im Boden stattfindet. Nach Verschluss des Systems erfolgt der Blot innerhalb 1 h mit 1 mA pro cm² Blot-Papier.

Die farblichen Markierungen des Proteinstandards auf der PVDF-Membran sind ein erster Indikator für einen erfolgreichen Transfer der Proteine. Um unspezifische Antikörper-Bindungen zu verhindern, wird die PVDF-Membran nach dem Blotverfahren über Nacht bei 4°C in Rotiblock® belassen. Die Antikörpermarkierungen und Waschschrte finden nach folgendem Protokoll in Paraffinschiffchen bei Raumtemperatur (RT) auf dem Wipptisch statt.

Tabelle 7: Protokoll der Antikörpermarkierung

3x	5 min	Rotiblock®
1x	2 h	Primärantikörper
3x	5 min	Rotiblock®
1x	1 h	Sekundärantikörper
3x	5 min	PBS
2x	10 min	PBS-T

Schließlich wird die Membran zur Weiterbehandlung in eine Folie gelegt. Die Sichtbarmachung der Zielstrukturen erfolgt mittels SuperSignal® Chemilumineszenz Kit. Die im Kit enthaltenen Reagenzien (A: Luminol/Verstärker-Lösung, B: Peroxidpuffer) werden im Verhältnis 1:1 vermischt und auf den Blot gegeben. Die Reaktion zwischen der aufgegebenen Lösung und der HRP von gebundenen Sekundärantikörpern führt dabei zu einer elektromagnetischen Strahlung im Bereich des sichtbaren Lichts.

3.2.1.7. Entwicklung und Auswertung

In der Dunkelkammer wird der Chemilumineszenz-Überstand nach fünf Minuten aus der Folie entfernt und zugeschnittenes Filmpapier unter Rotlicht Bedingungen auf die Membran gelegt. Die Belichtung des Films erfolgt für ca. 5-10 sek in einer Kassette, bevor er in die Entwickler-Lösung überführt wird. Nach der Entwicklung wird der Film in Aqua dest. gewaschen und schließlich mittels Fixier-Lösung fixiert. Zur Entfernung aller Rückstände wird der Film nochmals gründlich mit Aqua dest. gewaschen. Die densitometrische Auswertung der Western Blot-Filme erfolgt mit Hilfe des Bildanalyseprogramms TINA 2.0.

3.2.2. Immunhistochemie

Zusätzlich zur Western Blot-Analyse wurde das mittels Immunhistochemie gegen PolySia gefärbte Hodengewebe lichtmikroskopisch ausgewertet. Insgesamt wurden Gewebeschnitte von je drei verschiedenen Tieren in den Monaten Februar, April, Juni, August, Oktober und Dezember untersucht.

Die Methode der Immunhistochemie erlaubt Aussagen über die Lokalisation von Zielstrukturen in einem Gewebe oder einer Zelle und beruht auf einer Epitop-Antikörper-Bindung. Das zuvor in Paraffin eingebettete und in 5 µm dünne Scheiben geschnittene Gewebe wird auf Objektträger gezogen, nach absteigender Alkoholreihe

in Aqua dest. überführt und anschließend mit Antikörpern inkubiert. Die Antikörper können dann mit verschiedenen Detektionssystemen sichtbar gemacht werden. Für diese Arbeit wurde das Detektionssystem „Liquid DAB+ Substrate Chromogen System“ benutzt, bei dem es unter Oxidationsbedingungen zur Braunfärbung durch HRP des gebundenen Sekundärantikörpers kommt.

3.2.2.1. Vorbereitung der Schnitte

Die Paraffinblöcke werden zunächst in das Mikrotom eingespannt und angeschnitten. Die mit Hilfe des Mikrotoms angefertigten, 5 µm dünnen Schnitte werden im Wasserbad bei 38°C für 1 min gestreckt und auf Objektträger gezogen. Um die Gewebeschnitte zu trocknen, erfolgt die Inkubation über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank. Die Objektträger können dann bei RT in Objektträgerkästen aufbewahrt werden.

3.2.2.2. Entparaffinierung und Negativkontrolle

Die Entparaffinierung und Rehydratation der Gewebsschnitte fand in absteigender Alkoholreihe (**Tabelle 8**) statt.

Tabelle 8: Absteigende Alkoholreihe		
3x	5 min	Xylol
1x	5 min	Ethanol 100%
1x	30 min	H ₂ O ₂ 4% in Methanol
1x	5 min	Ethanol 100%
1x	5 min	Ethanol 70%
1x	5 min	Aqua dest.
1x	5 min	PBS

Auf jedem Objektträger befinden sich zwei Serienschnitte, von denen einer immer als Negativkontrolle dient. Hierzu wird die EndoN 1:300 mit Histopuffer verdünnt und 80 µl der entstandenen Lösung auf einen der Schnitte gegeben. Der jeweils andere Schnitt wird nur mit Histopuffer bedeckt. Der Verdau findet über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank statt.

3.2.2.3. Immunfärbung und Gegenfärbung

Die Flüssigkeit wird nach dem Verdau vorsichtig mit Papiertüchern von den Schnitten entfernt, bevor der ebenfalls 1:300 mit Histopuffer verdünnte Primärantikörper mAk 735 aufgetragen wird. Die Inkubation der Gewebeschnitte erfolgt über Nacht bei 4°C.

Die Schnitte werden nun 3x 5 min mit PBS gewaschen und anschließend mit dem gebrauchsfertigen HRP-markierten Sekundärantikörper für 30 min bei RT inkubiert. Nach abermaligen Waschschritten (3x 5min mit PBS) werden die Objektträger für 5 min mit Aqua dest. äquilibriert.

Für die Farbreaktion werden die im DAB+ Kit enthaltenen Reagenzien (A: 3,3'-Diaminobenzidin in Chromogenlösung und B: Imidazol-HCl-Puffer, pH: 7,5) im Verhältnis 1:50 vermischt und für 5 min auf die Gewebeschnitte gegeben. Die HRP des Sekundärantikörpers oxidiert dabei DAB, wodurch an den entsprechenden Stellen eine Braunfärbung eintritt. Um die Reaktion zu stoppen, werden die Objektträger dann in Aqua dest. überführt und 2x 5 min gewaschen.

Die Gegenfärbung der zellulären Strukturen erfolgt in Hämalaun-Lösung nach Mayer für 2 min. Hämalaun färbt basophile Strukturen, wie den Zellkern in saurem Milieu dunkelblau an. Um die Färbung zu konservieren, werden die Schnitte anschließend erst mit Aqua dest. gespült und dann unter fließendem Leitungswasser für 15 min gebläut.

3.2.2.4. Fixierung und Auswertung

Die Dehydratation der Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe erfolgt nach folgendem Protokoll:

Tabelle 9: Aufsteigende Alkoholreihe		
1x	5 min	Ethanol 70%
2x	5 min	Ethanol 100%
3x	5 min	Rotihistol®

Schließlich werden die Schnitte unter Verwendung von Eukitt® mit Deckgläsern eingedeckt und am Lichtmikroskop mit einer Mikroskopkamera und zugehörigem Computerprogramm fotografiert und qualitativ ausgewertet.

3.2.3. Kettenlängenanalyse (HPLC)

Dieses Flüssigchromatographie-Verfahren, welches der Auftrennung, Detektion und Quantifizierung von α -Ketocarbonsäuren dient, basiert auf spezifischen

Wechselwirkungen zwischen zwei Phasen. Dabei wird eine flüssige Phase an einer stationären Phase in der Säule vorbeigeführt, je nach Trennprinzip (z.B. Größe, Ionenaustausch) zunächst reversibel gebunden und anschließend über eine Gradienten-Elution wieder getrennt. Je nach Kettenlänge lösen sich und durchwandern kleine Moleküle die Säule schneller als große und können dann mit Hilfe eines Detektors bestimmt werden. Vor der Auftrennung müssen die Sialinsäureketten in einer Eintopfreaktion vom Trägerprotein abgespalten und mit 1,2-Diamino-4,5-Methylenedioxybenzol (DMB) fluoreszenzmarkiert werden, um für den Detektor messbar zu sein. Diese Methode nennt sich milde DMB-Derivatisierung und wurde von Inoue et al. 2001 erstmals etabliert [Inoue et al. 2001]. Zunächst werden die in der SpeedVac trockengezogenen Proben dafür in 80 µl saurer DMB-Reagenz aufgenommen und für 24 h bei 11°C im Rüttler derivatisiert. Durch anschließende Zugabe von 20 µl 1M NaOH kann die Reaktion gestoppt werden. Die Derivate werden 1h bei RT belassen und dann bei 8°C für 10 min mit 1440 x g zentrifugiert. Durch den Auto-Sampler werden die entstandenen Überstände nacheinander mit einem Fluss von 1ml/min auf die HPLC Säule gegeben.

Eine Colominsäure-Lösung dient dabei als Standard, die Elution erfolgt mit Amoniumacetatpuffer unter folgendem Gradienten:

Tabelle 10: Elutionsgradient	
Zeit (min)	C₂H₇NO₂ (%)
0	0
5	0
10	10
15	13
20	17
55	20
100	26
115	28
116	100
125	100
126	0
140	0

Zur Messung im Fluoreszenzdetektor wird eine Anregungswellenlänge von 372 nm und einer Emissionswellenlänge von 456 nm verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. Quantität der PolySia- und NCAM-Expression im Gesamthomogenat des Rehhodens

4.1.1. Nachweis von PolySia im Rehhoden

Um nachzuweisen, ob im Hodengewebe des Rehbocks PolySia vorkommt wurde zunächst eine „Testprobe“ aus dem Monat Dezember untersucht. Nach erfolgter Probenvorbereitung und Proteinbestimmung wurde ein Teil des entstandenen Lysats als Negativkontrolle mit EndoN vorbehandelt. Abbildung 10 zeigt einen Western Blot der gelelektrophoretisch aufgetrennten und immunmarkierten „Testprobe“. Bei der unbehandelten Probe in Spur 1 ist das typische PolySia Signal in Form einer breiten, schmierigen Bande von 230 Kilodalton (kDa) sichtbar. Dies ist auf einen heterogenen Polysialylierungsstatus zurückzuführen. Da die zur Degradierung von PolySia mit EndoN vorbehandelte Probe in Spur 2 kein Signal zeigt, kann die Färbung in Spur 1 als spezifisch gelten. Der Beweis für das Vorkommen von PolySia im Rehhodengewebe konnte somit erbracht werden.

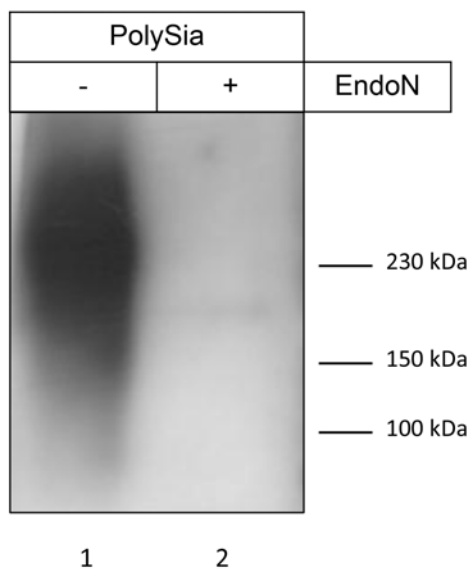


Abbildung 10: Nachweis von PolySia im Rehhodengewebe.

Für die Western Blot-Analyse wurden 10 µg Gesamtprotein des Testlysats pro Spur aufgetragen. Nach der Übertragung auf die PVDF-Membran erfolgte die Immunmarkierung durch den spezifischen anti-PolySia mAk 735. Spur 1 zeigt die unbehandelte Probe, Spur 2 die als Negativkontrolle mit EndoN verdauten Probe. Die Molekulargewichte sind in Kilodalton (kDa) angegeben.

4.1.2. PolySia Expression im Jahresverlauf

Nachdem das generelle Vorkommen polysialylierter Proteine im Hodengewebe des Rehbocks nachgewiesen werden konnte, sollte ermittelt werden, ob und wie sich die PolySia-Expression im Jahresverlauf und während des Reproduktionszyklus verändert. Dazu wurden fünf Probenreihen aus Rehhodengewebe zusammengestellt und mittels Western Blot untersucht. Die fünf Probereihen enthielten dabei jeweils Gewebeproben der Monate Februar, April, Juni, August, Oktober und Dezember. Um die Spezifität der PolySia-Signale zu kontrollieren, wurden stets Aliquots jeder Probe enzymatisch mit EndoN vorbehandelt. In den entsprechenden Spuren 2, 4, 6, 8, 10 und 12 konnte keine Färbung erkannt werden, sodass die Signale in Spur 1, 3, 5, 7, 9 und 11 als spezifisch gelten können. Nachdem das PolySia-Signal im Vorversuch mit 10 µg Protein pro Spur sehr stark war, wurde für die anschließend durchgeführten Analysen nur 1 µg Gesamtprotein pro Spur aufgetragen. Alle Proben der fünf untersuchten Reihen zeigten die typisch breite PolySia Bande im Bereich von 230 kDa.

Der Beweis, dass PolySia während des gesamten Jahres im Rehhoden vorhanden ist, konnte damit erbracht werden. In der Signalintensität zeigten sich jedoch Unterschiede: Im Februar, wenn sich der Reproduktionszyklus noch im sogenannten „Winterarrest“ befindet, zeigten sich nur sehr schwache Signale. Zu Beginn der Proliferation des germinativen Epithels im April erreicht die PolySia-Expression ihr Maximum. Für diesen Monat wurden in allen Versuchen sehr intensive Färbungen detektiert. In der Zeit der maximalen Proliferation des Keimepithels und der anschließenden Brunftzeit (Juni, August) waren die detektierten Signale wieder deutlich schwächer. Zum Ende der Brunftzeit im Oktober nahm die PolySia Expression jedoch wieder zu und war mit Beginn des Winterarrests im Dezember wieder besonders stark ausgeprägt. Abbildung 11 zeigt einen Western Blot mit typischer Jahresrhythmik der PolySia Expression im testikulären Gewebe des Rehbocks.

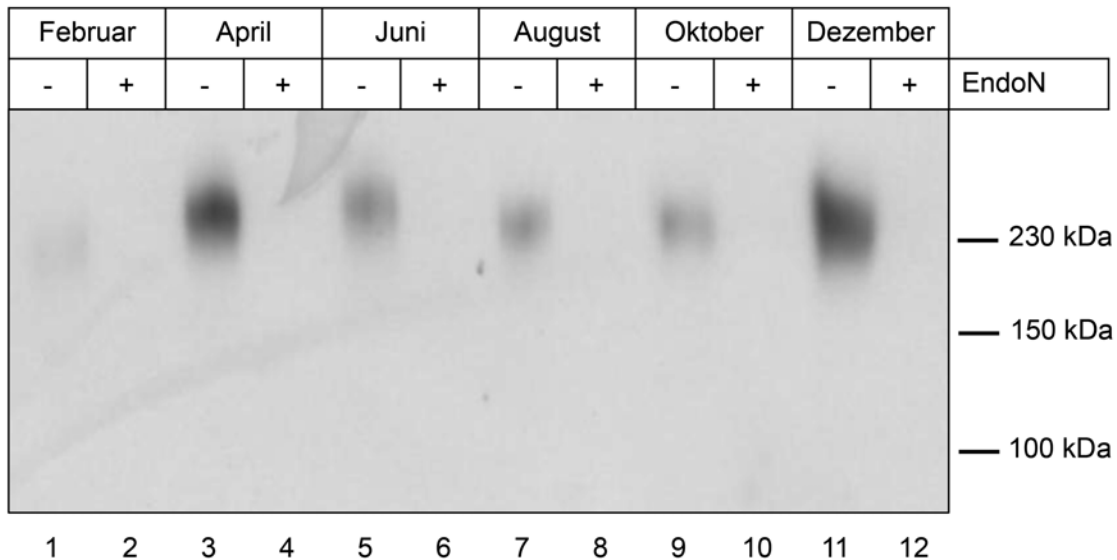


Abbildung 11: Nachweis der PolySia Expression im Jahresverlauf.

Zur Western Blot-Analyse wurde pro Spur 1 µg Gesamtprotein des jeweiligen testikulären Gewebslysats aufgetragen und nach der Auftrennung auf eine PVDF-Membran übertragen. Aliquots jeder Probe wurden zuvor als Negativkontrolle mit EndoN behandelt, um mögliche PolySia Ketten zu entfernen. Für die Immunmarkierung kam der spezifische anti-PolySia Antikörper mAk 735 zum Einsatz. Die Molekulargewichte sind in kDa angegeben. PolySia Signale erscheinen im Western Blot als schmierige Banden im Bereich von 230 kDa.

4.1.3. Identifizierung des PolySia Trägerproteins

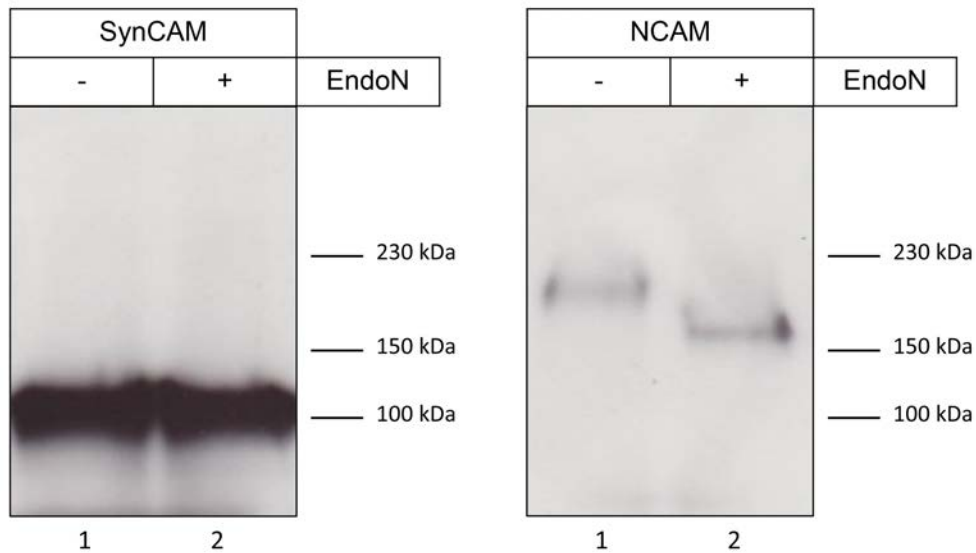
Die Identifizierung des PolySia Trägerproteins erfolgte mittels Western Blot-Analyse einer „Testprobe“ aus dem Dezember. Der Dezember wurde ausgewählt, da hier besonders viel PolySia exprimiert wurde. Die verwendeten Antikörper gegen NCAM und SynCAM können das jeweilige Zielprotein sowohl im polysialylierten als auch im unpolysialylierten Zustand binden. Für eine spezifische Identifizierung von PolySia-Trägern mussten die polysialylierten Proteine also zunächst aus dem Gesamtlisat isoliert werden. Dies geschah durch eine Affinitätsaufreinigung mit inaktiver EndoN (3.2.1.3). Die aufgereinigte Probe sowie eine native Kontrollprobe wurden nach der Proteinbestimmung gelelektrophoretisch aufgetrennt und in der Western Blot-Analyse gegen SynCAM, bzw. NCAM immungefärbt. Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, konnte in der nativen Probe ein starkes SynCAM-Signal nachgewiesen werden (Proteinbande bei 100 kDa), während bei der aufgereinigten Probe kein SynCAM-Signal zu erkennen ist. NCAM-Banden sind hingegen sowohl bei der nativen als auch bei der aufgereinigten Probe bei 180 kDa zu sehen.

Die zusehende Gewichts-Diskrepanz zwischen den Banden vor und nach EndoN-Verdau („Banden-Shift“) zeigt, dass das Protein nach Entfernung der PolySia-Ketten

deutlich weiter (~ 30 kDa) durch das Gel wandern konnte als zuvor. Dieses Phänomen ist ein Indikator für eine starke Polysialylierung.

Somit konnte bewiesen werden, dass NCAM ein Trägerprotein von PolySia im testikulären Gewebe des Rehbocks ist. Im Gegensatz dazu scheint SynCAM im Rehhoden nur in unpolysialyliertem Zustand zu existieren.

A



B

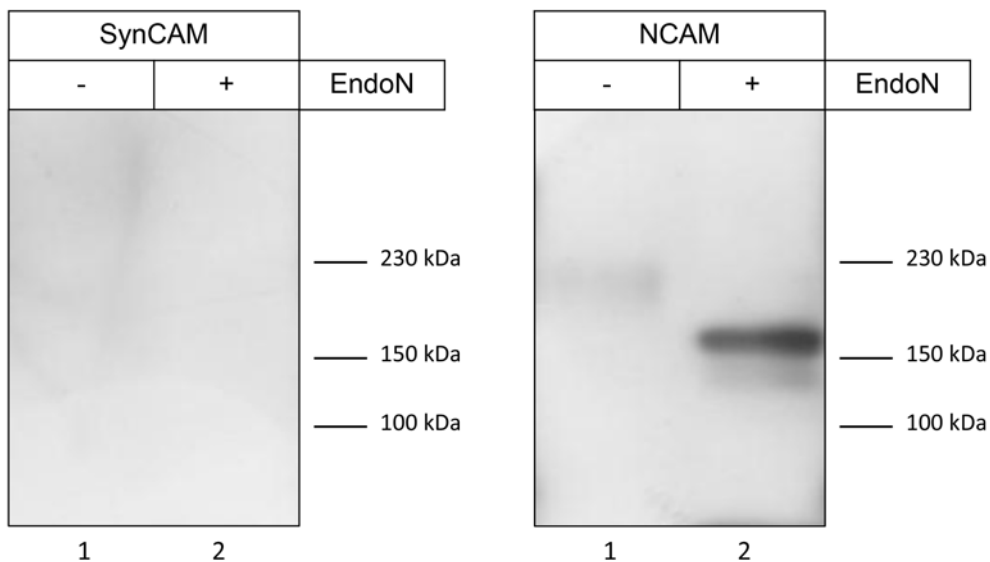


Abbildung 12: Identifizierung von NCAM als PolySia Trägerprotein.

Für die Western Blot-Analyse der nativen (A) und affinitätsaufgereinigten (B) Gewebslysate wurden 10 µg Protein jeweils sowohl unbehandelt (Spur 1) als auch mit EndoN vorbehandelt (Spur 2) auf das Gel aufgetragen und elektrophoretisch nach Größe getrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran, wurden die Immunmarkierungen entweder mit dem anti-NCAM mAk 123C3 oder mit dem anti-SynCAM mAk durchgeführt. Die Molekulargewichte sind in kDa angegeben.

4.1.4. NCAM Expression im Jahresverlauf

Nachdem NCAM als PolySia Trägerprotein identifiziert werden konnte, galt es zu klären, wie sich die NCAM Expression während des Reproduktionszyklus verändert und ob sie einem ähnlichen Muster folgt wie die PolySia Expression. Dazu wurden die Probereihen in der Western Blot-Analyse mit einem anti-NCAM Antikörper untersucht, der alle Hauptisoformen von NCAM erkennt. Abbildung 13 zeigt die testikuläre NCAM-Expression im Jahresverlauf ohne (Spur 1) und mit (Spur 2) EndoN-Vorbehandlung der Proben. Bei den beiden nach EndoN-Behandlung erkennbaren Banden handelt es sich um die NCAM-Isoformen NCAM-140 und NCAM-180. Wie zuvor bereits beschrieben, spricht der hier vor allem bei NCAM-180 zu erkennende „Banden-Shift“ von ca. 30 kDa zwischen den benachbarten Spuren einer Probe für eine ausgeprägte Polysialylierung von NCAM-180. Bei NCAM-140 ist dieser Banden-Shift nur in den Monaten April und Dezember gut zu erkennen. Im Juni, August und Oktober scheint hingegen nur schwach oder unpolysialyliertes NCAM-140 vorhanden zu sein, da sich die Banden bei 140 kDa vor und nach Entfernung der PolySia-Ketten auf gleicher Höhe befinden (vergleiche Abbildung 13, Spur 5-10). Ähnlich wie bei den PolySia-Blots konnte auch hier in den Monaten April und Dezember eine erhöhte Expression von NCAM nachgewiesen werden, während für Februar, Juni und August niedrigere Werte ermittelt wurden. In der Übergangsphase von Brunftzeit zum Winterarrest im Oktober nimmt die NCAM-Expression insgesamt wieder zu. In der Abbildung ist das NCAM Signal in den zuvor mit EndoN behandelten Proben intensiver als bei den nativen Proben. Dies liegt daran, dass der Antikörper an das depolysialylierte Protein besser binden kann und so in der Analyse ein stärkeres Signal zeigt.

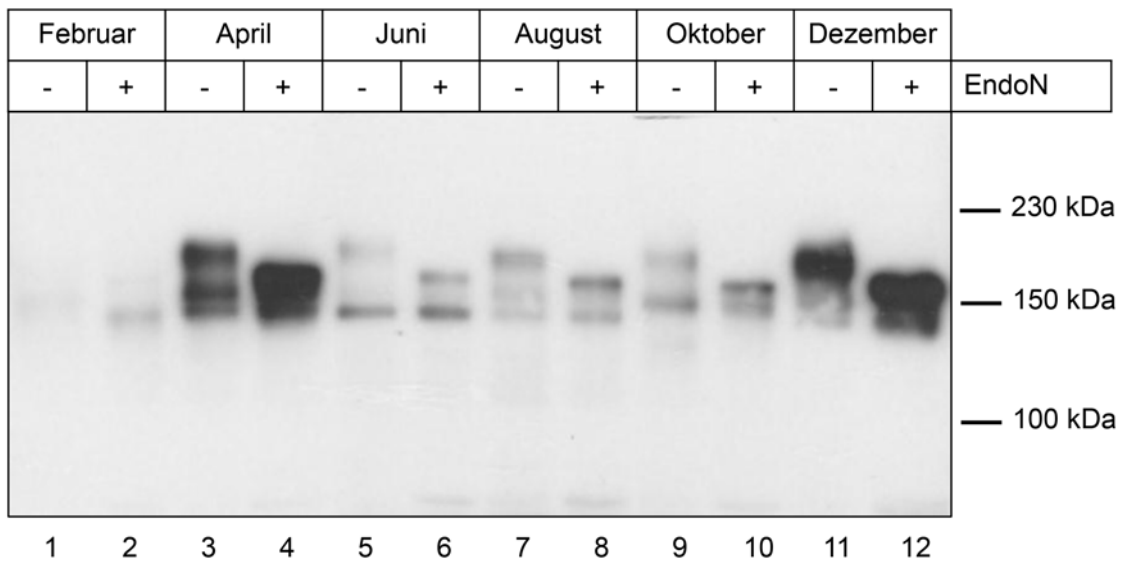


Abbildung 13: Nachweis der NCAM Expression im Jahresverlauf.

Für die Western Blot-Analysen der NCAM Expression wurden pro Spur jeweils 4 µg Protein der Gewebslysate sowohl nativ (Spur: 1,3,5,7,9,11) als auch mit EndoN vorbehandelt (Spur 2,4,6,8,10,12) auf das Gel gegeben, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Immunmarkierung erfolgte unter Verwendung des anti-NCAM mAk 123C3. Die Molekulargewichte sind in kDa angegeben.

4.1.5. Statistische Auswertung der Western Blot-Analysen

Der Juni ist der einzige Monat im Reproduktionszyklus des Rehbocks in dem die Spermatogenese komplett aktiviert ist. Daher wurden die für Juni densitometrisch ermittelten Zahlen in jedem Blot als Referenz (100%) definiert und die Signalintensitäten der anderen Monate im Verhältnis dazu berechnet. Für die statistische Auswertung wurden die so ermittelten relativen Werte der verschiedenen Blots miteinander verglichen. Je fünf (PolySia) bzw. vier (NCAM) Werte der Monate Februar, April, August, Oktober und Dezember gingen in die Statistik ein. Im Rahmen der Identifizierung des PolySia-Trägerproteins zeigte sich in der Western Blot-Analyse nach erfolgter Affinitätspräzipitation vor allem im Bereich von 180 kDa ein NCAM-Signal, sodass nur die Isoform NCAM-180 in der statistischen Auswertung berücksichtigt wurde (vergleiche 4.1.3). In der statistischen Auswertung (Abbildung 14) zeigen sich für die Monate Februar, Juni und August verhältnismäßig geringe Expression von PolySia und NCAM-180. Im April und Dezember finden sich sowohl für PolySia als auch für NCAM die höchsten relativen Expressionswerte. Mittels eines T-Tests konnte eine signifikante Erhöhung der PolySia und NCAM-180 Expression in den Monaten April und Dezember gegenüber dem Referenzwert im Juni ermittelt werden.

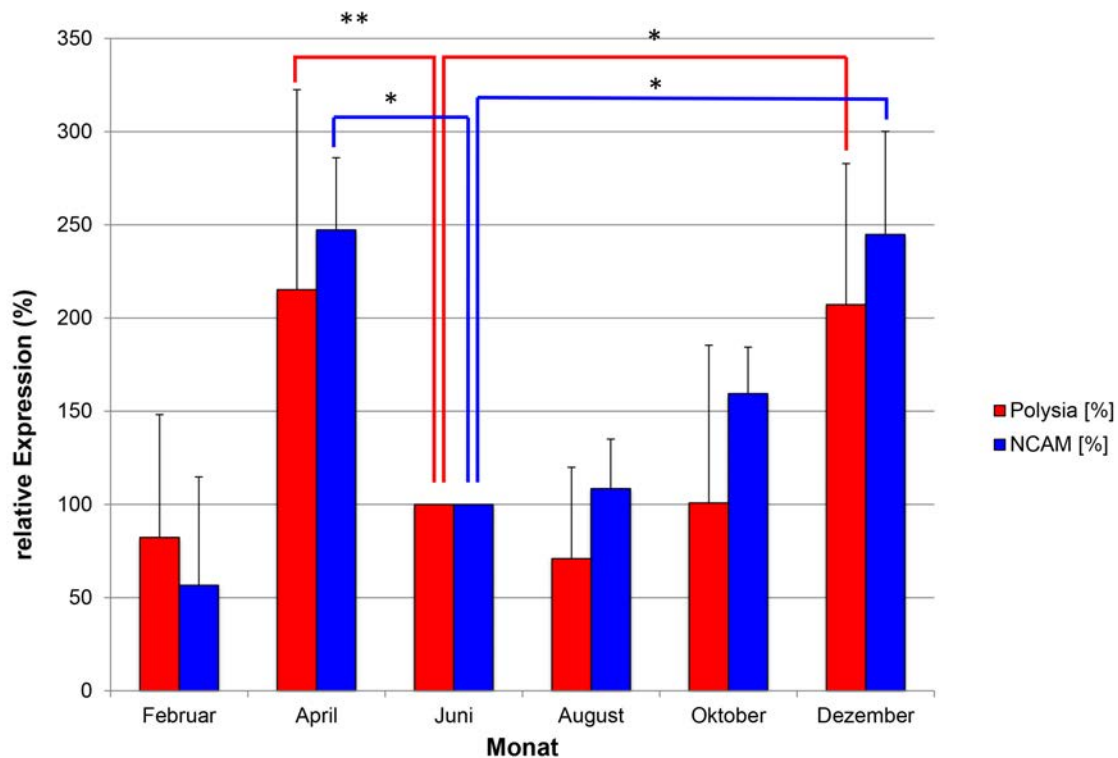


Abbildung 14: Statistische Auswertung der PolySia- und NCAM Expressionswerten.

Für die statistische Auswertung wurden die Proteinbanden jedes Western Blots zunächst densitometrisch quantifiziert. Die Juniwerte wurden jeweils als 100% gesetzt und die übrigen Werte eines Blots dazu im Verhältnis berechnet. Für jeden Monat wurde anschließend ein Mittelwert der Expression von PolySia (rot) und NCAM (blau) erstellt. Die mittels T-Test erhobenen signifikanten Werte (p -Wert unter 5%) sind mit $*p < 0,05$ und $**p < 0,01$ gekennzeichnet.

4.2. Kettenlängenbestimmung von PolySia

In der Vergangenheit konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass die biologische Funktion von PolySia auch von der Kettenlänge abhängig ist. So berichteten Ono und Hane 2011 darüber, dass PolySia eine Kettenlänge von mindestens 17 Sialinsäureresten benötigt, um mit dem Wachstumsfaktor bFGF interagieren zu können [Ono et al. 2012]. Dass bFGF im Rehhoden während der beginnenden Keimzellproliferation im April maximal stark exprimiert ist, beschrieb Wagener schon 2003 [Wagener et al. 2003]. Es stellte sich daher die Frage, ob das im Rahmen dieser Arbeit detektierte PolySia-NCAM als Interaktionspartner von bFGF im Rehhoden infrage kommen könnte. Für die Kettenlängenanalyse wurden Proben aus April und Dezember ausgewählt, da hier die PolySia-Expression am größten war. Die polysialylierten Proteine wurden dazu zunächst mittels einer Affinitätspräzipitation (3.2.1.3) aus den entsprechenden Proben extrahiert. Anschließend wurden sie in einer Eintopfreaktion durch saure Hydrolyse von NCAM abgespalten und durch das in der

Reagenz enthaltene DMB fluoreszenzmarkiert. Die freien Sialinsäureketten wurden dann chromatographisch mit einer Anionenaustauschersäule aufgetrennt und je nach Kettenlänge vom Fluoreszenzdetektor erfasst. Die Chromatogramme in Abbildung 15 zeigen, dass PolySia in beiden Monaten aus mindestens 19 Sialinsäureresten bestehen kann.

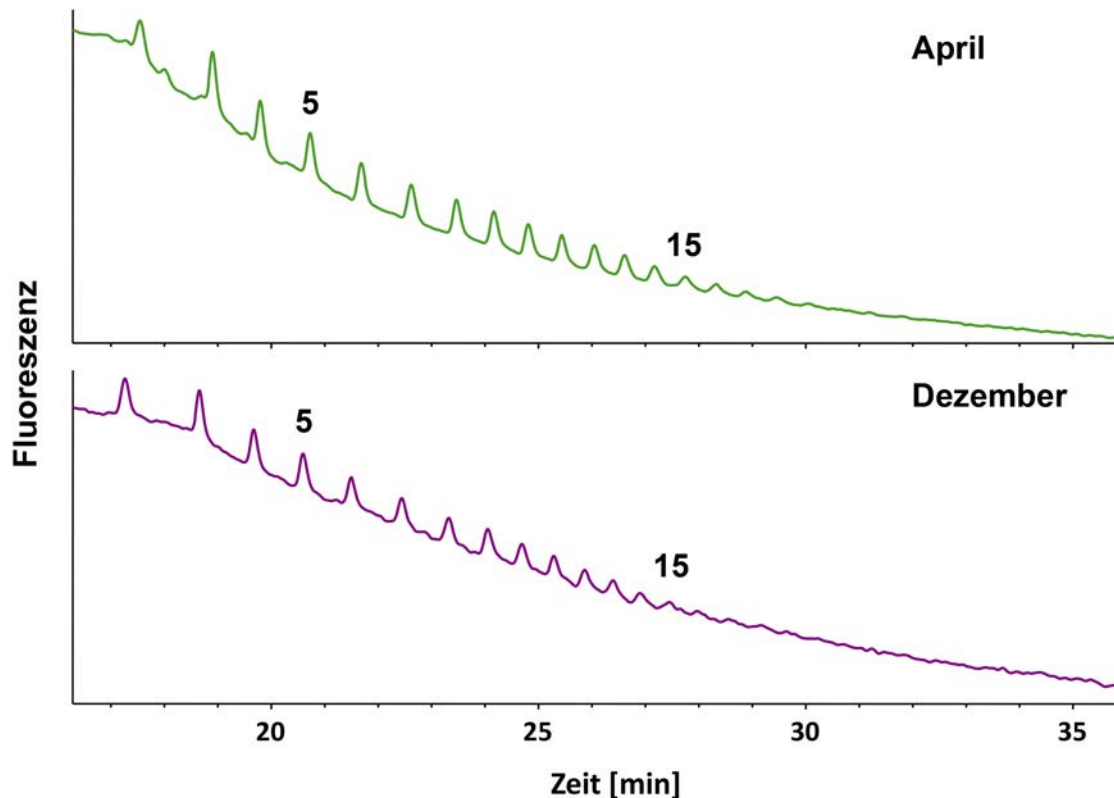


Abbildung 15: PolySia-Kettenlängenbestimmung mittels DMB HPLC Analyse.

Für die HPLC Analyse wurden die PolySia-Ketten der zuvor aufgereinigten polysialylierten Proteine in einer Eintopfreaktion vom Trägerprotein abgespalten und durch DMB fluoreszenzmarkiert. Die Sialinsäure-Polymere wurden anschließend auf einer Anionenaustauschersäule nach ihrer Kettenlänge aufgetrennt und detektiert. Oberhalb ausgewählter Peaks ist die jeweilige Anzahl an Sialinsäureresten pro Polymer angegeben.

4.3. Lokalisation von PolySia-NCAM im Rehhodengewebe

Nachdem in der Western Blot-Analyse nachgewiesen werden konnte, dass sich die PolySia-Expression im Hodengewebe des Rehbocks während des Reproduktionszyklus verändert, sollte nun die genaue histologische Lokalisation von PolySia bestimmt werden. Die in 5 µm geschnittenen und entparaffinierten Gewebeproben wurden dazu in der Immunhistochemie mit dem anti-PolySia mAk inkubiert, mit Hämalaun gegengefärbt und am Lichtmikroskop qualitativ ausgewertet.

4.3.1. Negativkontrolle

Für die IHC wurden immer zwei 5 µm dünne Serienschnitte nebeneinander auf die Objektträger platziert, von denen einer als Negativkontrolle verwendet wurde. Mittels eines EndoN-Verdaus wurden alle eventuell vorhandenen PolySia Ketten vor der eigentlichen Immunmarkierung vom Kontrollschnitt entfernt.

Bei erfolgreich durchgeführter IHC sollte die Immunfärbung nur auf dem nicht mit EndoN behandeltem Schnitt nachzuweisen sein und so zeigen, dass keine unspezifischen Antikörperbindungen stattgefunden haben. Exemplarisch ist in Abbildung 16 eine solche Negativkontrolle von einem Dezemberschnitt gezeigt. Da nach der Entfernung aller PolySia-Ketten durch EndoN keine Immunfärbung mehr gesehen wurde, sind die übrigen Signale als spezifisch zu betrachten.

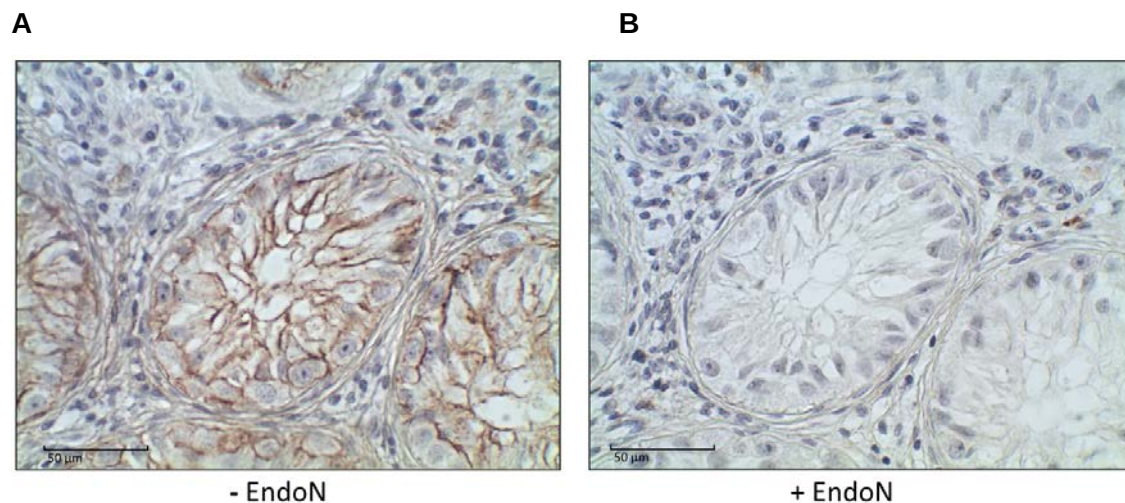


Abbildung 16: Negativkontrolle der PolySia-Immunfärbungen

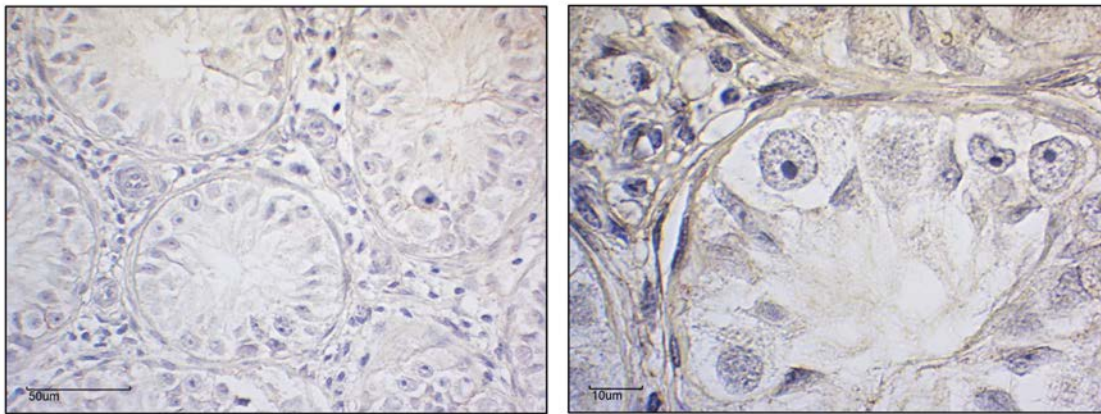
PolySia wurde durch den anti-PolySia mAk 735 immunhistochemisch sichtbar gemacht (**A**). Als Negativkontrolle fand ein EndoN-Enzymverdaus aller Kontrollschnitte vor der eigentlichen Immunmarkierung statt (**B**). Da hier kein Signal gesehen werden konnte, gilt die PolySia Färbung als spezifisch. Der Skalierungsbalken entspricht 50 µm.

4.3.2. Qualitative Beschreibung der histologischen Bilder

4.3.2.1. Februar

Histologisch bestehen die Tubuli des Rehhodenparenchyms im Februar fast ausschließlich aus Sertoli-Zellen und Spermatogonien. Spermatozyten oder Spermatiden sind kaum vorhanden. Weder im tubulären noch im interstitiellen Gewebe der drei untersuchten Gewebeproben konnte ein wiederkehrendes PolySia-Signal detektiert werden (Abbildung 17 A). Vereinzelt Signale konnten jedoch im apikalen Bereich von Sertoli-Zellen detektiert werden. Diese Signale waren jedoch in Tubuli zu finden, die bereits einige Spermatozyten enthielten, also nach der Winterruhe schon zu proliferieren begonnen hatten (Abbildung 17 B).

A



B

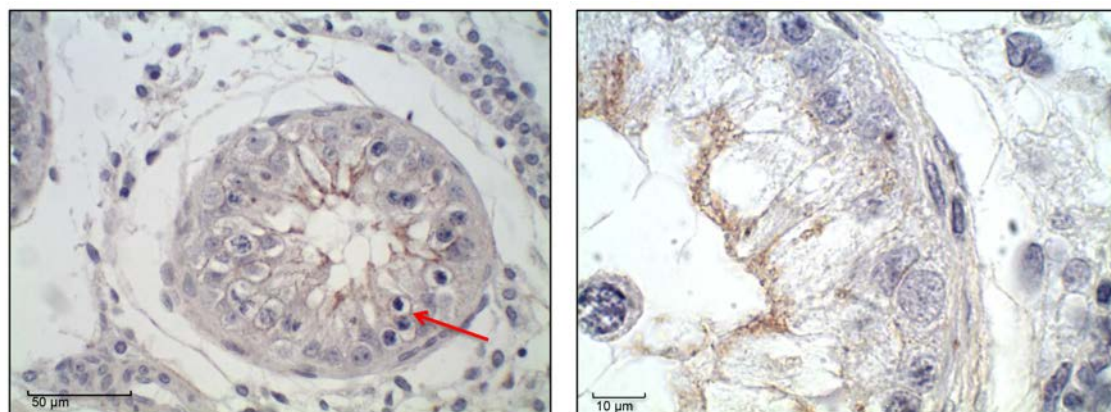


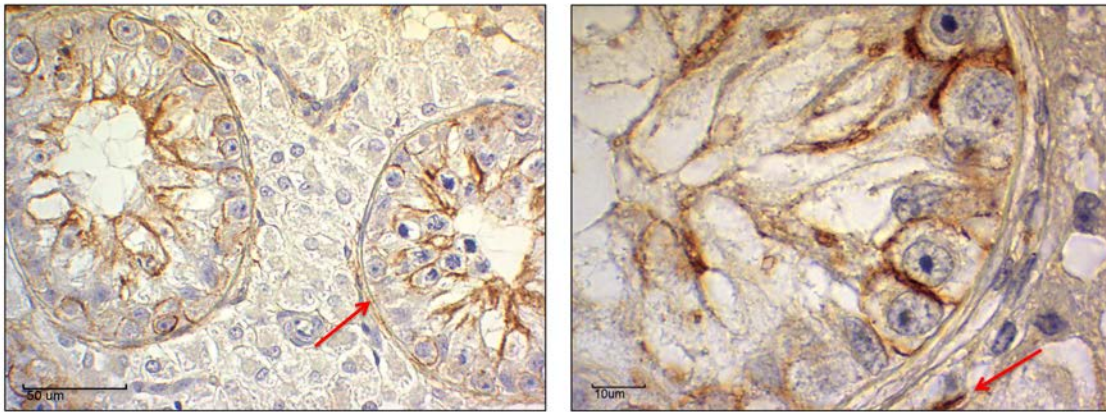
Abbildung 17: Bilder des Hodenparenchyms im Februar nach PolySia-Immunfärbung.

In **(A)** ist das typische histologische Bild des Hodenparenchyms nach PolySia-Immunmarkierung zu sehen. Eine seltene Ausnahme ist in **(B)** aufgeführt. Die Skalierungsbalken entsprechen jeweils 50 µm bzw. 10 µm. Der rote Pfeil zeigt auf im Februar selten zu sehende Spermatozyten.

4.3.2.2. April

Trotz der zum Teil variierenden Morphologie (einige Tubuli weisen schon viele Entwicklungsstufen germinativer Zellen auf, während andere nur Sertoli-Zellen und Spermatogonien enthalten) konnten in allen Proben deutliche PolySia-Signale nachgewiesen werden. Mit zunehmendem Reifegrad des Gewebes veränderten sich jedoch Menge und Lokalisation. In den morphologisch noch weniger weit entwickelten Tubuli konnten die intensivsten Färbungen auf den Spermatogonien und im apikalen Bereich der Sertoli-Zellen detektiert werden. Bei manchen Tubuli schien auch die Lamina propria bzw. schienen die peritubulären Zellen angefärbt zu sein (Abbildung 18 A). Anders fielen die Signale in Tubuli aus, in denen das Keimepithel im Reifeprozess schon fortgeschrittener war. Besonders um primäre Spermatozyten und auf Sertoli-Zellen waren hier Signale sichtbar (Abbildung 18 B). Im sonstigen Interstitium zeigte sich keine Immunfärbung.

A



B

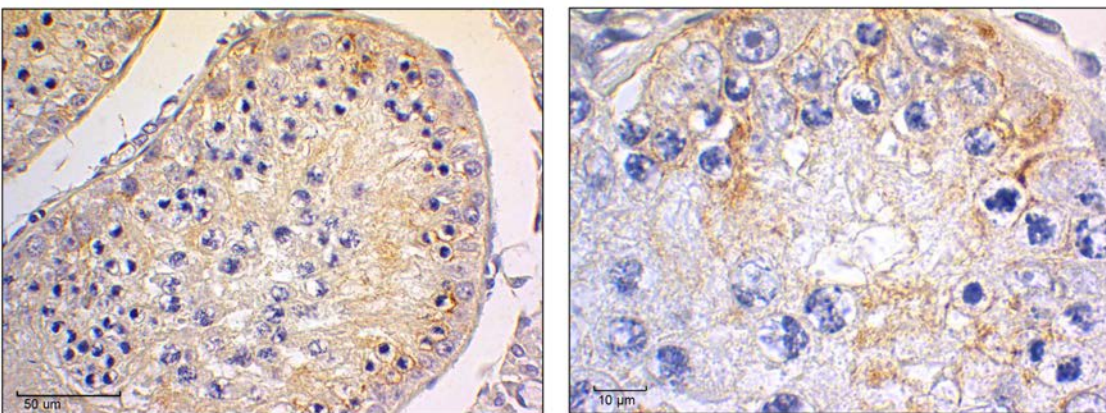


Abbildung 18: Bilder des Hodenparenchyms im April nach PolySia-Immunfärbung.

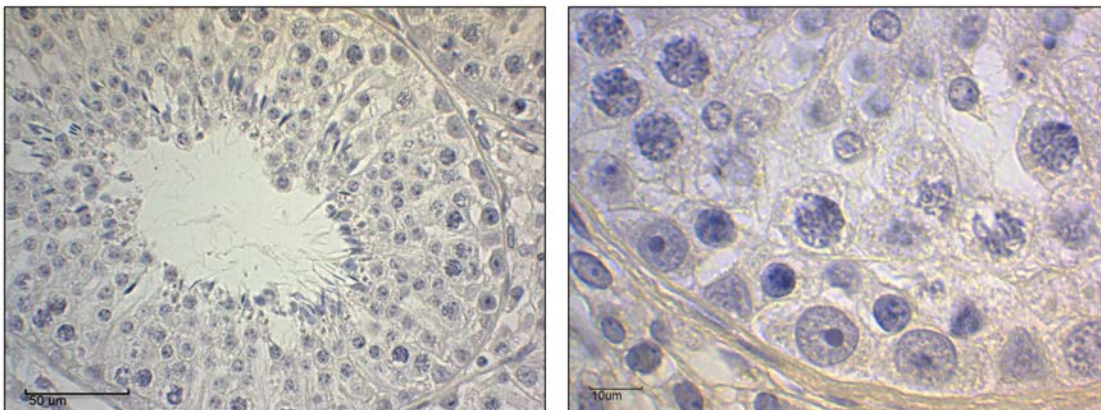
In **(A)** ist die PolySia-Immunfärbung eines weniger weit entwickelten Tubuli zu sehen. Das Signal befindet sich hier besonders um die Spermatogonien und im adluminalen Kompartiment auf den Sertoli-Zellen. Die roten Pfeile zeigen auf PolySia-positive peritubuläre Zellen (Myofibroblasten). Die Immunfärbung von in der Spermatogenese schon weiter fortgeschrittenen Tubuli ist in **(B)** exemplarisch gezeigt. Hier sind besonders primäre Spermatozyten und Sertoli-Zellen polysialyliert. Die Skalierungsbalken entsprechen jeweils 50 µm bzw. 10 µm.

4.3.2.3. Juni

Zu dieser Zeit ist die Spermatogenese vollständig aktiviert, im Keimepithel des Tubulus sind von Spermatogonien bis Spermatozoen alle Keimzell-Entwicklungsstufen zu finden. Von allen in der Immunhistochemie untersuchten Monaten konnte in den Juni-Proben allerdings die geringste Menge an PolySia-Signalen gefunden werden.

Abbildung 19 A zeigt ein typisches histologisches Bild des Hodengewebes nach der PolySia-Immunmarkierung. Sehr vereinzelt waren zwar polysialylierte Spermatogonien zu sehen (Abbildung 19 B), jedoch ließ sich in keiner der untersuchten Proben ein regelmäßig wiederkehrendes Verteilungsmuster der PolySia-Signale erkennen. Im Interstitium zeigte sich keine Immunfärbung.

A



B

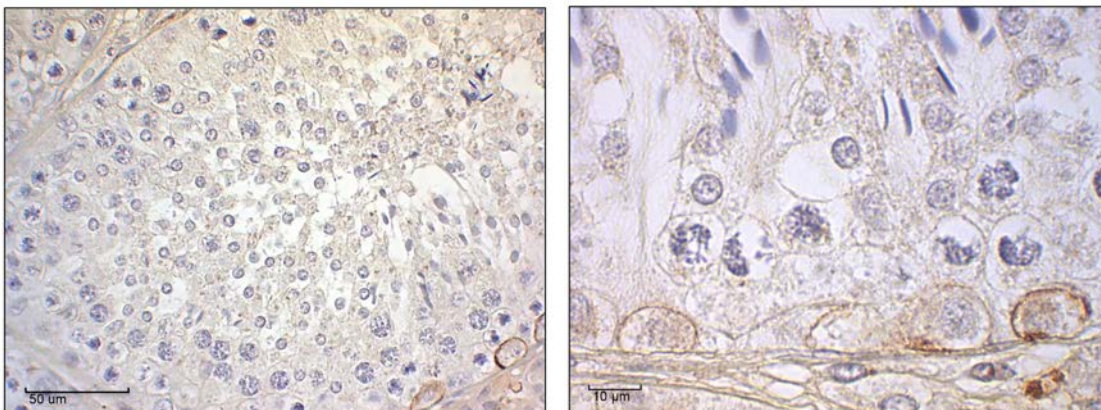


Abbildung 19: Bilder des Hodenparenchyms im Juni nach PolySia-Immunfärbung.

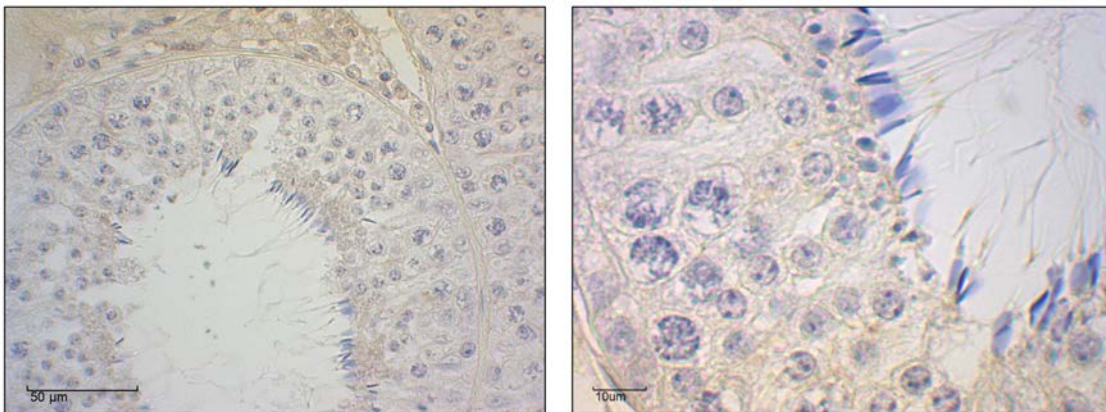
In **(A)** ist das typische Bild eines Juni-Tubulus nach PolySia-Immunfärbung gezeigt. Insgesamt wurden im Juni die wenigsten PolySia-Signale detektiert. Eine seltene Ausnahme ist in **(B)** dargestellt. Das Signal wurde in diesen Fällen nur auf Spermatogonien gesehen. Die Skalierungsbalken entsprechen jeweils 50 µm bzw. 10 µm.

4.3.2.4. August

Im Juli und August findet die Brunftzeit der Rehböcke statt. Histologisch ist zu dieser Zeit die höchste Anzahl an Spermatiden zu detektieren. Die Proliferation der germinativen Zellen ist jedoch schon wieder rückläufig. Die Tubulusdurchmesser werden kleiner, die Zahl der Spermatozyten verringert sich und der prozentuale Anteil der Sertoli-Zellen nimmt wieder zu.

In den Augustproben konnten nur einige sehr wenige wiederkehrende Signale gesehen werden. Diese befanden sich auf Spermatogonien, primären Spermatozyten und auf den ins Tubuluslumen ragenden Seiten von Sertoli-Zellen (Abbildung 20 B). Der Großteil der angeschnittenen Tubuli wies jedoch keine Färbung auf (Abbildung 20 A). Im Interstitium zeigte sich keine Immunfärbung.

A



B

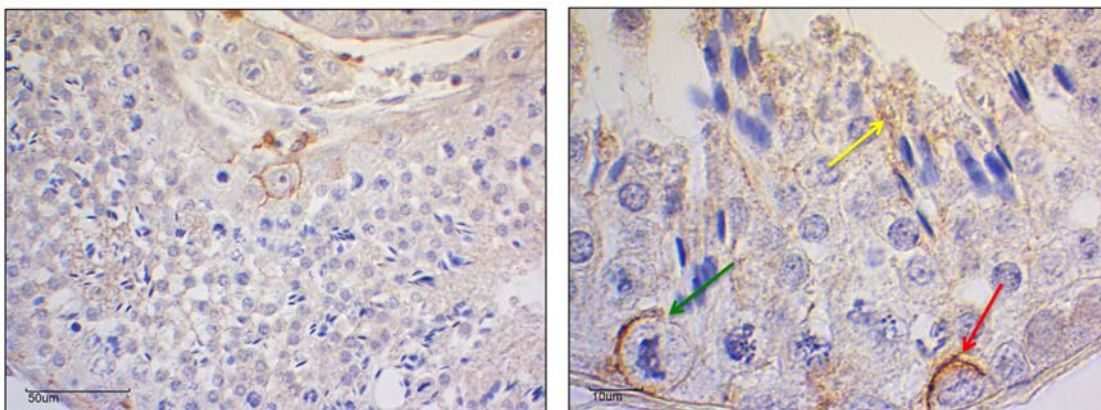


Abbildung 20: Bilder des Hodenparenchyms im August nach PolySia-Immunfärbung.

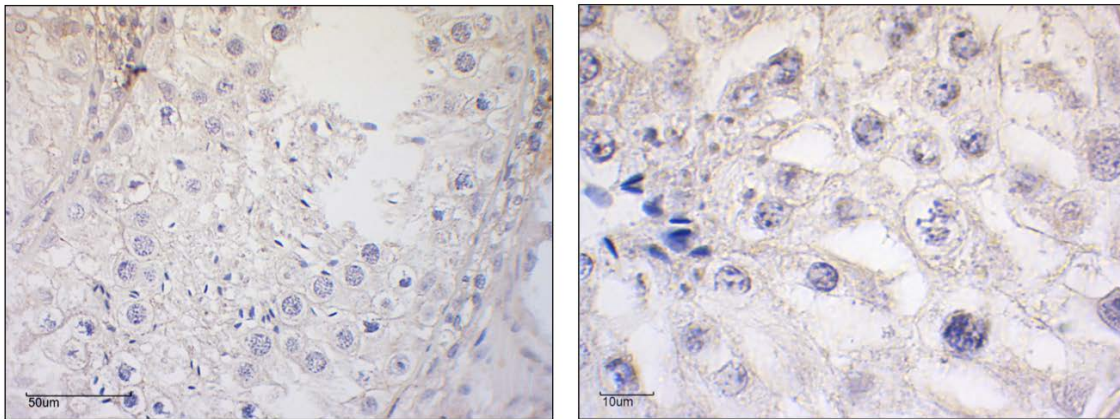
(A) zeigt einen typischen Tubulus im August ohne sichtbares PolySia-Signal. In (B) sind Bilder wiederkehrender PolySia-Immunsignale auf Spermatogonien (roter Pfeil), prim. Spermatozyten (grüner Pfeil) und der luminalen Seite von Sertoli-Zellen (gelber Pfeil) dargestellt. Die Skalierungsbalken entsprechen jeweils 50 µm bzw. 10 µm.

4.3.2.5. Oktober

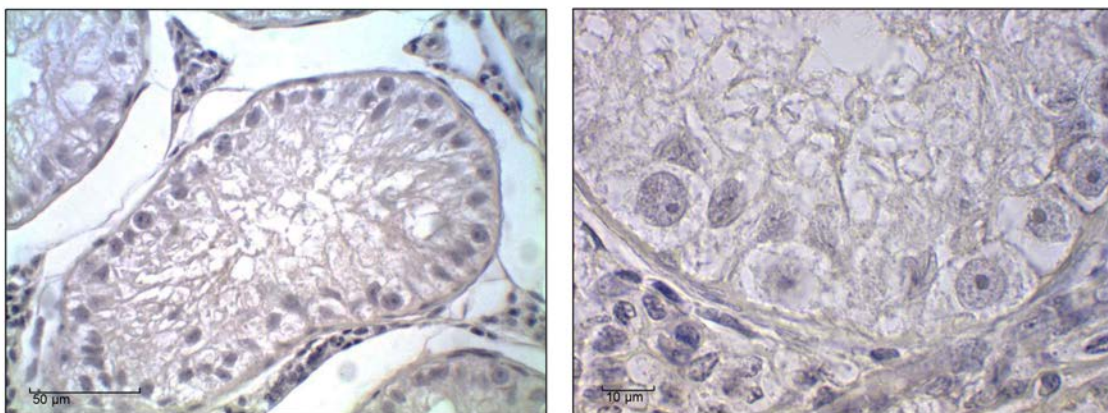
Der Oktober stellt die Übergangsphase von der Brunftzeit zum Winterruhe dar. Das histologische Bild des Hodengewebes ist zu dieser Zeit sehr heterogen. Die testikuläre Zellzusammensetzung variiert sowohl zwischen den verschiedenen Tieren als auch innerhalb des Hodens eines Tiers. Während in einigen Tubuli noch viele germinative Zellen zu sehen sind, befinden sich in anderen bereits nur noch Spermatogonien und Sertoli-Zellen.

Der immunhistochemische Nachweis der PolySia-Lokalisation im Rehhodenparenchym stellte sich ebenso heterogen dar wie das histologische Bild. Innerhalb jeder untersuchten Probe zeigten die meisten Tubuli gar keine Färbung (Abbildung 21 A/B), während einzelne Tubuli deutliche Signale aufwiesen. Wiederkehrende PolySia-Signale wurden besonders luminal zwischen den Sertoli-Zellen in jenen Tubuli gesehen, die nur noch aus Spermatogonien und Sertoli-Zellen bestanden (Abbildung 21 C).

A



B



C

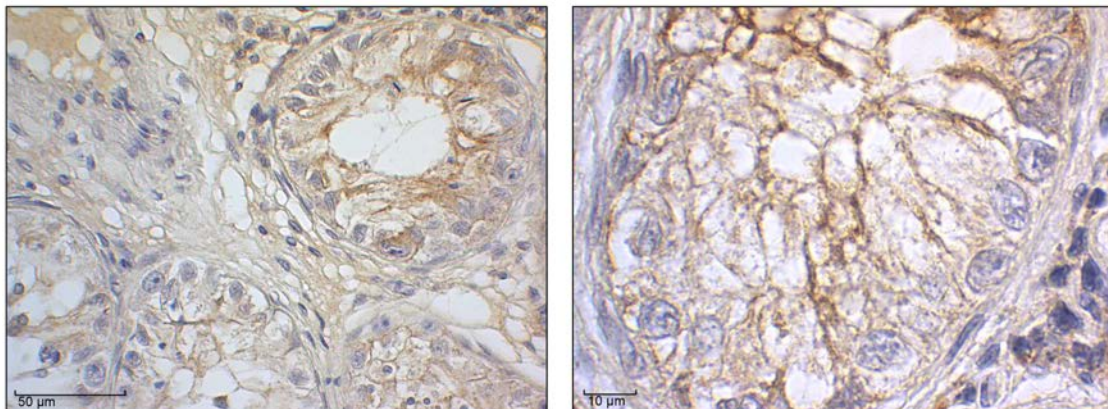


Abbildung 21: Bilder des Hodenparenchyms im Oktober nach PolySia-Immunfärbung.

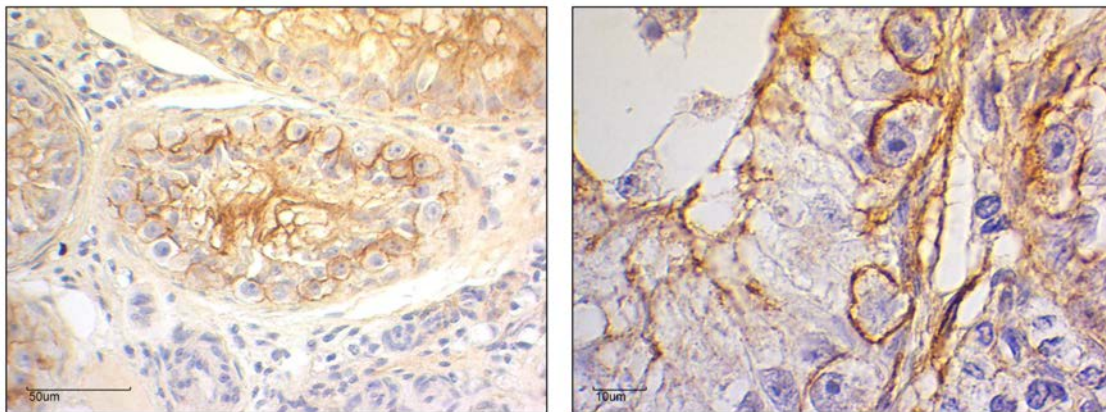
Gezeigt sind typische histologische Bilder des Oktober-Rehhodenparenchyms nach Immunmarkierung mit einem PolySia mAk. Meistens wurde weder in den Spermatogenese-aktiven (A) noch den Spermatogenese-inaktiven Tubuli (B) ein PolySia-Signal gesehen. Das seltene PolySia-Immunsignal ist in (C) zu sehen und befindet sich auf der luminalen Seite von Sertoli-Zellen. Die Skalierungsbalken entsprechen jeweils 50 µm bzw. 10 µm.

4.3.2.6. Dezember

Das histologische Bild des Hodenparenchyms ist im Dezember gleichmäßig. Bei allen untersuchten Tieren und in allen Gewebeschnitten befinden sich nur noch Sertoli-Zellen und Spermatogonien in den Tubuli, andere germinative Zellen sind kaum mehr sichtbar. Der Tubulusdurchmesser ist im Dezember klein, die Tubuli liegen eng gepackt im Interstitium.

Alle untersuchten Proben wiesen durchgehend ein sehr starkes PolySia-Signal in der Immunhistochemie auf. PolySia-Signale konnten besonders um die Spermatogonien und zwischen den Sertoli-Zellen detektiert werden (Abbildung 22). Im Interstitium zeigte sich keine Immunfärbung.

A



B

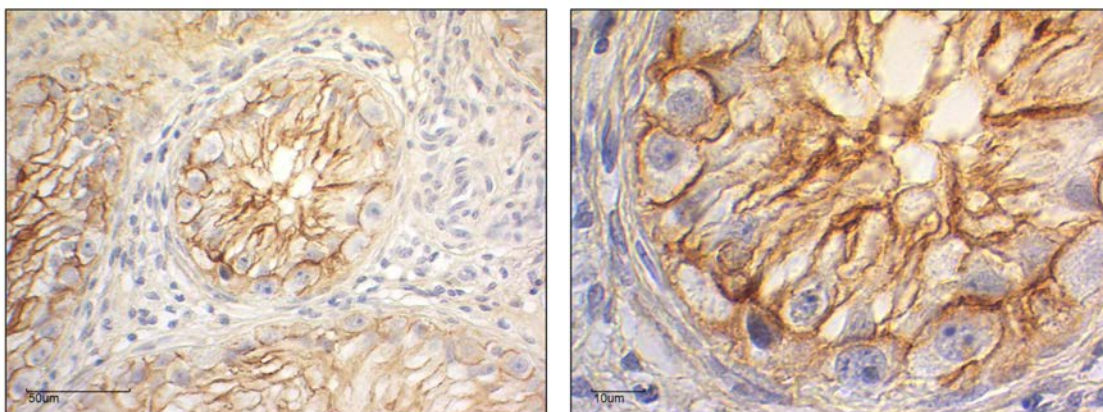


Abbildung 22: Bilder des Hodenparenchyms im Dezember nach PolySia-Immunfärbung.

Alle Dezemberproben zeigten in der Immunhistochemie deutliche PolySia-Signale. Diese befanden sich besonders auf den Spermatogonien und im apikalen Bereich zwischen den Sertoli-Zellen. Die Skalierungsbalken entsprechen jeweils 50 µm bzw. 10 µm.

5. Diskussion

5.1. Die saisonale PolySia-Expression im Rehhoden

PolySia ist ein wichtiger Regulator der Zell-Zell-Interaktion und kommt als posttranslationale Modifikation auf verschiedenen Proteinen, wie dem *neural cell adhesion molecule* NCAM und dem Zelladhäsionsmolekül SynCAM vor [Finne 1982, Galuska et al. 2010]. Durch seine negative Ladung vergrößert PolySia unter anderem Zell-Abstände und erschwert die Zelladhäsion. Diese Eigenschaften haben eine wichtige Bedeutung für das Wachstum von Axonen, der Plastizität von Synapsen und der Entwicklung des Gehirns insgesamt [Muller et al. 1996, Kiss und Rougon 1997, Gascon et al. 2007]. So sind PolySia-NCAM und die beiden Polysialyltransferasen ST8SialII und ST8SialIV während der gesamten Neurogenese nachweisbar [Hildebrandt et al. 1998, Muhlenhoff et al. 2009]. Im adulten Hirn konnte PolySia vor allem in solchen Arealen gefunden werden, die auch nach abgeschlossener Hirnreifung noch einer ständigen Umstrukturierung unterliegen, wie dem Hippocampus [Cremer et al. 1997, Burgess et al. 2008].

Ob PolySia auch während der Gonadenentwicklung von Säugetieren exprimiert wird, konnte bislang nicht gezeigt werden. In den 1990er Jahren kamen Li, Orth und Jester zu dem Schluss, dass das in Rattenhoden auf Sertoli-Zellen und Spermatozyten gefundene NCAM-140 nur unpolysialyliert vorliegt [Orth und Jester 1995, Li et al. 1998]. Auf bovinen, humanen und Seeigel-Spermien konnte α 2,8-verkürzte PolySia hingegen schon nachgewiesen werden [Miyata et al. 2007, Simon et al. 2013].

Wir wollten daher der Frage nachgehen, ob und wann PolySia in Säugetierhoden vorkommt. Als Studienmodell wählten wir den Rehbock, dessen Reproduktionsaktivität einem saisonalen Zyklus folgt. Die Keimdrüsen (Testis/Ovarien) solcher saisonalen Tiere unterliegen ständigen morphologischen und histologischen Veränderungen und eignen sich daher hervorragend, um generelle Steuerungsmechanismen der Spermatogenese zu untersuchen [Hikim et al. 1988]. Beim Rehbock schwanken diese Veränderungen zwischen vollkommener Aktivierung der Spermatogenese in den Sommermonaten (Juni-August) und kompletter Rückbildung des Keimepithels im Winter (Januar-Februar) [Lincoln 1989, Bronson und Heidemann 1994]. Seine saisonale Spermatogenese ist histologisch sehr gut charakterisiert und seine Reproduktion folgt einem besonders strengen Zyklus [Klonisch et al. 2006].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Glykan PolySia als posttranslationale Modifikation des Glykoproteins NCAM im Rehhoden vorkommt und seine Expression dabei einer saisonalen Periodik folgt.

Um den Nachweis zu erbringen, dass PolySia im Rehhoden vorkommt, wurde zunächst das Gesamthodenlysat einer „Testprobe“ mittels Western Blot-Analyse untersucht. Nachdem sich hier ein sehr deutliches PolySia-Signal zeigte, stellte sich die Frage, ob sich die PolySia-Expression im Rahmen der saisonalen Spermatogenese des Rehbocks verändert.

Um ein möglichst lückenloses Bild der PolySia-Expression im sich ständig verändernden Keimepithel des Rehbocks zu erhalten, wurden die testikulären Proben so gewählt, dass jede Probereihe einen kompletten Jahreszyklus abbildet (Februar, April, Juni, August, Oktober und Dezember). Diese Probereihen wurden ebenfalls per Western Blot-Analyse auf das Vorhandensein von PolySia untersucht. Dabei konnte in allen Proben ein PolySia-Signal detektiert werden. Bei der Intensität der Banden präsentierten sich jedoch deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Monaten, was sich auch in der anschließenden densitometrischen und statistischen Auswertung der Blots bestätigte. Unsere Untersuchungen zeigen deutlich, dass die PolySia-Expression zu Beginn der Keimzellproliferation im April und zu Beginn des Winterarrests im Dezember besonders hoch ist. Im Übergangsmonat Oktober konnten insgesamt leicht erhöhte PolySia-Werte im Vergleich zum Juni gemessen werden. Liegt das Keimepithel hingegen komplett aktiviert (Juni, August) bzw. inaktiviert (Februar) vor, werden signifikant geringere PolySia-Mengen exprimiert (Abbildung 11). PolySia scheint im Rehhodengewebe immer dann hochreguliert zu werden, wenn sich das Keimepithel im Übergang von inaktiv zu aktiv oder aktiv zu inaktiv befindet und könnte dabei als eine Art Initiator der Morphologie-Veränderung fungieren.

In späteren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurden die Expressionslevel der Polysialyltransferasen ST8SialII und ST8SialIV mittels *real-time*-PCR für die Monate April, Juni und Dezember untersucht [Hänsch et al. 2014]. Obwohl das Transkript beider Enzyme nachgewiesen werden konnte, waren die ST8SialII-Expressionslevel ca. 100x höher als die von ST8SialIV, sodass ST8SialII im Rehhoden als vorherrschende Polysialyltransferase bezeichnet werden kann. Interessanterweise zeigten sich keine großen Unterschiede in der Expression zwischen den verschiedenen Monaten. Wie genau das oft beschriebene Missverhältnis von gemessener mRNA und Protein-Expression zustanden kommt, ist noch nicht abschließend geklärt. Postranskriptionale und posttranslationale Prozesse könnten dabei aber eine Rolle spielen. [Vogel und Marcotte 2012].

5.2. Identifizierung von NCAM als PolySia-Trägerprotein

In mehreren Studien wurde das Vorkommen der oben beschriebenen Glykoproteine SynCAM und NCAM im Keimepithel von Säugetierhoden belegt [Orth und Jester 1995, Li et al. 1998, Wakayama et al. 2003]. Später erwiesen sich SynCAM-ko-Mäusen sogar als infertil, was dessen enorme Bedeutung für die Spermatogenese zeigt [van der Weyden et al. 2006]. Vor diesem Hintergrund interessierte uns im Folgenden: Welche Glykoproteine fungieren im testikulären Gewebe des Rehbocks als PolySia-Träger? Da NCAM und SynCAM aber sowohl polysialyliert als auch unpolysialyliert vorliegen können, mussten die polysialylierten Proteine der Probe zunächst isoliert werden. Für die Versuche wurde eine Dezemberprobe mit nachweislich hohem PolySia-Gehalt zunächst in zwei Hälften aufgeteilt (aliquotiert). Aus einem Aliquot wurden alle polysialylierten Proteine mittels Affinitätspräzipitation (AP) extrahiert, das andere blieb nativ. Ein Teil jedes Aliquots wurde durch das Enzym EndoN von allen eventuell vorhandenen PolySia-Ketten befreit, um den Antikörpern in der anschließenden Western Blot-Analyse eine bessere Bindung zu ermöglichen und so ein besseres Signal zu erhalten.

Es stellte sich heraus, dass reichlich SynCAM im Rehhodengewebe nachgewiesen werden konnte. Allerdings scheint es dort nur in unpolysialyliertem Zustand vorzukommen, da nach erfolgter AP kein SynCAM-Signal mehr sichtbar war. NCAM hingegen zeigte in beiden Proben eine deutliche Bande im Bereich von 180 kDa und eine schwache Bande bei 140 kDa (Abbildung 12). Dies bestätigt, dass sowohl NCAM-140 als auch NCAM-180 als PolySia-Träger im Rehhoden fungieren, wobei NCAM-180 scheinbar der Hauptträger ist. Dies ist eine neue Erkenntnis, da bislang nur die NCAM-140-Isoform in Säugetierhoden nachgewiesen wurde [Orth und Jester 1995, Li et al. 1998]. Bisher war polysialyliertes NCAM-180 vor allem für seine Bedeutung für das Neuritenwachstum im Gehirn bekannt [Horstkorte et al. 1993, Franceschini et al. 2001, Korshunova et al. 2007]. Außerdem kommt unpolysialyliertes NCAM-180 in benignen Kolontumoren vor und gilt bei kolorektalen Karzinomen als prognostisch günstiger Faktor für den Krankheitsverlauf. Fehlt NCAM-180 jedoch oder liegt polysialyliert vor, steigt das Metastasierungspotential und verschlechtert die Krankheitsprognose [Roesler et al. 1997, Huerta et al. 2001, Tascilar et al. 2007].

In dieser Studie konnte polysialyliertes NCAM-180 erstmals in Säugetierhoden nachgewiesen werden.

5.3. Die saisonale NCAM-Expression

In Säugetierhoden konnte NCAM bislang nur unpolysialyliert nachgewiesen werden. Nachdem wir NCAM jedoch als PolySia-Trägerprotein im Rehhoden identifizieren konnten, interessierte uns, ob sich Expression und Polysialylierung im Jahresverlauf verändern. Um dies zu untersuchen, wurden nun alle Probereihen mittels Western Blot-Analyse auf NCAM untersucht. In der densitometrischen Auswertung konnte eine saisonale Periodik der NCAM-180-Expression detektiert werden, die der PolySia-Expression sehr ähnelt. Auch hier wurden in den Monaten April/Dezember die höchsten und im Februar/Juni/August die niedrigsten relativen Werte gemessen. NCAM-180 war dabei in den Monaten April, August, Oktober und Dezember die dominierende Isoform und in allen Monaten stets polysialyliert, was an dem deutlichen „Banden-Shift“ zwischen nativer und EndoN-vorbehandelter Probe zu erkennen ist. Auch geringere Mengen an polysialyliertem NCAM-140 konnte in diesen Monaten detektiert werden. Im Februar und Juni zeigte polysialyliertes NCAM-180 ein schwächeres Signal als das hier unpolysialyliert vorliegende NCAM-140.

Im Juni, dem einzigen Monat in dem die Spermatogenese komplett aktiviert ist, scheint also hauptsächlich unpolysialyliertes NCAM-140 exprimiert zu werden. Vergleicht man dies mit den Studien von Orth und Li [Orth und Jester 1995, Li et al. 1998], fallen einige Unterschiede in den Ergebnissen auf. Dass die Arbeitsgruppen weder PolySia noch NCAM-180 während der Hodenentwicklung von Ratten feststellen konnten, könnte entweder daran liegen, dass die damals verwendeten Antikörper unspezifischer war als die von uns benutzten [Sato et al. 1995], oder die Konzentration der exprimierten PolySia-Mengen in Rattenhoden war zu gering, um in der Western Blot-Analyse detektiert zu werden. Eine weitere Möglichkeit ist, dass in sich entwickelnden Rattenhoden tatsächlich kein PolySia exprimiert wird. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da das Vorkommen von PolySia-NCAM während der postnatalen Hodenentwicklung von Säugetieren (Mäuse, Katzen) in unserem Labor bereits nachgewiesen werden konnte (noch nicht publiziert). Die gemessenen PolySia- und NCAM-Expressionswerte sanken dabei mit zunehmendem Alter der Tiere und zunehmender Reifung des Keimepithels, was mit von Ergebnissen von Orth und Li bezüglich der NCAM-140-Expressionswerte übereinstimmt.

Dass die PolySia-tragende NCAM-Isoform zwischen den verschiedenen Säugetierspezies variiert, ist hingegen denkbar. Zudem wurden in der vorliegenden Studie nicht die postnatale Hodenentwicklung des Rehbocks, sondern deren saisonale Veränderungen untersucht. Es ist durchaus möglich, dass PolySia während der embryologischen und perinatalen Entwicklung der Keimdrüsen von anderen

Trägerproteinen exprimiert wird als bei adulten Tieren. Dennoch gleicht der Aufbau des Keimepithels nach dem Winterarrest der postnatalen Hodenentwicklung insofern, als alle germinativen Zellstufen aus Stammzellen neu gebildet werden müssen und der Hoden zur Brunftzeit deutlich an Volumen und Funktionalität gewinnt [Schön et al. 2004].

5.4. Histologische Lokalisation von PolySia-NCAM

Um ein genaueres Bild davon zu bekommen, welche Funktionen PolySia-NCAM im Rahmen der saisonalen Veränderung erfüllt, sollten nun die polysialylierten Zellen mittels Immunhistochemie identifiziert werden. Dazu wurden die zuvor in Paraffin eingebetteten Gewebeproben am Mikrotom in 5 µm dünne Gewebspräparate geschnitten, auf Objektträger gezogen und in absteigender Alkoholreihe entparaffiniert. Anschließend folgte die Inkubation mit dem PolySia-Antikörper. Für die Negativkontrolle wurden Serienschnitte vor der Immunmarkierung mit EndoN verdaut. Durch einen HRP-haltigen Sekundärantikörper und ein DAB+Kit konnte das im Gewebe vorhandene PolySia als braune Färbung sichtbar gemacht werden. Die Gegenfärbung der testikulären Zellstrukturen erfolgte mit Hämalaun. Die verbreitete Hämalaun-Eosin (HE)-Färbung erschwerte in Testversuchen das Erkennen der braunen PolySia-Färbung, sodass wir uns für eine einfache Hämalaunfärbung entschieden. Die Schnitte wurden nun in aufsteigender Alkoholreihe entwässert, mit Eukitt® und Deckglas fixiert und am Mikroskop ausgewertet. Pro Monat wurden Gewebeproben von drei verschiedenen Tieren auf diese Weise immunhistochemisch untersucht.

Die intensivsten Färbungen wurden in den Monaten April und Dezember gesehen, während die Gewebsschnitte aus Februar, Juni und August kaum PolySia-Signale aufwiesen. Der Oktober stellte einen sehr heterogenen Monat dar und zeigte in einigen Bereichen intensive, in anderen gar keine Färbungen. Diese allgemeine Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der Western Blot-Analyse. Die genaue Lokalisation von PolySia veränderte sich jedoch nicht nur quantitativ sondern auch qualitativ.

Bei dem Versuch einer Interpretation muss berücksichtigt werden, dass die saisonale Spermatogenese wildlebender Tiere, anders als die asaisonale („*steady-state*“) Spermatogenese des Menschen, ein sehr dynamisch ablaufender Prozess ist, bei dem sowohl das Keimepithel als auch das Interstitium einem ständigen Auf-, Ab- und Umbau unterliegen. Dr. Jennifer Schön fertigte 2003 eine umfangreiche Arbeit zur histologischen Charakterisierung der saisonalen Spermatogenese des Rehbocks an

und beschrieb darin die am häufigsten wiederkehrenden Zellassoziationen jedes Monats [Schön 2003]. Der Versuch, die saisonale Spermatogenese in Stadien einzuteilen und ihnen bestimmte Zellzusammensetzungen zuzuschreiben, ist wichtig und dient dem besseren Verständnis der biologischen Abläufe. Dennoch stellen solche Einteilungen stets nur eine Annäherung an die tatsächlich stattfindenden, sehr komplexen Prozesse dar. Auch wenn der Großteil der Tubuli eines Tieres sich histologisch sehr ähneln und häufig wiederkehrende Zellassoziationen identifiziert werden können, ist es nicht selten, dass sich das Keimepithel einzelner Tubuli von dieser Regelmäßigkeit unterscheidet. So kommt es vor, dass einige Tubuli schon im Februar zu proliferieren beginnen, andere bis in den April hinein keine Reproduktionsaktivität zeigen oder Tubuli im Oktober noch alle germinativen Zellen enthalten.

Im Februar konnte PolySia auf einigen wenigen Spermatogonien entdeckt werden. Sie zeigten sich stets in Tubuli, die bereits zu proliferieren begonnen hatten, in denen das Keimepithel also eher der für den April typischen Zellassoziation glich. Alle Tubuli, die sich „ordnungsgemäß“ noch im Winterarrest befanden, also nur Spermatogonien und Sertoli-Zellen enthielten, wiesen keine PolySia-Färbung auf (Abbildung 17).

Die Gewebeschnitte aus den Monaten Juni und August zeigten nur sehr vereinzelt Signale. Im Juni waren diese auf Spermatogonien zu detektieren, im August wiesen auch einige primäre Spermatozyten PolySia-Signale an ihren Zellgrenzen auf (Abbildung 19 und Abbildung 20). Bei beiden Monaten konnte jedoch kein regelmäßiger Zusammenhang von PolySia-Färbungen und Tubulus-Zellkonfiguration festgestellt werden. Auch die während dieser Monate in hoher Zahl vorhandenen elongierten Spermatiden waren nicht polysialyliert.

Dies ist interessant, da PolySia-NCAM auf ejakulierten Säugetier-Spermien (Ratte, Rind, Mensch) bereits nachgewiesen werden konnte [Simon et al. 2013]. Auch auf Epithelzellen des Nebenhodenkopfs fand man in diesem Zusammenhang PolySia, nicht aber auf Zellen des Keimepithels selbst.

Dass während der aktiven Spermatogenese des Rehbocks kein PolySia auf elongierten Spermatiden gefunden werden konnte, stimmt mit den Ergebnissen von Simon et al. (2013) überein. Die vereinzelt PolySia-Signale auf Spermatogonien sind entweder dem konstanten Auf-und Abbau des Keimepithels geschuldet oder es könnte sich um „echte“ Stammzellen handeln, die histologisch nur sehr schwer zu identifizieren sind und sich nur selten teilen. Die im Übergangsmonat Oktober detektieren Färbungen befanden sich an den Sertoli-Zellgrenzen des adluminalen Kompartiments. Polysialylierte Spermatogonien wurden kaum gesehen (Abbildung 21)

Einzig die Gewebeschnitte der Monate April und Dezember wiesen stets intensive und wiederkehrende PolySia-Färbungen auf. Im April zeigten sich die braunen PolySia-Signale besonders auf der Oberfläche von Spermatogonien und an den Sertoli-Zellgrenzen des adluminalen Kompartiments (Abbildung 18). Weiterhin schien PolySia auf primären Spermatozyten exprimiert zu werden. Eine ähnliche Verteilung war bei den Gewebeschnitten der Dezemberproben zu beobachten. Hier konnte auf allen Spermatogonien und an allen Sertoli-Zellgrenzen PolySia nachgewiesen werden (Abbildung 22). In beiden Monaten scheint dabei die gesamte Oberfläche der Spermatogonien polysialyliert zu sein, sodass angenommen werden kann, dass nicht nur Sertoli-Zellen sondern auch Spermatogonien PolySia-NCAM exprimieren.

5.5. Kettenlängenbestimmung von PolySia

Sialinsäuren können als Monosialylrest oder als Polymer am reduzierenden Ende von Glykoproteinen vorkommen. Je nach Polymerisierungsgrad werden sie als DiSia (2 Sialinsäuren), OligoSia (3-7 Sialinsäuren) oder PolySia (≥ 8 Sialinsäuren) bezeichnet [Sato 2004]. Kanato, Kitajama und Sato konnten 2008 erstmals nachweisen, dass sich nicht nur Di-, Oligo- und PolySia in Aufbau und Funktion voneinander unterscheiden, sondern sich je nach Polymerisationsgrad auch die Interaktionsmöglichkeiten und Funktionen von verschiedenen PolySia-Ketten verändern [Kanato et al. 2008, Sato und Kitajima 2013]. So kann PolySia erst ab einer Kettenlänge von 12 Sialinsäureresten an die Wachstumsfaktoren BDNF und NGF binden, und benötigt sogar 17 Sialinsäurereste, um mit bFGF zu interagieren. Es wird vermutet, dass PolySia in diesem Zusammenhang wie ein extrazellulärer Speicher für die Wachstumsfaktoren funktioniert und an der Feinregulation ihrer Funktionen beteiligt ist [Kanato et al. 2008, Ono et al. 2012].

Um eine Vorstellung davon zu bekommen, welche Interaktionspartner und Funktionen PolySia im Rehhodengewebe haben könnte, analysierten wir die PolySia-Kettenlängen aus einer April- und Dezemberprobe mittels DMB-HPLC. Dieses Verfahren stellt außerdem eine weitere Methode für den Beweis des Vorkommens von PolySia im Rehhodengewebe dar. Zunächst erfolgte die Isolierung der polysialylierten Proteine aus dem Gesamtlysat der Proben (April und Dezember). In einer Eintopfreaktion wurden die PolySia-Ketten anschließend durch saure Hydrolyse vom Trägerprotein abgespalten und fluoreszenzmarkiert. In der Anionenaustauschersäule wurden die Sialinsäure-Polymere nach ihrem Polymerisierungsgrad aufgetrennt und zuletzt im Fluoreszenzdetektor erfasst.

Bei den Rehhoden-Proben aus April und Dezember konnten so PolySia-Ketten mit über 19 Sialinsäureresten nachgewiesen werden. An dieser Stelle ist anzumerken, dass die Signalintensität kleiner Probenmengen, wie hier verwendet, geringer ausfällt und die sauren Bedingungen der Eintopfreaktion zu Kettenbrüchen führen können. Ein höherer Grad der Polymerisation *in vivo* ist daher wahrscheinlich. Da die PolySia-Ketten im Rehhoden aber aus mindestens 19 Sialinsäureresten bestehen, ist die Interaktion mit Wachstumsfaktoren wie bFGF, GDNF oder BDNF möglich. Der Wachstumsfaktor GDNF ist für die Selbsterneuerung, Differenzierung und Proliferation von Stammzellen (A_{dark} -Spermatogonien) essentiell [Oatley et al. 2006] und wird durch die Anwesenheit von bFGF in seinen Funktionen verstärkt [Hofmann et al. 2005]. Die Expressionswerte des Wachstumsfaktors bFGF bei der saisonalen Spermatogenese des Rehbocks wurden bereits 2003 untersucht und ergaben die höchsten bFGF-Werte im April, was mit dem Beginn der Stammzellproliferation und den höchsten PolySia-Werten korreliert [Roelants et al. 2002, Wagener et al. 2003]. Da die Interaktion von PolySia mit bFGF [Ono et al. 2012] sowie die Interaktion des FGF- und GDNF-Rezeptors mit NCAM [Kiselyov et al. 2003, Paratcha et al. 2003, Kochoyan et al. 2008, Kiselyov 2010] bereits bewiesen wurden, ist ein Zusammenspiel dieser Faktoren bei der Initiierung und Terminierung der saisonalen Spermatogenese wahrscheinlich.

5.6. Mögliche Funktion von PolySia-NCAM bei der saisonalen Spermatogenese

PolySia-NCAM wird im Rahmen der saisonalen Spermatogenese des Rehbocks also besonders stark in den Monaten April und Dezember im Hodengewebe exprimiert. Im April beginnt die Proliferation des Keimepithels, im Dezember tritt es in die Winterruhe ein. Es lässt sich somit vermuten, dass PolySia-NCAM in die saisonalen Umbauprozesse maßgeblich involviert ist. Eine graphische Darstellung der saisonalen PolySia-Expression im Vergleich zur NCAM-Expression, zur Anzahl der Spermatogonien und zur Anzahl der Spermatiden ist in Abbildung 23 dargestellt. Diese tiefgreifenden morphologischen Umstrukturierungen verlangen das exakte Zusammenspiel einer Vielzahl von Mediatoren und gehen mit einer Veränderung der Zell-Zell-Interaktion und Zell-Kommunikation einher. Besonders die Kommunikation zwischen Spermatogonien und Sertoli-Zellen beeinflusst dabei die Zellproliferation und die Zelldifferenzierung [Roelants et al. 2002, Blottner et al. 2007, Schön und Blottner 2008].

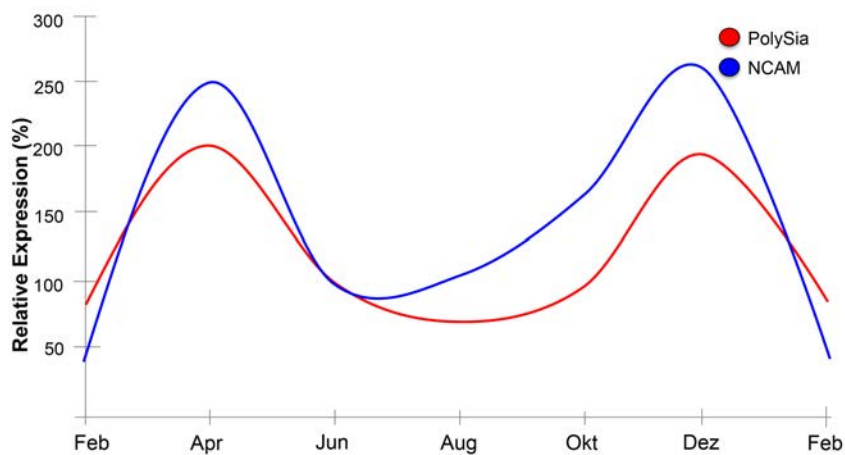
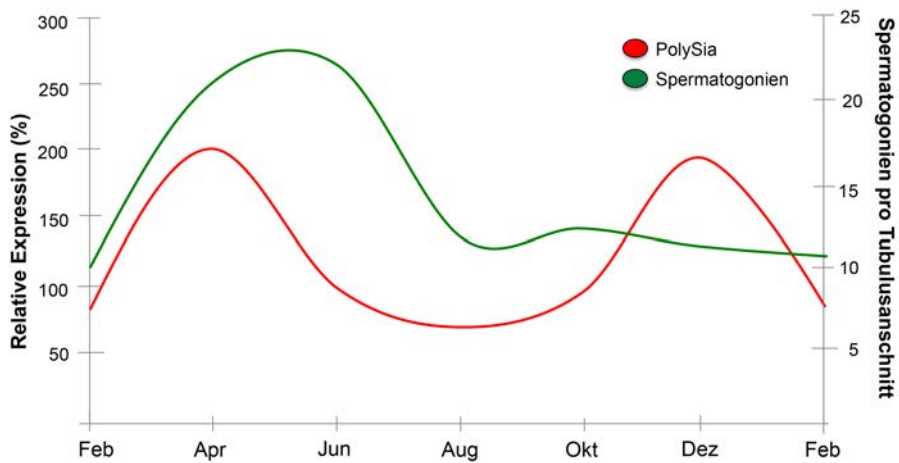
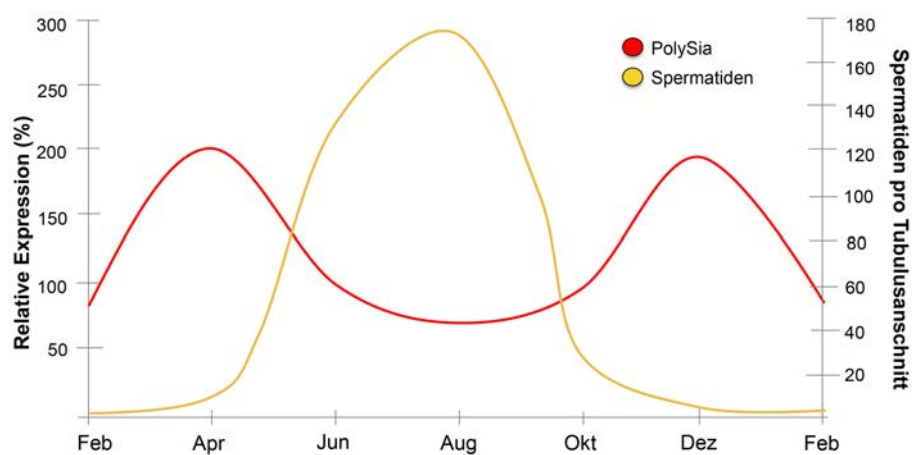
A**B****C**

Abbildung 23: Expressionsdynamik von PolySia im Kontext (halbschematisch).

Die Abbildung zeigt die graphische Darstellung der saisonalen PolySia-Expression im Vergleich zu **A**: NCAM-Expression, **B**: Spermatogonienanzahl pro Tubulusanschnitt und **C**: Spermatidenanzahl pro Tubulusanschnitt. Verändert nach [Schön 2003].

Spermatogoniale Stammzellen (SSC) teilen sich nur äußerst selten und sind histologisch kaum zu identifizieren [Culty 2009]. Erst kürzlich wurde diskutiert, dass die bei einer Selbsterneuerung entstandenen Stammzellen (SSC) nach abgeschlossenem Prozess von einander wegmigrieren [de Rooij und van Beek 2013, Eddy und Chen 2013].

Viele Studien an neuronalem Gewebe legen dar, dass die Polysialylierung von NCAM Zell-Zell-Adhäsionen abschwächt, Zellabstände vergrößert, Zell-Migrationen unterstützt und durch seinen polyanionischen Charakter auch die Struktur von Zelloberflächen moduliert [Johnson et al. 2005, Sytnyk et al. 2006].

Da PolySia vor allem auf Sertoli-Zellen und Spermatogonien detektiert wurde, könnte es in diesem Zusammenhang an der Loslösung der im April neu entstehenden Stammzellen von einander beteiligt sein. Da dieser Erneuerungs- und Differenzierungsprozess auch in adulten asaisonalen Tieren beobachtet wird, könnte es sich bei den vereinzelt polysialylierten Spermatogonien des Rehbocks im Juni und August um die seltenen und schwer zu identifizierenden $A_{\text{(dark)}}$ -Stammzellen handeln. Im Dezember könnte PolySia die Spermatogonien durch Unterbindung der Zell-Kontakte zwischen Sertoli-Zellen und Spermatogonien an der Differenzierung hindern und so die Winterruhe initiieren. Es ist zudem denkbar, dass das im Dezember im adluminalen Kompartiment auf Sertoli-Zellen detektierte PolySia dazu beiträgt, das Keimepithel von Zellrückständen, Residualkörpern der Spermatiden und anderen Substanzen zu befreien, indem es Zell-Kontakte zwischen Sertoli-Zellen inhibiert. Die PolySia-Signale befanden sich dabei nie an allen Sertoli-Zellgrenzen, was daran liegen könnte, dass Sertoli-Zellen das Grundgerüst der Tubuli darstellen und eine Lösung jeglicher Zellkontakte in der Zerstörung der Gewebsstruktur und dem Untergang des Tubulus enden könnte [Lee und Cheng 2004].

Der Wachstumsfaktor GDNF spielt eine essenzielle Rolle bei der Selbsterneuerung von Spermatogonien [Buageaw et al. 2005, Naughton et al. 2006]. Eine zu geringe GDNF-Expression führt zu einer Abnahme des Stammzell-Vorrats, eine zu hohe Expression wird dagegen in Zusammenhang mit der Entstehung von Hodentumoren diskutiert [Meng et al. 2000]. Eine Studie von Duveau et al. identifiziert PolySia-NCAM als Mediator des GDNF-Signals im Hippocampus und beschreibt die so vermittelten protektiven und zellerneuernden Effekte auf das neuronale Gewebe [Duveau und Fritschy 2010]. PolySia-NCAM könnte daher, analog zu den Ergebnissen im Hippocampus, auch über die Interaktion mit GDNF an der Stammzellerneuerung beteiligt sein.

Mittels HPLC konnten wir für PolySia im Rehhodengebe Kettenlängen von mindestens 19 Untereinheiten detektieren. Dies ist von Bedeutung, da eine Interaktion mit

Wachstumsfaktoren wie BDNF und bFGF erst ab einer Kettenlänge von 12 bzw. 17 Sialylresten möglich ist [Kanato et al. 2008, Sato und Kitajima 2013]. Es wird vermutet, dass PolySia dabei als Reservoir für die Wachstumsfaktoren dient und über seine Expression an der Feinregulierung ihrer Funktion beteiligt ist [Ono et al. 2012, Sato und Kitajima 2013].

Im Rehhoden könnte PolySia daher über die Retention und Liberation von bFGF Einfluss auf die Proliferation und die Terminierung der saisonalen Spermatogenese nehmen.

5.7. Kritische Bewertung

Die Forschung an Wildtieren gestaltet sich oftmals schwierig, wobei die Gewinnung von genügend und standardisierten Proben wohl das größte Problem darstellt. Weiterhin ist die Lebenszeit von großen Säugetieren wie dem Rehbock im Vergleich zu kleinen Säugetieren wie der Maus oder der Ratte sehr lang. Die Erforschung von entwicklungsbedingten Veränderungen (beispielsweise von Hormonspiegeln o.ä.) nimmt somit einen längeren Zeitraum in Anspruch und erbringt nicht so schnell Ergebnisse. Die hier verwendeten Proben stammen von 2-4 Jahre alten Rehböcken der Feldforschungsstation Niederfinow, in der es gelang, Rehböcke unter annähernd standardisierten Bedingungen zu halten. Die Tiere lebten artgerecht in großen Außengehegen, waren denselben klimatischen Bedingungen ausgesetzt und erhielten eine einheitliche Fütterung. Der untersuchte Probenumfang von fünf pro Monat für die Western Blot-Analysen und drei pro Monat für die Immunhistochemie ist nicht sehr groß, es handelt sich für Wildtiere aber um eine respektable Menge und um sehr gut vergleichbares Material.

Der hier verwendete PolySia-Antikörper 735 bindet PolySia speziesübergreifend. Die anderen in dieser Arbeit eingesetzten Antikörper sind nach Angaben der Hersteller nicht Reh-spezifisch sondern gegen humane (123C3) oder murine (anti-SynCAM) Antigene gerichtet. Dies rührt aber daher, dass Hersteller Antikörper gegen Strukturen von bestimmten und häufig verwendeten Spezies wie der Maus oder dem Menschen designen und nicht an allen Tieren testen. Die erfolgreich durchgeführten Negativkontrollen (EndoN-Verdau) und die im für die Zielstruktur typischen Kilodalton-Bereich detektierten Immunsignale sprechen jedoch für eine spezifische Antikörper-Antigen-Reaktion aller verwendeten Antikörper. Obwohl in der Western Blot-Analyse deutliche und spezifische NCAM-Signale detektiert werden konnten, zeigte sich beim Einsatz des anti-NCAM-Antikörpers 123C3 in der Immunhistochemie kein Signal. Dies

liegt wahrscheinlich an dem oft beschriebenen Phänomen, dass durch die (für die Immunhistochemie notwendige) Formalinfixierung Strukturveränderungen der Proteine auftreten, welche die Antikörper-Epitop-Bindungen beeinflussen können [Sompuram et al. 2006].

Insgesamt wurden im Rahmen der Arbeit eindeutige und signifikante Ergebnisse bezüglich der Dynamik der testikulären PolySia-NCAM-Expression und -Lokalisation während der saisonalen Spermatogenese des Rehbocks erzielt.

5.8. Klinische Bedeutung und Ausblick

Diese Studie ist unseres Wissens die erste, die polysialyliertes NCAM in Säugetierhoden nachweisen konnte, und bringt neue Erkenntnisse über das Vorkommen und die möglichen Funktionen von PolySia-NCAM. Für anknüpfende Studien ist interessant, ob PolySia-NCAM auch während der Gonadenentwicklung und der saisonalen Spermatogenese anderer Säugetiere (auch weiblicher Tiere) exprimiert wird. Ein diesbezügliches Projekt läuft gegenwärtig in unserem Labor.

Außerdem stellt sich die Frage, ob PolySia auch bei der Entwicklung von humanem Hodengewebe exprimiert wird und ob es bei Erkrankungen wie der Pubertas praecox eventuell zu einer zu frühen PolySia-Expression kommt.

Eine zu geringe oder zu hohe PolySia-Expression könnte zudem an der Entstehung und Metastasierung von malignen testikulären Erkrankungen wie den embryonalen Tumoren beteiligt sein.

PolySia spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und Proliferation von Stammzellen. Ein wichtiger Gedanke ist daher, ob PolySia für die Behandlung von Chemotherapie- oder Bestrahlungs-induzierter Infertilität geeignet ist. PolySia könnte die noch vorhandenen Stammzellen des testikulären Gewebes dabei ggf. zur Proliferation anregen.

Ein sehr aktuelles Thema ist außerdem der genaue Mechanismus der PolySia-Wachstumsfaktor-Interaktionen. Die hier erarbeiteten Ergebnisse werfen somit eine Reihe neuer Fragen auf und bieten zahlreiche interessante Aspekte für nachfolgende Untersuchungen.

6. Zusammenfassung

Polysialinsäuren (PolySia) sind Homopolymere, die aus mindestens acht 2,8-verknüpften Sialinsäuren bestehen und in Säugern hauptsächlich als posttranslationale Modifikation des neuronalen Zelladhäsionsmolekül NCAM vorkommen. PolySia agiert unter anderem als Regulator von Zellinteraktionen und -adhäsionen und spielt eine wichtige Rolle bei der Proliferation und der Migration von Zellen. Während sich viele Studien mit dem Vorkommen und der Funktion von PolySia im Nervensystem beschäftigen, ist bisher nur sehr wenig über dessen Existenz und Relevanz in anderen Gewebearten bekannt.

In dieser Arbeit wurde die Expression von PolySia und seinen Trägerproteinen im testikulären Gewebe von Rehböcken charakterisiert.

Der Reproduktionszyklus des Rehbocks folgt einer strengen saisonalen Rhythmik. Während die Spermatogenese im Frühsommer komplett aktiviert ist, kommt es in den Wintermonaten zu einer vollständigen Rückbildung des Keimepithels. Dieses Phänomen macht den Rehbock zu einem interessanten Studienmodell, um generelle Regulationsmechanismen der Spermatogenese in Säugetieren zu untersuchen.

In den Untersuchungen der in repräsentativen Jahresreihen zusammengestellten Gewebeproben konnte gezeigt werden, dass PolySia in den Monaten April (Proliferation des Keimepithels) und Dezember (Eintritt in den Winterarrest) am stärksten exprimiert wird. Die NCAM-Isoformen -180 und -140 wurden als PolySia-Trägerproteine identifiziert, wobei das hier zum ersten mal in Säugetierhoden nachgewiesene NCAM-180 als Hauptträger von PolySia zu benennen ist. Seine saisonale Expression folgt einem sehr ähnlichen Muster wie das der PolySia.

Darüber hinaus wurde PolySia hauptsächlich zwischen Spermatogonien und Sertoli-Zellen im basalen Kompartiment lokalisiert, konnte aber auch auf Spermatozyten und im adluminalen Bereich von Sertoli-Zellen detektiert werden. Mittels HPLC wurden PolySia-Kettenlängen von über 19 Sia-Resten bestimmt, was Voraussetzung ist, um Interaktionen mit einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren einzugehen.

Damit konnte in dieser Studie erstmals gezeigt werden, dass PolySia, bestehend aus mindestens 19 Sia-Resten, als posttranslationale Modifikation von NCAM im testikulären Rehhodengewebe vorkommt und seine Expression einer wiederkehrenden saisonalen Periodik unterliegt. Da die höchsten PolySia-NCAM-Expressionslevel während der Aktivierung und Deaktivierung der Spermatogenese festgestellt wurden, könnte PolySia an den hier essentiellen morphologischen Umstrukturierungen des Keimepithels in besonderem Maße beteiligt sein.

7. Summary

Polysialic acid (polySia) is a homopolymer of at least eight α 2,8-linked sialic acids and is mainly found as a posttranslational modification of the neural cell adhesion molecule NCAM.

PolySia acts, inter alia, as a regulator of cell-cell interaction and adhesion and is crucial for cell proliferation and migration. While many studies have been focusing on the occurrence and function of polySia in neural tissue, little is known about its existence and relevance in other types of tissue.

In the present study expression of polySia and its carrier protein in testicular tissue of roe deer has been characterized.

Roe deer are seasonal breeders and cyclic structural changes of their testis come along with a highly activated and a totally arrested spermatogenesis. Due to this phenomenon roe bucks represent an interesting model to study general spermatogenesis regulating mechanisms in mammals.

Investigating the annual cycle representing tissue samples it could be shown that polySia is primarily expressed during April (proliferation of germinal epithelium) and December (beginning of winter arrest). NCAM isoforms NCAM-140 and NCAM-180 were identified as carrier proteins of polySia, whereby NCAM-180, which has been detected in testicular tissue for the first time, can be addressed as the main carrier protein. The seasonal expression patterns of polySia and NCAM-180 are very similar.

Predominantly, polySia was detectable between spermatogonia and Sertoli cells in the basal regions of germinal epithelia, but could also be found on spermatocytes and on the adluminal part of Sertoli cells.

Using HPLC, the maximal detectable chain length of polySia consisted of 19 sialic acid residues, enabling these negatively charged sugar polymers to interact with a number of growth factors.

In sum, this study demonstrated that polySia (I) can consist of more than 19 sialic acid residues, (II) occurs as a posttranslational modification of NCAM in testicular tissue of roe deer and (III) its expression profile follows a recurring seasonal periodicity. Since the highest amounts of polySia-NCAM were detectable during key steps of “on/off mechanisms” of spermatogenesis, polySia might be an important factor during the morphological restructuring of the germ cell epithelium.

8. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
(b)FGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i> (Oberflächenantigen)
cm	Zentimeter
Da	Dalton
DMB	1,2-Diamino-4,5-Methyendioxybenzol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EndoN	Endoneuraminidase N
et al.	et alia
FN	Fibronektin
Ggf.	gegebenfalls
GDNF	<i>glia cell line-derived neurotrophic factor</i>
GnRH	<i>gonadotropin-releasing hormone</i> (Gonadoliberin)
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
Hz	Hertz
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
kDa	Kilodalton
Ko	<i>knockout</i>
LH	luteinisierende Hormon / Lutropin
mA	Milliampere
mAk	monoklonaler Antikörper
min	Minute

ml	Milliliter
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCAM	neurales Zelladhäsionsmolekül
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
Neu5Gc	N-Glykolyneuraminsäure
NGF	<i>nerve growth factor</i>
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
pAK	polyklonaler Antikörper
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PBS	<i>phosphat-buffered saline</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PolySia	Polysialinsäure
PolySia-NCAM	polysialyliertes NCAM
PVDF	Polyvinylidendfluorid
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfat-Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese
Sek	Sekunde
SSC	<i>spermatogonial stem cell</i>
SynCAM	Synaptisches Zelladhäsionsmolekül
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Tri-Fluor-Essigsäure
Tween	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
z.B.	zum Beispiel

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Struktur von α 2,8-verknüpften N-Acetylneuraminsäuren.	1
Abbildung 2: Strukturbeispiel eines polysialylierten N-Glykans von NCAM.....	2
Abbildung 3: Schematische Darstellung der drei Hauptisoformen von NCAM.	5
Abbildung 4: Darstellung der NCAM-Interaktion (unpolysialyliert/polysialyliert)...	6
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Hodens und Nebenhodens.....	8
Abbildung 6: Histologischer Aufbau des Keimepithels.	10
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Spermatogenese.....	12
Abbildung 8: Schema der saisonalen Spermatogenese-Steuerung.	13
Abbildung 9: saisonale Veränderung der Keimzellpopulationen des Rehbocks..	14
Abbildung 10: Nachweis von PolySia im Rehhodengewebe.	32
Abbildung 11: Nachweis der PolySia Expression im Jahresverlauf.	34
Abbildung 12: Identifizierung von NCAM als PolySia Trägerprotein.	35
Abbildung 13: Nachweis der NCAM Expression im Jahresverlauf.	37
Abbildung 14: Statistische Auswertung der PolySia- und NCAM Expressionswerten.....	38
Abbildung 15: PolySia-Kettenlängenbestimmung mittels DMB HPLC Analyse....	39
Abbildung 16: Negativkontrolle der PolySia-Immunfärbungen	40
Abbildung 17: Bilder des Hodenparenchyms im Februar nach PolySia- Immunfärbung.....	41
Abbildung 18: Bilder des Hodenparenchyms im April nach PolySia- Immunfärbung.....	43
Abbildung 19: Bilder des Hodenparenchyms im Juni nach PolySia- Immunfärbung.....	44
Abbildung 20: Bilder des Hodenparenchyms im August nach PolySia- Immunfärbung.....	45
Abbildung 21: Bilder des Hodenparenchyms im Oktober nach PolySia- Immunfärbung.....	47
Abbildung 22: Bilder des Hodenparenchyms im Dezember nach PolySia- Immunfärbung.....	48
Abbildung 23: Expressionsdynamik von PolySia im Kontext (halbschematisch).	57

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien.....	18
Tabelle 2: Kits.....	19
Tabelle 3: Puffer und Lösungen.....	20
Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien.....	21
Tabelle 5: Laborgeräte.....	22
Tabelle 6: Pipettierschema für zwei SDS-Polyacrylamid-Gele.....	26
Tabelle 7: Protokoll der Antikörpermarkierung.....	28
Tabelle 8: Absteigende Alkoholreihe.....	29
Tabelle 9: Aufsteigende Alkoholreihe.....	30
Tabelle 10: Elutionsgradient.....	31

11. Literaturverzeichnis

- Angata, K., J. Nakayama, B. Fredette, K. Chong, B. Ranscht and M. Fukuda (1997). "Human STX polysialyltransferase forms the embryonic form of the neural cell adhesion molecule. Tissue-specific expression, neurite outgrowth, and chromosomal localization in comparison with another polysialyltransferase, PST." *J Biol Chem* 272(11): 7182-7190.
- Angata, K., M. Suzuki, J. McAuliffe, Y. Ding, O. Hindsgaul and M. Fukuda (2000). "Differential biosynthesis of polysialic acid on neural cell adhesion molecule (NCAM) and oligosaccharide acceptors by three distinct alpha 2,8-sialyltransferases, ST8Sia IV (PST), ST8Sia II (STX), and ST8Sia III." *J Biol Chem* 275(24): 18594-18601.
- Angata, T. and A. Varki (2002). "Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective." *Chem Rev* 102(2): 439-469.
- Barbeau, D., J. J. Liang, Y. Robitalille, R. Quirion and L. K. Srivastava (1995). "Decreased expression of the embryonic form of the neural cell adhesion molecule in schizophrenic brains." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(7): 2785-2789.
- Barry, G. T. and W. F. Goebel (1957). "Colominic acid, a substance of bacterial origin related to sialic acid." *Nature* 179(4552): 206.
- Blottner, S. and H. Roelants (1998). "Calculation of spermatogenic transformations based on dual-flow cytometric analysis of testicular tissue in seasonal breeders." *Andrologia* 30(6): 331-337.
- Blottner, S., J. Schon and H. Roelants (2007). "Apoptosis is not the cause of seasonal testicular involution in roe deer." *Cell Tissue Res* 327(3): 615-624.
- Brackenbury, R., J. P. Thiery, U. Rutishauser and G. M. Edelman (1977). "Adhesion among neural cells of the chick embryo. I. An immunological assay for molecules involved in cell-cell binding." *J Biol Chem* 252(19): 6835-6840.
- Bronson, F. (1985). *mammalian reproduction: an ecological perspective. biology of reproduction.* 32: 1-26.
- Bronson, F. and P. Heidemann (1994). *Seasonal Regulation of Reproduction in Mammals. The Physiology of Reproduction.* K. E and N. JD. New York, Raven Press: 541-584.
- Buageaw, A., M. Sukhwani, A. Ben-Yehudah, J. Ehmcke, V. Y. Rawe, C. Pholpramool, K. E. Orwig and S. Schlatt (2005). "GDNF family receptor alpha1 phenotype of

- spermatogonial stem cells in immature mouse testes." *Biol Reprod* 73(5): 1011-1016.
- Burgess, A., S. R. Wainwright, L. S. Shihabuddin, U. Rutishauser, T. Seki and I. Aubert (2008). "Polysialic acid regulates the clustering, migration, and neuronal differentiation of progenitor cells in the adult hippocampus." *Dev Neurobiol* 68(14): 1580-1590.
- Campodonico, P. B., E. D. de Kier Joffe, A. J. Urtreger, L. S. Lauria, J. M. Lastiri, L. I. Puricelli and L. B. Todaro (2010). "The neural cell adhesion molecule is involved in the metastatic capacity in a murine model of lung cancer." *Mol Carcinog* 49(4): 386-397.
- Clermont, Y. (1963). "The cycle of the seminiferous epithelium in man." *Am J Anat* 112: 35-51.
- Cremer, H., G. Chazal, C. Goridis and A. Represa (1997). "NCAM is essential for axonal growth and fasciculation in the hippocampus." *Mol Cell Neurosci* 8(5): 323-335.
- Cremer, H., R. Lange, A. Christoph, M. Plomann, G. Vopper, J. Roes, R. Brown, S. Baldwin, P. Kraemer, S. Scheff and et al. (1994). "Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning." *Nature* 367(6462): 455-459.
- Culty, M. (2009). "Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage." *Birth Defects Res C Embryo Today* 87(1): 1-26.
- Cunningham, B. A., J. J. Hemperly, B. A. Murray, E. A. Prediger, R. Brackenbury and G. M. Edelman (1987). "Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing." *Science* 236(4803): 799-806.
- Curreli, S., Z. Arany, R. Gerardy-Schahn, D. Mann and N. M. Stamatou (2007). "Polysialylated neuropilin-2 is expressed on the surface of human dendritic cells and modulates dendritic cell-T lymphocyte interactions." *J Biol Chem* 282(42): 30346-30356.
- de Rooij, D. G. and M. E. van Beek (2013). "Computer simulation of the rodent spermatogonial stem cell niche." *Biol Reprod* 88(5): 131.
- Duveau, V. and J. M. Fritschy (2010). "PSA-NCAM-dependent GDNF signaling limits neurodegeneration and epileptogenesis in temporal lobe epilepsy." *Eur J Neurosci* 32(1): 89-98.
- Eddy, E. M. and L. Y. Chen (2013). "Location, location, location: how does a spermatogonium know it is a spermatogonial stem cell (SSC)?" *Biol Reprod* 88(5): 132.

- Faillard, H. (1989). "The early history of sialic acids." *Trends Biochem Sci* 14(6): 237-241.
- Finne, J. (1982). "Occurrence of unique polysialosyl carbohydrate units in glycoproteins of developing brain." *J Biol Chem* 257(20): 11966-11970.
- Franceschini, I., K. Angata, E. Ong, A. Hong, P. Doherty and M. Fukuda (2001). "Polysialyltransferase ST8Sia II (STX) polysialylates all of the major isoforms of NCAM and facilitates neurite outgrowth." *Glycobiology* 11(3): 231-239.
- Frosch, M., I. Gorgen, G. J. Boulnois, K. N. Timmis and D. Bitter-Suermann (1985). "NZB mouse system for production of monoclonal antibodies to weak bacterial antigens: isolation of an IgG antibody to the polysaccharide capsules of *Escherichia coli* K1 and group B meningococci." *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(4): 1194-1198.
- Fujimoto, I., J. L. Bruses and U. Rutishauser (2001). "Regulation of cell adhesion by polysialic acid. Effects on cadherin, immunoglobulin cell adhesion molecule, and integrin function and independence from neural cell adhesion molecule binding or signaling activity." *J Biol Chem* 276(34): 31745-31751.
- Galuska, S. P., H. Geyer, B. Weinhold, M. Kontou, R. C. Rohrich, U. Bernard, R. Gerardy-Schahn, W. Reutter, A. Munster-Kuhnel and R. Geyer (2010). "Quantification of nucleotide-activated sialic acids by a combination of reduction and fluorescent labeling." *Anal Chem* 82(11): 4591-4598.
- Galuska, S. P., R. Geyer, R. Gerardy-Schahn, M. Muhlenhoff and H. Geyer (2008). "Enzyme-dependent variations in the polysialylation of the neural cell adhesion molecule (NCAM) in vivo." *J Biol Chem* 283(1): 17-28.
- Galuska, S. P., I. Oltmann-Norden, H. Geyer, B. Weinhold, K. Kuchelmeister, H. Hildebrandt, R. Gerardy-Schahn, R. Geyer and M. Muhlenhoff (2006). "Polysialic acid profiles of mice expressing variant allelic combinations of the polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV." *J Biol Chem* 281(42): 31605-31615.
- Galuska, S. P., M. Rollenhagen, M. Kaup, K. Eggers, I. Oltmann-Norden, M. Schiff, M. Hartmann, B. Weinhold, H. Hildebrandt, R. Geyer, M. Muhlenhoff and H. Geyer (2010). "Synaptic cell adhesion molecule SynCAM 1 is a target for polysialylation in postnatal mouse brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(22): 10250-10255.
- Gascon, E., L. Vutskits and J. Z. Kiss (2007). "Polysialic acid-neural cell adhesion molecule in brain plasticity: from synapses to integration of new neurons." *Brain Res Rev* 56(1): 101-118.

- Gerardy-Schahn, R. and M. Eckhardt (1994). "Hot spots of antigenicity in the neural cell adhesion molecule NCAM." *Int J Cancer Suppl* 8: 38-42.
- Gluer, S., C. Schelp, D. von Schweinitz and R. Gerardy-Schahn (1998). "Polysialylated neural cell adhesion molecule in childhood rhabdomyosarcoma." *Pediatr Res* 43(1): 145-147.
- Goeritz, F., M. Quest, A. Wagener, M. Fassbender, A. Broich, T. B. Hildebrandt, R. R. Hofmann and S. Blottner (2003). "Seasonal timing of sperm production in roe deer: interrelationship among changes in ejaculate parameters, morphology and function of testis and accessory glands." *Theriogenology* 59(7): 1487-1502.
- Goridis, C. and J. F. Brunet (1992). "NCAM: structural diversity, function and regulation of expression." *Semin Cell Biol* 3(3): 189-197.
- Hammond, M. S., C. Sims, K. Parameshwaran, V. Suppiramaniam, M. Schachner and A. Dityatev (2006). "Neural cell adhesion molecule-associated polysialic acid inhibits NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors and prevents glutamate-induced cell death." *J Biol Chem* 281(46): 34859-34869.
- Hänsch, M., P. Simon, J. Schon, M. Kaese, B. C. Braun, K. Jewgenow, F. Goritz, J. Kupper, N. Ahmadvand, R. Geyer, R. Middendorff, K. Muller and S. P. Galuska (2014). "Polysialylation of NCAM correlates with onset and termination of seasonal spermatogenesis in roe deer." *Glycobiology* 24(6): 488-493.
- Harduin-Lepers, A., V. Vallejo-Ruiz, M. A. Krzewinski-Recchi, B. Samyn-Petit, S. Julien and P. Delannoy (2001). "The human sialyltransferase family." *Biochimie* 83(8): 727-737.
- Hartung, J. and K. Schoppmeyer (1986). *Zur zyklischen Entwicklung der Hoden beim Reh. Beiträge zur Jagd- und Wildforschung.*
- Hartung, J. and K. Schoppmeyer (1994). "Beitrag zu Hodenveränderungen beim Rehwild." *Beiträge zur Jagd- und Wildforschung* 19: 117-120.
- Hikim, A. P., A. J. Bartke and L. D. Russell (1988). "The seasonal breeding hamster as a model to study structure-function relationships in the testis." *Tissue Cell* 20(1): 63-78.
- Hildebrandt, H., C. Becker, M. Murau, R. Gerardy-Schahn and H. Rahmann (1998). "Heterogeneous expression of the polysialyltransferases ST8Sia II and ST8Sia IV during postnatal rat brain development." *J Neurochem* 71(6): 2339-2348.
- Hinsby, A. M., V. Berezin and E. Bock (2004). "Molecular mechanisms of NCAM function." *Front Biosci* 9: 2227-2244.

- Hofmann, M. C., L. Braydich-Stolle and M. Dym (2005). "Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF." *Dev Biol* 279(1): 114-124.
- Holstein, A. F. (2002). "Männliche Geschlechtsorgane." In: Drenckhahn, D. und Zenker, W. ; Benninghoff Anatomie; Urban & Schwarzenberg; München 2002 16. Auflage: 799-837.
- Horstkorte, R., M. Schachner, J. P. Magyar, T. Vorherr and B. Schmitz (1993). "The fourth immunoglobulin-like domain of NCAM contains a carbohydrate recognition domain for oligomannosidic glycans implicated in association with L1 and neurite outgrowth." *J Cell Biol* 121(6): 1409-1421.
- Huerta, S., E. S. Srivatsan, N. Venkatesan, J. Peters, F. Moatamed, S. Renner and E. H. Livingston (2001). "Alternative mRNA splicing in colon cancer causes loss of expression of neural cell adhesion molecule." *Surgery* 130(5): 834-843.
- Inoue, S., S. L. Lin, Y. C. Lee and Y. Inoue (2001). "An ultrasensitive chemical method for polysialic acid analysis." *Glycobiology* 11(9): 759-767.
- Isomura, R., K. Kitajima and C. Sato (2011). "Structural and functional impairments of polysialic acid by a mutated polysialyltransferase found in schizophrenia." *J Biol Chem* 286(24): 21535-21545.
- Itoh, N. (2007). "The Fgf families in humans, mice, and zebrafish: their evolutionary processes and roles in development, metabolism, and disease." *Biol Pharm Bull* 30(10): 1819-1825.
- Johnson, C. P., I. Fujimoto, U. Rutishauser and D. E. Leckband (2005). "Direct evidence that neural cell adhesion molecule (NCAM) polysialylation increases intermembrane repulsion and abrogates adhesion." *J Biol Chem* 280(1): 137-145.
- Jorgensen, O. S. and E. Bock (1974). "Brain specific synaptosomal membrane proteins demonstrated by crossed immunoelectrophoresis." *J Neurochem* 23(4): 879-880.
- Kanato, Y., K. Kitajima and C. Sato (2008). "Direct binding of polysialic acid to a brain-derived neurotrophic factor depends on the degree of polymerization." *Glycobiology* 18(12): 1044-1053.
- Kean, E. L. (1991). "Sialic acid activation." *Glycobiology* 1(5): 441-447.
- Kiselyov, V. V. (2010). "NCAM and the FGF-receptor." *Adv Exp Med Biol* 663: 67-79.
- Kiselyov, V. V., G. Skladchikova, A. M. Hinsby, P. H. Jensen, N. Kulahin, V. Soroka, N. Pedersen, V. Tsetlin, F. M. Poulsen, V. Berezin and E. Bock (2003). "Structural basis for a direct interaction between FGFR1 and NCAM and evidence for a regulatory role of ATP." *Structure* 11(6): 691-701.

- Kiss, J. Z. and G. Rougon (1997). "Cell biology of polysialic acid." *Curr Opin Neurobiol* 7(5): 640-646.
- Kleene, R. and M. Schachner (2004). "Glycans and neural cell interactions." *Nat Rev Neurosci* 5(3): 195-208.
- Klonisch, T., J. Schon, S. Hombach-Klonisch and S. Blottner (2006). "The roe deer as a model for studying seasonal regulation of testis function." *Int J Androl* 29(1): 122-128.
- Kochoyan, A., F. M. Poulsen, V. Berezin, E. Bock and V. V. Kiselyov (2008). "Structural basis for the activation of FGFR by NCAM." *Protein Sci* 17(10): 1698-1705.
- Korshunova, I., V. Novitskaya, D. Kiryushko, N. Pedersen, K. Kolkova, E. Kropotova, M. Mosevitsky, M. Rayko, J. S. Morrow, I. Ginzburg, V. Berezin and E. Bock (2007). "GAP-43 regulates NCAM-180-mediated neurite outgrowth." *J Neurochem* 100(6): 1599-1612.
- Lackie, P. M., C. Zuber and J. Roth (1990). "Polysialic acid and N-CAM localisation in embryonic rat kidney: mesenchymal and epithelial elements show different patterns of expression." *Development* 110(3): 933-947.
- Lackie, P. M., C. Zuber and J. Roth (1991). "Expression of polysialylated N-CAM during rat heart development." *Differentiation* 47(2): 85-98.
- Lackie, P. M., C. Zuber and J. Roth (1994). "Polysialic acid of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) is widely expressed during organogenesis in mesodermal and endodermal derivatives." *Differentiation* 57(2): 119-131.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lee, N. P. and C. Y. Cheng (2004). "Ectoplasmic specialization, a testis-specific cell-cell actin-based adherens junction type: is this a potential target for male contraceptive development?" *Hum Reprod Update* 10(4): 349-369.
- Li, L. H., W. F. Jester, Jr. and J. M. Orth (1998). "Expression of 140-kDa neural cell adhesion molecule in developing testes in vivo and in long-term Sertoli cell-gonocyte cocultures." *J Androl* 19(3): 365-373.
- Liedtke, S., H. Geyer, M. Wuhler, R. Geyer, G. Frank, R. Gerardy-Schahn, U. Zahringer and M. Schachner (2001). "Characterization of N-glycans from mouse brain neural cell adhesion molecule." *Glycobiology* 11(5): 373-384.
- Lincoln, G. (1989). *Seasonal aspects in testicular physiology in seasonal mammals. The testis.* H. Burger and D. de Kretser. New York, Raven Press: 229-385.
- Lüllmann-Rauch, R. (2003). *Histologie.* Stuttgart Georg Thieme Verlag.
- Marchlewska-Koj, A. and M. Kruczek (1988). "Seasonal variation in testicular activity of roe deer (*Capreolus capreolus*)." *Folia Biol (Krakow)* 36(1-2): 119-125.

- McGuire, E. J. and S. B. Binkley (1964). "The Structure and Chemistry of Colominic Acid." *Biochemistry* 3: 247-251.
- Meng, X., M. Lindahl, M. E. Hyvonen, M. Parvinen, D. G. de Rooij, M. W. Hess, A. Raatikainen-Ahokas, K. Sainio, H. Rauvala, M. Lakso, J. G. Pichel, H. Westphal, M. Saarma and H. Sariola (2000). "Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF." *Science* 287(5457): 1489-1493.
- Mikkonen, M., H. Soininen, I. Alafuzof and R. Miettinen (2001). "Hippocampal plasticity in Alzheimer's disease." *Rev Neurosci* 12(4): 311-325.
- Miyata, S., C. Sato and K. Kitajima (2007). "Glycobiology of Polysialic Acids on Sea Urchin Gametes." *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 19(106): 85-98.
- Moller, C. J., A. G. Byskov, J. Roth, J. E. Celis and E. Bock (1991). "NCAM in developing mouse gonads and ducts." *Anat Embryol (Berl)* 184(6): 541-548.
- Moolenaar, C. E., E. J. Muller, D. J. Schol, C. G. Figdor, E. Bock, D. Bitter-Suermann and R. J. Michalides (1990). "Expression of neural cell adhesion molecule-related sialoglycoprotein in small cell lung cancer and neuroblastoma cell lines H69 and CHP-212." *Cancer Res* 50(4): 1102-1106.
- Mudo, G., A. Bonomo, V. Di Liberto, M. Frinchi, K. Fuxe and N. Belluardo (2009). "The FGF-2/FGFRs neurotrophic system promotes neurogenesis in the adult brain." *J Neural Transm* 116(8): 995-1005.
- Muhlenhoff, M., M. Eckhardt, A. Bethe, M. Frosch and R. Gerardy-Schahn (1996). "Autocatalytic polysialylation of polysialyltransferase-1." *EMBO J* 15(24): 6943-6950.
- Muhlenhoff, M., M. Eckhardt and R. Gerardy-Schahn (1998). "Polysialic acid: three-dimensional structure, biosynthesis and function." *Curr Opin Struct Biol* 8(5): 558-564.
- Muhlenhoff, M., I. Oltmann-Norden, B. Weinhold, H. Hildebrandt and R. Gerardy-Schahn (2009). "Brain development needs sugar: the role of polysialic acid in controlling NCAM functions." *Biol Chem* 390(7): 567-574.
- Muller, D., C. Wang, G. Skibo, N. Toni, H. Cremer, V. Calaora, G. Rougon and J. Z. Kiss (1996). "PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity." *Neuron* 17(3): 413-422.
- Munster, A. K., M. Eckhardt, B. Potvin, M. Muhlenhoff, P. Stanley and R. Gerardy-Schahn (1998). "Mammalian cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase: a nuclear protein with evolutionarily conserved structural motifs." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(16): 9140-9145.

- Nakata, D., L. Zhang and F. A. Troy, 2nd (2006). "Molecular basis for polysialylation: a novel polybasic polysialyltransferase domain (PSTD) of 32 amino acids unique to the alpha 2,8-polysialyltransferases is essential for polysialylation." *Glycoconj J* 23(5-6): 423-436.
- Naughton, C. K., S. Jain, A. M. Strickland, A. Gupta and J. Milbrandt (2006). "Glial cell-line derived neurotrophic factor-mediated RET signaling regulates spermatogonial stem cell fate." *Biol Reprod* 74(2): 314-321.
- Nieschlag, E. and H. M. Behre (2009). *Physiologie der Hodenfunktion*. Berlin, Springer
- Oatley, J. M., M. R. Avarbock, A. I. Telaranta, D. T. Fearon and R. L. Brinster (2006). "Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(25): 9524-9529.
- Ong, E., J. Nakayama, K. Angata, L. Reyes, T. Katsuyama, Y. Arai and M. Fukuda (1998). "Developmental regulation of polysialic acid synthesis in mouse directed by two polysialyltransferases, PST and STX." *Glycobiology* 8(4): 415-424.
- Ono, S., M. Hane, K. Kitajima and C. Sato (2012). "Novel regulation of fibroblast growth factor 2 (FGF2)-mediated cell growth by polysialic acid." *J Biol Chem* 287(6): 3710-3722.
- Orth, J. M. and W. F. Jester, Jr. (1995). "NCAM mediates adhesion between gonocytes and Sertoli cells in cocultures from testes of neonatal rats." *J Androl* 16(5): 389-399.
- Paratcha, G., F. Ledda and C. F. Ibanez (2003). "The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands." *Cell* 113(7): 867-879.
- Rao, Y., X. F. Wu, J. Gariepy, U. Rutishauser and C. H. Siu (1992). "Identification of a peptide sequence involved in homophilic binding in the neural cell adhesion molecule NCAM." *J Cell Biol* 118(4): 937-949.
- Rao, Y., X. F. Wu, P. Yip, J. Gariepy and C. H. Siu (1993). "Structural characterization of a homophilic binding site in the neural cell adhesion molecule." *J Biol Chem* 268(27): 20630-20638.
- Roelants, H., F. Schneider, F. Goritz, J. Streich and S. Blottner (2002). "Seasonal changes of spermatogonial proliferation in roe deer, demonstrated by flow cytometric analysis of c-kit receptor, in relation to follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, and testosterone." *Biol Reprod* 66(2): 305-312.
- Roesler, J., E. Srivatsan, F. Moatamed, J. Peters and E. H. Livingston (1997). "Tumor suppressor activity of neural cell adhesion molecule in colon carcinoma." *Am J Surg* 174(3): 251-257.

- Rolland, A. D., B. Jegou and C. Pineau (2008). "Testicular development and spermatogenesis: harvesting the postgenomics bounty." *Adv Exp Med Biol* 636: 16-41.
- Roth, J., C. Zuber, P. Wagner, D. J. Taatjes, C. Weisgerber, P. U. Heitz, C. Goridis and D. Bitter-Suermann (1988). "Reexpression of poly(sialic acid) units of the neural cell adhesion molecule in Wilms tumor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(9): 2999-3003.
- Rutishauser, U., A. Acheson, A. K. Hall, D. M. Mann and J. Sunshine (1988). "The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions." *Science* 240(4848): 53-57.
- Rutishauser, U. and L. Landmesser (1996). "Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interactions." *Trends Neurosci* 19(10): 422-427.
- Rutishauser, U., J. P. Thiery, R. Brackenbury, B. A. Sela and G. M. Edelman (1976). "Mechanisms of adhesion among cells from neural tissues of the chick embryo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(2): 577-581.
- Sato, C. (2004). "Chain length diversity of sialic acids and its biological significance." *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 16(91): 331-344.
- Sato, C., H. Fukuoka, K. Ohta, T. Matsuda, R. Koshino, K. Kobayashi, F. A. Troy, 2nd and K. Kitajima (2000). "Frequent occurrence of pre-existing alpha 2-->8-linked disialic and oligosialic acids with chain lengths up to 7 Sia residues in mammalian brain glycoproteins. Prevalence revealed by highly sensitive chemical methods and anti-di-, oligo-, and poly-Sia antibodies specific for defined chain lengths." *J Biol Chem* 275(20): 15422-15431.
- Sato, C. and K. Kitajima (2013). "Disialic, oligosialic and polysialic acids: distribution, functions and related disease." *J Biochem* 154(2): 115-136.
- Sato, C., K. Kitajima, S. Inoue, T. Seki, F. A. Troy, 2nd and Y. Inoue (1995). "Characterization of the antigenic specificity of four different anti-(alpha 2-->8-linked polysialic acid) antibodies using lipid-conjugated oligo/polysialic acids." *J Biol Chem* 270(32): 18923-18928.
- Schauer, R. (2004). "Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man." *Zoology (Jena)* 107(1): 49-64.
- Schön, J. (2003). *Die saisonale Spermatogenese des Rehbockes (Capreolus capreolus)*. Doktor der Veterinärmedizin, Freie Universität, Berlin.
- Schön, J. and S. Blottner (2008). "Estrogens are involved in seasonal regulation of spermatogenesis and sperm maturation in roe deer (Capreolus capreolus)." *Gen Comp Endocrinol* 159(2-3): 257-263.

- Schön, J., F. Goritz, J. Streich and S. Blottner (2004). "Histological organization of roe deer testis throughout the seasonal cycle: variable and constant components of tubular and interstitial compartment." *Anat Embryol (Berl)* 208(2): 151-159.
- Schreiber, S. C., K. Giehl, C. Kastilan, C. Hasel, M. Muhlenhoff, G. Adler, D. Wedlich and A. Menke (2008). "Polysialylated NCAM represses E-cadherin-mediated cell-cell adhesion in pancreatic tumor cells." *Gastroenterology* 134(5): 1555-1566.
- Schwarzer, D., K. Stummeyer, T. Haselhorst, F. Freiburger, B. Rode, M. Grove, T. Scheper, M. von Itzstein, M. Muhlenhoff and R. Gerardy-Schahn (2009). "Proteolytic release of the intramolecular chaperone domain confers processivity to endosialidase F." *J Biol Chem* 284(14): 9465-9474.
- Short, R. V. and T. Mann (1966). "The sexual cycle of a seasonally breeding mammal, the roebuck (*Capreolus capreolus*)." *J Reprod Fertil* 12(2): 337-351.
- Simon, P., S. Baumner, O. Busch, R. Rohrich, M. Kaese, P. Richterich, A. Wehrend, K. Muller, R. Gerardy-Schahn, M. Muhlenhoff, H. Geyer, R. Geyer, R. Middendorff and S. P. Galuska (2013). "Polysialic acid is present in mammalian semen as a post-translational modification of the neural cell adhesion molecule NCAM and the polysialyltransferase ST8Siall." *J Biol Chem* 288(26): 18825-18833.
- Sinowatz, F. (2001). Morphologie und Histologie der männlichen Genitalorgane. In: *Veterinärmedizinische Andrologie, Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren*. W. Busch and A. Holzmann. Stuttgart, Schattauer, 1-22. 1.
- Sompuram, S. R., K. Vani, L. J. Hafer and S. A. Bogen (2006). "Antibodies immunoreactive with formalin-fixed tissue antigens recognize linear protein epitopes." *Am J Clin Pathol* 125(1): 82-90.
- Stummeyer, K., A. Dickmanns, M. Muhlenhoff, R. Gerardy-Schahn and R. Ficner (2005). "Crystal structure of the polysialic acid-degrading endosialidase of bacteriophage K1F." *Nat Struct Mol Biol* 12(1): 90-96.
- Sytnyk, V., I. Leshchyns'ka, A. G. Nikonenko and M. Schachner (2006). "NCAM promotes assembly and activity-dependent remodeling of the postsynaptic signaling complex." *J Cell Biol* 174(7): 1071-1085.
- Tahka, K. M., A. Ruokonen, H. Wallgren and T. Teravainen (1983). "Temporal changes in testicular histology and steroidogenesis in juvenile bank voles (*Clethrionomys glareolus*, Schreber) subjected to different photoperiods." *Endocrinology* 112(4): 1420-1426.

- Tascilar, O., G. K. Cakmak, I. O. Tekin, A. U. Emre, B. H. Ucan, O. Irkorucu, K. Karakaya, M. Gul, H. B. Engin and M. Comert (2007). "Neural cell adhesion molecule-180 expression as a prognostic criterion in colorectal carcinoma: feasible or not?" *World J Gastroenterol* 13(41): 5476-5480.
- Thiery, J. P., R. Brackenbury, U. Rutishauser and G. M. Edelman (1977). "Adhesion among neural cells of the chick embryo." *Prog Clin Biol Res* 15: 199-206.
- van der Weyden, L., M. J. Arends, O. E. Chausiaux, P. J. Ellis, U. C. Lange, M. A. Surani, N. Affara, Y. Murakami, D. J. Adams and A. Bradley (2006). "Loss of TSLC1 causes male infertility due to a defect at the spermatid stage of spermatogenesis." *Mol Cell Biol* 26(9): 3595-3609.
- Vogel, C. and E. M. Marcotte (2012). "Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses." *Nat Rev Genet* 13(4): 227-232.
- von Der Ohe, M., S. F. Wheeler, M. Wuhrer, D. J. Harvey, S. Liedtke, M. Muhlenhoff, R. Gerardy-Schahn, H. Geyer, R. A. Dwek, R. Geyer, D. R. Wing and M. Schachner (2002). "Localization and characterization of polysialic acid-containing N-linked glycans from bovine NCAM." *Glycobiology* 12(1): 47-63.
- Vutskits, L., Z. Djebbara-Hannas, H. Zhang, J. P. Paccaud, P. Durbec, G. Rougon, D. Muller and J. Z. Kiss (2001). "PSA-NCAM modulates BDNF-dependent survival and differentiation of cortical neurons." *Eur J Neurosci* 13(7): 1391-1402.
- Wagener, A., S. Blottner, F. Goritz, W. J. Streich and J. Fickel (2003). "Differential changes in expression of a and b FGF, IGF-1 and -2, and TGF-alpha during seasonal growth and involution of roe deer testis." *Growth Factors* 21(2): 95-102.
- Wakayama, T., H. Koami, H. Ariga, D. Kobayashi, Y. Sai, A. Tsuji, M. Yamamoto and S. Iseki (2003). "Expression and functional characterization of the adhesion molecule spermatogenic immunoglobulin superfamily in the mouse testis." *Biol Reprod* 68(5): 1755-1763.
- Weinhold, B., R. Seidenfaden, I. Rockle, M. Muhlenhoff, F. Schertzinger, S. Conzelmann, J. D. Marth, R. Gerardy-Schahn and H. Hildebrandt (2005). "Genetic ablation of polysialic acid causes severe neurodevelopmental defects rescued by deletion of the neural cell adhesion molecule." *J Biol Chem* 280(52): 42971-42977.
- Wuhrer, M., H. Geyer, M. von der Ohe, R. Gerardy-Schahn, M. Schachner and R. Geyer (2003). "Localization of defined carbohydrate epitopes in bovine polysialylated NCAM." *Biochimie* 85(1-2): 207-218.

Yabe, U., C. Sato, T. Matsuda and K. Kitajima (2003). "Polysialic acid in human milk. CD36 is a new member of mammalian polysialic acid-containing glycoprotein." J Biol Chem 278(16): 13875-13880.

12. Publikationsverzeichnis

Paper

Polysialylation of NCAM correlates with onset and termination of seasonal spermatogenesis in roe deer.

Glycobiology. 2014 Jun;24(6) p: 488-93

Hänsch M, Simon P, Schön J, Kaese M, Braun BC, Jewgenow K, Göritz F, Küpper J, Ahmadvand N, Geyer R, Middendorff R, Müller K, Galuska SP.

Poster

Polysialylation of NCAM correlates with onset and termination of seasonal spermatogenesis

Hänsch M, Simon P, Schön J, Kaese M, Geyer R, Middendorff R, Müller K, Galuska SP.

5. Symposium der Urologischen Forschung der Deutschen Gesellschaft für Urologie
14. – 16. November, Gießen 2013

13. Ehrenwörtliche Erklärung

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

Datum, Ort

Unterschrift

14. Danksagung

Die Danksagung wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.

15. Tabellarischer Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.