

SOAT, Membrantransporter für sulfatierte Steroide-Expression und zelluläre Lokalisation im humanen Hoden

Britta Wapelhorst

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



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

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

1. Auflage 2014

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

1st Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Martin Bergmann

**SOAT, Membrantransporter für sulfatierte Steroide -
Expression und zelluläre Lokalisation im humanen Hoden**

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

Eingereicht von

Britta Wapelhorst

Tierärztin aus Bochum

Gießen 2014

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Bergmann
Prof. Dr. Wrenzycki

Tag der Disputation: 04. Dezember 2014

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

Britta Wapelhorst

Meinen Eltern gewidmet

und

Figo

A. Inhaltsverzeichnis

A. Inhaltsverzeichnis	9
B. Publikationsverzeichnis	11
C. Abbildungsverzeichnis	13
D. Einleitung	16
E. Literaturübersicht	18
1. Aufbau des Hodens	18
2. Beschreibung der Zellpopulationen des Hodens	18
2.1. Zellen der <i>Tubuli seminiferi contorti</i>	18
2.1.1. Sertolizellen	18
2.1.2. Keimzellen	20
2.1.3. Peritubuläre Myoidzellen	21
2.2. Interstitium	22
2.2.1. Leydigzellen	22
2.2.2. Weitere Bestandteile des Interstitiums	23
3. Spermatogenese	23
3.1. Normale Spermatogenese	23
3.2. Stadien der Spermatogenese	26
3.3. Störungen der Spermatogenese	30
3.4. Bewertung der Spermatogenese	31
4. Sulfatierte Steroide	33
5. „sodium-dependent organic anion transporter“ (SOAT) (SLC10A6)	37
F. Material und Methoden	43
1. Probenumfang	43
2. Probengewinnung	43
2.1. Fixierung in Bouin`scher Lösung	43
2.2. Herstellung histologischer Schnitte	43
2.2.1. Paraffinschnitte	43
3. Histologische Untersuchung der Proben	44
3.1. Färbung mit Hämatoxylin und Eosin nach Meyer	44
3.2. Immunhistochemie	45
3.2.1. Immunhistochemischer Nachweis des SOAT	47
3.2.1.1. Protokoll der Immunhistochemie	50
4. Molekularbiologische Untersuchung	53
4.1. Untersuchung von Hodenhomogenat aus Paraffinmaterial	53
4.1.1. Gewinnung der Proben	53
4.1.2. Extraktion von mRNA mit Qiagen RNeasy FFPE Kit	53
4.2. Laser-assistierte Mikrodisektion (LAM)	54
4.2.1. Herstellung der Präparate	55
4.2.2. Durchführung der LAM	56
4.2.3. Extraktion von mRNA aus Gewebeproben nach LAM	57
4.3. DNase Behandlung	57
4.4. Reverse Transkription (RT)	58
4.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	60
4.5.1. Durchführung der RT-PCR	62
4.5.2. Agarosegelelektrophorese	64
4.5.3. Aufreinigung von Produkten aus der RT-PCR	64
4.6. Quantitative PCR (qPCR)	65
4.6.1. Zielgene	67
4.6.2. Durchführung der TaqMan [®] -RT-qPCR	68
4.6.3. Auswertung der TaqMan [®] -RT-qPCR	69
5. <i>In-situ</i> -Hybridisierung	70
5.1. Herstellung der Sonden	72

5.2.	Klonierung der RT-PCR-Produkte	72
5.2.1.	Klonierung TOPO TA Cloning® Kit	72
5.2.1.1.	Blau/Weiß-Differenzierung	74
5.2.2.	Plasmidextraktion mit QIAprep Spin Miniprep Kit	75
5.2.3.	Doppelverdau der Plasmide mit EcoRI	75
5.2.4.	Einzelverdau	77
5.2.5.	<i>In-vitro</i> -Transkription	78
5.3.	Protokoll der <i>In-situ</i> -Hybridisierung	79
G.	Ergebnisse	85
1.	Histologische Evaluierung der Hodenbiopsien	85
2.	Ergebnisse qualitativen RT-PCR nach LAM	88
3.	Ergebnisse der <i>In-situ</i> -Hybridisierung	95
4.	Ergebnisse der Immunhistochemischen Untersuchung	96
4.1.	Antikörper 1: SOAT3	96, 100
4.2.	Antikörper 2: SOAT3 aufgereinigt	96, 100
4.3.	Antikörper 3: EP042488	96, 100
4.4.	Antikörper 4: EP042489	96, 100
4.5.	Antikörper 5: EP072066	97, 101
4.6.	Antikörper 6: EP072067	97, 101
4.7.	Antikörper 7: AbD04769	97, 101
4.8.	Antikörper 8: AbD04770	97, 101
4.9.	Antikörper 9: SA6946	97, 102
4.10.	Antikörper 10: SA6947	97, 102
4.11.	Antikörper 11: SA6947 aufgereinigt	98, 102
4.12.	Antikörper 12: SC S-12	98, 102
4.13.	Antikörper 13: SC C-13	98, 102
4.14.	Antikörper 14: Abnova MaxPab	98, 103
4.15.	Antikörper 15: Sigma Prestige	98, 103
4.16.	Antikörper 16: Sigma SAB	99, 103
5.	Ergebnisse der quantitativen TaqMan®-RT-qPCR von Hodenhomogenat104	
H.	Diskussion	106
I.	Zusammenfassung	115
J.	Summary	117
K.	Literaturverzeichnis	119
L.	Anhang	131
1.	Puffer, Nährböden und Lösungen	131
2.	Reagenzien	136
3.	Verbrauchsmaterialien und Geräte	138
M.	Danksagung	141

B. Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

D. Fietz, K. Bakhaus, **B. Wapelhorst**, G. Grosser, S. Günther, J. Alber, B. Döring, S. Kliesch, W. Weidner, C.E. Galuska, M.F. Hartmann, S.A. Wudy, M. Bergmann, J. Geyer. Membrane transporters for sulfated steroids in the human testis – cellular localization, expression pattern and functional analysis. PLoS One, May 2013, Volume 8, Issue 5, e62638

Abstracts

B. Wapelhorst, O. Raabe, J. Geyer, M. Bergmann. Membrane transporters for sulfated steroid hormones: gatekeepers for the sulfatase pathway. 1st Symposium of the Clinical Research Unit KFO 181 “Molecular Andrology”, International Workshop, 08.-10.05.2009 in Gießen

B. Wapelhorst, O. Raabe, J. Geyer, B. Ugele, M. Bergmann. Membrantransporter für sulfatierte Steroidhormone und die Steroidsulfatase-Expression und zelluläre Lokalisation im humanen Hoden. 3. DVR Kongress, 11.-14.11.2009 in Freiburg i.Br. Abstract in Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie 2009; 6 (5): 237

B. Wapelhorst, O. Raabe, J. Geyer, B. Ugele, S. Kliesch, M. Bergmann. Membrane transporter for sulfated steroid hormones in the testis: gatekeepers of the sulfatase pathway. 43. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, 24.-27.02.2010 in München. Abstract in Reproduction in Domestic Animals 2010 (45) 1:57

B. Wapelhorst, O. Raabe, J. Geyer, B. Döring, S. Kliesch, M. Bergmann. SOAT, Membrane transporter for sulfated steroids - expression and cellular localization in human testis. 3rd GGL Conference of Life Sciences, 29./30.09.2010 in Gießen

B. Wapelhorst, O. Raabe, J. Geyer, B. Döring, S. Kliesch, M. Bergmann. SOAT, Membrantransporter für sulfatierte Steroidhormone - Expression und zelluläre Lokalisation im humanen Hoden. 22. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Andrologie, 29.-31.10.2010 in Hamburg. Abstract in Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie 2010

B. Wapelhorst, K. Bakhaus, D. Fietz, B. Döring, S. Kliesch, J. Geyer, M. Bergmann. Membrantransporter für sulfatierte Steroidhormone – Expression und zelluläre Lokalisation im humanen Hoden. 63. Kongress der deutschen Gesellschaft für Urologie, 14.-17.09.2011 in Hamburg.

B. Wapelhorst, D. Fietz, K. Bakhaus, J. Geyer, B. Döring, S. Kliesch, M. Bergmann. SOAT, membrane transporter for sulfated steroids and Steroid Sulfatase: Expression and cellular localization in the human testis. 4th GGL Conference of Life Sciences, 21./22.09.2011 in Gießen

C. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Schema der Spermatogenese (modifiziert nach Bergmann 2006)
- Abb. 2 Spermatogenesestadien (nach Clermont 1963)
- Abb. 3 Stadium II und Stadium III der Spermatogenese (Paraffinschnitte, HE, Primärvergrößerung x40)
- Abb. 4 Histologische Beispiele für eine normale und gestörte Spermatogenese (Paraffinschnitte, HE, Primärvergrößerung x40)
- Abb. 5 Transmembrandomänen-Modell des humanen SOAT (nach Döring 2010)
- Abb. 6 Funktionsweise der direkten und indirekten Immunhistochemie (modifiziert nach Noll et al. 2000)
- Tab. 1 SOAT-Antikörper
- Tab. 2 kommerzielle SOAT-Antikörper
- Tab. 3 Sekundärantikörper
- Abb. 7 Darstellung der Laser-assistierten Mikrodisektion
- Abb. 8 Funktionsweise der PCR (modifiziert nach Fietz 2011)
- Tab. 4 Primer für die RT-PCR
- Abb. 9 Funktionsweise der TaqMan[®]-qPCR (modifiziert nach Döring 2010)
- Tab. 5 Primer der TaqMan[®]-qPCR
- Abb. 10 Δ Ct (modifiziert nach Fietz 2011)
- Abb. 11 $\Delta\Delta$ Ct (modifiziert nach Fietz 2011)
- Abb. 12 Funktionsweise der *In-situ*-Hybridisierung (modifiziert nach Noll et al. 2000)
- Tab. 6 Primer für SOAT-Sonde für die *In-situ*-Hybridisierung

- Abb. 13 pCR®II-TOPO® -Vektor
(www.tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/prciitopo-map.pdf)
- Tab. 7 Histologische Evaluierung der Hodenbiopsien, Score count (SC)
Bewertung der verwendeten Hodenbiopsien
- Abb. 14 qualitative SOAT-RT-PCR nach LAM bei einer Hodenbiopsie mit
normaler Spermatogenese
- Abb. 15 qualitative SOAT-RT-PCR nach LAM bei zwei Hodenbiopsien mit Arrest
der Spermatogenese auf Höhe der Spermatiden
- Abb. 16 qualitative SOAT-RT-PCR nach LAM bei zwei Hodenbiopsien mit
Arresten der Spermatogenese auf Höhe der Spermatozyten
- Abb. 17 qualitative SOAT-RT-PCR nach LAM bei einer Hodenbiopsie mit Arrest
der Spermatogenese auf Höhe der Spermatogonien
- Abb. 18 qualitative SOAT-RT-PCR nach LAM bei einer Hodenbiopsie mit *Sertoli
Cell Only Syndrome*
- Abb. 19 SOAT-*In-situ*-Hybridisierung, A Antisense: Nachweis des SOAT im
Zytoplasma pachytäner Spermatozyten, Primärvergrößerung x40
- Abb. 20 Bildertafel Immunhistochemie I
(SOAT3, SOAT-RT-PCR von isolierten interstitiellen Bereichen mit
deutlicher Gefäßbildung, SOAT3 purified, EP042488, EP042489)
- Abb. 21 Bildertafel Immunhistochemie II
(EP072066, EP072067, AbD04769, AbD04769 Negativkontrolle,
AbD04770)

- Abb. 22 Bildertafel Immunhistochemie III
(SA6946, SA6947, SA6947 purified, SOAT-RT-PCR nach LAM mit isolierten *Tubuli seminiferi* und Interstitiumsanschnitten, SC C-12, SC C-13)
- Abb. 23 Bildertafel Immunhistochemie IV
(Abnova MaxPab, Sigma SAB, Sigma Prestige mit DAB, Sigma Prestige mit DAB Negativkontrolle)
- Abb. 24 TaqMan[®]-RT-qPCR mit Zielgen SOAT an Hodenhomogenat bei Patienten mit normaler Spermatogenese und Arresten der Spermatogenese sowie FS1-Zellen
- Abb. 25 TaqMan[®]-RT-qPCR mit Zielgen SOAT: Gen-Expression bei einzelnen Patienten sowie FS1-Zellen

D. Einleitung

Im Blut zirkulierende sulfatierte Steroide können durch ihre hydrophilen Eigenschaften Zellmembranen nicht mittels Diffusion passieren, sondern sind auf ein Transportsystem angewiesen (Geyer et al. 2007). Zudem sind sulfatierte Steroide biologisch nicht aktiv, eine Reaktion mit dem Zielrezeptor ist nicht möglich (Greven 2008). Lange wurden sulfatierte Steroide als zur Ausscheidung vorgesehene Endprodukte angesehen (Reed et al. 2005).

Durch die Steroidsulfatase (StS), auch Arylsulfatase C genannt (Ghosh 2007), können sulfatierte Steroide „reaktiviert“ werden, d.h. in ihre freie Form überführt und somit biologisch aktiviert werden (Reed et al. 2005). Die Reaktivierung sulfatierter Steroide durch die Steroidsulfatase in biologisch tätige Steroide wird „*sulfatase pathway*“ genannt (Secky et al. 2013). Substrate der Steroidsulfatase sind unter anderem Estronsulfat (E1S), Pregnenolonsulfat (PREGS) und Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS), (Reed et al. 2005, Ghosh 2007).

Eine Inaktivierung des Steroidsulfatase-Genes äußert sich durch das Krankheitsbild der „*X-linked Ichthyosis*“ (Kent et al. 2008, Kríz et al. 2008, Lykkesfeldt et al. 1991, Traupe und Happle 1983, Epstein et al. 1981). Weiter wird das Fehlen der Steroidsulfatase diskutiert mit dem Auftreten von Geburtskomplikationen sowie Kryptorchismus (Traupe und Happle 1983, Lykkesfeldt et al. 1985) und Hodenkrebs (Lykkesfeldt et al. 1991, Lykkesfeldt et al. 1983). Nakamura et al. (2006) wiesen die Steroidsulfatase in einer Prostatakrebs-Zelllinie nach und vermuteten für die Steroidsulfatase eine wichtige Rolle in der lokalen Bereitstellung von Androgenen und Östrogenen. Der Nachweis der Steroidsulfatase konnte in mehreren Organen des Menschen erbracht werden, unter anderem in Hoden, Uterus, Lunge, Aorta,

Schilddrüse, Leber (Reed et al. 2005) und dem Temporallappen des zentralen Nervensystems (Steckelbroeck et al. 2004).

Sulfatierte Steroide können als Vorläufer für die Testosteronsynthese im humanen Hoden genutzt werden (Payne et al. 1971, 1973, Kawano et al. 1973). So vermuteten Payne et al. bereits 1969, Dehydroepiandrosteronsulfat als inaktiven Vorgänger für aktive Hormone (Payne et al. 1969). Eine Versorgung des Hodens mit lokal verfügbarem Testosteron erscheint somit möglich.

Der SLC10A6 (sodium-dependent organic anion transporter, SOAT) ist ein Mitglied der SLC-Transporterfamilie (Geyer et al. 2006) und wurde erstmals bei der Ratte von Geyer et al. (2004) entdeckt und beschrieben. Die Arbeitsgruppe klonierte und charakterisierte ebenfalls den humanen SOAT, der eine hohe Expression im Hoden aufweist (Geyer et al. 2007). In Transportstudien in stabil transfizierten SOAT-HEK293 Zellen zeigt der SOAT Transporteigenschaften für die sulfatierten Steroide Estronsulfat, Pregnenolonsulfat sowie Dehydroepiandrosteronsulfat, jedoch nicht für Gallensäuren (Geyer et al. 2007).

Der SOAT erscheint aufgrund seiner hohen Expression im humanen Hoden sowie seiner Transportaffinität für die sulfatierten Steroide Estronsulfat, Pregnenolonsulfat und Dehydroepiandrosteronsulfat als ein aussichtsreicher Kandidat für die Beteiligung am „*sulfatase pathway*“ und damit an der lokalen Verfügbarkeit für Steroidhormone im Hoden.

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit sollen die Expression und die zelluläre Lokalisation des SOAT im humanen Hoden geklärt werden.

E. Literaturübersicht

1. Aufbau des Hodens

Umgeben ist der Hoden von einer derben Bindegewebshaut, der *Tunica albuginea*. Von der *Tunica albuginea* ausgehende Bindegewebssepten unterteilen das Hodenparenchym in einzelne Hodenläppchen, *Lobuli testis*. Die Bindegewebssepten bilden das innerhalb des Hodens zentral liegende *Mediastinum testis*, in dem das *Rete testis* liegt. Jedes Hodenläppchen wird von einem oder mehreren *Tubuli seminiferi contorti* gebildet, das von einer *Lamina propria* umgeben ist. Zusammen mit den interstitiellen Leydigzellen, Gefäßen und Nerven bilden sie das Hodenparenchym. Im Keimepithel der *Tubuli seminiferi contorti* gebildete Spermien gelangen über die *Tubuli seminiferi recti* in das *Rete testis* und darüber in den Nebenhoden (Übersicht in Mayerhofer et al. 2005).

2. Beschreibung der Zellpopulationen des Hodens

2.1. Zellen der *Tubuli seminiferi contorti*

2.1.1. Sertolizellen

Sertolizellen wurden erstmals 1865 von Enrico Sertoli beschrieben (zitiert nach Griswold 1998). Es sind somatische, postmitotisch inaktive Zellen, die innerhalb des Keimepithels liegen (Übersicht in Griswold 1998).

Sertolizellen sitzen der Basalmembran des Keimtubulus direkt auf und reichen bis zum Lumen des Keimtubulus. Die Zahl der täglich produzierten Spermien wird durch die Anzahl der in dem Keimtubulus vorhandenen Sertolizellen beeinflusst. Von Sharpe et al. (2003) wird vermutet, dass ein Rückgang der Spermienqualität im Alter mit dem Absterben der Sertolizellen im Zusammenhang steht.

Laut Griswold (1998) sind die Sertolizellen eine essentielle Voraussetzung für Aufbau und Erhalt einer qualitativ und quantitativ intakten Spermatogenese. Durch die permanente Verbindung zu den Keimzellen für die Dauer der gesamten Spermatogenese können die Sertolizellen das hormonelle Milieu mittels Vermittlung der Testosteronwirkung auf die Keimzellen regulieren. Hierbei ist jede Sertolizelle mit einer bestimmten Zahl von Keimzellen in Kontakt. Diese Zahl stellt ein Maß für die Quantität der Spermatogenese dar und beträgt beim Mann ca. 10 Keimzellen pro Sertolizelle (Übersicht in Bergmann 2005).

Morphologisch besitzen Sertolizellen einen charakteristischen unregelmäßig geformten, oftmals dreieckigen Zellkern. Der Zellkern ist meist im unteren Drittel des Keimepithels sichtbar und enthält einen deutlich sichtbaren Nucleolus.

Mit dem Eintritt in die Pubertät ist die Anzahl der Sertolizellen festgelegt und kann ab dann nur noch abnehmen (Sharpe et al. 2003). Zeitgleich verändert sich der Zellkern der Sertolizellen zu einem dreigeteilten und prominent hervortretenden Nucleolus. Weitere Zeichen der Reifung von Sertolizellen sind der Verlust der Proliferationsfähigkeit sowie die Ausbildung von *tight junctions* zwischen den Sertolizellen (Sharpe et al. 2003) und dem daraus folgenden Entstehen der Blut-Hoden-Schranke.

Für den Erhalt der Spermatogenese ist das Vorhandensein der Blut-Hoden-Schranke essentiell. Diese wurde erstmals von Dym & Fawcett (1970) bei der Ratte beschrieben. Für den Menschen deuteten Koskimies et al. auf das Vorhandensein einer Blut-Hoden-Schranke hin (Koskimies et al. 1973), welche von Bergmann et al. auch histologisch nachgewiesen wurde (Bergmann et al. 1989). Sertolizellen bilden aus *tight junctions* und *gap junctions* bestehende funktionale Komplexe, die sich von der Entwicklung der Spermatogonien bis zu primären Spermatozyten finden

(Übersicht bei Bergmann 2006). Auf diese Weise bietet die Blut-Hoden-Schranke den Keimzellen einen Schutz vor dem körpereigenen Immunsystem, da ab dem Stadium der primären Spermatozyten die Keimzellen Antigene auf ihrer Zelloberfläche ausbilden. Die Keimzellen müssen durch die Blut-Hoden-Schranke vom Blut getrennt werden, da es sonst zu einer Autoimmunreaktion kommen kann (Übersicht bei Bergmann 2005).

Des Weiteren sezernieren Sertolizellen Proteine, die in fünf verschiedene Kategorien eingeteilt werden können: 1. Transportproteine (z.B. *androgen binding protein* (ABP), Transferrin), 2. Proteasen und Inhibitoren (u.a. für die Formierung und Umgestaltung des Zytoskeletts), 3. Membran-Glykoproteine / Hormon-Rezeptoren (z.B. Androgen-Rezeptor (Suárez-Quian et al. 1999), 4. endokrine und parakrine Faktoren für die Keimzellernährung und -differenzierung (z.B. Anti-Müller-Hormon (AMH)) und 5. Transkriptionsfaktoren und Signalmoleküle (Griswold 2005).

2.1.2. Keimzellen

Die Keimzellen liegen im Keimepithel (ca. 80 µm) in unterschiedlichen Entwicklungsstadien vor und werden dabei von den Sertolizellen umgeben. Morphologie der Keimzellen sowie ihre Lage im Keimepithel sind abhängig von ihrem Entwicklungsstand, d.h. dem Spermatogenesestadium (Clermont 1963).

Spermatogonien haben Kontakt zur Basallamina der Tubuluswand und weisen einen kompakten Kern auf, der von einem schmalen Zytoplasmasaum umrandet ist. Aufgrund morphologischer Kriterien können unterschiedliche Typen von Spermatogonien (Typ A- und B-Spermatogonien) unterschieden werden. Spermatogonien Typ A treten in zwei unterschiedlichen Varianten auf: *A dark spermatogonia* (Ad) zeigen einen einheitlich dunkel gefärbten Kern, dagegen

besitzen *A pale spermatogonia* (Ap) ein hell granuliertes Chromatin mit ein bis zwei deutlich sichtbaren Nucleoli. Typ A-Spermatogonien bilden im Keimepithel den Pool an Stammzellen für die Spermatogenese. Ein Teil von ihnen differenziert sich zu Typ B-Spermatogonien (heller Zellkern), die sich von der Tubuluswand lösen und in die Spermatogenese eintreten.

Somit entstehen Typ B-Spermatogonien durch Mitose aus Typ A-Spermatogonien (Vermehrungsphase). Die Typ B-Spermatogonien reifen dann zu primären Spermatozyten heran, indem sie größer werden und ihr Chromatid verdoppeln. Primäre Spermatozyten besitzen einen großen Zellkern, in dem mehrere Stadien der Prophase I der Meiose I voneinander unterschieden werden können. Es kommt zur 1. meiotischen Reifeteilung und aus einer primären Spermatozyte entstehen zwei sekundäre Spermatozyten. Diese teilen sich nach kurzer Zeit erneut und es entstehen die runden Spermatiden.

Hierbei zeigen die frühen Spermatiden einen runden, dunklen Zellkern. Die elongierenden Spermatiden weisen einen tropfenförmigen Kern auf, während die elongierten Spermatiden sich bereits gedreht haben, der Spermischwanz weist bereits in das Tubuluslumen und der stark abgeflachte Zellkern befindet sich noch im Keimepithel. Die Spermien werden nun in das Tubuluslumen abgegeben und gelangen mittels peristaltischer Bewegungen der Tubuluswand über das *Rete testis* und die *Ductuli efferentes* in den Nebenhoden (Übersicht in Mayerhofer et al. 2005).

2.1.3. Peritubuläre Myoidzellen

Peritubuläre Myoidzellen sind Fibrozyten, die durch die Bildung des Proteins *α -smooth muscle actin* zur Kontraktion fähig sind. Zudem sezernieren sie kollagene Fasern für den Aufbau der Tubuluswand. Peritubuläre Myoidzellen sind in die

Tubuluswand eingebettet. Die Tubuluswand setzt sich dabei aus circa vier bis fünf Lagen Myofibroblasten sowie aus kollagenen Fasern zusammen (Bergmann 2005). Durch ihre Kontraktionsfähigkeit sind peritubuläre Myoidzellen am Weitertransport der in das Tubuluslumen abgegebenen Spermien beteiligt (Übersicht in Mayerhofer et al. 2005).

2.2. Interstitium

2.2.1. Leydigzellen

Im Jahre 1850 wurden Leydigzellen von Franz Leydig zuerst beschrieben (Übersicht bei Weinbauer et al. 2010). Sie bilden, vereinzelt oder in Gruppen vorliegend, gemeinsam mit Bindegewebe, Blutgefäßen und interzellulärer Matrix, das Hodeninterstitium. Leydigzellen produzieren und sezernieren Testosteron. Es kann zwischen Leydig-Vorgängerzellen, Leydig-Stammzellen sowie fetalen und adulten Leydigzellen unterschieden werden. Die fetalen Stammzellen stammen wahrscheinlich aus mehreren verschiedenen embryonalen Geweben (Coelomepithel, Gonadenleiste, Mesonephroszellen). Im Fetus sind sie die einzige Testosteronquelle und produzieren beim Menschen das Steroidhormon bereits vor der siebten Schwangerschaftswoche. Aus den fetalen werden neonatale Leydigzellen, die wiederum zu unreifen Leydigzellen werden. Die adulten Leydigzellen sind die typischen hormonproduzierenden Zellen, mit einem endoplasmatischen Retikulum und einer großen Anzahl an Mitochondrien. In den zahlreich vorkommenden Fetttröpfchen liegen die Vorstufen zum Testosteron vor. Leydigzellen produzieren ebenfalls den Rezeptor für das Luteinisierende Hormon (LH) und Wachstumsfaktoren (Übersicht bei Svechnikov et al. 2010).

2.2.2. Weitere Bestandteile des Interstitiums

Im Interstitium finden sich Blut- und Lymphgefäße sowie Nervenfasern. Des Weiteren können Zellen des Immunsystems vorkommen, so können ca. pro zehn bis fünfzig Leydigzellen ein Makrophage gefunden werden (Übersicht in Mayerhofer et al. 2005).

3. Spermatogenese

3.1. Normale Spermatogenese

Die Spermatogenese ist der Prozess der Bildung männlicher Keimzellen. Die Spermatogenese findet im Keimtubulus statt, beginnt basal an der Tubuluswand und endet luminal mit der Freigabe der Spermatozoen in das Tubuluslumen (Übersicht bei Bergmann 2005).

Der Ablauf der Spermatogenese / Keimzellbildung kann in drei Phasen unterschieden werden:

1. Mitotische Proliferation und Differenzierung der Spermatogonien
2. Meiotische Reifeteilung der Spermatozyten
3. Differenzierung der haploiden Spermatozoen zu Spermien (Spermiogenese / Spermatohistogenese)

Die Spermatogenese bezeichnet die Entstehung der Keimzellen von den Spermatogonien zu den Spermatozoen (Abb. 1). Die Spermatogonien besitzen einen diploiden Chromosomensatz ($2n = 2C$). Während die Typ A-Spermatogonien lebenslang mitotisch aktiv sind und den Pool von Stammzellen für die Spermatogenese darstellen, treten die durch Mitose aus ihnen hervorgehenden Spermatogonien Typ B in die Meiose ein. Mit dem Eintritt in die Meiose wird der

DNA-Gehalt verdoppelt, und jedes Chromosom besteht nun aus zwei Chromatiden ($2n = 4C$). Die entstandenen Keimzellen werden als primäre Spermatozyten bezeichnet. Es folgt die erste Reifeteilung der Meiose, bei der aus einer primären Spermatozyte zwei haploide sekundäre Spermatozyten (mit jeweils $1n = 2C$) entstehen. In der zweiten meiotischen Reifeteilung teilen sich die sekundären Spermatozyten und es entstehen Spermatiden, die einen haploiden Chromosomensatz mit einfachem Chromatid ($1n = 1C$) aufweisen.

Die entstandenen runden Spermatiden durchlaufen zeitgleich bzw. parallel ablaufende Differenzierungsschritte, um die Form des Spermiums zu erreichen. Diese sind: die Ausbildung von Spermienkopf, Akrosom und Geißel sowie Abschnürung des überflüssigen Zytoplasmas (Übersicht bei Bergmann 2005).

Voraussetzung für die Bildung des Spermienkopfes ist die Kondensierung der DNA. Hierfür werden ca. 85% der DNA-bindenden Histone durch Protamine ersetzt. Nach dem erfolgten Austausch liegt die Protamin-gebundene DNA in der sogenannten „Doughnut“-Struktur vor, hierbei handelt es sich um konzentrische Kreise von Protamin-DNA-Komplexen, durch die es zu einer enormen Kondensation des Kernchromatins in haploiden Spermatiden kommt (Steger et al. 1998). Durch die Kondensation des Kernchromatins findet in elongierten Spermatiden keine Genexpression mehr statt. Ebenso sind Transkription und Translation zeitlich entkoppelt (Übersicht bei Steger 2005). Für die Reifung runder Spermatiden zu reifen Spermien ist der korrekte zeit- sowie stadienspezifische Austausch von Histonen zu Protaminen wichtig. Zusätzlich ist der Protamingehalt eines Spermiums ein fertilitätsrelevanter Parameter (Steger et al. 1998, Übersicht bei Gaucher et al. 2010). Die Bildung des Akrosoms startet mit der Bildung eines akrosomalen Bläschens, welches aus der Fusion zahlreicher vom Golgi-Apparat abgeschnürter Lysosomen

hervorgeht. Diese Phase wird als Golgi-Phase bezeichnet. Das gebildete Bläschen lagert sich in der Kappen-Phase dem Spermatidenkern auf und breitet sich über den Nucleus aus. Im akrosomalen Bläschen sind verschiedene Enzyme (z.B. Akrosin und Hyaluronidasen) gespeichert, die bei der Befruchtung freigesetzt werden und es dem Spermium ermöglichen, die *Zona pellucida* der Eizelle zu durchdringen. In der Akrosom-Phase kondensiert der Zellkern weiter. Das akrosomale Bläschen wird zum Akrosom und begleitet die Formänderung des Spermatidenkerns. Zeitgleich dreht sich das Spermium, das Akrosom zeigt nun zur Tubuluswand und die sich ausbildende Geißel in das Tubuluslumen.

Die Ausbildung der Geißel beginnt zeitgleich mit der Kappen-Phase der Akrosombildung und ist mit der Freisetzung des Spermiums in das Tubuluslumen abgeschlossen. Die Geißel wird von den Zentriolen ausgehend gebildet. Hierbei nimmt ein Zentriol Kontakt zum Zellkern auf, um das zweite winden sich Mikrotubuli mit zwei zentralen und neun peripheren Tubuli. Diese stülpen die Zelloberfläche vor und bilden somit die Geißel.

Das von den Spermatiden nicht mehr benötigte Zytoplasma mit den restlichen Zellorganellen wird abgeschnürt und bildet den Residualkörper, der von den Sertolizellen abgebaut wird (Übersicht in Bergmann 2005).

Die in das Tubuluslumen freigesetzten Spermien gelangen mit Hilfe der peristaltischen Bewegungen der Tubuluswand über das *Rete testis* und die *Ductuli efferentes* des Hodens in den Nebenhoden. Hier werden die Spermien für die Erlangung ihrer Befruchtungsfähigkeit gespeichert. So bewirken beispielsweise die Sekrete des Nebenhodens, dass die Spermien ihre Eigenmotilität erhalten. Die Reifung der Spermien im Nebenhodenkopf, *Caput epididymidis*, ist essentiell für die

Bewegungsfähigkeit (Übersicht bei Mayerhofer et al. 2005 und Weinbauer et al. 2010).

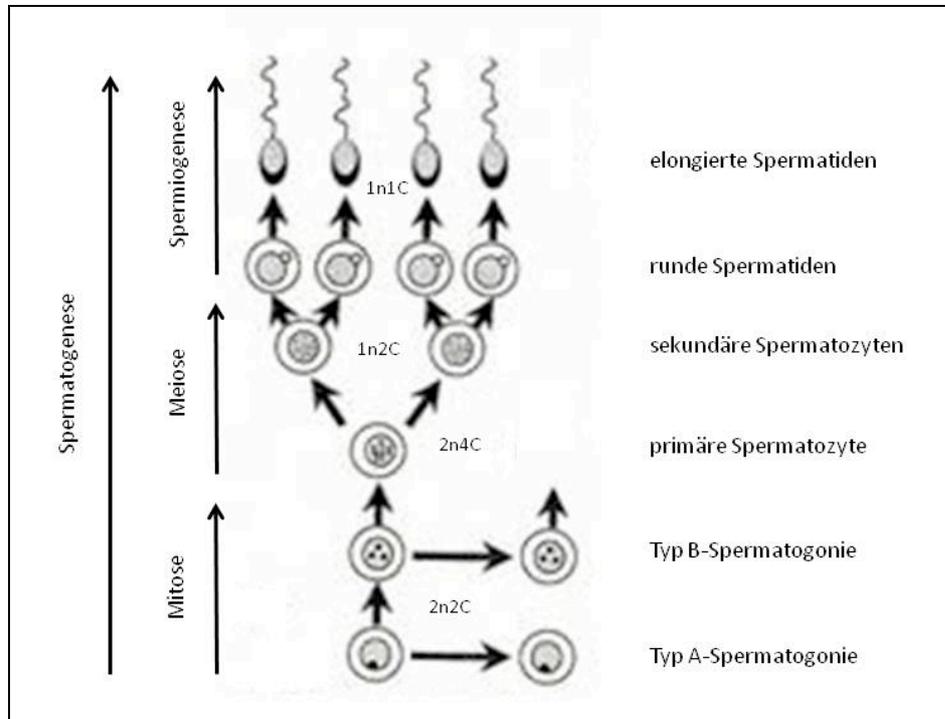


Abb. 1 Schema der Spermatogenese (modifiziert nach Bergmann 2006)

3.2. Stadien der Spermatogenese

Ein Spermatogenesezyklus, beginnend mit den Mitosen der Spermatogonien bis zur Freisetzung von Spermien in das Tubuluslumen, läuft in den *Tubuli seminiferi* nicht überall zeitgleich ab, um sicher zu stellen, dass zu jedem Zeitpunkt ausdifferenzierte Spermien zur Verfügung stehen. Als Folge daraus können im Querschnitt eines Keimtubulus verschiedene Entwicklungsstufen von Keimzellen bestimmt werden, die als Spermatogenesestadien bezeichnet werden. Beim Menschen werden sechs Spermatogenesestadien unterschieden (Abb. 2). Die innerhalb des Keimepithels längs angeordneten Spermatogenesestadien sind das Abbild von gleichzeitig ablaufenden Spermatogenesewellen. Diese Spermatogenesewellen sind in einem

Querschnitt des Keimepithels derart nur beim Menschen sichtbar (Abb. 2), (Clermont 1963).

Stadium I ist gekennzeichnet durch das Vorhandensein runder Spermatiden sowie den im Keimepithel über ihnen liegenden elongierenden Spermatiden. Basal finden sich pachytäne Spermatozyten und Spermatogonien Typ A und B.

Stadium II wird durch die Reifung der elongierten Spermatiden gekennzeichnet, die hier ihr überschüssiges Zytoplasma abschnüren und die Spermiogenese vollenden. Am Ende von Stadium II erfolgt das Freigeben der Spermien in das Tubuluslumen (Spermiation). Zusätzlich liegen Richtung Tubuluswand noch runde Spermatiden, pachytäne Spermatozyten und Typ A- und B-Spermatogonien vor (Abb. 2, 3).

Stadium III ist charakterisiert durch den Beginn der Kondensierung des Spermatidenkerns von den verbliebenen runden Spermatiden. In diesem Stadium treten zwei Generationen von primären Spermatozyten auf, pachytäne und präleptotäne primäre Spermatozyten. Da die Spermatogonien Typ B aus Stadium II in die Meiose eingetreten sind und zu präleptotänen primären Spermatozyten werden, können an der Tubuluswand nun nur Spermatogonien Typ A identifiziert werden (Abb. 2, 3).

In Stadium IV beginnen die runden Spermatiden mit der Elongation. Zudem treten pachytäne und leptotäne Spermatozyten auf sowie Spermatogonien Typ A an der Tubuluswand.

Stadium V zeigt weiter die Elongation der Spermatiden sowie die weitere Entwicklung der Spermatozyten. Die leptotänen primären Spermatozyten aus Stadium IV entwickeln sich zu zygotänen primären Spermatozyten. Basal liegend finden sich

Spermatogonien Typ A. Zum Ende von Stadium V durchlaufen die primären Spermatozyten die erste Reifeteilung.

Stadium VI ist somit durch das Vorhandensein von sekundären Spermatozyten definiert. Sekundäre Spermatozyten teilen sich jedoch nach wenigen Stunden erneut, durchlaufen die zweite Reifeteilung, so dass das Stadium VI nur sehr selten histologisch evaluierbar ist.

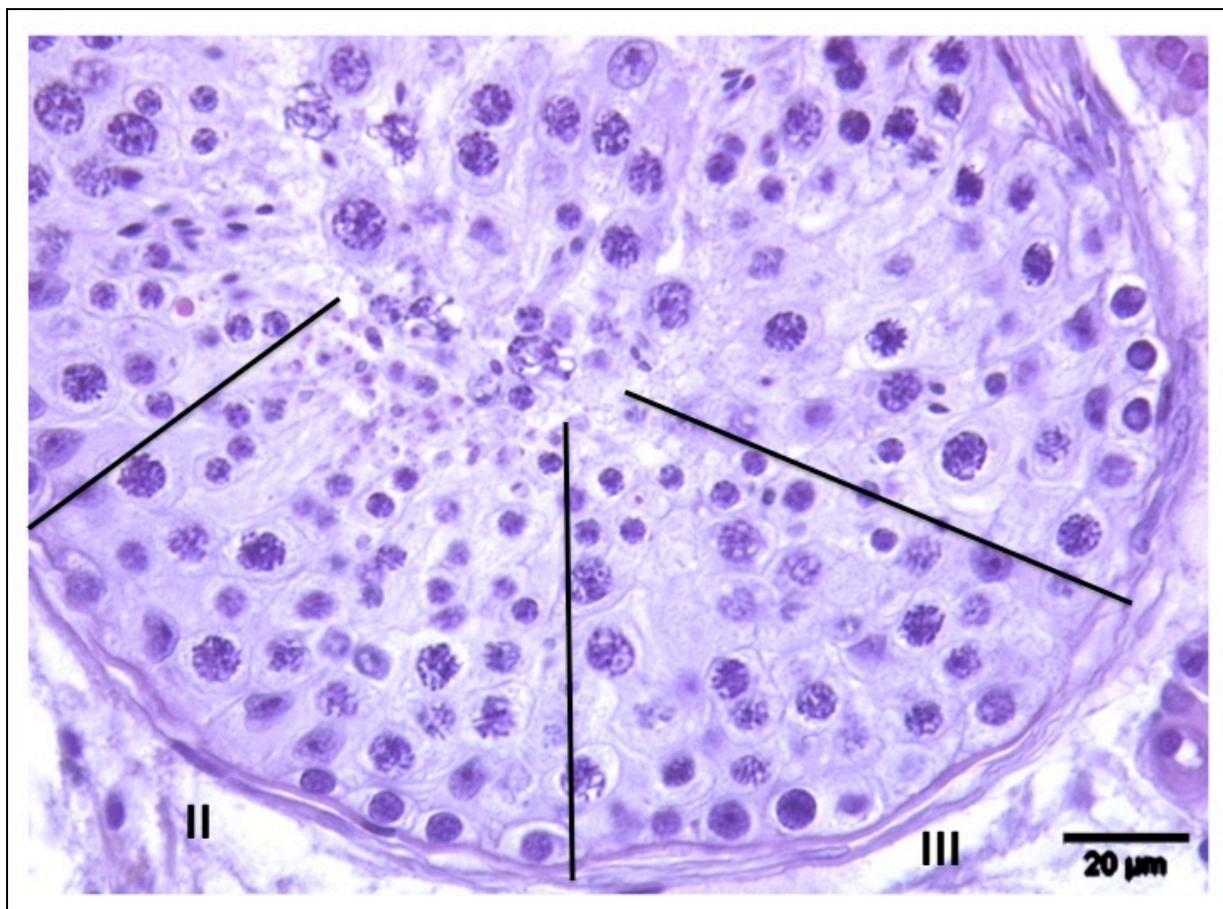


Abb. 3 Stadium II und Stadium III der Spermatogenese

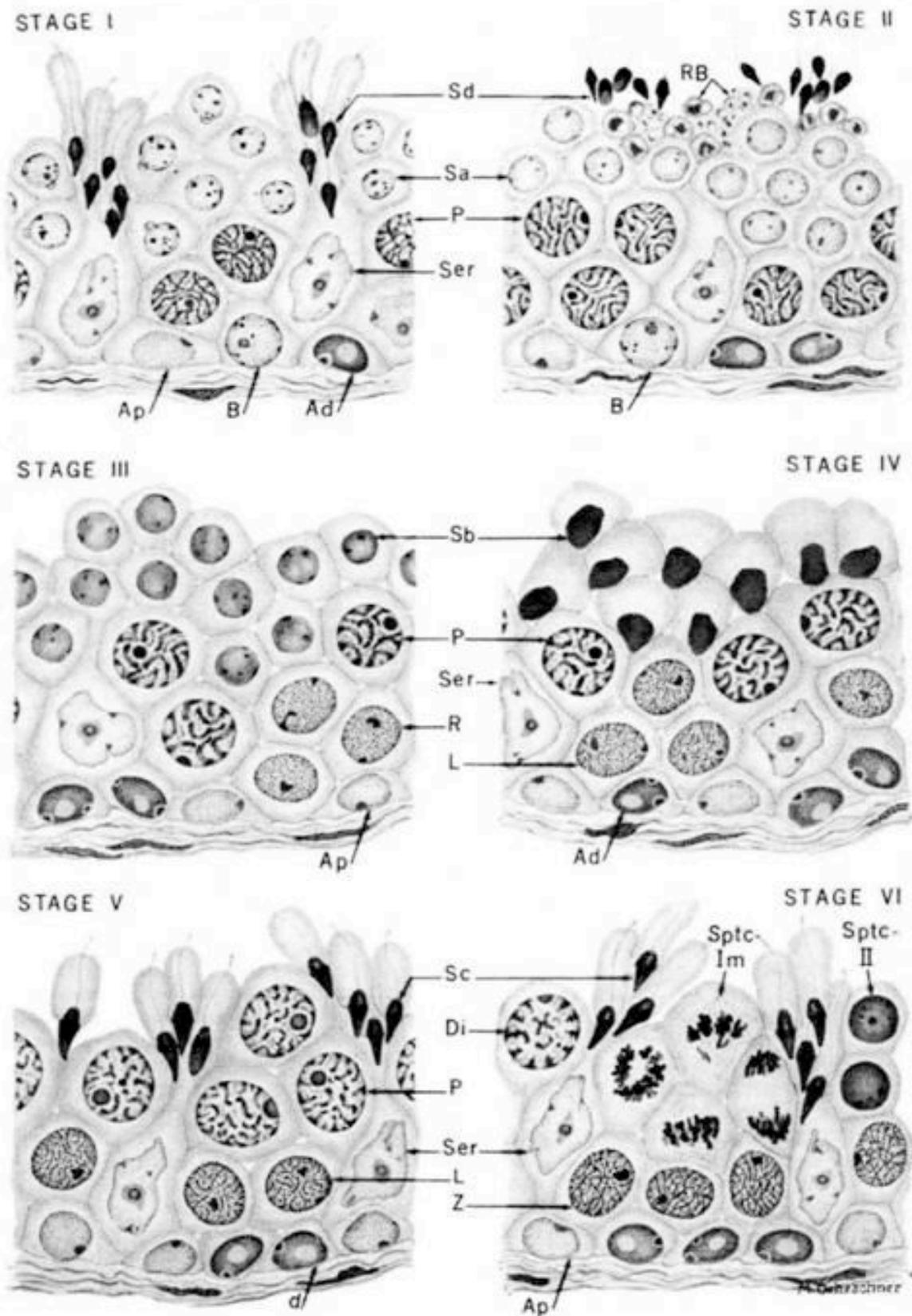


Abb. 2 Spermatogenesestadien (aus Clermont 1963)

3.3. Störungen der Spermatogenese

Ein häufig auftretender Befund bei Infertilität ist die Azoospermie, d.h. das Fehlen von Spermien im Ejakulat. Hierbei wird zwischen obstruktiver und nicht-obstruktiver Azoospermie unterschieden. Bei einer nicht-obstruktiven Azoospermie liegt immer eine Störung der Spermatogenese im Hoden vor. Eine Unterscheidung dieser beiden Azoospermie-Formen ist nur durch eine Hodenbiopsie möglich.

Indiziert ist eine diagnostische Biopsie des Hodens bei Azoospermie, bei der ein normales Hodenvolumen und ein normaler FSH-Wert vorliegen (Bergmann 2006). Für eine assistierte Reproduktion bei Patienten mit diagnostizierter nicht-obstruktiver Azoospermie können Spermien aus bioptiertem Hodengewebe entnommen werden (testikuläre Spermienextraktion, TESE).

Auch bei Patienten mit einem *Sertoli Cell Only Syndrom (SCO)* oder einer totalen Atrophie des Keimepithels lässt sich selten eine zumindest fokal erhaltene spermatogenetische Restfunktion nachweisen und ermöglicht somit für den Patienten eine Therapie mittels testikulärer Spermienextraktion und assistierter Reproduktion (Steger 2005).

Diagnostische Hodenbiopsien sind ebenfalls indiziert bei Patienten mit Risiko für maligne Keimzelltumore, da Tumorstufen, wie ein *Carcinoma in situ* frühzeitig diagnostiziert werden können oder um eine Erkrankung des kontralateralen Hodens bei bereits klinisch manifestiertem Hodentumor auszuschließen (Übersicht bei Bergmann 2010).

Störungen können an allen Entwicklungsstufen der Keimzellentwicklung auftreten. Eine Hypospermatogenese (hyp) stellt eine qualitativ intakte und nur quantitativ gestörte Spermatogenese dar. Es können jedoch auch Spermatogenese-arreste auftreten, auf den Stufen von runden Spermatisden (sda), primären Spermatozyten

(sza) oder Spermatogonien (sga). Ein vollständiges Fehlen von Keimzellen im Tubulus bedeutet das *Sertoli Cell Only Syndrom (SCO)*, (Übersicht normale Spermatogenese und Spermatogenesestörungen in Abb. 4). Bei einer Abwesenheit aller Zellen im Tubulus mit durch Kollageneinlagerungen verdickter Tubuluswand liegt ein Tubulusschatten (ts) vor. Es können auch Differenzierungsstörungen von Keimzellen auftreten, z.B. Megalospermatozyten durch einen Meiosearrest oder mehrkernige Spermatozyten infolge von Spermioyogenesestörungen (Bergmann 2005).

3.4. Bewertung der Spermatogenese

Die Bewertung der Hodenbiopsien erfolgt histologisch semi-quantitativ mittels „*score count*“-Analyse nach Johnson (Johnsen 1970) oder Bergmann und Kliesch (Bergmann und Kliesch 2010). Nach Johnsen wird jedem Spermatogenesebild ein bestimmter Zahlenwert zugeordnet, aus der Berechnung des arithmetischen Mittelwertes ergibt sich der *score count*. Dieser stellt somit das durchschnittliche Bild der Hodenbiopsie dar. Bei der Bewertung nach Bergmann und Kliesch dagegen stellt der *score count* die Anzahl der Hodenkanälchen dar, die reife Spermien enthalten. Hierbei wird jedes Hodenkanälchen einer Hodenbiopsie histologisch einzeln betrachtet. Am Ende wird die Anzahl der betrachteten *Tubuli seminiferi* zusammengezählt, und die Prozentzahl der Tubuli, die elongierte Spermatozyten enthalten, geben den *score count* wieder. So bedeutet beispielsweise ein *score count* von 10, dass 100% der betrachteten Tubuli einer Hodenbiopsie elongierte Spermatozyten enthalten (Bergmann und Kliesch 2010). Entsprechend wird so festgehalten, wie viele Tubuli mit aktiver Spermatogenese in der Hodenbiopsie enthalten sind und es lassen sich die Chancen für eine positive testikuläre Spermienextraktion ableiten.

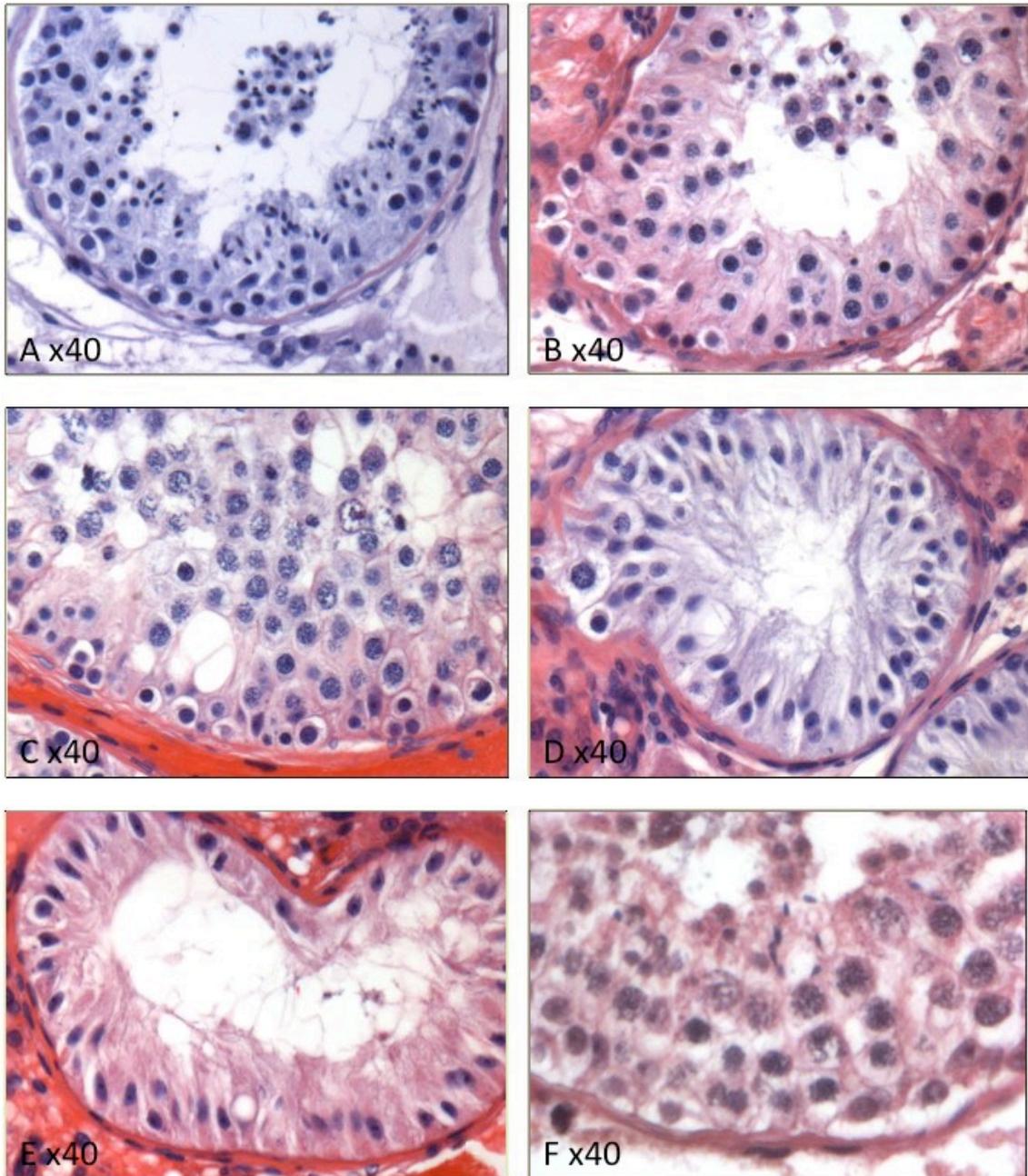


Abb. 4 Histologische Beispiele für eine normale und gestörte Spermatogenese

(Paraffinschnitte, HE, Primärvergrößerung x40)

- A normale Spermatogenese (nsp)
- B Spermatidenarrest (sda)
- C Spermatozytenarrest (sza)
- D Spermatogonienarrest (sga)
- E Sertoli Cell Only Syndrom (SCO)
- F Hypospermatogenese (hyp)

4. Sulfatierte Steroide

Steroidhormone werden chemisch in drei Gruppen unterteilt: C₂₁-Steroide (Gestagene, Glucocorticoide, Mineralcorticoide), C₁₉-Steroide (Androgene) und C₁₈-Steroide (Östrogene). Sie sind sowohl an der Reproduktion als auch an der Steuerung weiterer Körperfunktionen beteiligt. Steroidhormonproduzierende Organe sind die Gonaden, die Nebennierenrinde und bei vielen Säugetieren die Plazenta.

Durch Sulfatierung von Steroidhormonen mittels Sulfotransferasen (SULT) sind Steroidhormone in ihrer sulfatierten Form polar und dadurch wasserlöslich. Dazu ist ihr Bindungsvermögen an Albumin erhöht (Übersicht in Greven 2008), und sie können effektiv im Blut transportiert und mit Kot oder Urin ausgeschieden werden. Nach Sulfatierung werden Steroidhormone jedoch inaktiviert und können nun, im Gegensatz zu den freien Formen, aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften Zellmembranen nicht mehr passiv durchdringen und somit nicht mehr mit ihren nukleären Zielrezeptoren interagieren (Übersicht in Geyer et al. 2007). Das klassische Dogma ist, dass Steroidhormone in ihrer freien Form verfügbar sein müssen, um an ihre spezifischen Rezeptoren zu binden und somit eine biologische Antwort auslösen zu können (Reed et al. 2005). Dagegen wurden sulfatierte Steroide als biologische Endprodukte angesehen, die aufgrund ihrer Wasserlöslichkeit für die Ausscheidung vorgesehen sind (Reed et al. 2005), da sie nicht frei durch die Zellmembranen diffundieren können. Um mit dem Urin ausgeschieden werden zu können, durchlaufen die Steroidhormone im Rahmen der Biotransformation in Phase II eine Glukuronodierung bzw. Sulfatierung, die die Wasserlöslichkeit steigert (Gomes et al. 2009). Zuvor, in Phase I der Biotransformation, geschehen Umbauten an funktionellen Gruppen, was beispielsweise eine biologische Inaktivierung ergeben kann. In Phase I gibt es weiterhin die Schaffung neuer neuer funktioneller Gruppen

an Molekülen, an denen wiederum im Rahmen der Phase II sehr polare Gruppen angehängt werden können. In der Konsequenz ergibt sich hierdurch die wichtige Erhöhung der Wasserlöslichkeit auszuscheidender Moleküle (Horn et al. 2003). So wird beispielsweise Dehydroepiandrosteron (DHEA), ein Vorgänger von Testosteron als Phase II sulfokonjugiert im Urin ausgeschieden (Badoud et al. 2011) und kann somit u.a. als Parameter bei Dopinguntersuchungen genutzt werden (Gomes et al. 2009, Badoud et al. 2011).

Sulfatierte Steroide können durch die enzymatische Aktivität der Steroidsulfatase (StS) in ihre biologisch aktive Form überführt werden (Reed et al. 2005). Hierbei ist die Möglichkeit zur Transformation abhängig von der Menge der im peripheren Gewebe vorhandenen Enzyme (Labrie et al. 2001). Die im humanen Hoden häufig vorkommenden sulfatierten Steroide sind Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS) und Pregnenolonsulfat (PREGS), (Ruokonen et al. 1972, Ruokonen und Vihko 1974).

Payne et al. (1971) konnten mit ihrer Studie einen Zusammenhang zwischen den sulfatierten Steroiden Dehydroepiandrosteronsulfat und Pregnenolonsulfat sowie dem Serum-Testosteron-Level erkennen. Dieses Ergebnis impliziert, dass sulfatierte Steroide als Vorläufer für aktive Hormone im humanen Hoden fungieren können.

Zwei Jahre später wurde von der gleichen Forschergruppe der Nachweis erbracht, dass Pregnenolonsulfat im humanen Hoden in seine aktive Form überführt wird (Payne et al. 1973). In der genannten Studie wurden interstitielle Zellen von *Tubuli seminiferi* isoliert, so dass die Untersuchungen an beiden Kompartimenten unabhängig voneinander durchgeführt werden konnten. Im Ergebnis zeigte sich die Bereitstellung der aktiven Form Pregnenolon (PREG) und, dass isolierte *Tubuli seminiferi* annähernd neunmal mehr Pregnenolonsulfat spalteten als isolierte interstitielle Zellen.

Ruokonen untersuchte 1978 in einer *In-vitro*-Studie die Synthetisierung von Testosteron aus sulfatierten Steroiden durch Hodenhomogenat. Es konnte gezeigt werden, dass Pregnenolosulfat und Dehydroepiandrosteronsulfat durch Zellen des Hodenhomogenats in Testosteron umgewandelt werden können.

Vor diesem Hintergrund konnte die Relevanz sulfatierter Steroidhormone bzw. von Steroiden nach Abspaltung des Sulfatrestes durch die Steroidsulfatase als mögliche Vorläuferstoffe für die lokale Versorgung mittels Östrogenen und Androgenen diskutiert werden (Hobkirk 1985).

Innerhalb des adulten Hodens stellen Leydigzellen die primäre Quelle testikulärer Androgene und Östrogene dar (Übersicht in Hess 2003). Bereits 1971 wurden von Laatikainen et al. Testosteron, Androstenedion und Dehydroepiandrosteron im Blutplasma der Hodenvene nachgewiesen. Zusätzlich konnte die Arbeitsgruppe den Nachweis erbringen, dass der humane Hoden zur Produktion der sulfatierten Steroide Pregnenolonsulfat, Dehydroepiandrosteronsulfat und Testosteronsulfat fähig ist (Laatikainen et al. 1971).

Im Blutserum finden sich Dehydroepiandrosteronsulfat (Friedrich et al. 2008) und Pregnenolonsulfat (Meloun et al. 2009) mit hohen Konzentrationen, jedoch ist der Weg sulfatierter Steroide in die Zielzellen zu klären.

Die Steroidsulfatase, auch bekannt unter Arylsulfatase C (Ghosh 2007), kann sulfatierte Steroidhormone desulfatieren, in ihre freie Form überführen und somit „reaktivieren“. Auf diesem Weg („*Sulfatase Pathway*“) können lokal aktive Steroidhormone bzw. Vorstufen gebildet werden. Durch die Steroidsulfatase werden ein Steroidsulfat und ein Wassermolekül in ein freies Steroid und einen Sulfatrest umgewandelt. Unter den Substraten der Steroidsulfatase befinden sich Cholesterinsulfat, sowie die sulfatierten Steroidhormone Estronsulfat,

Dehydroepiandrosteronsulfat und Pregnenolonsulfat (Reed et al. 2005, Ghosh 2007, Greven 2008).

Das Krankheitsbild der „*X-linked Ichthyosis*“, einer geschlechtsgebundenen Erbkrankheit (Reed et al. 2005) entsteht durch die Inaktivierung des Steroidsulfatase-Gens (Kent et al. 2008, Kríz et al. 2008, Lykkesfeldt et al. 1991, Traupe und Happle 1983, Epstein et al. 1981). Des Weiteren wird das Fehlen der Steroidsulfatase mit dem gleichzeitigen Auftreten von Geburtsstörungen (Traupe und Happle 1983) sowie Hodenkrebs (Lykkesfeldt et al. 1991, Lykkesfeldt et al. 1983) und Kryptorchismus (Lykkesfeldt et al. 1985, Traupe und Happle 1983) in Verbindung gebracht. Gleichzeitig besteht ein erhöhtes Risiko für „*Attention deficit hyperactivity disorder*“ (*ADHS*), (Kent et al. 2008, Brookes et al. 2008) und Defiziten in der sozialen Kommunikation sowie Autismus (Kent et al. 2008). Das Auftreten von Polymorphismen der Steroidsulfatase wird ebenfalls mit dem Auftreten von „*Attention deficit hyperactivity disorder*“ beschrieben (Stergiakouli et al. 2011).

Die Steroidsulfatase konnte bereits in vielen Organen des adulten Menschen nachgewiesen werden, darunter in Hoden, Uterus, Lunge, Aorta, Schilddrüse, Leber (Reed et al. 2005) sowie im Temporallappen des zentralen Nervensystems (Steckelbroeck et al. 2004).

Des Weiteren wiesen Nakamura et al. (2006) die Steroidsulfatase in einer Prostatakrebs-Zelllinie nach und vermuteten eine wichtige Rolle in der lokalen Bereitstellung von Androgenen und Östrogenen. In der männlichen Reproduktionsbiologie wird von Greven eine Beteiligung der Steroidsulfatase an der Testosteronsynthese diskutiert (Greven 2008). Auf subzellulärer Ebene konnte die Steroidsulfatase im endoplasmatischen Retikulum nachgewiesen werden (Ghosh 2007).

5. „sodium-dependent organic anion transporter“ (SOAT, SLC10A6)

Der „sodium-dependent organic anion transporter“ (SOAT) wurde erstmals 2004 von Geyer et al. (2004) bei der Ratte entdeckt und beschrieben. 2007 klonierten und charakterisierten Geyer et al. den humanen SOAT (Geyer et al. 2007). Aufgrund seiner sehr ähnlichen Genstruktur mit den übrigen Vertretern der „*Solute Carrier Family 10*“ (SLC10), einer Familie von natriumabhängigen Gallensäuretransportern, wurde der SOAT unter der Bezeichnung SLC10A6 in dieser Familie eingeordnet (Geyer et al. 2006).

Mittlerweile beinhaltet die SLC10-Familie sieben Transporter. In den 1990er Jahren wurden mit SLC10A1 (*Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide* (NTCP)) und SLC10A2 (*apical sodium-dependent bile acid transporter* (ASBT)) die ersten beiden Vertreter dieser Familie kloniert. Beide sind Transporter von Gallensäuren. Der SLC10A1 (NTCP) ist in der Leber (Hepatozyten) und dem Pankreas zu finden (Hagenbuch und Meier 1994). Dagegen konnte der SLC10A2 (ASBT) im Ileum, der Niere und in den Zellen der Gallenkanälchen, *Canaliculi biliferi*, nachgewiesen werden (Übersicht in Geyer et al. 2006). Für den SLC10A3 ist noch keine Funktion bekannt, seine Einordnung in die SLC10-Familie geschah aufgrund seiner Sequenzhomogenität zu NCBT und ASBT (Geyer et al. 2006). Dennoch konnte der SLC10A3 bisher in Fibroblasten und T-Lymphozyten experimentell detektiert werden (Übersicht in Geyer et al. 2006). Der SLC10A4 konnte von Splinter et al. (2006) mit einer hohen Expression im zentralen Nervensystem, der Plazenta und im Pankreas nachgewiesen werden. Fernandes et al. (2007) bewiesen die Expression des SLC10A5 in Leber und Nieren bei Menschen, Ratten und Mäusen. Einen weiteren Vertreter der SLC10 Familie stellt der SLC10A7 dar. Der SLC10A7 zeigt Expressionen in Leber, Hoden und Plazenta (Godoy et al. 2007). Im Gegensatz zum

SOAT, für den keine Transkriptionsvariante nachgewiesen werden konnte (Geyer et al. 2007), wurden für den SLC10A7 drei Transkriptionsvarianten ermittelt (Godoy et al. 2007). Die Autoren konnten für den SLC10A7 jedoch keinen Transport von Gallensäuren bzw. von sulfatierten Steroiden wie E1S, DHEAS und PREGS in *Xenopus laevis*-Oozyten bzw. in SLC10A7-HEK293-Zellen zeigen.

Der SLC10A6 wurde von Sreedharan et al. (2011) in allen in der Studie untersuchten peripheren Organen der Ratte nachgewiesen (u.a. ZNS, Niere, Hoden), wohingegen eine Expression in zwei Fischarten (*D. rerio* und *T. rubripes*) bzw. dem Haushuhn (*G. gallus*) nicht nachgewiesen werden konnte.

Der humane SOAT liegt auf Chromosom 4 und wird durch sechs Exone kodiert, die in Region 4q21.3 liegen. Das SOAT-Transkript umfasst 1502 Basenpaare (bp, *GenBank Accession Number* NM_197965.2). Das SOAT-Protein besteht aus 377 Aminosäuren mit einem kalkuliertem Molekulargewicht von 41.2 kDa (Geyer et al. 2007).

Mit Hilfe von Transportstudien in stabil transfizierten SOAT-HEK293 Zellen konnten die Substrate des SOAT identifiziert werden. SOAT transportiert neben der sulfatierten Gallensäure Taurolithocholic-3-sulfat (TLCS) hauptsächlich sulfatierte Steroide wie Estronsulfat (E1S), Pregnenolonsulfat (PREGS) und Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS). Aufgrund seiner Genstruktur ist der SLC10A6 eng mit den Gallensäuretransportern SLC10A1 (NTCP) und besonders mit dem SLC10A2 (ASBT) verwandt (Döring et al. 2012). Der für die untersuchten Vertreter der SLC10-Familie typische Transport von Gallensäuren konnte jedoch für den SOAT nicht nachgewiesen werden (Geyer et al. 2006). Im Gegenteil, Gallensäuren wie Cholat und Taurocholat, die durch ASBT und NTCP transportiert werden, wirken für den SOAT als Transportinhibitoren (Geyer et al. 2006).

Aufgrund des nachgewiesenen Transports der sulfatierten Gallensäure TLCS und seiner Expression in der humanen Plazenta wird eine Aufgabe des SOAT im fetomaternalen Transfer von sulfatierten Gallensäuren vermutet (Geyer et al. 2007).

Zu den Substraten des SOAT gehören ebenfalls die sulfatierten Pyrene 2-Sulfooxymethylpyren (2-SMP) und 4-Sulfooxymethylpyren (4-SMP). Beide Stoffe sind Isomere des 1-Sulfooxymethylpyren (1-SMP), welcher ein Metabolit von 1-Methylperen ist, der in hohem Maße in Zigarettenrauch vorkommt. Für 1-SMP sind kanzerogene Wirkungen bekannt (Glatt 2000). Aufgrund der hohen Expression des SOAT im Hoden wird ein Zusammenhang zwischen der Aufnahme von 2-SMP und 4-SMP durch den SOAT und dem bereits bekannten Zusammenhang von Hodentumoren bei Rauchern vermutet (Srivastava und Kreiger 2004).

SOAT transportiert streng natriumabhängig. Ein Transport in Abwesenheit von Natrium konnte nicht nachgewiesen werden (Geyer et al. 2007). ASBT transportiert ebenfalls nur in Anwesenheit von Natrium, hier werden zwei Natriumionen für ein Gallensäuremolekül bewegt (Weinman et al. 1998). Aufgrund der phylogenetisch engen Verwandtschaft des SOAT zum ASBT wird ein ähnlicher Transportmechanismus für den SOAT vermutet (Geyer et al. 2007).

Mit Hilfe des Programms *TopPred II (KD-scale)* wurde für den SOAT ein Modell errechnet, welches sieben Transmembrandomänen (TMD) aufzeigt. Hierbei liegt das N-terminale Ende extrazellulär, wogegen der C-Terminus intrazellulär zu finden ist (Abb. 5). Die Bestätigung dieser Ergebnisse erfolgte mittels Immunhistochemie. Zu diesem Zweck wurde gegen das N-terminale Ende des SOAT ein Antikörper generiert, der gegen die Aminosäuren zwei bis siebzehn des N-Terminus gerichtet ist. Eingesetzt an SOAT-HEK293 Zellen zeigte der Antikörper die erwartete Färbung. Zur Bestätigung der vermuteten Lage des C-Terminus erfolgte der Einsatz eines

gegen die Aminosäuren 349 bis 364 generierten und ebenfalls an SOAT-HEK293 Zellen eingesetzten Antikörpers. Eine Färbung konnte jedoch erst nachgewiesen werden, nachdem ein SOAT-FLAG-pcDNA 5-Konstrukt in die Zellen transfiziert wurde und die Zellen mittels Triton X-100 permeabilisiert worden waren (Geyer et al. 2007).

Ein Modell mit neun Transmembrandomänen konnte über die durchgeführten Versuche nicht ausgeschlossen werden. Für ASBT und NCBT wurden jedoch ebenfalls sieben Transmembrandomänen-Modelle durch experimentelle Daten bestätigt (Hagenbuch und Meier 1994, Banerjee und Swaan 2006). Aufgrund der hohen Homologität der Sequenzen bei den angeführten Transportern wird für den SOAT ebenfalls ein Modell mit sieben Transmembrandomänen angenommen (Geyer et al. 2007).

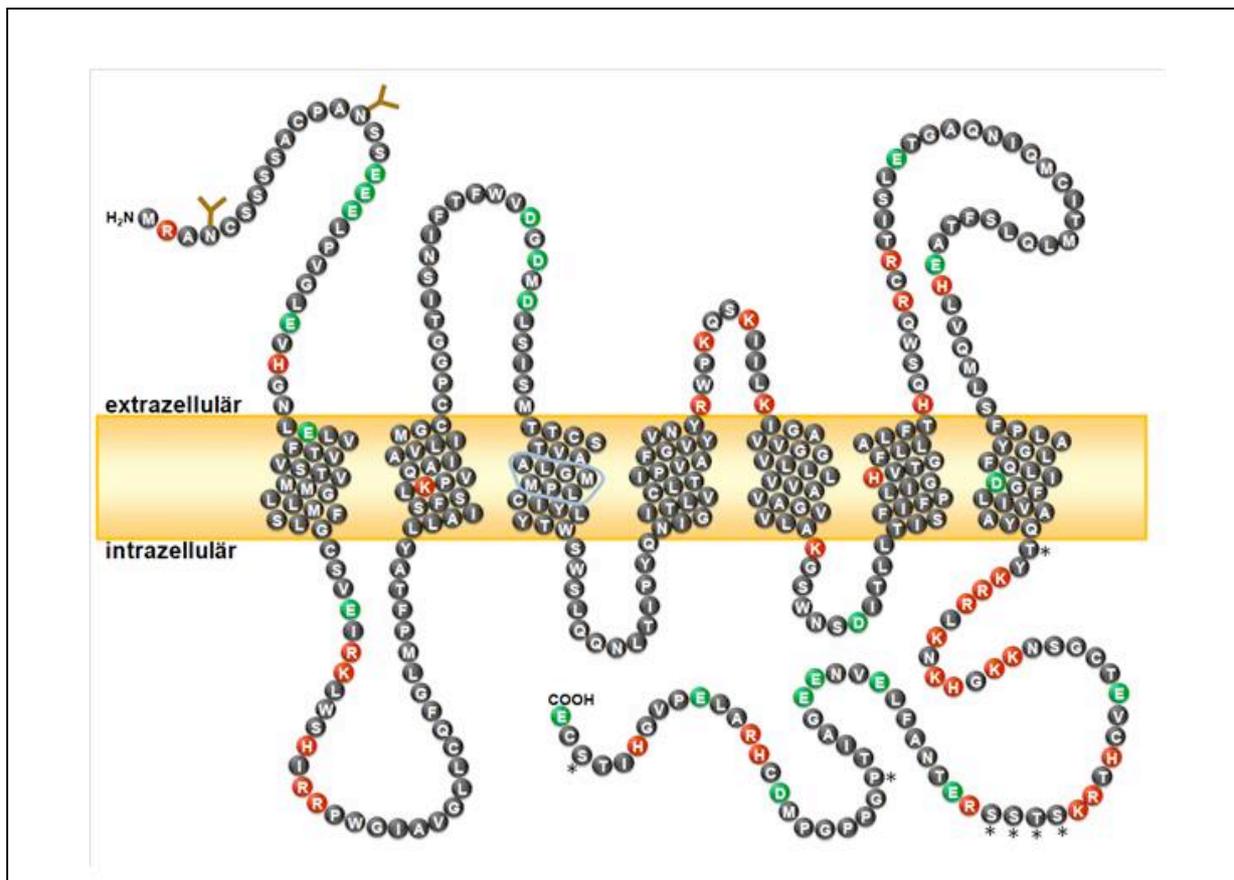


Abb. 5 Transmembrandomänen-Modell des humanen SOAT (aus Döring 2010)

Die TMD wurden nach dem Programm *Toppred (KD scale)* berechnet. Positiv geladene Aminosäuren (K, R, H) sind rot, negativ geladene Aminosäuren (D, E) grün dargestellt. Das Signaturmotiv ALGMMPL der SLC10-Familie ist blau umrandet. Y = potenzielle N-Glykosylierungsstelle; * = potenzielle Phosphorylierungsstelle

Der SOAT konnte in großen Mengen mittels RT-qPCR im Hoden und auch in der Plazenta nachgewiesen werden, sein geringstes Expressionslevel zeigte er im zentralen Nervensystem. Die Expression im Hoden war 678 mal höher als im zentralen Nervensystem (Geyer et al. 2007).

In der Plazenta liegt ebenfalls eine relativ hohe SOAT-Expression vor. Während der Schwangerschaft ist die humane Plazenta der Hauptsyntheseort für Östrogen.

Hierbei sind die Trophoblastzellen auf den Import von C19-Steroiden angewiesen (Strauss et al. 1996, Übersicht in Geyer et al. 2007). Bereits 1999 konnten Ugele und Simon (Ugele und Simon 1999, Übersicht in Geyer et al. 2007) zeigen, dass Dehydroepiandrosteronsulfat in isolierte Zytotrophoblasten aufgenommen wird. Die dabei ermittelten Transportdaten passen zur Transportcharakteristik des SOAT. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der SOAT in den Transport von Dehydroepiandrosteronsulfat in plazentare Trophoblasten involviert ist (Geyer et al. 2007).

Die humane Plazenta ist nach dem ersten Schwangerschaftstrimester ebenfalls der Hauptsyntheseort von Progesteron, welches der Erhaltung der Schwangerschaft dient. Hierbei wird der Vorläufer Pregnenolon von den Trophoblastzellen aus Cholesterol synthetisiert aber auch mittels des Sulfats von Pregnenolon zugeführt. Pregnenolonsulfat wird in hohem Maße in der Nebenniere synthetisiert und über die maternale-fetale Blutzirkulation weitergegeben. Es wird vermutet, dass der SOAT über den Transport von Pregnenolonsulfat in diesen Prozess mit eingebunden ist und somit zur plazentaren Progesteronsynthese beitragen könnte (Geyer et al. 2007).

Die höchste Expression des SOAT wurde im Hoden nachgewiesen. Aufgrund seiner Transportaffinität für Dehydroepiandrosteronsulfat und Pregnenolonsulfat sowie seiner hohen Expression im humanen Hoden im Vergleich zu weiteren Gewebetypen ist der SOAT ein potentieller Kandidat für den Transport sulfatierter Steroide in die Zielzellen des Hodens und kann damit vermutlich zur lokalen Bereitstellung von Androgenen und Östrogenen beitragen (Geyer et al. 2006, 2007).

F. Material und Methoden

1. Probenumfang

Die 56 untersuchten Hodenbiopsien stammen aus der Biopsiebank des Instituts für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie. Patienten wurden aufgrund normo- oder hypogonadotroper Azoospermie und wegen nicht-obstruktiver Azoospermie nach Vasektomie im Center für Reproduktionsmedizin des Universitätsklinikums Münster bzw. in der Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie am Standort Gießen vorstellig. Nach schriftlicher Einverständniserklärung wurde die Hodenbiopsie unter Allgemeinanästhesie vorgenommen (Entscheidung der Ethikkommission 187b/09).

Dr. V. Schumacher, Children`s Hospital, Boston, USA stellte die humane Sertolizell-Linie FS1 zur Verfügung. Die Kultivierung dieser FS1-Zelllinie erfolgte aus Hoden-Gewebe eines Patienten mit Frasier-Syndrom, bei dem nach schriftlicher Einverständniserklärung eine prophylaktische Gonadoektomie durchgeführt wurde (Schumacher et al. 2008).

2. Probengewinnung

2.1. Fixierung in Bouin`scher Lösung

Die Hodenbiopsien wurden in Bouin`scher Fixierlösung für 24 Stunden in Dunkelheit fixiert, im Anschluss in 70% Alkohol gespült und in Paraffin eingebettet (Einbetter EG 1160, Leica).

2.2. Herstellung histologischer Schnitte

2.2.1. Paraffinschnitte

5 µm dicke Paraffinschnitte wurden mit Hilfe des Schlittenmikrotoms SM200R (Leica) gewonnen, in ein 40°C warmes Wasserbad gegeben, wo sie sich auf der

Wasseroberfläche streckten und danach auf SuperFrost Objektträger aufgezogen. Im Anschluss erfolgte das Trocknen der Objektträger bei 37°C im Wärmeschrank und Lagerung bei Raumtemperatur bis zur weiteren Verarbeitung.

3. Histologische Untersuchung der Proben

3.1. Färbung mit Hämatoxylin und Eosin nach Mayer

Bei den Paraffinschnitten erfolgte das Entparaffinieren in drei Waschsritten mit Xylol, mit anschließender Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe. Zur Beurteilung des Spermatogenesestatus wurden die Objektträger mit Hämalaun und Eosin nach dem Protokoll nach Mayer gefärbt. Hierbei werden Zellkerne (basophil) selektiv stark blau angefärbt, während eosinophile Strukturen (Zytoplasma, interstitielles Gewebe) rosa gefärbt werden. Die Schnitte wurden nach der Färbung mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, im Anschluss mit einem Eindeckmedium (VitroClud[®], Langenbrink) beträufelt, mit einem Deckglas abgedeckt und damit dauerhaft haltbar gemacht.

Färbeprotokoll nach Mayer:

- a) Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe mit vergälltem Alkohol (Roth)
 - 1) Schwenken in Xylol für 3 x 10 min
 - 2) Schwenken in 100% Alkohol für 5 min
 - 3) Schwenken in 96% Alkohol für 5 min
 - 4) Schwenken in 80% Alkohol für 5 min
 - 5) Schwenken in 70% Alkohol für 5 min
 - 6) Schwenken in 60% Alkohol für 5 min
 - 7) Schwenken in 50% Alkohol für 5 min
 - 8) Schwenken in Aqua dest. für 5 min

b) Färbung

- 1) Schwenken in gefiltertem Hämalaun nach Mayer für 1 min
- 2) Spülen in fließendem Leitungswasser (Bläuen, erst hier tritt die blaue Farbe des Hämalauns hervor) für 10 min
- 3) Schwenken in gefiltertem Eosin für 5 min
- 4) Kurzes Spülen in Leitungswasser

c) Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe

- 1) Kurzes Spülen in 80% Alkohol
- 2) Kurzes Spülen in 90% Alkohol
- 3) Schwenken in 100% Alkohol für 2 x 2 min
- 4) Schwenken in Xylol für 3 x 10 min

d) Eindecken mit Vitro-Clud[®] (Langenbrinck)

3.2. Immunhistochemie

Die Immunhistochemie beruht auf der Bindung eines Antikörpers an ein Antigen und der nachfolgenden Sichtbarmachung des Proteins im Gewebe. Typische Antigene sind Proteine, Lipo- und Glykoproteine. Der Antikörper ist bei der direkten Immunmarkierung mit einem Detektionssystem gekoppelt, welches sichtbar ist oder sichtbar gemacht werden kann. Bei der indirekten Immunmarkierung bindet an den Primärantikörper ein zweiter Antikörper (Sekundärantikörper), der seinerseits mit einem Marker gekoppelt ist und nach seiner Bindung sichtbar gemacht werden kann (Abb. 6). Hierbei muss beachtet werden, dass der genutzte Sekundärantikörper gegen die Tierspezies gerichtet sein muss, aus der der Primärantikörper stammt.

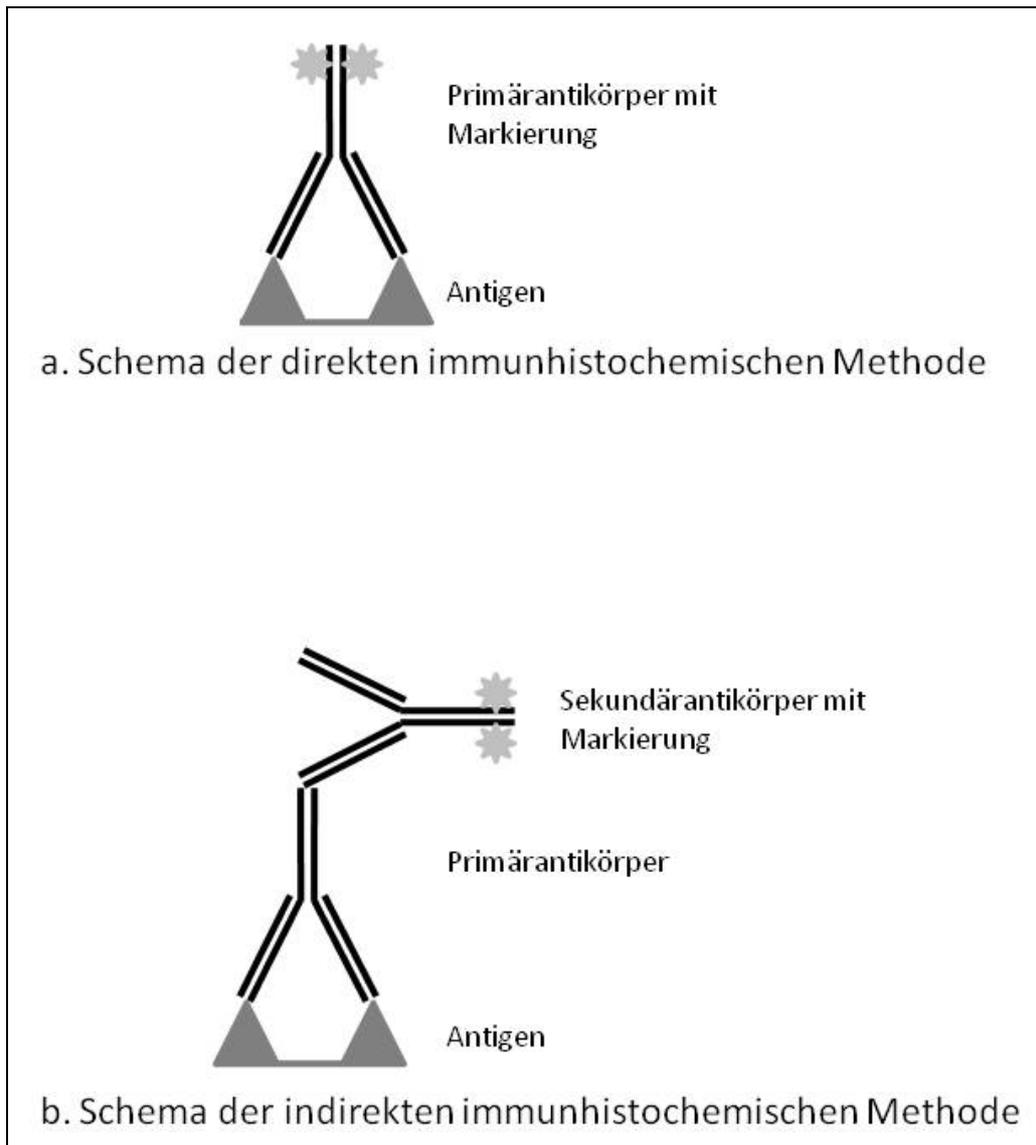


Abb. 6 Funktionsweise der direkten und indirekten Immunhistochemie (modifiziert nach Noll et al. 2000)

3.2.1 Immunhistochemischer Nachweis des SOAT

Die zur Verwendung kommenden Primärantikörper sind in den Tabellen 1 und 2 aufgezeigt.

Tab. 1 SOAT-Antikörper

Name, Firma	Epitop / Peptid	Antikörper aus	Verdünnungs- stufen	Detektions- systeme
SOAT3, Glatt, Potsdam	C-Terminus	Rabbit polyclonal	1:25, 1:50, 1:75, 1:100, 1:125, 1:150	AEC
SOAT3, Glatt, Potsdam, aufgereinigt	C-Terminus	Rabbit polyclonal	1:100	AEC
EP0420488, Eurogentec	AS 2-17, KLH- gekoppelt	Rabbit polyclonal (SA4040 und SA4041)	1:50, 1:100, 1:250, 1:500	AEC, DAB
EP042489, Eurogentec	AS 349-364, KLH- gekoppelt	Rabbit polyclonal (SA4040 und SA4041)	1:50, 1:100, 1:250, 1:500	AEC, DAB
EP072066, Eurogentec	AS 311-326, C-Terminus, KLH- gekoppelt	Rabbit polyklonal (SPY875 und SPY876)	1:50, 1:100, 1:250, 1:500	AEC, DAB, APAAP

Tab. 1 SOAT-Antikörper (1. Fortsetzung)

Name, Firma	Epitop / Peptid	Antikörper aus	Verdünnungs- stufen	Detektions- systeme
EP072067, Eurogentec	AS 250-265, KLH- gekoppelt	Rabbit polyclonal (SPY875 und SPY 876)	1:50, 1:100, 1:250, 1:500	AEC, DAB, APAAP
AbD04769, AbD Serotec Morphosys	AS 15-29	Recombinant monoclonal AB- fragment produced in E.coli	1:100, 1:200, 1:250, 1:400	AEC
AbD04770, AbD Serotec Morphosys	AS 15-29	Recombinant monoclonal AB- fragment produced in E.coli	1:100, 1:200, 1:250, 1:400	AEC
SA6946, Eurogentec		Rabbit polyclonal	1:50, 1:100, 1:200	AEC, APAAP
SA6947, Eurogentec		Rabbit polyclonal	1:50, 1:100, 1:200	AEC, APAAP
SA6947, aufgereinigt, Eurogentec		Rabbit polyclonal	1:50, 1:100, 1:200	AEC, APAAP

Tab. 2 kommerzielle SOAT-Antikörper

Firma, Name, Bestellnummer	Antikörper aus	Epitop	Verdünnungs- stufen	Detektions- systeme
Santa Cruz, (S-12), Sc-136879	Rabbit, polyclonal, affinity purified	N-Terminus (peptide)	1:50, 1:100	AEC
Santa Cruz, (C-13), Sc-136875	Rabbit, polyclonal, affinity purified	C-Terminus (peptide)	1:50, 1:100	AEC
Abnova MaxPab, ABIN531669	Mouse, polyclonal, purified	Full-length, human	1:50, 1:100, 1:150, 1:200	AEC
Sigma Prestige, HPA016662	Rabbit, affinity isolated	C-Terminus	1:10, 1:20, 1:40, 1:60, 1:75, 1:100, 1:200, 1:250, 1:500	AEC, APAAP, DAB, DakoEnvision System
Sigma SAB, 1408505	Mouse, polyclonal	Full-lenght, human	1:50, 1:100, 1:200	AEC

Eine Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper liefert Tabelle 3.

Tab. 3 Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller
goat anti rabbit E0432	1:200	Dako, Glostrup, Denmark
goat anti mouse E0433	1:200	Dako, Glostrup, Denmark
goat anti-rabbit, AP-konjugiert SC-3838	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA
goat anti-rabbit, HRP-konjugiert SC-2004	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA
mouse anti-rabbit M0737	1:50	Dako, Glostrup, Denmark
rabbit anti-mouse Z0259	1:50	Dako, Glostrup, Denmark
goat anti-human, IgF(ab') ₂ : HRP0500-0099	1:500; 1:2000	AbD Serotec, Puchheim, Deutschland

3.2.1.1. Protokoll der Immunhistochemie

Die Immunfärbung an Paraffinschnitten wurde nach dem unten beschriebenen Protokoll durchgeführt. Für jede immunhistochemische Färbung wurde ein histologischer Schnitt als Negativkontrolle mitgeführt. Die Negativkontrolle wurde wie im folgenden Protokoll behandelt, es erfolgte jedoch statt des Primärantikörpers eine Inkubation mit BSA-Blockpuffer. Eine Positivkontrolle kam nicht zur Anwendung, da ein großer Teil der genutzten Antikörper selbst generiert war und bisher nur an Zellkulturen Anwendung gefunden hatte. Bei den kommerziellen Antikörpern,

beispielsweise Sigma Prestige wurde als Referenz u.a. humaner Hoden angeführt (www.proteinatlas.org/ENSG00000145283/normal/testis).

Tag 1

- a) Gewebepreparierung (Entparaffinieren und Rehydrieren der Gewebeschnitte in einer absteigenden Alkoholreihe)
 - 1) 3 x 10 min Xylol
 - 2) 1 x 5 min 100% Alkohol
 - 3) 1 x 5 min 96% Alkohol
 - 4) 1 x 5 min 80% Alkohol
 - 5) 1 x 5 min 70% Alkohol
 - 6) 1 x 5 min 50% Alkohol
 - 7) 1 x 5 min Aqua dest
 - 8) 1 x 5 min Tris-Waschpuffer
- b) Demaskierung der Antikörper-Bindungsstellen mittels Mikrowellenbehandlung
 - 1) Objektträger (OT) in Citratpuffer stellen
 - 2) Bei 800 W in der Mikrowelle erhitzen, bis der Citratpuffer kocht und für 4 min kochen lassen
 - 3) 15 min bei 465 W in der Mikrowelle stehen lassen
 - 4) Für 20 min im Citratpuffer bei Raumtemperatur (RT) stehen lassen
 - 5) 2 x 5 min in Tris-Waschpuffer
- c) Blockierung der endogenen Peroxidase
 - 1) OT in 3% H₂O₂ für 30 min bei RT inkubieren
 - 2) 2 x 5 min in Tris-Waschpuffer
- d) Blockierung unspezifischer Bindungsstellen

- 1) OT in BSA-Blockpuffer für 30 min bei RT inkubieren
- e) Inkubation mit dem Primärantikörper
 - 1) Primärantikörper mit BSA-Blockpuffer verdünnen
 - 2) Umkreisen der Gewebeschnitte mit dem DAKO-Pen
 - 3) 50 µl des verdünnten Primärantikörpers auf die Gewebeschnitte pipettieren
 - 4) Auf die interne Negativkontrolle BSA-Blockpuffer pipettieren
 - 5) Inkubation in feuchter Kammer bei 4°C über Nacht (ÜN)

Tag 2

- a) Inkubation mit dem Sekundärantikörper
 - 1) OT 2 x 5 min in Tris-Waschpuffer
 - 2) Sekundärantikörper mit BSA-Blockpuffer verdünnen
 - 3) 50 µl des verdünnten Sekundärantikörpers auf die Gewebeschnitte pipettieren
 - 4) Inkubation in feuchter Kammer bei RT für 60 min
- b) Inkubation mit Vectastain Elite ABC Standard Kit
 - 1) ABC-Lösung nach Herstellerangaben ansetzen (mindestens 30 min vor Gebrauch): 5 ml Tris-Waschpuffer + 2 Tropfen Lösung A + 2 Tropfen Lösung B
 - 2) Abspülen des Sekundärantikörpers 2 x 5 min in Tris-Waschpuffer
 - 3) Je 1-2 Tropfen ABC-Lösung auf die Gewebeschnitte aufbringen
 - 4) Inkubation in feuchter Kammer für 60 min bei RT
- c) Farbreaktion mit AEC-Kit
 - 1) AEC-Färbelösung nach Herstellerangaben ansetzen: 1 Tropfen AEC auf 300 µl Substratpuffer (im Kit enthalten)

- 2) 50 µl der Färbelösung auf die Gewebeschnitte pipettieren
- 3) Inkubation für 5 min bei RT
- d) Gegenfärbung und Eindecken
 - 1) 3 x 5 min in Aqua dest
 - 2) Ca. 5 Sekunden mit Hämatoxylin gegenfärben
 - 3) Bläuen in Leitungswasser für 5 min
 - 4) OT in Aqua dest
 - 5) Eindecken der OT in Glycerin-Gelatine

4. Molekularbiologische Untersuchung

4.1. Untersuchung von Hodenhomogenat aus Paraffinmaterial

4.1.1. Gewinnung der Proben

Das Schlittenmikrotom wurde mit 70% Alkohol gereinigt und eine sterile Einmalklinge verwendet. Von den in Bouin'scher Lösung fixierten und in Paraffin eingebetteten Hodenbiopsien wurden die ersten fünf Schnitte verworfen. Von der nun sauberen Schnittfläche wurden je nach Größe der Biopsie fünf bis zwanzig Schnitte angefertigt (jeweils 5 µm dick) und in ein steriles 2 ml Eppendorf Gefäß überführt.

4.1.2. Extraktion von mRNA mit dem Qiagen RNeasy FFPE Kit

Zur Extraktion der mRNA wurde das Qiagen RNeasy FFPR Kit verwendet. Zu den gewonnenen Paraffinschnitten wurde 1 ml Xylol hinzugegeben. Dem Durchmischen für 10 sec auf dem Vortexer folgte ein Zentrifugationsschritt bei 14.000 rpm für 2 min und abpipettieren des Überstandes. Überschüssiges Xylol wurde mittels Zugabe von 1 ml 100% Ethanol p.a. (Roth), erneutem Vortexen sowie Zentrifugieren bei 14.000 rpm für 2 min und Abpipettieren des Überstandes entfernt. Zur Verdampfung des Restalkohols wurde die Probe einige Minuten offen bei Raumtemperatur oder bei

bis zu 37°C stehen gelassen. Zugabe von 240 µl PKD-Lyse-Puffer und 10 µl Proteinase K bewirkten die Resuspension des entstandenen Pellets. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 55°C im Wasserbad. Hierbei sollten drei Stunden als Mindestzeit nicht unterschritten und achtzehn Stunden als maximale Inkubationszeit nicht überschritten werden, damit ein Verdau der RNA vermieden wird. Eine folgende fünfzehnminütige Inkubation der Probe bei 80°C diente dem Entfernen der Formaldehyd-Verlinkungen im Gewebe. Durch Zugabe von 500 µl RBC-Puffer und 1200 µl 100% Alkohol sowie Zentrifugieren bei 10.000 rpm für 15 sec wurde die mRNA auf die dem Kit beiliegenden Säulen mit Silikonmembran gebunden. Zugabe von 500 µl RPE-Puffer und Zentrifugation bei 10.000 rpm für 15 sec bzw. 2 min bewirkten, dass Verschmutzungen durch die Membran zentrifugiert und verworfen werden konnten. 15 µl RNase-freies Wasser löste die an die Membran gebundene mRNA. Die nach einem weiteren Zentrifugationsschritt gelöste RNA wurde bei -80°C eingelagert. Die Weiterverarbeitung der extrahierten mRNA erfolgte zu einem späteren Zeitpunkt (s. 4.3.).

4.2. Laser-assistierte Mikrodissektion (*laser-assisted microdissection (LAM)*)

Nach Espina et al. (2006) ermöglicht die LAM eine isolierte Gewinnung unterschiedlicher Zellpopulationen aus einem heterogenen Gewebe. Hierzu wurden das *PALM MicroBean System* mit der *PALM Robo Software* (Zeiss) sowie spezielle, mit einer Membran beschichtete Objektträger (MembranSlide 1.0 PEN, Zeiss) genutzt. Nach Markierung gewünschter Bereiche innerhalb eines histologischen Schnittes wurden durch den Laserstrahl Gewebe und Membran miteinander verschmolzen. Im Anschluss konnte mittels LMPC-Technik (*laser microdissection and pressure catapulting*) das Gewebestück auf der Membran aus dem

Gewebeverband gelöst, herauskatapultiert und im Deckel eines Probengefäßes aufgefangen werden (Abb. 7).

4.2.1. Herstellung der Präparate

Für die LAM wurden die P.A.L.M.-Objektträger (MembranSlide 1.0 PEN, Zeiss) vor der Verwendung 30 min mit UV-Licht bestrahlt, um eine bessere Haftung des Gewebes an der Membran zu erreichen. Die Reinigung des Mikrotoms erfolgte mit 70% Alkohol und eine sterile Einmalklinge kam zur Verwendung. Ein Wasserbad wurde ebenfalls mit 70% Alkohol gereinigt und das eingefüllte sterile Aqua bidest auf 42°C erhitzt. Nach dem Schneiden mehrerer 5 µm dicke Paraffinschnitte der jeweiligen Hodenbiopsie erfolgte das Strecken der Paraffinschnitte im erwärmten Wasserbad. Die gestreckten Schnitte wurden dann auf die vorbereiteten P.A.L.M.-Objektträger gezogen, die Objektträger eine Stunde bei 42°C getrocknet und in einer sterilen und luftdicht geschlossenen Küvette bei Raumtemperatur für maximal 1 Woche gelagert.

Durchführung der Entparaffinierung und Färbung vor der LAM erfolgte nach folgendem Protokoll:

- a) Entparaffinierung mit absteigender Alkoholreihe mit Xylol und Ethanol p.a. mittels Auftropfen
 - 1) 2 x 2min Xylol reinst
 - 2) 1 min 100% Alkohol p.a. in DEPC
 - 3) 1 min 96% Alkohol p.a. in DEPC
 - 4) 1 min 70% Alkohol p.a. in DEPC
 - 5) 1 min DEPC

b) Färbung des Schnittes

- 1) Auftropfen von sterilfiltriertem Hämalaun für 25-30 sec
- 2) Abspülen mit DEPC und bläuen für 30 sec mit DEPC

c) Dehydrierung des Gewebes durch aufsteigende Alkoholreihe mit Alkohol p.a. mittels Auftropfen

- 1) 10 sec 70% Alkohol p.a. in DEPC
- 2) 10 sec 96% Alkohol p.a. in DEPC
- 3) 10 sec 100% Alkohol p.a. in DEPC

Die Objektträger wurden in einem sterilen Falcon zum Institut für Human-Anatomie der JLU Gießen zur Durchführung der LAM transportiert.

4.2.2. Durchführung der Laser-assisierten Mikrodissektion

Nach der Bewertung der Morphologie des jeweiligen Gewebeschnittes wurden die gewünschten Bereiche markiert, mittels Laserstrahl mit der Membran des Objektträgers verschmolzen, ausgeschnitten und im Anschluss in den Deckel eines Probengefäßes katapultiert (Abb. 7). Mit dieser Technik war es möglich, isolierte *Tubuli seminiferi* (mind. 60) und interstitielles Gewebe (mind. 20 Interstitiumsanschnitte) getrennt voneinander zu gewinnen. In den Deckel des jeweiligen Probengefäßes wurden 2,5 µl Mineralöl (Sigma) pipettiert, damit die heraufkatapultierten Gewebestücke besser im Deckel haften blieben.

Bei der Gewinnung von Gewebe aus Paraffinschnitten wurden die Probengefäße bei Raumtemperatur bis zur weiteren Behandlung belassen.

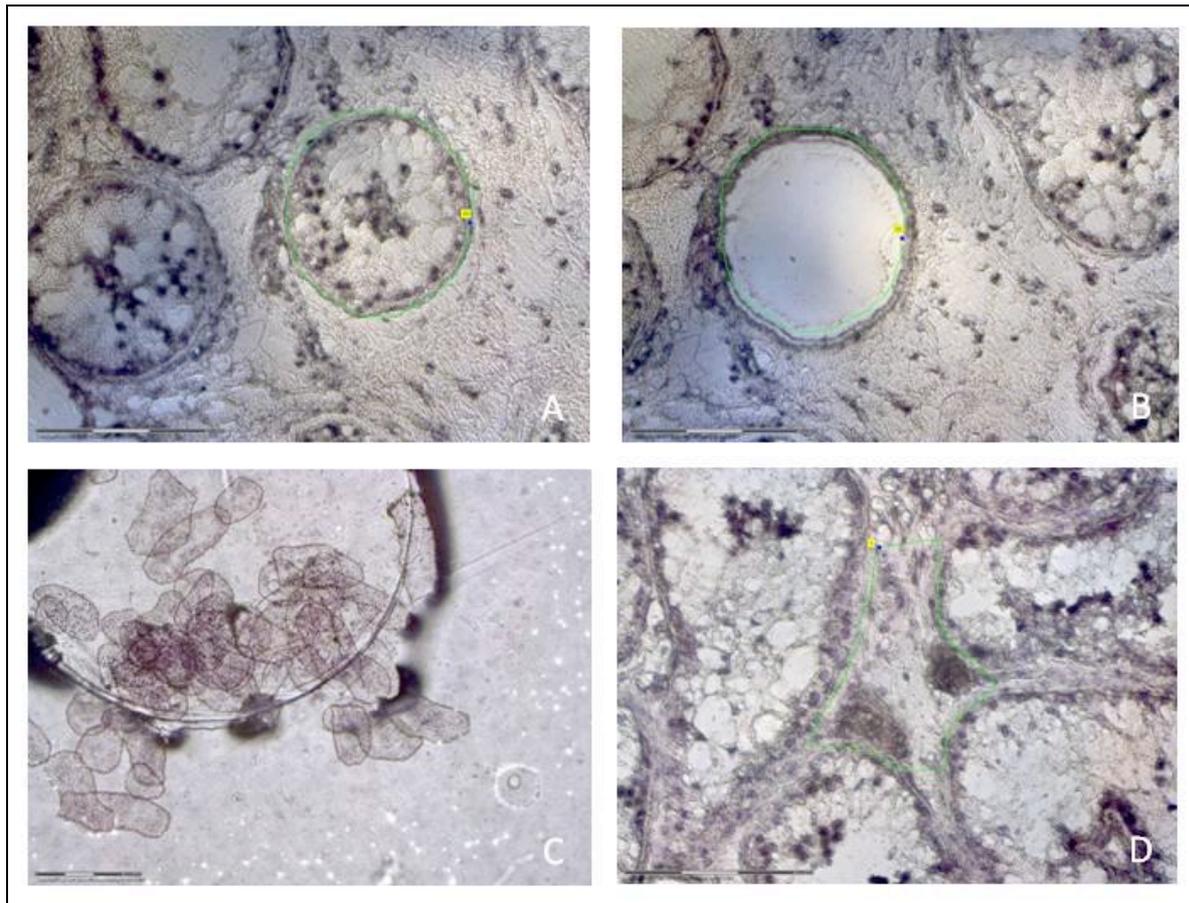


Abb. 7 Darstellung der Laser-assistierten Mikrodissektion
A Markierung des Keimtubulus (Spermatozytenarrest auf Höhe der primären Spermatozyten)
B Ausgeschnittenes Gewebe
C Katapultiertes Gewebe im Deckel des Tubes
D Markierung eines Interstitiumanschnittes

4.2.3. Extraktion von mRNA aus Gewebeproben nach LAM

Die Weiterverarbeitung von Gewebeproben aus FFPE-Material wurde mit dem RNeasy FFPE Kit (Qiagen) durchgeführt (s. 4.1.2).

4.3. DNase-Behandlung

Mittels Behandlung mit DNase I (*recombinant, RNase-free*, Roche) wurde die noch in der Probe vorhandene genomische DNA (gDNA) verdaut. Der zugesetzte RNase-Inhibitor sollte dabei den gleichzeitigen Verdau der mRNA verhindern.

1x Ansatz	Reagenz	Konzentration	Hersteller
2 µl	DNase I-Puffer		Roche
1 µl	DNase I	10 U/L	Roche
0,25 µl	RNAse-Inhibitor	40 U/L	Ambion

Zu 3,25 µl DNase-Mix wurden 6,65 µl RNA hinzu gegeben und gut gemischt.

Protokoll für den DNase-Verdau im T3-Thermocycler (Biometra):

- 1) 25 min bei 37°C DNase arbeitet
- 2) 10 min bei 75°C DNase wird deaktiviert
- 3) Abkühlen auf 4°C im Cycler

Nach dem DNase-Verdau wurde die mRNA sofort weiterverarbeitet.

4.4. Reverse Transkription (RT)

Bei der reversen Transkription (RT) wird aus der zuvor extrahierten und mit DNase behandelten mRNA, *complimentary DNA* (cDNA) synthetisiert. Diese cDNA wird dann in der RT-PCR und TaqMan[®]-RT-qPCR eingesetzt, und es kann ermittelt werden, ob die zu untersuchenden Gene in den Proben exprimiert werden.

Hierbei muss bei der reversen Transkription der behandelten RNA ein dNTP-Mix (enthält die Desoxynukleotidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP), das Enzym reverse Transkriptase (RT) und Random Hexamer-Primer als Startermoleküle für das Enzym zugegeben werden.

MATERIAL UND METHODEN

Mastermix für einen einfachen Ansatz:

1x Ansatz	Reagenz	Konzentration	Hersteller
2,2 µl	MgCl ₂	25 mM	Applied Biosystems
1,1 µl	10x PCR-Gold-Puffer	10 mM	Applied Biosystems
4,4 µl	dNTP-Mix	10 mM	Applied Biosystems
0,55 µl	Random-Hexamers	50 mM	Applied Biosystems
0,55 µl	RNase-Inhibitor	20 U/L	Applied Biosystems
0,55 µl	MultiScribe RT	5 U/L	Applied Biosystems

Zu 9,35 µl des Reverse-Transkriptase-Mixes wurden 1,65 µl der DNase-behandelten mRNA zugegeben und die Lösungen gut gemischt.

Protokoll für die reverse Transkription im Thermocycler:

- 1) 8 min bei 21°C Anlagerung der Random Hexamers
- 2) 15 min bei 42°C Transkription findet statt
- 3) 5 min bei 99°C Inaktivierung der Reversen Transkriptase
- 4) 5 min bei 5°C Abkühlung
- 5) Abkühlen auf 4°C im Cycler

Aufbewahrung der cDNA bis zur weiteren Verwendung bei -20°C.

4.5. PCR (Polymerasekettenreaktion, *polymerase chain reaction*)

Mittels PCR kann DNA in vitro vervielfältigt werden. Hierzu wird das Enzym DNA-abhängige DNA-Polymerase benötigt, welches den durch die verwendeten Primer bestimmten DNA-Abschnitt amplifiziert.

Der DNA-Doppelstrang wird bei 95°C aufgetrennt. Die Primer lagern sich an (hierbei richtet sich das Temperaturoptimum nach der Basenzusammensetzung der Primer) und bei 72°C erfolgt die Vervielfältigung des DNA-Stranges. Nach der Amplifikation startet der Zyklus erneut. Die Produkte der bereits gelaufenen Zyklen bilden die Ausgangsstoffe der weiteren Zyklen. Somit ist eine exponentielle Vervielfältigung möglich (Abb. 8).

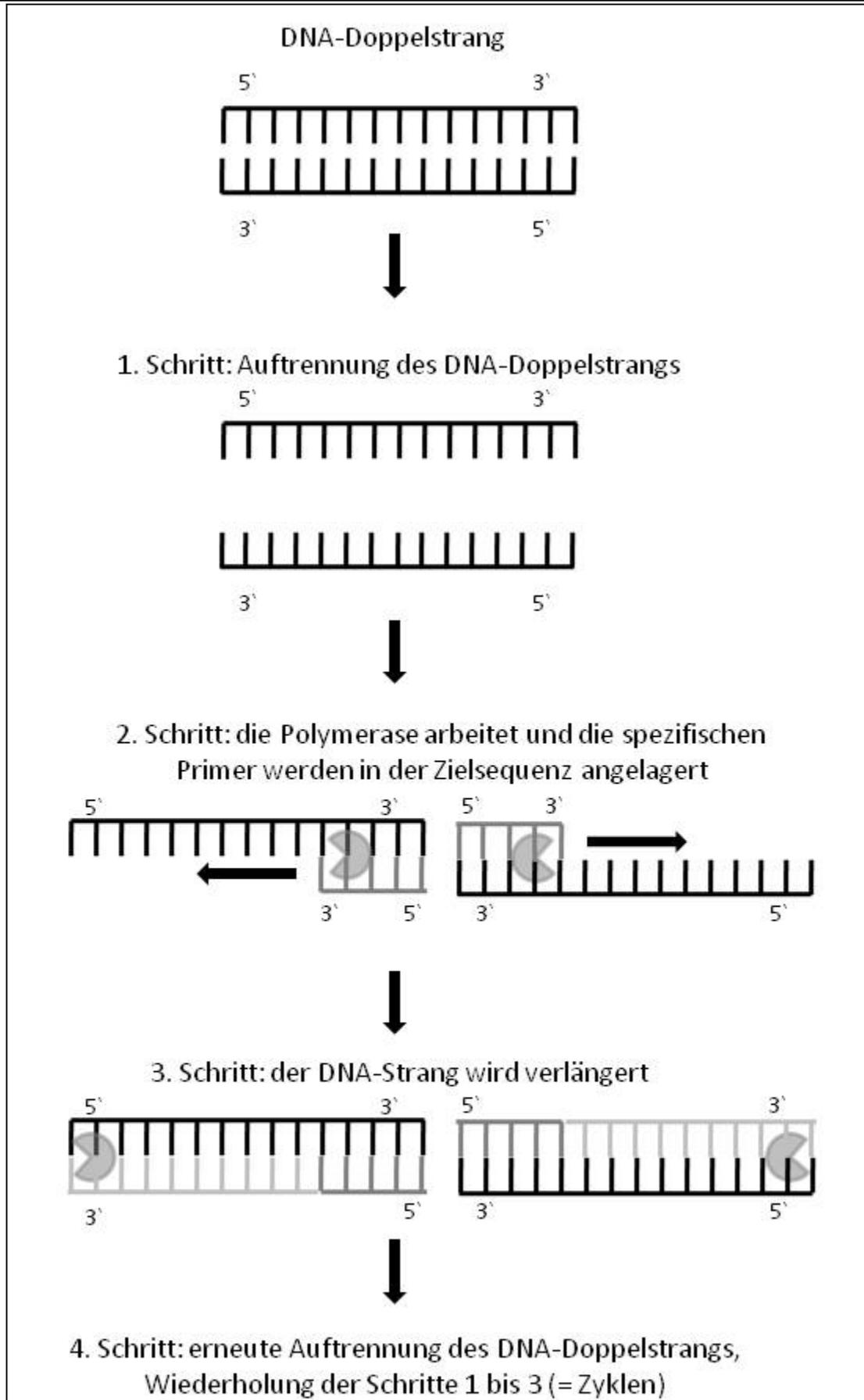


Abb. 8 Funktionsweise der PCR (modifiziert nach Fietz 2011)

4.5.1. Durchführung der RT-PCR

In der RT-PCR wurde die GOLDAmplitaq® Polymerase (Applied Biosystems) verwendet. Die eingesetzten Primer wurden mit Hilfe des Programms OligoExplorer bestimmt und von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert. Als Primer für den SOAT wurde ein exon-übergreifendes Primerpaar gesucht, da diese ausschließlich die gespleißte mRNA amplifizieren und somit eine Verunreinigung der PCR-Produkte durch genomische DNA ausgeschlossen werden kann.

Tab. 4 Primer für die RT-PCR

Primer	RefSeq	Primersequenz	Exon	Produkt
SOAT	NM_197965.2	for 5`- ACCTGGTCCTGGAGTCTTC-3` rev 5`-GAATGGTCAGGCACACAAG-3`	2 - 3	79 bp
β-Aktin	NM_001101.3	for 5`- GCGAGAAGATGACCCAGATC -3` rev 5`- CGTACAGGGATAGCACAGC -3`	-	84 bp

Einfacher Ansatz für den Prä-Mix:

1x Ansatz	Reagenz	Konzentration	Hersteller
2 µl	MgCl ₂	25 mM	Applied Biosystems
4 µl	10x PCR Puffer	10 mM	Applied Biosystems
32,75 µl	Steriles AqBidest		

Einfacher Ansatz für den Primer-Mix:

1x Ansatz	Reagenz	Konzentration	Hersteller
38,75 µl	Prä-Mix		
0,5 µl	for Primer	10 pM	Eurofins MWG
0,5 µl	rev Primer	10 pM	Eurofins MWG
0,25 µl	GOLDAmplitaq [®]		Applied Biosystems

Bei einem einfachen Ansatz von 25 µl wurden 20 µl Primer-Mix noch 5 µl cDNA hinzugegeben. Als Positivkontrolle für die RT-PCR wurde cDNA eines Patienten mit normaler Spermatogenese in einem Volumen von 1 µl und 4 µl sterilem Aqua bidest eingesetzt. Als interne Kontrolle für die Proben aus LAM-Material wurden die RT-PCRs zusätzlich mit β -Aktin durchgeführt. β -Aktin ist als Strukturprotein Bestandteil des Zytoskeletts (Horn et al. 2003) und zudem ist die Expression diese Gens unabhängig von der histologischen Diagnose der zu untersuchenden Hodenbiopsie (Ratzenböck 2014). In der Negativkontrolle (NTC, *no template control*) wurde die cDNA durch steriles Aqua bidest ersetzt. Die Lösungen wurden beim Pipettieren gut gemischt, kurz an zentrifugiert und im Cyclor inkubiert.

Protokoll für die RT-PCR im Thermocycler:

- 1) 5 min bei 95°C Aktivierung der Polymerase
- 2) 30 sec bei 95°C Auftrennung der DNA-Doppelhelix
- 3) 30 sec bei 57°C Anlagerung der Primer
- 4) 30 sec bei 72°C Amplifikation des DNA-Stranges

- 5) 7 min bei 72°C endgültige Amplifikation
- 6) Abkühlen auf 4°C im Cyclor

Die Schritte 2 bis 4 wurden 39mal wiederholt. Die Lagerung der RT-PCR-Produkte erfolgte bei -20°C bis zur weiteren Verwendung.

4.5.2. Agarosegelelektrophorese

Die visuelle Darstellung der RT-PCR-Produkte erfolgte auf einem 2%igen Agarosegel mit beigefügtem Farbstoff SYBR[®] Green I. Zur Herstellung wurde 1 g Agarose FineRes mit 50 ml 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht und nach dem Abkühlen auf ca. 60°C, 5 µl SYBR[®] Green I beigemischt. Das noch flüssige Gel wurde in einen entsprechenden Gelträger gegossen.

Nach dem Aushärten des Gels wurde es in die passende Elektrophoresekammer gelegt und die Kammer mit 10x TAE-Laufpuffer gefüllt, das Gel hierbei mit Pufferlösung bedeckt. Als Marker kam ein 50 bp-Marker, versetzt mit 2 µl Ladepuffer und 8 µl Aqua bidest zum Einsatz. Die einzelnen Geltaschen (Slots) wurden mit 3 µl Ladepuffer und 12 µl PCR-Produkt befüllt. Mit Hilfe des Ladepuffers (*loading buffer*) erhöht sich die Dichte des Gemischs und die RT-PCR-Produkte sinken beim Pipettieren in die Slots. Die Auftrennung fand bei 125 V in 30 min statt. Nach der Elektrophorese wurde das Ergebnis mittels Transilluminator UVsolo (Biometra) und Software UVIdoc (Biometra) dokumentiert. Die Lagerung restlicher RT-PCR-Produkte erfolgte bei -20°C.

4.5.3. Aufreinigung von Produkten aus der RT-PCR

Produkte aus der RT-PCR von jedem eingesetzten Primerpaar mit der internen Positivkontrolle, cDNA eines Patienten mit normaler Spermatogenese, wurde zur

Sequenzierung zu SRD (Scientific Research and Development GmbH, Bad Homburg) gegeben. Für die Aufreinigung des einzusendenden RT-PCR-Produktes wurde das peqGOLD MicroSpin Cycle Pure Kit (PEQlab) verwendet. RT-PCR-Produkt und dem Kit beiliegender CP-Puffer wurden im Verhältnis 1:10 gemischt, auf die mitgelieferte Zentrifugensäule pipettiert und 2 min bei 10.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde verworfen, die Zentrifugensäule auf ein neues 1,5 ml Tube gesteckt und die gebundene DNA mit 10-20 µl DNA-Elutionspuffer eluiert. Der Elutionspuffer wurde direkt auf die Säule pipettiert, für 1 bis 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert.

4.6. Quantitative PCR (qPCR, real-time PCR)

Die real-time PCR ist eine Methode zur absoluten oder relativen Quantifizierung von Nukleinsäuren. Bei der qPCR wird nach jedem PCR-Zyklus die Fluoreszenz gemessen, die proportional zum gebildeten PCR-Produkt ist.

Bei den durchgeführten Versuchen wurden TaqMan[®]-Sonden von Applied Biosystems eingesetzt. Hierbei werden Zielsequenz-spezifische Sondenpaare benutzt, bei denen Reporter (Farbstoff Fam) und Quencher auf demselben Oligonukleotid am 5'- und am 3'-Ende sitzen. Der Quencher unterdrückt durch die räumliche Nähe die Fluoreszenz des Reporters. Bei der PCR-Reaktion werden durch die Exonuklease-Aktivität der Polymerase Reporter und Quencher voneinander getrennt. Der abgespaltene Reporter ist frei und kann fluoreszieren. Je mehr Zielsequenz-spezifische DNA synthetisiert wird, desto mehr Reporter-Moleküle werden freigesetzt, und die Signalstärke steigt an (Abb. 9).

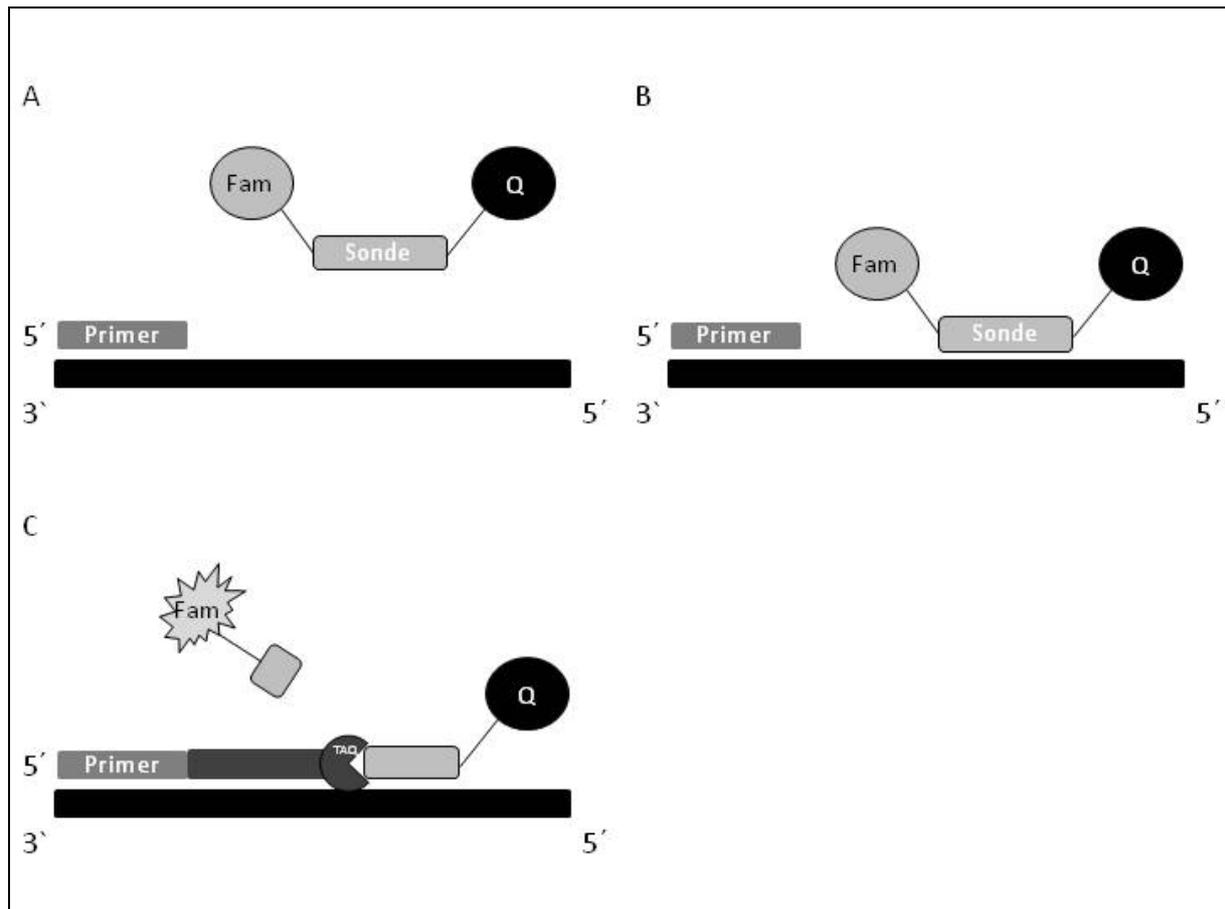


Abb. 9 Funktionsweise der TaqMan[®]-qPCR (modifiziert nach Döring 2010)

A Der DNA-Doppelstrang wird bei der Denaturierung getrennt. Ein Zielsequenz-spezifisches Sondenpaar hat sich noch nicht an die Zielsequenz angelagert, der Quencher (Q) unterdrückt durch die räumliche Nähe die Fluoreszenz des Reporters (Farbstoff Fam).

B Primer und Sonde lagern sich an die Zielsequenz an.

C Der Primer wird verlängert und die Polymerase kommt an das 5'-Ende der angelagerten Sonde. Hier wird durch die 5'->3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase die Sonde abgebaut, der Farbstoff Fam entfernt sich vom Quencher. Es besteht keine räumliche Nähe mehr zwischen Quencher und Reporter, durch Anregung des Farbstoffes kann dieser nun detektiert werden.

4.6.1. Zielgene

Auch bei der Nutzung des TaqMan[®]-Systems wurden exon-übergreifende Sonden ausgewählt.

Tab. 5 Primer der TaqMan[®]-RT-qPCR

Zielgen	TaqMan [®] Assay	Exongrenze	Produkt
SOAT	Hs01399354_m1	5-6	119
β-Aktin	Hs00357333_g1	1-2	77
GAPDH	Hs02758991_g1	7-8	93

Der pipettierte Ansatz für die TaqMan[®]-RT-qPCR im einfachen Ansatz:

1x Ansatz	Reagenz	Hersteller
1 µl	TaqMan [®] Assay	Applied Biosystems
10 µ	TaqMan [®] Master Mix	Applied Biosystems
2 µl	cDNA	
7 µl	Steriles Aqua bidest	

Um die Reaktionseffizienz der Assays zu bestimmen, wurde eine Verdünnungsreihe pipettiert. Hierzu wurde die cDNA eines Patienten mit normaler Spermatogenese in einer absteigenden dekadischen Reihe verdünnt (unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1000).

Die Proben wurden im dreifachen Ansatz auf eine 96 Well-Platte pipettiert und die Platte mit einem Microseal verschlossen. Die TaqMan[®]-RT-qPCR lief im Cycler (CFX96, BioRad) nach folgendem Programm ab:

- 1) 10 min bei 95°C
- 2) 15 sec bei 95°C
- 3) 1 min bei 60°C

Die Schritte 2 und 3 wurden 39mal wiederholt. Die Auswertung erfolgte mit der CFX Manager[®]-Software (BioRad).

4.6.2. Durchführung der TaqMan[®]-RT-qPCR

Die TaqMan[®]-RT-qPCR wurde für insgesamt 39 Patienten mit cDNA aus Hodenhomogenat durchgeführt.

1x Ansatz	Reagenz	Hersteller
1 µl	TaqMan [®] Assay	Applied Biosystems
10 µl	TaqMan [®] Master Mix	Applied Biosystems
3 µl	cDNA	
6 µl	Steriles Aqua bidest	

Bei den Homogenaten aus Hodenbiopsien wurden sehr unterschiedliche Mengen an RNA gewonnen, so dass in der TaqMan[®]-RT-qPCR generell jeweils 3 µl cDNA

eingesetzt wurden. Diese wurden mit 17 µl Mix gemischt und in dreifachem Ansatz in 96 Well-Platten pipettiert. Diese wurden anschließend mit einem Microseal verschlossen und im Cyclyer bei folgendem Program inkubiert:

- 1) 10 min bei 95°C
- 2) 15 sec bei 95°C
- 3) 1 min bei 60°C

Die Schritte 2 und 3 wurden 39mal wiederholt.

4.6.3. Auswertung der TaqMan[®]-RT-qPCR

Die Auswertung der TaqMan[®]-RT-qPCR erfolgte nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode mit Hilfe der CFX Manager[®]-Software der Firma BioRad.

Der C_t -Wert (*Threshold cycle*) bezeichnet den Zyklus der RT-qPCR, bei dem die gemessene Fluoreszenz den *Threshold* (= Schwellenwert) überschritten hat. Hierbei wird der *Threshold* von der Software derart berechnet, dass der Bereich angezeigt wird, in dem die Amplifikation exponentiell stattgefunden hat.

Für die Berechnung der relativen Genexpression müssen die ΔC_t -Werte des Zielgens (GOI = *gene of interest*) und des Referenzgens (Ref) errechnet werden (Abb. 10):

$$\Delta C(t)_{GOI} = E_{GOI}^{(C_{T(min)} - C_T)}$$

Abb. 10 ΔC_t (modifiziert nach Fietz 2011)

E zeigt hier die Effizienz des Primersystems. Ist $E = 2$ bedeutet dies eine Effizienz von 100%, d.h., dass es bei jedem PCR-Zyklus zu einer Verdopplung der DNA-

Menge kommt. Die Effizienzen der eingesetzten TaqMan[®]-Sonden wurden durch die durchgeführte Standardverdünnung bestimmt und konnten in der CFX Manager[®]-Software eingerechnet werden, um Effizienzunterschiede zwischen den einzelnen TaqMan[®]-Sonden auszugleichen.

Mit $C_{T(\min)}$ wird der Wert mit dem geringsten Ct-Wert des Zielgens bezeichnet.

Es wurden zwei Referenzgene, β -Aktin und GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase), in der TaqMan[®]-RT-qPCR eingesetzt, hier musste nun ein Normalisierungsfaktor errechnet werden.

Für die normalisierte Expression des Zielgens musste der ΔC_t -Wert des Zielgens mit dem ΔC_t des Referenzgens nach folgender Formel verrechnet werden (Abb. 11):

$$\Delta\Delta C(t)_{GOI} = \frac{\Delta C(t)_{GOI}}{(\Delta C(t)_{Ref1} \times \Delta C(t)_{Ref2} \times \dots \times \Delta C(t)_{Refn})^{\frac{1}{n}}}$$

Abb. 11 $\Delta\Delta C t$ (modifiziert nach Fietz 2011)

5. In-situ-Hybridisierung

Mittels *In-situ*-Hybridisierung kann eine direkte Aussage über die zelluläre Lokalisation von Nukleinsäuren in einem Gewebeschnitt getroffen werden. Hierzu muss sich ein spezifisches Nukleinsäurefragment (Sonde) an die komplementäre Nukleinsäuresequenz des Gewebeschnitts anlagern. An die Sonde ist ein Marker gekoppelt, bei Bindung der Sonde im Gewebe kann der Marker sichtbar gemacht werden und somit ist die Zielsequenz innerhalb des Gewebes detektierbar (Abb. 12).

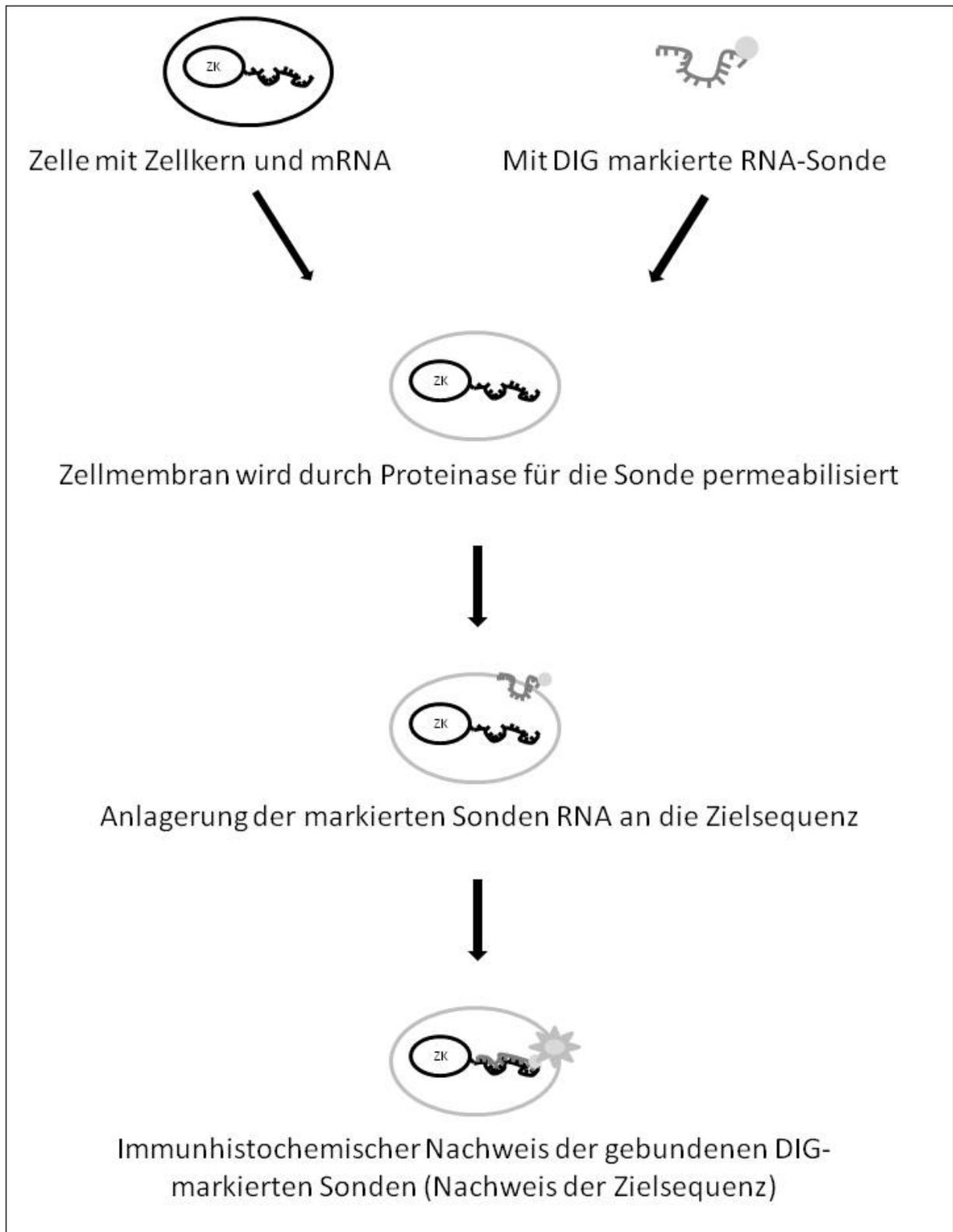


Abb. 12 Funktionsweise der *In-situ*-Hybridisierung (modifiziert nach Noll et al. 2000)

5.1. Herstellung der Sonden

In dieser Arbeit wurde eine zu SOAT komplementäre „*antisense*“-Sonde hergestellt, die die entsprechende mRNA in der Zelle detektiert.

Für die Sondenherstellung wurde cDNA aus einer humanen Hodenbiopsie mit normaler Spermatogenese verwendet. Die eingesetzten Primer, die ein 330bp langes Fragment detektieren, wurden von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert.

Tab. 6 Primer für SOAT-Sonde (*In-situ*-Hybridisierung)

Primer	RefSeq	Primersequenz	Exon	Produkt
SOAT	NM_197965.2	for 5`- CTGCTGGCACTTTTTACCC -3` rev 5`- GGCACCTTCTTCATTACCC -3`	4-6	330 bp

Die RT-PCR-Produkte wurden in einem 2%-Agarose-Gel sichtbar gemacht, mittels peqGOLD MicroSpin Cycle Pure Kit aufgereinigt und bei SRD sequenziert.

5.2. Klonierung der RT-PCR-Produkte

Zur Herstellung der Sonden für die *In-situ*-Hybridisierung wurde die Methode des Klonierens genutzt. Hierbei wird DNA (z.B. ein RT-PCR-Produkt) zuerst in ein Plasmid und darin in ein Bakterium eingeschleust. Die Bakterien vermehren dann innerhalb ihres normalen Zellzyklus das Plasmid und die darin enthaltene DNA.

5.2.1. Klonierung mit TOPO TA-Cloning® Kit

Ein A-tailing der Produkte der RT-PCR musste nicht durchgeführt werden, da die verwendete GoldAmplitaq® Polymerase den RT-PCR-Produkten bereits einen

MATERIAL UND METHODEN

A-Überhang zufügte. Für die Klonierung wurde das TOPO TA Cloning[®] Kit mit pCR[®]II-TOPO[®]TA-Vektor (Abb. 13) und OneShot[®]TOP10 Chemically Competent E.coli genutzt.

Der Ansatz für die Klonierungsreaktion setzte sich im einfachen Ansatz zusammen aus:

1x Ansatz	Reagenz	Hersteller
2 µl	RT-PCR-Produkt	
1 µl	Salt Solution	Invitrogen TOPO TA Cloning [®] Kit
2 µl	Steriles Bidest	
1 µl	pCR [®] II-TOPO [®] TA- Vector	Invitrogen TOPO TA Cloning [®] Kit

Die Proben wurden behutsam gemischt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden 2 µl der TOPO Cloning Reaction in ein Fläschchen OneShot[®]TOP 10 Chemically Competent E.coli gegeben, behutsam gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für eine Minute, in der die Bakterien dazu gebracht wurden, die Plasmide aufzunehmen und sofort weitere zwei Minuten Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von 250 µl S.O.C.-Medium (Invitrogen) bei Raumtemperatur wurden die Bakterien für eine Stunde horizontal bei 200 rpm geschüttelt.

Jeweils 50 µl und 100 µl der Reaktion wurden auf bereits vorbereitete und vorgewärmte LBamp-Platten mit Ampicillin, XGal (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranosid) und IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) mittels eines

sterilen Spatels aufgetragen. Der folgende Inkubationsschritt erfolgte im Brutschrank bei 37°C über Nacht, wobei die Platten auf dem Deckel liegend inkubiert wurden.

Um eine eindeutige Blau-/Weiß-Differenzierung durchführen zu können, war es nötig, die Platten am nächsten Tag für zwei Stunden in den Kühlschrank zu verbringen. Für eine weitere Verwendung der Kolonien mussten diese wieder in Flüssigkultur überführt werden. Hierfür wurde mittels einer Pipettenspitze jeweils eine weiße Kolonie von der Platte abgenommen und samt Pipettenspitze in ein steriles Glasröhrchen mit 4 ml LB-Medium mit 1 µg/µl Ampicillin überführt. Die Glasröhrchen wurden über Nacht bei 200 rpm und 37°C in den Schüttler gestellt, wobei ein Glasröhrchen mit 4 ml LB-Medium und ohne Kolonien als interne Negativkontrolle mitgeführt wurde.

5.2.1.1. Blau/Weiß-Differenzierung

Durch die Blau-/Weiß-Differenzierung ist es möglich, zwischen den Bakterienkolonien zu unterscheiden, ob diese den Vektor mit (weiß) oder ohne (blau) Insert aufgenommen haben.

Den LB-Agarplatten wurde XGal und IPTG zugefügt. Auf dem Vektor ist die Information für das Enzym β -Galaktosidase kodiert, welches das in der LB-Agarplatte enthaltene XGal zu dem gelben Zwischenprodukt 5-Brom-4-chlor-Indoxyl abbaut. Dieses oxidiert mit Luftsauerstoff zu blauem 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo. Auf der Platte erscheinende blaue Kolonien haben demnach das Insert nicht aufgenommen. Bei weiß erscheinenden Kolonien hingegen ist das Insert aufgenommen. Hier wird das Enzym β -Galaktosidase nicht mehr exprimiert, als Folge daraus kann XGal nicht mehr abgebaut werden.

5.2.2. Plasmidextraktion mit QIAprep Spin Miniprep Kit

Bei den inkubierten Flüssigkulturen wurde die optische Dichte bestimmt, wobei die interne Negativkontrolle weiterhin als klares Medium vorliegen musste. Für die Plasmidextraktion wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit No. 27104 genutzt. Die Durchführung sämtlicher folgender Schritte erfolgte bei Raumtemperatur.

2 ml der über Nacht inkubierten Flüssigkulturen wurden in ein 2 ml Eppendorf-Tube überführt, bei 9000 rpm für 3 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das verbliebene Bakterien-Pellet wurde mit 250 µl P1-Puffer versetzt und wieder in Lösung gebracht. 250 µl P2-Puffer wurden hinzugeführt, das Tube vier bis sechs Mal gedreht und die Lösungen somit sorgfältig gemischt. Von Puffer N3 wurden 350 µl zugegeben, das Tube erneut sofort vier bis sechs Mal gedreht und bei 13.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Nach Überführen des Überstands in die dem Kit beiliegenden QiAprep Säulen folgte ein Zentrifugationsschritt für 30-60 sec. Durch Zugabe von 500 µl PB Waschpuffer und erneutem Zentrifugationsschritt für 30-60 sec wurden die Säulen gewaschen. Der Durchfluss wurde verworfen und der Schritt mit 750 µl PE-Puffer wiederholt. Um noch verbliebenen Waschpuffer zu beseitigen erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 1 min bei 13.000 rpm. Die Säule wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf Gefäß gestellt, 50 µl EB-Puffer auf die Säule pipettiert und 1 min inkubiert. Durch den folgenden Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm für 1 min konnte die an die Säule gebundene DNA wieder in Lösung gebracht werden.

Eine abschließend durchgeführte photometrische Messung bestimmte den Gehalt an Plasmid-DNA.

5.2.3. Doppelverdau der Plasmide mit EcoRI und die Gelelektrophorese

Der Doppelverdau wurde durchgeführt, um festzustellen, ob die Plasmide auch das vollständige Insert aufgenommen haben.

Jeder Vektor enthält verschiedene Schnittstellen für die jeweiligen Restriktionsenzyme (Abb. 13).

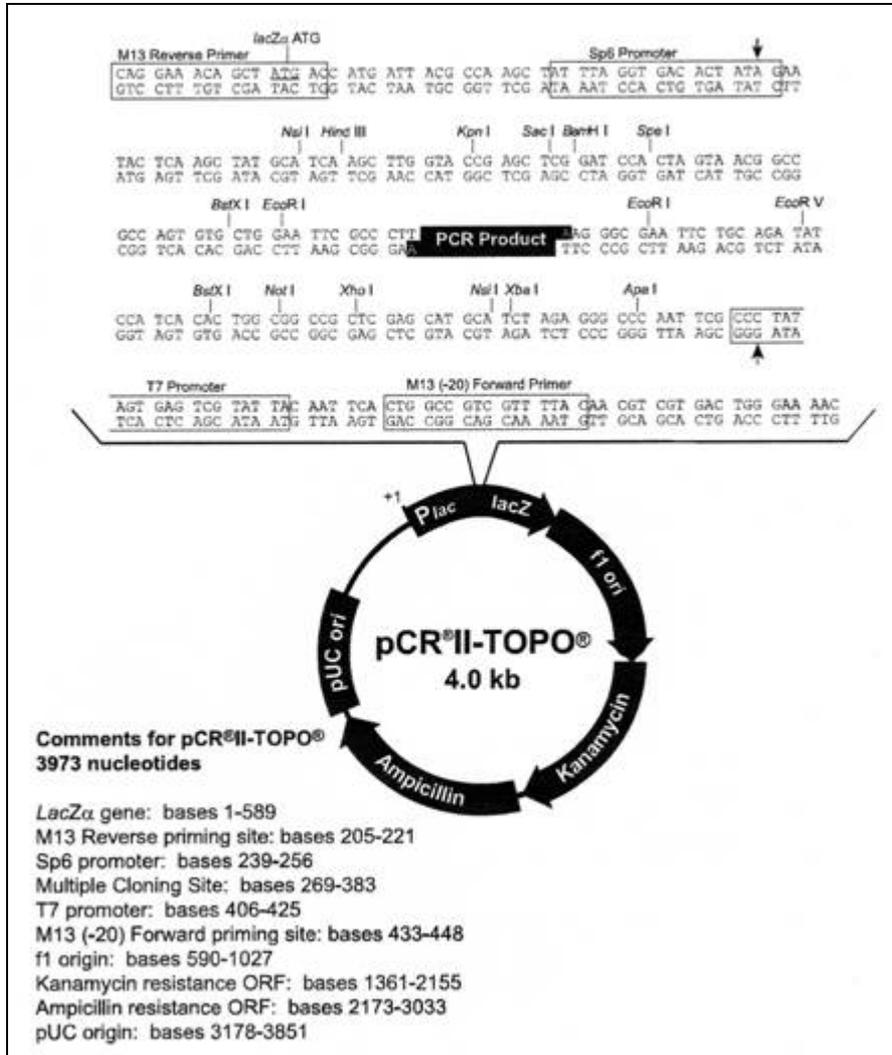


Abb. 13 pCR®II-TOPO®-Vektor

(www.tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/prciitopo-map.pdf)

Die Wahl des Restriktionsenzym richtet sich nach den jeweiligen Schnittstellen des Restriktionsenzym im PCR-Produkt, da das Enzym nicht in das Insert schneiden soll. Der Doppelverdau wurde mit dem Enzym EcoRI durchgeführt, und die Menge des eingesetzten Plasmids ergab sich nach der photometrischen Messung.

Für 25 µl Reaktionsvolumen wurde folgender Mix angesetzt:

1x Ansatz	Reagenz
2 µl	Plasmid DNA
2,5 µl	Puffer
0,5 µl	EcoRI
20 µl	Steriles Bideest

Die Inkubation erfolgte 1 h bei 37°C im Wasserbad.

Proben, die im Gel eine Bande auf der richtigen Höhe zeigten, wurden für die Sequenzierung zu den Firmen SRD (Scientific Research and Development, Bad Homburg, Deutschland) oder GATC (GATC Biotech AG, Konstanz) gegeben.

5.2.4. Einzelverdau

Nach erfolgter positiver Sequenzierung wurde das Plasmid im Einzelverdau jeweils mit den Enzymen Not-I und Nco-I gespalten.

Ansatz mit Not-I bzw. Nco-I jeweils:

1x Ansatz	Reagenz
5 µl	Plasmid
1 µl	Not-I / Nco-I
2 µl	Puffer
12 µl	DEPC (Diethylpyrocarbonat)

MATERIAL UND METHODEN

Der Ansatz wurde kurz anzentrifugiert und bei 37°C für 6 Stunden im Thermoblock (Biometra TB1 Thermoblock) inkubiert. Danach folgte eine Hitzeinaktivierung für 20 min bei 65°C im Wasserbad. Die Reaktionen wurden erneut kurz anzentrifugiert und in einem 1% -Agarose-Gel 60 min bei 95 V aufgetrennt.

5.2.5. *In-vitro*-Transkription

Für jede Sonde erfolgte das Pipettieren eines 20 µl-Ansatzes in der angegebenen Reihenfolge.

	DEPC	5x Transkriptinspuffer	100x DTT	10x DIG-RNA Labeling-Mix	Restriktions- einzelverdau	RNA- Polymerase
Not	7 µl	4 µl	2 µl	2 µl	3 µl	2 µl (T7)
Nco	7 µl	4 µl	2 µl	2 µl	3 µl	2 µl (SP6)

Die Lösungen wurden pipettiert, mit der Pipettenspitze vorsichtig gemischt und kurz anzentrifugiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Proben für 1 Stunde bei 37°C im Wasserbad oder im Thermoblock. Nach Ablauf der Inkubation wurde 0,5 µl 0,5 M EDTA-Lösung sowie 1,2 µl Lithiumchlorid-Lösung und 70,7 µl 96% Ethanol (-20°C) zugefügt. Hierbei stoppt 0,5 M EDTA-Lösung die Aktivität der Polymerase, und mittels Lithiumchlorid soll die RNA-Sonde nach dem Markieren von nicht eingebauten markierten Nukleotiden gereinigt werden. Die Proben wurden nun für 1 Stunde bei -80°C inkubiert. Hier ist auch eine Inkubationszeit über Nacht möglich. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4°C und 13.000 rpm für 20 min. Der entstandene Überstand wurde mit einer Pipette abgesaugt und das verbliebene Pellet mit 200 µl 70% Ethanol (in DEPC) resuspendiert und gewaschen. Erneut folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4°C und 13.000 rpm für 15 min. Im Anschluss wurde der

Überstand gut abgesaugt und die Tubes mit dem Pellet zum Trocknen für 10-20 min bei 37°C in den Thermoblock gestellt. Eine erneute in-Lösung bringen der getrockneten Pellets erfolgte mit 50 µl DEPC-Wasser und anschließender Inkubation im Thermoblock bei 70°C für 10-15 min. Nach Ablauf der Zeit mussten sich die Pellets vollständig aufgelöst haben, die Tubes wurden kurz anzentrifugiert und danach bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

5.3. Protokoll der *In-situ*-Hybridisierung

Tag 1

a) Entparaffinierung und Rehydrieren der Gewebeschnitte in einer absteigenden Alkoholreihe

1) 1 x 5 min Xylol (60°C) und danach umsetzen in sterile Küvette

Es erfolgte die Verwendung steriler Behältnisse, um eine Kontamination mit RNase zu vermeiden. Die Lösungen wurden mit DEPC-Wasser angesetzt.

2) 2 x 5 min Xylol

3) 2 x 5 min abs. Ethanol

4) 1 x 5 min 96% Ethanol

5) 1 x 5 min 70% Ethanol

6) 1 x 5 min DEPC-Wasser

7) 1 x 20 min 0,2 N HCl

8) 1 x 15 min 2x SSC-Puffer bei 70°C

9) 1 x 5 min waschen in PBSM-Puffer

b) Demaskierung der Bindungsstellen mit Proteinase K. Dies dient der Erhöhung der Durchlässigkeit des Gewebes für die Sonde und gleichzeitig dem Abbau der im Präparat vorhandenen Nukleasen.

1) Inkubation mit 15 µg/ml Proteinase K für 30 min bei 37°C

2) Abstoppen der Proteinase in 0,2% Glycin-Lösung (Fixierung, Deaktivierung der Enzyme, Stabilisierung des Präparats und Verminderung des Verlustes an RNA oder DNA)

c) Blockierung endogener Phosphatasen

1) 15-20 sec in 20% Essigsäure (4°C)

2) 1 x 5 min waschen in PBSM-Puffer (Phosphatgepufferte Salzlösung)

d) Nachfixierung

1) 10 min in 4% Paraformaldehyd-Lösung

2) 1 x 5 min waschen in PBSM-Puffer

3) 1 Stunde in 20% Glycerol in DEPC-Wasser inkubieren

e) Vorbereitung der Sonden

1) Sonden-Gemisch

1x Ansatz	Sense	Antisense
Sonden-Konzentration	1:50	1:50
DEPC-Wasser	1 µl	1 µl
Salm-Sperm	1 µl	1 µl
Yeast-RNA	2 µl	2 µl
Sonde	1 µl	1 µl
Hybridisierungs-Puffer	95 µl	95 µl

Salm-Sperm, also Lachssperma-DNA, dient der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf dem Präparat. Yeast-RNA (t-RNA) soll eine unspezifische Hybridisierung der Sonde mit Präparate-DNA bzw. -RNA und die Anlagerung an sonstige Nukleinsäure-bindende Komponenten reduzieren. Die Antisense-Sonden sind die zur mRNA komplementären Sondensequenzen und sollen an die einzelsträngige RNA binden. In der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *In-situ*-Hybridisierung wurden Sense-Sonden als Spezifitätskontrolle mitverwendet, da diese keine Komplementarität zur nachzuweisenden mRNA aufweisen und somit in der abschließenden immunhistochemischen Färbung auch keine Färbung aufweisen. Weitere mögliche Negativkontrollen sind eine Behandlung des Präparats mit RNase, das Weglassen der Sonde oder der Einsatz von Gewebe, in dem die Zielsequenz nicht vorhanden ist.

2) Hybridisierungs-Puffer

1x Ansatz	Reagenz
52 µl	DEPC-Wasser
40 µl	20x SSC
80 µl	50% Dextransulfat (70°C)
8 µl	Denhardt-Reagenz
200 µl	Deionisiertes Formamid

Dextransulfat wirkt als Reaktionsbeschleuniger, es steigert die Effizienz der Hybridisierung, wirkt dehydrierend und erhöht dadurch die Konzentration der Sonde in der Lösung. Das Denhardt-Reagenz unterdrückt unspezifische Anlagerungen. Durch das Formamid wird die Schmelztemperatur der Nukleinsäuren gesenkt, womit eine Hybridisierungstemperatur ermöglicht wird, die das Gewebe nicht schädigt. Zudem können allzu hohe Temperaturen zum Verlust der Ziel-RNA bzw. -DNA führen.

- 3) Objektträger kurz in 2x SSC eintauchen
- 4) Sondengemisch und Hybridisierungspuffer zusammenpipettieren
- 5) Sonden getrennt nach Not-I und Nco-I (Sense und Antisense) auf die Schnitte geben (Hybridisierungspuffer im Thermoblock bei 70°C stehen lassen, damit es pipettierbar bleibt, da das Gemisch durch Dextransulfat fest wird)

- 6) Objektträger mit Sense und Antisense für 10 min auf die Heizplatte (Typ AB110, Harry Gestigkeit, Düsseldorf) stellen
- 7) Objektträger danach auf Kühlakku (aus -23°C Gefrierschrank) abschrecken
- 8) Inkubation in Hybridisierungskammer bei 37°C im Brutschrank über Nacht

Tag 2

a) Posthybridisierung

Mit der stringenten Waschung sollen nicht-spezifisch gebundene Sonden vom Gewebeschnitt entfernt werden um die unspezifische Hintergrundfärbung zu minimieren.

- 1) 4 x 10-15 min in 4x SSC-Puffer (saline-sodium citrate buffer) waschen
- 2) 15-20 min 2x SSC-Puffer bei 60°C
- 3) 15-20 min 0,2x SSC-Puffer bei 42°C
- 4) 5 min 0,1x SSC-Puffer bei Raumtemperatur
- 5) 5 min 2x SSC-Puffer bei Raumtemperatur

b) Immunhistochemie (Nachweis der gebundenen DIG-markierten Sonden)

- 1) 10 min 1x TNMT bei Raumtemperatur
- 2) 1 Stunde 3% BSA-Blockpuffer bei Raumtemperatur
- 3) Mit Anti-DIG-Fab-Antikörper Inkubation in feuchter Kammer bei 4°C über Nacht

Tag 3

a) Farbreaktion

- 1) 2 x 10 min 1x TNMT-Puffer
- 2) 5 min 1x NTB-Puffer
- 3) 5 min 50 ml 1x NTB-Puffer mit 250 μ l 1M Levamisol
- 4) Entwickeln mit NBT-BCIP-Lösung in der feuchten Kammer (Dunkel!)
- 5) Abstoppen der Färbereaktion durch 5 min 50 ml 1x NTB-Puffer mit 250 μ l 1 M Levamisol
- 6) Waschen in Aqua bidest
- 7) Eindecken in Glycergel

G. Ergebnisse

1. Histologische Evaluierung der Hodenbiopsien

Bei der histologischen Evaluierung der Hodenbiopsien wurden mittels „*Score count*“-Methode der Spermatogenesestatus und der *Score count* nach Bergmann und Kliesch (Übersicht in Bergmann und Kliesch 2010) bestimmt (Tab. 7). Hierbei sind die Proben grau unterlegt, die für die weiteren Untersuchungen verwendet wurden. Bei der Auswahl der Patienten wurde darauf geachtet, dass in der untersuchten Hodenbiopsie jeweils nur ein Spermatogenesedefekt vorlag.

Nummer	Rechter Hoden	Score	Linker Hoden	Score
1	nsp	10	hyp, ts, tu	-
2	-	-	nsp	-
3	nsp, dv, msg	10	nsp, dv	10
4	nsp	10	nsp	10
5	nsp	10	nsp	-
6	nsp	10	hyp, ts, lp, mz, ly	2
7	nsp, ts	7, 10	nsp	10
8	nsp	10	Tumor?	-
9	nsp	10	nsp	10
10	hyp	10	hyp	10
11	nsp	10	hyp	9
12	tu, sza, hyp	-	nsp	10
13	nsp	10	nsp	10
14	sda, fsc, ts	0	sda, ts	0
15	sda, fsc, ts	0	sda, ts	0

Tab. 7 Histologische Evaluierung, *Score count* (SC) Bewertung der verwendeten Hodenbiopsien

ERGEBNISSE

Nummer	Rechter Hoden	Score	Linker Hoden	Score
16	sza	0	sda, dkz	0
17	sda, msg, dkz	0, 0, 0	sda	0, 0, 0
18	sda, ts	0	sza, ly	0
19	sda	3	sda	0
20	sda, msd, dkz	0	sda, dkz	-
21	sza	0	sda, dkz	0
22	sza	0	sza	0
23	sza, ts, lp	0	sza, ts, dkz	0
24	sza, ts	0	sga, fsc, ts, ly, pl	0
25	sza	0	sza	0
26	sza	0	sza	0
27	sza	0	sza	0
28	sza	0, 0, 0	sza	0, 0, 0
29	hyp, mz, dv	9	sza, ts	0
30	sza	0	sza	0
31	sza	0	sza	0
32			sza	0
33	sga	0	ts	0
34	tu, sga	-	ts, isz	0
35	tu, sga	0	hyp	6
36	sga, fcs, ts	0	ts, sga	0
37	hyp, msd	7	sga	0
38	sga, lhyp	0	sga, ts, lhyp	0
39	hyp, ts, fsc	0	sga, fsc, ts, bg	0
40	sga, ts, ly	0	sga, ts	0
41	sga	0	sga, isz	0
42	SCO	0	SCO	0

Tab. 7 Histologische Evaluierung, *Score count* (SC) Bewertung der verwendeten Hodenbiopsien (1. Fortsetzung)

Nummer	Rechter Hoden	Score	Linker Hoden	Score
43	SCO	0	SCO, ts, lp	0
44	SCO	0	SCO	0
45	SCO	0	SCO, ts	0
46	SCO	0	SCO	0
47	SCO, ts, bg	0	SCO, lhyp, bg	0
48	SCO	0, 0, 0	SCO	0, 0, 0
49	SCO	0, 0, 0	SCO	0, 0, 0
50	SCO	0	SCO	0
51	SCO	0	SCO	0
52	SCO	0	SCO	0
53	SCO	0	SCO, lhyp	0
54	SCO	0	SCO	0
55	hyp, ts		hyp	
56	sza	0		

Tab. 7 Histologische Evaluierung, *Score count* (SC) Bewertung der verwendeten Hodenbiopsien (2. Fortsetzung)

- nsp** normale Spermatogenese
hyp qualitativ intakte Spermatogenese, Hypospermatogenese
sda Spermatogenesearestart auf Höhe der Spermatiden
sza Spermatogenesearestart auf der Höhe der primären Spermatozyten
sga Spermatogenesearestart auf der Höhe der Spermatogonien
SCO *Sertoli Cell Only Syndrom*
- bg** Bindegewebe
dkz degenerative Keimzellen
dv Divertikelbildung der Tubuli
fsc fetale Sertolizellen
isz immature Sertolizellen
lhyp Leydigzellhyperplasie
lp Verdickung der *Lamina propria* der Tubuluswand
ly Lymphozyteninfiltrate
msd mehrkernige runde Spermatiden
msg mehrkernige Spermatogonien
mz Mastzellen
ts Tubulusschatten
tu Tumor

2. Qualitative RT-PCR nach LAM

In der qualitativen RT-PCR wurde cDNA von Tubulusanschnitten und Teilen des Interstitiums sowohl von Hodenbiopsien mit normaler Spermatogenese, als auch von Hodenbiopsien mit Spermatogenesedefekten eingesetzt.

Das erwartete 79 bp lange RT-PCR-Produkt für den SOAT konnte nur bei gepickten Tubulusanschnitten von Hodenbiopsien mit normaler Spermatogenese, bei einer Hodenbiopsie mit einem Spermatogenesedefekt auf Höhe der Spermatischen sowie bei zwei Patienten mit einem Spermatogenesedefekt auf Höhe der Spermatozyten detektiert werden. In den untersuchten isolierten Teilen des Interstitiums und Tubulusanschnitten von weiteren Hodenbiopsien mit Spermatogenesedefekten bzw. *Sertoli Cell Only Syndrom* konnte der Nachweis des SOAT nicht erbracht werden.

Als interne Kontrolle wurde für jede Probe eine RT-PCR mit β -Actin durchgeführt, hier konnte jeweils eine Bande auf der Höhe von 84 bp detektiert werden.

Bei elf Hodenbiopsien mit normaler Spermatogenese wurden die entsprechenden RT-PCR-Reaktionen durchgeführt. Für die Tubulusanschnitte aller elf untersuchter Hodenbiopsien konnte eine für SOAT-spezifische Bande auf der Höhe von 79 bp nachgewiesen werden. In den Interstitiumsanschnitten konnte das SOAT-Fragment nicht detektiert werden (Abb. 14).

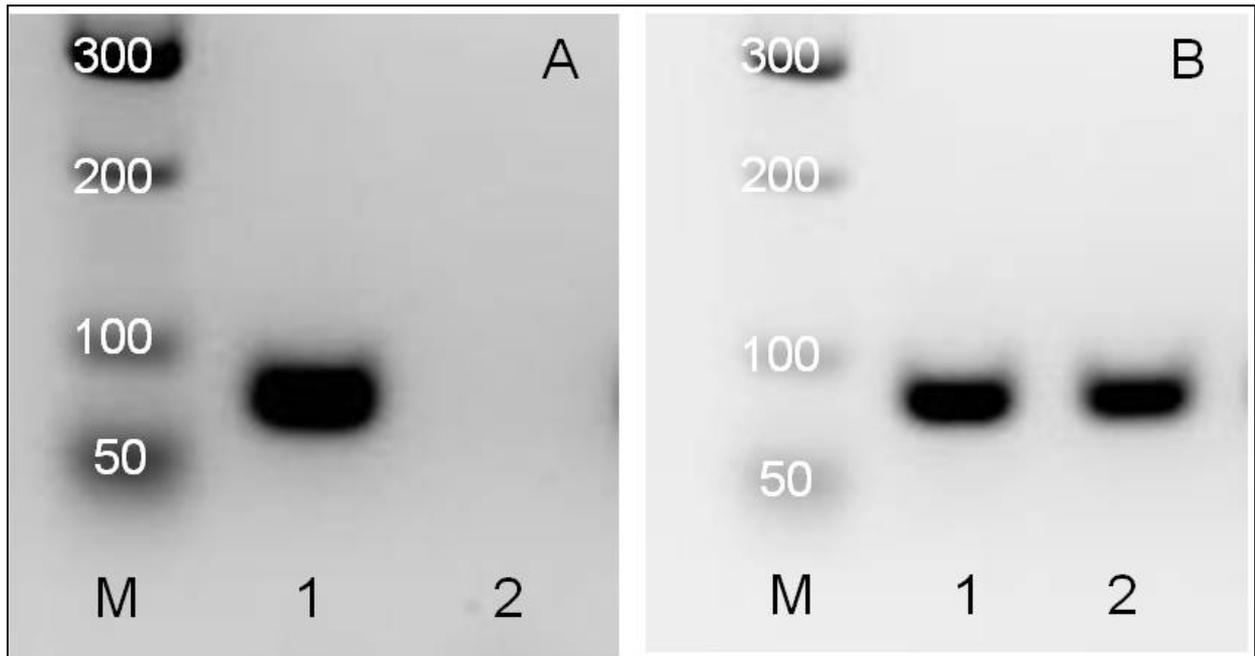


Abb. 14 Qualitative SOAT-RT-PCR nach LAM bei einer Hodenbiopsie mit normaler Spermatogenese (Patient 7)

- A** Qualitative SOAT-RT-PCR von Tubulus- (1) und Interstitiums-anschnitten (2)
- B** Qualitative β -Actin-RT-PCR von Tubulus- (1) und Interstitiums-anschnitten (2)

Für die mit jeder durchgeführten RT-PCR nach LAM mitgenommenen Positivkontrolle wurde cDNA eines Patienten mit normaler Spermatogenese eingesetzt. In der Negativkontrolle ersetzte steriles Aqua bidest die cDNA.

Die nachfolgende Abb. 14 (1. Fortsetzung) steht exemplarisch für sämtliche Positiv- und Negativkontrollen aller im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten RT-PCRs nach LAM. Hierbei wiesen die jeweiligen Positivkontrollen die zu erwartenden Banden auf, während die Negativkontrollen ohne Bande blieben.

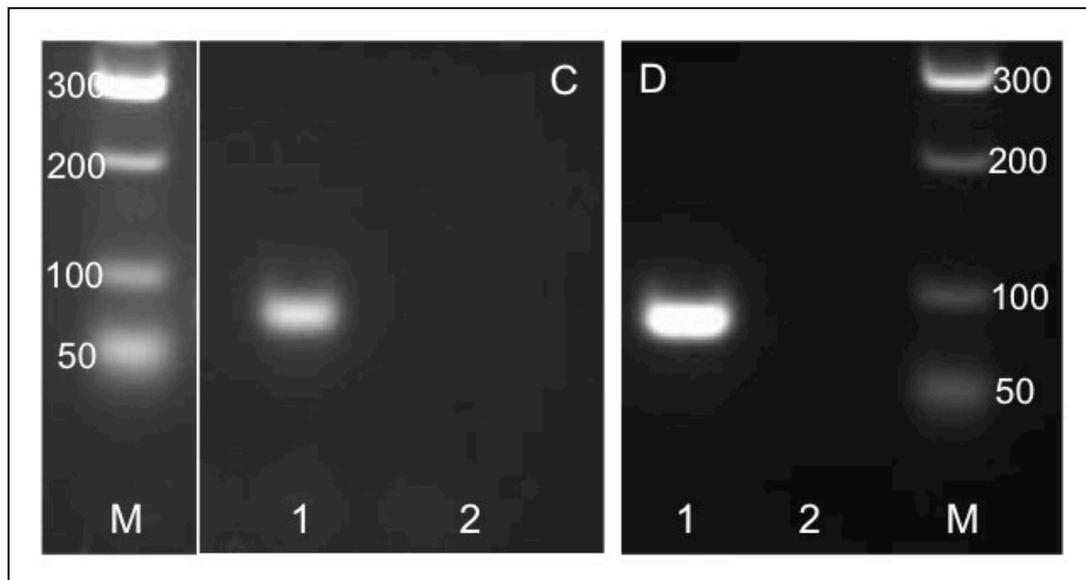


Abb. 14 Qualitative SOAT-RT-PCR nach LAM bei einer Hodenbiopsie mit normaler Spermatogenese (Patient 7) (1.Fortsetzung)

- C** Qualitative SOAT-RT-PCR der Positivkontrolle (1) und der Negativkontrolle (2)
- D** Qualitative β -Aktin-RT-PCR der Positivkontrolle (1) und der Negativkontrolle (2)

Es wurden fünf Hodenbiopsien mit einem Arrest der Spermatogenese auf Höhe der Spermatiden untersucht. Einzig in den Tubulusanschnitten von Patient 16 konnte das SOAT-Fragment detektiert werden, in den untersuchten Tubulusanschnitten der weiteren Hodenbiopsien sowie in Anschnitten des Interstitiums konnte das SOAT-Transkript nicht nachgewiesen werden (Abb. 15).

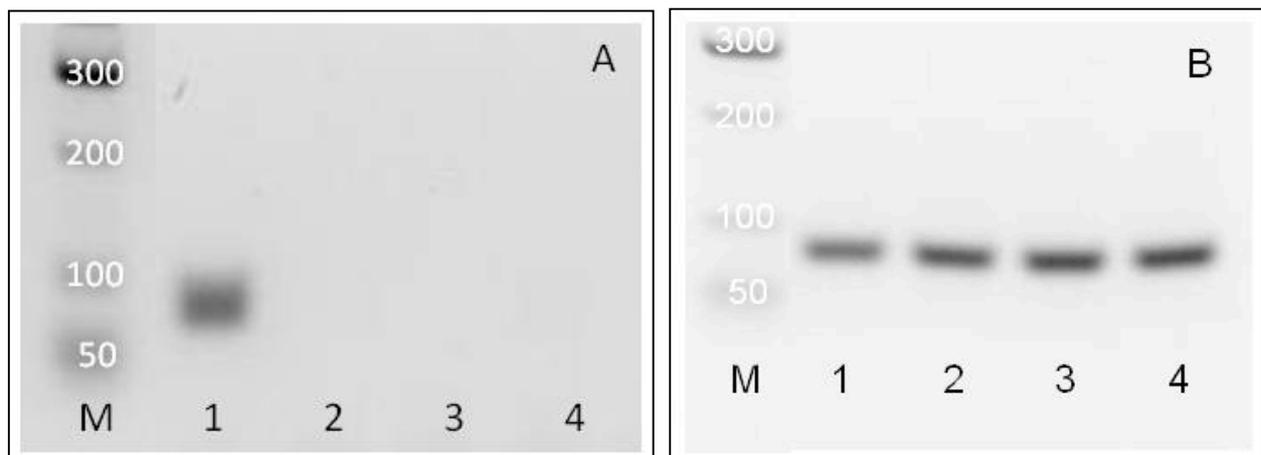


Abb. 15 Qualitative SOAT-RT-PCR nach LAM bei zwei Hodenbiopsien mit Arrest der Spermatogenese auf Höhe der Spermatiden

- A** Qualitative SOAT-RT-PCR von Tubulus- (1) und Interstitiums-anschnitten (2) von Patient 16 sowie Tubulus- (3) und Interstitiums-anschnitten (4) von Patient 15
- B** Qualitative β -Actin-RT-PCR von Tubulus- (1) + (3) und Interstitiums-anschnitten (2) + (4)

Mit einem Arrest der Spermatogenese auf Höhe der Spermatozyten wurden neun Hodenbiopsien untersucht. Das SOAT-Transkript konnte bei zwei Patienten in Tubulusanschnitten nachgewiesen werden (Abb. 16).

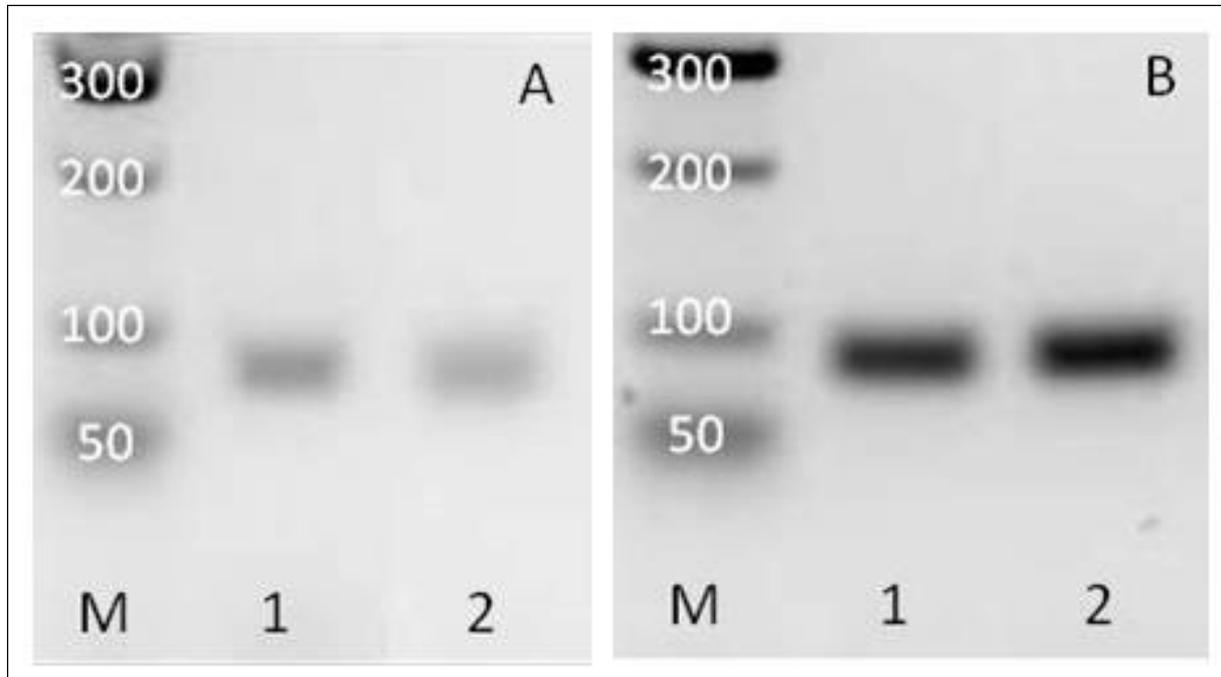


Abb. 16 Qualitative SOAT-RT-PCR nach LAM bei zwei Hodenbiopsien mit Arrest der Spermatogenese auf Höhe der Spermatozyten

- A** Qualitative SOAT-RT-PCR von Tubulusanschnitten bei Patient 32 (1) und Patient 56 (2)
- B** Qualitative β -Actin-RT-PCR von Tubulusanschnitten bei Patient 32 (1) und Patient 56 (2)

Es wurden acht Hodenbiopsien mit einem Arrest der Spermatogenese auf Höhe der Spermatogonien untersucht. Bei keiner Hodenbiopsie konnte das SOAT-Fragment in Tubulus- oder Interstitiumsanschnitten detektiert werden (Abb. 17).

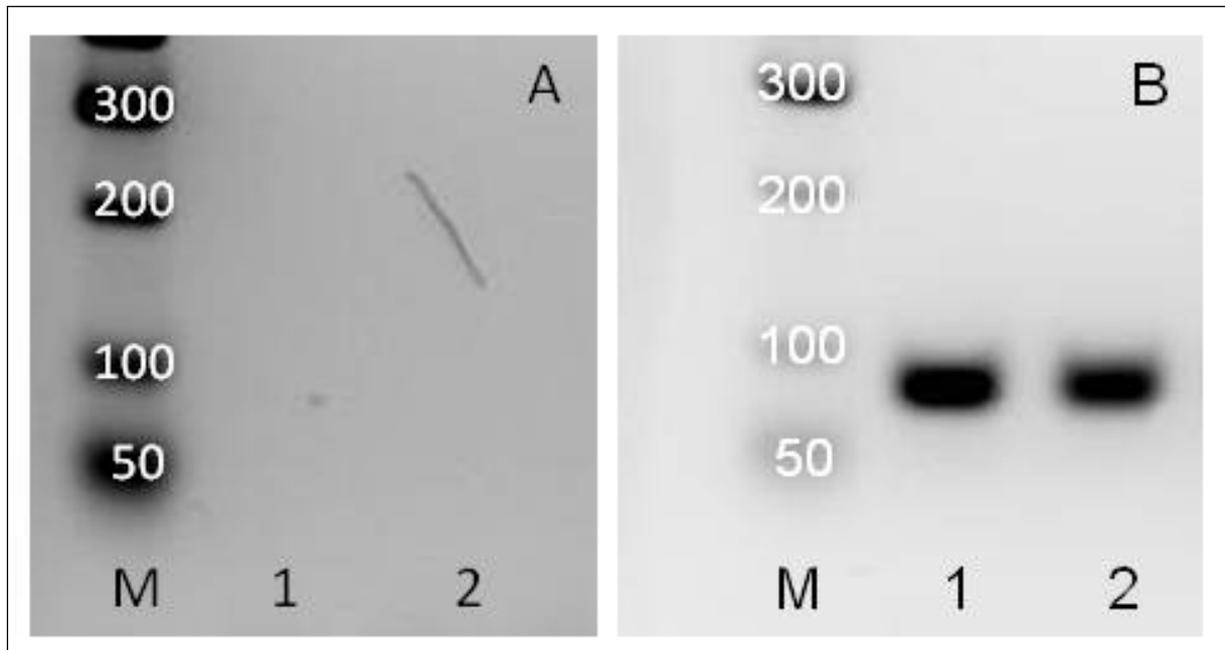


Abb. 17 Qualitative SOAT-RT-PCR nach LAM einer Hodenbiopsie mit Arrest der Spermatogenese auf Höhe der Spermatogonien (Patient 33)

- A** Qualitative SOAT-RT-PCR von Tubulus- (1) und Interstitiumsanschnitten (2)
- B** Qualitative β -Actin-RT-PCR von Tubulus- (1) und Interstitiumsanschnitten (2)

Ein *Sertoli Cell Only-Syndrom* zeigten dreizehn der untersuchten Hodenbiopsien. Weder in Tubulusanschnitten noch in Anschnitten des Interstitiums konnte das SOAT-Fragment bei den untersuchten dreizehn Biopaten nachgewiesen werden (Abb. 18).

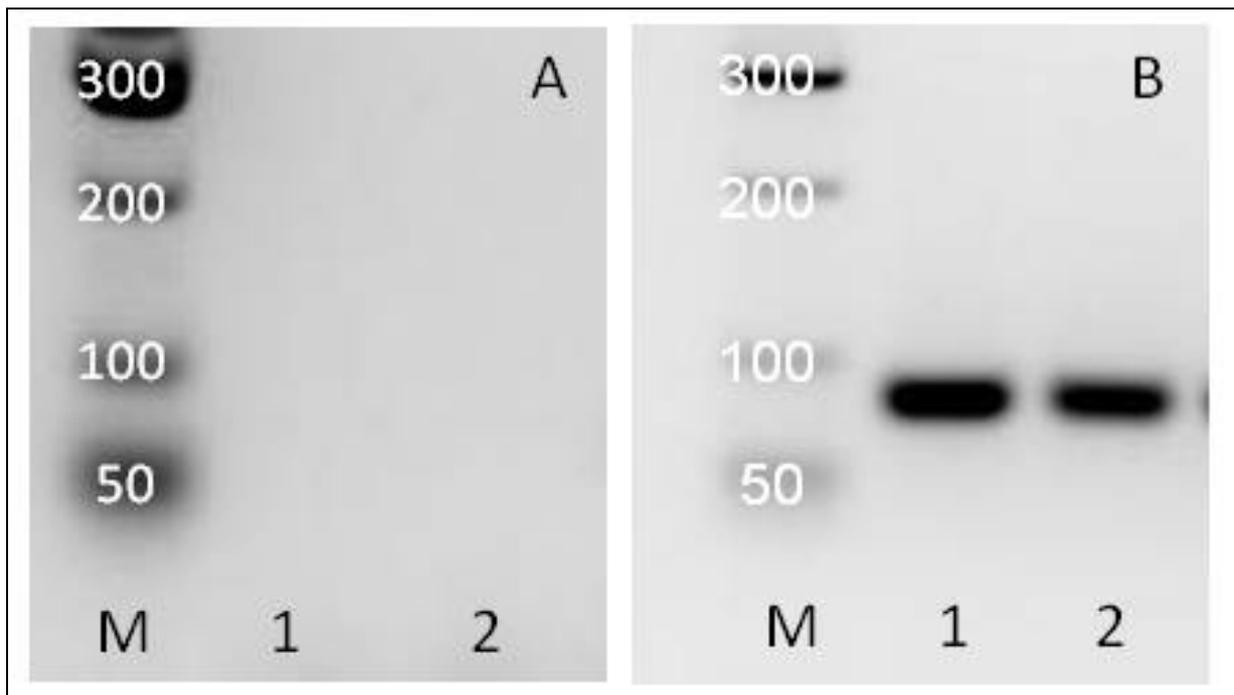


Abb. 18 Qualitative SOAT-RT-PCR nach LAM bei einer Hodenbiopsie mit *Sertoli Cell Only Syndrom* (Patient 42)

- A** Qualitative SOAT-RT-PCR von Tubulus- (1) und Interstitiums-anschnitten (2)
- B** Qualitative β -Actin-RT-PCR von Tubulus- (1) und Interstitiums-anschnitten (2)

3. Ergebnisse der *In-situ*-Hybridisierung

Die *In-situ*-Hybridisierung wurde an Paraffinschnitten eines Patienten mit normaler Spermatogenese durchgeführt (Patient 8). Es zeigte sich eine deutliche zytoplasmatische Färbung der pachytänen primären Spermatozyten, während die restlichen Zellen des Keimepithels sowie interstitielle Zellen keine Färbung aufwiesen (Abb.19).

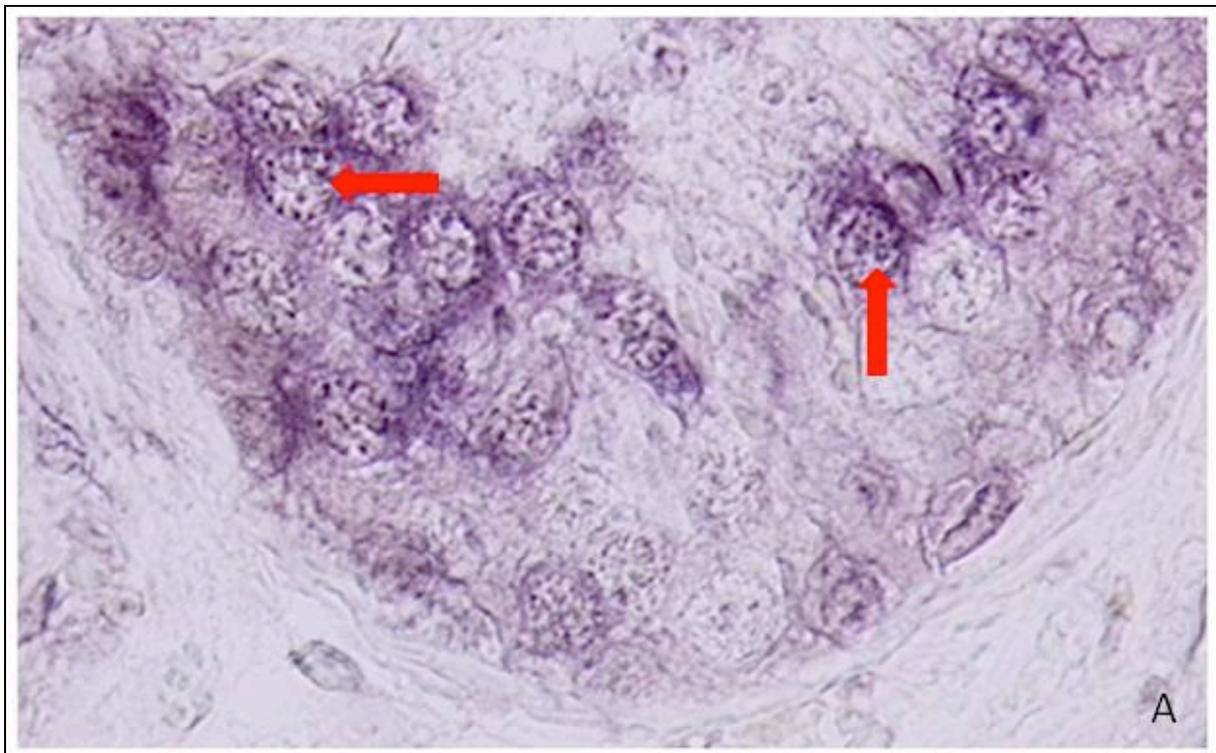


Abb. 19 SOAT *In-situ*-Hybridisierung, A Antisense: Nachweis des SOAT im Zytoplasma von pachytänen Spermatozyten, Primärvergrößerung x40

4. Ergebnisse der Immunhistochemischen Untersuchung

4.1. Antikörper 1: SOAT3

Zu beobachten war für den Antikörper SOAT3 die Färbung von Vesikeln in Sertolizellen, einzelnen Spermatogonien, Akrosomenkappen von Spermatiden sowie von Spermischwänzen und des Gefäßendothels (Abb. 20 A + B).

Um die Färbung des Gefäßendothels zu überprüfen, wurden mittels Laser-assistierter Mikrodissektion interstitielle Bereiche mit deutlicher Gefäßbildung bei drei Patienten mit normaler Spermatogenese gewonnen, die RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und in der SOAT-RT-PCR eingesetzt. Als Positivkontrolle für die SOAT-RT-PCR wurde cDNA eines Patienten mit normaler Spermatogenese genommen. In der durchgeführten Gelelektrophorese konnten keine Banden für SOAT mit den isolierten interstitiellen Bereichen und somit des Gefäßendothels detektiert werden (Abb. 20 C).

4.2. Antikörper 2: SOAT3 aufgereinigt

Der Antikörper SOAT3 wurde bei Eurogentec aufgereinigt. Es konnte keine Färbung festgestellt werden (Abb. 20 D).

4.3. Antikörper 3: EP042488

Für das eingesetzte Antiserum war in allen Verdünnungsstufen eine starke Hintergrundfärbung und eine Färbung des Gefäßendothels sichtbar (Abb. 20 E).

4.4. Antikörper 4: EP042489

In allen eingesetzten Verdünnungsstufen zeigten sich eine starke Hintergrundfärbung und eine Färbung des Gefäßendothels (Abb. 20 F).

4.5. Antikörper 5: EP072066

Es zeigte sich eine Färbung von Vesikeln in Sertolizellen sowie von Akrosomenkappen (Abb. 21 A).

4.6. Antikörper 6: EP072067

Für den Antikörper waren Färbungen von Vesikeln in Sertolizellen, einzelner Spermato gonien und Akrosomenkappen sichtbar (Abb. 21 B).

4.7. Antikörper 7: AbD04769

Es zeigte sich eine Färbung von Vesikeln in Sertolizellen und der Lipide in Leydigzellen (Abb. 21 C).

4.8. Antikörper 8: AbD04770

Eine Färbung von Vesikeln in Sertolizellen konnte festgestellt werden (Abb. 21 E).

4.9. Antikörper 9: SA6946

Es stellte sich in allen Verdünnungsstufen eine starke Hintergrundfärbung sowie Färbungen von Sertolizellen, Leydigzellen und des Gefäßendothels dar (Abb. 22 A).

4.10. Antikörper 10: SA6947

In allen Verdünnungsstufen zeigten sich eine starke Hintergrundfärbung, Färbungen von Sertolizellen, Leydigzellen und des Gefäßendothels (Abb. 22 B).

4.11. Antikörper 11: SA6947 aufgereinigt

Es war eine deutliche Färbung der Leydigzellen sichtbar (Abb. 22 C).

Zur Überprüfung des Ergebnisses wurden mittels Laser-assistierter Mikrodisektion bei diesem Patienten (Patient 55) Tubulusanschnitte und interstitielle Anschnitte gewonnen, die RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und in der SOAT-RT-PCR eingesetzt. Bei der Gelelektrophorese konnte eine Bande für die Tubulusanschnitte detektiert werden, jedoch keine Bande für die interstitiellen Bereiche (Abb. 22 D).

4.12. Antikörper 12: SC S-12

Eine Farbreaktion konnte nicht detektiert werden (Abb. 22 E).

4.13. Antikörper 13: SC C-13

Der Antikörper zeigte eine Färbung von Vesikeln in Sertolizellen sowie von Lipiden in Leydigzellen (Abb. 22 F).

4.14. Antikörper 14: Abnova MaxPab

Es konnte keine Farbreaktion festgestellt werden (Abb. 23 A).

4.15. Antikörper 15: Sigma Prestige

Mit den Detektionssystemen AEC und APAAP konnte für Antikörper Nr. 15 keine Färbung detektiert werden. Da für diesen Antikörper durch den Hersteller als Referenz eine punktuelle zytoplasmatische Färbung der Leydigzellen angegeben wurde (www.proteinatlas.org/ENSG00000145283/normal/testis), erfolgte der Einsatz des Detektionssystems DAB. Mit diesem Detektionssystem konnte eine punktuelle Färbung der Leydigzellen sichtbar gemacht werden (Abb. 23 C). Die gleiche Färbung

war jedoch auch in der durch das Weglassen des Antikörpers Nr. 15 mitgeführten Negativkontrolle sichtbar (Abb. 23 D).

4.16. Antikörper 16: Sigma SAB

Der Antikörper zeigte keine Färbung (Abb. 23 B).

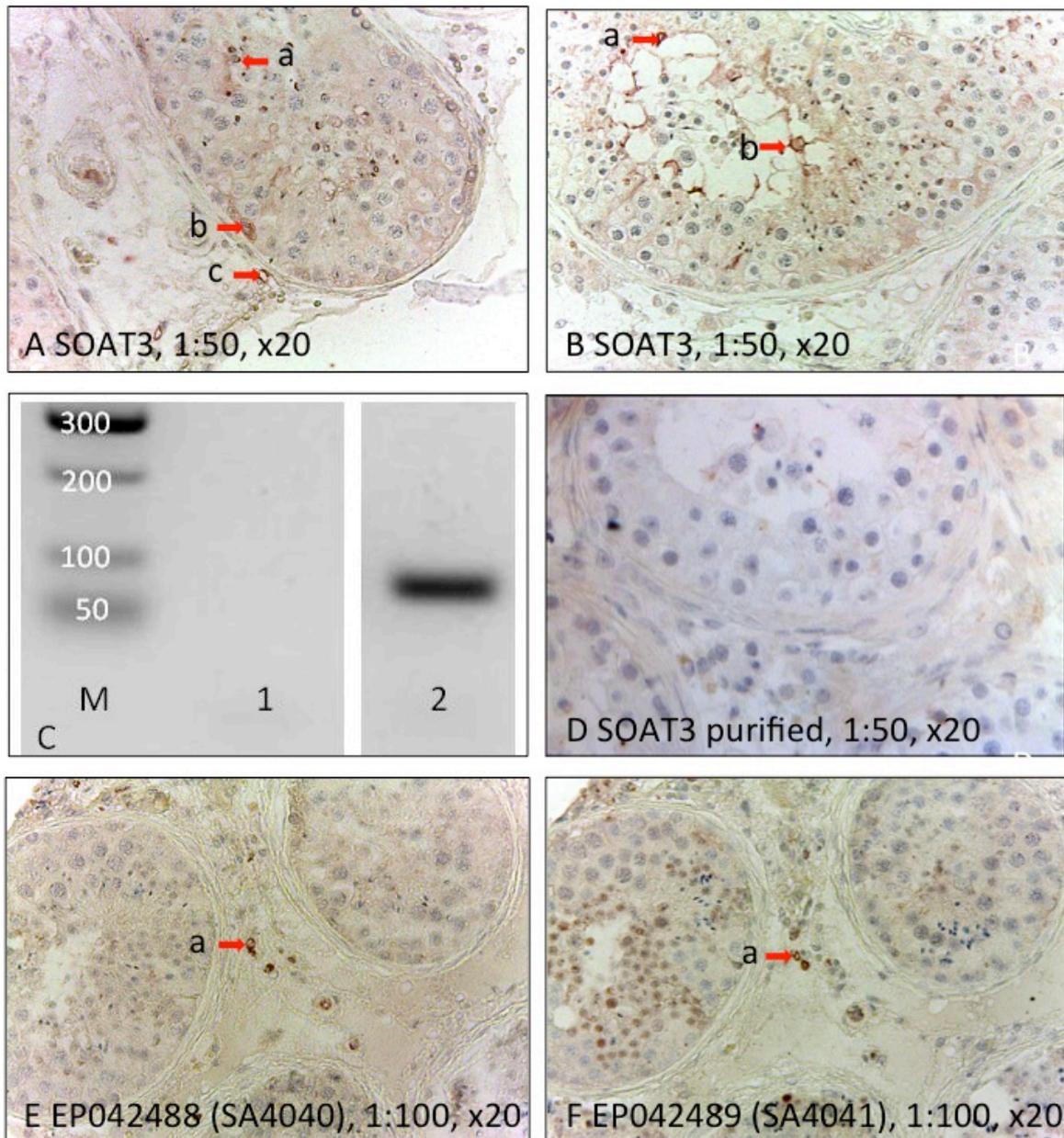


Abb. 20 Bildertafel Immunhistochemie I

- A SOAT3, a: Akrosomenkappen, b: einzelne Spermatogonien, c: Gefäßendothel
- B SOAT3, a, b: Spermischwänze
- C SOAT-RT-PCR nach LAM von isolierten interstitiellen Bereichen mit deutlicher Gefäßbildung, M: Marker, 1: gepickte Gefäßbereiche, 2: Positivkontrolle
- D SOAT3 purified, keine Färbung nachweisbar
- E EP042488, a: Gefäßendothel
- F EP042489, a: Gefäßendothel

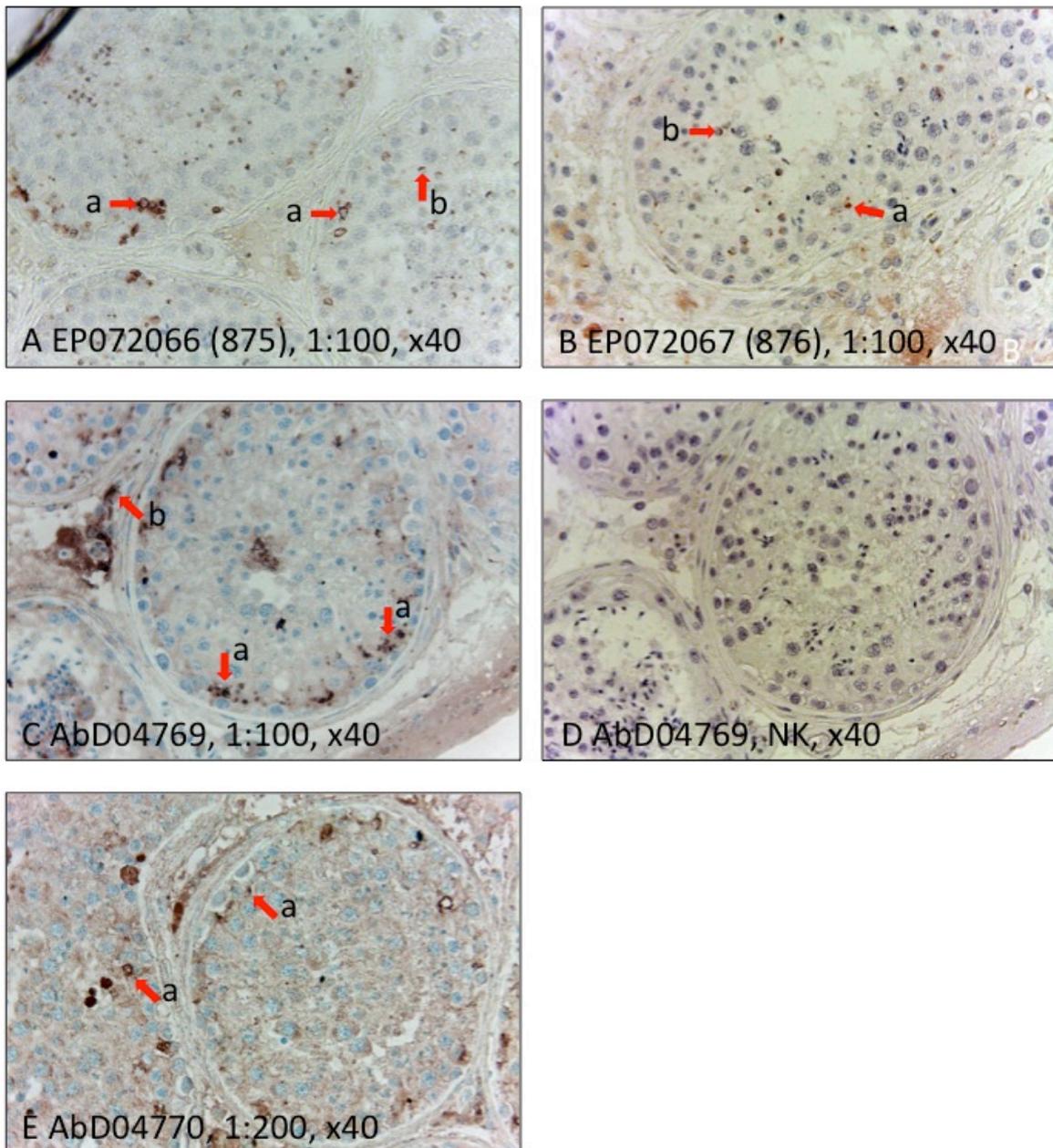


Abb. 21 Bildertafel Immunhistochemie II

- A EP072066 (875), a: Vesikel in Sertolizellen, b: Akrosomenkappen
- B EP072067 (876), a: Vesikel in Sertolizellen, b: Akrosomenkappen
- C AbD04769, a: Vesikel in Sertolizellen, b: Lipide in Leydigzellen
- D AbD04769, Negativkontrolle
- E AbD04770, a: Vesikel in Sertolizellen

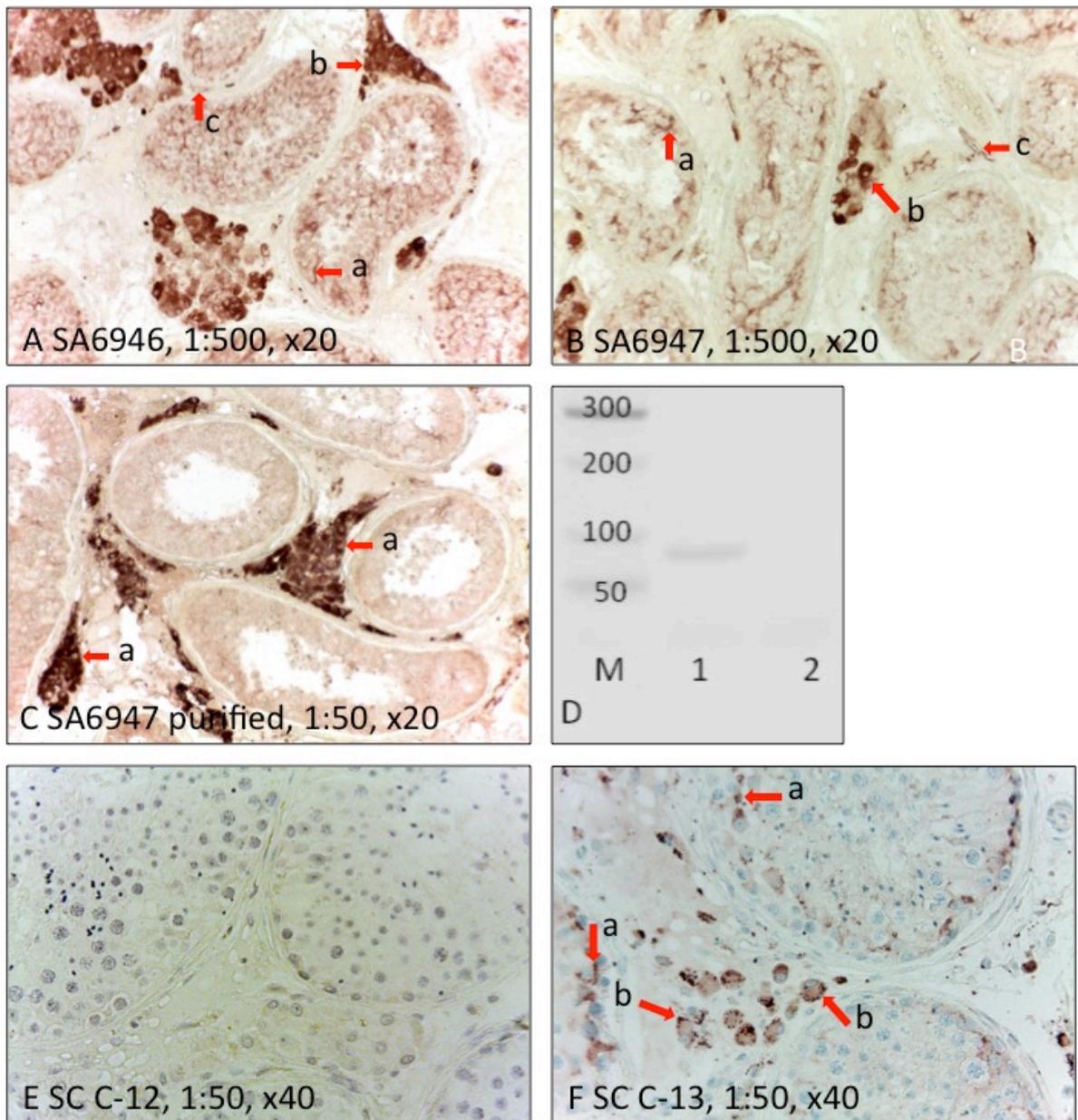


Abb. 22 Bildertafel Immunhistochemie III

- A SA6946, a: Sertolizellen, b: Leydigzellen, c: Gefäßendothel
- B SA6947, a: Sertolizellen, b: Leydigzellen, c: Gefäßendothel
- C SA6947 purified, a: Leydigzellen
- D SOAT-RT-PCR nach LAM, M: Marker, 1: isolierte *Tubuli seminiferi*, 2: Interstitiumsanschnitte
- E SC S-12, keine Färbung nachweisbar
- F SC C-13, a: Vesikel in Sertolizellen, b: Lipide in Leydigzellen

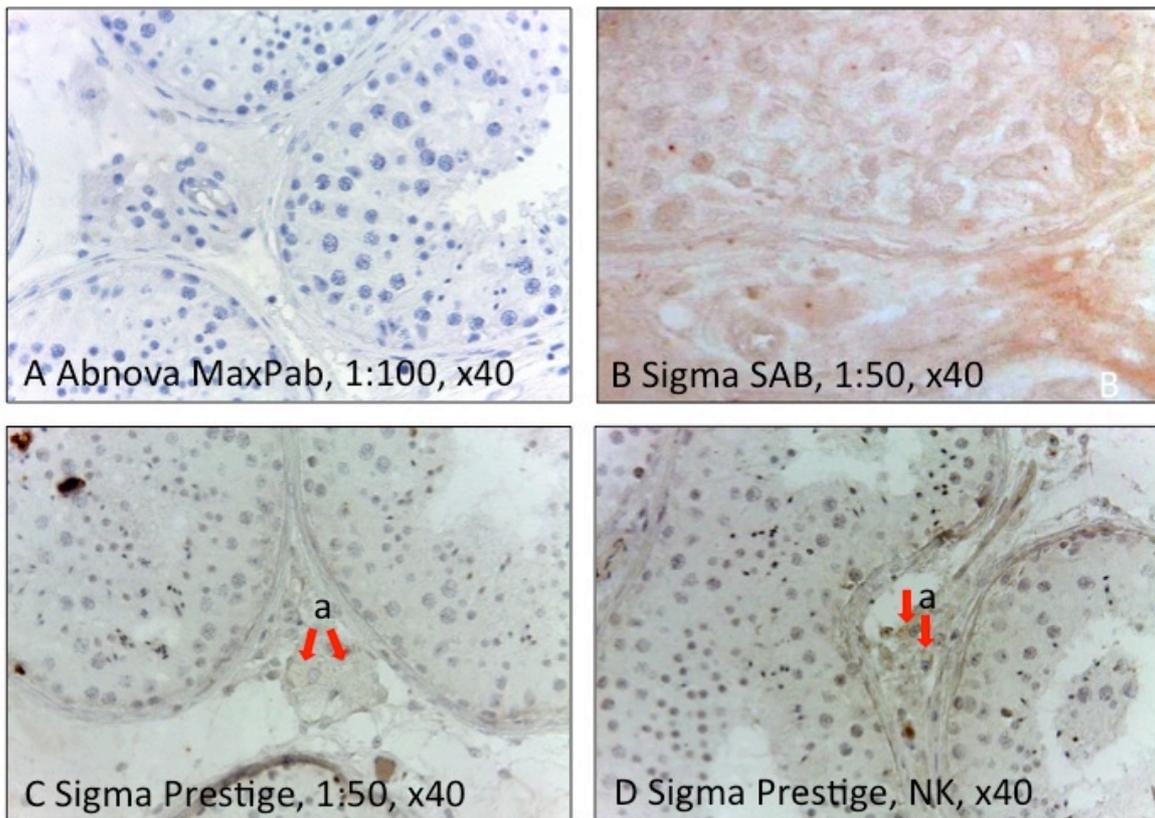


Abb. 23 Bildertafel Immunhistochemie IV

- A Abnova MaxPab, keine Färbung nachweisbar
- B Sigma SAB, keine Färbung nachweisbar
- C Sigma Prestige, a: Färbung der Lipide der Leydigzellen mit Detektiossystem DAB
- D Sigma Prestige, Negativkontrolle, a: Färbung der Lipide der Leydigzellen mit Detektionssystem DAB

5. Quantitative TaqMan®-RT-qPCR von Hodenhomogenat

Nach der Etablierung der Primersysteme für SOAT, β -Actin und GAPDH wurde für Proben von 39 Patienten eine quantitative RT-PCR im Dreifachansatz durchgeführt (nsp mit n=12, sda mit n=7, sza mit n= 6, sga mit n=5, SCO mit n=9). Hierbei konnte bei allen Patienten mit diagnostizierter normaler Spermatogenese die relative Expression des SOAT-Transkripts nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde der SOAT bei einzelnen Patienten mit diagnostiziertem Arrest der Spermatogenese auf Höhe der Spermatischen und auf Höhe der Spermatozyten detektiert. In Spermatogenese-arresten auf Höhe der Spermatozyten, bei *Sertoli Cell Only Syndrome* und bei FS1-Zellen wurde SOAT nicht exprimiert (Abb. 24).

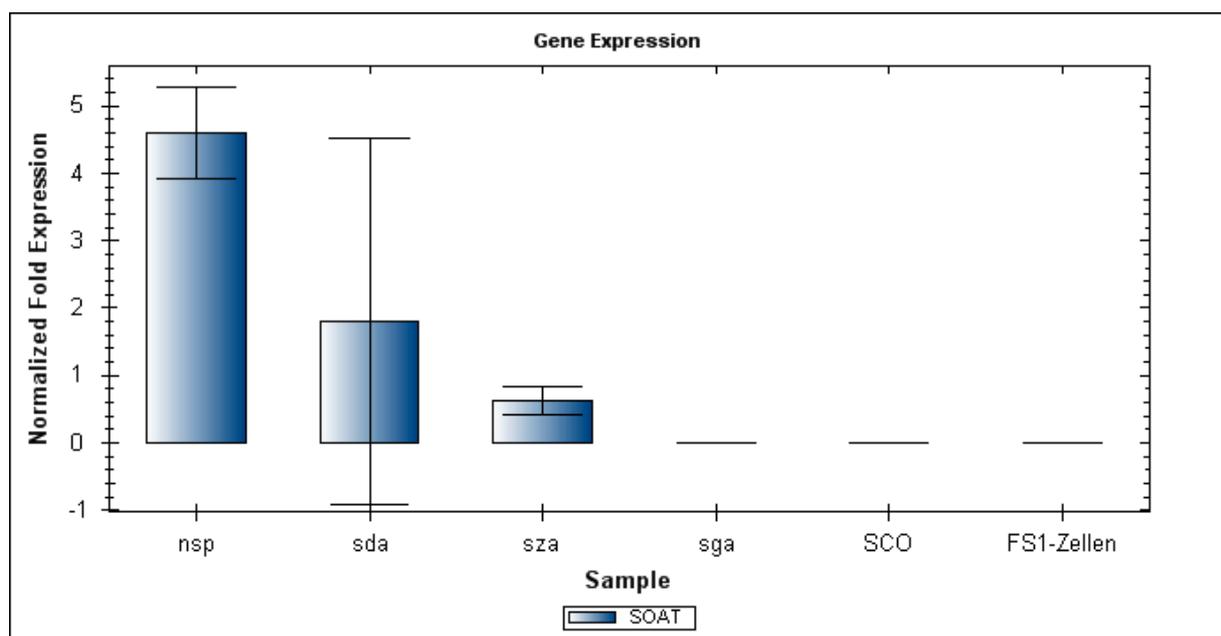


Abb. 24 TaqMan®-RT-qPCR mit Zielgen SOAT an Hodenhomogenat von Patienten mit normaler Spermatogenese und Arresten der Spermatogenese sowie FS1-Zellen

ERGEBNISSE

Aus Abb. 25 wird ersichtlich, dass in drei Patienten mit Spermatogenesedefekten (Patienten 32, 56 und 16) das SOAT-Transkript detektiert werden konnte. Die Expression innerhalb der Spermatogenesedefekte liegt jedoch deutlich unterhalb der Expression bei den zwölf Patienten, die eine normale Spermatogenese aufweisen (Patienten 8, 7, 13, 11, 3, 5, 2, 9, 12, 6, 10, 4).

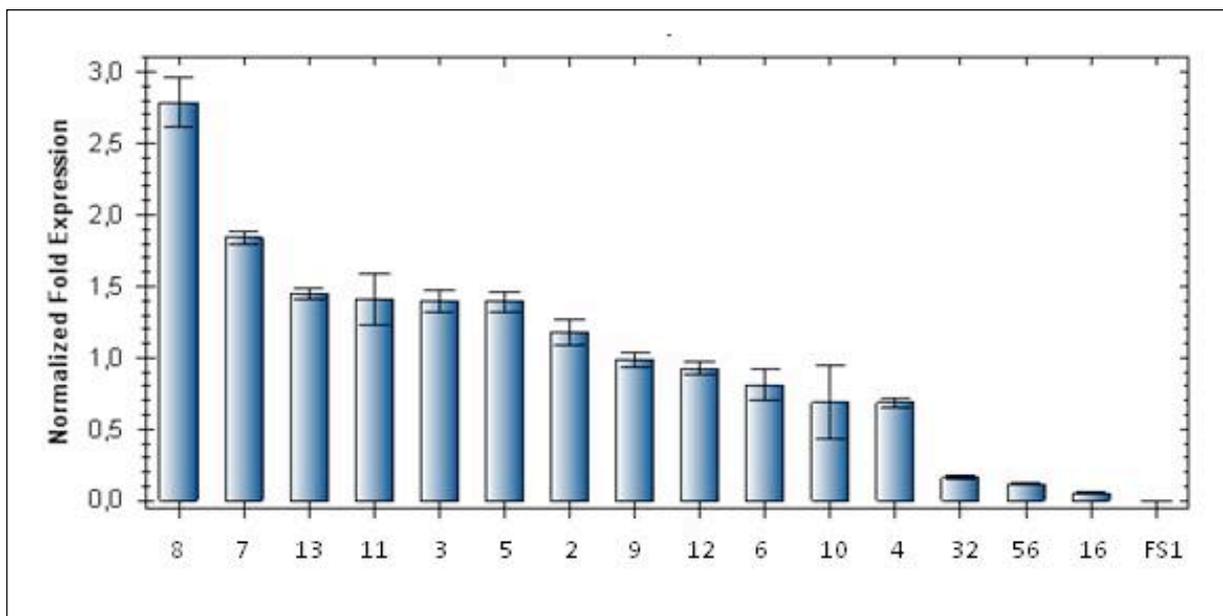


Abb. 25 TaqMan[®]-RT-qPCR mit Zielgen SOAT: Gen Expression einzelner Patienten sowie bei FS1-Zellen

H. Diskussion

Sulfatierte Steroide sind in teilweise hohen Konzentrationen im Blutkreislauf vertreten, z.B. DHEAS mit 10 μM (Morris et al. 2001). Außer der Ausscheidung über Gallensäure und Urin können sulfatierte Steroide in biologisch aktive Hormone umgewandelt werden und somit zur Regulation reproduktiver Prozesse beitragen. Durch Untersuchungen der Arbeitsgruppen um Payne et al. (1969) ist seit den späten 1960er Jahren bekannt, dass sulfatierte Steroide nicht nur wasserlösliche Abfallprodukte sind, sondern auch eine biologische Relevanz für die Bereitstellung von Steroidhormonvorläufern im menschlichen Hoden haben können. Vorrangig die Zellen in den *Tubuli seminiferi* sind zur Umwandlung von Pregnenolonsulfat zu biologisch aktivem Pregnenolon und damit zur Herstellung von Androgenen fähig (Payne et al. 1973).

Sulfatierte Steroide benötigen aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften jedoch ein Transportsystem, um die Zellmembranen ihrer Zielzellen passieren zu können. Die Arbeitsgruppe um Geyer et al. entdeckte und klonierte 2006 den humanen SOAT, der aufgrund seiner Transportaffinität für sulfatierte Steroide und der extrem hohen Expression im Hoden einen aussichtsreichen Kandidaten für die lokale Versorgung der Zellen des Hodens mit Steroiden darstellt (Geyer et al. 2007).

In dieser Doktorarbeit konnte mittels TaqMan[®]-RT-qPCR gezeigt werden, dass der SOAT hauptsächlich in Hodenhomogenat von Patienten mit normaler Spermatogenese exprimiert wird. So konnte der SOAT bei 12 Patienten mit normaler Spermatogenese nachgewiesen werden. Des Weiteren erfolgten Untersuchungen von Hodenbiopsien von 18 Patienten mit Spermatogenesestörungen. Hier konnte nur bei einem Patienten mit einem Arrest der Spermatogenese auf Höhe der Spermatozyten (Patient 16) und bei zwei Patienten mit Arrest der Spermatogenese auf

Höhe der Spermatozyten (Patienten 32 und 56) der SOAT mittels TaqMan[®]-RT-qPCR detektiert werden. Bei keinem weiteren Patienten mit Spermatogenesedefekten unterschiedlichen Ausmaßes sowie dem *Sertoli Cell Only Syndrom* (n=9) konnte der SOAT in der TaqMan[®]-RT-qPCR nachgewiesen werden.

Die fehlende Expression des SOAT bei Hodenbiopsien mit *Sertoli Cell Only Syndrom* wurde durch TaqMan[®]-RT-qPCR-Versuche mit der reinen Sertolizell-Linie FS1 bestätigt.

Die Ergebnisse der TaqMan[®]-RT-qPCR konnten durch die qualitative RT-PCR nach LAM untermauert werden. Hierfür wurden mittels LAM Tubulusanschnitte und interstitielle Bereiche getrennt voneinander gewonnen und in der RT-PCR mit dem Zielgen SOAT eingesetzt. Bei allen untersuchten Patienten mit normaler Spermatogenese konnte der SOAT in den isolierten *Tubuli seminiferi* nachgewiesen werden, während in den interstitiellen Bereichen keine Detektion erfolgte. Des Weiteren konnte der SOAT mittels RT-PCR nach LAM ebenfalls bei den Patienten 16, 32 und 56 in den Tubulusanschnitten detektiert werden. Für diese Patienten war bereits eine Expression für den SOAT in der TaqMan[®]-RT-qPCR erfolgt. In keiner weiteren Hodenbiopsie konnte in isolierten Tubulusanschnitten oder isolierten Anschnitten interstitieller Bereiche der Nachweis des SOAT mittels RT-PCR erbracht werden.

Nach den Ergebnissen der TaqMan[®]-RT-qPCR und der RT-PCR kann somit festgestellt werden, dass der SOAT in den Keimzellen des Hodens und hier aufsteigend von den primären Spermatozyten exprimiert wird, nicht jedoch in Sertolizellen bzw. Leydigzellen.

Mittels *In-situ*-Hybridisierung erfolgte der Nachweis des SOAT in den pachytänen Spermatozyten und bestätigt somit die Ergebnisse der RT-PCR nach LAM sowie der TaqMan[®]-RT-qPCR.

Der Nachweis des SOAT-Proteins mittels Immunhistochemie stellte sich als schwierig dar. Innerhalb dieser Arbeit wurden sechzehn Antikörper eingesetzt, die entweder kommerziell erworben oder selbst generiert wurden. Keiner der in dieser Arbeit eingesetzten Antikörper gegen spezielle Proteinabschnitte oder gegen das gesamte Protein konnte mit einer spezifischen Färbung überzeugen.

Färbungen interstitieller Bereiche, wie Gefäßendothel und in Leydig-Zellen konnten mittels RT-PCR nach LAM nicht bestätigt werden. Für keinen der 46 Patienten in den untersuchten isolierten interstitiellen Bereichen, die hauptsächlich aus Leydigzellen, Gefäßanschnitten sowie Bindegewebe bestehen, konnte mittels RT-PCR eine Expression des SOAT nachgewiesen werden.

Des Weiteren wurden Färbungen von Vesikeln in Sertoli-Zellen beobachtet. Mittels TaqMan[®]-RT-qPCR wurde die reine Sertolizell-Linie FS1 untersucht, in der keine Expression des SOAT nachgewiesen werden konnte. Ebenfalls negativ waren die in der RT-PCR eingesetzten isolierten *Tubuli seminiferi* mit einem diagnostizierten SCO, also einem alleinigen Auftreten von Sertolizellen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Färbung in Sertolizellen, eine unspezifische Färbung ist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass für keinen der in dieser Arbeit eingesetzten sechzehn Antikörper eine spezifische Färbereaktion nachgewiesen werden konnte.

Geyer et al. schlagen für den SOAT ein Transmembranmodell mit sieben transmembranen Domänen, wie es auch der ASBT zeigt, vor (Geyer et al. 2007).

Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen mit unterschiedlichen „*topology prediction programs*“ (Geyer et al. 2007) ist jedoch auch ein Modell mit neun transmembranen Domänen nicht ausgeschlossen (Döring et al. 2012).

Bei beiden möglichen Transmembranmodellen wird der extrazellulär liegende N-Terminus mindestens durch die Aminosäuren 2-17 dargestellt (Geyer et al. 2007). In den Untersuchungen der Arbeitsgruppe Geyer et al. wurde ein Antikörper gegen die Aminosäuren 2-17 des N-Terminus generiert, zur *In-vitro*-Immunfluoreszenz der Lage des N-Terminus in SOAT-HEK293-Zellen eingesetzt und zeigte eine spezifische Färbung der Zellmembranen der SOAT-HEK293-Zellen (Geyer et al. 2007). Der gleiche Antikörper wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit in der Immunhistochemie an Paraffinschnitten eingesetzt (Antikörper Nr. 3) und zeigte eine starke Hintergrundfärbung sowie eine Färbung des Gefäßendothels. Aufgrund durchgeführter Kontrolluntersuchungen wurde die Färbereaktion des Antikörpers Nr. 3 an Paraffinschnitten von Hodenbiopsien als nicht spezifisch angesehen.

Der genannte Antikörper demonstrierte somit *in vitro* eine spezifische Färbung in der Zellmembran der SOAT-HEK293-Zellen, jedoch nicht *in vivo* an Paraffinschnitten von Hodenbiopsien. Es kann vermutet werden, dass das SOAT-Protein *in vivo* durch seinen Einbau in die Zellmembran eine über die Zellmembran länger verteilte Quartärstruktur einnimmt, die eine Bindung der Antikörper an die entsprechenden Ziel-Antigene verhindert (Fietz et al. 2013).

Der Nachweis allein mittels Immunhistochemie wird aufgrund der in dieser Arbeit untersuchten falsch positiven Färbungen nach hiesiger Ansicht als nicht zielführend angesehen. Für eine funktionierende Proteinbiosynthese in einer Zelle wird die DNA in mRNA umgeschrieben, um an den Ribosomen im Zytoplasma in eine Aminosäuresequenz, ein Protein, übersetzt zu werden (Übersicht bei Horn et al.

2003). Somit ist die gleichzeitige Anwesenheit von mRNA und Protein in der gleichen Zelle notwendig und beim Nachweis eines Proteins mittels Immunhistochemie hat auch der Nachweis der mRNA zu erfolgen.

Fietz et al. (2013) generierten einen Antikörper gegen die sechzehn Aminosäuren des C-Terminus des SOAT-Proteins der Maus ($\text{Soat}_{m329-344}$). Dieser Antikörper wurde in der Immunhistochemie an Paraffinschnitten humaner Hodenbiopsien eingesetzt. Es zeigten sich Färbungen an verschiedenen Keimzellstadien, zygotäne primäre Spermatozyten Stage V, pachytäne Spermatozyten aller (Stage I-V), sekundäre Spermatozyten Stage VI und runde Spermatiden (step 1 und step 2) in Stage I und Stage II. Als besonders markant wurde die Färbung primärer Spermatozyten erachtet, die sich als eiförmig geformte Färbung im Bereich des Golgi-Apparates, nahe des Nukleus darstellte. Kontrollfärbungen mit Golgin A2 wiesen das SOAT-Protein im Golgi-Apparat nach, wo für den Einbau in die Zellmembran bestimmte Proteine für den Transport in Vesikel verpackt werden können. Für die Zellmembran war keine eindeutige Färbung nachweisbar (Fietz et al. 2013).

Mit einem weiteren Antikörper gegen den C-Terminus des humanen SOAT-Proteins ($\text{SOAT}_{311-377}$) konnten Fietz et al. (2013) eine klare Färbung der Zellemembranen von stabil transfizierten SOAT-HEK293-Zellen nachweisen. Dies unterstützt die Ergebnisse früherer Untersuchungen und auch die Ergebnisse der Transportstudie von Fietz et al. (2013), die einen SOAT-vermittelten Transport von β -Estradiol-3-Sulfat (E2S) und Androstenediol-3-Sulfat durch die Zellmembranen stabil transfizierter SOAT-HEK293-Zellen nachweisen konnten (Fietz et al. 2013).

In weiterführenden Untersuchungen von Hodenbiopsien mit Hypospermatogenese, Arresten der Spermatogenese und SCO zeigten sich mit dem $\text{Soat}_{m329-344}$ spezifische Färbungen für primäre pachytäne Spermatozyten, sobald diese Zellen in den

Paraffinschnitten präsent waren (Fietz et al. 2013). In Sertolizellen konnte keine Färbung nachgewiesen werden, was die in dieser Arbeit vorgetragenen Ergebnisse der RT-PCR nach LAM sowie der TaqMan[®]-RT-qPCR mit der reinen Sertolizell-Linie FS1 bestätigt.

Vorausgegangene Studien von Geyer et al. (2007) ergaben den Nachweis des SOAT-spezifischen Transports für DHEAS, PREGS und E1S in SOAT-HEK293-Zellen. Fietz et al. (2013) konnten mittels LC-MS-MS den Nachweis erbringen, dass DHEAS und E1S in SOAT-HEK293-Zellen aus dem extrazellulären in das intrazelluläre Kompartiment transportiert werden, ohne dass Modifikationen an den Molekülen vorgenommen werden. Als Konsequenz daraus wird die Transportfunktion des SOAT für sulfatierte Steroide als Hauptfunktion des SOAT angesehen.

Die physiologische Rolle des Transportes sulfatierter Steroide in die Sertoli-Zellen bleibt unklar. DHEAS und PREGS finden sich im Hoden und sind Vorgängermoleküle von Testosteron, so dass der Transport dieser Stoffe im Hoden eine Rolle hinsichtlich Initialisierung und Aufrechterhaltung der Spermatogenese spielen mag. Jedoch besitzen die Keimzellen des Hodens keinen Androgenrezeptor (AR), so dass Androgene diese Zellen nur über einen „*non-genomic pathway*“ beeinflussen könnten.

Keimzellen exprimieren den Östrogen-Rezeptor (ER), so konnten Fietz et al. den ER α in Spermatogonien und primären Spermazyten sowohl auf Protein-Ebene als auch auf mRNA-Ebene nachweisen (Fietz et al. 2014). Aufgrund unterschiedlichster Ergebnisse diverser Autoren bezüglich der Expression und zellulären Lokalisation der Östrogen-Rezeptoren ER α und ER β im humanen Hoden wird hier jedoch auf die entsprechende Übersicht verwiesen (Carreau und Hess 2010).

Vor dem Hintergrund der Expression der ER im humanen Hoden kann der Transport von E1S und E2S eine relevante Funktion des SOAT in Spermatozyten sein. Vor diesem Hintergrund ist es als interessant zu sehen, dass die Expression des SOAT sehr niedrig bis nicht vorhanden war in Spermatogensearresten auf Höhe der Spermatozyten oder Spermatogonien. Diese Arreste zeigen sich bei nicht-obstruktiver Azoospermie und daraus folgender Infertilität. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse konnte jedoch nicht von verringerter SOAT-Expression auf Spermatogenesedefekte geschlossen werden.

Fietz et al. (2013) erweiterten in ihren Untersuchungen das Spektrum um Patienten mit einer Hypospermatogenese, wo die Spermatogenese qualitativ intakt aber quantitativ verringert ist. Hier zeigte sich die SOAT-Expression im Vergleich zu Patienten mit einer normalen Spermatogenese verringert. Aufgrund dieser Ergebnisse kann vermutet werden, dass eine signifikant verringerte Expression des SOAT mit einem reduzierten Transport von sulfatierten Steroiden und in Folge mit einer reduzierten Bereitstellung von lokal verfügbaren Androgenen und Östrogenen einhergeht. Es ist weiterhin möglich, dass hierin eine Begründung für das Auftreten von Spermatogenesestörungen liegt, da die nötige Versorgung mit Androgenen und Östrogenen (Übersicht in Hess 2003) nicht oder nur reduziert gegeben ist. Weiterführende Untersuchungen der Spermatogenese von Hoden von Slc10a6-knockout-Mäusen könnten diese Hypothese unterstützen.

In der vorliegenden Doktorarbeit sowie in weiterführenden Untersuchungen der Gruppe um Fietz et al. (2013) konnte der Nachweis des SOAT auf die Keimzellen begrenzt werden. Der Nachweis der Expression des SOAT in den Keimzellen und hier in den primären Spermatozyten lenkt jedoch die Frage nicht nur auf die Bedeutung des SOAT für den Transport von sulfatierten Steroiden, Pregnenolosulfat,

Dehydroepiandrosteronsulfat (Geyer et al. 2007, Fietz et al. 2013) in die Zielzellen, sondern auch, wie sulfatierte Steroide die als Träger des SOAT ermittelten Keimzellen erreichen sollen.

Die Zielzellen des SOAT, primäre Spermatozyten, liegen innerhalb des Keimepithels und sind durch die Blut-Hoden-Schranke vom Gefäßsystem und darin zirkulierenden Stoffen getrennt. Somit erscheint es kaum möglich, dass im Blut zirkulierende sulfatierte Steroide auf direktem Weg ihre Zielzellen erreichen können, da ihr Weg über die Blut-Hoden-Schranke und die beteiligten Sertolizellen führen müsste (Fietz et al. 2013). Die Passage von Sertolizellen kann jedoch nur mittels passiver Diffusion oder aktivem Transport ermöglicht werden, wie es von Augustine et al. für Arzneimittel (Xenobiotics) diskutiert wird (Augustine et al. 2005).

Die Blut-Hoden-Schranke teilt die *Tubuli seminiferi* in ein basales und ein adluminales Kompartiment (Su et al. 2011a), wobei benachbarte Sertolizellen *tight junctions* untereinander ausbilden und kein Molekül größer als 1000 Da diese Barriere passieren kann (Walker 2010). Auf der Stufe der preleptotänen Spermatozyten wechseln die Keimzellen vom basalen in das adluminale Kompartiment, unter gleichzeitig ablaufenden Veränderungen der *tight junctions* der benachbarten Sertolizellen (Bergmann et al. 1989, Übersicht in Kopera et al. 2010). Die Keimzellen sind nun durch die Blut-Hoden-Schranke von Stoffen aus dem Blut getrennt und vollständig auf die Bereitstellung von Nährstoffen und Wachstumsfaktoren durch die Sertolizellen angewiesen (Walker 2010).

In Sertolizellen wurden bereits viele Transporter für einen aktiven Transport von diversen Stoffen diskutiert (Übersicht in Su et al. 2011a). So konnten für Sertolizellen sowohl Transporter der *multidrug resistance proteins* (MDRs) als auch der *multidrug resistance-related proteins* (MRPs) und in Keimzellen sowie schwach in Sertolizellen

(Robillard et al. 2012) die *breast cancer resistance proteins* (BCRP) nachgewiesen werden, die allesamt in die Familie der *ATP-binding cassette* (ABC) eingeordnet wurden (Su et al. 2011a). Die zweite große Familie der Transporter stellen die *solute carrier* (SLC) dar (Su et al. 2011a).

Innerhalb der Familie der MRPs erscheint der MRP4 aufgrund seiner Expression im Hoden und des Transports sulfatierter Steroide als ein aussichtsreicher Kandidat für den Transport sulfatierter Steroide bei Sertolizellen. Robillard et al. (2012) konnten in ihren Untersuchungen der humanen Sertolizell-Kultur HSECs nicht nur die Expression des MRP4 in Sertolizellen, sondern auch seine Lokalisation in der Plasmamembran nachweisen.

Die Mitglieder der ABC-Familie, wie das P-Glykoprotein (Mruk et al. 2011), das MRP1 (Bart et al. 2002) sowie das MRP4 (Robillard et al. 2012) werden jedoch als Transporter mit der Funktion von Efflux-Pumpen angesehen. Ein Transport sulfatierter Steroide in die Sertolizellen hinein und ein Weitertransport in die Keimzellen mittels der genannten Transporter erscheint vor diesem Hintergrund somit als nicht wahrscheinlich.

Als reine Influx-Transporter oder kombinierte Influx- / Efflux-Transporter werden die Angehörigen der SLC-Familie angesehen (Mruk et al. 2011). So wird im Rattenhoden der Slco6b1 in Sertolizellen exprimiert und seine Beteiligung am Transport von Dehydroepiandrosteronsulfat ist erwiesen (Su et al. 2011b).

Ein Transporter mit den Eigenschaften des Slco6b1 konnte am humanen Hoden bisher jedoch nicht nachgewiesen werden.

Die Fragestellung, wie sulfatierte Steroide die Keimzellen als Träger des SOAT erreichen können, bleibt somit vorerst offen.

I. Zusammenfassung

In der vorliegenden Doktorarbeit sollte a) die Expression sowie b) die zelluläre Lokalisation des SLC10A6 (SOAT) im humanen Hoden geklärt werden.

Der SOAT zeigt im Vergleich mit weiteren Gewebetypen vergleichsweise hohe Expression im Hoden und weist eine Transportaffinität für sulfatierte Steroide auf. Sulfatierte Steroide können aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften Zellmembranen nicht durch Diffusion passieren, sondern benötigen einen Transporter. Zudem sind sulfatierte Steroide biologisch nicht aktiv und können erst nach Desulfatierung an ihre entsprechenden Rezeptoren binden und eine biologische Antwort hervorrufen. Aufgrund seiner Eigenschaften ist der SOAT ein potentieller Kandidat für den Transport sulfatierter Steroide im humanen Hoden und somit für die lokale Bereitstellung von Androgenen und Östrogenen.

Die Untersuchungen wurden an Hodenbiopsien von Patienten durchgeführt, die eine normale Spermatogenese aufwiesen und Hodenbiopsien von Patienten mit gestörter Spermatogenese, bis hin zu einer völligen Abwesenheit von Keimzellen, dem *Sertoli Cell Only Syndrom*. Der Nachweis der Expression des SOAT erfolgte mittels TaqMan[®]-RT-qPCR, RT-PCR nach Laser-assistierter Mikrodissektion und *In-situ*-Hybridisierung.

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnte durch TaqMan[®]-RT-qPCR und RT-PCR nach Laser-assistierter Mikrodissektion gezeigt werden, dass der SOAT in Hodenbiopsien mit normaler Spermatogenese exprimiert wird. Der zelluläre

Nachweis des SOAT erfolgte mittels *In-situ*-Hybridisierung in Keimzellen, den primären Spermatozyten.

Für den Nachweis des SOAT Proteins wurden im Rahmen dieser Dissertation sechzehn Antikörper eingesetzt. Eine spezifische Färbung konnte jedoch bei keinem Antikörper beobachtet werden. Untersuchungen von Fietz et al. (2013) konnten das SOAT-Protein schließlich mittels eines Antikörpers gegen das Soat-Protein der Maus Soat_(m329-344) in Spermatozyten und teilweise in Spermatisiden nachweisen.

Da es sulfatierten Steroiden nicht möglich ist, die Blut-Hoden-Schranke ohne die Hilfe eines Transporters zu überwinden und so die Keimzellen zu erreichen, stellt sich die Frage nach der Funktion des SOAT in den Keimzellen des humanen Hodens.

Der Nachweis der Expression des SOAT erfolgte auch in drei Hodenbiopsien mit Spermatogenestörungen, die mit einer Infertilität einhergehen. Aufgrund der signifikant geringeren Expression des SOAT in Hodenbiopsien mit einer Hypospermatogenese kann vermutet werden, dass eine signifikant geringere Expression des SOAT mit einem verringertem Transport von sulfatierten Steroiden und in Folge mit einer reduzierten Bereitstellung von lokal verfügbaren Androgenen und Östrogenen einhergeht (Fietz et al. 2013). Diese Fragestellung könnte durch Untersuchungen der Spermatogenese von *Slc10a6-knockout* Mäusen weiterführend untersucht werden.

J. Summary

It was the aim of this doctoral thesis to elucidate a) the expression and b) the cellular localization of the sodium-dependent organic anion transporter SLC10A6 (SOAT) in human testis.

SOAT is predominantly expressed in human testis and shows specific transport for sulfated steroids. Because of their hydrophilic nature, sulfated steroids are not able to pass cell membranes and therefore need the help of a transporter. Moreover, sulfated steroids are not biologically active, only after desulfatation they can bind to their receptors to induce a biological response. SOAT is a potential candidate not only for transport of sulfated steroids in the human testis, but also for a local supply of androgens and estrogens.

The study included testicular biopsy showing normal spermatogenesis and spermatogenic impairment, including Sertoli cell only syndrome. Detection of SOAT mRNA was performed by TaqMan[®]-RT-qPCR, RT-PCR after laser-assisted microdissection and *in situ* hybridization.

TaqMan[®]-RT-qPCR and RT-PCR after LAM detected expression of SOAT in testicular biopsies showing normal spermatogenesis. SOAT was localized in germ cells, in primary spermatocytes by *in situ* hybridization.

For verification of SOAT protein distribution 16 antibodies were tested but none could give answer to the question of protein localization. Fietz et al. (2013) employed a new

SUMMARY

antibody against SOAT protein of mice (Soat_{m329-433}) and detected SOAT in spermatocytes and spermatid of various stages.

Due to inability for sulfated steroids to pass the blood-testis-barrier, the function of SOAT in spermatocytes is still not known.

SOAT could be verified in three testicular biopsies showing impaired spermatogenesis resulting in infertility. Fietz et al. confirmed a significant lower expression of SOAT in testicular biopsies showing hypospermatogenesis. It is suggested that the reduction or lack of SOAT expression might be related to a decreased local supply with androgens and estrogens (Fietz et al. 2013). Further studies with Slc10a6-knockout mice could corroborate this hypothesis.

K. Literaturverzeichnis

Augustine, L. M.; Markelewicz, R. J.; Boekelheide, K.; Cherrington, N. J. (2005): Xenobiotic and endobiotic transporter mRNA expression in the blood-testis barrier. *Drug Metab. Dispos* 33 (1), S. 182–189.

Badoud, F.; Grata, E.; Boccard, J.; Guillarme, D.; Veuthey, J. L.; Rudaz, S.; Saugy, M. (2011): Quantification of glucuronidated and sulfated steroids in human urine by ultra-high pressure liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 400 (2), S. 503–516.

Banerjee, A.; Swaan, P. W. (2006): Membrane topology of human ASBT (SLC10A2) determined by dual label epitope insertion scanning mutagenesis. New evidence for seven transmembrane domains. *Biochemistry* 45 (3), S. 943–953.

Bart, J.; Groen, H. J. M.; van der Graaf, W. T. A.; Hollema, H.; Hendrikse, N. H.; Vaalburg, W.; Sleijfer D. T.; de Vries E. G. E. (2002): An oncological view on the blood-testis barrier. *Lancet Oncol* 3 (6), S. 357–363.

Bergmann, M. (2005): Spermatogenese. Physiologie und Pathophysiologie. *Der Urologe* (44), S. 1131–1138.

Bergmann, M.; Nashan, D.; Nieschlag, E. (1989): Pattern of compartmentation in human seminiferous tubules showing dislocation of spermatogonia. *Cell Tissue Res* 256 (1), S. 183–190.

Bergmann, M.: Evaluation of Testicular Biopsy Samples from the Clinical Perspective. In: *Andrology for the clinician*. Schill, W.-B., Comhaire, F. H.; Hargreave, T. B. (eds) (2006) Berlin, New York, Springer, S.

- Bergmann, M.; Kliesch, S. (2010): Testicular Biopsy and Histology. In: *Andrology. Male reproductive health and dysfunction*. Nieschlag, E.; Behre, H. M.; Nieschlag, S. (2010) 3rd. Heidelberg, New York: Springer, S. 155-167
- Brookes, K. J.; Hawi, Z.; Kirley, A.; Barry, E.; Gill, M.; Kent, L. (2008): Association of the steroid sulfatase (STS) gene with attention deficit hyperactivity disorder. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet* 147B (8), S. 1531–1535.
- Carreau, S.; Hess, R. A. (2010): Oestrogens and Spermatogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci* 365, S. 1514-1535
- Clermont, Y. (1963): The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am. J. Anat* 112, S. 35–51.
- Döring, B. (2010): Molekulare und funktionale Charakterisierung des humanen sodium-dependent organic anion transporters (SOAT). *Inaugural Dissertation zur Erlangung des Grades eines Dr. oec.troph. beim Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Gießen; VVB Laufersweiler Verlag Gießen.*
- Döring, B.; Lütteke, T.; Geyer, J.; Petzinger, E. (2012): The SLC10 carrier family: transport functions and molecular structure. *Curr Top Membr* 70, S. 105–168.
- Dym, M.; Fawcett, D. W. (1970): The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol. Reprod* 3 (3), S. 308–326.
- Epstein, E. H.; Krauss, R. M.; Shackleton, C. H. (1981): X-linked ichthyosis: increased blood cholesterol sulfate and electrophoretic mobility of low-density lipoprotein. *Science* 214 (4521), S. 659–660.

Espina, V.; Wulfkühle, J. D.; Calvert, V. S.; VanMeter, A.; Zhou, W.; Coukos, G.; Geho D. H.; Petricoin III E. F.; Liotta L. A. (2006): Laser-capture microdissection. *Nat Protoc* 1 (2), S. 586–603.

Fernandes, C. F.; Godoy, J. R.; Döring, B.; Cavalcanti, M. C. O.; Bergmann, M.; Petzinger, E.; Geyer, J. (2007): The novel putative bile acid transporter SLC10A5 is highly expressed in liver and kidney. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 361 (1), S. 26–32.

Fietz, D. (2011): Molekularbiologische Untersuchungen des CAG-Repeats des humanen Androgenrezeptors und Korrelation mit der Histologie der Spermatogenese - Ist das CAG-Repeat ein molekularer Marker für männliche Infertilität? *Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet. am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.*

Fietz, D.; Bakhaus, K.; Wapelhorst, B.; Grosser, G.; Günther, S.; Alber, J.; Döring B; Kliesch S.; Weidner W.; Galuska C. E.; Hartmann M. F.; Wudy S. A.; Bergmann M.; Geyer J. (2013): Membrane transporters for sulfated steroids in the human testis - cellular localization, expression pattern and functional analysis. *PLoS ONE* 8 (5), S. e62638.

Fietz, D.; Ratzenböck, C.; Raabe, O.; Hartmann, K.; Kliesch, S.; Weidner, W.; Klug, J.; Bergmann, M. (2014): Expression pattern of estrogen receptors alpha and beta and G-protein-coupled estrogen receptor 1 in testes of fertile and infertile men. *Histochem Cell Biol.* 142 (4), S. 421-432

Friedrich, N.; Völzke, H.; Rosskopf, D.; Steveling, A.; Krebs, A.; Nauck, M.; Wallaschofski, H. (2008): Reference ranges for serum dehydroepiandrosterone sulfate and testosterone in adult men. *J. Androl* 29 (6), S. 610–617.

Gaucher, J.; Reynoird, N.; Montellier, E.; Boussouar, F.; Rousseaux, S.; Khochbin, S. (2010): From meiosis to postmeiotic events: the secrets of histone disappearance. *FEBS J* 277 (3), S. 599–604.

Geyer, J.; Wilke, T.; Petzinger, E. (2006): The solute carrier family SLC10: more than a family of bile acid transporters regarding function and phylogenetic relationships. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol* 372 (6), S. 413–431.

Geyer, J.; Döring, B.; Meerkamp, K.; Ugele, B.; Bakhiya, N.; Fernandes, C. F.; Godoy J. R.; Glatt H.; Petzinger E. (2007): Cloning and functional characterization of human sodium-dependent organic anion transporter (SLC10A6). *J. Biol. Chem* 282 (27), S. 19728–19741.

Geyer, J.; Godoy, J. R.; Petzinger, E. (2004): Identification of a sodium-dependent organic anion transporter from rat adrenal gland. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 316 (2), S. 300–306.

Ghosh, D. (2007): Human sulfatases: a structural perspective to catalysis. *Cell. Mol. Life Sci* 64 (15), S. 2013–2022.

Glatt, H. (2000): Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics. *Chem. Biol. Interact* 129 (1-2), S. 141–170.

Godoy, J. R.; Fernandes, C.; Döring, B.; Beuerlein, K.; Petzinger, E.; Geyer, J. (2007): Molecular and phylogenetic characterization of a novel putative membrane transporter (SLC10A7), conserved in vertebrates and bacteria. *Eur. J. Cell Biol* 86 (8), S. 445–460.

Gomes, R. L.; Meredith, W.; Snape, C. E.; Sephton, M. A. (2009): Analysis of conjugated steroid androgens: deconjugation, derivatisation and associated issues. *J Pharm Biomed Anal* 49 (5), S. 1133–1140.

Greven (2008): Hydrolyse und Transport sulfatierter Steroide in den Plazentomen des Rindes: Charakterisierung der Expression und der Funktionen von Steroidsulfatase (StS) und des Natrium-dependent Organic Anion Transporters (SOAT). *Dissertation Justus-Liebig-Universität Gießen*.

Griswold, M. D. (1998): The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol* 9 (4), S. 411–416.

Griswold, M. D. (2005): Sertoli Cell Gene Expression and Protein Expression. *Sertoli Cell Biology*, S. 95–196.

Hagenbuch, B.; Meier, P. J. (1994): Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na⁺/bile acid cotransporter. *J. Clin. Invest* 93 (3), S. 1326–1331.

Hess, R. A. (2003): Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reprod. Biol. Endocrinol* 1, S. 52-65.

Hobkirk, R. (1985): Steroid sulfotransferases and steroid sulfate sulfatases: characteristics and biological roles. *Can. J. Biochem. Cell Biol* 63 (11), S. 1127–1144.

Horn, F.; Lindenmeier, G.; Moc, I.; Grillhösl, C.; Berghold, S.; Schneider, N.; Münster, B. (2003): *Biochemie des Menschen*. 2. Korrigierte Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.

Johnsen, S. G. (1970): Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* 1 (1), S. 2–25.

Kawano, A.; Payne, A. H.; Jaffe, R. B. (1973): Gonadal steroid sulfates and sulfatase. VI. Comparative metabolism in isolated seminiferous tubules and minces of human testis. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 37 (3), S. 441–447.

Kent, L.; Emerton, J.; Bhadravathi, V.; Weisblatt, E.; Pasco, G.; Willatt, L. R.; McMahon R.; Yates J. R. W. (2008): X-linked ichthyosis (steroid sulfatase deficiency) is associated with increased risk of attention deficit hyperactivity disorder, autism and social communication deficits. *J. Med. Genet* 45 (8), S. 519–524.

Kopera, I. A.; Bilinska, B.; Cheng, C. Y.; Mruk, D. D. (2010): Sertoli-germ cell junctions in the testis: a review of recent data. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci* 365 (1546), S. 1593–1605.

Koskimies, A. I.; Kormano, M., Alfthan, O. (1973): Proteins of the seminiferous tubule fluid in man-evidence for a blood-testis barrier. *J. Reprod. Fertil.* 32, 79-86

Kríz, L.; Bicíková, M.; Hampl, R. (2008): Roles of steroid sulfatase in brain and other tissues. *Physiol Res* 57 (5), S. 657–668.

Laatikainen, T.; Laitinen, E. A.; Vihko, R. (1971): Secretion of free and sulfate-conjugated neutral steroids by the human testis. Effect of administration of human chorionic gonadotropin. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 32 (1), S. 59–64.

Labrie, F.; Luu-The, V.; Labrie, C.; Simard, J. (2001): DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: intracrinology. *Front Neuroendocrinol* 22 (3), S. 185–212.

Lykkesfeldt, G.; Bennett, P.; Lykkesfeldt, A. E.; Micic, S.; Rørth, M.; Skakkebaek, N. E.; Svenstrup, B. (1991): Testis cancer. Ichthyosis constitutes a significant risk factor. *Cancer* 67 (3), S. 730–734.

Lykkesfeldt, G.; Høyer, H.; Lykkesfeldt, A. E.; Skakkebaek, N. E. (1983): Steroid sulphatase deficiency associated with testis cancer. *Lancet* 2 (8365-66), S. 1456.

Lykkesfeldt, G.; Müller, J.; Skakkebaek, N. E.; Bruun, E.; Lykkesfeldt, A. E. (1985): Absence of testicular steroid sulphatase activity in a boy with recessive X-linked ichthyosis and testicular maldescent. *Eur. J. Pediatr* 144 (3), S. 273–274.

Mayerhofer, A.; Vogt, H. J.; Zanner, R. (2005): Männliche Geschlechtsorgane. In: Manfred Gratzl (Hg.): Histologie. 6., neu übersetzte, überarbeitete und aktualisierte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg (Springer-Lehrbuch), S. 369-384.

Meloun, M.; Hill, M.; Vceláková-Havlíková, H. (2009): Minimizing the effects of multicollinearity in the polynomial regression of age relationships and sex differences in serum levels of pregnenolone sulfate in healthy subjects. *Clin. Chem. Lab. Med* 47 (4), S. 464–470.

Morris, K. T.; Toth-Fejöl, S.; Schmidt, J.; Fletcher W. S.; Pommier, R. F. (2001): High dehydroepiandrosterone-sulfate predicts breast cancer progression during new aromatase inhibitor therapy and stimulates breast cancer cell growth in tissue culture: a renewed role for adrenalectomy. *Surgery* 130 (6): 947-953

Mruk, D. D.; Su, L.; Cheng, C. Y. (2011): Emerging role for drug transporters at the blood-testis barrier. *Trends Pharmacol. Sci* 32 (2), S. 99–106.

Nakamura, Y.; Suzuki, T.; Fukuda, T.; Ito, A.; Endo, M.; Moriya, T.; Arai Y.; Sasano H. (2006): Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human prostate cancer. *Prostate* 66 (9), S. 1005–1012.

Noll, S.; Höfler, H.; Schaub-Kuhnen, S. (2000): Praxis der Immunhistochemie. 1. Aufl. München (u.a.): Urban & Fischer.

Payne, A. H.; Jaffe, R. B.; Abell, M. R. (1971): Gonadal steroid sulfates and sulfatase. 3. Correlation of human testicular sulfatase, 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase, histologic structure and serum testosterone. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 33 (4), S. 582–591.

Payne, A. H.; Kawano, A.; Jaffe, R. B. (1973): Formation of dihydrotestosterone and other 5 alpha-reduced metabolites by isolated seminiferous tubules and suspension of interstitial cells in a human testis. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 37 (3), S. 448–453.

Payne, A. H.; Mason, M.; Jaffe, R. B. (1969): Testicular steroid sulfatase. Substrate specificity and inhibition. *Steroids* 14 (6), S. 685–704.

Ratzenböck, C. (2014): Lokalisation und Expression des Östrogenrezeptors alpha und Zusammenhang zwischen der mitotischen Aktivität der Spermatogonien und dem peripheren Östrogenwert im menschlichen Hoden mit normaler und gestörter Spermatogenese. *Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Dr. med. Vet. beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, VVB Laufersweiler Verlag.*

Reed, M. J.; Purohit, A.; Woo, L. W. L.; Newman, S. P.; Potter, B. V. L. (2005): Steroid sulfatase: molecular biology, regulation, and inhibition. *Endocr. Rev* 26 (2), S. 171–202.

Robillard, K. R.; Hoque, T.; Bendayan, R. (2012): Expression of ATP-binding cassette membrane transporters in rodent and human sertoli cells: relevance to the permeability of antiretroviral therapy at the blood-testis barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 340 (1), S. 96–108.

Ruokonen, A. (1978): Steroid metabolism in testis tissue: the metabolism of pregnenolone, pregnenolone sulfate, dehydroepiandrosterone and

dehydroepiandrosterone sulfate in human and boar testes in vitro. *J. Steroid Biochem* 9 (10), S. 939–946.

Ruokonen, A.; Laatikainen, T.; Laitinen, E. A.; Vihko, R. (1972): Free and sulfate-conjugated neutral steroids in human testis tissue. *Biochemistry* 11 (8), S. 1411–1416.

Ruokonen, A.; Vihko, R. (1974): Steroid metabolism in human and boar testis tissue. Steroid concentrations and the position of the sulfate group in steroid sulfates. *Steroids* 23 (1), S. 1–16.

Schumacher, V.; Gueler, B.; Looijenga, L. H. J.; Becker, J. U.; Amann, K.; Engers, R.; Dotsch J.; Stoop H.; Schulz W.; Royer-Pokora B. (2008): Characteristics of testicular dysgenesis syndrome and decreased expression of SRY and SOX9 in Frasier syndrome. *Mol. Reprod. Dev* 75 (9), S. 1484–1494.

Secky, L.; Svoboda, M.; Klameth, L.; Bajna, E.; Hamilton, G.; Zeillinger, R.; Jäger W.; Thalhammer T. (2013): The sulfatase pathway for estrogen formation: targets for the treatment and diagnosis of hormone-associated tumors. *J Drug Deliv* 2013, S. 957605.

Sharpe, R. M.; McKinnell, C.; Kivlin, C.; Fisher, J. S. (2003): Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 125 (6), S. 769–784.

Splinter, P. L.; Lazaridis, K. N.; Dawson, P. A.; LaRusso, N. F. (2006): Cloning and expression of SLC10A4, a putative organic anion transport protein. *World J. Gastroenterol* 12 (42), S. 6797–6805.

Sreedharan, S.; Stephansson, O.; Schiöth, H. B.; Fredriksson, R. (2011): Long evolutionary conservation and considerable tissue specificity of several atypical solute carrier transporters. *Gene* 478 (1-2), S. 11–18.

Srivastava, A.; Kreiger, N. (2004): Cigarette smoking and testicular cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 13 (1), S. 49–54.

Steckelbroeck, S.; Nassen, A.; Ugele, B.; Ludwig, M.; Watzka, M.; Reissinger, A.; Clusmann H.; Lütjohann D.; Siekmann L.; Klingmüller D.; Hans V. H. (2004): Steroid sulfatase (STS) expression in the human temporal lobe: enzyme activity, mRNA expression and immunohistochemistry study. *J. Neurochem* 89 (2), S. 403–417.

Steger, K. (2005): Protamin als Prognosefaktor für den Erfolg einer testikulären Spermienextraktion (TESE). *Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie* (2(1)), S. 13–17.

Steger, K.; Klonisch, T.; Gavenis, K.; Drabent, B.; Doenecke, D.; Bergmann, M. (1998): Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis. *Mol. Hum. Reprod* 4 (10), S. 939–945.

Stergiakouli, E.; Langley, K.; Williams, H.; Walters, J.; Williams, N. M.; Suren, S.; Giegling I.; Wilkinson L. S.; Owen M. J. O'Donovan M. C.; Rujescu D.; Thapar A.; Davies W. (2011): Steroid sulfatase is a potential modifier of cognition in attention deficit hyperactivity disorder. *Genes Brain Behav* 10 (3), S. 334–344.

Strauss, J. F.; Martinez, F.; Kiriakidou, M. (1996): Placental steroid hormone synthesis: unique features and unanswered questions. *Biol. Reprod* 54 (2), S. 303–311.

Su, L.; Mruk, D. D.; Cheng, C. Y. (2011a): Drug transporters, the blood-testis barrier, and spermatogenesis. *J. Endocrinol* 208 (3), S. 207–223.

Su, L.; Mruk, D. D.; Lee, W. M.; Cheng, C. Y. (2011b): Drug transporters and blood--testis barrier function. *J. Endocrinol* 209 (3), S. 337–351.

Suárez-Quian, C. A.; Martínez-García, F.; Nistal, M.; Regadera, J. (1999): Androgen receptor distribution in adult human testis. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 84 (1), S. 350–358.

Svechnikov, K.; Landreh, L.; Weisser, J.; Izzo, G.; Colón, E.; Svechnikova, I.; Söder, O. (2010): Origin, development and regulation of human Leydig cells. *Horm Res Paediatr* 73 (2), S. 93–101.

Traupe, H.; Happle, R. (1983): Clinical spectrum of steroid sulfatase deficiency: X-linked recessive ichthyosis, birth complications and cryptorchidism. *Eur. J. Pediatr* 140 (1), S. 19–21.

Ugele, B.; Simon, S. (1999): Uptake of dehydroepiandrosterone-3-sulfate by isolated trophoblasts from human term placenta, JEG-3, BeWo, Jar, BHK cells, and BHK cells transfected with human steryl-sulfatase-cDNA. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol* 71 (5-6), S. 203–211.

Walker, W. H. (2010): Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci* 365 (1546), S. 1557–1569.

Weinbauer, G. F.; Luetjens, C. M.; Simoni, M.; Nieschlag, E. (2010): Physiology of Testicular Function. In: Eberhard Nieschlag, Hermann M. Behre und Susan Nieschlag (Hg.): *Andrology, Male Reproductive Health and Dysfunction*. Unter Mitarbeit von E. Nieschlag, H. M. Behre und S. Nieschlag. 3. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer, S. 11-59.

Weinman, S. A.; Carruth, M. W.; Dawson, P. A. (1998): Bile acid uptake via the human apical sodium-bile acid cotransporter is electrogenic. *J. Biol. Chem* 273 (52), S. 34691-34695.

L. Anhang

a. Puffer, Nährböden und Lösungen

a) Bouinsche Lösung

Menge	Reagenz	Hersteller	Anleitung
210 mL	gesättigte wässrige Pikrinsäure	Sigma	Formalin filtern; mit Pikrinsäure mischen und vor Gebrauch Eisessig zugeben. Proben mit 10x Menge Bouin 24h fixieren.
70 mL	konzentriertes Formalin, 36,5-38%	Sigma	
10 mL	konzentrierte Essigsäure, 100% (Eisessig)	Merck	

b) 10x TAE pH 8,0 für SYBR Green

Menge	Reagenz	Hersteller	Anleitung
48,40 g	TRIZMA Base	Sigma	Alle Komponenten mischen; einstellen des pH-Wertes auf 8.0 mit 4N NaOH; Gebrauchslösung: 100mL 10x TAE + 900mL A. bidest
3,72 g	EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Sigma	
ad 1 L	steriles A. bidest		

c) Loading Dye für Agarosegele

Menge	Reagenz	Hersteller	Anleitung
0,25 mL	Bromphenolblau-Stammlösung	Sigma	Mischen der Komponenten und gründliches Rühren auf dem Magnetrührer, da Ficoll® 400 lange zum Lösen braucht. Filtrieren und Aliquotieren.
0,25 mL	Xylencyanol-Stammlösung	Sigma	
1,5 g	Ficoll® 400	Serva	
1,5 mL	0,5 M EDTA	Sigma	
ad 10 mL	1x TAE Puffer (s.o.)		

d) LB-Agar

Menge	Reagenz	Hersteller	Anleitung
10 St.	LB-Agar-Medium Kapseln	Bio101	Kapseln mit H ₂ O in handelsüblichem Dampfkochtopf für 20min kochen, nach dem Abkühlen Zugabe des Ampicillins und Gießen der Platten.
25 mg	Ampicillin-Natriumsalz (1%)	BioChemica	
250 mL	steriles A. bidest		

ANHANG

e) LB-Medium

Menge	Reagenz	Hersteller	Anleitung
5 St.	LB-Medium Kapseln	MP Biomedicals	Kapseln mit H ₂ O in handelsüblichem Dampfkochtopf für 15min kochen, Lagerung bei 4°C.
200 mL	steriles A. bidest		

f) XGal-Lösung

Menge	Reagenz	Hersteller	Anleitung
20 mg	XGal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid)	Invitrogen	Mischen und aliquotieren; Lagerung bei -20°C.
1 mL	N,N-Dimethylformamid	Sigma	

g) ITPG-Lösung

Menge	Reagenz	Hersteller	Anleitung
20 mg	IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	Appligene	Mischen und aliquotieren; Lagerung bei -20°C.
1 mL	steriles A. bidest		

h) 4N NaOH

Menge	Reagenz	Hersteller	Anleitung
8 G	Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck	Mischen auf dem Magnetrührer.
ad 50 mL	steriles A. bidest		

i) 0,1M Tris/HCl pH 7,3 in DEPC

Menge	Reagenz	Hersteller	Anleitung
1,21 g	Tris (Pufferan, ≥ 99.9% p.a.)	Sigma	Alle Komponenten mischen und mit HCl auf einen pH-Wert von 7.3 einstellen. Lagerung bei -20°C.
ca. 5 mL	konzentrierte Salzsäure (25%)	Roth	
ad 100 mL	DEPC-H ₂ O (s.u.)		

ANHANG

j) DEPC-H₂O

Menge	Reagenz	Hersteller	Anleitung
2 mL	Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma	Mischen und inkubieren für 24h bei 37°C; danach autoklavieren.
2 L	steriles A. bidest		

k) 20x SSC-Puffer

Menge	Reagenz	Hersteller	Anleitung
88,23 g	Natriumcitrat	Sigma	Alle Komponenten mischen und auf einen pH-Wert von 7 einstellen; über Nacht inkubieren; danach autoklavieren.
175,29 g	Natriumchlorid	Merck	
1 L	Steriles A. bidest		
1 ml	DEPC-H ₂ O		

l) 1x PBSM-Puffer

Menge	Reagenz	Hersteller	Anleitung
1 ml	1 M Magnesiumchlorid		81,4 g Magnesiumchlorid in 400 ml DEPC-H ₂ O lösen. Alle Komponenten mischen und im Kühlschrank aufbewahren.
2 Tb	PBS Tabletten	Sigma	
200 ml	DEPC-H ₂ O		

m) 10x TNMT-Puffer

Menge	Reagenz	Hersteller	Anleitung
121,1 g	Tris HCl		Alle Komponenten mischen und auf einen pH-Wert von 7.5 einstellen; über Nacht inkubieren und danach autoklavieren. Nach dem Erkalten 5 ml TritonX zugeben.
58,4 g	Natriumchlorid		
4,17 g	Magnesiumchlorid		
1 L	DEPC-H ₂ O		
5 ml	TritonX	Merck	

ANHANG

n) Citratpuffer

Menge	Reagenz	Hersteller	Anleitung
7 ml	Stammlösung A		Stammlösung A: 4,2 g Citronensäuremonohydrat in 200 ml Aqua Bidest lösen. Stammlösung B: 29,41 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat in 1 L Aqua Bidest lösen. Alle Komponenten mischen.
41 ml	Stammlösung B		
500 ml	A. bidest		

o) 4% Paraformaldehyd

Menge	Reagenz	Hersteller	Anleitung
20 g	Paraformaldehyd		Komponenten unter Erhitzung auf 60°C rühren; auf pH-Wert 7.0 einstellen; Portionsweise Lagerung bei -20°C.
500 ml	1x PBSM-Puffer		

p) Denhardt Reagenz (BFP)

Menge	Reagenz	Hersteller	Anleitung
200 mg	bovines Serumalbumin (2%)	NEB	Alle Komponenten mischen und Aliquots herstellen.
200 mg	Ficoll 400 (2%)	Serva	
200 mg	Polyvinylpyrrolidon (2%)		
10 ml	DEPC-H ₂ O		

q) 2% Glycin Lösung

Menge	Reagenz	Hersteller	Anleitung
200 mg	Glycin	Merck	Komponenten mischen.
100 ml	PBSM-Puffer		

ANHANG

r) 20% Glycerol Lösung

Menge	Reagenz	Hersteller	Anleitung
15 ml	99,5% Glycerol	Roth	Komponenten mischen.
60 ml	DEPC-H ₂ O		

s) Levamisol

Menge	Reagenz	Hersteller	Anleitung
1 ml	1M Levamisol		2,4g Levamisol in 10ml 1x NTB-Puffer lösen; zu 1ml aliquotieren; Lagerung bei -20°C. Komponenten mischen.
200 ml	1x NTB		

t) 3% Wasserstoffperoxid

Menge	Reagenz	Hersteller	Anleitung
54 ml	30%iges Wasserstoffperoxid		Alle Komponenten mischen.
6 ml	Methanol		

b. Reagenzien

Reagenz	Hersteller
SP6-RNA-Polymerase	Promega, Heidelberg, Deutschland
T7-RNA Polymerase	Promega, Heidelberg, Deutschland
10x DIG-RNA Labeling Mix	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
10x PCR Gold Buffer	AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA
ABC-Standard-Kit Peroxidase	Biologo, Kronshagen, Deutschland
AEC-Peroxidase-Substratkit	Biologo, Kronshagen, Deutschland
Agarose FineRes	Bioline, London, UK
Anti-DIG-Fab-Antikörper	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
Ampicillin-Natriumsalz, 1%	BioChemica über AppliChem, Darmstadt, Deutschland
APAAP-Kit	Dako, Hamburg, Deutschland
APES (3-Aminopropyl-triethoxysilan)	Merck GmbH, Darmstadt, Deutschland
bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs, Ipswich, Boston, MA, USA
DAB-Peroxidase-Substratkit	Biologo, Kronshagen, Deutschland
D-(+)-Glucose	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
DNase I, recombinant, 10 U/L	Roche über Invitrogen Ltd., Paisley, UK
EcoRI	New England Biolabs, Ipswich, Boston, MA, USA
Eosin G-Lösung, 0.5% wässrig	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure, 99-100% zur Synthese	Merck GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethanol ROTIPURAN [®] , ≥99,8%, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Disodium, analytical grade	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ficoll [®] 400, molecular biology grade	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Formalin, 36.5-38% molecular grade	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

ANHANG

Formamid, deionisiert	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
GeneAmp [®] dNTP blend, 10 mM	AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA
Glycin	Merck GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glycerol, $\geq 99,5\%$, Ph.Eur. wasserfrei	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
GoldAmplitaq [®] Polymerase	AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA
Hämalaunlösung, sauer, nach Mayer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Appligene Oncor Lifescreen, Watford, UK
LB-Agar-Medium, Kapseln	Bio101 Inc., Vista, CA, USA
LB-Medium, Kapseln	MP Biomedicals, Irvine, CA, USA
Lithiumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid für PCR, 25 mM	AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA
MultiScribe [®] Reverse Transcriptase, 5 U/L	AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA
Methanol	Merck GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid, Plätzchen	Merck GmbH, Darmstadt, Deutschland
NBT-BCIP-Färbelösung	Roche, Mannheim, Deutschland
Nco I restriction enzyme, 10000 U/mL	New England Biolabs, Ipswich, Boston, MA, USA
Not I restriction enzyme, 10000 U/mL	New England Biolabs, Ipswich, Boston, MA, USA
OneShot [®] TOP10 Chemically Competent E.coli	Invitrogen Ltd., Paisley, UK
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS Tabletten	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
pCRII [®] TOPO [®] TA Cloning Vector	Invitrogen Ltd., Paisley, UK
Pikrinsäure	Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu-Ulm, Deutschland
Proteinase K	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Quantitas 50bp-2kb DNA Leiter	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland

ANHANG

Random Hexamers, 50 mM	AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA
RNase Inhibitor, 20 U/L, 2000 U	AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA
RNase Inhibitor 40 U/L, 2500 U	Ambion über AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA
Salzsäure, konzentriert 25%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
S.O.C. Medium	Invitrogen Ltd., Paisley, UK
SYBR [®] Green I nucleic acid gel stain	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
TRIS Pufferan [®] , ≥ 99.9% p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TritonX	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trizma [®] Base, ≥ 99,9%	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Vitro-Clud [®]	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Wasserstoffperoxid 3%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
XGal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid)	Invitrogen Ltd., Paisley, UK
XyloI ROTIPURAN [®] , ≥ 99,8% p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Yeast Extract	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

c. Verbrauchsmaterialien und Geräte

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Einmal-Kulturröhrchen, 14 mL mit Deckel	Greiner BioOne über MAGV, Kremsmünster, Österreich
FilterTip 0,5-10µL, 0-20µL, 0-100µL, 0-200µL, 0-1000µL	Nerbe plus, Winsen/Luhe, Deutschland
MembranSlide 1.0 PEN	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Microseal ‚B‘ Adhesive Seals, optical	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Multiplate™ 96-Well PCR Plates	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
MicroTube 500	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Mineralöl, für die Mikrobiologie	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Multi [®] -Reaktionsgefäß 650µL, 2mL	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

ANHANG

Multi [®] -SafeSeal [®] Tubes 1.7mL	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
PCR Tubes 650µL	Nerbe plus, Winsen/Luhe, Deutschland
Petrischalen mit Nocken, Polystyrol, steril, Ø 90 mm	Nunc über Thermo Fischer Scientific, Langenselbold, Deutschland
Pipettenspitzen gelb 200µl, blau 1000µL	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
QIAamp DNA Micro Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit No. 27104	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Micro Kit, FFPE Tissue Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Röhrchen, 50 mL, PP, konischer Boden	Greiner BioOne über MAGV, Kremsmünster, Österreich
SuperFrost Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
TwistTop Vials 1.5mL, TwistTop Vial Caps	Sorenson BioScience Inc., Salt Lake City, UT, USA
µltraAmp PCR Plate, low profile	Sorenson BioScience Inc., Salt Lake City, UT, USA
UV-Küvette mikro, 8.5 mm Zentrums- höhe	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland

Geräte	Hersteller
Agagel Mini Horizontal Gel Electrophoresis	Biometra, Göttingen, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Brutschrank mit Rüttelplatte	WTB Binder, Tuttlingen, Deutschland
CFX96 [™] Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
CFX96 [™] Manager Software Version 1.6	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
DakoPen	Dako, Hamburg, Deutschland
EG 1160 Einbettter	Leica, Solms, Deutschland
Frigocut AM 2800	Reichert-Jung, Nussloch, Deutschland
PALM MicrBean System mit PALM Robo Software	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
inoLab pH-Meter	WTW, Weilheim, Deutschland

ANHANG

Mikrowelle, Privileg 8020	Quelle, Fürth, Deutschland
MR3003 Magnetrührer mit Heizfunktion	Heidolph, Schwabach, Deutschland
PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
PowerPac 200 Power Supply	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Reax Control Vortexer	Heidolph, Schwabach, Deutschland
SM 2000R Mikrotom	Leica, Solms, Deutschland
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
TB1 Thermoblock	Biometra, Göttingen, Deutschland
UVsolo Transilluminator	Biometra, Göttingen, Deutschland
UVIdoc	Biometra, Göttingen, Deutschland
Variomag Electronicrührer	Variomag über Thermo Fischer Scientific, Langenselbold, Deutschland
Zentrifuge Hettich Mikro 120	Hettich über MAGV GmbH, Rabenau, Deutschland

DANKSAGUNG

Als erstes möchte ich Prof. Dr. Bergmann als meinem Betreuer für das Überlassen dieses Themas und besonders für seine Betreuung und Unterstützung danken. Jedes „Geht doch!“ spornte zu weiteren Leistungen an, und die gemeinsame Arbeit in der FOR1369 hat mich fachlich und menschlich weitergebracht. Chef, ein großes Danke für diese schöne Zeit.

Dani, dir möchte ich besonders danken. Du hast mich nicht nur in die Arbeit im S1-Labor eingeführt, sondern warst weit darüber hinaus über den gesamten Zeitraum in Gießen und auch jetzt noch eine riesige Hilfe, Rückhalt und gute Freundin. Im ersten Schritt der Arbeit durchgeführte Versuche und Interpretationen der Ergebnisse geschahen gemeinsam mit dem Chef und dir in Gießen, der schriftliche Teil in Kronshagen, doch trotz der räumlichen Distanz wurde meine Arbeit jederzeit vom Chef und dir unterstützt. Ohne Ihren / deinen Rückhalt auf die Entfernung wäre diese Dissertation bei meiner hiesigen Arbeitsbelastung nichts mehr geworden. Danke! Dani, so gerne erinnere ich mich an unsere gemeinsame Zeit im Büro, an Kaffee, Kekse und konstruktive Gespräche mit dir, dazu waren die „persönliche Glücksmelodie“ , „Huhu, Frau Suhrbier!“ und viel Lachen immer dabei.

Ein großes Danke geht an Jutta. Du hast mit immer weiteren neuen Ideen und unermüdlichem Elan jeden SOAT-Antikörper durch die Immunhistochemie geführt und mit der *In-situ*-Hybridisierung mehrere Kämpfe ausgestanden. Dem gesamten Laborteam, um Jutta, Alex, Katrin, Susi, Roswitha und Jörg danke ich für Gespräche und Hilfestellungen sowie für Schokolade und Cappuccino zum Aufmuntern.

Danke an Prof. Dr. Geyer (Achim), Barbara, Katharina und dem Team der VetMed Pharma für die Unterstützung, auch wenn jeder neue SOAT-Antikörper gefürchtet war.

Freunde, weit vorne genannt Sandra und Lasse, die bei vielen gemeinsamen Spaziergängen mit den Hunden in Gießen, Fortschritte und Rückschläge im Labor mitbekommen haben, danke für Hilfe, Geduld, anregende Gespräche und Ablenkung.

Nicola und Else, mit euch machen Wildpark Eekholt, Waffeln mit Erdbeeren und Sahne in Steinwehr und besonders Dierhagen richtig Spaß. Danke für die schöne gemeinsame Zeit in Kiel, für Freundschaft und Rückhalt. Alles Gute für Potsdam.

Andrea, ein großes Danke für Figo, deine Freundschaft und moralische Unterstützung und deine besondere Fähigkeit, die richtigen Kommentare zum genau richtigen Zeitpunkt zu geben. Freue mich auf die nächsten Kaffee mit dir.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, für alles, was sie bisher, dabei insbesondere während der Zeit meines Studiums und meiner Dissertation für mich getan haben. Euer Vertrauen und Unterstützung haben mir den Rücken freigehalten. Dazu Reiner und Elke, die gemeinsam mit meinen Eltern immer an mich geglaubt haben. Auslandseinsatz, Doktorarbeit, lasst uns ein Guinness trinken gehen!

Figo, mein Hund in Studium, Doktorarbeit und Bundeswehr, du bekommst große Stücke getrockneter Rinderlunge, neues Spielzeug und Spaziergänge am Strand.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-6251-4



9 17 8 3 8 3 5 19 6 2 5 1 4