

**„Transkriptionelle Steuerung der Spermatogenese
in postmeiotischen Keimzellen
von *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) –
eine *in vitro*-Untersuchung isolierter Tubuli seminiferi“**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg**

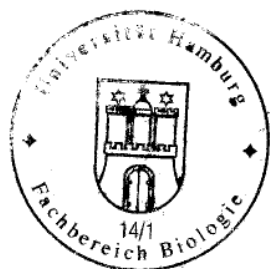
vorgelegt von

Sandra Danner
aus Hamburg

Hamburg 2005

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. R. IVELL
Weitere Gutachterin der Dissertation:
Frau Professor Dr. S. DOBLER
Tag der Disputation: 26. August 2005

Hamburg, den 12. August 2005



Professor Dr. Arno Frühwald
Dekan

Die vorliegende Arbeit wurde am „Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung (IHF)“ an der Universität Hamburg und in der Arbeitsgruppe „Molekulare Andrologie“ am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

1. Dissertationsgutachter: Prof. Dr. R. Ivell (School of Molecular and Biomedical Sciences, Adelaide)
2. Dissertationsgutachterin: Prof. Dr. S. Dobler (Biozentrum Grindel, Hamburg)

Inhaltsverzeichnis	I–III
1 Einleitung	1
1.1 Organisation des Hodens.....	1
1.2 Spermatogenese.....	3
1.2.1 Phasen der Spermatogenese.....	3
1.2.1.1 Proliferative Phase.....	4
1.2.1.2 Meiotische Phase.....	5
1.2.1.3 Spermiogenese.....	5
1.2.2 Zyklus und Welle der Spermatogenese.....	8
1.3 Die Rolle der Sertolizellen.....	10
1.4 Hormonelle Kontrolle der Spermatogenese.....	13
1.5 Transkriptionskontrolle in männlichen Keimzellen.....	14
1.5.1 Herkunft der Keimzell-Transkripte.....	15
1.5.1.1 Ubiquitär exprimierte Gene.....	15
1.5.1.2 Keimzell-spezifische Homologe somatisch exprimierter Gene.....	15
1.5.1.3 Transkript-Varianten somatischer Gene.....	16
1.5.1.4 Testis-spezifische Gene und haploid-spezifische Genexpression.....	17
1.5.2 Methoden der Promotoranalyse in postmeiotischen Keimzellen.....	17
1.5.2.1 Experimente zur DNA-Protein-Bindung.....	17
1.5.2.2 Experimente zur <i>in vitro</i> -Transkription.....	18
1.5.2.3 Transgene Tiere und <i>in vivo</i> -Gentransfer.....	18
1.5.2.4 Sertolizell-Keimzell-Kokultur und Kultivierung testikulärer Tubuli.....	19
1.5.2.5 Etablierte Zelllinien.....	19
1.5.3 Transkriptionelle Regulation und beteiligte Transkriptionsfaktoren.....	20
1.5.4 Regulation der Translation.....	22
1.5.5 Methylierung.....	23
1.5.6 Postmeiotische Genexpression in männlichen Keimzellen.....	23
1.5.6.1 Proakrosin.....	24
1.5.6.2 Protamin.....	24
1.5.6.3 SP-10.....	25
1.6 Das <i>Endozepine-like peptide</i>	26
1.7 Ziel der Arbeit.....	29
2 Material und Methoden	31
2.1 Material.....	31
2.1.2 Reaktions- und Färbe- <i>Kits</i>	32
2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	32
2.1.4 Geräte.....	33
2.1.5 Puffer und Lösungen.....	34
2.1.6 Enzyme.....	35
2.1.7 Molekulargewichtsmarker.....	35
2.1.8 Kulturmedien.....	35
2.1.8.1 Kulturmedium für Bakterien.....	35
2.1.8.2 TKM-Kulturmedium für isolierte Ratten-Hodenkanälchen.....	36
2.1.8.3 Kulturmedium für SK11-Zelllinie.....	36
2.1.9 Tiere und biologisches Material.....	37
2.1.9.1 Versuchstiere.....	37
2.1.9.2 Eukaryotische Zelllinie.....	37
2.1.9.3 Bakterien.....	37
2.1.10 Antikörper.....	37

2.1.10.1 Primärer Antikörper	37
2.1.10.2 Sekundäre Antikörper	37
2.1.11 Oligonukleotide	37
2.1.12 Vektoren.....	38
2.2 Methoden.....	40
2.2.1 Bakterien.....	40
2.2.1.1 Transformation und Aufzucht von Bakterien	40
2.2.1.2 „Mini“-Präparation von Plasmid-DNA.....	40
2.2.1.3 „Midi“-Präparation von Plasmid-DNA.....	40
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	40
2.2.2.1 PCR (<i>polymerase chain reaction</i>).....	40
2.2.2.2 Restriktion von Plasmid-DNA	43
2.2.2.3 Auffüllen von überhängenden Enden.....	43
2.2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	43
2.2.2.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten	43
2.2.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten	44
2.2.3 Zellkultur und proteinbiochemische Methoden.....	44
2.2.3.1 Kultur von isolierten Ratten-Hodenkanälchen.....	44
2.2.3.2 Kultur von SK11-Zelllinie	45
2.2.3.3 Transiente Transfektion	45
2.2.3.3.1 Transfektion von isolierten Ratten-Hodenkanälchen mittels Elektroporation	45
2.2.3.3.2 Transfektion von SK11-Zellen mittels Lipofektion	48
2.2.3.4 Luziferase-Assay von SK11-Zellen	48
2.2.3.5 Luziferase-Assay von kultivierten Hodenkanälchen.....	49
2.2.3.6 Kryoschnitte	49
2.2.3.7 Cytospinpräparate.....	49
2.2.3.8 Hämalaunfärbung von Kryoschnitten	49
2.2.3.9 Fluoreszenzfärbung von Zellkern und Akrosom.....	50
2.2.3.10 Immunohistochemie.....	50
2.2.3.11 <i>Live-Dead</i> -Assay von kultivierten Hodenkanälchen.....	51
2.2.3.12 Apoptose-Nachweis auf Tubuli-Kryoschnitten.....	52
3 Ergebnisse	54
3.1 Etablierung eines <i>in vitro</i> -Systems für die Transfektion isolierter Ratten-Hodenkanälchen.....	54
3.1.1 Lichtmikroskopische Analyse der isolierten und kultivierten Hodenkanälchen.....	54
3.1.2 Analyse der Morphologie des Keimepithels in isolierten und kultivierten Hodenkanälchen anhand von Kryoschnitten	58
3.1.3 Analyse der Expression des <i>Endozepine-like peptide</i> (ELP) im Rattenhoden und in kultivierten Tubuli seminiferi.....	66
3.2 Etablierung des Transfektionssystems.....	70
3.2.1 Einstellung der Elektroporationsparameter.....	70
3.2.2 Analyse der Transfektionseffizienz in Bezug auf verschiedene Stadien	73
3.2.3 Analyse der Zellschädigung nach Injektion und Elektroporation der Tubuli seminiferi.....	74
3.2.3.1 <i>Live-Dead</i> -Assay	74
3.2.3.2 TUNEL-Assay.....	76

3.2.4 Analyse der konstitutiven Expression des Reportergens EYFP-N1 in verschiedenen Zelltypen der Hodenkanälchen	80
3.3 Expression von EYFP-Reportergenkonstrukten unter der Kontrolle	
Keimzell-spezifischer Promotoren	84
3.3.1 Klonierung von Reportergenkonstrukten	84
3.3.2 Analyse der Zelltyp- und Stadien-spezifischen Expression unter der Kontrolle	
Keimzell-spezifischer Promotoren	85
3.3.2.1 Proakrosin-Promotor	87
3.3.2.2 Protamin1-Promotor	88
3.3.2.3 SP-10-Promotor	89
3.3.3 Analyse der Expression von EYFP-Promotorkonstrukten in der SK11-Zelllinie	91
3.4 Analyse der Expression von ELP-Promotorkonstrukten	93
3.4.1 Klonierung von ELP-Promotor-Deletionskonstrukten	93
3.4.2 Analyse der Expression von ELP-Promotor-Deletionskonstrukten nach Transfektion in isolierte Hodenkanälchen	95
3.4.3 Analyse der Expression der ELP-EYFP-Promotorkonstrukte in der SK11-Zelllinie	101
3.4.4 Quantitative Analyse der Expression der ELP-pGL3-Konstrukte in SK11-Zelllinie mittels Luziferase-Assay	102
3.4.5 Quantitative Analyse der Expression der ELP-Luziferase-Promotorkonstrukte in transfizierten Hodenkanälchen mittels Luziferase-Assay	104
4 Diskussion	107
4.1 Etablierung eines <i>in vitro</i> -Systems für die Transfektion isolierter Ratten-Hodenkanälchen	107
4.2 Etablierung des Transfektionssystems	109
4.3 Expression von EYFP-Reportergenkonstrukten unter der Kontrolle	
Keimzell-spezifischer Promotoren	113
4.4 Analyse der Expression von ELP-Promotorkonstrukten	116
4.5 Ausblick	120
5 Zusammenfassung	121
6 Literaturverzeichnis	124
7 Abkürzungen und Glossar	133
7.1 Abkürzungen	133
7.2 Glossar	135
8 Danksagung	136

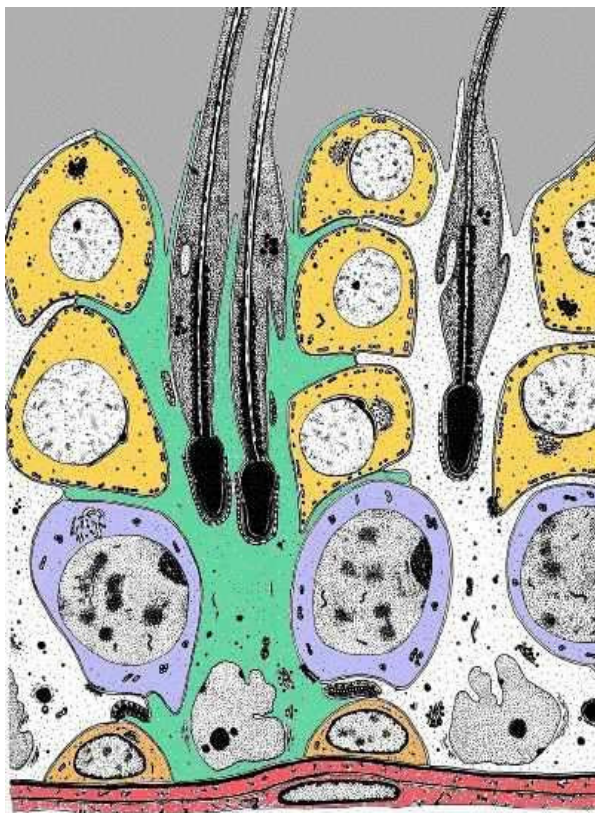
1 Einleitung

Die Spermatogenese in den Samenkanälchen des Hodens ist ein komplexer Differenzierungsprozess, bei dem sich diploide Stammzellen (Spermatogonien) unter dramatischen morphologischen und biochemischen Veränderungen zu befruchtungsfähigen Spermien entwickeln. Dieser Prozess ermöglicht über fortlaufend wiederholte Mitosen die Erhaltung der Stammzellpopulation und sichert über den Vorgang der Meiose die Halbierung des Genoms in den Spermatozyten für die Befruchtung mit der ebenfalls haploiden Eizelle. Zusätzlich ist durch das Auftreten genetischer Rekombination, erkenntlich am *Crossing-over* der Chromosomen während der Meiose, eine große genetische Variabilität möglich. Das reife Spermium muss einer Reihe von Anforderungen genügen, die sehr spezifisch sind und von keiner anderen Zelle im Körper geteilt werden. Das Spermium ist eine Transporteinheit, die einen großen und komplexen Datensatz, das Genom, in einer stark kondensierten Form zur Eizelle transportieren muss. Dieser Datensatz muss, nachdem das Spermium das schützende Keimepithel verlassen hat, gegenüber Umwelteinflüssen geschützt werden und sollte trotzdem bei der Befruchtung der Eizelle aus der kompakten DNA-Verpackung in aktives Chromatin überführt werden können, so dass die genetische Information wieder zur Generierung eines kompletten Organismus genutzt werden kann. Um zur Eizelle zu gelangen, muss das Spermium mit einer Fortbewegungsmöglichkeit, dem Flagellum, ausgestattet werden, so dass es sich zielgerichtet durch viskoses Material bewegen kann. Um diesen Aufgaben gerecht zu werden, benötigt es eine sehr spezielle Ausstattung an Proteinen. Es bedarf einer präzise gesteuerten Gentranskription und -translation, um diese morphologischen und physiologischen Differenzierungsprozesse zu ermöglichen. Viele der involvierten Gene werden erst postmeiotisch in den haploiden Keimzellen exprimiert, was folglich nur über besondere Kontrollmechanismen möglich ist.

1.1 Organisation des Hodens

Die Spermatogenese findet in den Samenkanälchen (Tubuli seminiferi) des Hodens statt. Diese Tubuli seminiferi sind eng aufgekäuelt und werden von einer derben Bindegewebshülle, der Tunica albuginea, umgeben. Der Hoden weist zwei Kompartimente auf: das intertubuläre Kompartiment (Interstitium) und das tubuläre Kompartiment der seminiferen Tubuli. Das Interstitium beinhaltet die Blut- und Lymphgefäße, sowie eine peritubuläre Muskelschicht. Der am häufigsten vertretene Zelltyp im intertubulären Kompartiment ist die Leydigzelle, in der die Testosteronproduktion stattfindet. Zusätzlich sind hier einzelne Makrophagen verteilt. Die Tubuli seminiferi sind stark aufgewundene

Schläuche, deren Enden mit den Anfängen des ausführenden Tubulsystems, dem Rete testis, verbunden sind. Das Kompartiment der Samenkanälchen wird durch die umgrenzende Basallamina (Lamina propria) vom Interstitium getrennt. Zusätzlich sind myoide Zellen aufgelagert, die eine Kontraktilität des Samenkanälchens ermöglichen. Die Samenkanälchen besitzen ein flüssigkeitsgefülltes Lumen, in das die reifen Spermatozoen bei der Spermiation abgegeben werden. Das Keimepithel besteht aus zwei Zelltypen, den somatischen Sertolizellen und den Keimzellen. Die Keimzellen liegen in verschiedenen Differenzierungsstadien vektoriell geordnet von der Tubulus-Basis bis zum Tubulus-Lumen vor und sind in die Sertolizellen eingebettet (siehe Abbildung 1.1).



Farbig markierte Zelltypen und -strukturen:

Basallamina

Spermatogonien

Spermatozyten

runde Spermatiden

elongierende Spermatiden

Sertolizelle

Abbildung 1.1: Aufbau des Keimepithels (modifiziert nach Russell *et al.*, 1990)

Die auf der Basalmembran fußenden Sertolizellen umgeben mit ihren charakteristischen, cytoplasmatischen Fortsätzen sämtliche Keimzellstadien und ragen bis ins Tubulus-Lumen hinein. Deswegen werden sie auch als Stützgerüst des Keimepithels angesehen. Von ihnen wird außerdem die intratubuläre Flüssigkeit erzeugt, die ein spezielles metabolisches Mikromilieu für die Entwicklung der Keimzellen bildet und überdies für die Bildung des Tubulus-Lumens verantwortlich ist. Die Sertolizellen sind über spezielle interzelluläre Kontakte untereinander und mit den Keimzellen verbunden. Sertoli-Sertoli-Kontakte

unterteilen das Keimepithel in ein basales und ein adluminales Kompartiment, so dass eine Blut-Hoden-Schranke ausgebildet wird (Pelletier und Byers, 1992). Im basalen Kompartiment befinden sich die Spermatogonien und Spermatozyten, während im adluminalen Teil die weiter fortgeschrittenen Reifestadien der Spermatiden und Spermatozoen ihren Platz haben. Diese effektive Barriere schützt die adluminal gelegenen Keimzellstadien vor schädlichen Einflüssen und außerdem vor der körpereigenen Abwehr. Während ihrer Entwicklung von den basalen Spermatogonien zu den luminalen Spermatozoen müssen die Keimzellen diese Blut-Hoden-Schranke überwinden, indem sich die Sertolizell-*junctions* öffnen und den Keimzellen eine Passage ins adluminale Kompartiment ermöglichen. Die Keimzellen entwickeln sich als Synzytium oder klonale Einheit, da sie untereinander nach jeder Teilung über interzellulare Cytoplasmabrücken verbunden bleiben. Dieser Vorgang der unvollständigen Teilung ermöglicht eine synchrone Entwicklung und erlaubt eine schnelle Kommunikation zwischen den Zellen. Nach der Meiose sorgen die Cytoplasmabrücken für die Gleichwertigkeit trotz unterschiedlicher Chromosomenausstattung der Keimzellen.

1.2 Spermatogenese

1.2.1 Phasen der Spermatogenese

Die Spermatogenese lässt sich in drei verschiedene Phasen einteilen: 1) die Proliferationsphase, die gekennzeichnet ist durch zahlreiche mitotische Teilungen der Spermatogonien, 2) die meiotische Phase, in der das genetische Material der Spermatozyten rekombiniert und halbiert wird, und schließlich 3) die Spermiogenese, in der, ausgehend von runden, haploiden Spermatiden, die morphologische Umgestaltung zum befruchtungsfähigen Spermatozoon stattfindet. Der gesamte Prozess dauert bei der Ratte etwa 54 Tage (Russell *et al.*, 1990).

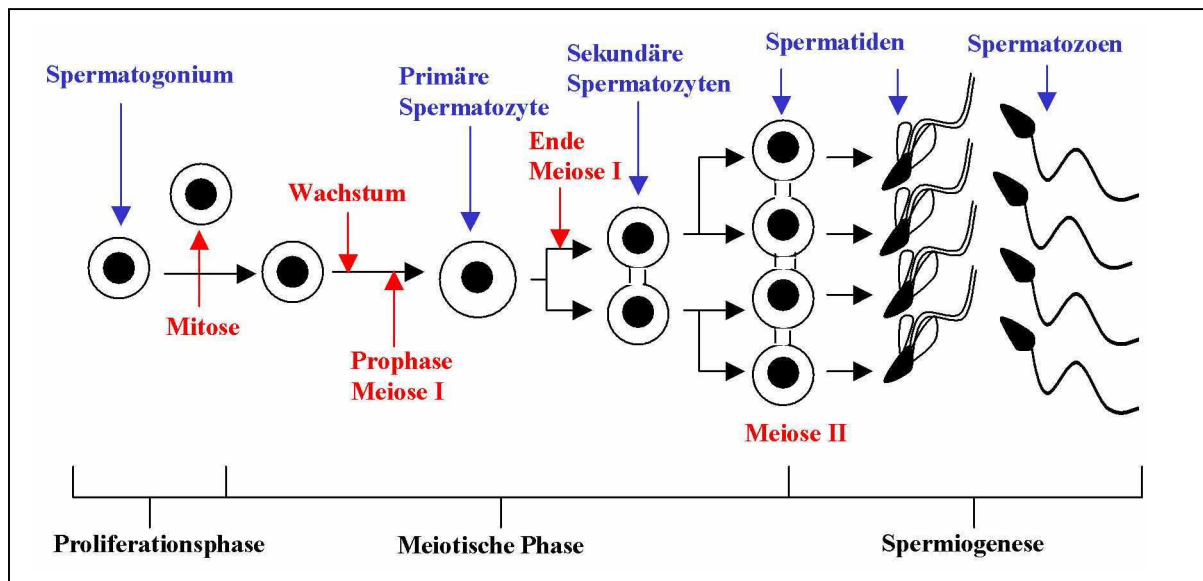


Abbildung 1.2: Ablauf der Spermatogenese

1.2.1.1 Proliferative Phase

Die Spermatogenese beginnt in der basalen Region des Keimepithels mit den mitotischen Zellteilungen der Spermatogonien. Spermatogonien sind sehr resistent gegenüber schädigenden Einflüssen und können häufig überleben, wenn andere Keimzellstadien zugrunde gehen. Eine Zerstörung aller Stammzellen, z. B. durch Bestrahlung, führt dagegen zu einem irreversiblen Verlust der Spermatogenesefähigkeit. Die weiteren Teilungen der Spermatogenese verlaufen nach einem artspezifisch festgelegten Muster, das sich bei Nagern und Primaten unterscheidet. Bei der Ratte liegen die Spermatogonien einzeln der Basalmembran an und werden *A-single*-Spermatogonien genannt (de Rooij *et al.*, 2000). Diese Zellen können sich einerseits in zwei neue *A-single*-Spermatogonien teilen, um diese Stammzellpopulation aufrechtzuerhalten, oder sich andererseits in ein Paar von Tochterzellen teilen, die über interzelluläre Brücken verbunden bleiben und als *A-paired*-Spermatogonien bezeichnet werden (Weber und Russell, 1987). Die Generierung der *A-paired*-Spermatogonien ist der Einstieg in die Spermatogenese, denn hiermit wird der erste Differenzierungsschritt eingeleitet. In allen weiteren Teilungen wird die Zellteilung unvollständig bleiben, was zu einem immer größer werdenden Keimzellsynzytium führt. In diesen weiteren Zellteilungen entstehen aus den *A-paired*-Spermatogonien über Ketten von bis zu 32 *A-aligned*-Spermatogonien und über weitere verschiedene Differenzierungsstadien die B-Spermatogonien (de Rooij, 2001). Im letzten Schritt der proliferativen Phase teilt sich dieses Spermatogonienstadium und liefert die Präleptotän-Spermatozyten, womit die Prophase der Meiose und damit die zweite Phase der Spermatogenese eingeleitet wird.

1.2.1.2 Meiotische Phase

In diesem ersten Schritt der Meiose I lösen sich die Spermatozyten von der Basalmembran und es beginnt die Reduplikation der DNA zum 4C-Stadium. Die primären Spermatozyten durchlaufen die Prophase, in der es zur Paarbildung mit anschließendem Austausch des genetischen Materials zwischen den homologen Chromosomen kommt. Am Ende dieser Phase sind die Chromosomen wieder getrennt und die Kernmembran hat sich aufgelöst. Nach den sich anschließenden Schritten der Metaphase, Anaphase und Telophase ist die erste Reifeteilung abgeschlossen und es resultieren zwei Tochterzellen, die sekundären Spermatozyten. Es folgt sehr schnell die zweite Reifeteilung, in der die haploiden Spermatisden entstehen. Hier beginnt die Phase der Spermiogenese.

1.2.1.3 Spermiogenese

Während einer längeren Differenzierungsphase, der Spermiogenese, erfahren die unreifen Spermatisden einige weitere Modifikationen, die für eine fortschreitende morphologische Veränderung sorgen und eine Einteilung der Spermatogenese in verschiedene Differenzierungsschritte erlauben. Bei der Ratte werden 19 verschiedene Spermiogenesestadien unterschieden, in denen, ausgehend von runden „Stadium 1“-Spermatisden, eine Entwicklung bis hin zu den reifen „Stadium 19“-Spermatozoen stattfindet (Übersicht siehe Abbildung 1.3). Der gesamte Prozess dauert bei der Ratte drei Wochen und ist einer der außergewöhnlichsten morphogenetischen Vorgänge im Körper.

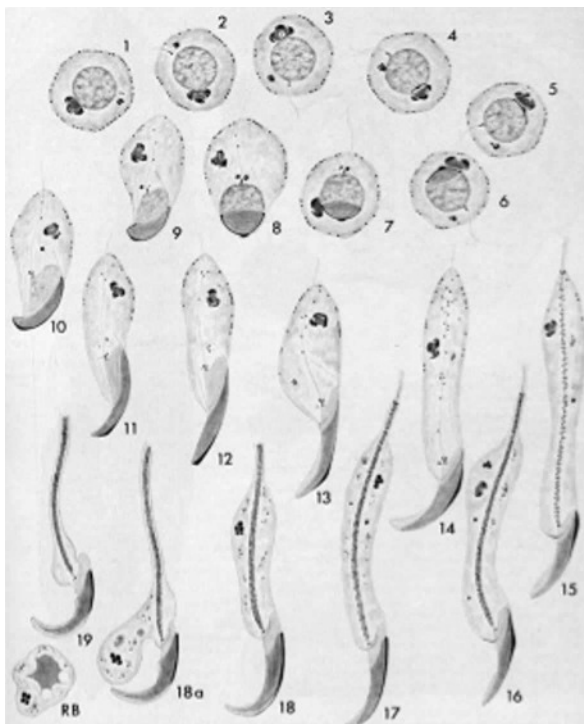


Abbildung 1.3: Spermiogenese bei der Ratte [RB: *residual body*] (aus Russell *et al.*, 1990)

Entwicklung des Flagellums

Die Anlage des Flagellums erfolgt schon in frühen runden Spermatiden. Eines der Zentriolen bildet an der Zelloberfläche ein Axonema aus, das aus Mikrotubuli in einer klassischen 9+2-Anordnung besteht. In der weiteren Entwicklung bewegt sich das Zentriol zum Zellkern und wird dort verankert, was eine Einschnürung des restlichen Cytoplasmas bewirkt. Anschließend entstehen weitere Faserstrukturen, die schließlich das Mittel-, Haupt- und Endstück des Flagellums bilden. Mitochondrien werden aus dem Cytoplasma rekrutiert, um eine helikale Anordnung um das Mittelstück herum auszubilden. Das Flagellum entwickelt sich in einem kontinuierlichen Prozess, während dem es in das Tubulus-Lumen hinein verlängert wird, und dessen Differenzierung erst mit der Freisetzung der Spermatozoen abgeschlossen ist (Russell *et al.*, 1990).

Entwicklung des Akrosoms

Die Ausbildung des Akrosoms ist ein langsamer, kontinuierlich fortschreitender Differenzierungsprozess, der selbst in späten Spermiogenesestadien nicht abgeschlossen ist. In frühen unreifen Spermatiden erscheint als erste Struktur eine vom Golgi-Apparat gebildete Ansammlung von proakrosomalen Vesikeln. Diese verschmelzen anschließend zu einem akrosomalen Vesikel, der zuerst rund ist, sich dann aber als abgeflachte Struktur über den Zellkern legt. In der weiteren Entwicklung wandert der Zellkern zur Zelloberfläche, wobei das Akrosom in räumliche Nähe zur Plasmamembran kommt. Das Akrosom folgt der Elongation des Zellkerns und erfährt eine Verdichtung des Inhalts. Das akrosomale System beinhaltet unter anderem die hydrolytischen Enzyme, die später für eine Spermien-Ei-Interaktion und für die Fertilisation wichtig sind (Russell *et al.*, 1990).

Kernelongation und -kondensation

Während der ersten Spermiogenesestadien erscheint der Zellkern noch kugelförmig, bis er im Laufe der Differenzierung elongiert und eine artspezifische Form annimmt, die für jede Spezies charakteristisch ist. Der Spermienkopf bei der Ratte erhält beispielsweise eine hakenförmige Form. Durch die fortschreitende Kompaktierung und Formveränderung werden die Spermienköpfe zunehmend stromlinienförmig, so dass sie sich im flüssigen Milieu des weiblichen Reproduktionstraktes gut bewegen können. Diese Differenzierungen gehen einher mit einer dramatischen Kondensation des Zellkerns. Die nukleäre DNA liegt anfangs in der klassischen Nukleosomenstruktur vor, in der die DNA zweimal um Histon-Oktamere gewunden ist (Mills *et al.*, 1977). Um eine größere Kondensation und eine dichtere Packung

der DNA zu erreichen, werden die Histone durch kleine, basische arginin- und cysteinreiche Proteine, die Protamine, ersetzt. Diese Kondensation der Kern-DNA erfolgt über einen intermediären Austausch der Histone zunächst durch Transitionsproteine, die schließlich durch die Protamine ersetzt werden. Die Protamine lagern sich mit ihrer zentralen Polyarginin-Region innerhalb der großen Furche der DNA-Doppelhelix an, was eine dichtere Anordnung der Protamin-DNA-Komplexe erlaubt (Balhorn, 1982). In dieser *doughnut*-förmigen Chromatinstruktur (Braun, 2001) kann der Zellkern auf 5 % des Volumens eines somatischen Zellkerns kondensiert werden (Übersicht siehe Abbildung 1.4).

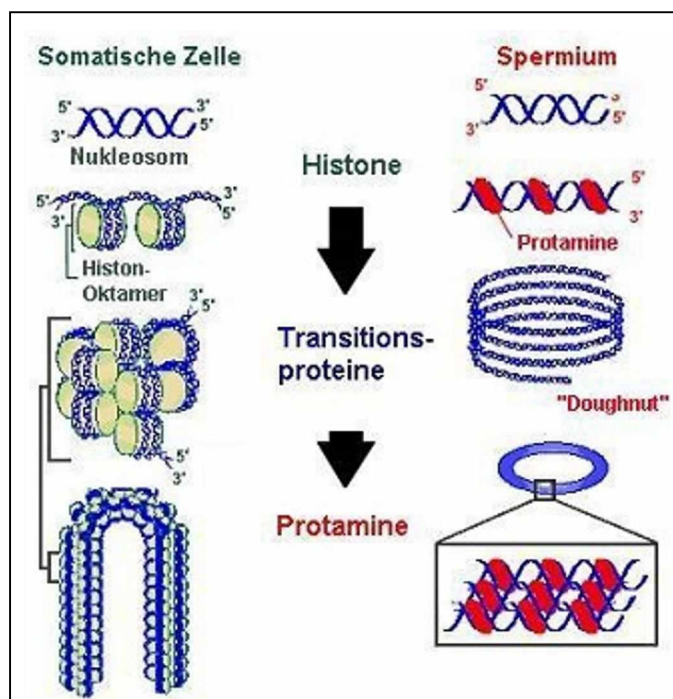


Abbildung 1.4: Kondensation der Kern-DNA über Protamine (modifiziert nach Braun, 2001)

Elimination des Cytoplasmas

Am Ende der Spermio-genese wird eine Volumenreduktion des fertigen Spermatozoons auf etwa 25 % der ursprünglichen Größe erreicht. Diese wird einerseits über die Elimination von Wasser aus Zellkern und Cytoplasma erreicht und andererseits über die Abschnürung eines Cytoplasmarestes, dem Residualkörper, kurz vor der Spermiation. Die Residualkörper enthalten RNA, Organellen und andere Bestandteile, die für das Überleben des Spermiums nach der Freisetzung nicht mehr länger nötig sind. Die Cytoplasmafragmente werden zur Tubulus-Basis transportiert, wo sie anschließend von den Sertolizellen phago-cytiert werden (Russell *et al.*, 1990).

1.2.2 Zyklus und Welle der Spermatogenese

Der zyklisch wiederholte Prozess der Spermatogenese unterscheidet sich grundsätzlich von dem ebenfalls zyklischen Vorgang der Oogenese des weiblichen Organismus. Neue Spermatozoen werden ständig gebildet und in das Tubulisystem abgegeben. Zur gleichen Zeit, zu der aus einem Spermatogonium über Teilungen und Differenzierungen neue Spermatozoen entstehen, starten andere Spermatogonien in demselben Areal des Keimepithels mit der Spermatogenese, in einer gestaffelten aber zeitlich kontrollierten Sequenz. Der synchronisierte Ablauf der Spermatogenese bedingt eine Verlagerung der Keimzellen im Keimepithel des Hodenkanälchens. Die reiferen Keimzellstadien findet man dabei weiter entfernt von der Basalmembran und in spezifischen Assoziationen mit jüngeren Zellen, die sich noch teilen und heranreifen müssen. Diese synchronisierte Evolution des Keimepithels über die Zeit lässt einen Zyklus entstehen, dessen Beginn über den Eintritt eines Spermatogoniums in den Differenzierungsweg determiniert ist, und der mit der Freisetzung des Spermiums endet. Durch diese Zyklen formieren sich definierte Zellassoziationen des Keimepithels, die sich über eine bestimmte Zeitperiode wiederholen, die sogenannten Spermatogenesestadien. Über Hodenkanälchenquerschnitte lassen sich diese Stadien histologisch anhand von morphologischen Differenzierungsmarkern, wie Akrosomenentwicklung und Kernelongation, identifizieren. Bei der Ratte braucht es vier Zyklen, um eine Entwicklung vom Spermatogonium zum Spermatozoon zu vollziehen. Für die Einteilung der Stadien des Zyklus ist ein Vergleich von histologischen Querschnitten in einer *Staging map* besonders übersichtlich. In dieser Übersicht werden alle möglichen Zellassoziationen des Keimepithels zusammengefasst. In der *Staging map* ist die fortschreitende Keimzell-differenzierung von links nach rechts dargestellt, wobei am Ende der Reihe die Entwicklung eine Etage weiter oben fortläuft. Die übereinanderliegenden Keimzellstadien spiegeln die im Hodenkanälchenquerschnitt gefundenen Zellassoziationen im Keimepithel wieder. Bei der Ratte unterscheidet man 14 verschiedene Stadien (Leblond und Clermont, 1952) (Abbildung 1.5).

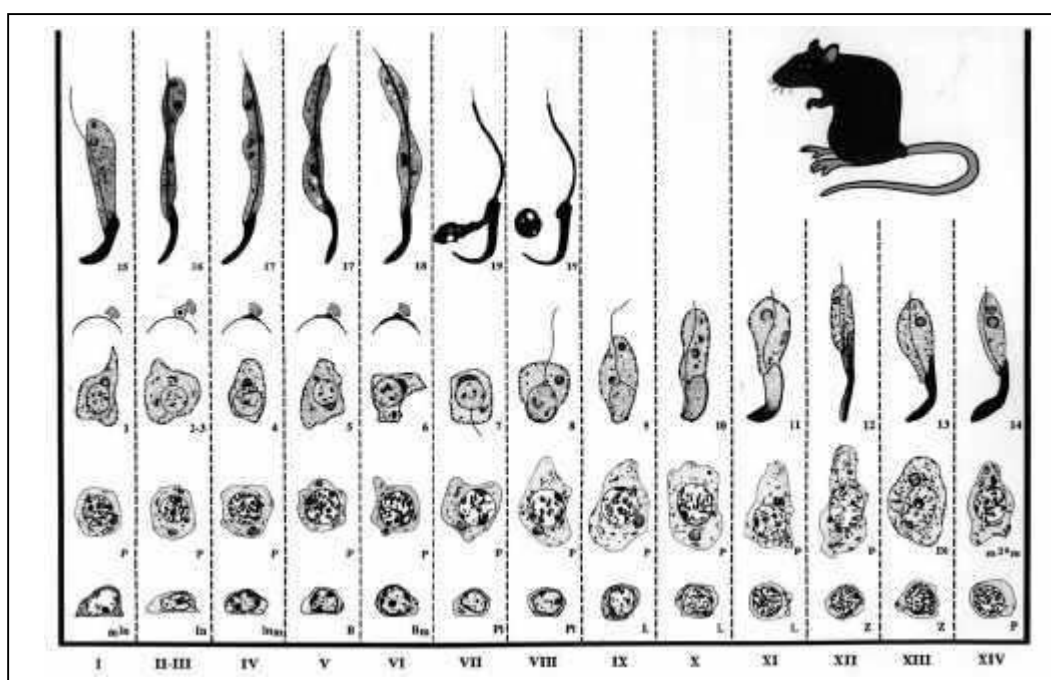


Abbildung 1.5: Zusammenstellung der Keimzelloassoziationen in der *Staging map* der Ratte (aus Russell *et al.*, 1990)

Obwohl keine laterale Bewegung der Keimzellstadien entlang des Hodenkanälchens erfolgt, sondern die Zellen nur von der Tubulus-Basis zum Tubulus-Lumen aufrücken, lässt sich doch eine bestimmte Anordnung der Stadien in Bezug auf die Längsachse des Hodenkanälchens erkennen. In aufeinanderfolgender Ordnung reihen sich die Stadien entlang des Tubulus, und sind in ihrer sequentiellen Anordnung nur durch seltene Umkehrungen, sogenannte Modulationen, unterbrochen. In der Regel folgt also auf Stadium I Stadium II, welches vom Stadium III abgelöst wird usw. Die Stadien werden in aufsteigender Ordnung vom Rete testis bis zur Mitte des Hodenkanälchens angelegt, wo oft ein Umkehrpunkt ist. Diese Wiederholung der Stadien in longitudinaler Richtung des Tubulus wird als Welle der Spermatogenese bezeichnet (Abbildung 1.6).

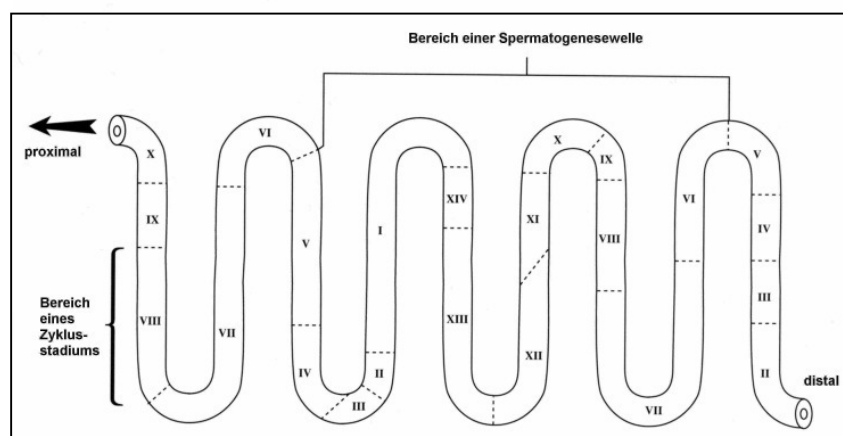


Abbildung 1.6: Welle der Spermatogenese (modifiziert nach Russell *et al.*, 1990)

1.3 Die Rolle der Sertolizellen

Die enge morphologische Assoziation der Keimzellen mit den somatischen Sertolizellen weist auf eine wichtige physiologische Interaktion hin, in der eine Kommunikation zwischen den beiden Zelltypen für eine funktionierende Spermatogenese essentiell ist. *In vitro*-Studien konnten zeigen, dass es einen bidirektionalen Stoffaustausch zwischen Keim- und Sertolizellen gibt, und dass jeder Zelltyp die Funktionen des jeweils anderen reguliert (Jegou, 1993). Sertolizellen stellen ihre Teilungsaktivität im Laufe der Pubertät nahezu ein und bilden die adulte Sertolizellpopulation, die während des späteren Lebens relativ stabil bleibt. Die Struktur der Sertolizelle, analysiert über elektronenmikroskopische Aufnahmen, ist sehr komplex (Schulze, 1974). Die Zelle reicht von der Basis des Hodenkanälchens bis ins Lumen hinein und erreicht in der Ratte eine Höhe von 90 µm (Wong und Russell, 1983). Sertolizellen besitzen einen charakteristischen gelappten Kern und einen dreiteiligen Nucleolus (Fawcett, 1975). Die maximale Anzahl an Keimzellen, die eine Sertolizelle „betreuen“ kann, variiert zwischen den Spezies. In der Ratte ist jede Sertolizelle mit 30–50 Keimzellen der verschiedenen Differenzierungsstadien assoziiert (Weber *et al.*, 1983).

Den Sertolizellen werden vielfältige Funktionen zugewiesen:

Erhaltung der Integrität des Keimepithels

Sertolizellen weisen eine Reihe von Verknüpfungen zu anderen Zellen und azellulären Elementen auf. Sie sind mit der Basallamina über Hemidesmosome verbunden und stehen untereinander über Desmosomen, *Gap junctions* und *Tight junctions* in Kontakt, wobei letztere für die Ausbildung der Blut-Hoden-Schranke verantwortlich sind. Mit den Keimzellen sind sie über Desmosomen-ähnliche *junctions*, *Gap junctions* und sogenannte ectoplasmatische Spezialisierungen verbunden. Über dieses komplexe Netzwerk von Verbindungen wird die Integrität des Keimepithels erhalten und eine Möglichkeit der Zell-Zell-Kommunikation geschaffen (Cheng und Mruk, 2002). Bei der Spermiation werden die *Junctions*, welche Sertolizellen und Keimzellen verbinden, in einem komplexen Prozess eliminiert, an dem wiederum die Sertolizellen aktiv teilnehmen (Fawcett und Phillips, 1969; Russell, 1984).

Kompartimentierung des Keimepithels

Sertolizellen bilden zwei permanente Kompartimente, das basale und adluminale, sowie ein transientes intermediäres Kompartiment. Das basale Kompartiment beinhaltet Spermogonien und Spermatozyten bis zum Stadium der frühen Leptotän-Phase der Meiose (Russell,

1977 und 1978). Substanzen, die aus dem lymphatischen System diffundieren, und Substanzen des vaskulären Systems haben freien Zugang zu diesen Zellen. Das adluminale Kompartiment wird durch die Existenz von *Tight junctions* abgegrenzt, die zwischen der basolateralen Oberfläche der Sertolizellen ausgebildet werden (Dym und Fawcett, 1970). Diese ausgeformte Sertolizell-Barriere ist dynamisch, denn die Präleptotän- und Leptotän-Spermatozyten müssen für ihre weitere Differenzierung diese Barriere überwinden. Während des Transits dieser Zellen wird über ein periodisches Öffnen und Schließen der *Tight junctions* das dritte intermediäre Kompartiment gebildet. Für die heranreifenden Spermatiden im adluminalen Kompartiment wird somit ein stabiles Mikromilieu geschaffen. Giftige Substanzen müssen die Sertolizell-Barriere entweder durchbrechen oder über eine Passage der Sertolizellen in das adluminale Kompartiment gelangen, um dort die Keimzellen direkt zu schädigen. Zusätzlich ist eine Rolle der Sertolizellen als immunologische Barriere von Bedeutung, welche die auf der Oberfläche von Spermatozyten und Spermatiden entstehenden Autoantigene vor der Erkennung durch das Immunsystem schützt (O’Rand und Romrell, 1977).

Flüssigkeitssekretion für die Ausbildung eines Tubulus-Lumens

Sertolizellen sind in der Lage, sowohl apikal als auch basal Flüssigkeit zu sezernieren (Setchell, 1978). Durch die große Zelloberfläche der Sertolizellen wird der größte Teil der Flüssigkeit ins Tubulus-Lumen abgegeben. Über den Flüssigkeitsdruck im Hodenkanälchen bleibt dieses Lumen erhalten. In dieser luminalen Flüssigkeit werden die Spermien im Kanalsystem des männlichen Reproduktionstraktes transportiert, die Reabsorption erfolgt in den Ductuli efferentes und im proximalen Nebenhoden.

Phagocytose

Während der Spermatogenese sterben etwa die Hälfte der Keimzellen über Apoptose (Shinha und Swerdloff, 1999). Diese werden von den Sertolizellen phagocytiert. Die schnelle und selektive Eliminierung von abgestorbenen Zellen ist Teil eines wichtigen Selbstverteidigungsmechanismus, in dem die Sertolizellen als Makrophagen agieren (Savill und Fadok, 2000). Die apoptotischen Zellen werden von den Sertolizellen durch einen an der Oberfläche exprimierten Rezeptor, dem *Class B scavenger receptor type I*, erkannt. Dieser Rezeptor bindet das Phosphatidylserin, welches apoptotische Keimzellen im Zuge ihrer Membranzumstrukturierung an der Oberfläche exponieren. Die phagocytotische Aufnahme der Keimzellen über die Sertolizellen wird als wichtiger Prozess im Ablauf der Spermatogenese

angesehen und ist für die effiziente Spermienproduktion nötig (Nakanishi und Shiratsuchi, 2004). Außerdem werden auch das von den reifenden Spermatiden eliminierte Cytoplasma sowie die abgeschnürten Residualkörper von den Sertolizellen über Phagocytose aufgenommen.

Produkte der Sertolizellen

Sertolizellen produzieren nahezu 100 verschiedene Proteine und Substanzen, von denen noch nicht alle identifiziert sind (Jegou, 1993). Die meisten dieser Sertolizellprodukte sind für die Unterstützung und Ernährung der Keimzellen während ihrer Differenzierung in der Spermatogenese wichtig. Zu den produzierten Substanzen zählen Proteasen, Transportproteine, Komponenten der extrazellulären Matrix, Energiemetaboliten und viele andere Faktoren, die in Prozessen der Keimzellteilung, -differenzierung und dem Keimzellmetabolismus involviert sind (Dupaix *et al.*, 1996). Ein wichtiger Nährstoff, der von den Sertolizellen produziert und direkt an die Keimzellen abgegeben wird, ist zum Beispiel das Lactat (Boussouar und Benahmed, 2004). Dieser Energiemetabolit wird von den Sertolizellen aus Glucose synthetisiert und dient den Keimzellen als Substrat für die Glykolyse. Eine weitere große Substanzgruppe, die von Sertolizellen synthetisiert werden kann, sind die Cytokine. Sie beeinflussen die Zellproliferation sowie die Zelldifferenzierung und können Keimzellfunktionen modulieren. Dazu gehören beispielsweise Interleukin-1 und Interleukin-6 sowie der Stammzell-Faktor und Cytokine der *Transforming growth factor*- und der *Insulin-like*-Familie (Dupaix *et al.*, 1996). Auch die Versorgung der Keimzellen mit Eisen wird über die Sertolizellen vermittelt, indem sie das Eisen-bindende Protein Transferrin sezernieren. Eine besonders wichtige Rolle spielen die Sertolizellen bei der Vermittlung von Hormoneffekten. Nur die Sertolizellen, nicht aber die Keimzellen, besitzen Rezeptoren für Testosteron und für das follikelstimulierende Hormon (FSH). Eine Reihe von biochemischen und morphologischen Reaktionen der Sertolizellen konnten durch die Stimulation mit diesen Hormonen beobachtet werden (Bardin *et al.*, 1988). Gleichzeitig sind die Sertolizellen in einen Rückkopplungsmechanismus der Hypophysen-Gonaden-Achse involviert, indem sie über die Produktion des Proteins Inhibin die Ausschüttung des Gonadotropins FSH kontrollieren (Bardin *et al.*, 1988). An der Vermittlung des Testosteronsignals sind ebenfalls die Sertolizellen beteiligt, indem das von den Leydigzellen produzierte Testosteron an den Androgenrezeptor oder an ein Transportprotein gebunden wird, das sogenannte *Androgen binding protein* (ABP), das ebenfalls von den Sertolizellen synthetisiert wird.

1.4 Hormonelle Kontrolle der Spermatogenese

Die Funktion des Hodens ist abhängig von einer Vielzahl von Botenstoffen, die über endokrine, parakrine und autokrine Signalwege agieren. Für die Spermatogenese im Säugetier sind vor allem die Gonadotropine, das follikelstimulierende Hormon (FSH) und das luteinisierende Hormon (LH), sowie das Androgen Testosteron essentiell. An der hormonellen Regulation sind Leydigzellen, Sertolizellen und myoide Zellen beteiligt. Jede dieser Zelltypen ist ein direktes Ziel für ein oder mehrere Hormone, deren Signale für einen korrekten Ablauf der Spermatogenese wichtig sind (Holdcraft und Braun, 2004). Die Freisetzung von FSH und LH aus der Hypophyse wird durch das *Gonadotropin releasing hormone* (GnRH) aus dem Hypothalamus gesteuert. LH wirkt auf die im Interstitium des Hodenkanälchens liegenden Leydigzellen und induziert die Testosteronproduktion. Das Testosteron diffundiert aus den Leydigzellen via Interstitium in die Sertolizellen und wird dort durch die Bindung an das *Androgen binding protein* (ABP) angereichert. Sertolizellen und peritubuläre Myoidzellen besitzen außerdem Androgenrezeptoren und sind so für die Vermittlung des Testosteronsignals verantwortlich. Der Testosteron-ABP-Komplex wird in den Sertolizellen angereichert, die das Testosteron in den aktiven Metaboliten Dihydrotestosteron umwandeln und in das Lumen der Samenkanälchen abgeben. Die Wirkung der Androgene auf die Keimzellen erfolgt indirekt, da diese keine Androgenrezeptoren exprimieren. Das Testosteron ist für die Initiierung der Spermatogenese und für ihr lebenslanges Bestehen verantwortlich (Sharpe, 1994). Das von der Hypophyse ausgeschüttete FSH wirkt direkt auf die Sertolizellen, die an ihrer Oberfläche FSH-Rezeptoren besitzen. Die Wirkung des FSH auf die Keimzellen erfolgt ebenfalls indirekt und wird von den Sertolizellen vermittelt, denn reifende männliche Keimzellen haben keine FSH-Rezeptoren. Sicher ist allerdings, dass sowohl FSH als auch Testosteron eine wichtige Wirkung auf die Spermatogenese haben und sich die beiden Hormone in ihrer Wirkung auch gegenseitig unterstützen können, so dass Testosteron- und FSH-Effekte oft schwer zu unterscheiden sind. Unter FSH-Einfluss produzieren die Sertolizellen Inhibin und das schon erwähnte ABP. Der Regelkreis zwischen Hypophyse und Hodenkanälchen wird über Inhibin geschlossen, das ein potenter Inhibitor der FSH-Sekretion ist und somit für eine negative Rückkopplung auf Hypophysenebene verantwortlich ist (Abbildung 1.7).

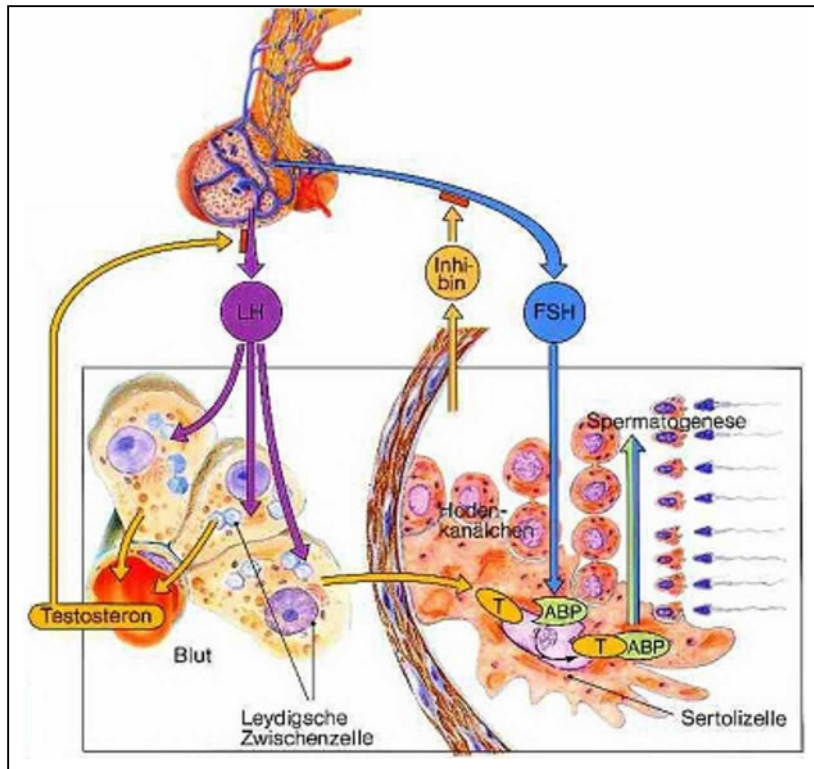


Abbildung 1.7: Endokrine Steuerung der Spermatogenese (modifiziert nach Breckwolddt, 1991)

1.5 Transkriptionskontrolle in männlichen Keimzellen

Die morphologischen und physiologischen Veränderungen, die die Keimzellen während der Spermatogenese erfahren, sind eine Folge markanter Veränderungen in der Genexpression. Das komplexe Differenzierungsprogramm muss über spezielle Mechanismen kontrolliert werden. Im Vergleich zu anderen Entwicklungsprozessen beim Säuger ist jedoch relativ wenig über die molekularen Mechanismen bekannt, die die Spermatogenese kontrollieren. Dies liegt vor allem an der experimentellen Unzugänglichkeit des Systems. Experimentelle Eingriffe sind in einem System, in dem eine primäre Zellkultur schwierig ist, und in dem es keine geeigneten Zelllinien gibt, nur eingeschränkt möglich. Dennoch sind eine Reihe von Genen bekannt, die sehr spezifisch in den männlichen Keimzellen exprimiert werden. Manche dieser Gene werden sogar eindeutig nur in den haploiden Keimzellstadien exprimiert. Dies sind zum Beispiel Gene, die für wichtige strukturelle Bestandteile des reifen Spermiums kodieren, oder die eine Rolle im Spermienstoffwechsel ausüben. Die zunehmende Kondensation des Zellkerns während der Spermio-genese, in der Protamine die DNA in eine Art pseudokristallines Milieu verwandelt haben, stellt für eine postmeiotische Gen-transkription ein Problem dar. Auch wenn etwa noch 15 % der DNA in der klassischen histonverpackten Nucleosomenstruktur vorliegen (Gatewood *et al.*, 1987), wird diese

Schwierigkeit in der Regel dadurch kompensiert, dass viele solcher Gene relativ früh nach der Meiose transkribiert werden, um als gespeicherte *messenger* RNA (mRNA) gelagert zu werden. Erst in späteren Stadien der Spermiogenese werden diese gespeicherten mRNAs dann translatiert. Trotzdem werden noch viele Gene nachweislich in elongierten Spermatiden transkribiert. Über die Mechanismen dieser Transkription ist sehr wenig bekannt.

1.5.1 Herkunft der Keimzell-Transkripte

Die während der Spermatogenese exprimierten Transkripte lassen sich in vier Gruppen klassifizieren:

1.5.1.1 Ubiquitär exprimierte Gene

Viele Gene werden sowohl in somatischen als auch in Keimzellen exprimiert, da sie wichtige Funktionen ausüben, die allen Zellen gemein sind. Wichtige Prozesse, wie DNA-Reparatur, haben in allen Zelltypen ihre Bedeutung, so dass sich beteiligte Proteine, wie z. B. Xrcc-1, auch in Keimzellen finden (Walter *et al.*, 1996). Viele Gene, die für Enzyme wichtiger biochemischer Synthesewege kodieren, können ebenfalls in Keimzellen nachgewiesen werden, z. B. Ornithin-Decarboxylase (Kaipia *et al.*, 1990), Glutaminsäure-Decarboxylase (Persson *et al.*, 1990) und Cholin-Acetyltransferase (Ibanez *et al.*, 1991).

1.5.1.2 Keimzell-spezifische Homologe somatisch exprimierter Gene

Gene, die spezifisch in Keimzellen gefunden werden, sind sehr häufig Homologe von somatisch exprimierten Genen. Vordergründig erscheint es ineffizient für die männlichen Keimzellen, anstelle eines existierenden Gens ein neues Gen zu exprimieren, das schließlich für ein fast identisches Protein kodiert. Es gibt aber signifikante Vorteile, ein „eigenes“ Gen zu exprimieren. In männlichen Keimzellen wird das X-Chromosom während der Spermatogenese inaktiviert, so dass viele dort lokalisierten Gene nicht mehr exprimiert werden können. Zusätzlich findet in einigen Fällen auch eine Inaktivierung von speziellen autosomalen Genen statt. Die Keimzellen kompensieren diesen Zustand über die Expression eines Genhomologs. Beispiele für Gene, die über ein autosomal lokalisiertes homologes Gen der X-chromosomalen Inaktivierung entgehen, sind z. B. Gene, die für wichtige Enzyme kodieren, wie Pyruvat-Dehydrogenase (Fitzgerald *et al.*, 1992) und Phosphoglyceratkinase-1 (McCarrey *et al.*, 1992). Andere Testis-spezifische Genhomologe kompensieren die Inaktivierung verschiedener autosomaler Gene. Diese kodieren beispielsweise für ein wichtiges Enzym der Glykolyse, die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Welch *et al.*, 1992). Auch für das

Protein Cytochrom C (Cyc), welches für den Transport von Elektronen im Inter-membranraum des Mitochondriums wichtig ist, existieren zwei Isoformen. CycS wird in somatischen Zellen und CycT in Keimzellen exprimiert, wo es maximale Expressionslevel in runden Spermatozoen erreicht (Morales *et al.*, 1993). Ein weiterer Vorteil Keimzell-spezifischer Homologe ist die spezifische Anpassung von Proteinen, indem das Keimzell-produkt dieselbe Rolle des somatischen Zellproduktes erfüllt, aber noch zusätzliche strukturelle oder funktionelle Ergänzungen aufweisen kann, die eine spezifische Funktion in Keimzellen unterstützen. Die Keimzell-spezifische Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase besitzt nur in Keimzellen eine prolinreiche N-terminale Domäne, über die das Enzym an Flagellum-Komponenten gebunden ist (Bunch *et al.*, 1998). Es gibt aber auch Keimzell-spezifische Gene, die ohne eine vorherige Inaktivierung des somatischen homologen Gens exprimiert werden. Ein Beispiel hierfür sind zwei Mitglieder der 70-kDa-Hitzeschock-Proteine (HSP-70-Proteine). Die HSP-70-Proteine sind sogenannte Chaperone und assistieren anderen Proteinen bei ihrer korrekten Faltung und Anordnung in Komplexen. Die HSP-70-Gene sind ubiquitär in allen Geweben exprimiert oder werden bei Hitze oder Stress induziert. Eines von ihnen, HSP-70-2, wird von dem Gen HSP-70-2 kodiert und spezifisch in Keimzellen während der Meiose gebildet (Dix *et al.*, 1996). Ein anderes Transkript, HSC-70-t, wird das erstmalig in haploiden Keimzellen detektiert, ohne dass sich die Expression der anderen zur HSP-70-Familie gehörenden Gene ändert (Matsumoto *et al.*, 1993).

1.5.1.3 Transkript-Varianten somatischer Gene

Keimzell-spezifische Isoenzyme oder Isotypen somatischer Proteine werden von Transkript-varianten translatiert, die von denselben Genen stammen wie die somatischen Transkripte. Sie unterscheiden sich von diesen allerdings in ihrer Länge oder in ihrer Gesamtsequenz. Diese Unterschiede entstehen durch Ausnutzung unterschiedlicher Transkriptionsstartstellen, durch Einfügen von alternativen Introns, durch alternatives Spleißen oder über die Benutzung alternativer Initiationsstellen für die Polyadenylierung (Eddy, 2002). Im Falle des Testis-spezifischen *Angiotensin-converting enzymes* (ACE) wird ein alternativer Promotor benutzt, der hinter dem in somatischen Zellen benutzten Promotor liegt (Howard *et al.*, 1990). Eine ähnliche Situation wurde bei der Testis-spezifischen Expression der mitochondrialen Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase (mGPDH) gefunden. Dieses Enzym ist Bestandteil der inneren Mitochondrienmembran und spielt eine wichtige Rolle im Glycerol-Phosphat-Stoffwechsel. Das mGPDH-Gen besitzt drei verschiedene Promotoren, von denen der am weitesten stromabwärts gelegene Promotor eine spezifische Expression in postmeiotischen

Keimzellen steuert (Weitzel *et al.*, 2003). Ein Beispiel für die Nutzung alternativer Polyadenylierungsstellen ist die Expression des Gens für die β -1,4-Galactosyl-Transferase (GalT1). GalT1-mRNA akkumuliert während der Reifung primärer Spermatozyten und erreicht hohe Expressionslevel kurz vor der Meiose (Pratt und Shur, 1993). Zu den Transkriptvarianten, die durch alternatives Spleißen entstehen, gehören zum Beispiel die Proteine der *cAMP-responsive-element-modulator* (CREM)-Familie. CREM ist ein Transkriptionsfaktor, der an ein spezifisches *cis*-aktivierendes Element, das *cAMP-responsive-element* (CRE), bindet und somit die Expression bestimmter Zielgene regulieren kann. Das CREM-Gen kodiert dabei sowohl für Repressoren (CREM α , β , γ) wie auch für Aktivatoren (CREM τ , τ_1 , τ_2) der cAMP-induzierten Transkription. Testikuläre CREM-Expression wechselt in haploiden Keimzellen von der Expression von Repressoren zur Expression von Aktivatoren (Cesare *et al.*, 2000).

1.5.1.4 Testis-spezifische Gene und haploid-spezifische Genexpression

Viele Gene, die in Keimzellen exprimiert werden, haben keine somatischen Homologe und werden oft erst in der postmeiotischen Phase transkribiert, wenn spezielle Strukturen der reifenden Spermien gebildet werden. Die nukleären Transitionsproteine und Protamine, sowie Strukturproteine des Spermienflagellums sind ohne Zweifel haploide Genprodukte. Im Kapitel 1.5.6 werden einige der postmeiotisch exprimierten Gene näher vorgestellt.

1.5.2 Methoden der Promotoranalyse in postmeiotischen Keimzellen

Aufgrund der oben schon erwähnten methodischen Schwierigkeiten sind bisher nur sehr wenige Promotoren haploid exprimierter Gene charakterisiert worden. Zusätzlich wird die Analyse der Genregulation durch die verzögerte Translation gespeicherter mRNAs erschwert, da ein Transfer der Regulationsebene von der transkriptionellen Ebene zur translationellen Ebene stattfindet. Dennoch gibt es eine Reihe von *in vivo*- und *in vitro*-Systemen, in denen erfolgreich eine Analyse von spezifischen postmeiotisch aktivierten Promotoren und ihrer Transkriptionsfaktoren erfolgen konnte.

1.5.2.1 Experimente zur DNA-Protein-Bindung

Für die Suche nach Transkriptionsfaktoren, die an bestimmten Promotorsequenzen binden, eignet sich ein *in vitro*-Ansatz zur Überprüfung einer Protein-DNA-Bindung. Dabei werden nukleäre Proteine aus dem Hoden, einerseits von adulten und andererseits von noch nicht geschlechtsreifen Tieren (Negativ-Kontrolle), extrahiert und eine spezifische Bindung an

Promotorregionen untersucht. Über diese auch als *Electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) bekannte Methode können Testis-spezifische Transkriptionsfaktoren ermittelt und deren Bindungsstellen in ihrer DNA-Sequenz untersucht werden (Valentin *et al.*, 2000; Weitzel *et al.*, 2003).

1.5.2.2 Experimente zur *in vitro*-Transkription

Eine funktionelle Analyse von zuvor strukturell charakterisierten Promotorbereichen ist über die Methode der *in vitro*-Transkription möglich. Hier werden Reportergenkonstrukte hergestellt, indem der zu untersuchende Promotorbereich an eine sogenannten *G-free*-Kassette gekoppelt wird. Kernextrakte aus unterschiedlichen Keimzellstadien werden zugefügt und die spezifische Expression der *G-free*-Kassette analysiert. Die Kernextrakte enthalten die meisten Enzyme und sonstigen Faktoren für die Transkription. Somit ist es möglich, einen spezifischen Promotorbereich durch gezielte Deletion und Mutation funktionell zu untersuchen (Hecht, 1996). Da diese Technik oft unzuverlässig und sehr schwierig in der Durchführung ist, wird sie heute kaum noch angewandt.

1.5.2.3 Transgene Tiere und *in vivo*-Gentransfer

Mit dieser immer populärer werdenden Technik der Generierung von transgenen Tieren ist es inzwischen relativ gut möglich, postmeiotisch exprimierte Promotoren zu untersuchen, die eine Expression eines Transgens in männlichen Keimzellen, beispielsweise von Mäusen, steuern. Vor allem der Einsatz von verschiedenen Reportergenen ermöglicht eine einfache Analyse der sie steuernden Promotoren und ihrer Expression in verschiedenen Geweben. Über diesen Ansatz konnten zum Beispiel die Promotoren für Protamin, Proakrosin und Transitionsprotein-2 untersucht werden (Zambrowicz *et al.*, 1993; Nayernia *et al.*, 1992; Topalogu *et al.*, 2001). Eine etwas neuere und wesentlich einfachere Methode ermöglicht eine Art *in vivo*-Transfektion am lebenden Tier, so dass eine transiente Reportergenexpression in bestimmten Geweben analysiert werden kann. Der Gentransfer in Hodengewebe findet über eine DNA-Injektion, meist in den Rete testis, und eine anschließende Elektroporation des gesamten Hodens statt. Mit Hilfe dieser Technik konnten schon Promotoranalysen einiger Keimzell-spezifischer Gene durchgeführt werden, z. B. des Protamin1-Gens (Muramatsu *et al.*, 1997; Yamazaki *et al.*, 1998), des Testis-spezifisch exprimierten Ornithin-Decarboxylase-Antizym-Gens (Ike *et al.*, 2004) und des Hitzeschock-Gens HST70 (Widlak *et al.*, 2003).

1.5.2.4 Sertolizell-Keimzell-Kokultur und Kultivierung testikulärer Tubuli

Isolierte Keimzellen in Kultur überleben *in vitro* nicht länger als etwa 24 h. Für eine Analyse der Keimzellendifferenzierung ist der direkte Kontakt von Keimzellen und Sertolizellen essentiell. In einer Kokultur der beiden Zelltypen, in der isolierte Keimzellen auf einer Zellschicht von Sertolizellen kultiviert werden, werden diese Zellkontakte ermöglicht. Die Kultur funktioniert sowohl mit primär isolierten Sertolizellen (Onoda *et al.*, 1990), als auch mit Sertolizell-Zelllinien (Walther *et al.*, 1996). Eine morphologische und biochemische Untersuchung der Zellen ist so gut möglich; eine Manipulation der Zellen über Transfektion und eine Analyse von Reportergenkonstrukten konnte bisher aber noch nicht gezeigt werden. Ein noch vielversprechenderer Ansatz ist die Kultur von isolierten Hodenkanälchen. Die wichtigen Sertolizell-Keimzell-Assoziationen werden hier nicht zerstört und das Keimepithel bleibt weitgehend intakt (Seidl und Holstein, 1990; Staub *et al.*, 2000). Die Möglichkeit der Transfektion dieser kultivierten Tubuli mit dem Ziel einer Promotoranalyse haploider Genexpression wird in der vorliegenden Arbeit ausgetestet und etabliert. Erste Experimente konnten zeigen, dass der Gentransfer von Reportergenkonstrukten und eine anschließende transiente Expression eines *Green fluorescent protein* (GFP)-Reporterproteins in diesen kultivierten Tubuli grundsätzlich möglich ist (Ivell *et al.*, 2004).

1.5.2.5 Etablierte Zelllinien

Eine Analyse der Keimzellentwicklung in einer immortalisierten Zelllinie *in vitro* wäre ein hilfreiches Werkzeug in der Aufklärung der molekularen Mechanismen der Spermatogenese. Die Generierung einer spermatogenen Zelllinie stellt jedoch aufgrund des Vorgangs der Meiose und des einmaligen Differenzierungsprozesses in der Spermatogenese eine große Herausforderung dar. Für Zelllinien, die über die Transformation von Spermatogonien und Präleptotän-Spermatozyten mit dem SV40 *large T-Antigen* erzeugt wurden, konnte keine eindeutige Differenzierung zu Spermatisden gezeigt werden (Wolkowicz *et al.*, 1996; Tascou *et al.*, 2000). Kürzlich konnte allerdings mit Hilfe einer alternativen Transformationstechnik eine neue Zelllinie vorgestellt werden, die sogar einige postmeiotische Gene exprimiert. Bei dieser immortalisierten spermatogenen Zelllinie konnte über Zugabe des *Stem cell factors* eine Differenzierung *in vitro* induziert werden (Feng *et al.*, 2002). Ob mit dieser Zelllinie auch Transfektionsexperimente durchgeführt werden können, ist allerdings noch nicht klar.

1.5.3 Transkriptionelle Regulation und beteiligte Transkriptionsfaktoren

Promotoraktivitäten in männlichen Keimzellen werden über das Zusammenspiel von generellen und Keimzell-spezifischen Transkriptionsfaktoren reguliert (Sassone-Corsi, 2002 B). Die Steuerung des komplexen Differenzierungsprozesses der Spermatogenese benötigt eine Stadien- und Zelltyp-spezifische Genexpression, deren Kontrolle eines speziellen Mechanismus und besonderer Transkriptionskomplexe bedarf. Nach der Meiose ist der Beginn der Spermiogenese durch einen massiven Anstieg der Transkriptionsaktivität gekennzeichnet, der die Aktivierung vieler postmeiotisch exprimierter Gene in frühen haploiden Keimzellen widerspiegelt. Zur Sicherung der effizienten und zeitgenauen Transkription sind viele generelle Transkriptionsfaktoren in Keimzellen differentiell reguliert. Das TATA-bindende Protein (TBP), der Faktor TFIIB und die RNA-Polymerase II akkumulieren in haploiden Keimzellen in größeren Konzentrationen als in somatischen Zellen (Schmidt und Schibler, 1995). Ein weiterer Unterschied zu somatischen Zellen ist die Existenz von Testis-spezifischen Transkriptionsfaktor-Isoformen. TFIIA τ ist eine Isoform des RNA-Polymerase II-assoziierten TFIIA aus somatischen Zellen, welche die Bindung von TBP an die Promotor-DNA stabilisiert. TFIIA τ scheint funktionell mit seiner somatischen Isoform übereinzustimmen, hat aber vermutlich noch andere Bindungsmöglichkeiten für Aktivatoren, ein Charakteristikum, das seine Testis-spezifische Funktion unterstreicht (Upadhyaya *et al.*, 1999; Ozer *et al.*, 2000). Viele andere Proteine des Transkriptionskomplexes sind inzwischen bekannt und nachweislich im Hoden exprimiert: RNA-Polymerase II *elongation factor* (Miller *et al.*, 2000), Testis-spezifisches Elongin (Aso *et al.*, 2000), TBP-assoziiierter Faktor (Martianov *et al.*, 2002), TBP-related Faktor 2 (Sugiura *et al.*, 2003), ein Paralog der Untereinheit von Transkriptionsfaktor TFIID (TAF7L) (Pointud *et al.*, 2003) und TFIIA *alpha/beta-like* Faktor (Han *et al.*, 2001).

Eine besonders wichtige Rolle bei der Keimzell-spezifischen Genaktivierung spielt ein Transkriptionsfaktor der *cAMP-responsive element binding protein* (CREB)-Familie, der *cAMP-responsive element modulator* τ (CREM τ). Dieser Transkriptionsfaktor bindet an ein sogenanntes *cAMP-responsive element* (CRE), das inzwischen in sehr vielen Promotorsequenzen postmeiotisch exprimierter Gene gefunden wurde. Diese CRE-Sequenz besteht aus einer Konsensus-Sequenz von acht Basenpaaren: 5'-TGACGTCA-3' (Sassone-Corsi, 2002 A), an die CREM τ in den Keimzellen bindet. CREM τ ist Testis-spezifisch exprimiert und die ersten Transkripte können in Pachytän-Spermatozyten nachgewiesen werden. CREM τ wird auch als Hauptschalter der Spermatogenese und postmeiotischer Genexpression bezeichnet. Anhand von CREM-*knock-out*-Mäusen konnte gezeigt werden, wie essentiell

dieser Transkriptionsfaktor für die meisten Keimzell-spezifischen Gene ist. *CREM-knock-out*-Männchen sind infertil durch eine Arretierung der Spermatogenese beim Spermatidenstadium 1 (Nantel und Sassone-Corsi, 1996). Diesen Mäusen fehlen viele postmeiotische Schlüsselproteine, wie Protamine, Transitionsproteine, Proakrosin und Calspermin. Die Gene dieser Proteine besitzen alle ein CRE in ihren Promotoren und werden über die Bindung des Transkriptionsfaktors $CREM\tau$ aktiviert. Die Aktivierung funktioniert dabei nicht über eine Phosphorylierung des gebundenen CREM, wie es in somatischen Zellen bei Bindung eines CREB an CRE üblich ist. Deshalb ist auch nicht der klassische Signal-abhängige Mechanismus zur Rekrutierung von CBP möglich. Stattdessen wird CREM über einen Testis-spezifischen Koaktivator ACT (Aktivator von CREM im Testis) aktiviert, der spezifisch in haploiden runden und elongierenden Spermatiden exprimiert wird (Sassone-Corsi, 2002 B; Fimia *et al.*, 1999) (Abbildung 1.8).

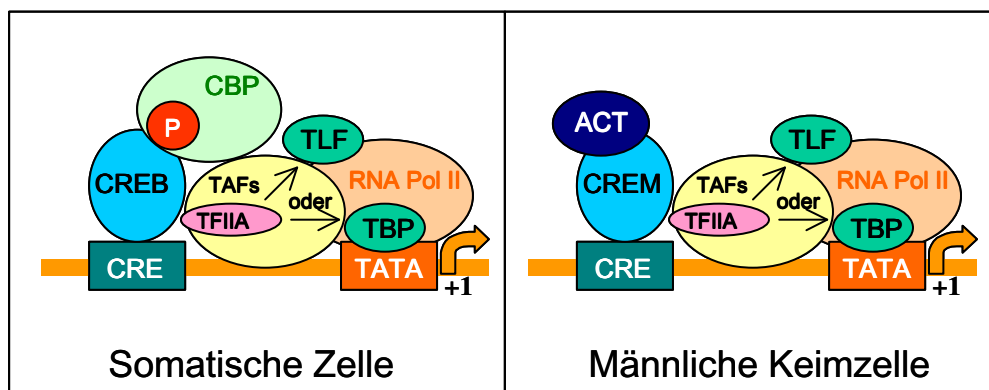


Abbildung 1.8: Vergleich der Transkriptionsaktivierung über das CRE-Motiv in somatischen Zellen und Keimzellen (CRE: *cAMP-responsive element*, CREB: *cAMP-responsive element binding protein*, CBP: *CREB-binding protein*, TBP: *TATA-binding protein*, TLF: *TBP-like factor*, RNA Pol II: *RNA Polymerase II*, TAFs: *TBP-assoziierte Proteine*, CREM: *cAMP-responsive element modulator*, ACT: *Aktivator von CREM im Testis* [modifiziert nach Sassone-Corsi, 2002 B])

Aber nicht nur $CREM\tau$ spielt bei der Regulation haploider Transkription eine Rolle. Der sogenannte *Germ cell nuclear factor* (GCNF) ist ebenfalls ein wichtiger Transkriptionsfaktor bei der Regulation haploid exprimierter Gene. Er gehört zur großen Familie der nukleären Liganden-aktivierten Rezeptoren, wobei bisher für GCNF kein Ligand bekannt ist (Cooney *et al.*, 2001). GCNF bindet spezifisch an direkte Wiederholungen der Konsensussequenz 5'-AGGTCA-3', die in Promotoren vieler postmeiotisch exprimierter Gene vorhanden sind. Anhand von *in vitro*-Studien wird für GCNF eine Funktion als transkriptioneller Repressor

vermutet (Yan und Jetten, 2000). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Expression des Gens für die mitochondriale Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase über eine kombinierte Aktivierung und Repression durch das Zusammenspiel von CREM τ und GCNF reguliert wird (Rajkovic *et al.*, 2004).

1.5.4 Regulation der Translation

Die Umstrukturierung des haploiden Genoms während der Spermiogenese durch Verpackung der DNA mit Hilfe von Protaminen resultiert in einer zunehmenden Kondensation des Zellkerns. Mit zunehmender Chromatinkondensation müssen die reifenden Spermatiden ihre Transkriptionsaktivität irgendwann einstellen (Kierszenbaum und Tres, 1975; Delmas *et al.*, 1993; Dadoune, 2003). Dennoch ist eine *de novo*-Proteinsynthese für die spezifische morphologische Differenzierung des elongierenden Spermiums weiterhin notwendig. Das Problem wird umgangen, indem viele Gene zu einem früheren Zeitpunkt transkribiert und die mRNAs bis zur Translation in einer vor dem Abbau geschützten Form gespeichert werden. Im Falle des Protamin1 findet die Transkription des Gens in runden Spermatiden (Stadium 7) statt, die Translation wird aber erst in elongierenden Spermatiden (Stadium 13) aktiviert (Mali *et al.*, 1989). Die Lagerung der für die spätere Translation aufbewahrten mRNAs erfolgt in sogenannten Ribonukleoprotein-Partikeln (RNPs). Viele Proteine werden als RNA-bindende Translationsregulatoren diskutiert, wobei über die Mechanismen der Repression und Aktivierung noch sehr wenig bekannt ist. Die Ribonukleoprotein-Komplexe werden im Cytoplasma gelagert und können auch über die Cytoplasmabrücken der Spermatiden von Zelle zu Zelle transportiert werden (Giorgini *et al.*, 2002; Tanaka und Baba, 2005). Die Erkennung und Bindung der RNA-bindenden Proteine erfolgt über Sequenzen in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR). Bei postmeiotisch exprimierten Genen scheinen dabei sogenannte H- und Y-Elemente eine Rolle zu spielen (Tanaka und Baba, 2005). Ob für die Verpackung der mRNA in die RNPs spezifische mRNA-Sequenzen als Signal benötigt werden, wird derzeit diskutiert. Im Falle der Protamin1-mRNA findet eine Bindung des murinen Y-Box-Proteins (MSY4) an eine Y-Box-Erkennungssequenz (YRS) statt und vermittelt eine translationale Repression dieses Transkriptes (Zhong *et al.*, 2001; Giorgini *et al.*, 2002). Es wird vermutet, dass die Bindung des MSY4 die zeitlich gesteuerte Aktivierung des Transkriptes determiniert, dass aber die Assoziation der mRNA-Ribonukleoprotein-Partikel sequenzunabhängig verläuft (Schmidt *et al.*, 1999).

1.5.5 Methylierung

Die Methylierung von genomischer DNA ist ein zentraler Mechanismus in der Regulierung gewebespezifischer Expression (Li, 2002). Die Kontrolle der Genexpression erfolgt dabei über Methylierung sogenannter CpG-Inseln, in denen das Cytosin dieses Dinukleotids über eine DNA-Methyltransferase methyliert werden kann. Spermatogenese-spezifische Gensequenzen enthalten CpG-Inseln und es wird vermutet, dass die Zelltyp- und Stadienspezifische Expression von Genen über eine Methylierung und Demethylierung der DNA-Sequenzen gesteuert werden kann (Tanaka und Baba, 2005). In Keimzellen sind bei vielen Testis-spezifischen Genen die CpG-Inseln methyliert, während sie in somatischen Zellen demethyliert vorliegen (De Smet *et al.*, 1999; Singal *et al.*, 2000; Kroft *et al.*, 2001; Hisano *et al.*, 2003). Die Aktivierung des haploid exprimierten Tact1/Actl7b-Gens verläuft beispielsweise über eine Demethylierung einer in der kodierenden Region liegenden CpG-Sequenz. In somatischen Zellen ist diese Sequenz methyliert, wodurch die Expression des Gens verhindert wird (Hisano *et al.*, 2003). Eine zusätzliche Regulation kann stattfinden, wenn die CpG-Inseln in Bindungssequenzen von Transkriptionsfaktoren liegen und eine Regulation noch über die Bindung und Verfügbarkeit dieses Faktors stattfinden kann. Im Falle der Testis-spezifischen Isoform der Pyruvat-Dehydrogenase, die in frühen Spermatozyten exprimiert wird, verläuft eine Regulation über die Methylierung/Demethylierung einer CpG-Insel in einer ATF/CRE-Bindestelle. Eine Aktivierung des Gens verläuft über eine Demethylierung der Sequenz in Spermatozyten, das Gen kann aber erst transkribiert werden, wenn ein bisher unbekannter Transkriptionsfaktor dort bindet, der aber erst mit der Differenzierung zu Spermatozyten verfügbar ist (Iannello *et al.*, 2000). Somit ist über den Methylierungszustand der entsprechenden Gensequenzen auch eine Stadien-spezifische Expression von Keimzell-spezifischen Genen während der Spermatogenese möglich.

1.5.6 Postmeiotische Genexpression in männlichen Keimzellen

Inzwischen sind durch die Fortschritte des Humangenomprojektes und ähnlicher Untersuchungen eine Vielzahl differentiell regulierter Gene des reproduktiven Gewebes der Säuger zusammengestellt worden. Unter den 23 000 Testis-exprimierten Genen der humanen Genomdatenbank sind mehrere tausend, die wahrscheinlich spezifisch in männlichen Keimzellen exprimiert werden (Ivell *et al.*, 2004). So sind inzwischen auch eine Reihe von postmeiotisch exprimierten Keimzellgenen recht gut charakterisiert und in ihrer Genregulation analysiert worden. In den folgenden Kapiteln sollen einige dieser Gene einschließlich der sie steuernden Promotoren vorgestellt werden, wobei der Schwerpunkt auf

den Genen liegt, deren Promotoren auch in der vorliegenden Arbeit für transiente Expressionsanalysen verwendet worden sind.

1.5.6.1 Proakrosin

Proakrosin ist die zymogene Form der Protease Akrosin, die im Akrosom des Spermiums lokalisiert ist und dort nach der Akrosomenreaktion für die Fertilisation wichtig ist (Yamagata *et al.*, 1998). Die Transkription des Proakrosin-Gens startet bei Ratte und Maus in späten Pachytän-Spermatozyten, das Protein wird aber zuerst in haploiden Spermatiden detektiert (Nayernia *et al.*, 1994 A und 1994 B). Es liegt hier also auch eine Verzögerung der Translation vor. Über Promotoranalysen mit transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Stadien-spezifische Expression des Gens in männlichen Keimzellen über regulative Sequenzen innerhalb eines Bereichs von 900 Basenpaaren vor dem Translationsstart vermittelt wird. Über EMSA-Analysen wurde die Promotorsequenz auf Transkriptionsbindungsstellen hin untersucht. Es wurden mehrere *cis*-aktivierende Elemente gefunden: zwei CRE, ein YY1-Element, eine Y-Box und eine CRE-ähnliche Sequenz. Die Anwesenheit einer Y-Box deckt sich mit der schon beschriebenen posttranskriptionalen Repression der mRNA. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass hier ein Y-Box-Bindeprotein ähnlich dem MSY4 bei Protamin binden kann. Wie in vielen anderen Keimzell-spezifischen Promotoren finden sich auch hier Bindestellen für CREM. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das YY1-Motiv von einem YY1-Protein gebunden wird. Es wird vermutet, dass es als Repressor agiert und das Proakrosin-Gen erst aktiviert wird, wenn dieser durch Keimzell-spezifische Proteasen gespalten wird. Es ist bemerkenswert, dass bis auf das CRE-ähnliche Element alle regulativen Sequenzen hinter dem Transkriptionsstart entweder innerhalb eines Introns oder in der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) liegen. In den letzten Jahren sind tatsächlich immer häufiger Elemente gefunden worden, die eine transkriptionelle Regulation auch über stromabwärts gelegene Sequenzen vermitteln können (Schulten *et al.*, 2001; Ogbourne und Antalis, 1998).

1.5.6.2 Protamin

Die Protamine sind kleine argininreiche Proteine, die für die Verpackung der Spermien-DNA in eine kompakte und kondensierte Struktur wichtig sind. Obwohl Maus und Ratte eng verwandt sind, unterscheiden sich ihre Spermatozoen in der Zusammensetzung ihrer Kern-DNA. Während bei Mäusen zwei Protamin-Proteine, Protamin1 und Protamin2, exprimiert werden, findet sich in den Spermatozoen der Ratte nur Protamin1. Dabei sind die Gene für die

zwei Protamine in beiden Spezies vorhanden und zeigen eine Übereinstimmung der Protamin1- und Protamin2-Sequenzen von etwa 90 %. Tatsächlich exprimieren auch die Spermien der Ratte eine Protamin2-mRNA, ein reifes Protamin2-Protein lässt sich aber nicht nachweisen (Hecht, 1990). Die Gene für die Protamine liegen in einem Gencluster zusammen mit den Transitionsproteinen auf ein und demselben Chromosom: bei Mensch und Maus auf Chromosom 16 (Reeves, 1989). Die Protamin-Gene sind postmeiotisch exprimierte Gene und werden zuerst in runden haploiden Spermatischen transkribiert. Bei der Ratte lässt sich die mRNA für Protamin1 in den Spermatischen Stadien 7–16 nachweisen (Hecht, 1990). Die Transkripte unterliegen einer translationalen Kontrolle und werden bis zu acht Tage in Ribonukleoprotein-Partikeln gespeichert, bis sie schließlich in elongierten Spermatischen translatiert werden (Kleene *et al.*, 1984). In transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass ein Promotorbereich von nur 113 Basenpaaren ausreichend ist für eine Haploid-spezifische Expression des Protamin1-Gens (Zambrowicz *et al.*, 1993). In diesem Bereich konnte eine CRE-ähnliche Sequenz nachgewiesen werden, die mit der CRE-Konsensussequenz bis auf einen Basenaustausch identisch ist. Die Bindung eines Testis-spezifischen Faktors an diese Sequenz konnte *in vitro* gezeigt werden (Zambrowicz und Palmiter, 1994).

1.5.6.3 SP-10

Das akrosomale Protein SP-10, oder auch Acrv1, wurde als erstes in humanen Spermien identifiziert und ist evolutionär konserviert (Wright *et al.*, 1990). Das murine SP-10-Gen wird postmeiotisch in runden Spermatischen der Stadien 1–6 transkribiert. Promotoranalysen in transgenen Mäusen zeigen, dass eine proximale Promotorsequenz von nur 294 Basenpaaren eine Zelltyp- und Stadien-spezifische Expression vermitteln kann. Dem Promotor fehlt eine klassische TATA-Box, und so findet der Transkriptionsstart über eine pyrimidinreiche Initiatorsequenz statt. In diesem Sequenzbereich liegen einige *cis*-aktivierende Elemente, darunter auch eine CRE-ähnliche Sequenz. Eine Abhängigkeit vom Transkriptionsfaktor CREM τ kann aber ausgeschlossen werden, da SP-10 in den schon beschriebenen CREM-*knock-out*-Mäusen weiterhin exprimiert wird. Die frühe Spermatischen-spezifische Expression des SP-10-Gens muss also über einen speziellen Kontrollmechanismus reguliert werden (Reddi *et al.*, 1999). Zusätzlich wurde eine *cis*-regulatorische Sequenz gefunden, die scheinbar aktiv eine Transkription des SP-10 in somatischen Zellen, wie auch in diploiden Keimzellen, verhindert. Bei den Experimenten mit transgenen Mäusen, die ein SP-10-Reportertransgen besaßen, wurde nämlich keine transgene Linie gefunden, bei der eine ektopische Expression des Transgens zu beobachten war. Üblicherweise sollte es einige

wenige transgene Linien geben, in denen das Transgen zufällig in einer Region des Genoms integriert wird, in der es unter die Kontrolle eines *Enhancers* oder anderer regulatorischer Einheiten gerät, wodurch eine gewebespezifische Expression des Transgens überdeckt wird. Das Fehlen dieser sogenannten Positionseffekte lässt sich durch eine Funktion des SP-10-Promotors als sogenannter „Insulator“ erklären. Die Insulator-Sequenz schützt anscheinend das Transgen vor der transkriptionellen Interferenz benachbarter regulatorischer Elemente. Der für diese Funktion wichtige Sequenzabschnitt konnte im SP-10-Promotor auf einen Bereich von 50 Basenpaaren eingeengt werden und befindet sich zwischen Nukleotid –186 und –135 in Bezug auf den Transkriptionsstart. Es wird vermutet, dass spezielle Insulator-Bindeproteine die *Enhancer*-blockierende Funktion in somatischen Zellen vermitteln (Reddi *et al.*, 2003).

1.6 Das *Endozepine-like peptide*

Die cDNA für das *Endozepine-like peptide* (ELP) ist über ein differentielles Klonierungsprojekt entdeckt worden, in dem Hoden von Wildtyp-Mäusen mit denen von azoospermen Mäusen verglichen wurden (Pusch *et al.*, 1996). Das ELP-Protein repräsentiert eine Testis-spezifische Isoform des ubiquitär exprimierten Acyl-CoA-bindenden Proteins (ACBP, auch bekannt unter Diazepam-bindendem Inhibitor oder Endozepine). Es hat auf Ebene der Aminosäuresequenz mit dem ACBP-Protein etwa 50 % identische Aminosäuren. Beide Proteine haben die gleiche Polypeptidlänge und besitzen beide ein konserviertes Bindungsmotiv für Acyl-CoA. ACBP wird in fast allen Geweben des Körpers exprimiert und ist verantwortlich für Transport und Lieferung von Acyl-CoA an Acyl-CoA-verbrauchende Systeme, zum Beispiel die β -Lipid-Oxidation (Rasmussen *et al.*, 1993). Eine Rolle bei intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen oder bei der Unterstützung der Steroidogenese wird diskutiert (Faergeman *et al.*, 1997; Papadopoulos *et al.*, 1993). Das ELP-Gen wird dagegen ausschließlich in postmeiotischen Stadien männlicher Keimzellen exprimiert (Pusch *et al.*, 1999). Eine ACBP-Expression findet sich im Hodengewebe fast ausschließlich in den somatischen Sertoli- und Leydigzellen (Bovolin *et al.*, 1990; Schultz *et al.*, 1992), obwohl eine Expression auch in Keimzellen diskutiert wird (Kolmer *et al.*, 1997). Die Expression von ELP in Keimzellen und ACBP in somatischen Zellen lässt eine wichtige Rolle des ELPs in der Ausübung ACBP-ähnlicher Funktionen in reifenden Keimzellen vermuten. Die ELP-Expression in den Keimzellen ist Stadien-spezifisch (Pusch *et al.*, 2000). Die ersten Transkripte werden bei der Ratte in Spermatischen des Stadiums 6 gefunden mit einem zunehmenden Anstieg der mRNA-Expression bis hin zu den reifen Spermatozoen (siehe

Abbildung 1.9). Das ELP-Protein findet sich erst in Keimzellen der Stadien 16–19 (siehe Abbildung 1.10).

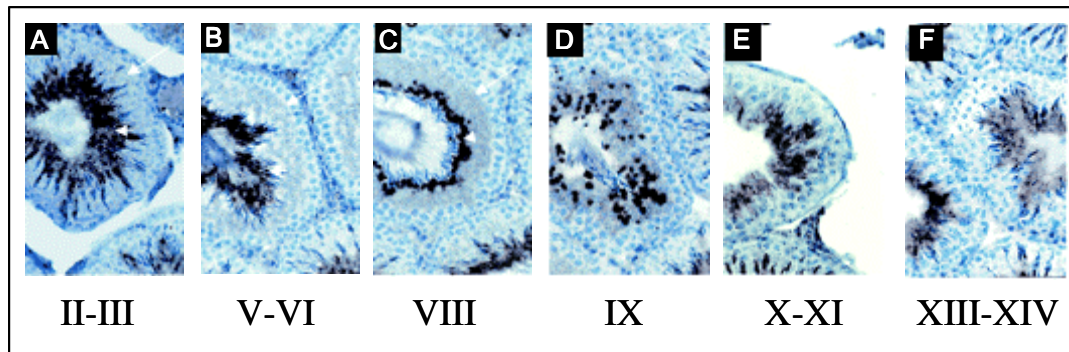


Abbildung 1.9: Nichtradioaktive *in situ*-Hybridisierung für den Nachweis von ELP-mRNA im Hoden von adulten Ratten. Bilder A–F zeigen eine Markierung der ELP-Transkripte in verschiedenen Spermatozytendifferenzierungsstufen der unterschiedlichen Stadien des Spermatogenese-Zyklus (I–XIV). Pfeile weisen auf schwache und starke Signale in runden und elongierenden Spermatozyten hin (modifiziert nach Pusch *et al.*, 2000).

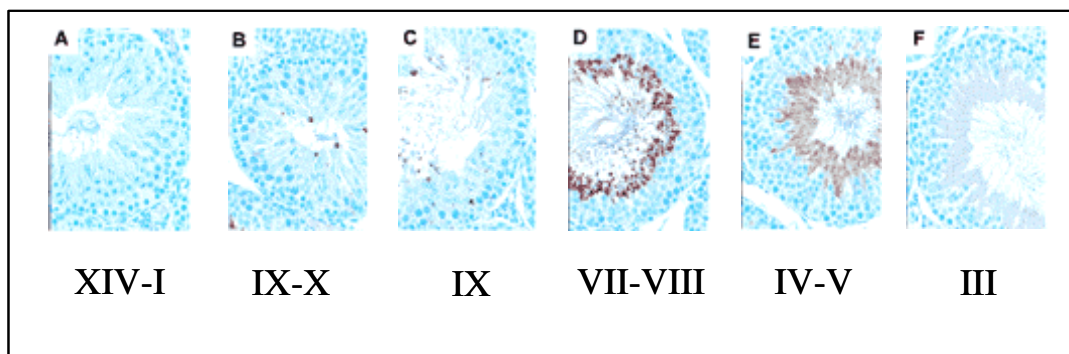


Abbildung 1.10: Immunohistochemische Analyse der ELP-Proteinexpression im Hoden von adulten Ratten. Bilder A–F zeigen eine Detektion des ELP-Proteins in verschiedenen Spermatozytendifferenzierungsstufen der unterschiedlichen Stadien des Spermatogenese-Zyklus (I–XIV) (modifiziert nach Pusch *et al.*, 2000).

Die Expression des ELP-Gens ist also durch späte haploide Expression in männlichen Keimzellen und eine verzögerte Translation charakterisiert. Eine Analyse *cis*-regulatorischer Elemente im Promotorbereich des ELP-Gens fand über EMSA-Studien mit der murinen Sequenz statt (Valentin *et al.*, 2000). Die strukturelle Organisation des Maus-ELP-Gens stellt sich wie folgt dar:

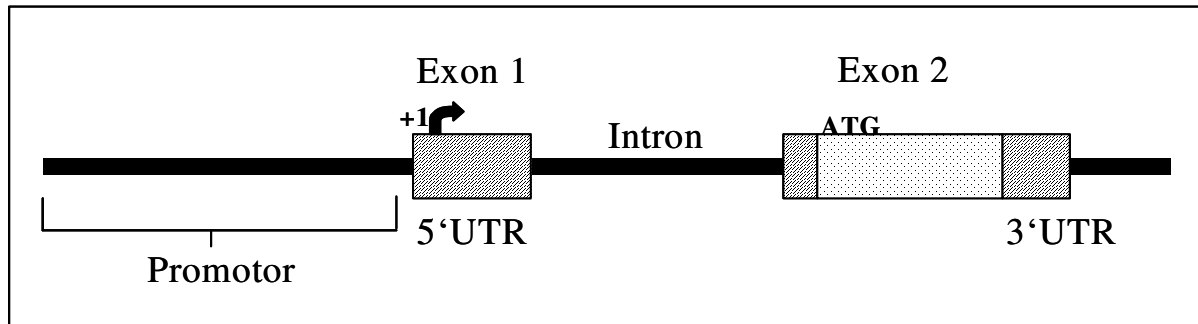


Abbildung 1.11: Strukturelle Organisation des ELP-Gens (modifiziert nach Valentin *et al.*, 2000)

Das ELP-Gen besteht aus nur zwei Exons, wobei sich der offene Leserahmen komplett im zweiten Exon befindet. Der Transkriptionsstart im ersten Exon wird über ein langes Intron vom Translationsstart getrennt. Es wird vermutet, dass das Testis-spezifische ELP-Gen über eine Retroposon-vermittelte Genduplikation des somatischen ACBP-Gens entstanden ist, und über die Akquirierung eines neuen Promotors seine haploidspezifische Expression ermöglicht wurde. Dem ELP-Promotor fehlt eine klassische TATA-Box als Transkriptionsstart; die Initiation der Transkription beginnt an der Sequenz 3'-TATT-5' (Nukleotide +1 bis +4). Eine *in vitro*-Analyse von DNA-Protein-Interaktion fand anhand einer DNA-Sequenz von etwa 700 Basenpaaren der vor dem Transkriptionsstart liegenden murinen Sequenz statt (Valentin *et al.*, 2000). Einige mögliche Transkriptionsbindungsstellen werden diskutiert. Unter ihnen findet sich auch eine CRE-ähnliche Sequenz, obwohl eine Bindung des Transkriptionsfaktors CREM τ *in vitro* nicht gezeigt werden konnte. Tatsächlich ist aber in azoospermen Mausmutanten, wie der CREM-*knock-out*-Maus, weder auf mRNA- noch auf Proteinebene eine ELP-Expression nachzuweisen. Außerdem wurde ein Sequenzmotiv gefunden, mit dem SF-1 oder GCNF interagieren können. Eine Bindung der beiden Faktoren konnte *in vitro* auch gezeigt werden (Valentin *et al.*, 2000). Obwohl ansonsten keine perfekten Konsensusmotive für bekannte Transkriptionsfaktoren gefunden wurden, sind doch ein paar Sequenzen detektiert worden, die auch in den regulativen Sequenzen anderer Testis-spezifischer Gene vorkommen (Valentin *et al.*, 2000). Eine genauere Analyse der Promotorregion des ELP-Gens sollte in der vorliegenden Arbeit anhand von Promotor-Reporterkonstrukten und Promotor-Deletionskonstrukten erfolgen.

1.7 Ziel der Arbeit

Eine Charakterisierung von haploid exprimierten Genen und ihrer Regulation ist durch das Fehlen geeigneter Zelllinien bisher hauptsächlich nur über die Generierung transgener Tiere möglich gewesen. Diese Technik ist allerdings sehr zeit- und kostenintensiv und für ein paralleles *Screening* unterschiedlicher Promotor-Deletionskonstrukte auch im Hinblick auf den Tierverbrauch nicht optimal. In dieser Arbeit sollte deshalb ein Transfektions- und Kultursystem etabliert werden, in dem die Einführung von Promotorkonstrukten und eine Kultur der Zellen bis zur Expression eines Reportergens möglich ist. Am vielversprechendsten erschien hier die Kultur von intakten Hodenkanälchen, da in der Vergangenheit Experimente mit humanen Tubuli seminiferi schon recht erfolgreich verlaufen waren (Seidl und Holstein, 1990). Dass eine Transfektion der Hodenkanälchen prinzipiell möglich ist, zeigen einige Berichte aus der Literatur (Yamazaki *et al.*, 1998 und 2000; Huang *et al.*, 2000), in denen eine *in vivo*-Gentransfermethode über DNA-Injektion und anschließende Elektroporation erfolgreich eingesetzt wurde. Mit der Übertragung dieser Technik auf *in vitro*-kultivierte Hodenkanälchen sollte in dieser Arbeit ein einfaches, kostengünstiges und ethisch vertretbares Verfahren entwickelt werden, das eine schnelle Analyse von Reporterexpression in haploiden Keimzellen und damit eine Studie der transkriptionellen Genregulation ermöglicht. Zur Optimierung der Transfektionstechnik sollte dabei ein konstitutiv exprimiertes Reportergen, das *Enhanced green fluorescent protein* (EGFP), eingesetzt werden, das mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie eine hervorragende Analyse der Genexpression im Keimepithel der transfizierten Tubuli ermöglicht. Anschließend sollte anhand schon charakterisierter haploid exprimierter Promotoren überprüft werden, ob über diese Transfektionstechnik eine Zelltyp- und Stadien-spezifische Reporterexpression in Analogie zur *in vivo*-Expression des Gens rekapituliert werden kann. Als Kontrollen wurden bereits analysierte Promotorsequenzen der Gene für Protamin1, SP-10 und Proakrosin verwendet, die in den Reportervektor kloniert wurden. Im weiteren sollte dann eine Fokussierung auf die Analyse des spät haploid aktivierten Promotors des *Endozepine-like peptide* (ELP) stattfinden. Die Promotorsequenz wurde schon zuvor im Hinblick auf DNA-Protein-Interaktion in einem *Electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) analysiert (Valentin *et al.*, 2000). Der ELP-Promotor sollte dann anhand von Reporter-Deletionskonstrukten mit Hilfe der neuen Technik weiter charakterisiert werden. Für die Messung von quantitativen Expressionsunterschieden der eingesetzten Deletionskonstrukte wurden zusätzlich Promotorsequenzen in einen Luziferase-Reportervektor kloniert, um eine Reporterexpression in homogenisierten Tubuli zu ermitteln. Somit sollte es möglich sein, eine Reihe von wichtigen

cis-regulatorischen Sequenzen und mögliche Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen zu identifizieren, die eine haploide Genexpression ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle im Folgenden nicht gesondert aufgeführten Reagenzien wurden im höchstmöglichen Reinheitsgrad bzw. als für die Zellkultur und Molekularbiologie geeignet von den Firmen Applichem (Darmstadt), Fluka (Buchs, CH), Merck (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim), Sigma (Deisenhofen) und Serva (Heidelberg) bezogen.

4',6-Diaminodino-2-phenylindol (DAPI)	Merck
6x Auftragspuffer für Gelelektrophorese	MBI Fermentas
Agar	Difco
Agarose <i>Electrophoresis Grade</i>	Invitrogen
Ampicillin	Applichem
Annexin V	Apotech
DAKO Stift für Immunohistochemie	DAKO
Dihydrotestosteron	Sigma
<i>Dulbecco's Modified Essential Medium (High Glucose)</i>	PAA
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>	PAA
<i>Epidermal growth factor</i>	Upstate Biotechnology
Ethidiumbromid	Sigma
Fluoromount G	Southern Biotech
Humanes Apo-Transferrin	Sigma
Rekombinantes humanes follikelstimulierendes Hormon	NHPP
Humanes Wachstumshormon	Ely Lilly & Co
Insulin	Invitrogen
<i>Insulin-like growth factor-1</i>	Upstate Biotechnology
IPTG	Applichem
Kanamycin	Applichem
LB Komplexmedium LB Broth, Lennox	Difco
Lektin PNA AlexaFluor [®] 568 Konjugat	Molecular Probes
L-Glutamin	Sigma
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Meyer's Hämalaunlösung	Merck

<i>Minimum Essential Medium</i> (ohne L-Glutamin/Phenolrot)	Gibco
Natriumpyruvat	Sigma
Nichtessentielle Aminosäuren	Gibco
<i>Normal Goat Serum</i>	Vector Laboratories
Penicillin/Streptomycin	Sigma
<i>Reporter Lysis Buffer</i> (5x)	Promega
Retinol	Sigma
Testosteron	Sigma
<i>Tissue-Tek O.C.T.</i> TM <i>Compound</i>	Sakura Finetek
TO-PRO [®] -3-Iodid	Molecular Probes
Zellkulturwasser	Sigma

2.1.2 Reaktions- und Färbe-Kits

<i>In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red</i>	Roche Diagnostics
<i>JetStar Plasmid Midi Kit</i>	Genomed
LIVE/DEAD [®] <i>Viability/Cytotoxicity Kit</i>	Molecular Probes
<i>Luciferase Assay System</i>	Promega
<i>NucleoSpin Extract</i>	Macherey-Nagel
<i>NucleoSpin Plasmid DNA Purification</i>	Macherey-Nagel
<i>PCR Cloning Kit</i>	Qiagen

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Nicht gesondert aufgeführte Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Biozym (Hess. Oldendorf), Nunc (Kamstrup, Dänemark), Greiner (Nürtingen) und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

50 ml Vakuumfilter-System 0,2 µm	Corning Inc.
500 ml Vakuumfilter-System 0,45 µm	Nalge Company
Cytofunnel-Kammern	Shandon
Deckgläser	Menzel-Gläser
Einmalpipetten	Becton Dickinson
Falcon-Röhrchen	Becton Dickinson
Femtotips II Mikroinjektionskapillaren	Eppendorf
Kimwipes [®] Lite	Kimberly-Clark

Lab-Tek 1.0 <i>Borosilicate Coverglass, 4 Chamber</i>	Nunc
<i>Microloader</i>	Eppendorf
<i>Multiwell-Platten Nunclon Surface</i>	Nunc
<i>PCR Softtubes</i>	Biozym
<i>Petrischalen Cellstar</i>	Greiner
Reaktionsgefäße	Sarstedt
Spitzen	Biozym
Spitzenaufsatzfilter Minisart 0,2 µm	Sartorius
<i>SuperFrost[®]Plus</i> Objektträger	Menzel-Gläser
Zellkulturflaschen <i>Nunclon Surface</i>	Nunc

2.1.4 Geräte

Cytospin3	Shandon
Dampfsterilisator Varioklav	H+P Labortechnik
Elektroporator PA-4000S	Cyto-Pulse Sciences
Feinwaage 1615 MP	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop „Diaphot“	Nikon
Heizrührer Ikamag RH	Janke & Kunkel
Horizontale Gelkammern <i>Easy-Cast Electrophoresis System</i>	Peqlab
Inkubator für Bakterien	Heraeus
Inkubator „Hera Cell“	Heraeus
Konfokales Lasermikroskop „TCS SL“	Leica
Kryotom 2800 Frigocut	Reichert-Jung
Luminometer	Berthold
Mikromanipulator 5171	Eppendorf
Mikroskop „Axiovert100“	Zeiss
Mixer VF2	Janke & Kunkel
Netzteil <i>Standard Power Pack P25</i>	Biometra
Photometer „Ultrospec 3000“	Pharmacia Biotech
Reine Werkbank „Hera Safe“	Heraeus
Schüttelwasserbad	GFL
<i>Thermocycler Cyclone Gradient</i>	Peqlab
Thermomixer 5436	Eppendorf
Thermomixer compact	Eppendorf

Tischautoklav Tuttnauer 2540EL	Systec GmbH
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus
Transjector 5246	Eppendorf
UV-Durchlichttisch <i>Imago Compact Imaging System</i>	B & L Systems
Vakuumzentrifuge Univapo 150 H	Univapo
Wallac Victor ² 1420 <i>Multilabel Counter</i>	Perkin Elmer
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus
Zentrifuge Megafuge 2.0R	Heraeus

2.1.5 Puffer und Lösungen

Reagenzien für Puffer und Lösungen wurden den Erfordernissen entsprechend in bi-distilliertem Wasser gelöst und nach Bedarf autoklaviert oder sterilfiltriert.

Ampicillinlösung	1 g Ampicillin (Natriumsalz) in 10 ml H ₂ O _{bidest} gelöst, sterilfiltriert, aliquotiert, bei -20 °C lagerstabil
IPTG-Lösung 0,5 M	1,19 g IPTG in 10 ml H ₂ O _{bidest} gelöst, sterilfiltriert, aliquotiert, bei 4 °C lagerstabil
Fixierungslösung	8 g Paraformaldehyd (4 %) in 200 ml PBS unter Erwärmung gelöst und mit 20 g Sucrose (10 %) versetzt; pH 7.4 einstellen
Kanamycinlösung	300 mg Kanamycin in 10 ml H ₂ O _{bidest} gelöst, sterilfiltriert, aliquotiert, bei 4 °C lagerstabil
PBS	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na ₂ HPO ₄ , 0,24 g KH ₂ PO ₄ , ad 1 l H ₂ O _{bidest} , pH 7.4 mit HCl einstellen, autoklavieren
PBS + Ca/Mg	siehe PBS mit Zusatz von 1,11 g CaCl und 0,102 MgCl ₂
Permeabilisierungslösung	PBS mit 1 % Natriumcitrat und 1 % Triton X 100

TAE-Puffer 4,84 g Tris, 1,142 ml Essigsäure, 2 ml 0,5 M EDTA pH 8.0,
ad 1 l H₂O_{bidest}, pH 8.0 mit HCl einstellen, autoklavieren

X-Gal-Lösung 0,2 g X-Gal in 10 ml DMSO gelöst, aliquotiert, bei 4 °C
lichtgeschützt lagerstabil

2.1.6 Enzyme

Alle hier aufgeführten Enzyme wurden gemäß der vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen und mit den dazu gelieferten Puffern verwendet.

DNA Polymerase <i>Large Fragment</i> (Klenow) (5 U/μl)	New England Biolabs
DNA Polymerase TaKaRa Ex Taq™ (5 U/μl)	Takara Bio Inc.
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
T4 DNA Ligase <i>High Concentration</i> (5 U/μl)	Invitrogen

2.1.7 Molekulargewichtsmarker

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	MBI Fermentas
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	MBI Fermentas

2.1.8 Kulturmedien

2.1.8.1 Kulturmedium für Bakterien

LB-Medium

LB Broth, Lennox 20 g

Ad 1 l H₂O_{bidest}

pH 7.0

Für die Herstellung von LB-Agar-Platten wurde dem Kulturmedium 15 g/l Agar zugesetzt. Die Medien wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt und autoklaviert. LB-Medium wurde bei 4 °C für einige Wochen gelagert. LB-Agar-Medium wurde nach dem Autoklavieren auf ca. 55 °C gekühlt, mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum (Endkonzentrationen Ampicillin 100 μg/ml, Kanamycin 30 μg/ml) versetzt und unter sterilen Bedingungen in Kulturschalen (56,7 cm²) gegossen. Wenn eine Blau/Weiß-Selektion nötig war, wurde dem Medium noch IPTG (Endkonzentration 0,5 mM) und X-Gal (Endkonzentration 80 μg/ml)

zugemischt. Nach dem Aushärten der Agar-Platten wurden diese für einige Wochen bei 4 °C gelagert.

2.1.8.2 TKM-Kulturmedium für isolierte Ratten-Hodenkanälchen

Für die Kultivierung der frisch isolierten Ratten-Hodenkanälchen wurde ein nach Tres und Kierszenbaum modifiziertes Medium (TKM) verwendet (Tres *et al.*, 1992).

Minimum Essential Medium (ohne L-Glutamin und Phenolrot) mit:

Insulin	5 µg/ml
Transferrin	5 µg/ml
<i>Epidermal growth factor</i>	10 ng/ml
<i>Insulin-like growth factor</i>	10 ng/ml
Wachstumshormon	10 ng/ml
FSH	10 ng/ml
Retinol	5 µM
Testosteron	0,1 µM
Dihydrotestosteron	0,1 µM
L-Glutamin	4 mM
Natriumpyruvat	1 mM
Nichtessentielle Aminosäuren	0,1 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml

2.1.8.3 Kulturmedium für SK11-Zelllinie

Dulbecco's Modified Essential Medium (High Glucose) wurde mit 10 % FCS und Penicillin/Streptomycin versetzt.

2.1.9 Tiere und biologisches Material

2.1.9.1 Versuchstiere

Für die Präparation des frischen Hodengewebes wurden männliche Wistar-Ratten (*Rattus norvegicus* L.) aus der zentralen Tierhaltung des Universitätskrankenhauses Eppendorf verwendet. Alle Tiere waren geschlechtsreif und zwischen sieben und acht Monate alt. Die Tiere wurden unter konstanten Bedingungen mit abwechselnden Hell- und Dunkelperioden von jeweils 12 Stunden gehalten und erhielten Standardfutter und Wasser *ad libitum*.

2.1.9.2 Eukaryotische Zelllinie

Für Transfektionsexperimente wurde die Maus-Sertolizell-Zelllinie SK11, etabliert aus H-2K^b-tsA58 transgenen Mäusen (Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung, Hamburg [Walther *et al.*, 1996]), benutzt.

2.1.9.3 Bakterien

Für die Klonierungsexperimente wurden kompetente Zellen des *Escherichia coli*-Stammes DH5 α (Invitrogen) benutzt.

2.1.10 Antikörper

2.1.10.1 Primärer Antikörper

Anti-Maus ELP aus Kaninchen

2.1.10.2 Sekundäre Antikörper

Anti-Kaninchen IgG Cy3 TM -gekoppelt aus Ziege	Jackson ImmunoResearch
Anti-Maus IgG Cy3 TM -gekoppelt aus Ziege	Jackson ImmunoResearch
Anti-Kaninchen IgG Cy2 TM -gekoppelt aus Ziege	Jackson ImmunoResearch

2.1.11 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden entweder von der Firma IBA (Göttingen) als 100 μ M Stocklösung oder von MWG Biotech AG (Ebersberg) als Lyophilisat bezogen und mit autoklaviertem Wasser auf 100 μ M eingestellt. Aliquotierte Lösungen wurden bei -20°C gelagert. Die Sequenzabschnitte aller benutzten Primer und Sonden sind in 5' \rightarrow 3'- Richtung auf dem Plus-Strang dargestellt. Je nach Klonierungsstrategie wurden entsprechende Restriktionsschnittstellen in die Primersequenzen eingefügt.

Primer für die Amplifikation der Promotorsequenzen aus genomischer DNA:

Promotor	Primersequenzen 5'→3'
<i>ratABP_Ase_forward</i>	TAT TAA TGC TGT CTC AAC CTT GGG TGC
<i>ratABP_reverse</i>	AGT TAG CAG CTG TCC ACC CAG T
<i>ratProtamine1_Ase_forward</i>	TAT TAA TGT CTA GTA ATG TCC AAC AGC
<i>ratProtamine1_reverse</i>	AAC CTG TGA GCA GGT GGA ATT TTG
<i>ratProakrosin_Ase_forward</i>	TAT TAA TGG GTA GGA GCA TTC TCA TCT CGT
<i>ratProakrosin_reverse</i>	CAG ATC TGC CTG CAA GCT GTG ACC TCA CAA
<i>ratSP-10_Ase_forward</i>	TAT TAA TCC TCC AAT CTT AGG ACT AAC CTC
<i>ratSP-10_reverse</i>	TGG CAC ACT CAA GAG CTG AGA AGA AAC
<i>ratELP10_Ase_forward</i>	TAT TAA TGC AGG GTG TCA ACT AG
<i>ratELP290_Ase_forward</i>	TAT TAA TGT GCC ATC TCA GGC TGC
<i>ratELP290_Bgl_forward</i>	TAA GAT CTT CGT GCC ATC TCA GGC
<i>ratELP-GCNF_Bgl_forward</i>	TAA GAT CTT CAT TCG CTC GCG G
<i>ratELP980_reverse</i>	TTG TTG GAA AGG AGT ACG CGT G
<i>ratELP1500_reverse</i>	TAT ACC AGA AGC CGT GCC TCT G

2.1.12 Vektoren

Es wurden folgende Vektoren verwendet:

GFP-Reportervektoren

pEYFP-N1	BD Biosciences (siehe Abbildung 2.1)
pEGFP-N1	BD Biosciences (siehe Abbildung 2.2)
pEYFP-Mito	BD Biosciences (siehe Abbildung 2.5)

Luziferase-Reportervektoren

pGL3-Basic	Promega (siehe Abbildung 2.3)
pGL3-Control	Promega (siehe Abbildung 2.4)

Klonierungsvektor

pDrive	Qiagen (siehe Abbildung 2.6)
--------	------------------------------

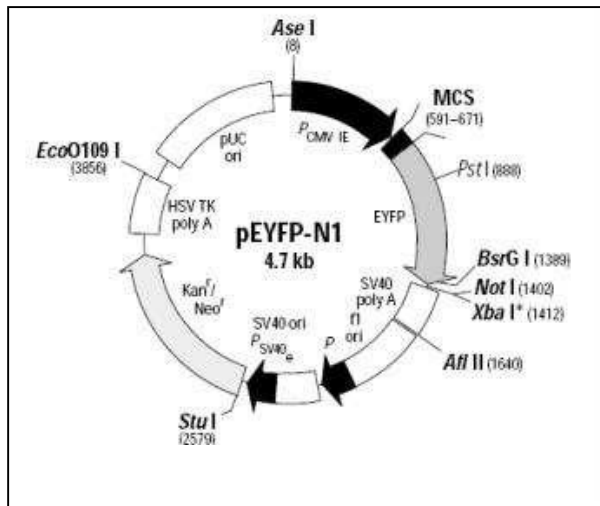


Abbildung 2.1: pEYFP-N1

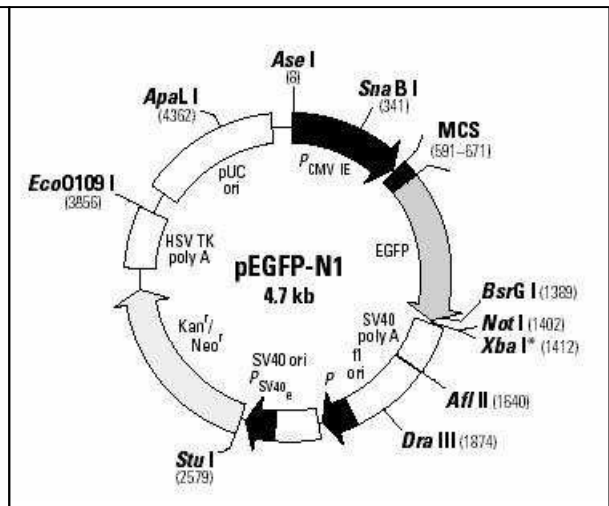


Abbildung 2.2: pEGFP-N1

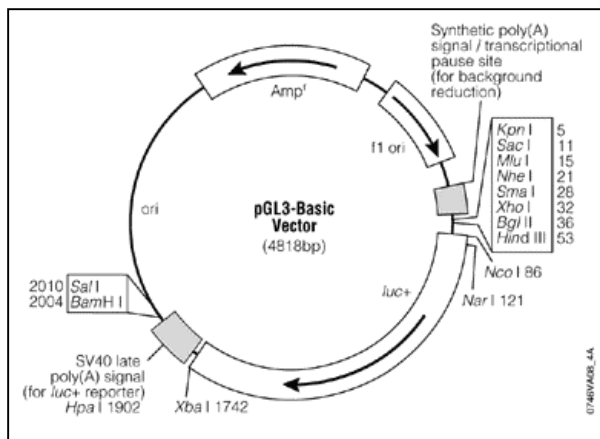


Abbildung 2.3: pGL3-Basic

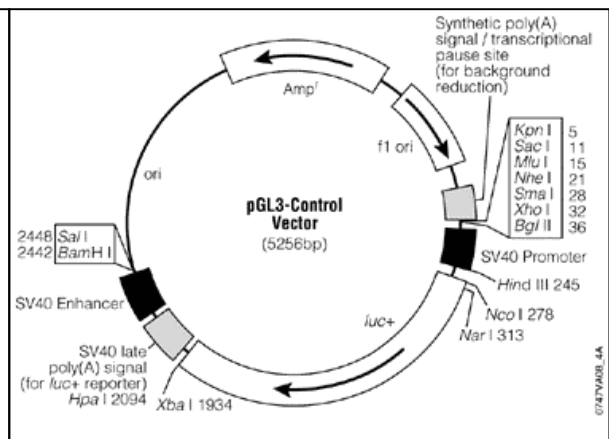


Abbildung 2.4: pGL3-Control

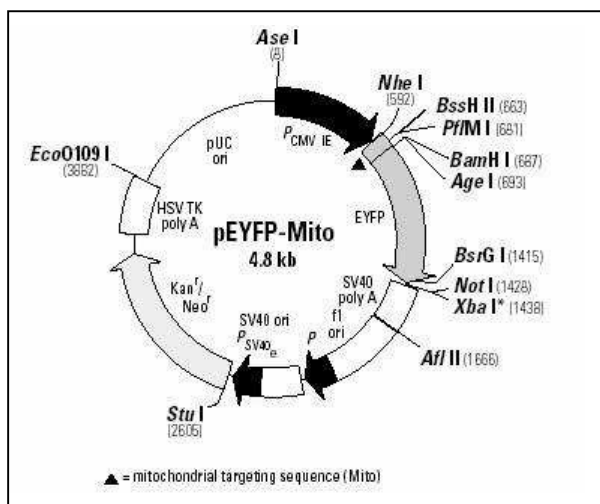


Abbildung 2.5: pEYFP-Mito

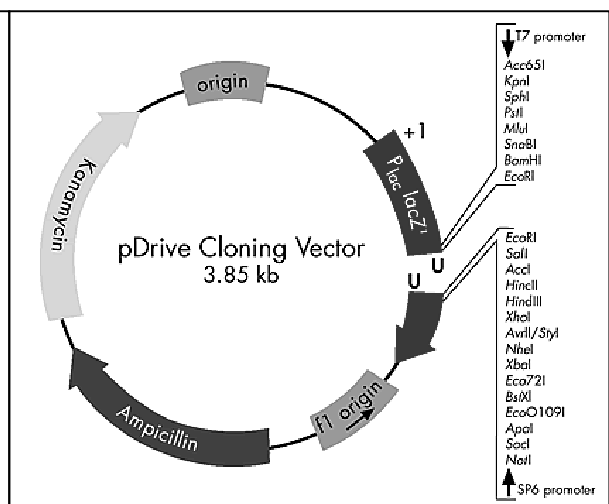


Abbildung 2.6: pDrive

2.2 Methoden

2.2.1 Bakterien

2.2.1.1 Transformation und Aufzucht von Bakterien

Die Aufzucht der Bakterien und die Transformation mit einem Plasmid erfolgte nach einem Standardprotokoll (Sambrook *et al.*, 1989). Für die Kultur in LB-Flüssigmedium wurden die Bakteriensuspensionen über Nacht bei 37 °C und 150 rpm in einem Schüttler inkubiert. Die Kultur auf LB-Agar-Platten erfolgte über Nacht ebenfalls bei 37 °C in einem Brutschrank. Die Selektion auf Bakterien mit dem gewünschten Vektor erfolgte über Zugabe der Antibiotika Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (30 µg/ml) zum Nährmedium. Die Kulturen wurden bei 4 °C gelagert.

2.2.1.2 „Mini“-Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des *Nucleospin Plasmid Kits*. Dafür wurden 4 ml LB-Medium inklusive entsprechendem Antibiotikum mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt (170 rpm). Am folgenden Tag wurden jeweils 3–4 ml der Kulturen bei 14 000 rpm zehn Minuten lang zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Bakterienpellets resuspendiert. Die Plasmid-DNA wurde anschließend nach Herstellerangaben präpariert und schließlich in 50 µl Elutionspuffer aufgenommen. Im Anschluss wurde eine Analyse mittels Restriktionsverdau oder Sequenzierung durchgeführt. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei –20 °C.

2.2.1.3 „Midi“-Präparation von Plasmid-DNA

Eine Präparation von größeren Mengen Plasmid-DNA wurde für die Transfektion von Zellen hergestellt. Hierzu wurde ein Plasmid-Kit der Firma Genomed verwendet, wobei 50 ml einer Übernachtkultur nach dem Protokoll des Herstellers aufbereitet wurden. Die DNA wurde anschließend in sterilem Zellkulturwasser aufgenommen. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei –20 °C.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 PCR (*Polymerase chain reaction*)

In der Polymerase-Kettenreaktion werden DNA-Segmente in einem zyklisch ablaufenden Prozess enzymatisch amplifiziert. Das Prinzip beruht auf einer komplementären Bindung und Verlängerung zweier Oligonukleotide, sogenannten Primern, die einen zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankieren. Die dabei neu synthetisierten DNA-Stränge dienen in weiteren

Syntheszyklen als Vorlage für die anschließende Amplifizierung. Der PCR-Prozess besteht meistens aus einer Serie von 20 bis 30 Zyklen. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten. Zunächst wird die doppelsträngige DNA auf 96 °C erhitzt um die Stränge zu trennen. Dieser Schritt wird *melting* (schmelzen) genannt. Die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, werden aufgebrochen. Im ersten Zyklus wird die DNA oft für längere Zeit erhitzt, um sicherzustellen, dass sich sowohl die Ausgangs-DNA als auch die Primer vollständig voneinander getrennt haben und nur noch Einzelstränge vorliegen. Nach der Trennung der Stränge wird die Temperatur gesenkt, so dass die Primer sich an die einzelnen DNA-Stränge anlagern können. Dieser Schritt heißt *annealing* (anlagern). Die Temperatur während dieser Phase hängt von den Primern ab und liegt normalerweise 5 °C unter ihrem Schmelzpunkt. Schließlich füllt die DNA-Polymerase die fehlenden Stränge mit Nukleotiden auf. Sie beginnt am angelagerten Primer und folgt dann dem DNA-Strang. Dieser Schritt heißt Elongation (Verlängerung). Die thermostabile *Taq*-(*Thermus aquaticus*)-Polymerase hat ihr Temperaturoptimum bei 72 °C und erstellt überhängende Enden an den synthetisierten DNA-Strängen. Durch die zyklische Wiederholung der Polymerase-Kettenreaktion kann eine Amplifizierungsrate von 10^6 bis 10^7 erreicht werden.

Die PCR-Methode wurde zur Amplifikation von Promotorsequenzen aus genomischer DNA für die Klonierung von Reportergenkonstrukten eingesetzt. Zur Vorbereitung der PCR wurde ein Reaktionsgemisch hergestellt, das alle essentiellen Komponenten beinhaltet und im Folgenden aufgeführt ist:

PCR-Reaktionsansatz

<i>Taq</i> -Polymerase-Puffer (10x)	5 µl
dNTP-Mix (je 2,5 mM)	4 µl
Primer <i>forward</i> (10 pmol)	2 µl
Primer <i>reverse</i> (10 pmol)	2 µl
DNA-Polymerase <i>ExTaq</i> TM (Takara) 5 U/µl	0,25 µl
Genomische DNA	0,1 µg
H ₂ O _{bidest}	ad 50 µl

Das PCR-Programm wurde entsprechend der jeweiligen Primer gewählt und die optimale *Annealing*-Temperatur wurde vorab in einer Gradienten-PCR bei verschiedenen Temperaturen getestet. Das zur Amplifikation verwendete PCR-Programm ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Segment	Anzahl der Zyklen	Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur
I	1	Denaturierung	5 min	95 °C
II	35	Denaturierung	30 sec	95 °C
		Primer-Anlagerung	30 sec	55 °C - 62 °C (siehe Tabelle 2)
		Synthese	1 min	72 °C
III	1	Endsynthese	5 min	72 °C

Tabelle 1: Programm für die PCR

Die in der PCR eingesetzten Oligonukleotide sind mit ihren jeweiligen *Annealing*-Temperaturen und der Amplifikatlänge in Tabelle 2 zusammengefasst.

Zu amplifizierender Promotor	Organismus	Sequenzabschnitt	Primerpaar	PCR-Produktlänge	Annealing-Temperatur
<i>Androgen binding protein</i> (APB)	Ratte	-613 → +36	ratABP_Ase_f ratABP_r	656 nt	60 °C
Akrosomales Protein SP-10	Ratte	-403 → +28	ratSP10_Ase_f ratSP10_r	437 nt	55 °C
Proakrosin	Ratte	-263 → +548	ratProakro_Ase_f ratProakro_r	818 nt	62 °C
Protamin1	Ratte	-556 → +30	ratPrm1_Ase_f ratPrm1_r	593 nt	55 °C
<i>Endozepine-like peptide</i> (ELP)	Ratte	-652 → +51	ratELP290_Ase_f ratELP980_r	708 nt	55 °C
		-957 → +617	ratELP10_Ase_f ratELP1500_r	1571 nt	62 °C
		-957 → +51	ratELP10_Ase_f ratELP980_r	1005 nt	60 °C
		-652 → +617	ratELP290_Ase_f ratELP1500_r	1274 nt	60 °C
		-652 → +51	ratELP290_Bgl_f ratELP980_r	708 nt	60 °C
		-652 → +617	ratELP290_Bgl_f ratELP1500_r	1274 nt	62 °C
		-380 → +617	ratELP-GCNF_Bgl_f ratELP1500_r	1003 nt	60 °C

Tabelle 2: Übersicht der amplifizierten Promotorsequenzen und der verwendeten Primer mit ihren *Annealing*-Temperaturen

Die PCR-Fragmente wurden anschließend in einen Klonierungsvektor ligiert (siehe 2.2.2.6) und anschließend bei MWG sequenziert.

2.2.2.2 Restriktion von Plasmid-DNA

Restriktionsendonukleasen wurden gemäß den Angaben der Hersteller in den entsprechenden mitgelieferten Puffern verwendet. In einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden pro 1 µg Plasmid-DNA 1 bis 3 U Enzym eingesetzt und der Reaktionsansatz 1,5 h bei entsprechender Temperatur inkubiert. Wurde eine größere DNA-Menge für anschließende Ligationsreaktionen benötigt, wurden Restriktionsansätze mit einem Gesamtvolumen von 50 µl angesetzt. Es wurden dann 4 µg Plasmid-DNA mit den jeweiligen Enzymen für 4 h bei entsprechender Temperatur inkubiert.

2.2.2.3 Auffüllen von überhängenden Enden

Das Auffüllen von überhängenden DNA-Enden wurde unter Ausnutzung der 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität des Klenow-Fragmentes erreicht. Dabei wurden einem 50 µl Restriktionsansatz 5 U des Enzyms sowie Desoxyribonukleotide (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) zugesetzt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurde das Enzym anschließend bei 75 °C für 20 Minuten inaktiviert. Anschließend wurde der Restriktionsansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels horizontaler Gelelektrophorese wurden die Proben mit dem entsprechenden Volumen 6x DNA-Auftragspuffer versetzt und bei konstanter Spannung von 8 mV/cm in 0,8 %igen bis 2 %igen Agarosegelen aufgetrennt. Agarosegele wurden mit TAE-Puffer hergestellt, der gleichzeitig als Laufpuffer verwendet wurde. Um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurde den Gelen Ethidiumbromid (1 µg/ml) zugesetzt.

2.2.2.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Für die Aufreinigung von amplifizierten PCR-Fragmenten und für gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente wurde das *Nucleospin Plasmid DNA Purification Kit* verwendet. PCR-Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 50 µl wurden direkt über die Säulen nach Herstellerangaben aufgereinigt und im kleinstmöglichen Volumen Elutionspuffer (25 µl) aufgenommen. DNA-Banden aus Agarosegelen wurden unter UV-Licht bei kurzer Exposition aus dem Gel ausgeschnitten und ebenfalls nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt.

2.2.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von PCR-Fragmenten wurde das *Qiagen PCR Cloning Kit* verwendet. Der enthaltene pDrive-Klonierungsvektor wird in linearer Form verwendet und hat U-Überhänge an jedem 3'-Ende, welche mit den A-Überhängen von PCR-Produkten reagieren, die von DNA-Polymerasen, wie der *Taq*-Polymerase, generiert werden. Nach dem Protokoll des Herstellers wurde dabei folgender Reaktionsmix hergestellt:

Ligationsansatz

pDrive-Vektor	1 µl
PCR-Produkt	3 µl
Ligationsmix (2x)	5 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 10 µl

Die Ligationsreaktion wurde über Nacht bei 15 °C inkubiert und dann in kompetente Bakterienzellen transformiert.

Für Klonierungsexperimente mit PCR-Fragmenten aus aufgereinigten Gelbanden wurde die T4-Ligase von Invitrogen verwendet. Dabei wurden Insert- und Vektorfragment in einem molaren Ratio von 3:1 eingesetzt. Die Ligationsreaktion wurde in einem Reaktionsansatz mit 5 U T4-Ligase in einem Gesamtvolumen von 15 µl durchgeführt. Die Inkubation bei 15 °C erfolgte über Nacht.

2.2.3 Zellkultur und proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Kultur von isolierten Ratten-Hodenkanälchen

Für eine Analyse der Genexpression von Keimzell-spezifischen Genen gibt es bisher keine Zelllinien und nur wenige erfolgreiche *in vitro*-Systeme. In Anlehnung an das von Seidl und Holstein (1990) vorgestellte Organ-Kultursystem humaner Hodenkanälchen wurde in dieser Arbeit ein *in vitro*-System für isolierte Tubuli seminiferi der Ratte etabliert. Das verwendete Tres-Kierszenbaum-Kulturmedium (TKM) wurde ursprünglich von Tres *et al.* (1992) für eine Sertoli-Keimzell-Kokultur entwickelt und wurde hier in einer modifizierten Zusammensetzung benutzt. Die frisch präparierten Rattenhoden wurden in PBS transportiert und dann steril unter einer reinen Werkbank weiterverarbeitet. In einer Kulturschale mit PBS wurde zuerst die Tunica albuginea entfernt, so dass die Hodenkanälchen frei lagen. Nun wurden die Tubuli seminiferi mit einer Pinzette herausgezupft und ca. 1,5 cm lange Tubulus-Fragmente

in einer Kulturschale mit TKM-Medium gesammelt und bis zur Weiterverarbeitung im Kulturschrank bei 32 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Kultur der Tubulus-Fragmente erfolgte in 24-Well-Platten mit 400 µl TKM-Medium pro Well.

2.2.3.2 Kultur von SK11-Zelllinie

Die adhärent wachsende Zelllinie SK11, etabliert aus Maus-Sertolizellen, wurde in 250 ml-Gewebekulturflaschen mit DMEM-Medium inklusive 10 % FCS und Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die Passage erfolgte alle 3 bis 4 Tage. Dabei wurden die Zellen mit 200 µg/ml EDTA in PBS abgelöst und nach Zugabe von Medium zentrifugiert. Anschließend wurden die Sertolizellen in einem entsprechenden Volumen Medium aufgenommen und in Gewebekulturflaschen ausgesät, so dass eine 1:2-Verdünnung erfolgte. Die Kultur der Zellen erfolgte im Kulturschrank bei 32 °C und 5 % CO₂.

2.2.3.3 Transiente Transfektion

Für die Funktionsuntersuchungen von Genen und ihrer Regulation können Plasmidkonstrukte aus einer klonierten Promotorsequenz und einem sogenannten Reporter gen über verschiedene Methoden in Zellen eingeschleust werden, um regulatorische Sequenzen und putative Transkriptionsbindungsstellen des Promotors zu untersuchen. Der Gentransfer der DNA erfolgt beispielsweise über eine Elektroporation der Zellen (siehe 2.2.3.3.1) oder über Lipofektion durch die Aufnahme von DNA-Liposomenkomplexen (siehe 2.2.3.3.2). In erfolgreich transfizierten Zellen gelangt die DNA in den Kern und ist dort transient einige Tage vorhanden. Während dieses Zeitraums unterliegt das eingebrachte vermutlich episomale Reporter genkonstrukt vielen Regulationsmechanismen, welche auch die Expression zelleigener Gene auf den Chromosomen steuern. Als Reporter gene werden spezielle Gene eingesetzt, deren Produkte in der transfizierten Zelle normalerweise nicht vorkommen und die leicht nachweisbar sind – im einfachsten Falle durch eine enzymatische Reaktion (z. B. Luziferase) oder aufgrund ihrer Fluoreszenz bei einer bestimmten Wellenlänge (z. B. *Green Fluorescent Protein* (GFP)). Die Analyse der vorübergehenden (transienten) Reporter gen-Expression ist schon nach 24–48 h möglich und lässt dann Rückschlüsse auf die Aktivierung und Regulierung des zu untersuchenden Promotors zu.

2.2.3.3.1 Transfektion von isolierten Ratten-Hodenkanälchen mittels Elektroporation

Für die Transfektion von männlichen Keimzellen gibt es bisher nur wenige erfolgreiche Ansätze. In dieser Arbeit wurde eine neue Methode etabliert, um Reporter genkonstrukte in

verschiedene Spermatogenesestadien des Keimepithels von Ratten-Hodenkanälchen zu transfizieren. Die Technik beruht auf dem Versuchsansatz von Yamazaki *et al.* (2000). Hier konnte über *in vivo*-Gentransfer von GFP-Reportergenkonstrukten in Testisgewebe der Maus via DNA-Injektion in die seminiferen Tubuli und anschließende Elektroporation eine Expression des Reportergens gezeigt werden. Mit der Technik des *in vivo*-Gentransfers wurde in den letzten Jahren eine wichtige Methode für die Gentherapie und für die molekularbiologische Analyse ganzer Gewebe etabliert. Die bisher übliche Virus-vermittelte Transfektion von Zellen hat zwar den Vorteil einer hohen Transfektionseffizienz, birgt aber ein hohes biologisches Risiko. Andere nicht-virale Systeme, wie Lipofektion, sind dagegen nicht besonders effizient. Die Technik der Elektroporation dagegen ermöglicht einen schnellen, einfachen und sicheren Gentransfer in Gewebe und Organe von lebenden Tieren. Mit dieser Methode können DNA-Moleküle mit einer hohen Transfektionseffizienz in jede Art von Zelltyp übertragen werden. Das Prinzip der Elektroporation beruht auf der Entstehung von temporären Poren in der Zellmembran bei Anlegung eines elektrischen Feldes. Die Poren erlauben ein Eindringen exogener Moleküle in das Cytoplasma oder den Kern. Werden die richtigen Elektroporationsparameter verwendet, dann kann die Zelle sich von dieser Behandlung erholen und die entstandenen Poren schließen sich spontan. Das Zeitintervall für die Formierung der Membranporen liegt bei 1 μ s, während die Regeneration der Zellmembran im Minutenbereich liegt. Für einen Gentransfer von DNA in männliche Keimzellen ist die Elektroporation zur Zeit die erfolgreichste Methode, und findet vor allem ihre Anwendung bei Promotoranalysen mit Hilfe von Reportergenkonstrukten. Während allerdings in den meisten Arbeiten die Reportergenexpression im lebenden Tier erfolgte, sollte in der vorliegenden Arbeit ein Transfektions- und Kultursystem für Tubuli seminiferi *in vitro* etabliert werden. Die DNA-Injektion und die Elektroporation erfolgte somit *ex vivo* mit den isolierten Ratten-Hodenkanälchen (siehe 2.2.3.1). Die Injektion der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe einer Mikroinjektionsapparatur (Eppendorf) und vorgefertigten Injektionskapillaren. Die Kapillaren wurden von hinten über sogenannte *Microloader* (Eppendorf) mit der DNA-Lösung beladen und die Spitze dieser Kapillaren wurde vorher vorsichtig abgebrochen, um für die Injektion in die Tubuli scharfe Glasränder zu erhalten. Für die Mikroinjektion wurde dann ein Hodenkanälchen ausgestreckt auf einem Objektträger platziert und die DNA-Lösung seitlich unter Durchstechen der Lamina propria in das Tubulus-Lumen injiziert (Abbildung 2.6 und Abbildung 2.7).

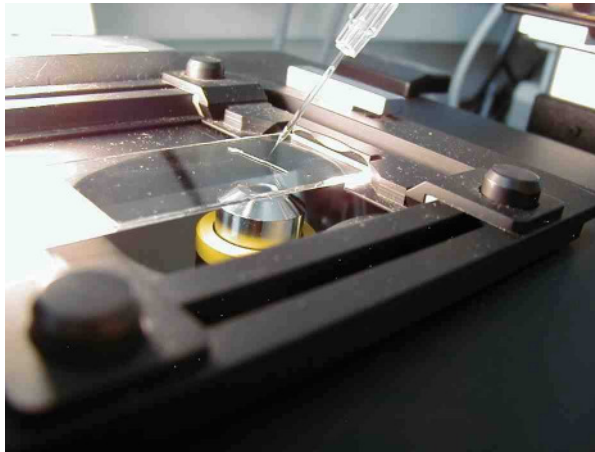


Abb. 2.7: Objektträger mit Hodenkanälchen

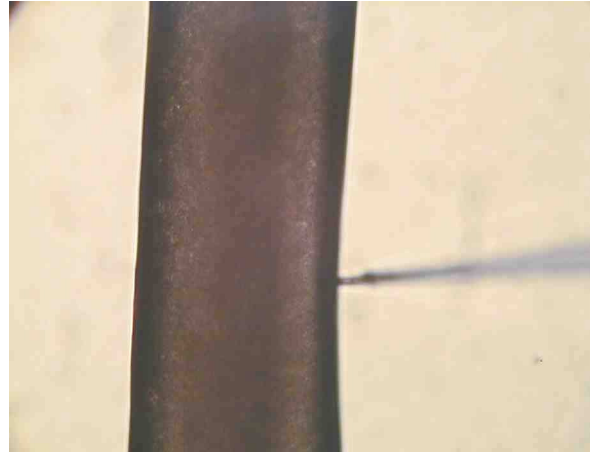


Abb. 2.8: Mikroinjektion mit Glaskapillare

Anschließend wurden die Tubuli in einzelne, mit 400 μ l Kulturmedium gefüllte *Wells* einer 24-*Well*-Platte überführt. Die Elektroporation erfolgte dann direkt im *Well* mit Pinzettenelektroden („Zweezertrodes“) und einem computergesteuerten Elektroporator, der sogenannte Rechteckpulse generierte (siehe Abbildung 2.8).



Abb. 2.9: Elektroporation der Hodenkanälchen

Die Elektroporationsbedingungen wurden optimiert und dann wie folgt eingestellt:

Elektrodenabstand	Pulszahl	Pulsstärke	Pulsdauer	Intervall
4 mm	10	20 V	20 ms	0,5 s

Die transfizierten Tubuli wurden anschließend im Kulturschrank bei 32 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.2.3.3.2 Transfektion von SK11-Zellen mittels Lipofektion

Verschiedene Reporter-genkonstrukte wurden mit der *Lipofectamine*-Methode in die SK11-Zelllinie transfiziert. Das Prinzip beruht auf der Entstehung von stabilen Komplexen durch Bindung von negativ geladener DNA an kationische Lipide. Durch Verschmelzung mit der ähnlich aufgebauten Zellmembran wird dieser DNA-Liposomenkomplex in die Zellen aufgenommen (Lipofektion). Die Durchführung erfolgte unter Verwendung des Reagenzes *Lipofectamine*TM 2000 (Invitrogen). Die Zellen wurden entweder in 24-Well-Platten (für Luziferase-Assay) oder in 4-Well-Chamber-Slides (für Fluoreszenzanalyse am konfokalen Lasermikroskop) ausplattiert und über Nacht im kompletten SK11-Medium bei 32 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Konfluenz der Zellen überprüft und das Medium kurz vor der Transfektion durch DMEM-Medium ohne FCS und ohne Penicillin/Streptomycin ersetzt. Für die Transfektion wurde pro Well 1 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Nach der Transfektion inkubierten die Zellen für 5 h im Kulturschrank bei 32 °C. Anschließend wurde das Medium noch einmal gewechselt und durch DMEM-Medium mit 10 % FCS, aber ohne Penicillin/Streptomycin, ersetzt. Die Inkubation erfolgte dann wieder bis zur Analyse der Reporter-genexpression für ca. 24 h.

2.2.3.4 Luziferase-Assay von SK11-Zellen

Das Prinzip des Luziferase-Assays beruht auf der Aktivitätsmessung des gebildeten Reporterenzymproteins Luziferase. Bei der Oxidation des Substrates Luziferin durch das Enzym Luziferase wird Licht emittiert, welches bei der Wellenlänge von 560 nm gemessen werden kann. Die ermittelte Lichtemission dient als Maß für die Promotoraktivität und wird als relative Lichteinheit (RLE) dargestellt. Der Assay wurde mit Hilfe des *Luciferase Assay Systems* von Promega durchgeführt. Die in 24-Well-Platten kultivierten SK11-Zellen wurden mit 200 µl PBS gewaschen und pro Well 100 µl *Reporter Lysis Puffer* dazugegeben. Anschließend wurde die Zellsuspension kurz über Trockeneis eingefroren und dann nach dem Auftauen in lysierter Form in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 2 Minuten bei 13 000 rpm, um unlösliche Zellbestandteile zu präzipitieren. Für die Messung wurden 20 µl Lysat in ein Messröhrchen gegeben und mit 100 µl Luziferase-Substrat-Reagenz unter schwenken gemischt. Die Lumineszenz wurde in einem *Single tube*-Luminometer innerhalb von 10 Sekunden ermittelt.

2.2.3.5 Luziferase-Assay von kultivierten Hodenkanälchen

Die Ermittlung der Luziferase-Aktivität in Proteinlysaten von transfizierten Hodenkanälchen wurde mit Hilfe des *Luciferase Assay Systems* von Promega durchgeführt. Hodenkanälchen, die mit Luziferase-Konstrukten transfiziert worden waren, wurden nach ca. 24 h in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Mit kleinen Mörsern wurde das Gewebe direkt im Reaktionsgefäß zerkleinert und in 150 µl *Reporter Lysis Puffer* aufgenommen und kurz gemixt. Anschließend wurde das Proteinlysat bei 13 000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Für die Messung wurden 20 µl Lysat in Messröhrchen überführt und nach Zugabe von 100 µl Luziferase-Substrat-Lösung am Luminometer gemessen. Die Lumineszenz wurde für jedes einzelne Tubulus-Proteinlysat für 10 Sekunden gemessen.

2.2.3.6 Kryoschnitte

Die kultivierten Ratten-Hodenkanälchen wurden für 1 h in einer Fixierungslösung mit 4 % Paraformaldehyd und 10 % Sucrose in PBS fixiert. Anschließend wurden drei bis vier Tubuli in gleicher Orientierung in einem Schälchen aus Aluminiumfolie mit *Tissue Tek*-Gefriermedium bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und anschließend bis zum Schneiden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Am Kryotom wurden Hodenkanälchen-Querschnitte mit einer Dicke von 12–20 µm angefertigt, auf *SuperFrost*-Objektträger aufgebracht und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.3.7 Cytospinpräparate

Für Cytospinpräparate wurden 3–4 Tubuli in 250 µl Kulturmedium mit einer Rasierklinge zerkleinert, um eine Zellsuspension zu erhalten. Für die Zentrifugation wurden Cytofunnel-Doppelkammern auf Vectabond-beschichtete Objektträger gespannt und pro Kammer mit 200–250 µl Zellsuspension befüllt. Anschließend wurde in jede Kammer die gleiche Menge Fixierungslösung (4 % Paraformaldehyd/10 % Sucrose in PBS) gegeben. Die Kammern wurden dann in der Cytospin für 4 Minuten bei 800 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Objektträger für 5 Minuten luftgetrocknet und dann bis zur Fluoreszenzfärbung in PBS aufbewahrt.

2.2.3.8 Hämalaunfärbung von Kryoschnitten

Die Auswirkung der Kulturdauer auf die Morphologie der Hodenkanälchen wurde über eine erste Analyse der Zellstrukturen in hämalaungefärbten Kryoschnitten untersucht. Die Kernfärbung kommt am besten in stark saurem Milieu zustande, indem sich das positiv geladene Hämalaun mit Phosphorgruppen der Nukleinsäuren des Chromatin verbindet. Um

die blaue Farbe zu erzielen, muss ein pH-Wert über 3.0 eingestellt werden, was durch Leitungswasser erreicht wird. Dieses Bläuen stabilisiert die Farbe, weil sie im alkalischen Milieu schlecht löslich ist und die Haltbarkeit des Präparates begünstigt. Die Kryoschnitte wurden 1 h luftgetrocknet, in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ rehydriert und dann für ca. 3–4 Minuten in Meyers Hämalaunlösung gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte durch mehrmaliges Waschen in Leitungswasser gebläut und dann eingebettet.

2.2.3.9 Fluoreszenzfärbung von Zellkern und Akrosom

Für eine Analyse der Morphologie und zur besseren Differenzierung der Zelltypen wurden auf Kryoschnitten und Cytospinpräparaten Zellkerne und Akrosome mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Für die Kernfärbung wurden der klassische DNA-Farbstoff DAPI und ein rotfluoreszierendes TO-PRO-3-Iodid verwendet. Die Anregungs- und Emissionsmaxima liegen für DAPI bei 355 nm und 450 nm und für TO-PRO-3 bei 642 nm und 661 nm. Die Akrosomenmarkierung erfolgte mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten Lektins aus Erdnuss (*Peanut agglutinin*, PNA), das spezifisch an terminale β -Galaktosereste im Akrosom von Spermien bindet. Der gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor[®]568 hat ein Anregungsmaximum von 570 nm und ein Emissionsmaximum bei 605 nm. Für die Fluoreszenzfärbung wurden die Kryoschnitte oder Cytospinpräparate für 10 Minuten in PBS inklusive Calcium und Magnesium rehydriert. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden in den folgenden Verdünnungen in PBS mit Ca/Mg angesetzt: PNA 10 $\mu\text{g/ml}$, DAPI 1 $\mu\text{g/ml}$ und TO-PRO-3 2 μM . Die Inkubation in der Färbelösung erfolgte für 30 Minuten in einer feuchten Kammer. Anschließend wurden die Objektträger zweimal für 5 Minuten in PBS gewaschen und dann in Fluoromount G eingebettet.

2.2.3.10 Immunohistochemie

Die Gefrierschnitte wurden ca. 1 h bei Raumtemperatur getrocknet und währenddessen mit einem DAKO-Stift umrandet, um eine hydrophobe Barriere zu schaffen und die Präparate damit gegeneinander abzugrenzen. Anschließend wurden die Schnitte für 10 Minuten in PBS rehydriert. Es folgte eine Inkubation in PBS mit 5 % *Normal Goat Serum* (NGS) für 30 Minuten bei Raumtemperatur, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die Verdünnung des primären Antikörpers erfolgte in PBS mit 2 % NGS und wurde je nach verwendetem Antikörper eingestellt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen in PBS für jeweils 5 Minuten wurden die Gewebeschnitte mit dem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Dieser wurde in PBS mit 2 % NGS 1:100 verdünnt. Für eine gleichzeitige DNA-Färbung wurde der Antikörperlösung noch entweder DAPI (1 µg/ml) oder TO-PRO-3 (2 µM) zugesetzt. Anschließend folgten drei Waschschriffe mit PBS für je 5 Minuten. Die Gewebeschnitte wurden dann in Fluoromount G eingedeckt. Die Auswertung erfolgte am inversen Fluoreszenzmikroskop oder am konfokalen Lasermikroskop.

2.2.3.11 *Live-Dead-Assay* von kultivierten Hodenkanälchen

Um eine erste Aussage über die Auswirkungen der Kultur- und Transfektionsbedingungen auf die Hodenkanälchen zu erhalten, wurde über einen LIVE/DEAD[®] *Viability/Cytotoxicity Kit* der Anteil von toten und lebenden Zellen in den Tubuli verglichen. Der Assay ermöglicht eine simultane Analyse zweier Viabilitätsparameter, da einerseits die Plasmamembranintegrität und andererseits eine intrazelluläre Esteraseaktivität ermittelt werden kann. Das Prinzip dieses Assays beruht auf der Verwendung von zwei unterschiedlichen Farbstoffen, Calcein AM und Ethidium-Homodimer-1 (EthD-1), die sich in ihrer Membranpermeabilität unterscheiden. Lebende Zellen besitzen eine ubiquitär vorkommende intrazelluläre Esteraseaktivität, die eine enzymatische Umwandlung des nichtfluoreszierenden und zellpermeablen Calcein AM's in das fluoreszierende Calcein ermöglicht. Dieser polyanionische Farbstoff akkumuliert in lebenden Zellen und produziert eine intensive grüne Fluoreszenz (Anregung 495 nm/Emission 515 nm). EthD-1 dringt dagegen in Zellen mit defekter Membran ein und erfährt bei Bindung an Nukleinsäuren eine 40fache Fluoreszenzverstärkung. Intakte Membranen von lebenden Zellen sind undurchlässig für EthD-1, so dass tote Zellen durch eine helle rote Fluoreszenz (Anregung 495 nm/Emission 635 nm) markiert werden.

Die Färbelösung wurde durch Mischen der zwei Farbstoffe vorbereitet. EthD-1 wurde 1:500 (4 µM) und Calcein AM 1:2000 (2 µM) in PBS verdünnt. Nach dem Mischen dieser beiden Komponenten wurden je 400 µl in die Kammern eines *4-Well-Chamber-Slides* eingefüllt und die Hodenkanälchen dazugegeben. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 30–45 Minuten. Die Auswertung erfolgte dann am konfokalen Lasermikroskop.

2.2.3.12 Apoptose-Nachweis auf Tubuli-Kryoschnitten

Apoptose ist ein programmierter Zelltod, bei dem die Zellen über einen kontrollierten und regulierten Mechanismus zum Absterben gebracht werden. Apoptose ist in vielen physiologischen Prozessen essentiell, kann aber auch durch Umweltfaktoren induziert werden. Apoptotische Zellen weisen ein charakteristisches Muster von strukturellen Veränderungen des Kerns und des Cytoplasmas auf. Abschnürungen der Plasmamembran führen zu einer Verkleinerung des Zellvolumens, endonukleolytische Spaltung des Chromatins lässt nukleosomale Fragmente entstehen, und Proteasen zerstören spezifische Proteine. Die Fragmentation der Kern-DNA ist ein Schlüsselereignis im Ablauf der Apoptose und kann über eine Markierungsreaktion der DNA-Strangbrüche in einem TUNEL (*Terminal dUTP nick end labeling*)-Assay nachgewiesen werden. In den kultivierten und transfizierten Hodenkanälchen sollte anhand von Kryoschnitten analysiert werden, ob die Kulturdauer und vor allem die Transfektion über Elektroporation der Hodenkanälchen eine verstärkte Apoptose der Zellen hervorruft. Für diesen Nachweis wurde ein *In Situ Cell Death Detection Kit* der Firma Roche benutzt. Das Prinzip beruht auf einer Markierung von freien 3'-OH-Enden in fragmentierter DNA mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden, die von einer Terminalen Deoxynukleotidyl-Transferase eingebaut werden. Die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes Tetra-Methyl-Rhodamin ermöglicht eine Identifikation von apoptotischen Zellen über die rote Fluoreszenz und eine parallele Auswertung von grünfluoreszierenden GFP-transfizierten Zellen. Die Verwendung des TUNEL-Assays bei der Analyse von Hodengewebe kann allerdings oft zu falsch negativen Ergebnissen führen. Durch die starke phagocytotische Aktivität der Sertolizellen werden apoptotische Zellen sehr schnell aufgenommen und können somit in den Kryoschnitten nicht mehr lokalisiert werden. Es gibt verschiedene Möglichkeiten die Phagocytose der Sertolizellen zu verhindern. Eine Möglichkeit ist, die sogenannten „Eat me“-Signale der apoptotischen Zellen zu maskieren. Die Sertolizellen erkennen diese Zellen über Phosphatidylserine, die an der Zelloberfläche apoptotischer Zellen exponiert werden. Werden diese zum Beispiel über die Bindung von Annexin V abgesättigt, entgeht diese Zelle der Phagocytose. Im Apoptose-Test wurden somit auch Hodenkanälchen analysiert, die vorher mit Annexin V injiziert wurden, damit die schnelle Phagocytose von apoptotischen Zellen im Keimepithel verhindert werden konnte. Die Kryoschnitte der Hodenkanälchen wurden für 1 h bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend erfolgte eine Rehydrierung in PBS für 30 Minuten. Es folgte eine Permeabilisierung der Schnitte in PBS mit 1 % Triton X 100 und 1 % Natriumcitrat für 2 Minuten bei 4 °C. Die Kryoschnitte wurden dann zweimal für 10 Minuten in PBS gewaschen und die

beiden Komponenten der TUNEL-Reaktionslösung auf Eis aufgetaut. Vor dem Vermischen der beiden Lösungen wurden für die Negativkontrolle 100 μ l von der Markierungslösung abgenommen. Anschließend wurden die 50 μ l Enzymlösung zur Markierungslösung gegeben und gut gemischt. Auf jeden Objektträger wurden 50 μ l der Reaktionslösung gegeben und vorsichtig mit Parafilm abgedeckt. Die Inkubation erfolgte dann bei 37 °C für 60 Minuten. Die Schnitte wurden anschließend dreimal für 10 Minuten in PBS gewaschen und in Fluoromount G eingebettet. Die Fluoreszenzanalyse erfolgte am Fluoreszenzmikroskop und konfokalen Lasermikroskop.

3 Ergebnisse

Für eine Untersuchung der transkriptionellen Steuerung der Spermatogenese sollte ein Kultur- und Transfektionssystem etabliert werden, in dem die Einführung und Analyse von Promotor-Reportergenkonstrukten in männliche Keimzellen möglich ist. Dafür wurden Reportergenkonstrukte mit Promotoren postmeiotisch exprimierter Gene kloniert. Die Zell- und Stadienspezifische Expression der haploid exprimierten Keimzellgene wurde in Kryoschnitten und anhand von Cytospinpräparaten überprüft. In einer weitergehenden Analyse wurde der Promotor für das späthaploid exprimierte *Endozepine-like peptide* (ELP)-Gen untersucht. Anhand einer quantitativen Ermittlung der Expressionsstärke von Promotor-Deletionskonstrukten wurde die ELP-Promotorsequenz auf putative Transkriptionsbindungsstellen hin charakterisiert.

3.1 Etablierung eines *in vitro*-Systems für die Transfektion isolierter Ratten-Hodenkanälchen

Zunächst sollte ermittelt werden, ob eine Kultur von kurzen Tubulus-Fragmenten des Rattenhodens über einen Zeitraum von bis zu 48 Stunden möglich ist. Das verwendete TKM-Kulturmedium nach Tres und Kierszenbaum (Tres *et al.*, 1992) wurde leicht modifiziert für die Tubulus-Kultur eingesetzt. Eine erste Analyse des Einflusses der Kulturbedingungen und der Kulturdauer auf die Morphologie der Hodenkanälchen fand über lichtmikroskopische Beobachtungen und Kryoschnitte statt.

3.1.1 Lichtmikroskopische Analyse der isolierten und kultivierten Hodenkanälchen

Während der Kulturphase der isolierten Tubulus-Fragmente wurden die morphologischen Veränderungen der Hodenkanälchen zunächst durch mikroskopische Beobachtung analysiert. Dabei ist es möglich, anhand der fortschreitenden Kernkondensation in den Keimzellen auch lichtmikroskopisch eine grobe Einteilung der Spermatogenesestadien vorzunehmen. Eine schematische Darstellung findet sich auch in der Literatur (Abbildung 3.1):

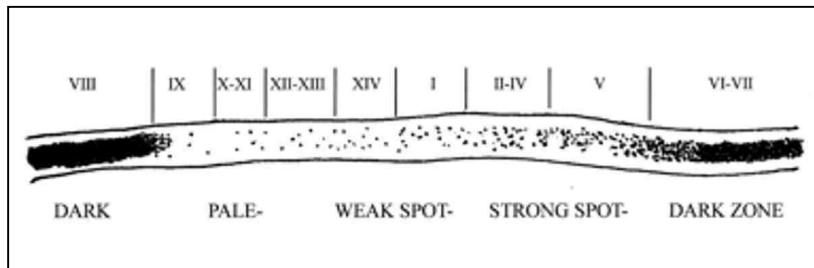


Abbildung 3.1: Transilluminations-Muster eines Ratten-Hodenkanälchens (aus Cheng und Mruk, 2002)

Eine Dokumentation der Morphologie der kultivierten Tubulus-Fragmente fand nach 2 h, 24 h und 48 h Kultur über Durchlichtaufnahmen statt.

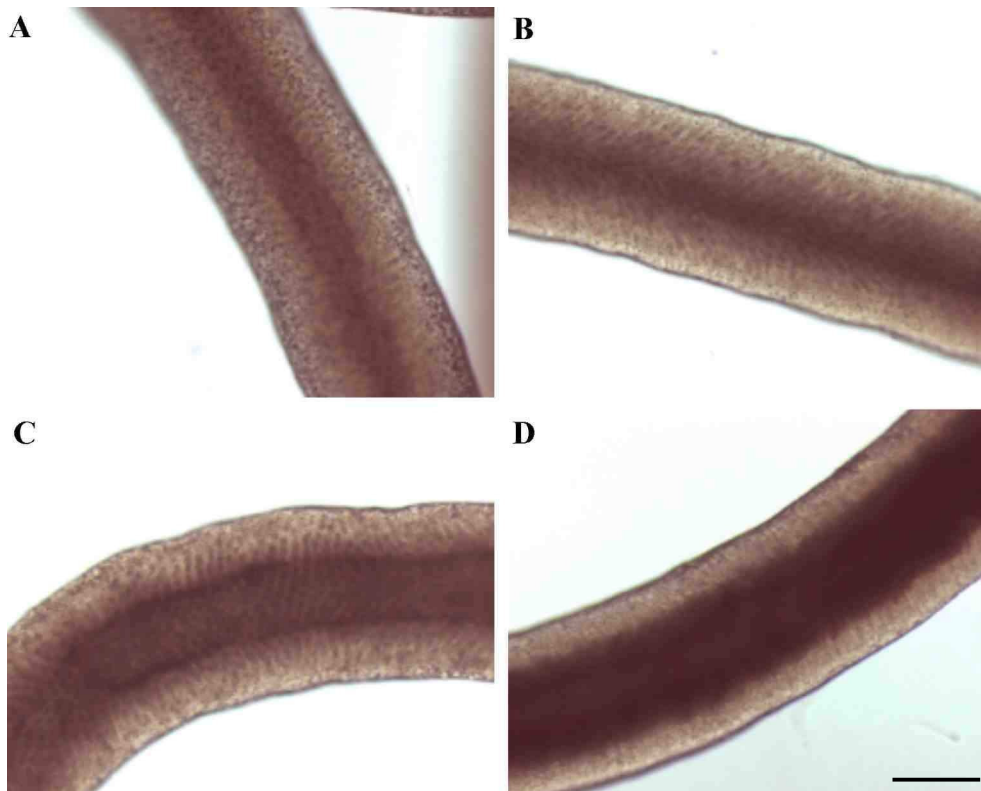


Abbildung 3.2: Lichtmikroskopische Analyse der kultivierten Tubulus-Fragmente im Hellfeld nach 2 h Kultur (A: „pale“, B: „weak spot“, C: „strong spot“, D: „dark“). Maßstabsmarke ~ 100 µm

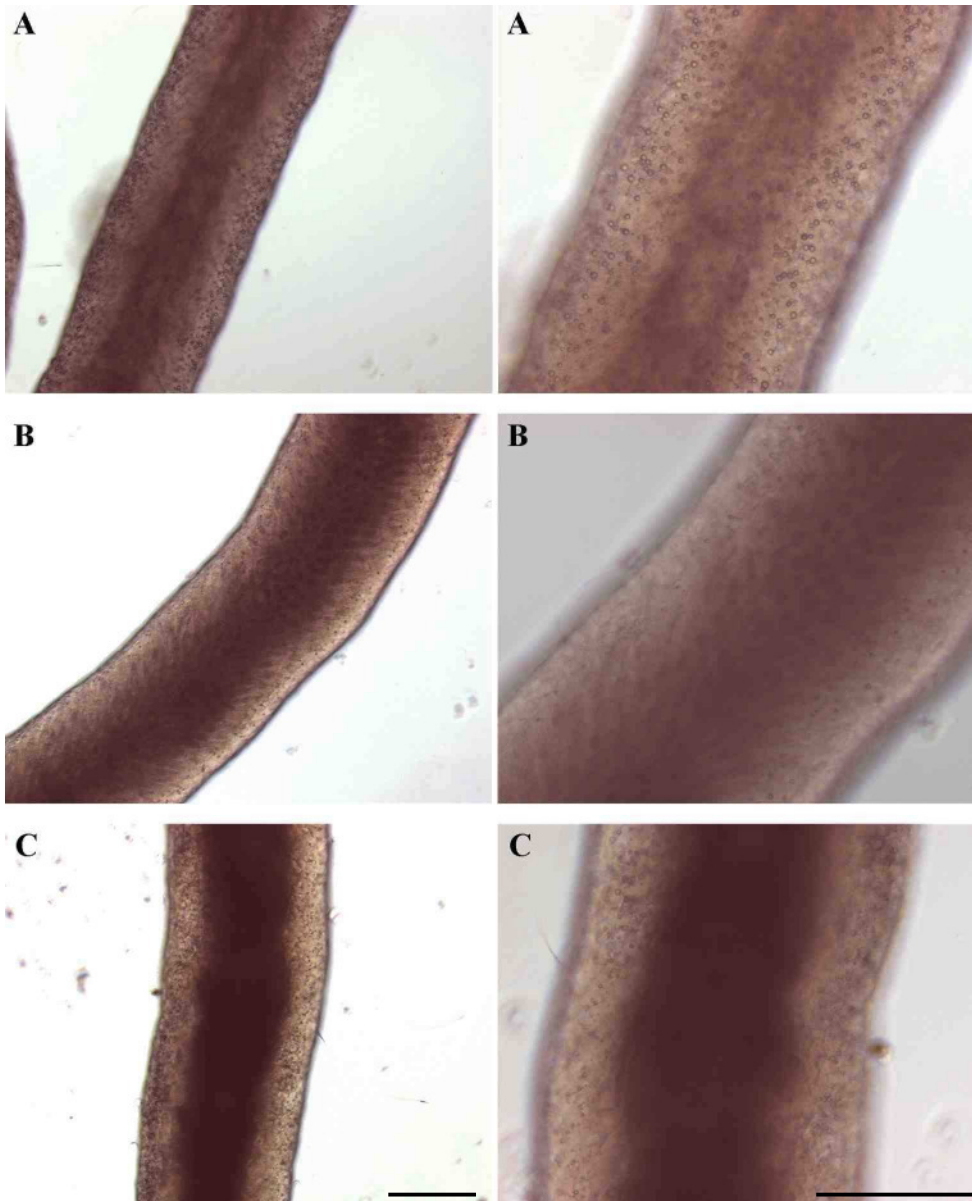


Abbildung 3.3: Lichtmikroskopische Analyse der kultivierten Tubulus-Fragmente im Hellfeld nach 24 h Kultur (A: „pale“, B: „weak spot“, C: „strong spot“, D: „dark“). Maßstabsmarke ~ 100 μ m

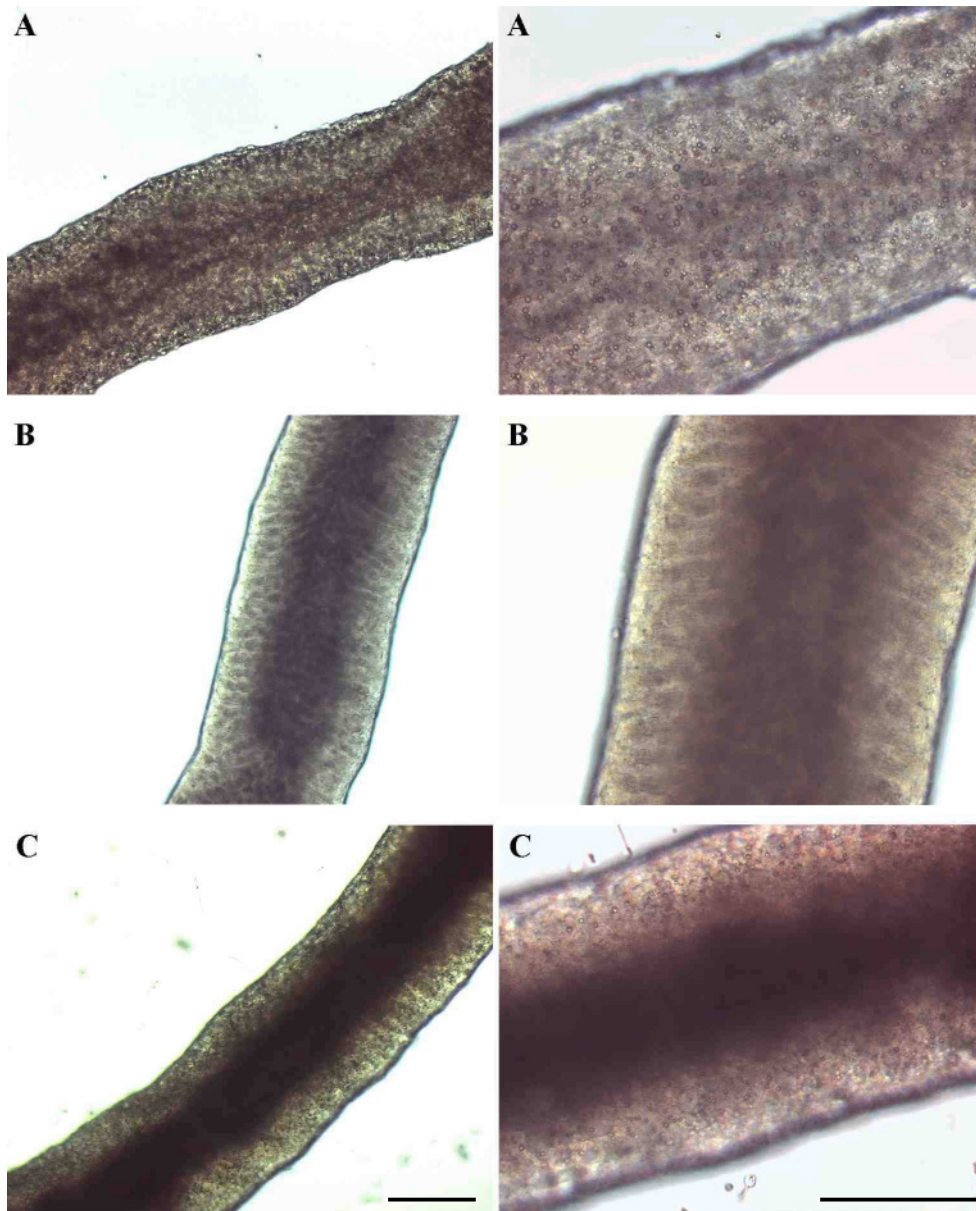


Abbildung 3.4: Lichtmikroskopische Analyse der kultivierten Tubulus-Fragmente im Hellfeld nach 48 h Kultur (A: „pale“, B: „weak spot“, C: „strong spot“, D: „dark“). Maßstabsmarke ~ 100 μ m

Die Technik der mechanischen Tubulus-Isolation aus dem Hodengewebe ermöglicht eine nahezu unbeschädigte Entnahme der Hodenkanälchen. Die Mikroskopbilder der Tubulus-Fragmente nach 2 h Kultur zeigen, dass das Keimepithel in seiner Anordnung intakt und dass scheinbar selbst das Lumen der Hodenkanälchen teilweise erhalten bleibt. Mit steigender Kulturdauer ist allerdings eine zunehmende Vesikelbildung zu beobachten. Kleine Tröpfchen bilden sich an der Basis des Keimepithels und fusionieren zu immer größer werdenden, lichtbrechenden Vesikeln. Ein Vergleich der Auswirkung der Kulturbedingungen auf die verschiedenen Stadien, „pale“, „spot“ und „dark“, zeigt, dass die Vesikelbildung vor allem im „pale“-Stadium schon recht früh nach 24 h sichtbar wird. In diesem Stadium ist auch das

Keimepithel spätestens nach 48 h Kultur nicht mehr vollständig intakt. Die Tubulus-Fragmente des „pale“-Stadiums besitzen nach 48 h auch definitiv kein Lumen mehr und die Tubuli wirken leicht deformiert. Die Tubulus-Fragmente des „spot“-Stadiums reagieren auf die Kulturdauer am unempfindlichsten. Einige von ihnen besitzen selbst nach 48 h noch ein Lumen und die Zelloassoziationen im Keimepithel bleiben weitgehend intakt. Das gleiche gilt für die Tubulus-Fragmente des „dark“-Stadiums, auch wenn hier eine stärkere Akkumulation der Vesikel zu beobachten ist.

3.1.2 Analyse der Morphologie des Keimepithels in isolierten und kultivierten Hodenkanälchen anhand von Kryoschnitten

Um einen besseren Einblick in die Auswirkungen der Kulturdauer auf das Keimepithel der kultivierten Hodenkanälchen zu erhalten, wurden am Kryotom Querschnitte der Tubulus-Fragmente mit einer Schnittdicke von 18 bis 25 μm angefertigt und mikroskopisch analysiert. Durch eine Übersichtsfärbung mit Hämalaun konnte ein erster Eindruck über die Intaktheit des Hodenkanälchens erhalten werden. Anhand einer Fluoreszenzmarkierung der Zellkerne mit DAPI und der Akrosomen mit AlexaFluor[®]568-markiertem Lektin (PNA) konnten anschließend sogar erste Informationen über den morphologischen Zustand der einzelnen Keimzellen ermittelt werden. Die Tubuli wurden jeweils wieder getrennt nach den lichtmikroskopisch unterscheidbaren Stadien „pale“, „spot“ und „dark“ untersucht. Der Einfluss der Kulturdauer auf die Hodenkanälchen wurde in Zeitabständen von 2 h, 24 h und 48 h dokumentiert (Abbildung 3.6–3.8).

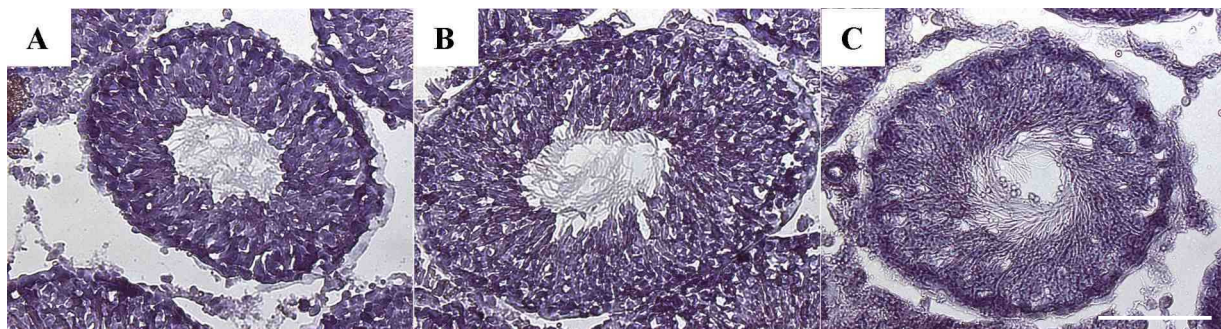


Abbildung 3.5: Hämalaun-gefärbte Kryoschnitte durch Tubuli seminiferi des Rattenhodens (18 μm). Die Querschnitte zeigen Tubuli seminiferi unterschiedlicher Spermatogenesestadien: A = „pale“ (Stadium IX–XIII), B = „spot“ (Stadium XIV–V), C = „dark“ (Stadium VI–VII). Hellfeld. Maßstabsmarke ~ 100 μm .

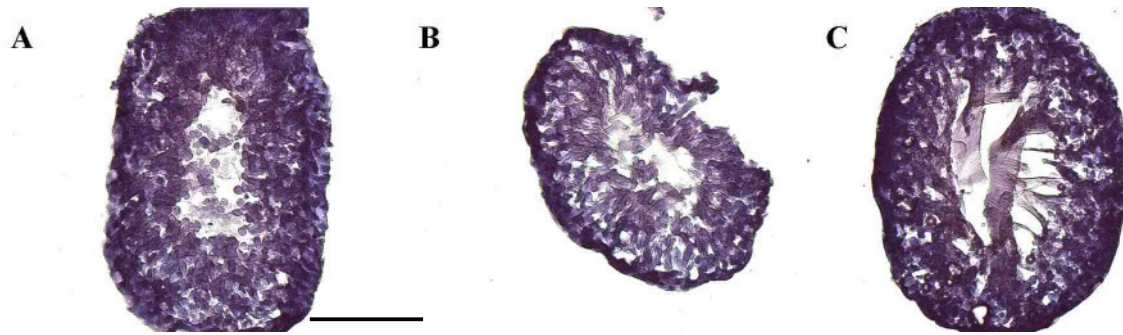


Abbildung 3.6: Hämalaun-gefärbte Kryoschnitte (25 µm) durch isolierte Tubuli seminiferi der Ratte nach 2 h Kultur. Die Querschnitte zeigen Tubuli der Spermatogenesestadien: A = „pale“, B = „spot“, C = „dark“. Hellfeld. Maßstabsmarke ~ 100 µm.



Abbildung 3.7: Hämalaun-gefärbte Kryoschnitte (25 µm) durch isolierte Tubuli seminiferi der Ratte nach 24 h Kultur. Die Querschnitte zeigen Tubuli der Spermatogenesestadien: A = „pale“, B = „spot“, C = „dark“. Hellfeld. Maßstabsmarke ~ 100 µm.



Abbildung 3.8: Hämalaun-gefärbte Kryoschnitte (25 µm) durch isolierte Tubuli seminiferi der Ratte nach 48 h Kultur. Die Querschnitte zeigen Tubuli der Spermatogenesestadien: A = „pale“, B = „spot“, C = „dark“. Hellfeld. Maßstabsmarke ~ 100 µm.

Die Darstellung der Tubulus-Morphologie mittels Kryoschnitt-Technik ist schwierig, doch es ist möglich, anhand der Querschnitte einen ersten Überblick über den Zustand des Keimepithels nach verschiedenen langen Kulturphasen zu erhalten. Im Vergleich zu den Hoden-Kryoschnitten zeigen die Querschnitte der unmittelbar isolierten Tubuli (Kultur 2 h) keine großen morphologischen Veränderungen der Keimzelloassoziationen. Die Anordnung der verschiedenen Keimzellstadien in konzentrischen Ringen bleibt auch nach der Isolation intakt, und auch der Erhalt des Lumens spricht für eine gewebeschonende Methode der Tubulus-Entnahme aus dem Hodengewebe. Auch nach 24 h Kultur zeigen die meisten Tubuli noch eine weitgehend intakte Anordnung des Keimepithels. Bei den kultivierten Tubuli des „dark“-Stadiums lassen sich auf einigen Querschnitten sogar noch nach 48 h recht gut intakte Keimzellanordnungen und sogar ein Tubulus-Lumen beobachten. Insgesamt zeigt der Vergleich der Tubulus-Stadien, dass vor allem die Tubuli des „pale“-Stadiums am schnellsten und stärksten von den Kulturbedingungen beeinflusst werden. Spätestens nach 48 h ist keine geordnete Assoziation der Keimzellen mehr zu erkennen und das ehemalige Tubulus-Lumen scheint kollabiert zu sein. Die kultivierten Tubulus-Fragmente des „spot“-Stadiums weisen dagegen zumindest noch nach 24 h Kultur ein Lumen auf, das mit zunehmender Kulturdauer immer kleiner wird. Das Keimepithel der Tubuli zeigt aber selbst nach 48 h noch eine weitgehend intakte Morphologie. Die ersten lichtmikroskopischen Analysen der Kryoschnitte decken sich mit den mikroskopischen Beobachtungen der intakten, kultivierten Hodenkanälchen (vergleiche Abschnitt 3.1.1). Für eine bessere Ermittlung der Keimzellmorphologie und eine bessere mikroskopische Auflösung wurden die Kryoschnitte nach Akrosomenmarkierung und Kernfärbung fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Anhand von Hodenquerschnitten wurde überprüft, ob eine Lokalisation des Akrosoms und damit eine gute Unterscheidung der verschiedenen Keimzellstadien in Hoden-Kryoschnitten nach Färbung mit dem fluoreszenzmarkiertem Lektin (PNA) grundsätzlich möglich ist (Abbildung 3.9).

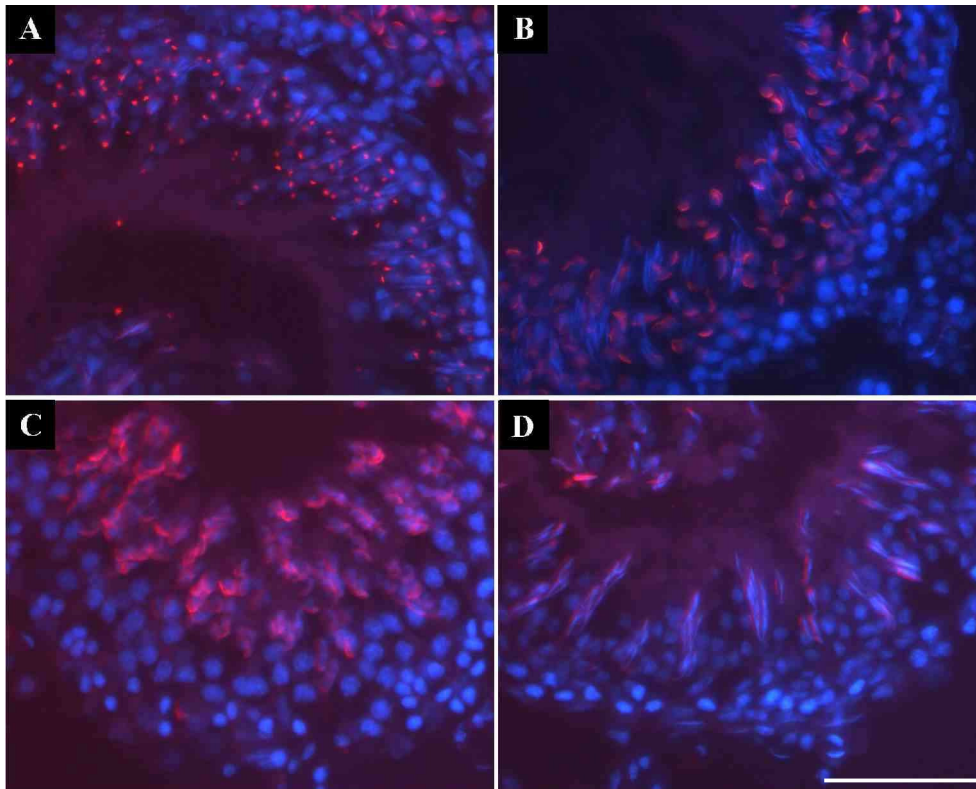


Abbildung 3.9: Fluoreszenzmikroskopische Analyse von Kryoschnitten (16 μm) durch den Rattenhoden. Die Querschnitte zeigen verschiedene Tubulus-Stadien: A = II-III, B = V-VI, C = X-XI, D = XIII-XIV. Die Akrosomen wurden mit PNA (rot) und die Zellkerne mit DAPI (blau) markiert. Maßstabsmarke $\sim 50 \mu\text{m}$.

Eine fluoreszenzmikroskopische Analyse der PNA-markierten Kryoschnitte zeigt die Stadienspezifische Markierung des Akrosoms in haploiden Keimzellen und ermöglicht so eine Differenzierung von Spermatiden einerseits und diploiden Spermatogonien und Spermatozyten andererseits (Abbildung 3.9). Selbst das noch punktförmige Akrosom in frühen Spermatiden lässt sich durch PNA markieren. In späten elongierten Spermatiden ist allerdings eine Akrosomenmarkierung nicht mehr detektierbar (Abbildung 3.9 A und B). Die Kernfärbung mit DAPI zeigt eine klare Lokalisation der Zellkerne. Die Fluoreszenzintensität scheint sogar mit dem DNA-Gehalt der Zellen zu korrelieren, so dass diploide Zellen stärker leuchten als haploide Zellen. Über die PNA-DAPI-Färbetechnik erfolgte anschließend eine morphologische Analyse der Keimzellen in den Kryoschnitten der kultivierten Tubuli.

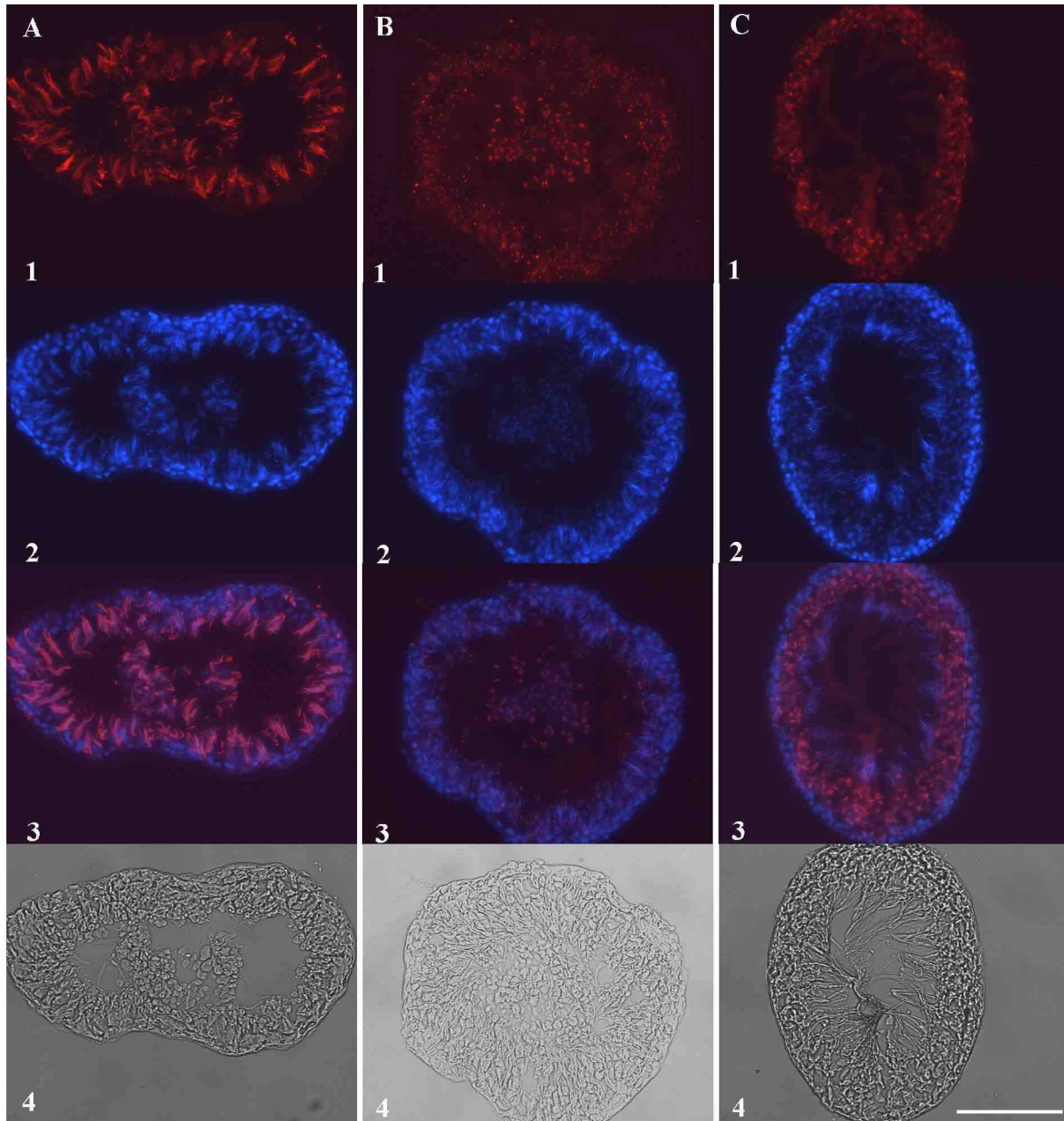


Abbildung 3.10: Fluoreszenzmikroskopische Analyse von Kryoschnitten (20 μm) durch isolierte Tubuli seminiferi der Ratte nach einer Kulturdauer von 2 h. Die Akrosomen wurden mit PNA (rot) und die Zellkerne mit DAPI (blau) markiert. Die Querschnitte zeigen verschiedene Spermatogenesestadien: A = „pale“, B = „spot“, C = „dark“ (1: Akrosomenfärbung mit PNA, 2: DAPI-Kernfärbung, 3: „Overlay“ von 1 und 2, 4: Hellfeld). Maßstabsmarke ~ 100 μm .

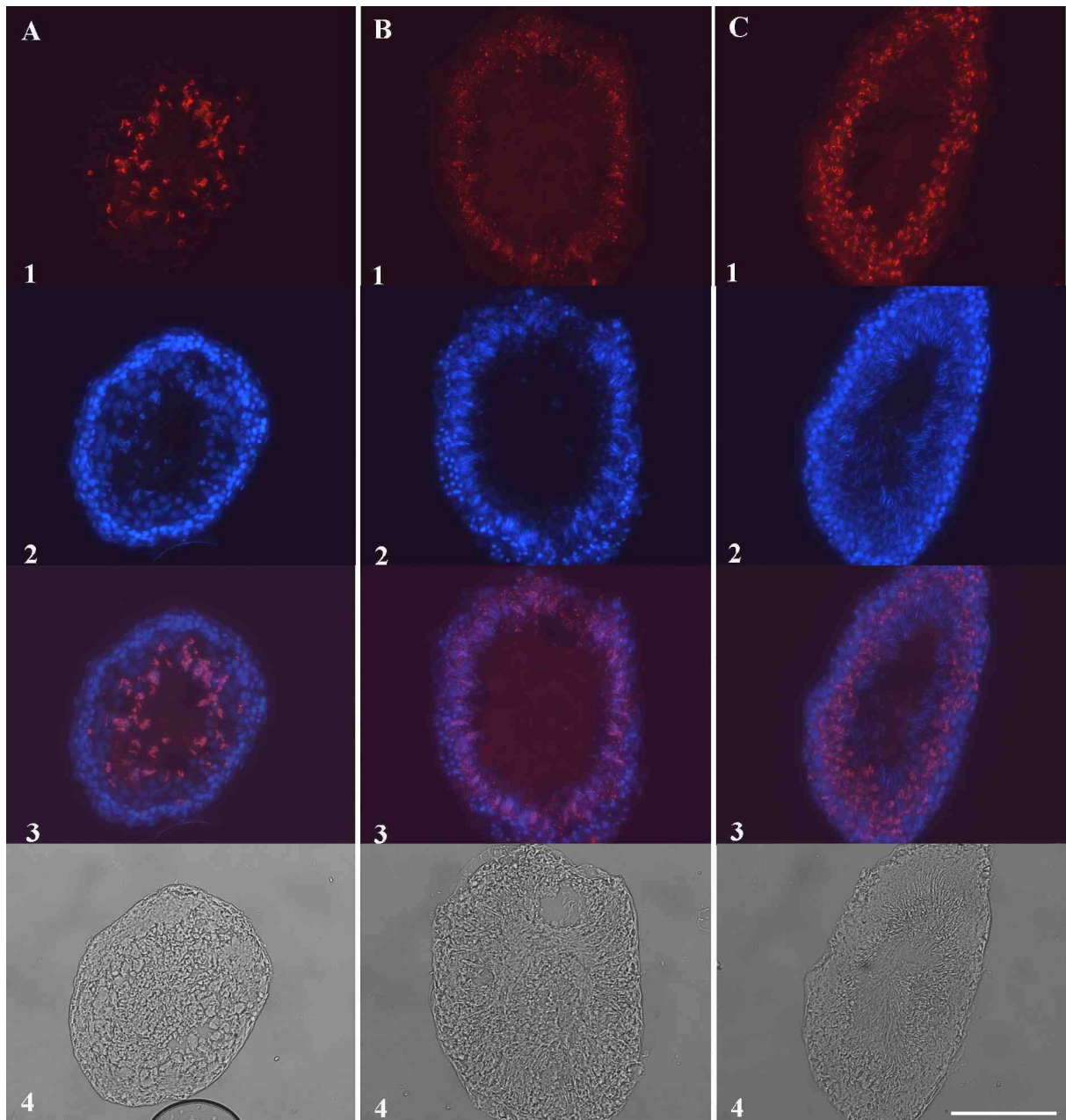


Abbildung 3.11: Fluoreszenzmikroskopische Analyse von Kryoschnitten (20 μm) durch isolierte Tubuli seminiferi der Ratte nach einer Kulturdauer von 24 h. Die Akrosomen wurden mit PNA (rot) und die Zellkerne mit DAPI (blau) markiert. Die Querschnitte zeigen verschiedene Spermatogenesestadien: A = „pale“, B = „spot“, C = „dark“ (1: Akrosomenfärbung mit PNA, 2: DAPI-Kernfärbung, 3: „Overlay“ von 1 und 2, 4: Hellfeld). Maßstabsmarke ~ 100 μm .

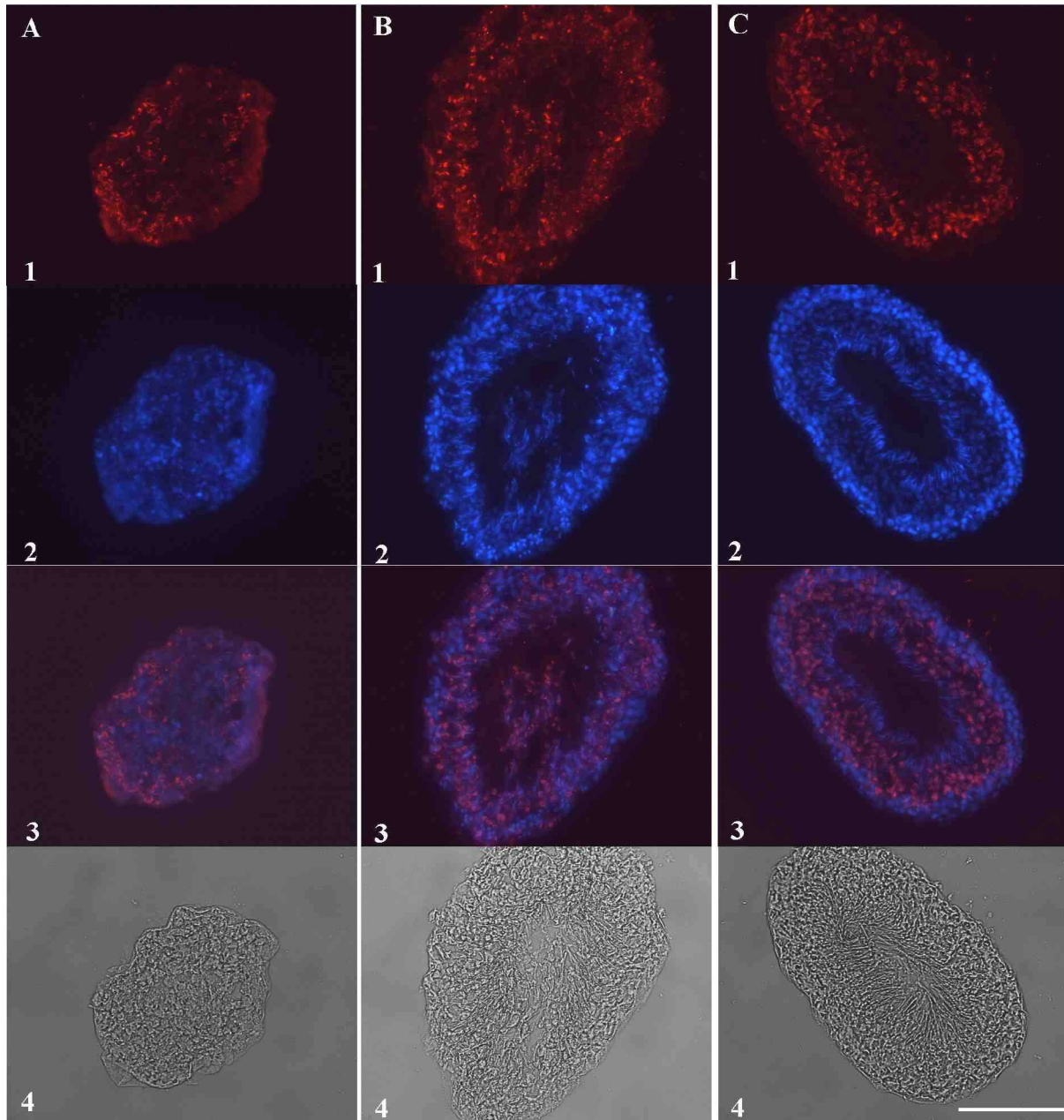


Abbildung 3.12: Fluoreszenzmikroskopische Analyse von Kryoschnitten (20 μm) durch isolierte Tubuli seminiferi der Ratte nach einer Kulturdauer von 48 h. Die Akrosomen wurden mit PNA (rot) und die Zellkerne mit DAPI (blau) markiert. Die Querschnitte zeigen verschiedene Spermatogenesestadien: A = „pale“, B = „spot“, C = „dark“ (1: Akrosomenfärbung mit PNA, 2: DAPI-Kernfärbung, 3: „Overlay“ von 1 und 2, 4: Hellfeld). Maßstabsmarke ~ 100 μm .

Zusammenfassend lässt sich folgendes feststellen: Die Isolation der Hodenkanälchen und eine anschließende Kulturdauer von bis zu 48 h hat in Bezug auf die unterschiedlichen Spermatogenesestadien der Tubulus-Fragmente unterschiedlich starke Auswirkungen auf die Keim-epithelmorphologie. Das Keimepithel ist bei den Tubulus-Fragmenten des „dark“-Stadiums auch noch nach 48 h fast vollständig intakt. Es lässt sich gut beobachten, dass alle Keimzellstadien in ihrer Assoziation untereinander unbeeinflusst bleiben, so dass sich die späteren Spermatiden dem Lumen zugewandt befinden, während die diploiden Spermatogonien und Spermatozyten an der Tubulus-Basis lokalisiert sind. Die Akrosomen der Spermatiden lassen sich komplett markieren und sind somit intakt. Ein anderes Bild ergibt sich für die Tubuli des „pale“-Stadiums. Eine Kulturdauer von 24 h hat zunächst nur einen geringen Einfluss auf die Morphologie des Keimepithels, denn auch hier bleiben zunächst alle Keimzellstadien in ihrer korrekten Anordnung. Es wird aber schon erkennbar, dass im ehemaligen Lumen des Tubulus Zellmaterial akkumuliert. Nach 48 h Kultur schließlich ist das gesamte Keimepithel kollabiert und die verschiedenen Keimzellstadien liegen ungeordnet über den Tubulus-Querschnitt verstreut. Die einzelnen Keimzellen scheinen aber noch nicht stark geschädigt zu sein, denn bei vielen sind Akrosom und Zellkern intakt. Das Keimepithel der kultivierten Tubuli des „spot“-Stadiums bleibt nach 48 h weitgehend intakt. Eine Kulturdauer von 24 h scheint auf die Assoziationen der Keimzellen noch keinen negativen Einfluss zu haben. Auch nach 48 h sind die Zellkerne und Akrosomen der Zellen noch gut anzufärben. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass eine Kulturdauer der isolierten Tubuli seminiferi bis zu 48 h möglich ist. Die gute Erhaltung der Zellassoziationen des Keimepithels wirken sich positiv auf ein Überleben der einzelnen Keimzellen aus. Damit sind optimale Voraussetzungen für die Etablierung eines Transfektionssystems einzelner kultivierter Hodenkanälchen gegeben.

3.1.3 Analyse der Expression des *Endozepine-like peptide* (ELP) im Rattenhoden und in kultivierten Tubuli seminiferi

In der vorliegenden Arbeit sollte eine genauere Analyse der Promotorsequenz des post-meiotisch exprimierten ELP-Gens stattfinden. In der Einleitung wurde schon die spezielle Stadien-spezifische Expression des Proteins in haploiden Keimzellen über Mikroskopiebilder einer immunohistochemischen Analyse auf Hoden-Paraffinschnitten dokumentiert (Pusch *et al.*, 2000 und Abbildung 1.10). Diese Experimente sollten nun durch Verwendung fluoreszenzmarkierter Antikörper für die immunohistochemische Detektion auf Kryoschnitten durch den Rattenhoden rekapituliert werden. Zusätzlich sollte überprüft werden, ob auch nach einer Kulturdauer von bis zu 48 h das ELP-Protein in den kultivierten Hodenkanälchen exprimiert wird und eine immunohistochemische Markierung des Proteins in Tubulus-Kryoschnitten möglich ist. Die Detektion erfolgte durch indirekte Immunfluoreszenz mit einem primären ELP-Antikörper aus Kaninchen in der Verdünnung 1:500 und einem fluoreszenzmarkierten Cy2-Zweitantikörper. Die Zellkerne wurden mit TO-PRO-3, einem DNA-Farbstoff, angefärbt. Die Stadien-spezifische ELP-Expression in Rattenhoden-Querschnitten wurde anhand von konfokalen Mikroskopbildern dokumentiert (Abbildungen 3.13–3.16):

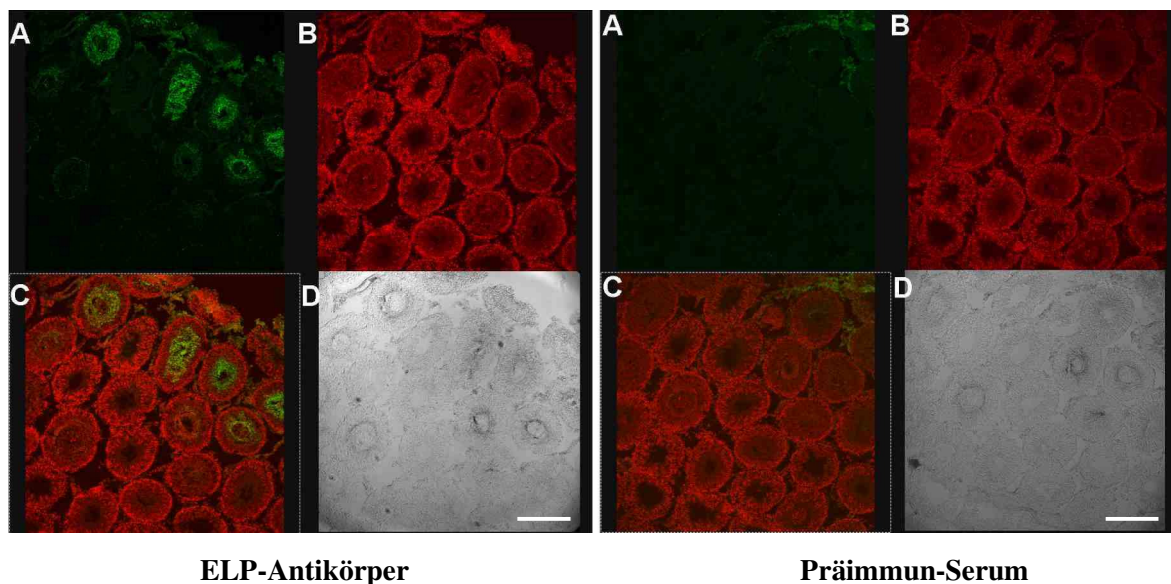


Abbildung 3.13: Immunohistochemische Analyse der ELP-Proteinexpression in Kryoschnitten des Rattenhodens (A: Cy2-markiertes ELP-Protein, B: Kernfärbung mit TO-PRO-3, C: „Overlay“ aus A und B, D: Hellfeld). Verdünnung des primären ELP-Antikörpers 1:500. Maßstabsmarke ~ 200 μm .

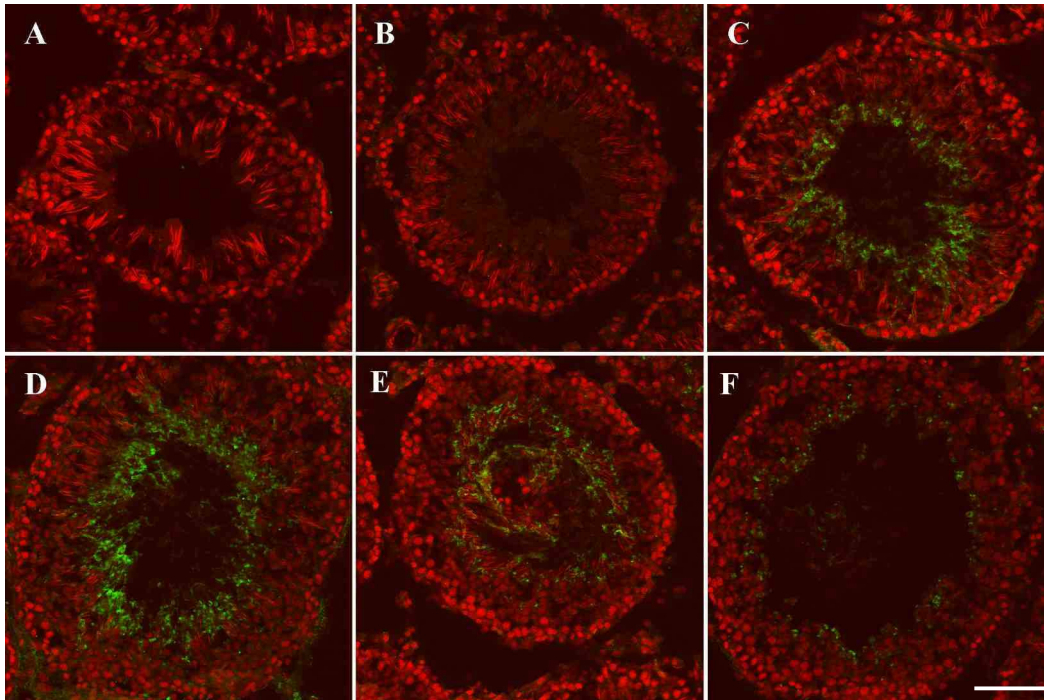


Abbildung 3.14: Analyse der ELP-Proteinexpression in Kryoschnitten durch den Rattenhoden mittels indirekter Immunfluoreszenz (grün) und Kernfärbung (rot). Die Querschnitte zeigen verschiedene Spermatogenesestadien: A = XII–XIII, B = III, C = IV–V, D = VI, E = VII–VIII, F = IX. Verdünnung des primären ELP-Antikörpers 1:500. Maßstabsmarke ~ 50 μ m.

Die Lokalisation der ELP-Proteinexpression über indirekte Immunfluoreszenz in Kryoschnitten durch den Rattenhoden ist also sehr gut möglich. Die Querschnitte zeigen eine Keimzell- und Stadien-spezifische ELP-Expression in bestimmten Spermatogenesestadien. Eine schwache Markierung lässt sich zuerst in den elongierenden Spermatiden des Stadiums 16 (Stadium III) nachweisen. Eine starke Akkumulation des ELP-Proteins lässt sich in den Spermatiden der Stadien 17–19 (Stadien IV–VIII) beobachten. Auch die Residualkörper, die im Stadium IX nach der Spermiation sichtbar werden, zeigen eine intensive Markierung.

Anhand von Kryoschnitten der isolierten und kultivierten Tubuli wurde anschließend überprüft, ob sich das ELP-Protein auch nach einem Kulturzeitraum von 24–48 h noch nachweisen lässt. Die Auswertung der Immunohistochemie nach Markierung des ELP-Proteins über Cy3 und Kernfärbung durch DAPI erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Abbildungen 3.15 und 3.16).

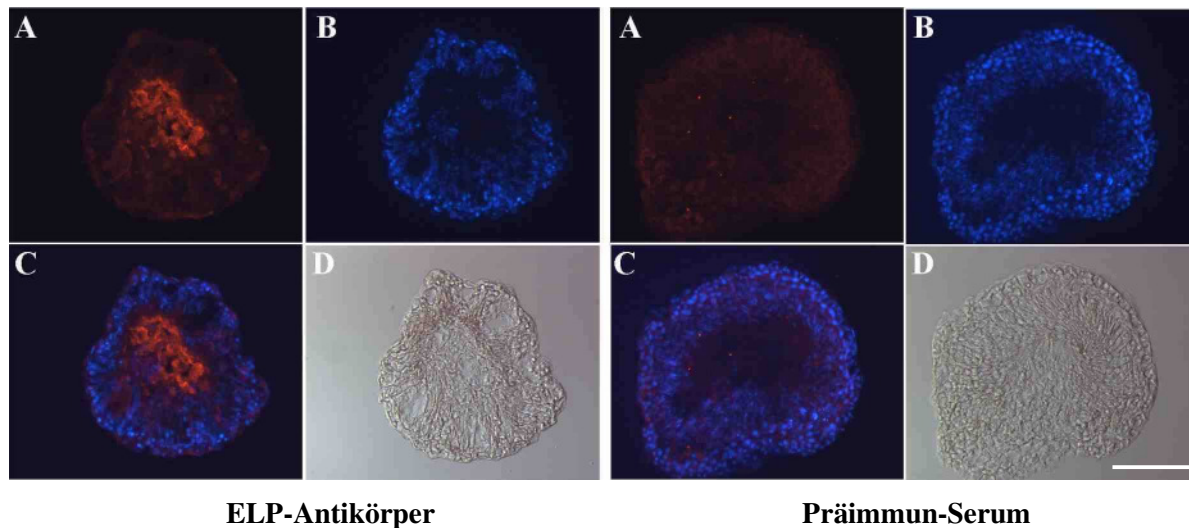


Abbildung 3.15: Analyse der ELP-Proteinexpression in Querschnitten isolierter Tubuli seminiferi der Ratte nach 24 h Kultur. Indirekte Cy3-Immunfluoreszenz des ELP und DAPI-Kernfärbung (A: Cy3-markiertes ELP-Protein, B: DAPI-Kernfärbung, C: „Overlay“ aus A und B, D: Hellfeld). Verdünnung des primären ELP-Antikörpers 1:500. Maßstabsmarke ~ 100 μm .

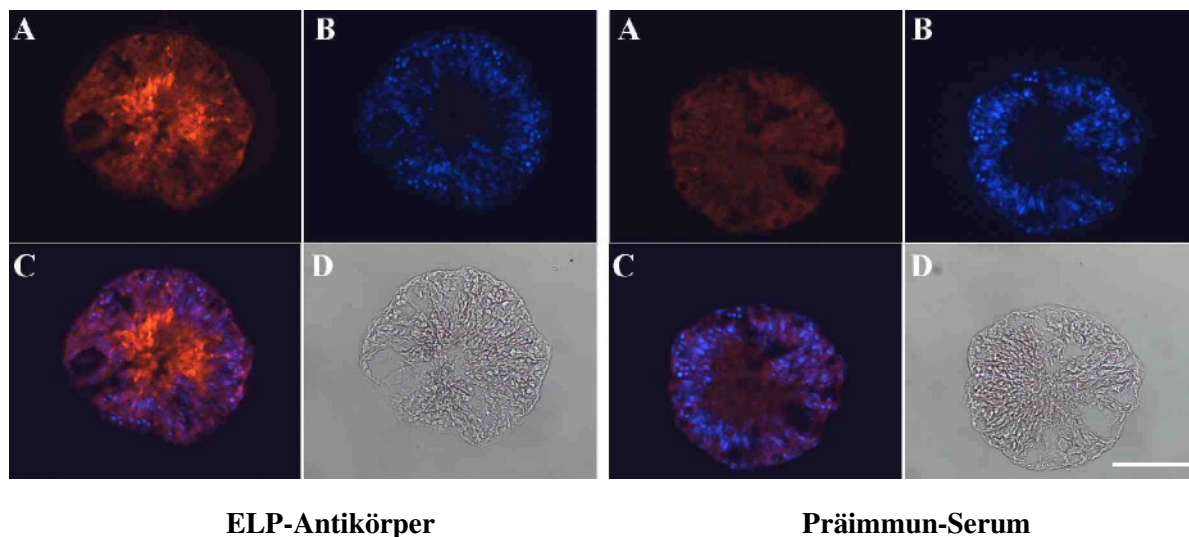


Abbildung 3.16: Analyse der ELP-Proteinexpression in Querschnitten isolierter Tubuli seminiferi der Ratte nach 48 h Kultur. Indirekte Cy3-Immunfluoreszenz des ELP und DAPI-Kernfärbung (A: Cy3-markiertes ELP-Protein, B: DAPI-Kernfärbung, C: „Overlay“ aus A und B, D: Hellfeld). Verdünnung des primären ELP-Antikörpers 1:500. Maßstabsmarke ~ 100 μm .

Die mikroskopische Auswertung der ELP-Immunfluoreszenz anhand von Kryoschnitten durch isolierte Tubuli seminiferi zeigt eine Proteinmarkierung der haploiden Keimzellen im Zentrum der Querschnitte der Hodenkanälchen. Die Kulturdauer von 24 h und 48 h hatte zwar einen leicht negativen Effekt auf die Tubulus-Morphologie, aber es lässt sich zeigen, dass die Expression des ELP-Proteins Stadien-spezifisch erfolgt und die postmeiotische Expression *in vitro* erhalten bleibt. Damit ist die Voraussetzung für eine Promotor-Reporteranalyse des ELP-Promotors in kultivierten Hodenkanälchen gegeben.

3.2 Etablierung des Transfektionssystems

Nachdem die mechanische Isolierung der Hodenkanälchen ohne größere Gewebeschädigungen möglich ist und die Morphologie des Keimepithels nach 24–48 h weitgehend intakt bleibt, sollte ein *in vitro*-Gentransfer in die kultivierten Tubuli mittels Elektroporation möglich sein. Nach Optimierung der Elektroporationsparameter sollten die Auswirkungen dieser Behandlung auf die Keimzellen durch eine Analyse der Zellschädigung überprüft werden. In einem sogenannten *Live-Dead*-Assay wurde der Anteil überlebender Zellen nach DNA-Mikroinjektion und Elektroporation direkt in den kultivierten Tubuli ermittelt. Ob sich nach der Transfektion eine verstärkte Zellschädigung auch über einen Anstieg in der Zahl apoptotischer Zellen nachweisen lässt, wurde mit einem sogenannten TUNEL-Assay ermittelt.

3.2.1 Einstellung der Elektroporationsparameter

Die Bedingungen für eine Transfektion der Hodenkanälchen durch DNA-Injektion mit anschließender Elektroporation wurden in Anlehnung an Experimente des *in vivo*-Gentransfers aus Literaturdaten optimiert. Dabei wurden verschiedene Elektroporationsparameter getestet, indem vorerst die konstitutiv exprimierten Reporterplasmide EGFP-N1 und EYFP-N1 für die Transfektion verwendet wurden. Die Konzentration der injizierten Plasmid-DNA betrug gleichbleibend 1 µg/µl. Die Auswertung des Transfektionserfolges und der -effizienz erfolgte über die grüne Fluoreszenz des *enhanced green/yellow fluorescent proteins* (EGFP/EYFP) am Fluoreszenzmikroskop (EGFP/EYFP-Anregung mit UV-Licht und FITC-Filterblock) oder am konfokalen Lasermikroskop (EGFP/EYFP-Anregung über 488 nm-Laser). Die Auswertung der Transfektionseffizienz in bezug auf die verschiedenen Parameter sind in folgender Tabelle und Grafik zusammengefasst (Tabelle 3 und Abbildung 3.17).

Parameter	Elektrodenabstand [mm]	Pulszahl	Pulsstärke [V]	Pulslänge [ms]	Pulsintervall [s]	Transfektionseffizienz [%]
A	2	4	60	20	1	0
B	2	8	50	20	1	0
C	2	8	20	20	1	0
D	4	4	60	20	1	16
E	4	8	50	20	1	16
F	4	8	20	20	1	50
G	4	10	20	20	1	80
H	4	10	20	20	0,5	80

Tabelle 3: Vergleich der Transfektionseffizienz nach Elektroporation über verschiedene Parameter (Transfektionseffizienz: Prozentualer Anteil positiv transfizierter Tubuli)

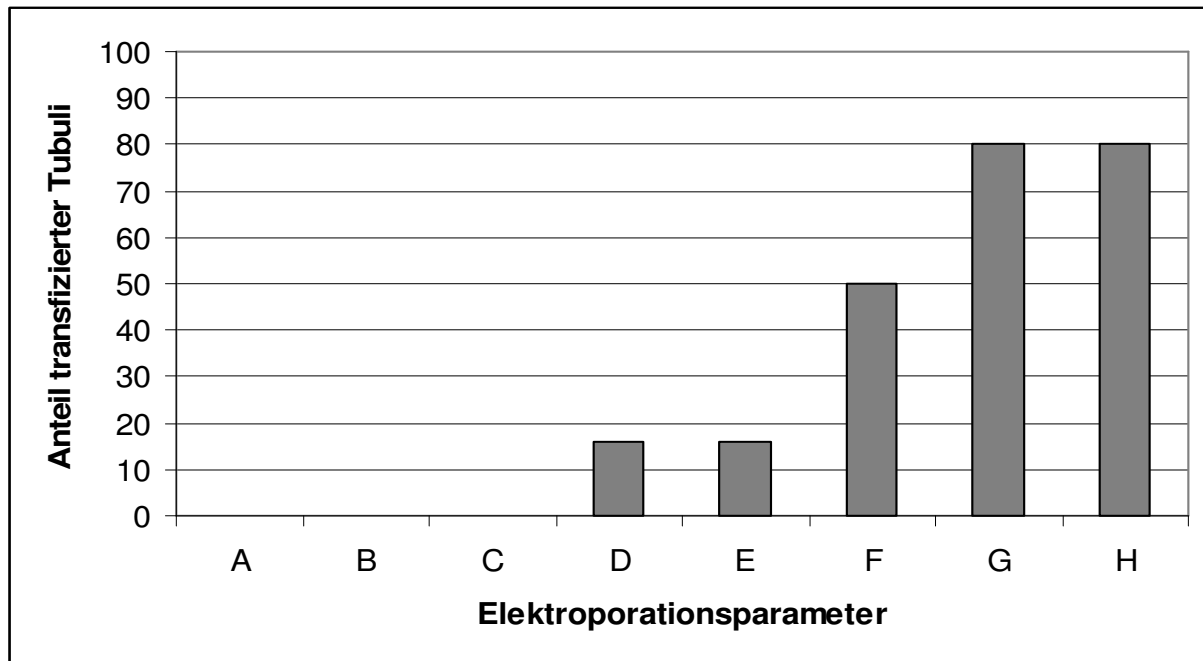


Abbildung 3.17: Vergleich der Transfektionseffizienz nach Elektroporation über verschiedene Parameter

Anhand der vorliegenden Ergebnisse wurde eine optimale Transfektion der Hodenkanälchen nach Elektroporation mit einem Elektrodenabstand von 4 mm, einer Pulszahl von 10 mit einer Pulsstärke von 20 V ermittelt. Abbildung 3.18 zeigt die Expression des Reporterplasmids EGFP-N1 in einem erfolgreich transfizierten Hodenkanälchen 24 h nach der Elektroporation.

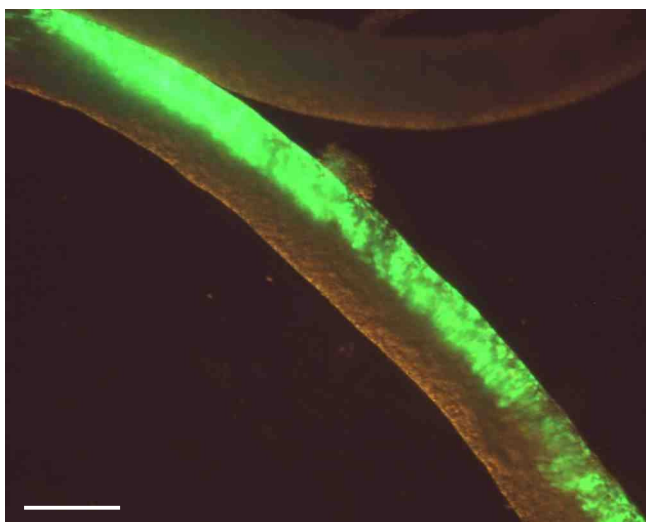


Abbildung 3.18: Hodenkanälchen nach Transfektion mit Reporterplasmid EGFP-N1. Maßstabsmarke ~ 200 μm

Nach dem Einstellen der optimalen Elektroporationsparameter ist demnach eine Transfektion der kultivierten Hodenkanälchen möglich. Nach 24 h Kultur ließ sich eine starke Expression des Reporterproteins EGFP beobachten. Das ins Lumen injizierte Reporterplasmid wurde im Tubulus nur halbseitig exprimiert. Für die spätere Analyse unterschiedlicher Promotor-Deletionskonstrukten sollte im weiteren überprüft werden, ob eine quantitative Analyse der Reporterexpression in den Hodenkanälchen möglich ist. Dafür wurden Tubulus-Fragmente mit dem Reporterplasmid pGL3 ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) transfiziert, für 24 h kultiviert und die Luziferase-Aktivität im Proteinlysate der Tubuli bestimmt (Abbildung 3.19).

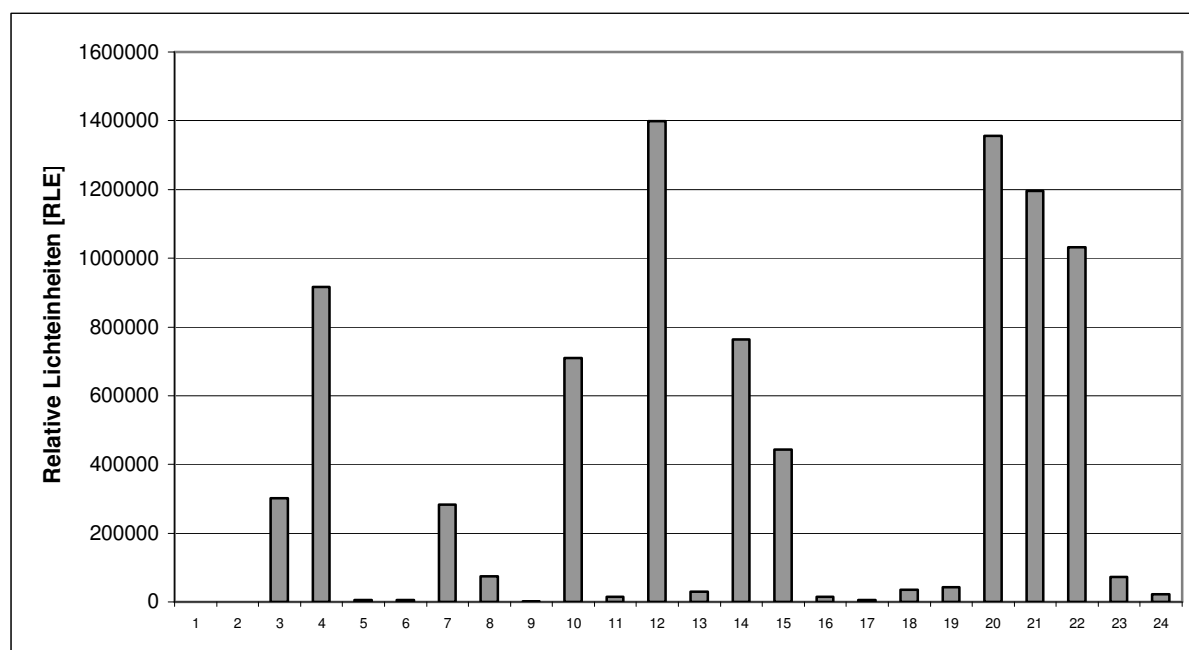


Abbildung 3.19: Vergleich der Luziferase-Aktivität von 24 transfizierten Hodenkanälchen

Auch die Transfektion der Tubuli mit dem Reporterplasmid pGL3 war erfolgreich. Durch Messung der Luziferase-Aktivität ließ sich die Transfektionseffizienz in den einzelnen Tubuli auch quantitativ ermitteln. Es wurde aber deutlich, dass die Transfektionseffizienz selbst bei optimalen Elektroporationsparametern sehr stark schwankte. Deshalb wurde im folgenden untersucht, ob diese Schwankungen auf unterschiedliche Spermatogenesestadien der Tubulus-Fragmente zurückzuführen sind.

3.2.2 Analyse der Transfektionseffizienz in bezug auf verschiedene Stadien

Es wurde schon in Abschnitt 3.1 gezeigt, dass die lichtmikroskopisch unterscheidbaren Tubulus-Stadien „pale“, „spot“ und „dark“ unterschiedlich empfindlich auf die Kulturbedingungen reagieren. Eine genauere Untersuchung der Transfektionseffizienz in den verschiedenen Stadien war deshalb besonders wichtig. Erste Analysen des Transfektionserfolges in Tubulus-Fragmenten unterschiedlicher Stadien erfolgten am Fluoreszenzmikroskop durch die Ermittlung der Fluoreszenzverteilung und -stärke nach Transfektion mit EYFP-N1.

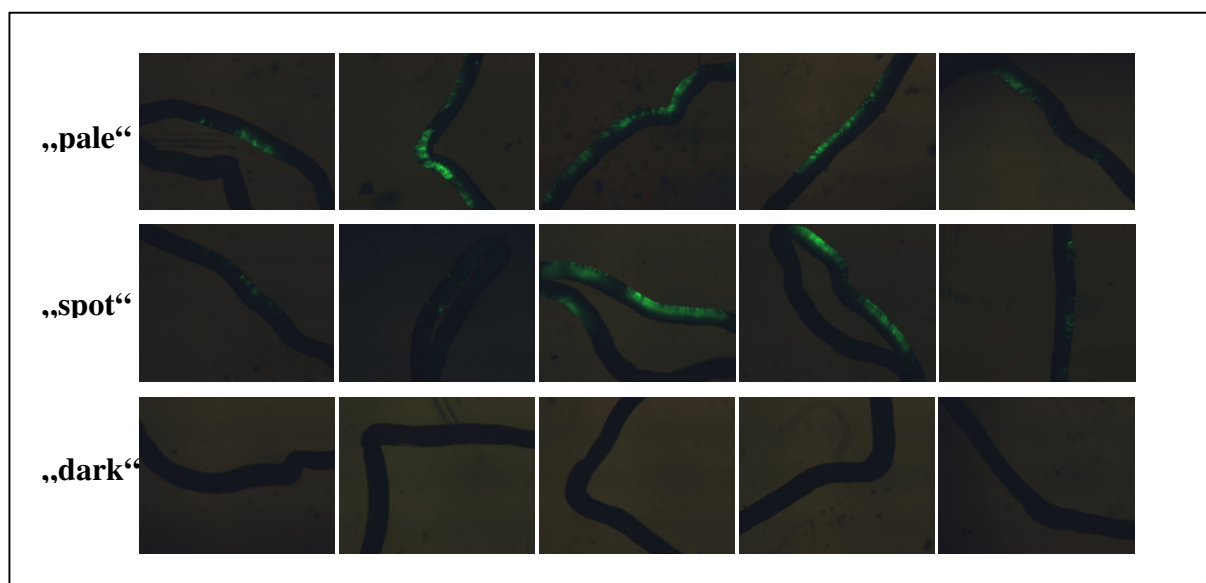


Abbildung 3.20: Vergleich der Transfektionseffizienz in bezug auf die verschiedenen Spermatogenesestadien unterschiedlicher Tubulus-Fragmente

Die Transfektionseffizienz in den unterschiedlichen Stadien schwankte stark. Die Tubulus-Fragmente des „dark“-Stadiums ließen sich nicht transfizieren, während in den Fragmenten des „pale“- und „spot“-Stadiums in den meisten Tubuli eine starke Expression des EYFP-Reporterproteins sichtbar war. Diese Ergebnisse wurden in einer quantitativen Untersuchung der Transfektionseffizienz anhand des Reporterproteins Luziferase bestätigt. Dafür wurden jeweils 10 Tubulus-Fragmente der unterschiedlichen Stadien mit dem Reporterplasmid pGL3 (Konzentration 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) transfiziert und die Luziferase-Aktivität nach 24 h Inkubation ermittelt (Abbildung 3.21).

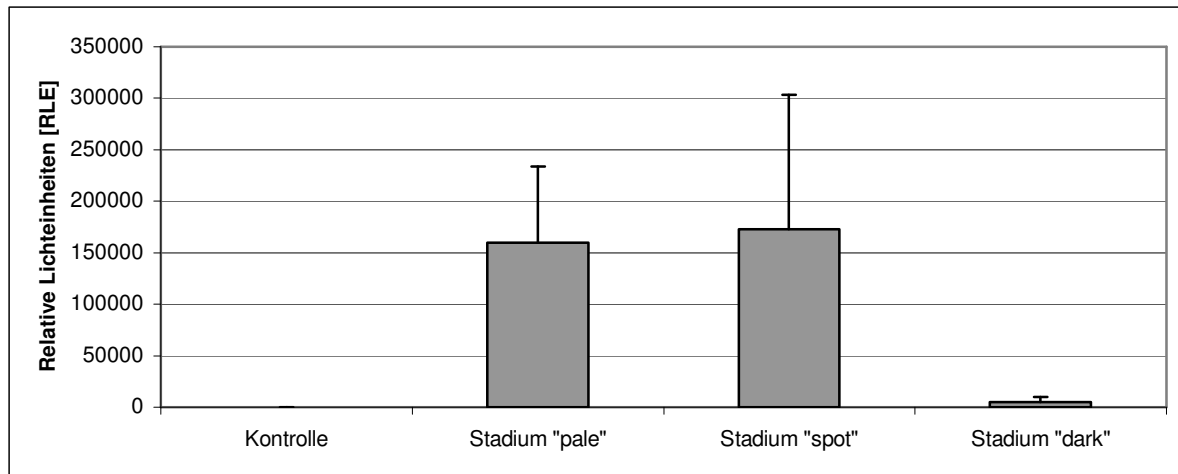


Abbildung 3.21: Vergleich der Luziferase-Aktivität in transfizierten Tubuli unterschiedlicher Stadien

Die quantitative Analyse der Luziferase-Reportereexpression bestätigte die Abhängigkeit des Transfektionserfolges vom Tubulus-Stadium. Es zeigte sich auch hier, dass in den Fragmenten des „dark“-Stadiums kaum eine Reportergenexpression nachzuweisen war. Trotz der Auswahl gleicher Tubulus-Stadien war die Standardabweichung nach Transfektion von „pale“- und „spot“-Stadien groß.

Anschließend sollte eine genauere Analyse der Zellschädigung erfolgen, die durch den Eingriff der Injektion und Elektroporation entstehen könnte. Dafür wurden die Tubulus-Fragmente nach der Behandlung in einem sogenannten *Live-Dead-Assay* analysiert. Zusätzlich wurde mit dem sogenannten TUNEL-Assay die Anzahl apoptotischer Zellen auf Kryoschnitten der transfizierten Tubuli ermittelt.

3.2.3 Analyse der Zellschädigung nach Injektion und Elektroporation der Tubuli seminiferi

3.2.3.1 *Live-Dead-Assay*

Anhand des *Live-Dead-Assays* ließen sich schon während der Kultur der Tubuli lebende und tote Zellen im Tubulus markieren. Die Analyse grünfluoreszierender lebender und rotfluoreszierender toter Zellen fand am konfokalen Mikroskop statt, indem Calcein und Ethidium-Homodimer über einen 488 nm-Laser angeregt wurden. Der Einfluss der Kulturdauer nach 24 h und 48 h sowie die Auswirkungen der DNA-Mikroinjektion und Elektroporation wurden dokumentiert (Abbildungen 3.22 und 3.23).

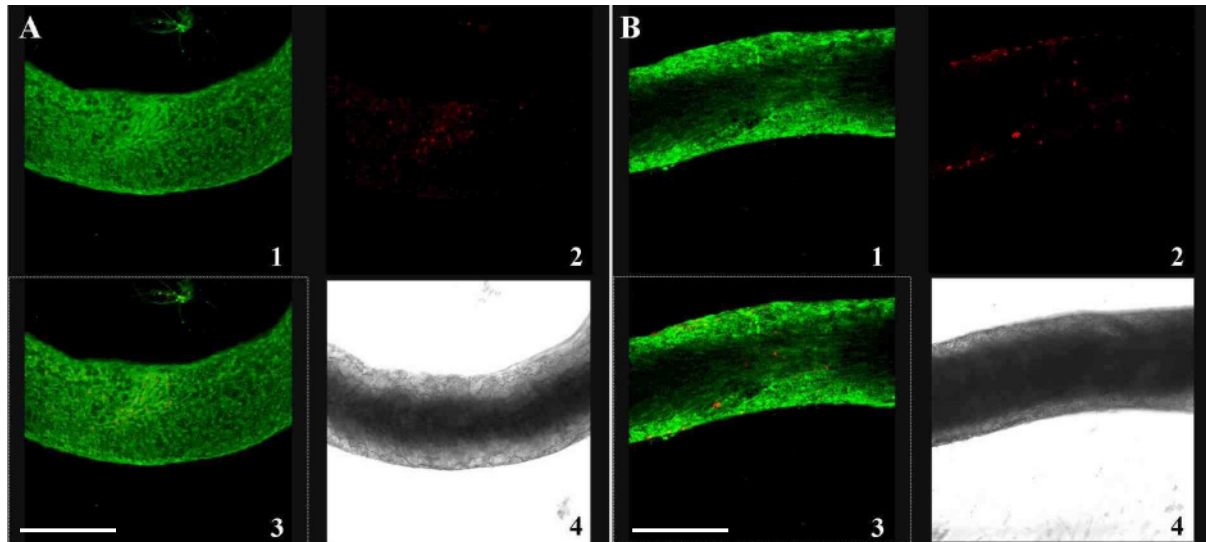


Abbildung 3.22: *Live-Dead*-Assay von Hodenkanälchen nach 24 h (A) und 48 h (B) Kultur (1: Calcein-Fluoreszenz der lebenden Zellen [Projektion aus 14 konfokalen Schnittebenen], 2: Ethidium-Homodimer-Fluoreszenz der Kerne in den toten Zellen [Projektion aus 14 konfokalen Schnittebenen], 3: „Overlay“ aus 1 und 2, 4: Hellfeld). Maßstabsmarke ~ 200 µm.

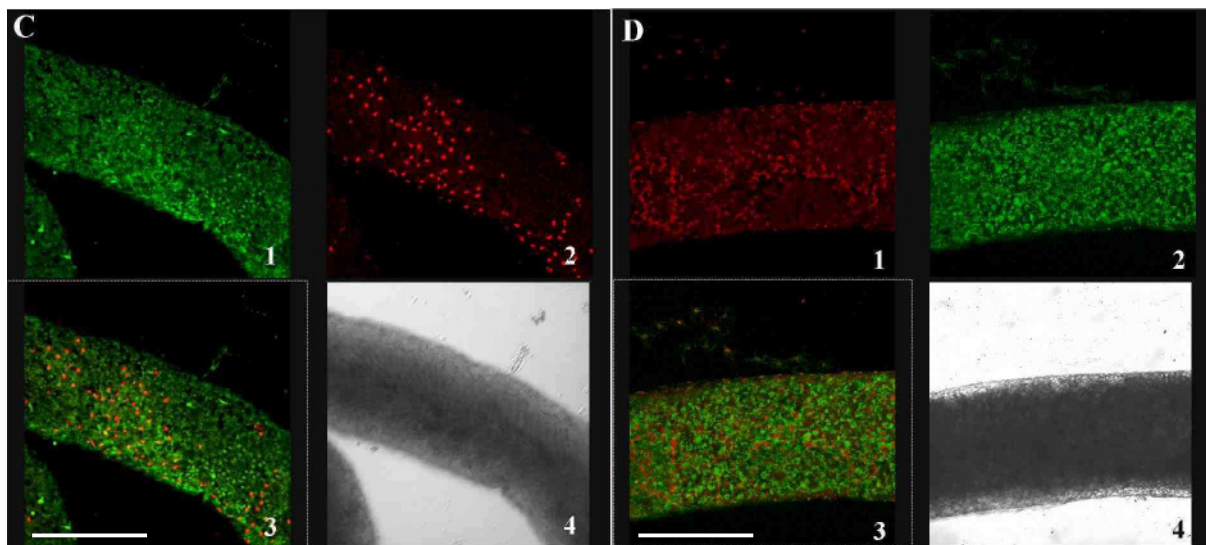


Abbildung 3.23: *Live-Dead*-Assay von Hodenkanälchen 24 h nach DNA-Injektion (C) und nach DNA-Injektion mit anschließender Elektroporation (D) (1: Calcein-Fluoreszenz der lebenden Zellen [Projektion aus 14 konfokalen Schnittebenen], 2: Ethidium-Homodimer-Fluoreszenz der Kerne in den toten Zellen [Projektion aus 14 konfokalen Schnittebenen], 3: „Overlay“ aus 1 und 2, 4: Hellfeld). Maßstabsmarke ~ 200 µm.

Die Ergebnisse zeigen, dass vor allem die Transfektionsbedingungen eine Zunahme der Zellschädigung in den Hodenkanälchen bewirken. Ohne Transfektion sind selbst nach 48 h Kultur im Keimepithel des Tubulus nur sehr wenige tote Zellen sichtbar. Die Lokalisation rotfluoreszierender Kerne an der Tubulus-Basis lässt auf ein Absterben von Spermatogonien

oder anderer Zellen auf der Basalmembran schließen. Eine DNA-Injektion verstärkt die Zellschädigung dagegen schon erheblich. Viele runde Zellkerne im Lumen des Tubulus wurden über die rote Fluoreszenz als tote Zellen markiert, so dass die Injektion allein schon einen schädigenden Effekt auf die runden Keimzellen haben muss. Die Anzahl der toten Zellen nimmt noch weiter zu, wenn die injizierten Tubuli zusätzlich noch elektroporiert werden. Die rotfluoreszierenden Kerne geschädigter Zellen sind regelmäßig über das gesamte Tubulus-Innere verteilt. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Transfektion der Hodenkanälchen zwar insgesamt eine verstärkte Zellschädigung bewirkt, dass aber der Anteil der lebenden Zellen im Keimepithel deutlich überwiegt.

3.2.3.2 TUNEL-Assay

Die Ergebnisse der *Live-Dead*-Färbung sollten durch eine zweite Methode bestätigt werden, indem die Anzahl der apoptotischen Zellen in Kryoschnitten transfizierter Tubuli ermittelt werden sollte. Dadurch ist eine genauere Analyse der geschädigten Zelltypen möglich. Die Methode ist allerdings in ihrer Anwendung auf Hodengewebe teilweise umstritten. Aufgrund der starken phagocytotischen Aktivität der Sertolizellen wird vermutet, dass selbst bei verstärkter Apoptose der Keimzellen diese auf einem Kryoschnitt nicht mit dem TUNEL-Assay markiert werden können, da sie sehr schnell von den Sertolizellen aufgenommen werden (Maeda *et al.*, 2002). Dies sollte überprüft werden, in dem die Phagozytose durch eine Injektion von Annexin V, das alle Phosphatidylserin-Signale absättigt, verhindert werden sollte. Es wurden Hodenkanälchen-Kryoschnitte nach 24 h Kultur, nach 48 h Kultur, nach Injektion von Plasmid-DNA und nach Transfektion mit einem Reporterplasmid analysiert. Zusätzlich wurden einige Tubuli mit Annexin V (10 μ M) injiziert und nach 24 h und 48 h eingebettet und anhand von Kryoschnitten analysiert. In einigen Kryoschnitten wurden die Zellkerne über DAPI markiert. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte über die Anregung des rotfluoreszierenden Tetra-Methyl-Rhodamins (TMR) am konfokalen Lasermikroskop und am Fluoreszenzmikroskop.

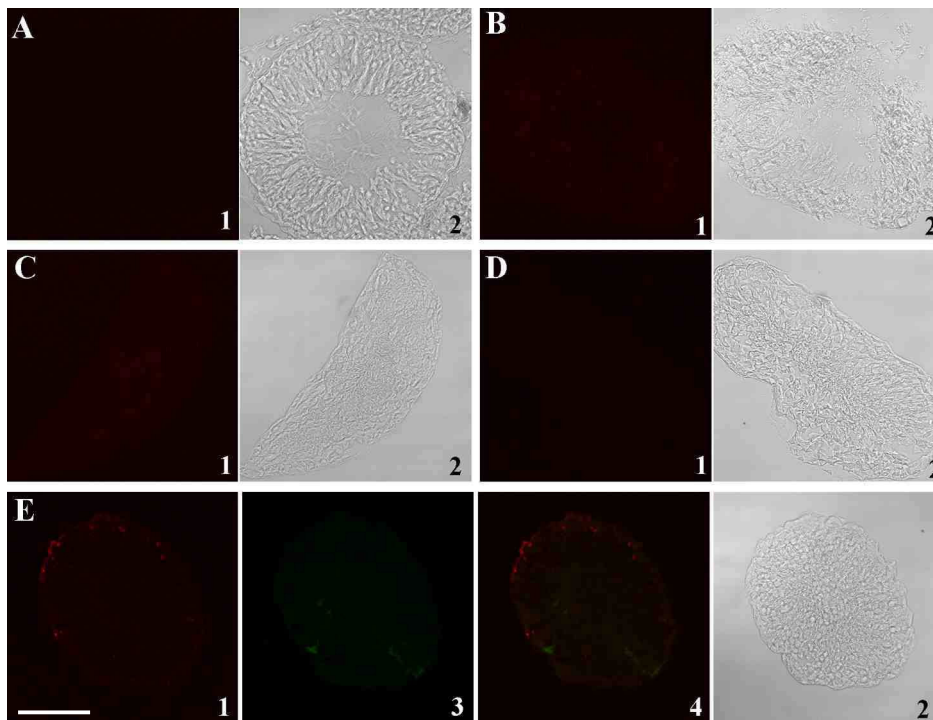


Abbildung 3.24: TUNEL-Assay auf Kryoschnitten (A: Hodengewebe, B: Tubulus nach 24 h Kultur, C: Tubulus nach 48 h Kultur, D: Tubulus nach Injektion, E: Tubulus transfiziert mit EYFP-Reportergen; 1: Fluoreszenz von TMR nach Anregung mit 515 nm-Laser, 2: Hellfeld, 3: EYFP-Fluoreszenz nach Anregung mit 488 nm-Laser, 4: „Overlay“). Maßstabsmarke ~ 100 μm .

In den Kryoschnitten der kultivierten Tubuli ließen sich mit dem TUNEL-Assay keine apoptotischen Zellen detektieren. Auch die zusätzliche Behandlung der Tubuli durch DNA-Injektion ließen keine stärkere Schädigung des Keimepithels über die Zunahme apoptotischer Zellen erkennen. Erst nach Transfektion der Hodenkanälchen zeigten die Kryoschnitte neben den EYFP-exprimierenden positiv transfizierten Zellen auch einige rot markierte apoptotische Zellen. Diese liegen eher am Rand und sind wahrscheinlich Spermatogonien oder primäre Spermatozyten. Apoptotische haploide Keimzellen ließen sich nicht nachweisen. Die Vermutung, dass geschädigte Keimzellen sofort über die Sertolizellen phagozytiert werden, lag nahe und sollte durch weitere Experimente bestätigt werden. Die Hodenkanälchen wurden deshalb einerseits mit 10 μM Annexin und andererseits mit DNA-Lösung injiziert. Die Tubuli wurden anschließend zusammen mit unbehandelten Hodenkanälchen für 24 h und 48 h inkubiert und dann anhand von Kryoschnitten analysiert. Die Zellkerne wurden über eine DAPI-Färbung markiert. Die Analyse der Kryoschnitte fand am Fluoreszenzmikroskop statt.

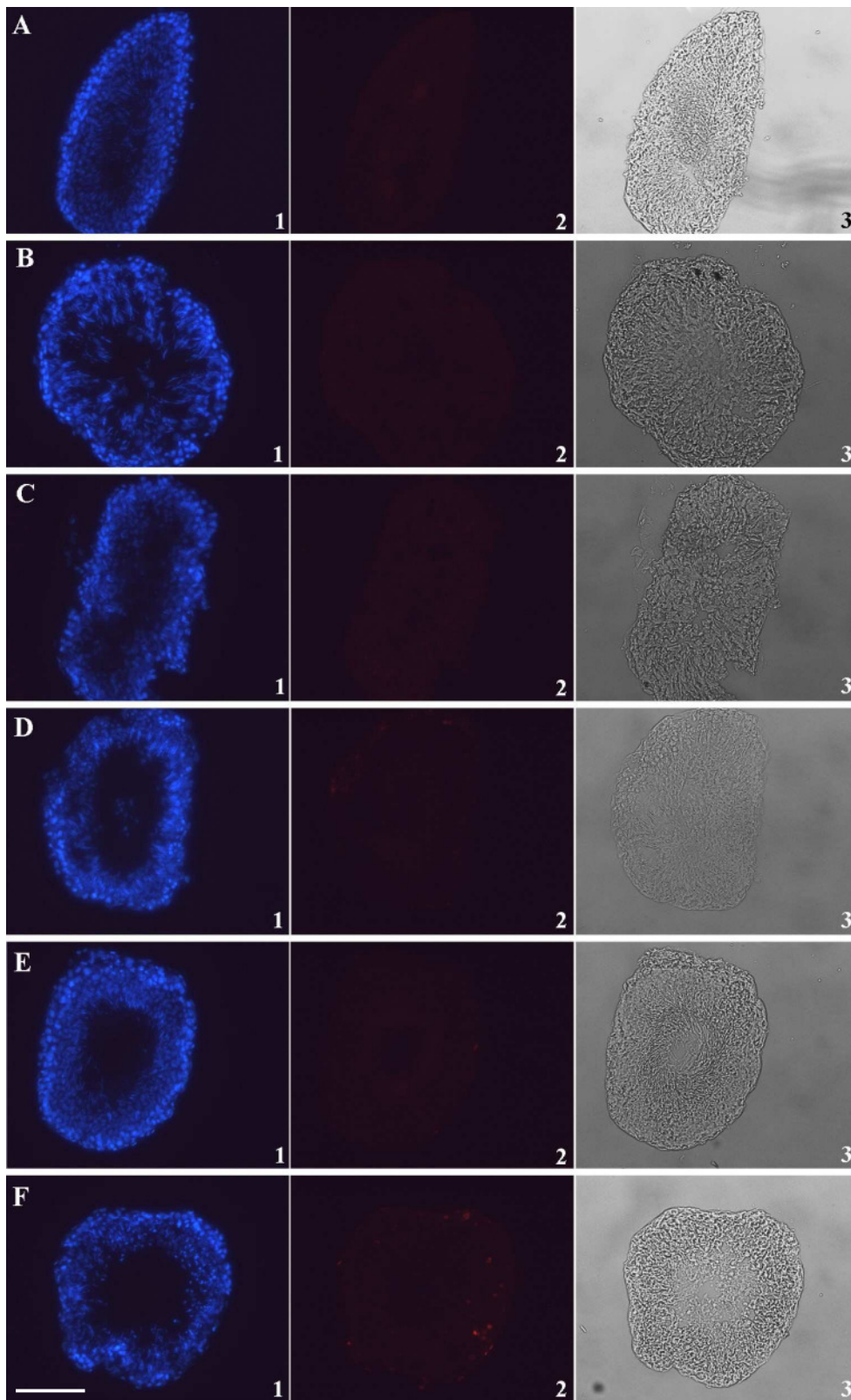


Abbildung 3.25: TUNEL-Assay auf Kryoschnitten (A: Tubulus nach 24 h Kultur, B: Tubulus nach 48 h Kultur, C: Tubulus nach DNA-Injektion und 24 h Kultur, D: Tubulus nach DNA-Injektion und 48 h Kultur, E: Tubulus nach Annexin-Injektion und 24 h Kultur, F: Tubulus nach Annexin-Injektion und 48 h Kultur; 1: DAPI-Kernfärbung, 2: Fluoreszenz von TMR, 3: Hellfeld). Maßstabsmarke ~ 100 μ m.

Die Ergebnisse zeigen auch hier keine Zunahme der Markierung apoptotischer Zellen auf Kryoschnitten durch die kultivierten Tubuli. Nach einer DNA-Injektion wurden erst nach einer zusätzlichen Inkubation von 48 h vereinzelt ein paar apoptotische Zellen sichtbar. Die Injektion von Annexin V hatte ebenfalls keinen großen Effekt. Allerdings ließen sich nach Annexin-Injektion und 48 h Inkubation viele Kryoschnitte finden, auf denen recht viele geschädigte Zellen markiert waren. Ob diese Zunahme durch eine Verhinderung der Phagozytose zurückzuführen ist, bleibt zu diskutieren.

3.2.4 Analyse der konstitutiven Expression des Reportergens EYFP-N1 in verschiedenen Zelltypen der Hodenkanälchen

In weiteren Transfektionsexperimenten sollte überprüft werden, ob eine Transfektion und Expression des Reporterplasmids in allen Zelltypen des Keimepithels grundsätzlich möglich ist. Eine Analyse der EYFP-Expression in einzelnen Zellen des Tubulus fand über mikroskopische Beobachtung intakter Tubulus-Fragmente am Mikroskop sowie über Kryoschnitte und Cytospinpräparate der transfizierten Tubuli statt. Eine Expression des Reporterproteins EYFP speziell in Keimzellen zeigen folgende konfokale Mikroskopbilder (Abbildung 3.26).

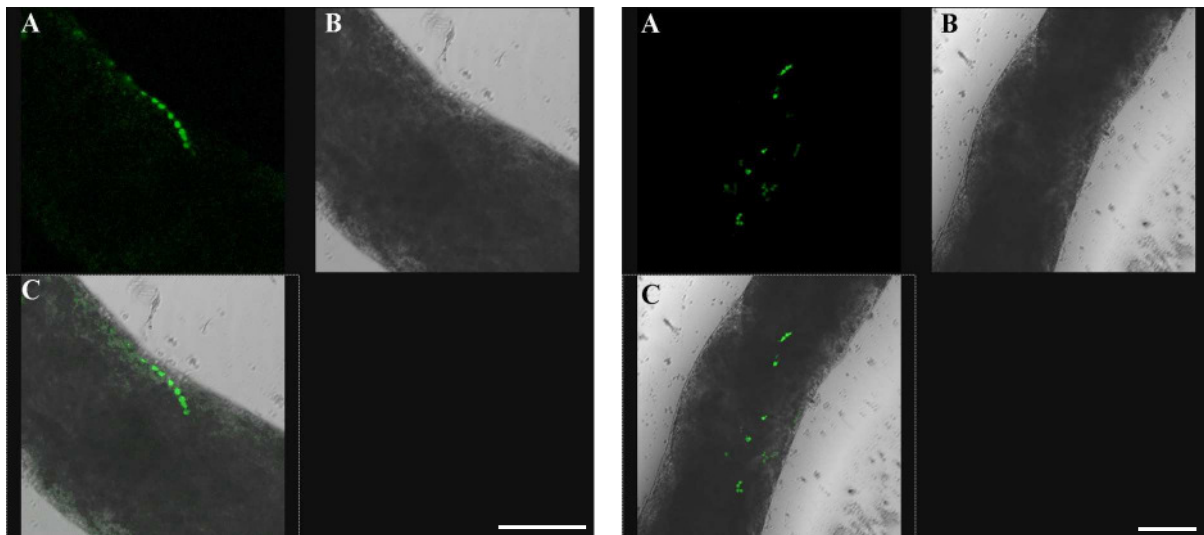


Abbildung 3.26: EYFP-Expression in Hodenkanälchen nach Transfektion mit EYFP-N1 (A: EYFP-Fluoreszenz nach Anregung mit 488 nm-Laser, B: Hellfeld, C: „Overlay“ aus A und B). Maßstabsmarke ~ 100 μ m

Auf den Mikroskopbildern ist die Expression von EYFP in runden Keimzellen sehr gut zu erkennen. Die über Cytoplasmabrücken verbundenen Keimzellen exprimieren das Reporterprotein, und es lassen sich regelrecht Ketten von fluoreszierenden Zellen erkennen. In vielen anderen transfizierten Tubuli deutet das Fluoreszenzmuster jedoch auf eine Expression in Sertolizellen hin. Das belegen folgende Bilder des Fluoreszenzmikroskops (Abbildung 3.27).

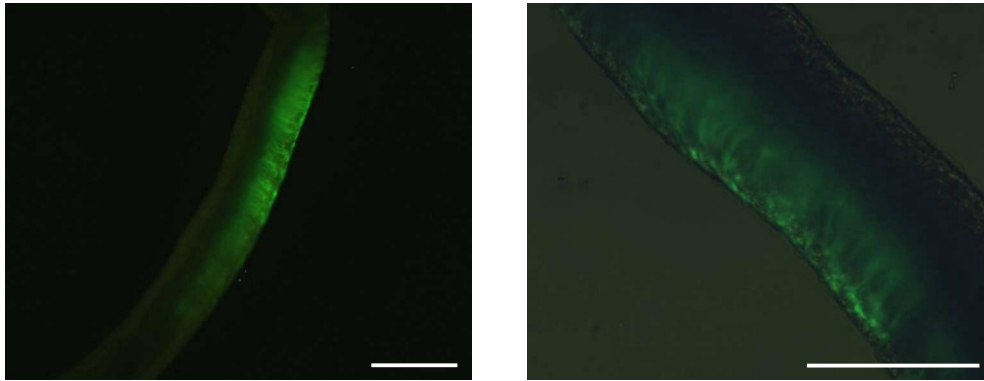


Abbildung 3.27: EYFP-Expression in zwei verschiedenen Hodenkanälchen nach Transfektion mit EYFP-N1. Maßstabsmarke ~ 200 μ m

Eine genauere Überprüfung der Expression der konstitutiv exprimierten Reportergene in einzelnen Zellen fand anhand von Kryoschnitten und Cytospinpräparaten statt (Abbildung 3.28).

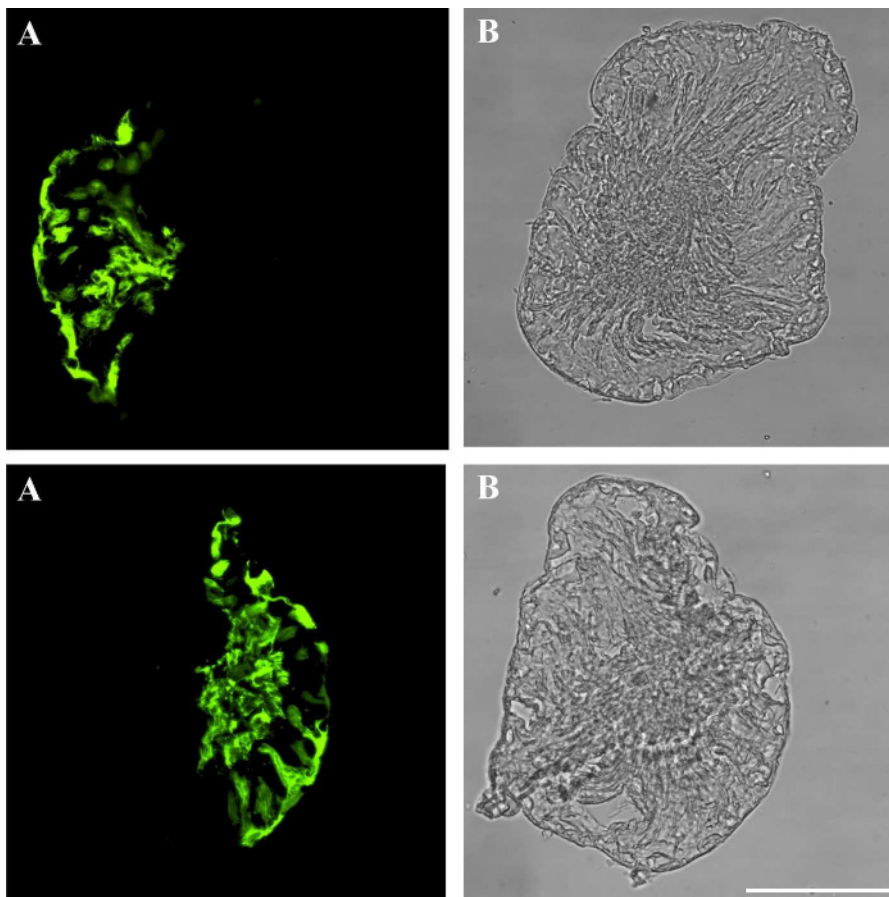


Abbildung 3.28: Expression von EYFP in zwei verschiedenen Kryoschnitten transfizierter Hodenkanälchen. Konfokale Mikroskopbilder (A: EYFP-Fluoreszenz bei Anregung mit 488 nm-Laser, B: Hellfeld). Maßstabsmarke ~ 100 μ m

Kryoschnitte der mit EYFP-N1 transfizierten Tubuli zeigen eine Expression des Reporterproteins in Sertolizellen und runden Keimzellen (Abbildung 3.28). Für eine bessere Unterscheidung der verschiedenen Zelltypen wurden Cytospinpräparate angefertigt. Eine Kernfärbung mit dem DNA-bindenden Farbstoff TO-PRO-3 unterstützte dabei zusätzlich die Analyse der EYFP-exprimierenden Zelltypen (Abbildung 3.29).

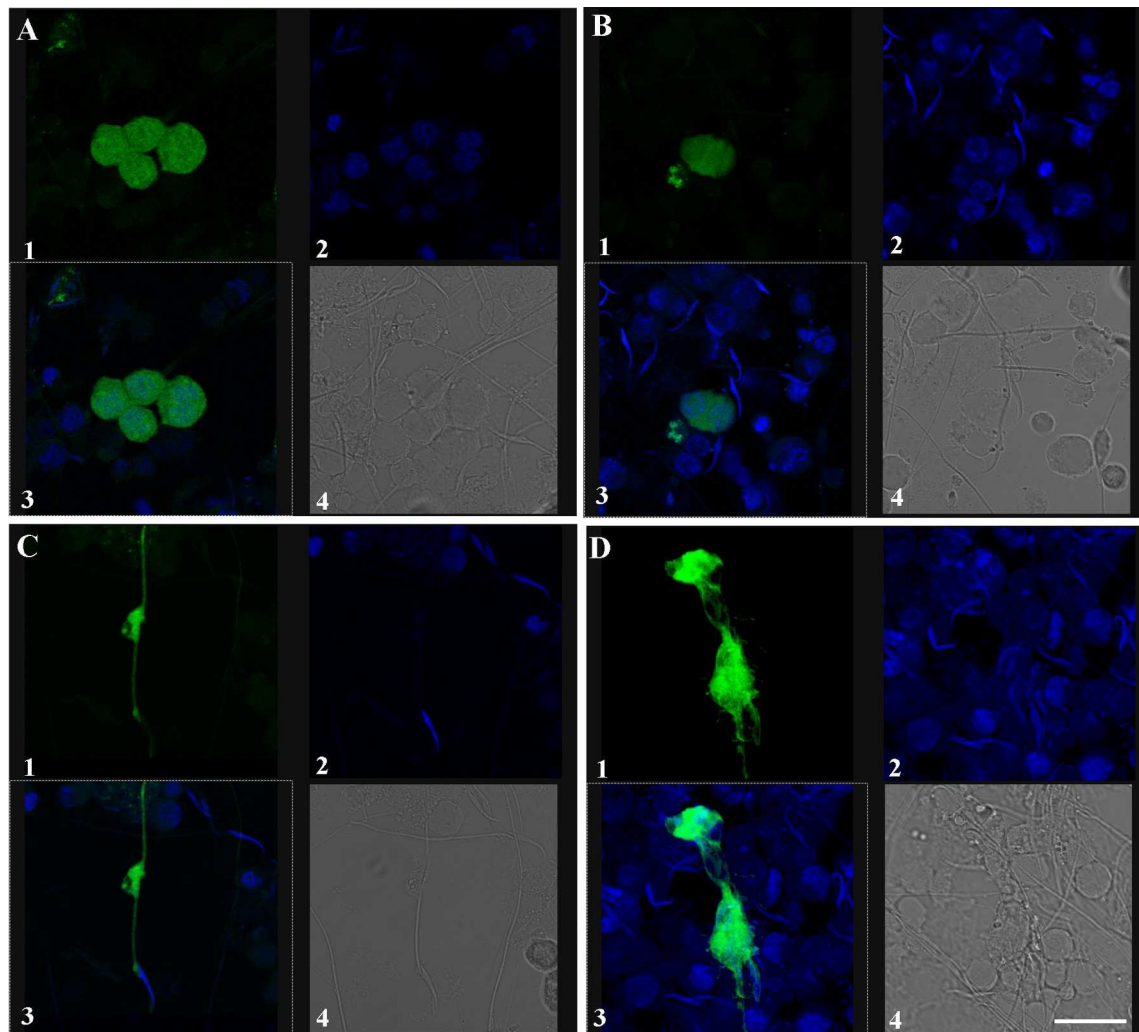


Abbildung 3.29: Expression von EYFP in verschiedenen Zelltypen auf Cytospinpräparaten von transfizierten Tubuli (1: EYFP-Fluoreszenz nach Anregung über 488 nm-Laser, 2: Kernfärbung mit TO-PRO-3, 3: „Overlay“ aus 1 und 2, 4: Hellfeld). Maßstabsmarke ~ 30 μ m

Anhand der Cytospinpräparate ließen sich die erfolgreich transfizierten Zelltypen gut identifizieren. Abbildung A zeigt eine Vierergruppe von runden Keimzellen, wahrscheinlich Spermatozyten. Auf Abbildung B lässt sich eine EYFP-exprimierende runde Keimzelle mit zwei Zellkernen erkennen, so dass es sich hier um eine Keimzelle kurz vor der Teilung handeln könnte. Abbildung C lässt ganz klar ein spätes elongiertes Spermium erkennen, das das EYFP-Reporterprotein in seinem verbleibenden Cytoplasmarest exprimiert. Anhand der

Abbildung D lässt sich auch eine Expression von EYFP in Sertolizellen zeigen. Diese Ergebnisse belegen, dass es grundsätzlich möglich ist, mit dem hier etablierten Kultur- und Transfektionssystem Keimzellen, einschließlich runder und elongierter Spermatiden sowie Sertolizellen, zu transfizieren und die Expression des fluoreszierenden Reportergens in diesen Zelltypen nachzuweisen.

3.3 Expression von EYFP-Reportergenkonstrukten unter der Kontrolle Keimzell-spezifischer Promotoren

Nachdem das Transfektionssystem etabliert und eine Einführung von konstitutiv exprimierten Reportergenkonstrukten in Keimzellen möglich war, sollte überprüft werden, ob spezielle Reportergenkonstrukte mit Keimzell-spezifischen Promotoren in ihrem Zelltyp- und Stadien-spezifischen Expressionsmuster analysiert werden können. Dafür wurden Promotoren benutzt, die schon in anderen Systemen, zum Beispiel in transgenen Tieren, charakterisiert worden waren. Dazu gehören die Promotoren der Gene für Proakrosin, Protamin und SP-10. Es sollte ermittelt werden, ob die Expression des EYFP-Reportervektors *in vitro* durch einen Keimzell-spezifischen Promotor in einer ähnlichen Weise gesteuert werden kann wie unter *in vivo*-Bedingungen. Zum Vergleich wurde ein Promotor verwendet, der eine spezifische Gen-expression in Sertolizellen lenkt, nämlich der Promotor des *Androgen binding protein*-Gens. Die Analysen der Zelltyp- und Stadien-spezifischen Expressionsmuster wurden wiederum anhand von Kryoschnitten und Cytospinpräparaten der transfizierten Tubuli durchgeführt. Zusätzlich wurde die Spezifität der Promotoren untersucht, indem die EYFP-Promotor-konstrukte in die SK11-Zelllinie (Walther *et al.*, 1996) transfiziert wurden, um eine eventuelle Hintergrundaktivität der Konstrukte in somatischen Zellen zu überprüfen.

3.3.1 Klonierung von Reportergenkonstrukten

Für die Klonierung von EYFP-Promotor-Reporterkonstrukten wurden die jeweiligen Promotorsequenzen mittels PCR aus genomischer Ratten-DNA amplifiziert und das PCR-Produkt in den pDrive-Klonierungsvektor inseriert. Der konstitutive CMV-Promotor des EYFP-Reporterkonstruktes wurde entfernt und durch die entsprechenden spezifischen Promotoren ersetzt. Dazu wurden die Promotorfragmente mit Hilfe entsprechender Restriktionsendonukleasen aus dem pDrive-Vektor ausgeschnitten und in die zuvor linearisierten EYFP-N1- oder EYFP-Mito-Reportervektoren ligiert. Die verschiedenen Promotor-Reportervektoren sind in Abbildung 3.30 schematisch dargestellt.

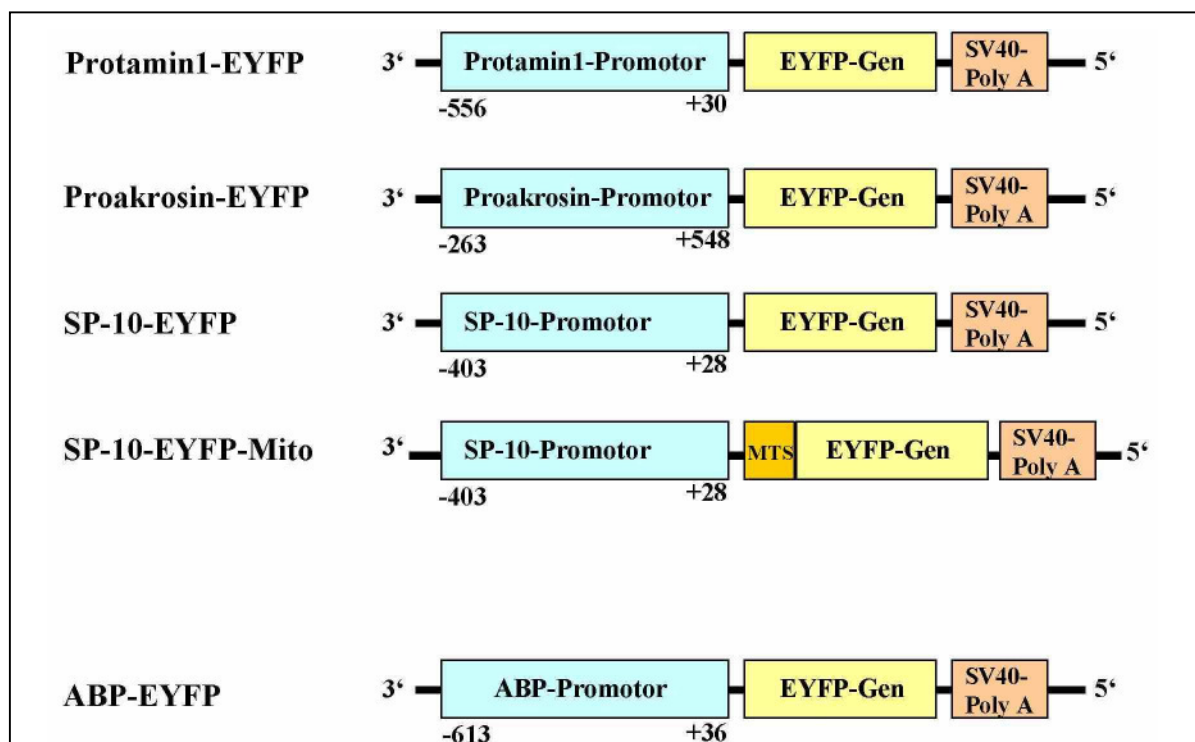


Abbildung 3.30: Schematische Darstellung verschiedener Reporter-Genkonstrukte mit Keimzell-spezifischen Promotoren und Konstrukt mit Sertolizell-spezifischem Promotor (SV40-Poly A: SV40-Polyadenylierungssignal, MTS: *mitochondrial targeting sequence*, ABP: *Androgen binding protein*). Promotorsequenzen: Protamin1 (Peschon *et al.*, 1987), Proakrosin (Nayernia *et al.*, 1992), SP-10 (Reddi *et al.*, 2003), ABP (Fenstermacher und Joseph, 1997).

3.3.2 Analyse der Zelltyp- und Stadien-spezifischen Expression unter der Kontrolle Keimzell-spezifischer Promotoren

Die verschiedenen Promotor-Reporterkonstrukte wurden in die Hodenkanälchen transfiziert und der Transfektionserfolg durch erste mikroskopische Analysen am Fluoreszenzmikroskop überprüft. Die Expression des EYFP-Reporterproteins ist nach 24 h oder 48 h anhand der Mikroskopbilder dokumentiert (Abbildung 3.31).

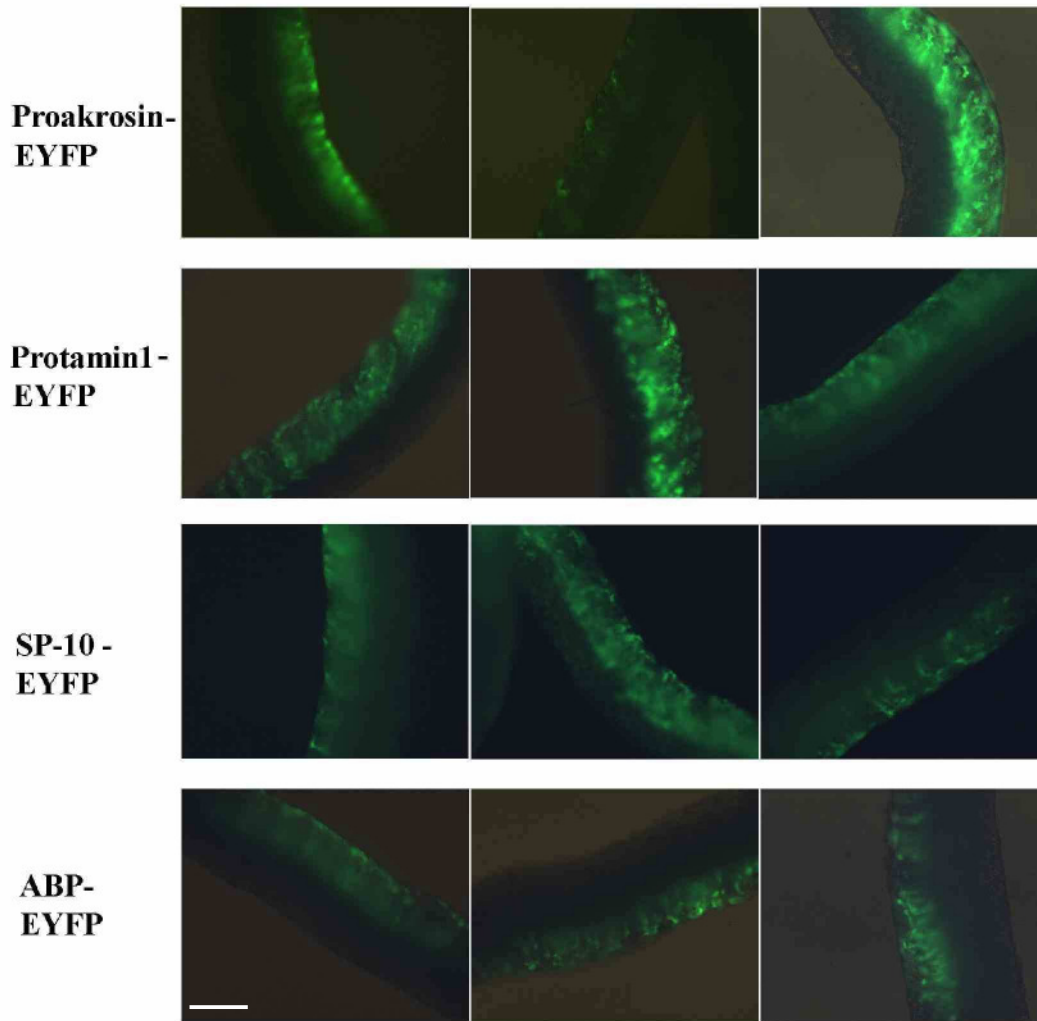


Abbildung 3.31: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der EYFP-Expression von Keimzell- und Sertolizell-spezifischen Promotorkonstrukten. Je drei exemplarische Ergebnisse pro Konstruktion sind gezeigt. Maßstabsmarke ~ 100 μ m

Jedes der klonierten Promotorkonstrukte zeigte eine EYFP-Expression in den transfizierten Hodenkanälchen. Die verwendeten Promotoren sind also grundsätzlich in der Lage, eine Expression des EYFP-Reporterproteins in die Zellen des Keimepithels der Tubuli zu lenken. Im Falle des ABP-Konstruktes erkennt man ein charakteristisches Muster aus langgestreckten Zellen mit einer verstärkten Fluoreszenzakkumulation an der Basis, das auf eine korrekte Expression des Konstruktes in Sertolizellen schließen lässt.

Es fällt allerdings auf, dass das Fluoreszenzmuster der Tubuli teilweise nicht mit der erwarteten Expression in bestimmten Zelltypen und -stadien übereinstimmt. Die Expression des SP-10-EYFP-Konstruktes sollte eigentlich in runden Keimzellen erfolgen (Spermatidenstadien 1–6), das Muster der EYFP-Expression gleicht aber eher dem des Sertolizell-spezifischen ABP-Konstruktes. Für die anderen Konstrukte ließ sich anhand der Tubuli eine

spezifische Expression in bestimmten Zellstadien und Zelltypen nicht genau analysieren. Deshalb wurden von den transfizierten Tubuli Kryoschnitte angefertigt, um die fluoreszierenden Zellen genauer ansprechen zu können. Für eine leichtere Identifikation der haploiden Spermatiden wurden die Akrosomen mit PNA angefärbt. Eine Markierung der Kerne erfolgte mittels DAPI-Gegenfärbung (Abbildungen 3.32–3.34).

3.3.2.1 Proakrosin-Promotor

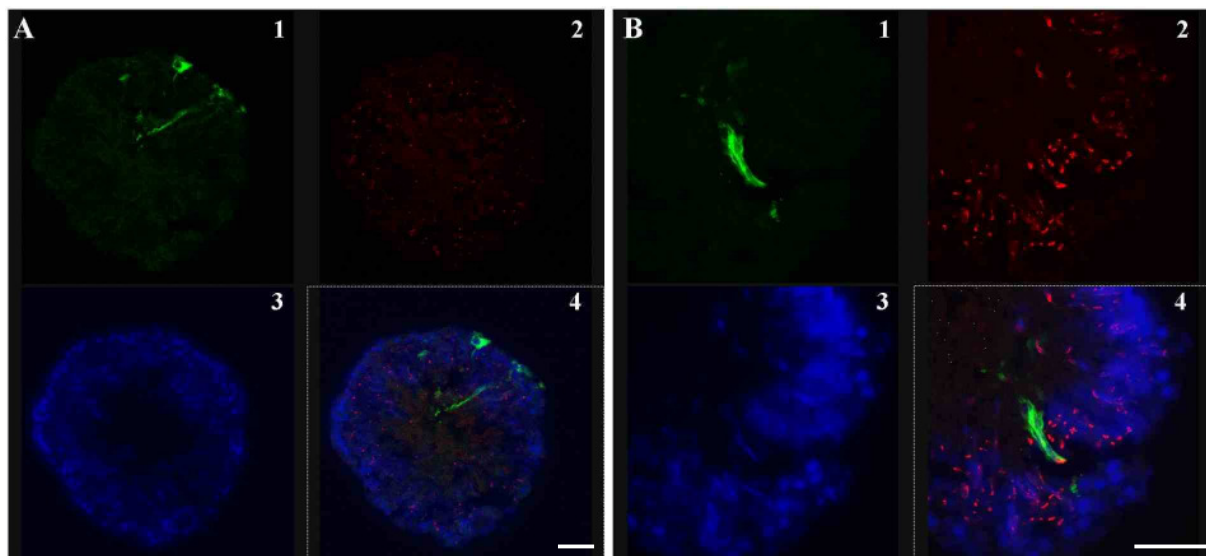


Abbildung 3.32: Analyse der EYFP-Expression in Kryoschnitten (16 μm) isolierter Tubuli seminiferi nach Transfektion mit dem Promotor-Reporterkonstrukt Proakrosin-EYFP. Akrosomenmarkierung durch PNA und Kernmarkierung mittels DAPI-Färbung (1: EYFP-Fluoreszenz des Reporterproteins, 2: Akrosomenmarkierung durch PNA-Färbung, 3: DAPI-Kernfärbung, 4: „Overlay“ aus 1, 2 und 3). Maßstabsmarke ~ 50 μm .

Erwartet wurde eine Expression des Reporterproteins in Spermatozyten und Spermatiden (Nayernia *et al.*, 1992). Die Kryoschnitte bestätigen, dass nach Transfektion des Proakrosin-EYFP-Konstruktes in isolierte Tubuli seminiferi eine Aktivierung des Reportergens über den Keimzell-spezifischen Proakrosin-Promotor erfolgt. Die Untersuchung der EYFP-exprimierenden Zelltypen mittels Kryoschnitt-Technik zeigt allerdings eine EYFP-Expression sowohl in Keimzellen als auch in Sertolizellen. In Abbildung 3.32 A ist die EYFP-Fluoreszenz in einer langgestreckten Sertolizelle dargestellt. Deutlich ist die EYFP-Akkumulation im basalen Teil, der auf der Basalmembran fußenden Zelle, zu erkennen. Eine Expression des Reporterproteins in Keimzellen kann aber auch nachgewiesen werden. Abbildung 3.32 B zeigt eine Assoziation von mehreren transfizierten elongierten Spermatiden. Ihre elongierten Kerne sind mit DAPI und die Akrosomen mit PNA angefärbt.

3.3.2.2 Protamin1-Promotor

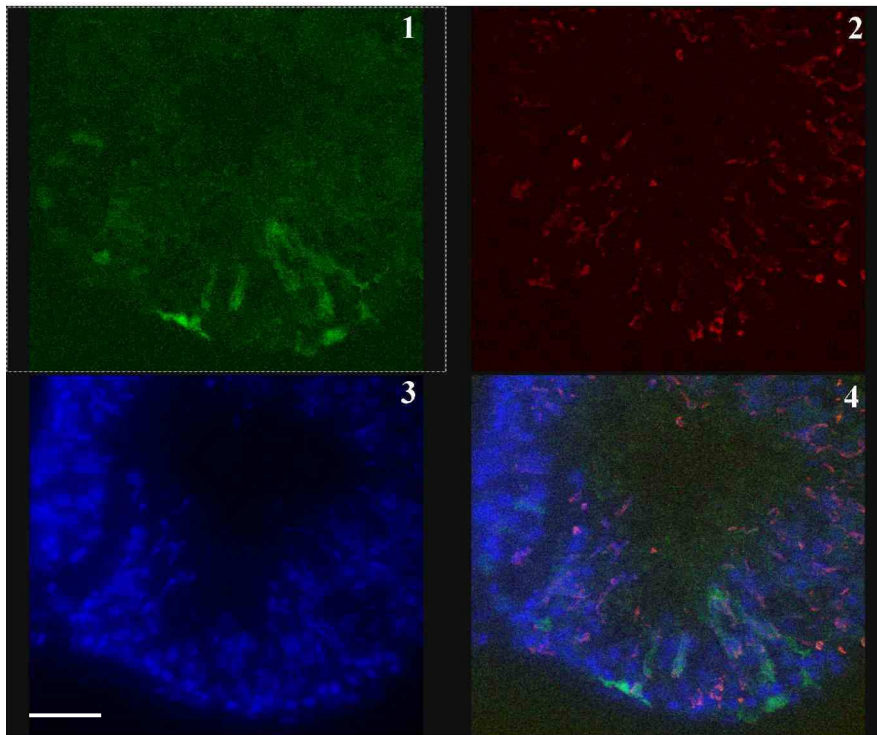


Abbildung 3.33: Analyse der EYFP-Expression in Kryoschnitten (16 µm) isolierter Tubuli seminiferi nach Transfektion mit dem Promotor-Reporterkonstrukt Protamin1-EYFP. Akrosomenmarkierung durch PNA und Kernmarkierung mittels DAPI-Färbung (1: EYFP-Fluoreszenz des Reporterproteins, 2: Akrosomenmarkierung durch PNA-Färbung, 3: DAPI-Kernfärbung, 4: „Overlay“ aus 1, 2 und 3). Maßstabsmarke ~ 50 µm.

Für das Protamin1-Promotorkonstrukt wurde eine Reporterproteinexpression in Spermatiden erwartet (Peschon *et al.*, 1987). In den Kryoschnitten transfizierter Hodenkanälchen zeigte sich eine eher schwache Fluoreszenz in den Zellen des Keimepithels. Eine geringe Aktivierung des Reportergens ist also über den Keimzell-spezifischen Protamin1-Promotor möglich. Abbildung 3.33 zeigt mehrere Gruppen assoziierter Keimzellen, die das fluoreszierende EYFP-Protein exprimieren und die sich anhand ihrer Akrosomenmarkierung und Kernfärbung als elongierende Spermatiden identifizieren lassen. Zusätzlich zeigt sich auch auf diesem Kryoschnitt eine basale EYFP-Fluoreszenz, so dass wahrscheinlich auch hier wieder Sertolizellen eine Reporterproteinexpression zeigen.

3.3.2.3 SP-10-Promotor

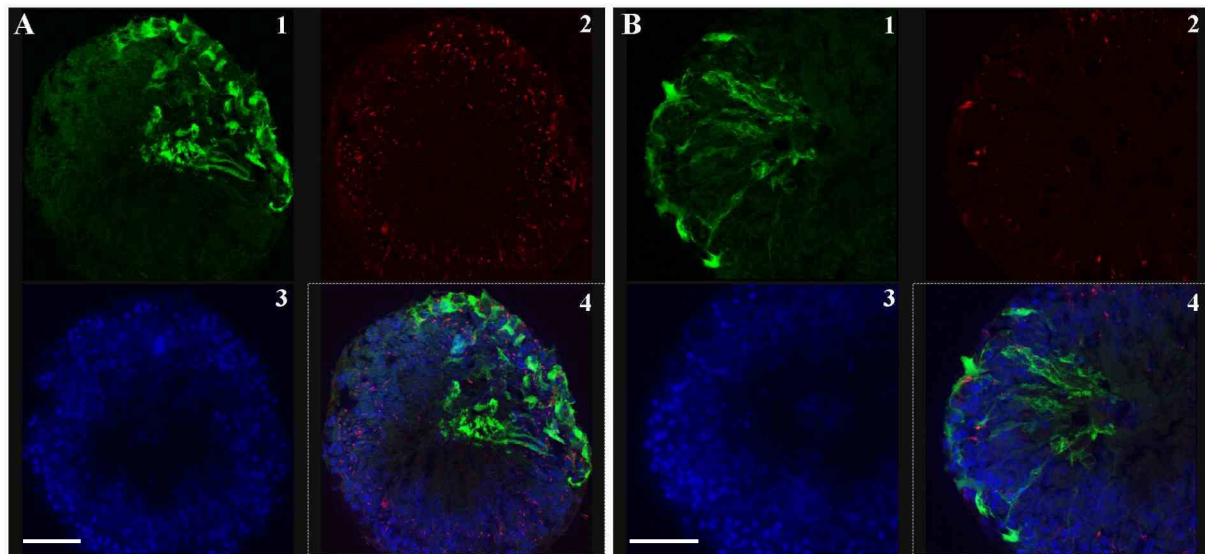


Abbildung 3.34: Analyse der EYFP-Expression in Kryoschnitten (18 µm) isolierter Tubuli seminiferi nach Transfektion mit dem Promotor-Reporterkonstrukt SP-10-EYFP. Akrosomenmarkierung durch PNA und Kernmarkierung mittels DAPI-Färbung (1: EYFP-Fluoreszenz des Reporterproteins, 2: Akrosomenmarkierung durch PNA-Färbung, 3: DAPI-Kernfärbung, 4: „Overlay“ aus 1, 2 und 3). Maßstabsmarke ~ 50 µm.

Erwartet wurde in diesem Fall eine Expression des Reporterproteins in runden Spermatozyten (Reddi *et al.*, 1999). Im Keimepithel der mit SP-10-EYFP transfizierten Hodenkanälchen konnte anhand der Kryoschnitte eine starke Expression des Reporterproteins beobachtet werden. Der Keimzell-spezifische SP-10-Promotor kann also eine Aktivierung der Reporterexpression bewirken. Hauptsächlich lassen sich auf den Kryoschnitten jedoch fluoreszierende Sertolizellen erkennen, die sich mit ihren langgestreckten Zellkörpern von der Tubulus-Basis bis ins Lumen erstrecken (Abbildung 3.34 B). Auf Abbildung 3.34 A lassen sich aber auch EYFP-exprimierende runde Zellen detektieren, bei denen es sich um Keimzellen handeln könnte.

In der Literatur wurde vereinzelt über eine mögliche Toxizität der fluoreszierenden GFP-Varianten in Keimzellen berichtet (Huang *et al.*, 2000). In diesen Arbeiten wurde deshalb ein EYFP-Konstrukt mit einem Lokalisationssignal für Mitochondrien verwendet. Analog dazu wurde in dieser Arbeit die Transfektion der Tubuli seminiferi mit einem Mitochondrien-lokalisierenden SP-10-EYFP-Mito-Konstrukt wiederholt. Eine Analyse der EYFP-Expression erfolgte mittels Cytospinpräparaten am konfokalen Lasermikroskop, nachdem die Zellkerne über den DNA-Farbstoff TO-PRO-3 angefärbt worden waren (Abbildung 3.35).

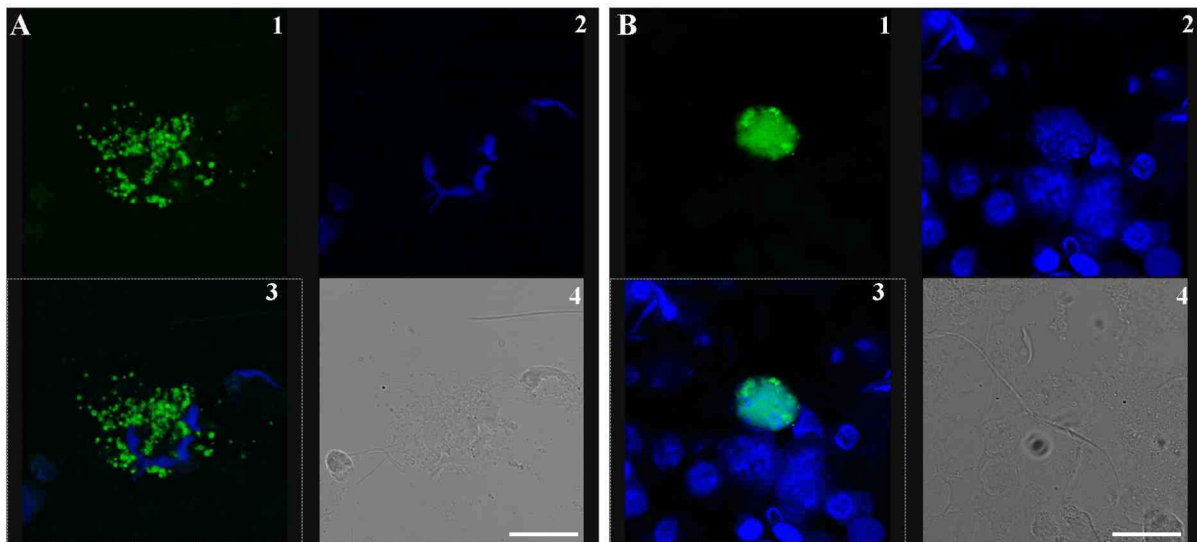


Abbildung 3.35: Analyse der EYFP-Expression in Cytospinpräparaten isolierter Tubuli seminiferi nach Transfektion mit dem Promotor-Reporterkonstrukt SP-10-EYFP-Mito. Mitochondrien-lokalisierte EYFP-Reporterproteinexpression (grün) und Kernfärbung mit TO-PRO-3 (blau) (1: EYFP-Fluoreszenz des Reporterproteins, 2: TO-PRO-3-Kernfärbung, 3: „Overlay“ aus 1 und 2, 4: Hellfeld). Maßstabsmarke ~ 40 µm.

Die mikroskopische Analyse der Cytospinpräparate zeigte eine Expression des EYFP-Promotor-Reporterkonstruktes in den Mitochondrien, was gut an der körnigen Verteilung der EYFP-Fluoreszenz zu erkennen war. Aber auch mit dem neuen Konstrukt ließ sich keine Keimzellspezifität des SP-10-EYFP-Mito-Konstruktes zeigen. Abbildung 3.35 A zeigt eine Gruppe von elongierenden Spermatozoen, um welche Cytoplasma mit EYFP-exprimierenden Mitochondrien verteilt liegt, das wahrscheinlich von einer Sertolizelle stammt. In Abbildung 3.35 B ist eine runde fluoreszierende Zelle mit fragmentiertem Zellkern zu sehen. Die Auflösung des Zellkerns deutet auf einen apoptotischen Vorgang hin, der durchaus eine runde Keimzelle betreffen könnte.

Grundsätzlich konnte für alle Promotor-Reporterkonstrukte mit Keimzell-spezifischen Promotoren eine EYFP-Reporterproteinexpression im Keimepithel der transfizierten Tubuli seminiferi gezeigt werden. Die unerwartete Expression des EYFP in Sertolizellen sollte zunächst weiterhin untersucht werden. Vermutet wurde eine Hintergrundaktivität der Promotorkonstrukte in den somatischen Sertolizellen. Um eine Hintergrundaktivität der Promotorkonstrukte in somatischen Zellen zu untersuchen, wurde eine SK11-Zelllinie transfiziert und die Expression der Reporterkonstrukte mit den verschiedenen Promotoren in den SK11-Zellen analysiert.

3.3.3 Analyse der Expression von EYFP-Promotorkonstrukten in der SK11-Zelllinie

Die Keimzellspezifität der verschiedenen klonierten Promotorkonstrukte sollte über eine Analyse der Expression in einer somatischen Maus-Zelllinie erfolgen. Dafür wurden die Konstrukte mit ihren Keimzell-spezifischen Promotoren über Lipofektion in die SK11-Zelllinie (Walther *et al.*, 1996) eingebracht und eine mögliche Hintergrundexpression des EYFP-Reporterproteins analysiert. Als Positiv-Kontrolle wurde das Sertolizell-spezifische Konstrukt mit dem ABP-Promotor eingesetzt. Die Dokumentation der EYFP-Fluoreszenz in den SK11-Zellen erfolgte am konfokalen Lasermikroskop über Anregung mit dem 488 nm-Laser (Abbildung 3.36).

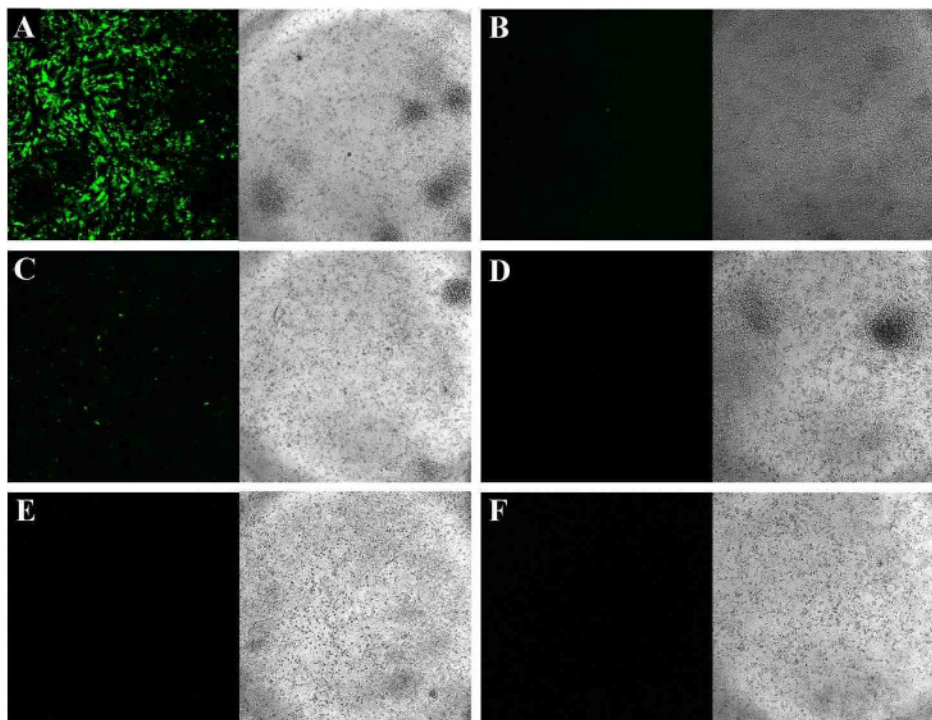


Abbildung 3.36: Analyse der EYFP-Expression von Keimzell- und Sertolizell-spezifischen Promotorkonstrukten in SK11-Zelllinie (A: Positiv-Kontrolle EYFP-N1, B: Negativ-Kontrolle EYFP ohne Promotor, C: Proakrosin-EYFP, D: Protamin1-EYFP, E: SP-10-EYFP, F: ABP-EYFP)

Die positive Transfektionskontrolle mit dem konstitutiv exprimierten EYFP-N1-Vektor zeigte, dass nach Transfektion eine starke Expression des EYFP-Reporterproteins zu beobachten ist. Die Negativ-Kontrolle mit dem promotorlosen EYFP-Konstrukt zeigte, wie erwartet, so gut wie keine EYFP-exprimierenden Zellen. Das EYFP-Konstrukt mit dem Proakrosin-Promotor zeigte allerdings in der somatischen Zelllinie eine gut sichtbare

Hintergrundaktivität. Anscheinend wird in einigen somatischen Zelltypen das eigentlich als Keimzell-spezifisch beschriebene Konstrukt aktiviert. Diese Hintergrundaktivität kann somit auch in den Sertolizellen zu einer Expression des Reporters führen. Die Protamin- und SP-10-Promotorkonstrukte zeigten dagegen, wie erwartet, keine Expression in den SK11-Zellen, was ihre Keimzellspezifität bestätigt. Die Positiv-Kontrolle mit dem ABP-EYFP-Konstrukt zeigte überraschenderweise auch überhaupt keine EYFP-Expression in SK11 und scheint deshalb als Kontrolle für eine Sertolizell-spezifische Expression nicht geeignet zu sein. Um auszuschließen, dass es sich um ein Transfektionsproblem der Maus-Zelllinie handelt, wurde das Experiment mit isolierten primären Ratten-Sertolizellen wiederholt. Dieser Versuch brachte aber die gleichen Ergebnisse hervor (Ergebnisse nicht dokumentiert).

3.4 Analyse der Expression von ELP-Promotorkonstrukten

Eine Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die genaue Charakterisierung des Promotorbereichs des ELP-Gens. Nachdem ein Transfektionssystem etabliert worden war, indem die Expression der Keimzell-spezifischen Kontrollkonstrukte in Keimzellen möglich ist, sollten ELP-Promotorkonstrukte kloniert und in die kultivierten Hodenkanälchen eingebracht werden. Zunächst wurde dabei der Promotorbereich untersucht, der schon in den *Electrophoretic mobility shift assays* (EMSA) analysiert worden war (Valentin *et al.*, 2000). Im Verlauf der Experimente ergab sich allerdings die Notwendigkeit, größere Sequenzbereiche des ELP-Promotors in die Analysen mit einzubeziehen. Die qualitativen Untersuchungen zur Zell- und Stadienspezifität der Expression wurden anhand von Kryoschnitten und Cytospinpräparaten durchgeführt. Zusätzlich fand eine quantitative Bestimmung von Expressionsunterschieden einiger Promotor-Luziferase-Konstrukte statt.

3.4.1 Klonierung von ELP-Promotor-Deletionskonstrukten

Für eine umfassende Analyse des Promotorbereichs des ELP-Gens wurden zunächst verschiedene Reporter-genkonstrukte kloniert. Die Promotorsequenzen wurden aus genomischer Ratten-DNA amplifiziert und sowohl in EYFP-Vektoren als auch in Luziferase-Vektoren kloniert. Dabei wurde zuerst ein Promotorbereich von 700 bp untersucht, der schon mit Hilfe von EMSA-Analysen charakterisiert worden war (Valentin *et al.*, 2000). Die Ergebnisse dieser Experimente machten eine Analyse eines größeren Sequenzbereichs nötig. So wurde zusätzlich ein 1500 bp langes Promotorkonstrukt kloniert, das auch das Intron hinter dem Transkriptionsstart beinhaltet. Für eine gezielte Eingrenzung der für eine Zelltyp- und Stadien-spezifische Expression nötigen Sequenzen wurde das längste Promotorkonstrukt sowohl von der 3'- als auch von der 5'-Seite her verkürzt (1000ELP-EYFP und 1270ELP-EYFP). Das besonders interessante 1270ELP-EYFP-Konstrukt wurde zusätzlich in den EYFP-Mito-Vektor kloniert, um eine mitochondriale Expression des Konstruktes zu untersuchen.

Eine weitere Analyse der Konstrukte fand nach Klonierung in den Luziferase-Vektor (pGL3) statt, wodurch ein quantitativer Vergleich der Reporterexpression ermöglicht werden sollte. Hierbei wurde besonders auf Auswirkungen der An- und Abwesenheit einer putativen Bindungsstelle für den *Germ cell nuclear factor* (GCNF) geachtet. Der Aufbau des Promotorbereichs des ELP-Gens und die klonierten Promotor-Reporterkonstrukte sind in Abbildung 3.37 schematisch dargestellt.

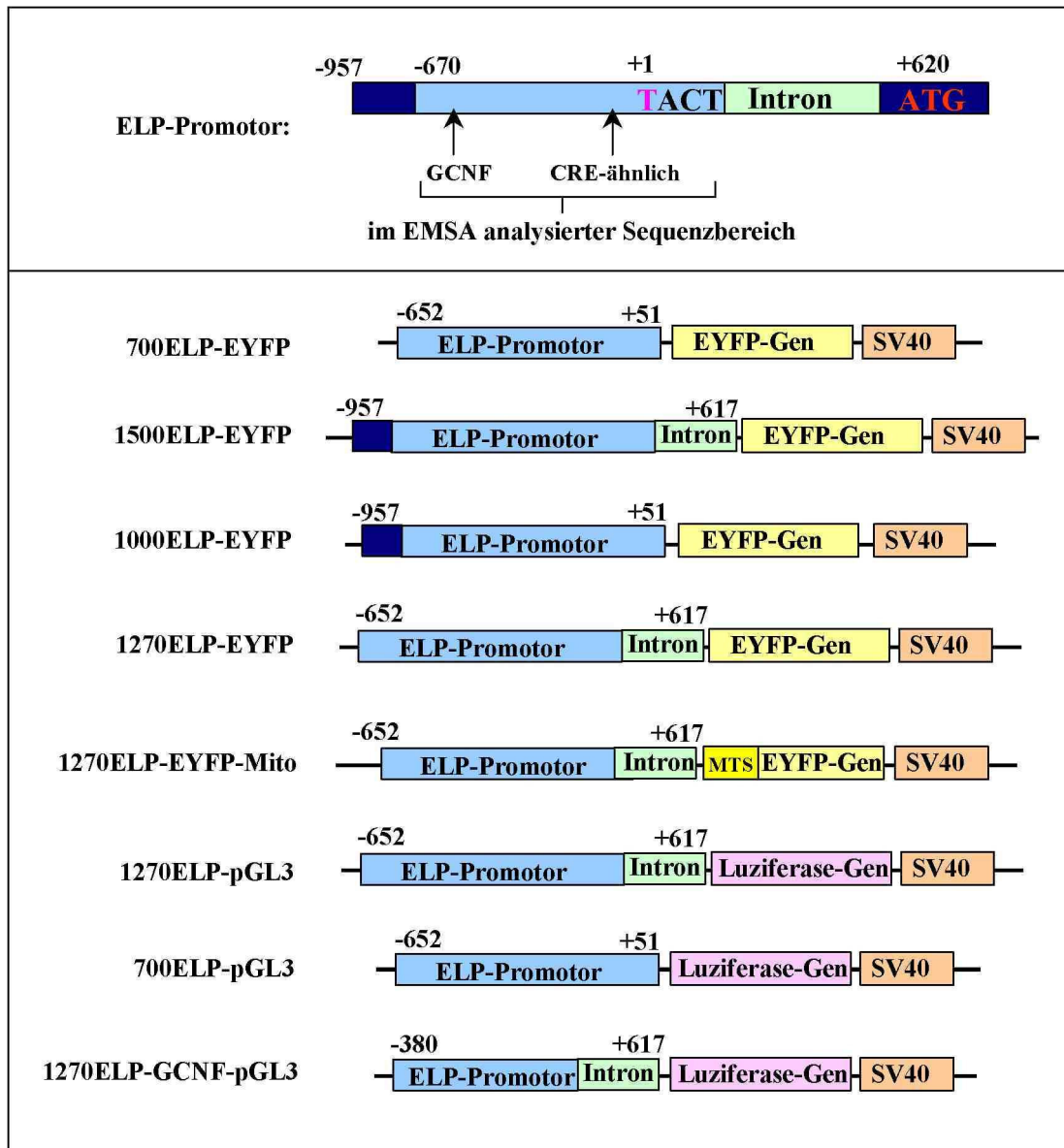


Abbildung 3.37: Schematische Darstellung des ELP-Promotorbereichs mit putativen Transkriptionsfaktorbindungsstellen und der verschiedenen klonierten Promotor-Reporter-konstrukte (GCNF: *Germ cell nuclear factor*, CRE: *cAMP responsive element*, TACT: Transkriptionsstart, ATG: Translationsstart, MTS: *mitochondrial targeting sequence*)

3.4.2 Analyse der Expression von ELP-Promotor-Deletionskonstrukten nach Transfektion in isolierte Hodenkanälchen

Die isolierten Tubuli seminiferi wurden zunächst wie beschrieben mit den verschiedenen ELP-EYFP-Promotorkonstrukten transfiziert. Eine erste Überprüfung des Transfektionserfolges fand anhand mikroskopischer Beobachtungen intakter Hodenkanälchen am Fluoreszenzmikroskop statt (Abbildung 3.38).

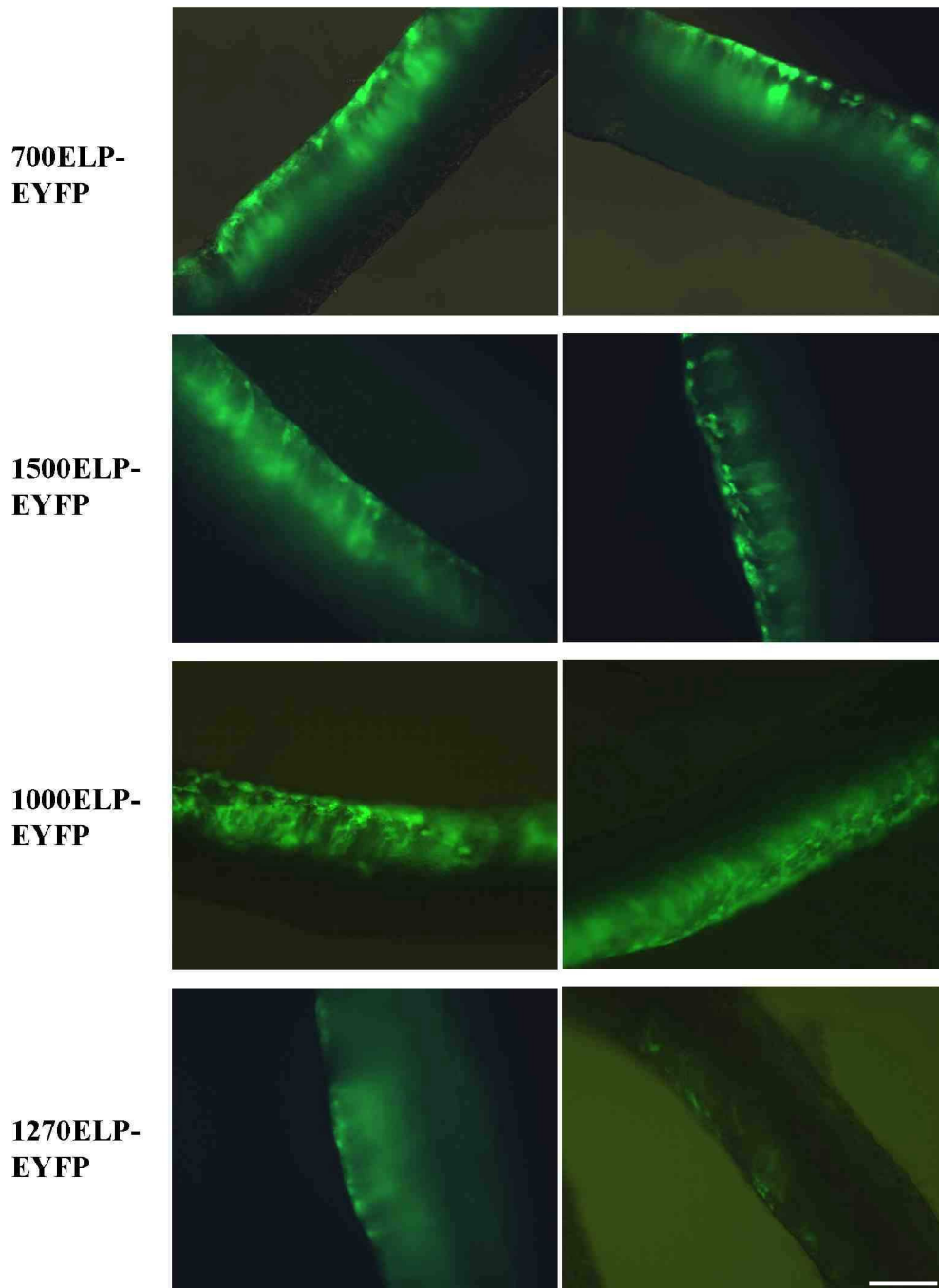


Abbildung 3.38: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der EYFP-Expression verschiedener ELP-Promotorkonstrukte in transfizierten Tubuli seminiferi der Ratte. Je zwei exemplarische Ergebnisse pro Konstrukt sind gezeigt. Maßstabsmarke ~ 100 μ m

Die mikroskopischen Beobachtungen intakter, transfizierter Tubuli seminiferi zeigten, dass alle EYFP-Reporterkonstrukte mit den verschiedenen Sequenzabschnitten des ELP-Promotors im Keimepithel des Hodenkanälchens exprimiert werden können. Beim Vergleich der Transfektionseffizienz und der Fluoreszenzintensität wurde allerdings deutlich, dass die beiden ELP-Konstrukte ohne den Intronbereich, 700ELP-EYFP und 1000ELP-EYFP, eine wesentlich stärkere EYFP-Fluoreszenz und insgesamt eine bessere Transfektionsrate zeigten. Eine Identifizierung der transfizierten und EYFP-exprimierenden Zelltypen lässt sich anhand des Fluoreszenzmusters nur schwer durchführen. Die regelmäßige Verteilung langgestreckter Zellen mit stark fluoreszierender Basis ließen allerdings wieder eine Reporterproteinexpression in Sertolizellen vermuten.

Die Expression der ELP-Promotorkonstrukte wurde deshalb genauer anhand von PNA- und DAPI-gefärbten Kryoschnitten untersucht (Abbildungen 3.39–3.42).

700ELP-EYFP-Konstrukt

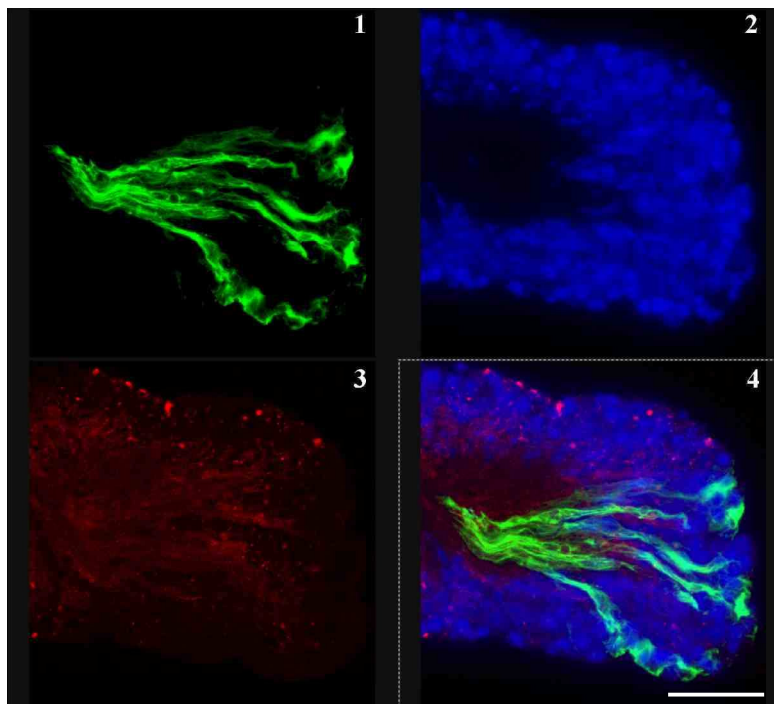


Abbildung 3.39: Analyse der EYFP-Expression in Kryoschnitten (16 µm) isolierter Tubuli seminiferi nach Transfektion mit dem Promotor-Reporterkonstrukt 700ELP-EYFP. Akrosomenmarkierung durch PNA-Färbung und Kernmarkierung mit DAPI (1: EYFP-Fluoreszenz des Reporterproteins, 2: Akrosomenmarkierung durch PNA-Färbung, 3: DAPI-Kernfärbung, 4: „Overlay“ aus 1, 2 und 3). Maßstabsmarke ~ 50 µm.

Eine Transfektion der Hodenkanälchen mit dem 700ELP-EYFP-Konstrukt führte zu einer starken Expression des EYFP-Reporterproteins in den Sertolizellen des Keimepithels. Die Kryoschnitte zeigen mehrere langgestreckte, fluoreszierende Sertolizellen, die mit ihren Cytoplasmafortsätzen bis weit ins Lumen des Hodenkanälchens hineinreichen. Eine enge Assoziierung mit den Keimzellen wird deutlich, wobei die angefärbten Zellkerne der Spermatozyten fast innerhalb der Sertolizellen zu liegen scheinen. Auch die sichtbare Anreicherung von Vesikeln im Cytoplasma der Zellen lassen eine eindeutige Identifizierung der EYFP-exprimierenden Zellen als Sertolizellen zu. Eine Keimzell-spezifische Expression des 700ELP-EYFP-Konstruktes konnte dagegen nicht gezeigt werden.

1500ELP-EYFP-Konstrukt

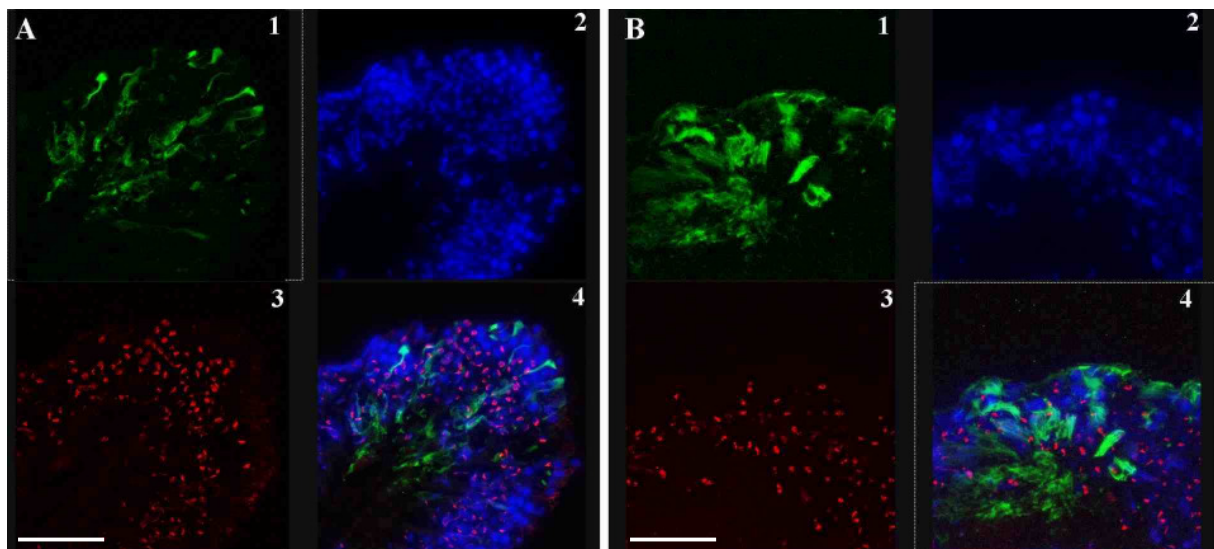


Abbildung 3.40: Analyse der EYFP-Expression in Kryoschnitten (14 µm) isolierter Tubuli seminiferi nach Transfektion mit dem Promotor-Reporterkonstrukt 1500ELP-EYFP. Akrosomenmarkierung durch PNA-Färbung und Kernmarkierung mit DAPI (1: EYFP-Fluoreszenz des Reporterproteins, 2: DAPI-Kernfärbung, 3: Akrosomenmarkierung durch PNA-Färbung, 4: „Overlay“ aus 1, 2 und 3). Maßstabsmarke ~ 50 µm.

Die Charakterisierung der EYFP-exprimierenden Zelltypen blieb auch mittels Kryoschnitt-Technik ungenau. Abbildung 3.40 A zeigt wiederum langgestreckte Zellen mit vielen Vesikeln im Cytoplasma, so dass es sich wiederum um eine Reporterproteinexpression in Sertolizellen handeln kann. In Abbildung 3.40 B lassen sich auch einige fluoreszierende Zellaggregate finden, bei denen es sich um elongierende Keimzellen handelt. Der 1500 bp-Abschnitt des ELP-Promotors ist somit in der Lage, eine Aktivierung der Reporterexpression zu ermöglichen und eine Expression des EYFP in Keimzellen zu bewirken.

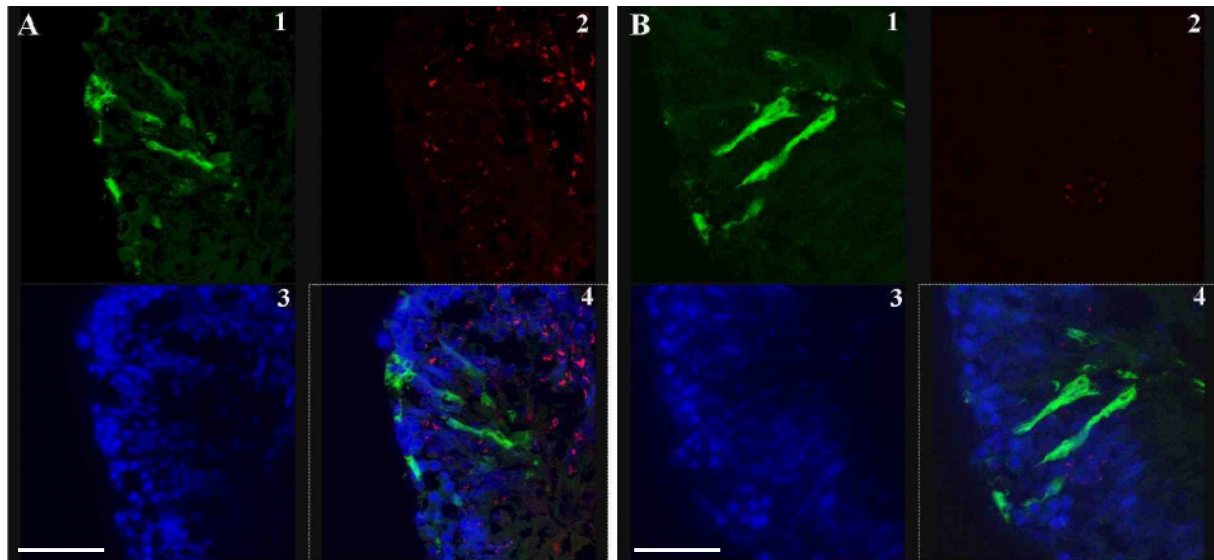
1000ELP-EYFP-Konstrukt

Abbildung 3.41: Analyse der EYFP-Expression in Kryoschnitten (12 μm) isolierter Tubuli seminiferi nach Transfektion mit dem Promotor-Reporterkonstrukt 1000ELP-EYFP. Akrosomenmarkierung durch PNA-Färbung und Kernmarkierung mit DAPI (1: EYFP-Fluoreszenz des Reporterproteins, 2: Akrosomenmarkierung durch PNA-Färbung, 3: DAPI-Kernfärbung, 4: „Overlay“ aus 1, 2 und 3). Maßstabsmarke ~ 50 μm .

Eine Analyse der mit 1000ELP-EYFP transfizierten Hodenkanälchen mittels Kryoschnitt-Technik zeigt deutlich eine Expression des Reporterproteins in Sertolizellen. In Abbildung 3.41 A ist deutlich der fluoreszierende basale Bereich der Sertolizellen samt gelapptem Zellkern zu erkennen. Abbildung 3.41 B zeigt die EYFP-Expression in langgestreckten Zellen, bei denen es sich um Zellaggregate elongierter Spermatozoen handeln könnte. Eine eindeutige Reporterexpression in Keimzellen konnte mit diesem Konstrukt hier aber nicht gezeigt werden.

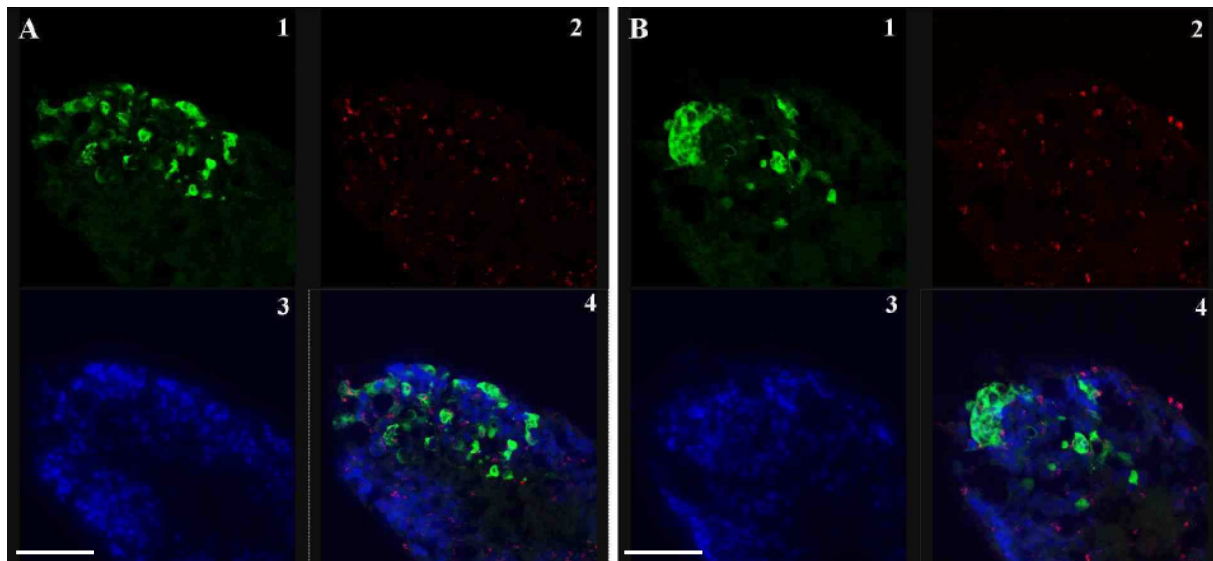
1270ELP-EYFP-Konstrukt

Abbildung 3.42: Analyse der EYFP-Expression in Kryoschnitten (16 µm) isolierter Tubuli seminiferi nach Transfektion mit dem Promotor-Reporterkonstrukt 1270ELP-EYFP. Akrosomenmarkierung durch PNA-Färbung und Kernmarkierung mit DAPI (1: EYFP-Fluoreszenz des Reporterproteins, 2: Akrosomenmarkierung durch PNA-Färbung, 3: DAPI-Kernfärbung, 4: „Overlay“ aus 1, 2 und 3). Maßstabsmarke ~ 50 µm.

Nach Transfektion mit dem 1270ELP-Promotorkonstrukt war die EYFP-Reporterproteinexpression in runden Zellen lokalisiert, bei denen es sich vermutlich um runde Spermatozoen handelt. Bei einigen grünfluoreszierenden Zellen ist das PNA-markierte Akrosom und der Zellkern zu erkennen (Abbildung 3.42 A). Auch hier sind allerdings einige der EYFP-exprimierenden Zellen an der Basis des Keimepithels lokalisiert, was wiederum auf eine Expression in Sertolizellen hindeutet. Abbildung 3.42 B zeigt eine sehr eigentümliche EYFP-exprimierende Zelle. Es könnte sich aufgrund der basalen Lokalisation um eine Sertolizelle handeln, obwohl die Zelle insgesamt sehr groß ist. Das Auftreten grünfluoreszierender kernloser Vesikel deutet auf apoptotische Vorgänge im Keimepithel hin.

Eine mögliche Cytotoxizität des EYFPs sollte durch Verwendung eines Vektors mit Mitochondrien-Lokalisierungssignal umgangen werden. Nach Transfektion des EYFP-Mito-Vektors ist die Reporterproteinexpression im Zellorganell statt im Cytoplasma lokalisiert. Die Expression des 1270ELP-EYFP-Mito-Konstruktes in transfizierten Tubuli seminiferi wurde am konfokalen Lasermikroskop über Cytospinpräparate überprüft (Abbildung 3.43).

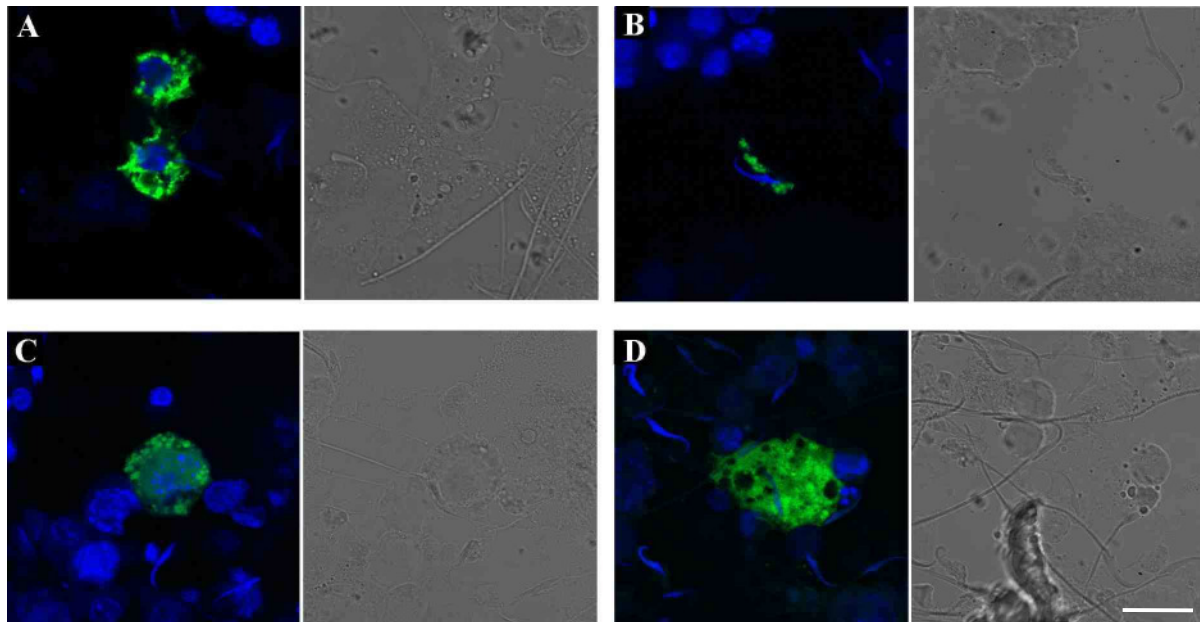


Abbildung 3.43: Analyse der EYFP-Expression in Cytospinpräparaten isolierter Tubuli seminiferi nach Transfektion mit dem Promotor-Reporterkonstrukt 1270ELP-EYFP-Mito. EYFP-Reporterproteinexpression (grün) und Kernfärbung mit TO-PRO-3 (blau). Maßstabmarke ~ 40 µm.

Abbildung 3.43 zeigt die Mitochondrien-lokalisierte Expression des 1270ELP-EYFP-Mito-Konstruktes in verschiedenen Zelltypen. Abbildung 3.43 A zeigt zwei grünfluoreszierende Zellen mit rundem Zellkern und somit die erfolgreiche Reporterproteinexpression in runden Keimzellen. Dass durch den 1270ELP-Promotor auch eine EYFP-Expression in elongierten Spermatischen aktiviert werden kann, belegt Abbildung 3.43 B. Es ließen sich auf den Cytospinpräparaten aber auch immer wieder apoptotische Zellen mit fragmentiertem Zellkern finden (siehe Abbildung 3.43 C). Abbildung 3.43 D zeigt eine EYFP-exprimierende Sertolizelle, die anhand ihrer engen Assoziation mit den Keimzellen und ihres vesikelreichen Cytoplasmas identifiziert werden kann. Die EYFP-Fluoreszenz scheint allerdings im gesamten Cytoplasma gleichmäßig verteilt zu sein und ist wohl nicht in den Mitochondrien lokalisiert.

Die starke Expression der 700ELP- und 1000ELP-Promotorkonstrukte in Sertolizellen wurde im weiteren genauer überprüft. Die verschiedenen Konstrukte wurden dazu in die Maus-Zelllinie SK11 transfiziert, um ihre Keimzellspezifität zu überprüfen und eine basale Expression der Promotorkonstrukte in somatischen Zellen zu analysieren (Abbildung 3.44).

3.4.3 Analyse der Expression der ELP-EYFP-Promotorkonstrukte in der SK11-Zelllinie

Die verschiedenen ELP-Promotorkonstrukte wurden durch Lipofektion in die kultivierte SK11-Zelllinie übertragen. Eine qualitative Analyse der Aktivierung der EYFP-Reportergene wurde am konfokalen Lasermikroskop durchgeführt (Abbildung 3.44).

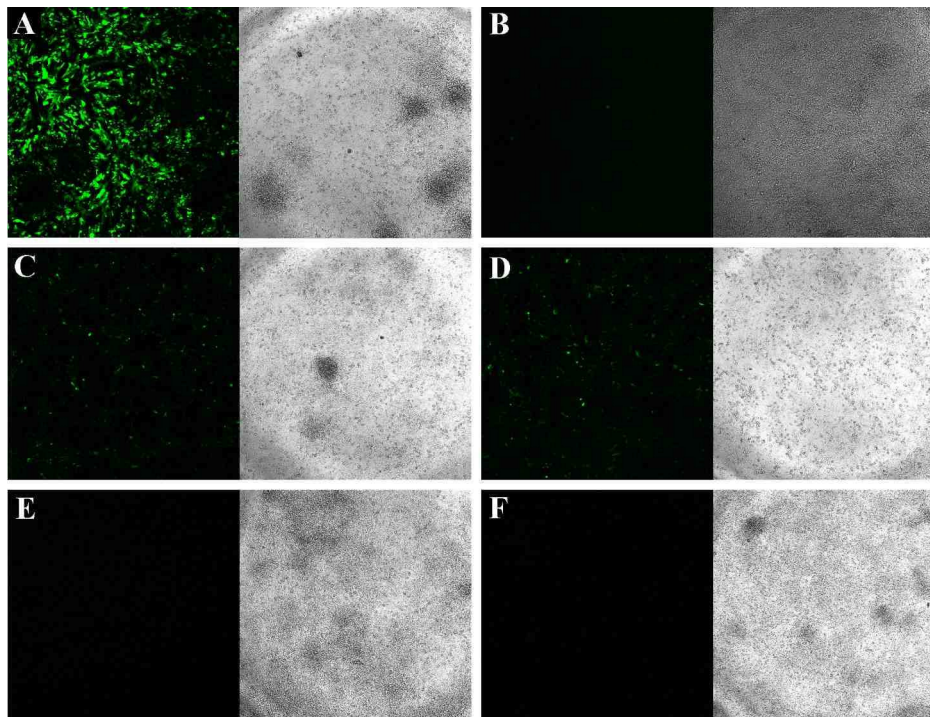


Abbildung 3.44: Analyse der EYFP-Expression der Keimzell-spezifischen ELP-Promotorkonstrukte in SK11-Zelllinie (A: Positiv-Kontrolle EYFP-N1, B: Negativ-Kontrolle EYFP ohne Promotor, C: 700ELP-EYFP, D: 1000ELP-EYFP, E: 1270ELP-EYFP, F: 1500ELP-EYFP)

Die Ergebnisse der Kryoschnitt-Technik hatten schon vorher gezeigt, dass einige der ELP-Konstrukte eine Expression in Sertolizellen bewirken können, also nicht Keimzell-spezifisch sind. Diese Ergebnisse wurden durch die Transfektionsexperimente mittels SK11-Zelllinie bestätigt. Abbildungen 3.44 A und 3.44 B zeigen die Positiv- und Negativ-Kontrolle der EYFP-Expression nach Transfektion der EYFP-Vektoren mit konstitutivem Promotor und ohne Promotor. In Abbildungen 3.44 C und 3.44 D wird deutlich, dass eine EYFP-Expression des 700ELP- und 1000ELP-Konstruktes in den somatischen Zellen möglich ist. Die beiden anderen Konstrukte, 1500ELP-EYFP und 1270ELP-EYFP, zeigten keine Aktivierung des Reportergens in der SK11-Zelllinie. Für diese beiden Konstrukte konnte hier keine basale Hintergrundaktivität in somatischen Zellen gezeigt werden, was für ihre Keimzellspezifität spricht. Die 1500ELP-EYFP- und 1270ELP-EYFP-Konstrukte unterscheiden sich von den

beiden unspezifischen ELP-Konstrukten (700ELP-EYFP und 1000ELP-EYFP) durch die zusätzliche Anwesenheit der Intron-Sequenz (siehe Abbildungen 1.11 und 3.37). Dies spricht für eine wichtige Rolle des Introns für die Zellspezifität des ELP-Promotors. Diese Ergebnisse wurden anschließend in einem quantitativen Luziferase-Assay überprüft.

3.4.4 Quantitative Analyse der Expression der ELP-pGL3-Konstrukte in SK11-Zelllinie mittels Luziferase-Assay

Die oben beschriebenen interessanten Ergebnisse zur Zellspezifität der unterschiedlichen ELP-Promotorkonstrukte wurden mittels ELP-Promotor-Luziferase-Konstrukten nach Transfektion in die SK11-Zelllinie bestätigt. Zusätzlich sollte eine Quantifizierung der Expression im Vergleich zu einem konstitutiv exprimierten Luziferase-Konstrukt durchgeführt werden. Auch zwei schon zuvor analysierte Promotoren, der SP-10- und der Proakrosin-Promotor, wurden zum Vergleich in den pGL3-Vektor kloniert, um die Luziferase-Expression in der Zelllinie zu untersuchen. Bei der Klonierung der Luziferase-Konstrukte habe ich mich auf das unspezifische 700ELP-Konstrukt und das spezifische 1270ELP-Konstrukt beschränkt. Zusätzlich wurde ein Luziferase-Konstrukt hergestellt, das eine verkürzte Form des 1270ELP-Konstruktes darstellte, indem die putative Bindungsstelle für den *Germ cell nuclear factor* eliminiert wurde (1270ELP-GCNF-pGL3). Diese Konstrukte wurden zusammen mit der Positiv- und Negativ-Kontrolle (pGL3-Control und pGL3-Basic) in die SK11-Zelllinie transfiziert und die Aktivität des Reporterenzym Luziferase am Luminometer ermittelt. Die Aktivität des Luziferase-Reporterenzym wurde dabei anhand von Zellextrakten durch Messung der emittierten Lichteinheiten bestimmt. Abbildung 3.45 zeigt die schematische Darstellung der Ergebnisse aus dem Luziferase-Assay.

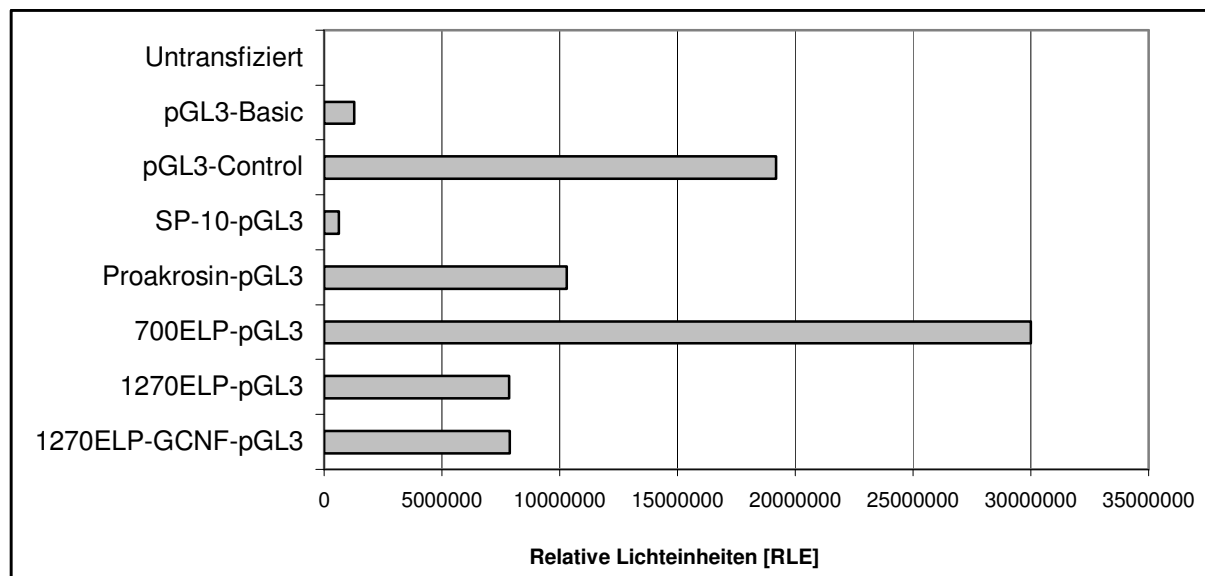


Abbildung 3.45: Quantitative Analyse der Luziferase-Aktivität von Promotor-Luziferase-Konstrukten nach Transfektion in die SK11-Zelllinie. Die Ermittlung der relativen Lichteinheiten erfolgte durch Dreifach-Messungen (Negativ-Kontrolle: Leervektor pGL3-Basic, Positiv-Kontrolle: pGL3-Control)

Die Ergebnisse des Luziferase-Assays bestätigen die vorherigen qualitativen Fluoreszenzanalysen am konfokalen Lasermikroskop. Wie erwartet konnte keine Luziferase-Aktivität in kultivierten, untransfizierten SK11-Zellen gemessen werden. Nach Transfektion mit dem Leervektor pGL3-Basic ergab sich nur eine sehr schwache basale Aktivität des Reporterenzym. Die Transfektion mit der konstitutiv exprimierten Positiv-Kontrolle pGL3-Control führte zu einer starken Reporterenzymaktivität, die einen relativen Wert von fast 20 Millionen Lichteinheiten erreicht. Vergleicht man die beiden Keimzell-spezifischen Promotorkonstrukte SP-10-pGL3 und Proakrosin-pGL3, wird deutlich, dass der SP-10-Promotor keine Aktivierung der Reporterexpression in der SK11-Zelllinie bewirken kann, während das Proakrosin-pGL3-Konstrukt durchaus auch in der Zelllinie exprimiert wird. Die Aktivität des SP-10-pGL3-Konstruktes liegt im Bereich der basalen Hintergrundaktivität des Leervektors, so dass eine Keimzellspezifität dieses Konstruktes vermutet werden kann. Die Messung der Luziferase-Aktivität nach Transfektion des Proakrosin-pGL3-Konstruktes lieferte dagegen deutlich messbare Aktivitäten, die etwa halb so stark waren wie bei der Positiv-Kontrolle. Ein Vergleich der Ergebnisse aus den Transfektionsexperimenten mit den drei ELP-Luziferase-Konstrukten bestätigt die quasi „konstitutive“ Expression des 700ELP-Konstruktes. Dieser 700 bp-Bereich des ELP-Promotors bewirkte eine starke Aktivierung des Reportergens auch in der SK11-Zelllinie. Die gemessenen Aktivitäten übersteigen sogar die ermittelten Aktivitätswerte der Positiv-Kontrolle pGL-Control. Eine Keimzellspezifität des

700ELP-Promotor-Konstruktes erscheint somit ausgeschlossen, wodurch die mittels Kryoschnitt-Technik beobachtete starke Expression des 700ELP-EYFP-Konstruktes in den Sertolizellen erklärt werden könnte. Die beiden ELP-Konstrukte mit dem Intron-Bereich des Promotors, 1270ELP-pGL3 und 1270-GCNF-pGL3, zeigen zwar eine Expression in SK11-Zellen, liegen aber in den ermittelten Luziferase-Aktivitätswerten lediglich im Bereich des Proakrosin-Konstruktes. Sie scheinen nicht strikt Keimzell-spezifisch zu sein, so dass eine gewisse Aktivierung auch in den somatischen Zellen stattfinden kann. Die Deletion der GCNF-Bindestelle des Promotors bewirkte keine Veränderung. Die verschiedenen Promotor-Luziferase-Konstrukte sollten anschließend mittels DNA-Injektion und Elektroporation in isolierte Tubuli seminiferi der Ratte transfiziert werden, um die Expression des Reporterproteins quantitativ anhand der Luziferase-Aktivität zu bestimmen.

3.4.5 Quantitative Analyse der Expression der ELP-Luziferase-Promotorkonstrukte in transfizierten Hodenkanälchen mittels Luziferase-Assay

Nachdem eine Analyse der ELP-Promotorkonstrukte in isolierten Tubuli seminiferi bisher fluoreszenzmikroskopisch nach Transfektion von EYFP-Reporterkonstrukten durchgeführt wurde, sollten nun die Expressionsunterschiede per Luziferase-Assay quantitativ ermittelt werden. Dazu wurde die Luziferase-Aktivität in Zellextrakten transfizierter Hodenkanälchen gemessen. Für eine Normalisierung wurden zusätzlich Messungen nach Transfektion des Leervektors pGL3-Basic und des konstitutiv exprimierten pGL3-Basic-Vektors durchgeführt. Auch das Keimzell-spezifische SP-10-pGL3-Konstrukt wurde nach Transfektion im Luziferase-Assay untersucht. In allen Experimenten wurde der EYFP-N1-Vektor kotransfiziert, um für die weitere Analyse nur die Hodenkanälchen herauszusuchen zu können, bei denen die Transfektion erfolgreich verlief. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.46 schematisch dargestellt.

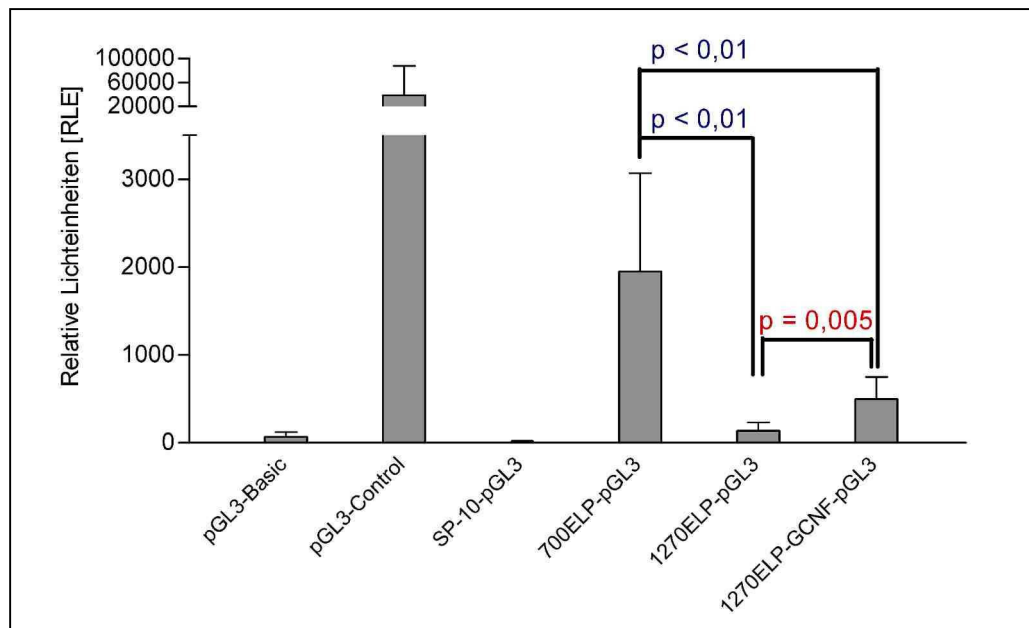


Abbildung 3.46: Analyse der Luziferase-Aktivität von Promotor-Luziferase-Konstrukten nach Transfektion in isolierte Tubuli seminiferi der Ratte. Die Ermittlung der relativen Lichteinheiten erfolgte aus den Mittelwerten der Aktivitäten von jeweils fünf unabhängigen Bestimmungen (Negativ-Kontrolle: Leervektor pGL3-Basic, Positiv-Kontrolle: pGL3-Control). Ermittlung statistisch signifikanter Unterschiede mittels ANOVA und t-Test.

Die Ergebnisse zeigen, dass es grundsätzlich möglich ist, aus den Zellextrakten der transfizierten Tubuli seminiferi die Reporterenzymaktivität zu ermitteln und quantitative Unterschiede in der Expressionsstärke festzustellen. Im Vergleich zu den Luziferase-Assays mit der SK11-Zelllinie liegen die gemessenen Aktivitäten jedoch in einem weitaus niedrigeren Bereich. Nach Transfektion der Hodenkanälchen mit dem Leervektor zeigte sich wie erwartet nur eine sehr geringe basale Aktivität. Der Luziferase-Assay mit pGL3-Control-transfizierten Tubuli weist trotz der konstitutiven Expression nur einen Wert von knapp 40 000 relativen Lichteinheiten auf. Dennoch lassen sich die Expressionsunterschiede der ELP-Promotorkonstrukte auch in diesem System bestätigen. Die Aktivität der Zellextrakte aus mit 700ELP-pGL3-transfizierten Hodenkanälchen ist deutlich größer als bei 1270ELP-pGL3 und 1270ELP-pGL3. Nach den bisherigen Ergebnissen zu urteilen werden 700ELP-Konstrukte in den Hodenkanälchen nahezu konstitutiv exprimiert. Die beiden ELP-Konstrukte mit Intron zeigen eine sehr geringe Expression in den Hodenkanälchen, wobei vor allem das 1270ELP-Konstrukt fast im Bereich der basalen Expression des Leervektors liegt. Demgegenüber zeigte das 1270ELP-GCNF-pGL3-Konstrukt wiederum eine leicht erhöhte Promotoraktivität.

Es bleibt zu diskutieren, ob die hier gemessenen Luziferase-Aktivitäten durch Keimzell-spezifische Aktivierung der Konstrukte zustande kommen, oder ob es sich um die schon beschriebenen Hintergrundaktivitäten der Promotoren in somatischen Zellen handelt.

Mit einer statistischen Analyse der unterschiedlichen Luziferase-Aktivitäten der drei ELP-Promotorkonstrukte mittels ANOVA konnte ein signifikanter Unterschied der drei Promotoraktivitäten festgestellt werden ($p = 0,0002$). In der ANOVA-Post-Analyse durch *Newman-Keuls Multiple Comparison Test* konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem 700ELP-pGL3-Konstrukt und dem 1270ELP-pGL3-Konstrukt ($p < 0,01$), sowie zwischen dem 700ELP-pGL3-Konstrukt und dem 1270ELP-GCNF-pGL3-Konstrukt ($p < 0,01$) festgestellt werden, nicht aber zwischen den beiden 1270ELP-Konstrukten. Betrachtet man allerdings die Expressionsanalysen des 1270ELP-pGL3-Konstruktes und des 1270ELP-GCNF-pGL3-Konstruktes unabhängig von den anderen Analysen und führt einen t-Test durch, ergibt sich auch zwischen diesen beiden Konstrukten ein statistisch signifikanter Unterschied in der Promotoraktivität ($p = 0,005$).

Die Transfektion mit dem Keimzell-spezifischen SP-10-pGL3-Konstrukt lieferte überhaupt keine messbare Aktivität des Reportergens. Warum eine Reporterenzymexpression im Keimepithel der Hodenkanälchen nach Transfektion hier nicht messbar war, bleibt fraglich.

4 Diskussion

Die molekularen Grundlagen des komplexen Differenzierungsprozesses der Spermatogenese, insbesondere die transkriptionelle Steuerung der Expression von Keimzellgenen, sind bisher noch weitgehend unbekannt. Die Schwierigkeit, die biochemischen und morphologischen Bedingungen für ein Überleben der Keimzellen *ex vivo* „nachzustellen“ sowie das Fehlen geeigneter Zelllinien sind dafür die Hauptursachen. In dieser Arbeit wurde deshalb ein Kultur- und Transfektionssystem etabliert, das eine Analyse von Promotorsequenzen Keimzell-spezifisch exprimierter Gene ermöglichen sollte. Dabei sollte vor allem ein Einblick in die Zelltyp- und Stadien-spezifische Expression haploid exprimierter Gene ermöglicht werden, die eine wichtige Funktion in der Spermiogenese haben. Vor allem die Promotoruntersuchungen des postmeiotisch exprimierten *Endozepine-like peptide* (ELP)-Gens liefern interessante Erkenntnisse im Hinblick auf putative Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen sowie andere wichtige DNA-Sequenzen, die für eine Zelltyp- und Stadien-spezifische Expression des Gens notwendig sind.

4.1 Etablierung eines *in vitro*-Systems für die Transfektion isolierter Ratten-Hodenkanälchen

Die Kultur isolierter Hodenkanälchen-Fragmente wurde schon in vielen unterschiedlichen Versuchsansätzen erfolgreich eingesetzt (Parvinen *et al.*, 1983; Toppari und Parvinen, 1985; Seidl und Holstein, 1990; Erkkilä *et al.*, 1997; Harris und Nicholson, 1998; Pflieger-Bruss *et al.*, 1999; Lombello *et al.*, 2000). Der Vorteil einer Kultur intakter Tubuli seminiferi-Fragmente besteht in der Erhaltung des Keimepithels und der Zell-Zell-Kontakte zwischen den Keimzellen sowie zwischen Keimzellen und Sertolizellen. Diese intakten Zellassoziationen wirken sich positiv auf ein Überleben der Keimzellen *in vitro* aus, indem das für die Spermatogenese notwendige Mikromilieu nahezu erhalten bleibt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kultur von mechanisch isolierten Hodenkanälchen der Ratte in einem nach Tres und Kierszenbaum modifizierten TKM-Kulturmedium über einen Zeitraum von bis zu 48 h möglich ist. Kriterien waren der Erhalt der Integrität des Keimepithels, der Anteil abgestorbener Zellen und das Ausmaß an Apoptose. Die mikroskopischen Analysen der Kryoschnitte kultivierter Hodenkanälchen zeigen, dass die Anordnung des Keimepithels im Tubulus nahezu erhalten werden kann. Auch die Intaktheit der haploiden Spermatiden nach einer Kulturdauer von bis zu 48 h konnte über die Anfärbung des Akrosoms dokumentiert werden. Es ist allerdings bemerkenswert, dass die

Kulturdauer einen unterschiedlichen Einfluss auf die Tubuli unterschiedlicher Spermatogenesestadien hatte. Nachdem die lichtmikroskopisch unterscheidbaren Tubulus-Fragmente der Stadien „pale“, „spot“ und „dark“ getrennt analysiert wurden, lässt sich beobachten, dass vor allem die Fragmente des „pale“-Stadiums sehr empfindlich auf die Kulturbedingungen reagieren. Hier liegt das Keimepithel spätestens nach 48 h völlig ungeordnet vor und die Tubuli weisen insgesamt eine degenerierte Morphologie auf. Es scheint so, als ob sich die Anwesenheit von späten elongierenden Spermatischen positiv auf den Erhalt der Zelloassoziationen im Keimepithel auswirkt. Möglicherweise sorgen diese Spermatischen Stadien für einen „Stützeffekt“, der bei den „pale“-Stadien der Fragmente, in denen die haploiden Spermatischen der Stadien 9–13 gerade anfangen zu elongieren, fehlt. Möglich ist auch, dass das Vorhandensein der langen, ins Tubulus-Lumen ragenden Flagellen der Spermatozoen eine Aufrechterhaltung des Lumens bewirkt, was sich positiv auf die gesamte Anordnung des Keimepithels auswirkt. Die gute morphologische Erhaltung der Kryoschnitte des „dark“-Stadiums, sogar nach einer Kulturdauer von 48 h, würde dafür sprechen. Die beobachtete Akkumulation von Zellen im Lumen der kultivierten Tubulus-Fragmente ist wahrscheinlich eher auf die Isolationstechnik zurückzuführen als auf einen degenerativen Effekt der Kulturbedingungen. Auch in den Arbeiten von Pflieger-Bruss *et al.* (1999) und Lombello *et al.* (2000) werden diese Effekte beschrieben, und da sie auch bei direkt analysierten, noch nicht kultivierten Tubuli zu beobachten waren, den Bedingungen der mechanischen Isolation zugeschrieben. Dennoch zeigen die analysierten Kryoschnitte kultivierter Tubuli seminiferi mit längerer Kulturdauer eine zunehmende Unordnung des Keimepithels. Vor allem Spermatozyten und Spermatischen werden aus den Zelloassoziationen freigesetzt und sind zunehmend im Lumen des Tubulus lokalisiert. Auch in den Experimenten von Lombello *et al.* (2000) wurde dieses Phänomen beobachtet und auf eine Störung der Sertolizellen durch die Isolations- und Kulturbedingungen zurückgeführt.

Die mikroskopische Analyse intakter Tubulus-Fragmente zeigte eine unterschiedliche Verteilung von Vesikeln in den Sertolizellen unterschiedlicher Spermatogenesestadien der Fragmente „pale“, „spot“ und „dark“. Diese Unterschiede existieren schon im Gewebeverband *in vivo*, und die Akkumulation der Vesikel im basalen Cytoplasma der Sertolizellen wurde schon bei Ulvik und Dahl (1981) als Stadien-abhängig beschrieben. Es wird ein Zusammenhang mit der phagozytotischen Aktivität der Sertolizellen und dem verstärkten Vorkommen dieser als Lysosomen bezeichneten Vesikel diskutiert. Morales *et al.* (1986) dokumentieren eine verstärkte lysosomale Akkumulation in den Sertolizellen während der Spermatogenesestadien IX bis XIV. In diesen Stadien werden die Residualkörper der vorher

freigesetzten Spermatozoen von den Sertolizellen phagozytiert. Eine Erhöhung der Vesikelzahl korreliert also mit der endocytischen Aktivität der Sertolizellen. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte in den frisch isolierten Tubuli seminiferi eine verstärkte Vesikelanhäufung in den Tubulus-Fragmenten des „pale“-Stadiums, das die Spermatogenesestadien IX bis XIV beinhaltet, beobachtet werden. Diese Beobachtungen stimmen also mit den von Morales *et al.* (1986) durchgeführten Analysen überein. Die Zunahme der Vesikelzahl in Tubulus-Fragmenten aller Spermatogenesestadien bei einer zunehmenden Kulturdauer von bis zu 48 h könnte ebenfalls auf eine verstärkte phagozytische Aktivität der Sertolizellen hinweisen. Es ist zu vermuten, dass trotz der optimierten Kulturbedingungen viele Keimzellen absterben und von den Sertolizellen phagozytiert werden. Die Akkumulation Lysosomen-ähnlicher Vesikel in den Sertolizellen ist dementsprechend natürlich in den für 48 h kultivierten Tubulus-Fragmenten am deutlichsten.

4.2 Etablierung des Transfektionssystems

Für eine Analyse der Regulation postmeiotisch exprimierter Keimzellgene wurde in dieser Arbeit eine Möglichkeit vorgestellt, Reporter-Plasmidkonstrukte über *in vivo*-Gentransfer in die Zellen des Keimepithels zu übertragen und in ihrer Expression zu untersuchen. Eine gewebespezifische Genexpression wird auf verschiedenen Ebenen kontrolliert, wie zum Beispiel über *cis*-aktivierende DNA-Sequenzen, gewebespezifische Transkriptionsfaktoren und lokale Chromatinstrukturen. Für einen Einblick in die Kontrolle und Steuerung der Genexpression sind Promotoranalysen unerlässlich. In der Regel werden diese Analysen mit klassischen Techniken der Zellkultur durchgeführt, entweder anhand von Zellen, die das zu untersuchende Gen endogen exprimieren oder durch Transfektion heterologer Zelllinien. Wie schon beschrieben, gibt es kein geeignetes System für die Promotoranalyse von Keimzellgenen. Neue methodische Möglichkeiten hat in den letzten Jahren die Technik der *in vivo*-Elektroporation eröffnet, mit deren Hilfe Plasmid-DNA in unterschiedliche Gewebe übertragen werden konnte. Die Elektroporation macht Gebrauch vom Einsatz kurzer Spannungspulse zur Überwindung der Zellmembran-Barriere. Durch die Applikation eines externen elektrischen Feldes, das den Widerstand der Zellmembran übersteigt, wird ein transienter und reversibler Zusammenbruch der Membran induziert. Der elektrophoretische Effekt des Feldes bewirkt eine gerichtete Bewegung der DNA-Moleküle, die als Polyanionen betrachtet werden können, zur positiven Elektrode, so dass sie schließlich durch die entstehenden Membranporen in die Zellen gelangen können (Gehl, 2003). Zunächst wurde diese Technik für die *in vivo*-Elektroporation intakter Hoden mit sogenannten

„Tweezertrodes“ verwendet, nachdem zuvor die Plasmid-DNA in den Hoden (Rete testis oder Tubulus-Lumen) injiziert wurde (Muramatsu *et al.*, 1997; Yamazaki *et al.*, 1998 und 2000; Huang *et al.*, 2000; Ike *et al.*, 2004). In diesen Arbeiten konnten Reporterplasmide und Promotor-Reporterkonstrukte in männliche Keimzellen übertragen und in ihrer Expression untersucht werden. Zum Erfolg dieser Technik hat vor allem die Konstruktion von Rechteckpuls-Generatoren beigetragen, da hier Amplitude und Pulslänge unabhängig voneinander eingestellt werden können, was eine bessere Optimierung der Elektroporationsbedingungen ermöglicht. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Technik verwendet und weiterentwickelt, indem ein Transfer der Plasmid-DNA durch Mikroinjektion in isolierte Tubuli seminiferi stattfand, so dass eine Expressionsanalyse des übertragenen Gens in den *in vitro*-kultivierten Hodenkanälchen möglich war. Die Experimente mit den *enhanced green/yellow fluorescent protein* (EGFP/EYFP)-Reportergenen ermöglichen eine direkte Analyse der Expression des Transgens in den Hodenkanälchen anhand der starken Fluoreszenz unter UV-Anregung. Die halbseitige Expression des EGFPs oder EYFPs im Keimepithel der Hodenkanälchen wird durch die Polarität der Elektroden erzeugt, da, wie schon erwähnt, die DNA als Polyanion in Richtung der Anode wandert.

Bemerkenswert ist die unterschiedliche Transfektionseffizienz in den Tubuli seminiferi unterschiedlicher Stadien. Während die Tubuli der Spermatogenesestadien IX–XIV und I–V eine reproduzierbar gute Reporterproteinexpression zeigten, ließen sich Tubuli des „dark“-Stadiums (VI–VIII) nur sehr schlecht transfizieren. Die Zellzusammensetzung des Keimepithels in diesen Stadien muss also einen Einfluss auf die Transfektionsrate haben. In diesen Stadien besteht die innerste, dem Lumen zugewandte Zellschicht aus Spermatozoen; es folgt die Zellschicht der runden Spermatiden (Stadium 6–8) und schließlich in Richtung Tubulus-Basis die Zellschichten der Spermatozyten und Spermatogonien. Die ins Lumen injizierte DNA erreicht wahrscheinlich nur die reifen Spermatozoen, deren Zellschicht fast geschlossen das Innere des Tubulus auskleidet und möglicherweise alle anderen Zelltypen von dem Zugang zur Plasmid-DNA abschirmt. In der Literatur wird beschrieben, dass die Transkription in den späteren Spermatiden zum Erliegen kommt. Aufgrund der morphologischen Umstrukturierung und der zunehmenden Kernkondensation sollen Transkriptionsaktivitäten mit Beginn der Elongation der Spermatiden nicht mehr möglich sein, wobei über den genauen Zeitpunkt diskutiert wird (Kierszenbaum und Tres, 1975; Fimia *et al.*, 2001; Kleene, 2003; Dadoune *et al.*, 2004). Es ist somit denkbar, dass zwar die gesamte Plasmid-DNA in die Spermatozoen transfiziert wird, dass aber diese späten Spermiestadien nicht mehr in der Lage sind das Reporterprotein zu exprimieren. Ein Vergleich der

Transfektionraten bei der Verwendung gleicher Spermatogenesestadien zeigte dennoch eine große Varianz in der Transfektionseffizienz. Das ergaben auch die quantitativ ermittelten Werte aus den Luziferase-Assays nach Transfektion der Hodenkanälchen mit dem pGL3-Reportervektor (vergleiche Abbildung 3.21). Diese Schwankungen liegen im Transfektionssystem begründet, da einerseits bei der Mikroinjektion die gleichmäßige Verteilung der Plasmid-DNA im Tubulus-Lumen nicht immer gewährleistet ist und andererseits auch die Position des Tubulus-Fragments zwischen den Elektroden variiert, so dass eine optimale Transfektionsrate nicht immer erreicht werden kann.

Die Untersuchungen über den Einfluss der Transfektionsbedingungen auf die Überlebensrate der Zellen im Keimepithel zeigten, dass mit zunehmender Manipulation der Tubuli (erst durch Mikroinjektion und anschließend durch Elektroporation) die Anzahl der geschädigten Zellen zwar deutlich zunahm, dass aber der größte Teil der Zellen diese Behandlung überlebte (vergleiche Abbildung 3.23). Ein ähnliches Ergebnis lieferten die Apoptose-Tests mittels TUNEL-Assay. Auf den analysierten Tubulus-Kryoschnitten fanden sich apoptotische Zellen erst, nachdem die Hodenkanälchen mikroinjiziert und elektroporiert wurden, während Kryoschnitte untransfizierter Tubuli nach gleicher Kulturdauer nahezu keine apoptotischen Zellen aufwiesen. Die markierten geschädigten Zellen fanden sich zudem eher vereinzelt und an der Basis des Keimepithels. Diese Lokalisation deutet auf apoptotische Spermatogonien und Spermatozyten hin, während die haploiden Keimzellstadien von den Transfektionsbedingungen anscheinend unbeeinflusst bleiben. An dieser Stelle muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass die TUNEL-Methode zur Ermittlung der Zellschädigung über das Vorkommen apoptotischer Zellen im Keimepithel nicht ganz unbestritten ist. Aufgrund der phagocytotischen Aktivität der Sertolizellen, die geschädigte Keimzellen sofort eliminieren, könnte dieser Assay falsch negative Ergebnisse liefern. In einigen Arbeiten wird dokumentiert, dass in histochemisch analysierten Hodenquerschnitten oft kaum apoptotische Keimzellen gefunden werden und dass diese Ergebnisse vorsichtig zu interpretieren sind (Maeda *et al.*, 2002; Nakanishi und Shiratsuchi, 2004). Um die Phagozytose der Sertolizellen zu unterbinden, wurde ein weiterer TUNEL-Assay mit Hodenkanälchen durchgeführt, in die zuvor Annexin V injiziert wurde, das an die von apoptotischen Keimzellen exponierten Phosphatidylserine bindet und damit maskiert. In den Versuchen von Maeda *et al.* (2002) konnte durch dieses Experiment gezeigt werden, dass nach Annexin-Applikation ein verstärktes Vorkommen apoptotischer Zellen im Keimepithel sichtbar wurde, was auf die verminderte Phagozytose der Sertolizellen zurückzuführen war und nicht auf einen toxischen Einfluss des Annexins. In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Effekt des Annexins bestätigt

werden. Tubuli, die mit Annexin injiziert und dann für 48 h kultiviert wurden, zeigten eine verstärkte Akkumulation von apoptotischen Zellen. Dieser Effekt konnte bei Tubuli, die zur Kontrolle mit Plasmid-DNA injiziert und anschließend kultiviert wurden, nicht beobachtet werden. Die durch die Transfektionsbedingungen hervorgerufene Apoptoserate könnte somit größer sein, als sich mit dem TUNEL-Assay nachweisen lässt. Dennoch lassen die Transfektionserfolge mit den konstitutiv exprimierten EGFP/EYFP-Konstrukten auf eine gute Optimierung der Transfektionsbedingungen schließen. Generell wird auch in anderen Arbeiten von einem tolerierbaren und nur gering schädigendem Einfluss der Elektroporation berichtet (Muramatsu *et al.*, 1997; Yamazaki *et al.*, 2000). Muramatsu *et al.* (1998) konnten zeigen, dass der schädigende Einfluss der Elektroporation direkt nach der Behandlung geringer ist als einen Monat danach. Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass vermutlich die Anzahl der durch die Transfektion geschädigten Zellen größer sein wird als mit den geschilderten Mitteln nachzuweisen ist, dass aber die Transfektionseffizienz für eine Promotor-Reporteranalyse ausreicht.

Besonders interessante Ergebnisse liefert die Analyse der EYFP-exprimierenden Zelltypen nach Transfektion mit dem EYFP-Reportervektor. Die Laser-mikroskopischen Aufnahmen zeigen eine Reporterprotein-Expression in den perlenschnurartig aufgereihten Keimzellen, die über ihre Cytoplasmabrücken verbunden bleiben (vergleiche Abbildung 3.26). Es kann vermutet werden, dass das Reporterplasmid über diese Brücken von Keimzelle zu Keimzelle weitergegeben werden kann, so dass ein ganzes Synzytium von Keimzellen das EYFP-Protein exprimiert. Bemerkenswert sind auch die mikroskopischen Beobachtungen zur Morphologie der EYFP-exprimierenden Zellen anhand von Cytospinpräparaten. Wie bei der Verwendung eines konstitutiven Promotors zu erwarten, findet man fluoreszierende Spermatozyten, Spermatiden und Sertolizellen (vergleiche Abbildung 3.29). Abbildung 2.29 C zeigt sogar die Expression des Reporterproteins in einem nahezu reifen Spermatozoon. Die EYFP-Fluoreszenz erstreckt sich über das Mittelstück und das Flagellum des Spermiums und akkumuliert in dem noch nicht abgeschnürten Cytoplasmarest. Diese Beobachtung ist erstaunlich, denn in dem schon stark kondensierten und elongierten Zellkern sollte eine Transkription nahezu unmöglich sein (Kierszenbaum und Tres, 1975; Fimia *et al.*, 2001; Kleene, 2003; Dadoune *et al.*, 2004). Dennoch wird hier 24 h nach Transfektion des EYFP-Plasmids in das Hodenkanälchen das EYFP-Protein in einem Spermatozoon exprimiert. Dieser überraschende Befund lässt sich nur schwer deuten. Möglicherweise liegt die Plasmid-DNA als Episom im Cytoplasma vor, und die Aktivierung der Transkription kann durch freigesetzte Transkriptionsfaktoren im Cytoplasma stattfinden. Schließlich werden sehr viele

Zellbestandteile aus dem Kern und der gesamten Zelle mit dem Residualkörper abgeschnürt, so dass hierdurch vielleicht eine Transkription außerhalb des Kerns möglich wird. Es ist aber auch denkbar, dass trotz der starken Kondensation des Kerns noch DNA eindringen kann, und sich Transkriptionsfaktoren anlagern können. In reifen humanen Spermien liegen 15 % der DNA noch „klassisch“ über Nukleohistone verpackt vor (Gatewood *et al.*, 1987). Dies könnte auf die Möglichkeit hinweisen, dass bestimmte Gene generell aktiv bleiben, so dass auch eine Transkription des EYFP-Reporterplasmids möglich wäre. Hier bedarf es also weiterer Untersuchungen, um diese Ergebnisse interpretieren zu können.

Insgesamt konnte in der vorliegenden Arbeit dokumentiert werden, dass sich das System der *in vivo*-Elektroporation intakter Hoden auf eine *in vitro*-Elektroporation kultivierter Hodenkanälchen übertragen lässt. Bei Verwendung eines konstitutiv exprimierten Reportergenkonstruktes konnte nach Transfektion eine starke Expression des EYFP-Proteins in den verschiedenen Zelltypen und -stadien nachgewiesen werden. Durch Verwendung eines Luziferase-Vektors ist selbst eine quantitative Ermittlung von Expressionsunterschieden möglich, so dass das etablierte Kultur- und Transfektionssystem für eine Promotor-Reporteranalyse postmeiotisch exprimierter Gene verwendet werden kann.

4.3 Expression von EYFP-Reportergenkonstrukten unter der Kontrolle Keimzell-spezifischer Promotoren

Für die Untersuchung der Keimzell-spezifischen Expression von Promotor-Reporterkonstrukten wurden verschiedene bekannte Promotorsequenzen für die Klonierung verwendet, deren Stadien-spezifisches Expressionsmuster schon vorher in transgenen Tieren dokumentiert wurde. Verwendet wurden die Promotoren für die Protamin1- und SP-10-Gene, die postmeiotisch exprimiert werden sowie der Promotor für das Proakrosin-Gen, der in Spermatozyten aktiviert wird. Zusätzlich wurde zum Vergleich der Expressionsmuster ein Sertolizell-spezifischer Promotor verwendet, der die Expression des *Androgen binding protein* (ABP)-Gens steuert. Für alle Konstrukte konnte eine Reportergenexpression in den transfizierten Hodenkanälchen gezeigt werden (vergleiche Abbildung 3.31). Die mikroskopische Analyse von Kryoschnitten der EYFP-exprimierenden Tubuli lieferte allerdings nicht immer das für die verschiedenen Promotorkonstrukte erwartete Expressionsmuster. Nur das Konstrukt mit dem ABP-Promotor wies das erwartete Fluoreszenzmuster transfizierter Sertolizellen auf. Gleichzeitig wurde beim Einsatz dieses Konstruktes für eine Transfektion in die SK11-Zelllinie aber keine Reporterproteinexpression beobachtet. Aufgrund dieses

widersprüchlichen Ergebnisses scheint der Promotor des ABP-Gens als Positiv-Kontrolle Sertolizell-spezifischer Expression somit eher ungeeignet zu sein.

Für alle übrigen Konstrukte wurde vereinzelt eine Expression in Keimzellen gefunden, es überwog jedoch die EYFP-Expression in Sertolizellen. Für Promotorkonstrukte des Proakrosin-Gens wurde in Experimenten mit transgenen Mäusen eine Stadien-spezifische Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)-Reporterexpression in Spermatozyten und Spermatisiden gezeigt, wenn 877 bp der 5'-flankierenden Sequenz als Promotor verwendet wurden (Nayernia *et al.*, 1992 und 1994). In der vorliegenden Arbeit konnte unter Verwendung dieser Promotorsequenz für ein EYFP-Promotor-Reporterkonstrukt eine Expression sowohl in Spermatisiden als auch in Sertolizellen beobachtet werden. Dieser Befund ist möglicherweise auf eine Hintergrundaktivität des Proakrosin-Promotors in somatischen Zellen zurückzuführen. Dafür spricht, dass auch nach Transfektion in die SK11-Zelllinie eine geringe Aktivierung des Promotor-Reporterkonstruktes beobachtet werden konnte. Ähnliche Beobachtungen wurden auch schon in anderen Arbeiten dokumentiert. In einer Arbeit von Widlak *et al.* (2003) wurde das Expressionsmuster des Keimzell-spezifischen HST70-Promotors analysiert, indem transgene Tiere, *in vivo*-elektroporierte Hoden und *in vitro*-Transfektionen einer Zelllinie miteinander verglichen wurden. Die stringente Expression des Promotorkonstruktes in Spermatozyten bei transgenen Tieren konnte mit den anderen beiden Techniken nicht rekapituliert werden. Das HST70-Promotorkonstrukt wurde nach Transfektion auch in der somatischen Zelllinie exprimiert.

Für den Promotor des SP-10-Gens wurde eine Expression in runden Spermatisiden der Stadien 1–6 erwartet (Reddi *et al.*, 1999 und 2002). Die Analyse der transfizierten Hodenkanälchen zeigte allerdings eine EYFP-Expression hauptsächlich in Sertolizellen und nur vereinzelt in runden Spermatisiden. Ähnliches ergab sich auch für das Promotorkonstrukt mit dem Protamin1-Promotor. Aufgrund der Ergebnisse aus Experimenten mit transgenen Tieren wurde hier eine Expression des Reportergens in runden und elongierenden Spermatisidenstadien erwartet (Peschon *et al.*, 1987; Zambrowicz *et al.*, 1993). In den Experimenten von Yamazaki *et al.* (1998) wurde mit dem Protamin1-Promotor, der ein β -Galaktosidase-Reportervektor steuerte, in *in vivo*-elektroporierem Hodengewebe eine Stadien-spezifische Reporterproteinexpression gezeigt. Tatsächlich wurden in der vorliegenden Arbeit auf den Kryoschnitten transfizierter Tubuli seminiferi einige EYFP-exprimierende elongierende Spermatisiden beobachtet. Aber auch hier kam es zu einer unerwarteten Reporterexpression in Sertolizellen. Eine Transfektion der SP-10- und Protamin1-Konstrukte in die SK11-Zelllinie belegt allerdings, dass zumindest in dieser

Zelllinie keine somatische Hintergrundexpression als Ursache für die verstärkte Fluoreszenz der Sertolizellen auf den Kryoschnitten in Frage kommt.

Shoji *et al.* (2005) machten ähnliche Beobachtungen nach *in vivo*-Elektroporation von Hodengewebe. Hier wurde das Expressionsmuster des Phosphoglyceratkinase2 (Pgk2)-Promotors untersucht, der eine Aktivierung des Pgk2-Gens in Spermatozyten steuert. Auch hier wurde außer der erwarteten Expression in Spermatozyten eine unerwartete Expression des Keimzell-spezifischen EGFP-Promotor-Reportergens in Sertolizellen detektiert. Als Ursache wird hier eine geringere Stringenz des Promotors in den episomalen Plasmidkonstrukten angesehen, da es, anders als bei transgenen Tieren, nicht zu einer Integration des Konstruktes ins Genom kommt. Es ist also möglich, dass auch in der vorliegenden Arbeit die Keimzell-spezifischen Promotorkonstrukte mit den Protamin1- und SP-10-Promotoren eine unspezifische Aktivierung in Sertolizellen bewirken können. Schließlich ist auch anzunehmen, dass Sertolizellen bei einer Transfektion einen großen Teil der Plasmidkonstrukte aufnehmen, da sie durch ihre gefaltete Zelloberfläche eine sehr große Angriffsfläche bieten.

Das Vorkommen fluoreszierender Sertolizellen auf den Kryoschnitten transfizierter Tubuli seminiferi ließe sich allerdings auch anders interpretieren. Wie schon beschrieben besitzen die Sertolizellen eine ausgeprägte Phagozytoseaktivität. Sie sorgt dafür, dass apoptotische Keimzellen sehr schnell aus dem Keimepithel eliminiert werden. Die Transfektion der Hodenkanälchen bewirkt eine Zunahme apoptotischer Zellen. Möglicherweise werden transfizierte Keimzellen, die ein EYFP-Reporterkonstrukt aufgenommen haben, dann aber absterben, von den Sertolizellen phagozytiert. Die Fluoreszenz in den Sertolizellen wäre dann nicht auf eine unspezifische Aktivierung der Keimzell-spezifischen Promotoren zurückzuführen, sondern würde durch die verstärkte Aufnahme EYFP-exprimierender Keimzellen zustande kommen. Dass die Apoptose der Keimzellen bei Transfektionsexperimenten tatsächlich ein Problem zu sein scheint, belegen auch andere Arbeiten. Ike *et al.* (2004) und Somboonthum *et al.* (2005) injizierten bei der *in vivo*-Transfektion mittels Elektroporation zusammen mit der Plasmid-DNA auch einen Caspase-Inhibitor in die Tubuli seminiferi, der eine Apoptose der Keimzellen blockieren sollte. In der Tat ließen sich auch in der vorliegenden Arbeit bei der Analyse von Cytospinpräparaten transfizierter Hodenkanälchen immer wieder apoptotische Zellen mit fragmentiertem Zellkern finden (vergleiche Abbildung 3.35), so dass die vermehrte Apoptose transfizierter Keimzellen möglicherweise der Schwachpunkt des Transfektionssystems ist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mittels des etablierten Transfektionssystems eine Übertragung Keimzell-spezifischer Promotorkonstrukte in Keimzellen möglich ist. Die Reporterproteinexpression in den verschiedenen Zelltypen- und -stadien bedarf allerdings einer weiteren genaueren Untersuchung, vor allem in Bezug auf die unerwartete Expression der Keimzell-spezifischen Promotorkonstrukte in Sertolizellen.

4.4 Analyse der Expression von ELP-Promotorkonstrukten

Das etablierte *in vitro*-System zur Übertragung von Promotor-Reporterkonstrukten in isolierte Hodenkanälchen sollte im weiteren zur Analyse des Promotors für das *Endozepine-like peptide*-Gen verwendet werden. Der ELP-Promotor steuert eine Keimzell-spezifische Expression mit entsprechender mRNA-Akkumulation in postmeiotischen Spermatiden der Stadien 6–19. Der zuvor im *Electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) untersuchte Promotorbereich von 700 bp sollte ein ähnliches Expressionsmuster nach Transfektion eines EYFP-Promotor-Reporterkonstruktes in transfizierten Tubuli seminiferi zeigen (Valentin *et al.*, 2000). Die Ergebnisse aus den Transfektionsexperimenten waren überraschend. Das 700ELP-EYFP-Konstrukt lenkte eine starke Reporterproteinexpression ausschließlich in Sertolizellen. Erst ein anschließend kloniertes 1500ELP-EYFP-Konstrukt konnte zusätzlich eine Expression des EYFPs in Keimzellen lenken. Die Analyse von ELP-Promotor-Deletionskonstrukten, die eine von 5'-Seite und eine von 3'-Seite her verkürzte Promotorsequenz aufwiesen (1270ELP-EYFP und 1000ELP-EYFP), ließ auf einen Einfluss der Intronsequenz auf die Zelltypspezifität des ELP-Promotors schließen. Eine Transfektion der EYFP-Konstrukte in die SK11-Zelllinie sprach ebenfalls für eine eher konstitutive Genaktivierungsfähigkeit der beiden intronlosen Konstrukte 700ELP-EYFP und 1000ELP-EYFP. Das 1270ELP-EYFP-Konstrukt hat ein ähnliches Expressionsmuster wie das 1500ELP-EYFP-Konstrukt, so dass die Deletion von der 5'-Seite her scheinbar keinen Einfluss auf die Zelltypspezifität hat.

Eine genauere Analyse der EYFP-exprimierenden Zelltypen und -stadien nach Transfektion mit 1270ELP-EYFP ergab tatsächlich eine Reporterproteinexpression in runden und elongierenden Spermatiden (vergleiche Abbildung 3.43). Dennoch wurde auch hier wieder eine EYFP-Akkumulation in Sertolizellen beobachtet. Die Messung unterschiedlicher Expressionslevel in einem Luziferase-Assay nach Transfektion der pGL3-Promotor-Reporterkonstrukte bestätigte die Ergebnisse aus den Fluoreszenzuntersuchungen. Das 700ELP-pGL3-Konstrukt bewirkte eine starke Aktivierung des Reportergens in SK11-Zellen und lag mit den gemessenen relativen Lichteinheiten im Bereich des konstitutiven SV-40-

Promotors. Das 1270ELP-pGL3-Konstrukt und das von der 5'-Seite her verkürzte 1270ELP-GCNF-pGL3-Konstrukt ohne putative GCNF-Bindungsstelle zeigten zwar auch eine geringe Expression des Reporterproteins, diese lag aber im Bereich des als Keimzell-spezifisch geltenden Proakrosin-Promotors. Diese Hintergrundexpression in somatischen Zellen darf wohl auch hier auf das Transfektionssystem zurückgeführt werden, da die transiente Expression möglicherweise wiederum nur episomal erfolgt und die Stringenz der Zell- und Stadienspezifität somit geringer sein könnte.

Die ELP-Promotorkonstrukte wurden dennoch für die *in vitro*-Transfektion kultivierter Hodenkanälchen eingesetzt und ihre Expression in einem Luziferase-Assay analysiert. Die Ergebnisse aus den Transfektionsexperimenten mit der SK11-Zelllinie ließen sich so teilweise bestätigen. Insgesamt waren die Expressionslevel der Reportergenkonstrukte in den Tubuli seminiferi jedoch viel niedriger als bei der Zelllinie. Dennoch konnte eine deutliche Expression des Luziferase-Reporterproteins in den transfizierten Tubuli gemessen werden. Ein Vergleich der Expressionslevel der unterschiedlichen ELP-Konstrukte zeigt auch hier eine stärkere pGL3-Expression nach Transfektion von 700ELP-EYFP, die wahrscheinlich wiederum unspezifisch in allen Zellen des Keimepithels erfolgt. Die sehr geringe Reporterexpression nach Transfektion der 1270ELP-pGL3- und 1270ELP-GCNF-pGL3-Konstrukte deutet auf eine spezifischere Expression hin. Möglicherweise beruht die sehr geringe Expression auf einer Keimzell-spezifischen Expression, die aber auf Grund von Apoptose der Keimzellen reduziert ist. Dies könnte auch erklären, warum nach Transfektion des SP-10-Promotorkonstruktes keine Reporterexpression ermittelt werden konnte. Die Expression in den runden Keimzellen erfolgt möglicherweise Stadien-spezifisch, die Zellen sterben dann jedoch durch Apoptose. Dieser Befund könnte auch wiederum daraufhin deuten, dass die EYFP-Fluoreszenz der Sertolizellen auf Kryoschnitten der mit SP-10-EYFP transfizierten Hodenkanälchen nicht durch somatische Hintergrundaktivität der Promotorkonstrukte entsteht. Diese wäre ansonsten auch im Luziferase-Assay der mit SP-10-pGL3-transfizierten Hodenkanälchen messbar gewesen. Die Beobachtungen stützen stattdessen die Vermutung, dass die apoptotischen EYFP-exprimierenden Keimzellen schnell von den Sertolizellen phagozytiert werden, so dass hier das Reporterprotein akkumuliert. Die ELP-Promotorkonstrukte 1270ELP-pGL3 und 1270ELP-GCNF-pGL3 werden wahrscheinlich Keimzell-spezifisch exprimiert. Da eine Aktivierung des ELP-Promotors über mehrere Spermatidenstadien hinweg (6–19) in allen Stadien der Tubuli (I–XIV) erfolgt, konnte im Unterschied zum nur kurze Zeit aktiven SP-10-Promotor (Spermatidenstadien 1–6) eine Luziferase-Expression ermittelt werden. Die Expressionsunterschiede beim Vergleich des

1270ELP-pGL3-Konstruktes mit dem deletierten 1270ELP-GCNF-pGL3-Konstrukt sind zumindest bei einer statistischen Analyse mittels t-Test signifikant. Ein Fehlen der Bindungsstelle für den *Germ cell nuclear factor* (GCNF) könnte somit einen Einfluss auf die Promotoraktivität gehabt haben.

In einigen Arbeiten wird eine Funktion von GCNF in postmeiotisch exprimierten Genen als Repressor der zuvor über CREM τ ausgelösten Promotoraktivierung diskutiert (Rajkovic *et al.*, 2004; Hummelke und Cooney, 2004). Es wäre also durchaus möglich, dass durch die Deletion der GCNF-Bindestelle eine verstärkte Expression des ELP-Promotor-Reporterkonstruktes ausgelöst wird. Um dies zu bestätigen, sollten die Transfektionsbedingungen der pGL3-Promotorkonstrukte in die Tubuli seminiferi weiter optimiert werden. Zum Beispiel wäre ein duales Luziferase-Assay-System sehr sinnvoll, indem über die zusätzliche Verwendung der *Renilla*-Luziferase alle Expressionslevel normalisiert werden können. Das würde die starken Schwankungen in der Transfektionseffizienz möglicherweise ausgleichen und für geringere Varianzen der Messergebnisse sorgen.

Aus den Analysen der Transfektionsexperimente mit den ELP-Promotorkonstrukten lässt sich folgende Schlussfolgerung ziehen: Die Keimzell-spezifische Expression des ELP-Gens wird auch durch Promotorsequenzen hinter, das heißt 3' vom Transkriptionsstart gesteuert, wobei regulatorische Elemente wahrscheinlich im Intronbereich des ELP-Gens liegen. Diese Beobachtung erscheint zunächst ungewöhnlich, wurde aber schon für viele andere Gene beschrieben (siehe *Review* Ogbourne und Antalis, 1998). In der Tat wurde auch bei dem schon beschriebenen Proakrosin-Promotor ein regulatorisches DNA-bindendes Element zwischen Transkriptions- und Translationsstart des Gens in einem Intron gefunden (Schulten *et al.*, 2001). Das sogenannte YY1-Motiv des Proakrosin-Promotors bindet ein YY1-Protein, dem eine Funktion als Repressor zugeschrieben wird. Erst eine Spaltung des Proteins durch eine Keimzell-spezifische Protease soll die Proakrosin-Expression auslösen. Auch in der Promotorsequenz des Testis-spezifischen Lactat-Dehydrogenase C-Gens findet sich ein regulatorisches Element zwischen TATA-Box und Transkriptionsstart, das scheinbar eine somatische Expression des Gens über die Bindung eines Repressors verhindert (Jethanandani und Goldberg, 2001). Es handelt sich hier um eine palindromische Sequenz, an die ein Protein der NF-I-Familie binden soll. Die Konsensussequenz für NF-I-Proteine ist TTGG(N₇)CCAA, wobei die Anzahl der zwischen TTGG und CCAA liegenden Nukleotide auch variieren kann und im Falle des Lactat-Dehydrogenase C-Promotors aus acht Nukleotiden besteht. Interessanterweise findet sich im Intronbereich des ELP-Promotors eine ähnliche Sequenz. Sie unterscheidet sich von der Konsensussequenz nur durch die Anwesenheit von sechs statt

sieben variablen Nukleotiden zwischen der TTGG- und CCAA-Sequenz. Um die Funktion des Intronbereichs und mögliche DNA-Bindestellen für regulative Elemente im ELP-Promotor genauer analysieren zu können, müssten die EMSA-Analysen mit dem 1270ELP-Konstrukt wiederholt werden. So könnte eine Protein-DNA-Interaktion spezifischer Sequenzen genauer charakterisiert werden.

Abschließend lässt sich feststellen, dass mit dieser Arbeit ein Kultur- und Transfektionssystem etabliert wurde, mit dem ein erstes *Screening* von Promotor-Reporterkonstrukten in Keimzellen und Sertolizellen möglich ist. Die Übertragung der *in vivo*-Gentransfer-Technik durch Elektroporation intakter Hoden auf eine *in vitro*-Transfektion isolierter Hodenkanälchen war erfolgreich. Es konnten sowohl mittels fluoreszenzmikroskopischer Analysen als auch durch quantitative Messungen der Reporterproteinlevel im Luziferase-Assay wichtige Erkenntnisse zur Regulation Keimzell-spezifischer Gene gewonnen werden. Wie in vielen anderen Arbeiten stellte aber auch hier die Transfektion von Keimzellen eine große Herausforderung dar. Wenn auch die Expression von Promotor-Reporterkonstrukten in Spermatiden gezeigt werden konnte, so stellte die anschließende Apoptose der Zellen anscheinend ein Problem dar. Möglicherweise eignet sich das hier etablierte *in vitro*-System viel besser zur Analyse Sertolizell-spezifischer Expression, da eine Transfektion der Sertolizellen in diesem System hervorragend möglich ist. Die wichtigen Zellinteraktionen zwischen Keim- und Sertolizellen wären zudem ohnehin ein sehr interessanter Forschungsansatz, so dass hier durch Erhaltung der Zelloassoziationen im Keimepithel der isolierten Tubuli seminiferi ein interessantes Werkzeug für die Analyse des Sertolizell-Keimzell-*Crosstalks* geschaffen wurde.

Insgesamt wurden mit diesem Versuchsansatz mehrere Ziele erreicht. Erstens wurde eine direkte und relativ einfache Methode entwickelt, die allgemein für die Promotoranalyse von im Keimepithel exprimierten Genen benutzt werden könnte. Zweitens wurde der Promotorbereich des ELP-Gens funktionell charakterisiert und mögliche Transkriptionskomplexe definiert, die eine Schlüsselrolle bei der Keimzell-Transkription spielen könnten. Drittens wäre eine nachfolgende Weiterentwicklung der Technik denkbar, in dem durch eine Übertragung der Methodik auf Hodenkanälchen *in vivo* eine Herstellung von transgenen Tieren über die männliche, anstatt wie bisher über die weibliche Keimbahn möglich wird. Nicht zuletzt würde die Identifizierung von funktionell relevanten Transkriptionsfaktoren, die bei der Expression von Spermienproteinen wichtig sind, einen erheblichen Fortschritt in unserem Verständnis der molekularen Mechanismen der Spermatogenese-Steuerung

darstellen. Dieses neue Wissen könnte helfen, Pathologien der Spermatogenese, insbesondere männliche Infertilität, besser zu verstehen, zu diagnostizieren und eventuell zu therapieren.

4.5 Ausblick

Die Ergebnisse aus den Transfektionsexperimenten mit den Keimzell-spezifischen Promotoren sollten in Zukunft noch genauer analysiert werden. Für alle EYFP-Konstrukte sollte eine Untersuchung der Zelltyp-spezifischen Expression anhand von Cytospinpräparaten erfolgen. Zusätzlich sollten Methoden entwickelt werden, die die Vermutung der phagocytotischen Aufnahme apoptotischer Keimzellen durch die Sertolizellen bestätigen könnten. Vielleicht könnte die Phagozytose durch das gleichzeitige Injizieren von Annexin V oder von Inhibitoren, die die *Scavenger*-Rezeptoren der Sertolizellen blockieren, verhindert werden. Außerdem sollte getestet werden, ob über die Zugabe von Caspase-Inhibitor zur Plasmid-DNA-Lösung eine verstärkte Apoptose der Keimzellen verhindert werden kann.

Es wäre bestimmt sinnvoll, einen direkten Vergleich der *in vivo*-Elektroporationstechnik mittels intakter Hoden mit der *in vitro*-Elektroporationstechnik isolierter Tubuli seminiferi durchzuführen. Die Expressionsanalyse eines ausgewählten Keimzell-spezifischen Promotors könnte dann genauer durchgeführt werden, und der Einfluss der verschiedenen Techniken auf die beobachteten Ergebnisse könnte so verglichen werden.

In Bezug auf die Promotoranalysen des ELP-Gens wären weitere EMSA-Analysen des Promotorbereichs inklusive Intron sehr sinnvoll. Insbesondere die DNA-Protein-Interaktion im Bereich der putativen NF- κ B-Bindungsstelle sollte hier analysiert werden. Besonders interessant wären aber bestimmte Expressionsanalysen des ELP-Gens in transgenen Tieren. So könnte der für eine Stadien- und Zelltyp-spezifischen Expression verantwortliche Sequenzbereich noch besser charakterisiert werden.

5 Zusammenfassung

Spermatogenese und Spermiohistogenese sind komplexe Differenzierungsvorgänge, die einer strikten Transkriptions- und Translationskontrolle unterliegen. Entgegen früheren Vermutungen findet auch in haploiden Keimzellen, d. h. postmeiotisch, durchaus noch eine merkliche Gentranskription statt. Sogar in ejakulierten Spermien konnten noch verschiedene mRNA-Spezies charakterisiert werden. Weil es für haploide Keimzellen aber keine geeigneten Zelllinien gibt, war eine funktionelle Analyse von Keimzell-spezifischen Promotoren, die eine haploide Transkription steuern, bisher kaum möglich. Deshalb wurde hier ein Transfektionssystem entwickelt, das eine Einführung und Charakterisierung von Promotorkonstrukten in intakten Tubuli seminiferi ermöglicht. Dabei wurde das bisher schon erfolgreich angewandte System des *in vivo*-Gentransfers durch Elektroporation intakter Hoden auf isolierte und kultivierte Hodenkanälchen *in vitro* übertragen. Es wurde zunächst ein Kultursystem etabliert, das eine Kultivierung mechanisch isolierter Tubulus-Fragmente für einen Zeitraum von 24 h bis 48 h ermöglichte. Mittels Kryoschnitt-Technik wurde der Einfluss der Kulturdauer auf die Morphologie des Keimepithels der Tubuli ermittelt, wobei insbesondere auf Unterschiede zwischen lichtmikroskopisch unterscheidbaren Tubuli der verschiedenen Spermatogenesestadien geachtet wurde. Es konnte gezeigt werden, dass insgesamt die Zellassoziationen im Keimepithel nach 24 h noch weitgehend intakt blieben. Auch nach 48 h waren bei den meisten Tubuli keine größeren Gewebeschäden sichtbar, wobei sich allerdings eine längere Kulturdauer auf die Spermatogenesestadien IX–XIII deutlich stärker negativ auswirkte und zu einer ungeordneten Verteilung der Zellen im Keimepithel führte. Ein Befund, der bei den übrigen Stadien nicht beobachtet wurde.

Der Gentransfer in die isolierten Tubuli seminiferi erfolgte durch Mikroinjektion der DNA-Lösung ins Tubulus-Lumen und anschließende Elektroporation mit pinzettenähnlichen Elektroden („Tweezertrodes“). Die Elektroporationsbedingungen wurden anhand der Transfektion eines konstitutiv exprimierten EGFP-Reportervektors optimiert. Mittels eines *Live-Dead*-Assays wurde die Gewebeschädigung, und via TUNEL-Assay die Anzahl apoptotischer Zellen bestimmt und somit die Auswirkungen der Mikroinjektion und Elektroporation auf die Zellen des Keimepithels untersucht. Obwohl die Eingriffe der Mikroinjektion und Elektroporation eine Zunahme toter Zellen bewirkten, blieb der größte Anteil der Zellen im Tubulus unbeschadet. In weiteren Analysen wurde ein Luziferase-Reportervektor eingesetzt, um die Transfektionseffizienz in den Hodenkanälchen auch quantitativ ermitteln zu können. Auch hier wurde in Bezug auf die verschiedenen lichtmikroskopisch unterscheidbaren Spermatogenesestadien ein signifikanter Unterschied

festgestellt. Die Tubulus-Fragmente mit späten elongierten Spermatischen im Keimepithel (Stadien VI-VIII) zeigten keine Reporterproteinexpression. Die übrigen Tubulus-Fragmente der Stadien I-V und IX-XIV ließen sich dagegen sehr gut transfizieren. Insgesamt gab es allerdings auch bei der Auswahl gleicher Stadien große Schwankungen in der Transfektionseffizienz.

Im weiteren wurden verschiedene Keimzell-spezifische Promotorkonstrukte eingesetzt, um Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen der Transkriptionssteuerung in haploiden Keimzellen zu gewinnen, darunter einige bereits gut charakterisierte Promotoren. Zum Vergleich wurde außerdem ein Konstrukt mit dem spezifisch in Sertolizellen exprimierten Promoter des *Androgen binding protein*-Gens kloniert. Für die Keimzell-spezifischen Promotor-Reporterkonstrukte konnte auch im *in vitro*-Transfektionssystem eine Expression in Keimzellen gezeigt werden. Jedoch fand sich bei allen Konstrukten auch eine deutliche Expression des EYFP-Reporterproteins in Sertolizellen. Eine Analyse der Hintergrundaktivität der Promotoren wurde deshalb in einer somatischen SK11-Zelllinie durchgeführt. Hier konnte allerdings nur für den Proakrosin-Promotor eine geringe Aktivierung in den somatischen Zellen beobachtet werden, während die Promotoren der Protamin1- und SP-10-Gene keine Hintergrundaktivität besaßen.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Charakterisierung des Promotors des postmeiotisch exprimierten *Endozepine-like peptide* (ELP)-Gens. Ausgehend von einer bereits beschriebenen ELP-Promotorsequenz wurden verschiedene EYFP-Reporter-Promotorkonstrukte kloniert, wobei sowohl längere Sequenzen des Promotors bis hin zum Translationsstart sowie verschiedene deletierte Promotorkonstrukte hergestellt wurden. Die Promotorkonstrukte zeigten eine sehr unterschiedliche Aktivierung, die auf die An- bzw. Abwesenheit eines hinter dem Transkriptionsstart gelegenen Introns beruhte. Konstrukte ohne Intron zeigten dabei eine starke Aktivierung sowohl in den transfizierten Hodenkanälchen als auch in der somatischen SK11-Zelllinie. Sie waren somit nicht Keimzell-spezifisch. Erst die Anwesenheit des Introns lenkte die Expression der ELP-Promotorkonstrukte in Keimzellen, wengleich auch hier eine geringe Hintergrundaktivität in der somatischen SK11-Zelllinie beobachtet werden konnte. Eine quantitative Analyse der Expression unterschiedlicher ELP-Promotor-Deletionskonstrukte wurde nach Transfektion in die Hodenkanälchen durch einen anschließenden Luziferase-Assay erreicht. Ein Vergleich der Konstrukte zeigte auch hier eine wahrscheinlich unspezifische Aktivierung des Promotor-Fragmentes ohne Intron. Zwei andere Konstrukte, die beide das Intron enthielten, sich aber durch die An- bzw. Abwesenheit einer putativen Bindungsstelle für den *Germ cell nuclear factor* (GCNF) unterschieden,

zeigten eine insgesamt geringere Reporterproteinaktivität, die dafür aber wahrscheinlich Keimzell-spezifisch war. Beim Vergleich der beiden Konstrukte untereinander konnte ein geringer, aber signifikanter Unterschied in den Expressionsstärken der Promotorkonstrukte gemessen werden. Eine etwas stärkere Aktivierung des Promotors wurde für das Konstrukt ohne die putative GCNF-Bindestelle ermittelt. Es konnte somit ein Kultur- und Transfektionssystem etabliert werden, indem ein schnelles, relativ einfaches und paralleles *Screening* der Zelltyp- und Stadien-spezifischen Aktivierung unterschiedlicher Promotor-Reporterkonstrukte möglich ist.

6 Literaturverzeichnis

- Aso T, Yamazaki K, Amimoto K, Kuroiwa A, Higashi H, Matsuda Y, Kitajima S, Hatakeyama M (2000) Identification and characterization of Elongin A2, a new member of the Elongin family of transcription elongation factors, specifically expressed in the testis. *J Biol Chem* 275, 6546-52.
- Balhorn R (1982) A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol* 93, 298-305.
- Bardin, C.W., Cheng, C.Y., Musto, N.A. and Gunsalus, G.L. (1988) The Sertoli cell. In: *The Physiology of Reproduction* (E. Knobil and J. Neill, eds) Raven Press, N.Y., pp 933-974.
- Bovolin P, Schlichting J, Miyata M, Ferrarese C, Guidotti A, Alho H (1990) Distribution and characterization of diazepam binding inhibitor (DBI) in peripheral tissues of rat. *Regul Pept* 29, 267-81.
- Braun RE (2001) Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat Genet* 28, 10-2.
- Breckwoldt M, Neumann F, Bräuer H: Die Hormone der Zona reticularis; in Breckwoldt M, Beier HM, Neumann F, Bräuer H: *Exempla endocrinologica. Bildatlas zur Physiologie und Morphologie des endokrinen Systems.* München, Medical Services, 1991, vol 1, pp 82-85.
- Bunch DO, Welch JE, Magyar PL, Eddy EM, O'Brien DA (1998) Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S protein distribution during mouse spermatogenesis. *Biol Reprod* 58, 834-41.
- Cheng CY, Mruk DD (2002) Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol Rev* 82, 825-74.
- Cooney AJ, Lee CT, Lin SC, Tsai SY, Tsai MJ (2001) Physiological function of the orphans GCNF and COUP-TF. *Trends Endocrinol Metab* 12, 247-51.
- Dadoune JP (2003) Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microsc Res Tech* 61, 56-75.
- Dadoune JP, Siffroi JP, Alfonsi MF (2004) Transcription in haploid male germ cells. *Int Rev Cytol* 237, 1-56.
- De Cesare D, Fimia GM, Sassone-Corsi P (2000) CREM, a master-switch of the transcriptional cascade in male germ cells. *J Endocrinol Invest* 23, 592-6.
- de Rooij DG, Russell LD (2000) All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl* 21, 776-98.
- de Rooij DG (2001) Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* 121, 347-54.
- De Smet C, Lurquin C, Lethe B, Martelange V, Boon T (1999) DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Mol Cell Biol* 19, 7327-35.
- Dix DJ, Rosario-Herrle M, Gotoh H, Mori C, Goulding EH, Barrett CV, Eddy EM (1996) Developmentally regulated expression of Hsp70-2 and a Hsp70-2/lacZ transgene during spermatogenesis. *Dev Biol* 174, 310-21.

- Dupaix, A., Pineau, C., Piquet-Pellorce, B., Jegou, B. (1996) Paracrine and autocrine regulations of spermatogenesis. In : Male gametes : production and quality (S. Hamamah and R. Miesusset) pp 47-63.
- Dym M, Fawcett DW (1970) The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 3, 308-26.
- Eddy EM (2002) Male germ cell gene expression. *Recent Prog Horm Res* 57, 103-28.
- Erkkila K, Henriksen K, Hirvonen V, Rannikko S, Salo J, Parvinen M, Dunkel L (1997) Testosterone regulates apoptosis in adult human seminiferous tubules in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 2314-21.
- Faergeman NJ, Knudsen J (1997) Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. *Biochem J* 323 (Pt 1), 1-12.
- Fawcett, D.W. and Phillips, D.M. (1969) Observations on the release of spermatozoa and on changes in the head during passage through the epididymis. *J. Reprod. Fertil. (Suppl. 6)*; 405-418
- Fawcett, D.W. (1975) Ultrastructure and function of the Sertoli cell. In: *Handbook of Physiology* (D.W. Hamilton and R.O. Greep, cds) Vol. 5. Male Reproductive System. American Physiological Society, Wash., D.C. pp 21-55.
- Feng LX, Chen Y, Dettin L, Pera RA, Herr JC, Goldberg E, Dym M (2002) Generation and in vitro differentiation of a spermatogonial cell line. *Science* 297, 392-5.
- Fenstermacher DA, Joseph DR (1997) DNA sequences and their binding proteins required for Sertoli cell-specific transcription of the rat androgen-binding protein gene. *Mol Endocrinol* 11, 1387-400.
- Fimia GM, De Cesare D, Sassone-Corsi P (1999) CBP-independent activation of CREM and CREB by the LIM-only protein ACT. *Nature* 398, 165-9.
- Fimia GM, Morlon A, Macho B, De Cesare D, Sassone-Corsi P (2001) Transcriptional cascades during spermatogenesis: pivotal role of CREM and ACT. *Mol Cell Endocrinol* 179, 17-23.
- Fitzgerald J, Hutchison WM, Dahl HH (1992) Isolation and characterisation of the mouse pyruvate dehydrogenase E1 alpha genes. *Biochim Biophys Acta* 1131, 83-90.
- Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, Bradbury EM, Schmid CW (1987) Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science* 236, 962-4.
- Gehl J (2003) Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand* 177, 437-47.
- Giorgini F, Davies HG, Braun RE (2002) Translational repression by MSY4 inhibits spermatid differentiation in mice. *Development* 129, 3669-79.
- Han SY, Zhou L, Upadhyaya A, Lee SH, Parker KL, DeJong J (2001) TFIIIAalpha/beta-like factor is encoded by a germ cell-specific gene whose expression is up-regulated with other general transcription factors during spermatogenesis in the mouse. *Biol Reprod* 64, 507-17.
- Harris GC, Nicholson HD (1998) Stage-related differences in rat seminiferous tubule contractility in vitro and their response to oxytocin. *J Endocrinol* 157, 251-7.
- Hecht NB (1990) Regulation of 'haploid expressed genes' in male germ cells. *J Reprod Fertil* 88, 679-93.

- Hecht, N.B. (1996) Posttranscriptional regulation of postmeiotic gene expression. Ernst Schering Research Foundation Workshop, Suppl. 2: 123-140
- Hisano M, Ohta H, Nishimune Y, Nozaki M (2003) Methylation of CpG dinucleotides in the open reading frame of a testicular germ cell-specific intronless gene, *Tact1/Act17b*, represses its expression in somatic cells. *Nucleic Acids Res* 31, 4797-804.
- Holdcraft RW, Braun RE (2004) Hormonal regulation of spermatogenesis. *Int J Androl* 27, 335-42.
- Howard TE, Shai SY, Langford KG, Martin BM, Bernstein KE (1990) Transcription of testicular angiotensin-converting enzyme (ACE) is initiated within the 12th intron of the somatic ACE gene. *Mol Cell Biol* 10, 4294-302.
- Huang Z, Tamura M, Sakurai T, Chuma S, Saito T, Nakatsuji N (2000) In vivo transfection of testicular germ cells and transgenesis by using the mitochondrially localized jellyfish fluorescent protein gene. *FEBS Lett* 487, 248-51.
- Iannello RC, Gould JA, Young JC, Giudice A, Medcalf R, Kola I (2000) Methylation-dependent silencing of the testis-specific *Pdha-2* basal promoter occurs through selective targeting of an activating transcription factor/cAMP-responsive element-binding site. *J Biol Chem* 275, 19603-8.
- Ibanez CF, Pelto-Huikko M, Soder O, Ritzen EM, Hersh LB, Hokfelt T, Persson H (1991) Expression of choline acetyltransferase mRNA in spermatogenic cells results in an accumulation of the enzyme in the postacrosomal region of mature spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3676-80.
- Ike A, Ohta H, Onishi M, Iguchi N, Nishimune Y, Nozaki M (2004) Transient expression analysis of the mouse ornithine decarboxylase antizyme haploid-specific promoter using in vivo electroporation. *FEBS Lett* 559, 159-64.
- Ivell R, Danner S, Fritsch M (2004) Post-meiotic gene products as targets for male contraception. *Mol Cell Endocrinol* 216, 65-74.
- Jegou B (1993) The Sertoli-germ cell communication network in mammals. *Int Rev Cytol* 147, 25-96.
- Jethanandani P, Goldberg E (2001) *Idhc* expression in non-germ cell nuclei is repressed by NF- κ B binding. *J Biol Chem* 276, 35414-21.
- Kaipia A, Toppari J, Mali P, Kangasniemi M, Alcivar AA, Hecht NB, Parvinen M (1990) Stage- and cell-specific expression of the ornithine decarboxylase gene during rat and mouse spermatogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 73, 45-52.
- Kierszenbaum AL, Tres LL (1975) Structural and transcriptional features of the mouse spermatid genome. *J Cell Biol* 65, 258-70.
- Kleene KC (2003) Patterns, mechanisms, and functions of translation regulation in mammalian spermatogenic cells. *Cytogenet Genome Res* 103, 217-24.
- Kleene KC, Distel RJ, Hecht NB (1984) Translational regulation and deadenylation of a protamine mRNA during spermiogenesis in the mouse. *Dev Biol* 105, 71-9.
- Kolmer M, Pelto-Huikko M, Parvinen M, Hoog C, Alho H (1997) The transcriptional and translational control of diazepam binding inhibitor expression in rat male germ-line cells. *DNA Cell Biol* 16, 59-72.

- Kroft TL, Jethanandani P, McLean DJ, Goldberg E (2001) Methylation of CpG dinucleotides alters binding and silences testis-specific transcription directed by the mouse lactate dehydrogenase C promoter. *Biol Reprod* 65, 1522-7.
- Leblond CP, Clermont Y (1952) Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann N Y Acad Sci* 55, 548-73.
- Li E (2002) Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* 3, 662-73.
- Lombello CB, Wada ML, Dolder H (2000) Morphological aspects of cultured rat seminiferous tubules in the presence of fetal calf serum and follicle-stimulating hormone. *J Submicrosc Cytol Pathol* 32, 103-10.
- Maeda Y, Shiratsuchi A, Namiki M, Nakanishi Y (2002) Inhibition of sperm production in mice by annexin V microinjected into seminiferous tubules: possible etiology of phagocytic clearance of apoptotic spermatogenic cells and male infertility. *Cell Death Differ* 9, 742-9.
- Mali P, Kaipia A, Kangasniemi M, Toppari J, Sandberg M, Hecht NB, Parvinen M (1989) Stage-specific expression of nucleoprotein mRNAs during rat and mouse spermiogenesis. *Reprod Fertil Dev* 1, 369-82.
- Martianov I, Brancorsini S, Gansmuller A, Parvinen M, Davidson I, Sassone-Corsi P (2002) Distinct functions of TBP and TLF/TRF2 during spermatogenesis: requirement of TLF for heterochromatic chromocenter formation in haploid round spermatids. *Development* 129, 945-55.
- Matsumoto M, Kurata S, Fujimoto H, Hoshi M (1993) Haploid specific activations of protamine 1 and hsc70t genes in mouse spermatogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1174, 274-8.
- Miller T, Williams K, Johnstone RW, Shilatifard A (2000) Identification, cloning, expression, and biochemical characterization of the testis-specific RNA polymerase II elongation factor ELL3. *J Biol Chem* 275, 32052-6.
- Millette CF, Bellve AR (1977) Temporal expression of membrane antigens during mouse spermatogenesis. *J Cell Biol* 74, 86-97.
- Mills NC, Van NT, Means AR (1977) Histones of rat testis chromatin during early postnatal development and their interactions with DNA. *Biol Reprod* 17, 760-8.
- Morales C, Clermont Y, Nadler NJ (1986) Cyclic endocytic activity and kinetics of lysosomes in Sertoli cells of the rat: a morphometric analysis. *Biol Reprod* 34, 207-18.
- Morales CR, Hake LE, Hecht NB (1993) Cellular localization of the mRNAs of the somatic and testis-specific cytochromes c during spermatogenesis in the rat. *Mol Reprod Dev* 34, 196-205.
- Muramatsu T, Nakamura A, Park HM (1998) In vivo electroporation: a powerful and convenient means of nonviral gene transfer to tissues of living animals (Review). *Int J Mol Med* 1, 55-62.
- Muramatsu T, Shibata O, Ryoki S, Ohmori Y, Okumura J (1997) Foreign gene expression in the mouse testis by localized in vivo gene transfer. *Biochem Biophys Res Commun* 233, 45-9.
- Nakanishi Y, Shiratsuchi A (2004) Phagocytic removal of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells: mechanisms and consequences. *Biol Pharm Bull* 27, 13-6.
- Nantel F, Sassone-Corsi P (1996) CREM: a transcriptional master switch during the spermatogenesis differentiation program. *Front Biosci* 1, d266-9.

- Nayernia K, Burkhardt E, Beimesche S, Keime S, Engel W (1992) Germ cell-specific expression of a proacrosin-CAT fusion gene in transgenic mouse testis. *Mol Reprod Dev* 31, 241-8.
- Nayernia K, Nieter S, Kremling H, Oberwinkler H, Engel W (1994 A) Functional and molecular characterization of the transcriptional regulatory region of the proacrosin gene. *J Biol Chem* 269, 32181-6.
- Nayernia K, Reim K, Oberwinkler H, Engel W (1994 B) Diploid expression and translational regulation of rat acrosin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 202, 88-93.
- Ogbourne S, Antalis TM (1998) Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem J* 331 (Pt 1), 1-14.
- Onoda M, Suarez-Quian CA, Djakiew D, Dym M (1990) Characterization of Sertoli cells cultured in the bicameral chamber system: relationship between formation of permeability barriers and polarized secretion of transferrin. *Biol Reprod* 43, 672-83.
- O'Rand MG, Romrell LJ (1977) Appearance of cell surface auto- and isoantigens during spermatogenesis in the rabbit. *Dev Biol* 55, 347-58.
- Ozer J, Moore PA, Lieberman PM (2000) A testis-specific transcription factor IIA (TFIIAtau) stimulates TATA-binding protein-DNA binding and transcription activation. *J Biol Chem* 275, 122-8.
- Papadopoulos V (1993) Peripheral-type benzodiazepine/diazepam binding inhibitor receptor: biological role in steroidogenic cell function. *Endocr Rev* 14, 222-40.
- Parvinen M, Wright WW, Phillips DM, Mather JP, Musto NA, Bardin CW (1983) Spermatogenesis in vitro: completion of meiosis and early spermiogenesis. *Endocrinology* 112, 1150-2.
- Pelletier RM, Byers SW (1992) The blood-testis barrier and Sertoli cell junctions: structural considerations. *Microsc Res Tech* 20, 3-33.
- Persson H, Pelto-Huikko M, Metsis M, Soder O, Brene S, Skog S, Hokfelt T, Ritzen EM (1990) Expression of the neurotransmitter-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase in male germ cells. *Mol Cell Biol* 10, 4701-11.
- Peschon JJ, Behringer RR, Brinster RL, Palmiter RD (1987) Spermatid-specific expression of protamine 1 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 5316-9.
- Pflieger-Bruss S, Hanf V, Behnisch P, Hagenmaier H, Rune GM (1999) Effects of single polychlorinated biphenyls on the morphology of cultured rat tubuli seminiferi. *Andrologia* 31, 77-82.
- Pointud JC, Mengus G, Brancorsini S, Monaco L, Parvinen M, Sassone-Corsi P, Davidson I (2003) The intracellular localisation of TAF7L, a paralogue of transcription factor TFIIID subunit TAF7, is developmentally regulated during male germ-cell differentiation. *J Cell Sci* 116, 1847-58.
- Pratt SA, Shur BD (1993) Beta-1,4-galactosyltransferase expression during spermatogenesis: stage-specific regulation by t alleles and uniform distribution in + -spermatids and t-spermatids. *Dev Biol* 156, 80-93.
- Pusch W, Balvers M, Hunt N, Ivell R (1996) A novel endozepine-like peptide (ELP) is exclusively expressed in male germ cells. *Mol Cell Endocrinol* 122, 69-80.

- Pusch W, Balvers M, Weinbauer GF, Ivell R (2000) The rat endozepine-like peptide gene is highly expressed in late haploid stages of male germ cell development. *Biol Reprod* 63, 763-8.
- Pusch W, Jahner D, Spiess AN, Ivell R (1999) Rat endozepine-like peptide (ELP): cDNA cloning, genomic organization and tissue-specific expression. *Gene* 235, 51-7.
- Rajkovic M, Middendorff R, Wetzel MG, Frkovic D, Damerow S, Seitz HJ, Weitzel JM (2004) Germ cell nuclear factor relieves cAMP-response element modulator tau-mediated activation of the testis-specific promoter of human mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem* 279, 52493-9.
- Rasmussen JT, Rosendal J, Knudsen J (1993) Interaction of acyl-CoA binding protein (ACBP) on processes for which acyl-CoA is a substrate, product or inhibitor. *Biochem J* 292 (Pt 3), 907-13.
- Reddi PP, Flickinger CJ, Herr JC (1999 A) Round spermatid-specific transcription of the mouse SP-10 gene is mediated by a 294-base pair proximal promoter. *Biol Reprod* 61, 1256-66.
- Reddi PP, Kallio M, Herr JC (1999 B) Green fluorescent protein as a reporter for promoter analysis of testis-specific genes in transgenic mice. *Methods Enzymol* 302, 272-84.
- Reddi PP, Shore AN, Acharya KK, Herr JC (2002) Transcriptional regulation of spermiogenesis: insights from the study of the gene encoding the acrosomal protein SP-10. *J Reprod Immunol* 53, 25-36.
- Reddi PP, Shore AN, Shapiro JA, Anderson A, Stoler MH, Acharya KK (2003) Spermatid-specific promoter of the SP-10 gene functions as an insulator in somatic cells. *Dev Biol* 262, 173-82.
- Reeves RH, Gearhart JD, Hecht NB, Yelick P, Johnson P, O'Brien SJ (1989) Mapping of PRM1 to human chromosome 16 and tight linkage of Prm-1 and Prm-2 on mouse chromosome 16. *J Hered* 80, 442-6.
- Russell L (1977) Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. *Am J Anat* 148, 313-28.
- Russell LD (1978) The blood-testis barrier and its formation relative to spermatocyte maturation in the adult rat: a lanthanum tracer study. *Anat Rec* 190, 99-111.
- Russell, L.D. (1984) Spermiation – the sperm release process: Ultrastructural observations and unresolved problems. In: *Electron Microscopy in Biology and Medicine, Ultrastructure of Reproduction*. (J. Van Blerkom and P.M. Motta, eds), Chapter 5, Plenum Press New York, pp 46-65
- Russell LD, Ettlin RA, Hikim PS, Clegg ED (1990) *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Cache River Press, Clearwater, FL.
- Sambrook, F., Fritsch, E.F., Maniatis, F. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York
- Sassone-Corsi P (2002 A) Editorial: Never enough--on the multiplicity and uniqueness of transcriptional regulators in postmeiotic male germ cells. *Endocrinology* 143, 1575-7.
- Sassone-Corsi P (2002 B) Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science* 296, 2176-8.
- Savill J, Fadok V (2000) Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407, 784-8.

- Schmidt EE, Schibler U (1995) High accumulation of components of the RNA polymerase II transcription machinery in rodent spermatids. *Development* 121, 2373-83.
- Schmidt, E.E., Hanson, E.S., Capecchi, M.R. (1999) Sequence-independent assembly of spermetid mRNAs into messenger ribonucleoprotein particles. *Mol Cell Biol* 19 (5), 3904-3915
- Schulten HJ, Nayernia K, Reim K, Engel W, Burfeind P (2001) Assessment of promoter elements of the germ cell-specific proacrosin gene. *J Cell Biochem* 83, 155-62.
- Schultz R, Pelto-Huikko M, Alho H (1992) Expression of diazepam binding inhibitor-like immunoreactivity in rat testis is dependent on pituitary hormones. *Endocrinology* 130, 3200-6.
- Schulze C (1974) On the morphology of the human Sertoli cell. *Cell Tissue Res* 153, 339-55.
- Seidl K, Holstein AF (1990) Organ culture of human seminiferous tubules: a useful tool to study the role of nerve growth factor in the testis. *Cell Tissue Res* 261, 539-47.
- Setchell, B.P. (1978) *The Mammalian Testis*. Paul Elik, Lond.
- Sharpe RM, Kerr JB, McKinnell C, Millar M (1994) Temporal relationship between androgen-dependent changes in the volume of seminiferous tubule fluid, lumen size and seminiferous tubule protein secretion in rats. *J Reprod Fertil* 101, 193-8.
- Shoji M, Chuma S, Yoshida K, Morita T, Nakatsuji N (2005) RNA interference during spermatogenesis in mice. *Dev Biol* 282, 524-34.
- Singal R, vanWert J, Bashambu M, Wolfe SA, Wilkerson DC, Grimes SR (2000) Testis-specific histone H1t gene is hypermethylated in nongerminal cells in the mouse. *Biol Reprod* 63, 1237-44.
- Sinha Hikim AP, Swerdloff RS (1999) Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod* 4, 38-47.
- Somboonthum P, Ohta H, Yamada S, Onishi M, Ike A, Nishimune Y, Nozaki M (2005) cAMP-responsive element in TATA-less core promoter is essential for haploid-specific gene expression in mouse testis. *Nucleic Acids Res* 33, 3401-11.
- Staub C, Hue D, Nicolle JC, Perrard-Sapori MH, Segretain D, Durand P (2000) The whole meiotic process can occur in vitro in untransformed rat spermatogenic cells. *Exp Cell Res* 260, 85-95.
- Sugiura S, Kashiwabara S, Iwase S, Baba T (2003) Expression of a testis-specific form of TBP-related factor 2 (TRF2) mRNA during mouse spermatogenesis. *J Reprod Dev* 49, 107-11.
- Tanaka H, Baba T (2005) Gene expression in spermiogenesis. *Cell Mol Life Sci* 62, 344-54.
- Tascou S, Nayernia K, Samani A, Schmidtke J, Vogel T, Engel W, Burfeind P (2000) immortalization of murine male germ cells at a discrete stage of differentiation by a novel directed promoter-based selection strategy. *Biol Reprod* 63, 1555-61.
- Topaloglu O, Schluter G, Nayernia K, Engel W (2001) A 74-bp promoter of the *Tnp2* gene confers testis- and spermatid-specific expression in transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 289, 597-601.
- Toppari J, Parvinen M (1985) In vitro differentiation of rat seminiferous tubular segments from defined stages of the epithelial cycle morphologic and immunolocalization analysis. *J Androl* 6, 334-43.

- Tres LL, Cahn F, Kierszenbaum AL (1992) Permeable collagen-glycosaminoglycan cross-linked copolymers for the study of biological responses of cocultured Sertoli and spermatogenic cells. *Cell Biol Toxicol* 8, 61-71.
- Ulvik NM, Dahl E (1981) Stage-dependent variations in volume density and size of Sertoli cell vesicles in the rat testis. *Cell Tissue Res* 221, 311-20.
- Upadhyaya AB, Lee SH, DeJong J (1999) Identification of a general transcription factor TFIIA α /beta homolog selectively expressed in testis. *J Biol Chem* 274, 18040-8.
- Valentin M, Balvers M, Pusch W, Weinbauer GF, Knudsen J, Ivell R (2000) Structure and expression of the mouse gene encoding the endozepine-like peptide from haploid male germ cells. *Eur J Biochem* 267, 5438-49.
- Walter CA, Trolan DA, McFarland MB, Street KA, Gurram GR, McCarrey JR (1996) Xrcc-1 expression during male meiosis in the mouse. *Biol Reprod* 55, 630-5.
- Walther N, Jansen M, Ergun S, Kascheike B, Ivell R (1996) Sertoli cell lines established from H-2Kb-tsA58 transgenic mice differentially regulate the expression of cell-specific genes. *Exp Cell Res* 225, 411-21.
- Weber JE, Russell LD (1987) A study of intercellular bridges during spermatogenesis in the rat. *Am J Anat* 180, 1-24.
- Weber JE, Russell LD, Wong V, Peterson RN (1983) Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell: II. Morphometry of Sertoli--Sertoli and Sertoli--germ-cell relationships. *Am J Anat* 167, 163-79.
- Weitzel JM, Shiryayeva NB, Middendorff R, Balvers M, Radtke C, Ivell R, Seitz HJ (2003) Testis-specific expression of rat mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in haploid male germ cells. *Biol Reprod* 68, 699-707.
- Welch JE, Schatte EC, O'Brien DA, Eddy EM (1992) Expression of a glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene specific to mouse spermatogenic cells. *Biol Reprod* 46, 869-78.
- Widlak W, Scieglinska D, Vydra N, Malusecka E, Krawczyk Z (2003) In vivo electroporation of the testis versus transgenic mice model in functional studies of spermatocyte-specific hst70 gene promoter: A comparative study. *Mol Reprod Dev* 65, 382-8.
- Wolkowicz, M.J., Coonrod, S.M., Reddi, P.P., Millan, J.I., Hofmann, M.-C., Herr, J.C. (1996) Refinement of the differentiated phenotype of the spermatogenic cell line GC-2spd(ts). *Biol Reprod* 55, 923-932
- Wong V, Russell LD (1983) Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell: I. Methods, basic configuration, and dimensions. *Am J Anat* 167, 143-61.
- Wright RM, John E, Klotz K, Flickinger CJ, Herr JC (1990) Cloning and sequencing of cDNAs coding for the human intra-acrosomal antigen SP-10. *Biol Reprod* 42, 693-701.
- Yamagata K, Murayama K, Okabe M, Toshimori K, Nakanishi T, Kashiwabara S, Baba T (1998) Acrosin accelerates the dispersal of sperm acrosomal proteins during acrosome reaction. *J Biol Chem* 273, 10470-4.
- Yamazaki Y, Fujimoto H, Ando H, Ohyama T, Hirota Y, Noce T (1998) In vivo gene transfer to mouse spermatogenic cells by deoxyribonucleic acid injection into seminiferous tubules and subsequent electroporation. *Biol Reprod* 59, 1439-44.

- Yamazaki Y, Yagi T, Ozaki T, Imoto K (2000) In vivo gene transfer to mouse spermatogenic cells using green fluorescent protein as a marker. *J Exp Zool* 286, 212-8.
- Yan, Z.H and Jetten, A.M., Characterization of the repressor function of the nuclear orphan receptor retinoid receptor-related testis-associated receptor/germ cell nuclear factor. *J Biol Chem* 275, 35077-35085
- Zambrowicz BP, Harendza CJ, Zimmermann JW, Brinster RL, Palmiter RD (1993) Analysis of the mouse protamine 1 promoter in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5071-5.
- Zambrowicz BP, Palmiter RD (1994) Testis-specific and ubiquitous proteins bind to functionally important regions of the mouse protamine-1 promoter. *Biol Reprod* 50, 65-72.
- Zhong, J., Peters, A.H., Kafer, K., Braun, R.E. (2001) A highly conserved sequence essential for translational repression of the protamine 1 messenger rna in murine spermatids. *Biol Reprod* 64, 1784-1789

7 Abkürzungen und Glossar

7.1 Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABP	Androgen-bindendes Protein (<i>androgen binding protein</i>)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cAMP	zyklisches (<i>cyclic</i>) Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CMV	Cytomegalie-Virus
CREM	<i>cAMP-responsive element modulator</i>
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DHT	Dihydrotestosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNase I	Desoxyribonuclease I
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
ds	doppelsträngig
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELP	Endozepin-ähnliches Peptid (<i>endozepine-like peptide</i>)
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
f.c.	Endkonzentration (<i>final concentration</i>)
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
G	Guanosin
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GCNF	<i>germ cell nuclear factor</i>
GnRH	Gonadotropin-freisetzendes Hormon (<i>gonadotropin releasing hormone</i>)
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
HPG-Achse	Hypothalamo-hypophysär-gonadale Achse (<i>hypothalamic-pituitary-gonadal axis</i>)
hsp	Hitzeschockprotein (<i>heat shock protein</i>)
IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (<i>insulin growth factor</i>)
IPTG	Isopropyl- β -Galactopyranosid
kb	Kilobasen (RNA), Kilobasenpaare (DNA)

kD	Kilodalton
KO	<i>knock-out</i>
LB	Luria Bertami
LH	Luteinisierendes Hormon
M	Molar
m	Masse
MCS	multiple Klonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
min	Minute
µl	Mikroliter
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
n	Stoffmenge
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PC	Computer (<i>personal computer</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	Hydrogenanion-Exponent (<i>potentia hydrogenii</i>)
PNA	<i>peanut agglutinin</i>
POL	Polymerase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SF-1	steroidogener Faktor-1 (<i>steroidogenic factor-1</i>)
sog.	sogenannt(e)
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
N-Terminus	Amino-Terminus
C-Terminus	Carboxy-Terminus
TMR	Tetra-Methyl-Rhodamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TUNEL	<i>terminal dUTP nick end labeling</i>
U	Einheit (<i>unit</i>)
ü.N.	über Nacht
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
(v/v)	Volumen/Volumen
(w/v)	Masse/Volumen
(w/w)	Masse/Masse
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galactopyranosid

7.2 Glossar

Acyl-CoA	Acylthioester des Coenzym A, eine aktivierte Fettsäure
<i>annealing</i>	Anlagerung eines <i>Primers</i> an sein <i>Template</i> (engl.)
<i>antisense</i> -Strang	zu der mRNA komplementäre DNA-Strang (engl.)
Assay	Test/Untersuchung (engl.)
Konsensus	Übereinstimmung (lat.)
Elongation	Verlängerung von DNA mittels Polymerasen (lat.)
<i>heat shock</i> -Proteine	Proteine, welche andere Proteine in ihrer Konformation stabilisieren (engl.)
<i>Insert</i>	in einen Plasmidvektor einkloniertes dsDNA-Fragment (engl.)
<i>in vitro</i>	„im Reagenzglas“, d. h. im Versuch außerhalb des Organismus
<i>in vivo</i>	„im Leben“, d. h. im lebenden Organismus
<i>knock-out</i>	gezieltes Ausschalten eines Gens durch homologe Rekombination (engl.)
<i>Overlay</i>	Überlagerung (z. B. von Mikroskopbildern) (engl.)
<i>Pellet</i>	Kügelchen (engl.), beim Zentrifugieren entstehende Ansammlung am Boden
<i>Primer</i>	Oligonukleotid, welches als Startermolekül für DNA-Polymerasen dient (engl.)
<i>Screening</i>	Durchmustern (engl.)
<i>sense</i> -Strang	der mRNA entsprechende DNA-Strang (engl.)
<i>sense</i> -Primer	der Sequenz des <i>sense</i> -Stranges entsprechender Primer (engl.)
<i>sticky ends</i>	überhängende Enden eines dsDNA-Fragmentes nach Restriktionsverdau (engl.)
<i>Thermocycler</i>	PCR-Maschine (engl.)
Transkripte	die mRNA eines umgeschriebenen Gens (lat.)
<i>Tweezerrodes</i>	pinzettenähnliche Elektroden (engl.)
Vortexer	Apparatur zum Durchmischen kleiner Reaktionsgefäße
<i>Well</i>	Vertiefung in einer Zellkultur- oder Mikrotiterplatte (engl.)

8 Danksagung

Diese Arbeit wurde im Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung an der Universität Hamburg begonnen und in der Arbeitsgruppe „Molekulare Andrologie“ des Universitätskrankenhauses Eppendorf zu Ende geführt.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ivell, der es mir ermöglicht hat, meine Doktorarbeit am IHF zu beginnen und der mir dieses interessante Thema zur Verfügung gestellt hat.

Frau Prof. Dr. Dobler möchte ich ganz herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Ebenso dankbar bin ich Herrn Prof. Dr. Wiese für die freundliche Übernahme des Disputationsgutachtens.

Einen besonderen Dank möchte ich Frau Prof. Dr. Kirchhoff aussprechen, die mich trotz der schwierigen Umstände so gut betreut und motiviert hat. Außerdem bedanke ich mich auch ganz herzlich für die Übernahme des Disputationsgutachtens und für das schnelle und ausführliche Korrekturlesen.

Für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe „Molekulare Andrologie“ am UKE möchte ich Herrn Prof. Dr. Schulze danken.

Nadine, Andrej-Nikolai, Stefan, Anja, Ralph, Caro und Martina möchte ich für die tolle Zusammenarbeit, das angenehme Arbeitsklima und die steten Aufmunterungen danken.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei all den ehemaligen IHF-Kollegen bedanken, die mich mit so vielen Ratschlägen unterstützt haben und mir jederzeit hilfreich zur Seite standen.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich meinen Freunden und Bekannten aussprechen, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und bei Bedarf für die nötige Ablenkung gesorgt haben.

Der größte Dank geht an meine Eltern, die mich so liebevoll unterstützt und ermutigt haben.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Sandra Danner
Anschrift	Hohe Weide 50 20253 Hamburg
Geburtsdatum	22. 11. 1975
Geburtsort	Hamburg
Familienstand	ledig

Schulbildung

1982–1986	Grundschule Kielortallee, Hamburg
1986–1995	Gymnasium Kaiser-Friedrich-Ufer, Hamburg
1995	Abitur

Hochschulstudium

10/1995–03/2001	Studium der Biologie an der Universität Hamburg
03/2001–12/2001	Diplomarbeit am Biozentrum Klein Flottbek, Arbeitsbereich „Angewandte Molekularbiologie der Pflanzen“, Universität Hamburg
04/2002–01/2004	Beginn der Promotion am Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung an der Universität Hamburg, Arbeitsbereich „Gonadale Genregulation“
01/2004–07/2005	Weiterführung der Promotion in der Abteilung für Andrologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, Arbeitseinheit „Molekulare Andrologie“