

Aus dem Institut für Anatomie I: Zelluläre Neurobiologie

Zentrum für Experimentelle Medizin

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Direktorin: Prof. Dr. med. G. Rune

**Expression von Angiogenesefaktoren im nativen menschlichen
Hodengewebe
und funktionelle Studien im organotypischen Tubulusmodell**

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von

Roya Schwarz

Hamburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG.....	5
2	EINLEITUNG	6
2.1	ORGANISATION DER MIKROVASKULATUR DES MENSCHLICHEN HODENS	7
2.2	VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) UND SEINE REZEPTOREN.....	10
2.2.1	<i>Regulation der Expression von VEGF.....</i>	<i>13</i>
2.3	VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) UND SEINE REZEPTOREN IM MENSCHLICHEN HODEN.....	14
2.4	CARCINOEMBRYONAL ANTIGEN-RELATED CELL ADHESION MOLECULE-1 (CEACAM1).....	15
3	MATERIAL UND METHODEN.....	18
3.1	EINGESETZTE HODENGeweBE ZUR UNTERSUCHUNG DER CEACAM1 EXPRESSION.....	18
3.1.1	<i>Normales Hodengewebe</i>	<i>18</i>
3.1.2	<i>Tumorgewebe</i>	<i>18</i>
3.2	MORPHOLOGISCHE ANALYSE DES HODENGeweBEs	19
3.2.1	<i>Morphologische Untersuchungen an Semidünnschnitten.....</i>	<i>19</i>
3.2.2	<i>Morphologische Untersuchungen an Paraffinschnitten</i>	<i>19</i>
3.3	PROBEN DES MENSCHLICHEN EJAKULATS.....	20
3.4	ORGANOTYPISCHES KULTURMODELL AUS MENSCHLICHEN HODENKANÄLCHEN.....	20
3.5	SDS-PAGE UND WESTERN BLOT	21
3.6	IMMUNHISTOCHEMIE	23
4	ERGEBNISSE	25
4.1	MORPHOLOGISCHE DARSTELLUNG DES UNTERSUCHTEN GWeBEs	25
4.1.1	<i>Normales menschliches Hodengewebe.....</i>	<i>25</i>
4.1.2	<i>Lichtmikroskopische Darstellung isolierter Samenkanälchen.....</i>	<i>27</i>
4.2	MENSCHLICHES HODENGeweBE MIT GESTÖRTER SPERMATOGENESE	28
4.2.1	<i>Samenkanälchen ohne Keimzellen.....</i>	<i>28</i>
4.2.2	<i>Hodengewebe mit frühen Keimzelltumoren.....</i>	<i>28</i>
4.2.3	<i>Induzierte Spermatogenesestörung durch Kultivierung</i>	<i>28</i>
4.3	EXPRESSION VON VEGF UND SEINEM REZEPTOR VEGFR-2 IM NORMALEN MENSCHLICHEN HODENGeweBE UND IN NORMALEN ISOLIERTEN HODENKANÄLCHEN	29
4.4	EXPRESSION VON VEGF UND SEINEN REZEPTOREN VEGFR-1 UND VEGFR-2 IN KULTIVIERTEN SAMENKANÄLCHEN	30
4.5	IMMUNHISTOCHEMISCHE LOKALISATION VON CEACAM1	34
4.5.1	<i>Expression von CEACAM1 in normalem Keimepithel</i>	<i>34</i>
4.5.2	<i>Expression von CEACAM1 im Ductus epididymidis</i>	<i>36</i>
4.5.3	<i>Expression von CEACAM1 in Samenkanälchen, die ausschließlich Sertoli-Zellen enthalten.....</i>	<i>37</i>
4.5.4	<i>Expression von CEACAM1 bei gestörter Spermatogenese.....</i>	<i>38</i>
4.5.5	<i>Expression von CEACAM1 in Keimzelltumoren.....</i>	<i>40</i>
4.6	EXPRESSION VON CEACAM1 NACH STIMULATION MIT VEGF	42

4.7	CEACAM1-NACHWEIS IM HUMANEN TESTIKULÄREN UND EPIDIDYMALEN GEWEBE SOWIE TESTIKULÄREN TUMOREN MITTELS WESTERN BLOT.....	43
4.8	CEACAM1-NACHWEIS IM MENSCHLICHEN EJAKULAT.....	43
5	DISKUSSION	45
5.1	DAS <i>EX-VIVO-KULTURMODELL</i> DER SAMENKANÄLCHEN IST GEEIGNET FÜR DAS STUDIUM DER EXPRESSION ANGIOGENETISCHER FAKTOREN IM KEIMEPITHEL	45
5.2	DIE EXPRESSION VON CEACAM1 STEHT IN RELATION ZUR EXPRESSION VON VEGF UND VEGFR-2 IN SERTOLI-ZELLEN	46
5.3	CEACAM1 IST INVOLVIERT IN DIE TUBULÄRE ORGANISATION DES KEIMEPITHELS.....	47
5.4	CEACAM1 IST EXPRIMIERT IN DEN KLEINEN BLUTGEFÄßEN VON SEMINOMEN.....	52
6	ABKÜRZUNGEN.....	55
7	LITERATUR	56
8	PUBLIKATION.....	77
9	DANKSAGUNG	78
10	LEBENS LAUF	79
11	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	80

1 Zusammenfassung

Die Interaktion zwischen Keimzellen und Sertoli-Zellen ist von entscheidender Bedeutung für die Spermatogenese. Neben endokrinen Faktoren spielen hierbei auch Angiogenesefaktoren wie VEGF und Zelladhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle. Jedoch ist die Bedeutung dieser Faktoren nicht ausreichend geklärt. Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Rolle angiogenetischer Faktoren wie VEGF und des pro-angiogenetischen Zelladhäsionsmoleküls CEACAM1 bei der Spermatogenese zu untersuchen. Immunhistochemische Analysen ergaben ein dem normalen Hodengewebe entsprechendes Expressionsmuster für VEGF und seine Rezeptoren, VEGFR-1 und VEGFR-2, in Sertoli-Zellen kultivierter Samenkanälchen. Die VEGF-Expression stieg deutlich am 7. und die von VEGFR-2 am 4. Kulturtag an. An Paraffinschnitten des normalen Hodengewebes wurde CEACAM1 nur im adluminalen Abschnitt der Sertoli-Zellen gefunden. Auch im Nebenhodengang war CEACAM1 an der luminalen Epitheloberfläche des Nebenhodenganges nachweisbar. Western Blot-Analysen an Proteinextrakten aus dem Hodengewebe bestätigten diese Ergebnisse und ergaben zwei Banden in der erwarteten Höhe von 160 und 120 kDa. Auch im Ejakulat fertiler Individuen war CEACAM1 nachweisbar. In kultivierten Samenkanälchen nahm die CEACAM1-Färbung in Sertoli-Zellen ab dem 3. Kulturtag zu und war wie bei VEGF am 7. Kulturtag am stärksten. Bemerkenswerterweise erreichte die Färbung ab dem 4. Kulturtag auch die basalen Abschnitte der Sertoli-Zellen. Unter Stimulation der Samenkanälchen mit VEGF nahm die Intensität der CEACAM1-Färbung in Sertoli-Zellen bereits ab dem 2. Kulturtag zu, in vergleichbarer Stärke wie in Sertoli-Zellen der Samenkanälchen mit Carcinoma-in-Situ (CIS). Interessanterweise waren Samenkanälchen, die ausschließlich Sertoli-Zellen enthielten, negativ für CEACAM1. Zusammenfassend zeigen die hier vorgestellten Befunde, daß angiogenetische Faktoren wie VEGF die Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie CEACAM1 in Sertoli-Zellen regulieren und damit die innere Struktur des Keimepithels sowie den regulären Ablauf der Spermatogenese beeinflussen.

2 Einleitung

Das Hodengewebe ist prinzipiell in zwei Kompartimente zu unterteilen, ein tubuläres Kompartiment, welches das Keimepithel beinhaltet und in dem die Spermatogenese stattfindet, sowie ein interstitielles Kompartiment mit hormonproduzierenden Leydigzellen und Gefäßen. Das Keimepithel besteht aus Sertoli-Zellen und Keimzellen. Die Sertoli-Zellen spielen eine entscheidende Rolle für die Aufrechterhaltung der tubulären Struktur und den geregelten Ablauf der Spermatogenese, indem sie durch spezielle Zell-Zellkontakte das Keimepithel in ein basales und ein adluminales Kompartiment gliedern. Unter diesen Zell-Zellkontakten bilden *Tight-junctions* zwischen den Sertoli-Zellen das morphologische Korrelat der Blut-Hoden-Schranke (Dym and Fawcett, 1970, Schulze, 1984, Wong et al., 2004, Yan HH and Cheng CY, 2005).

Das basale Kompartiment enthält die Stammzellen der Spermatogenese (Spermatogonien) und im adluminalen Kompartiment differenzieren sich die Keimzellen bis zu den reifen Spermatiden. Während der Proliferation, Differenzierung und Reifung bleiben diese solange in einem interaktiven Kontakt mit Sertoli-Zellen, bis sie als reife Spermatiden in das Lumen der Samenkanälchen abgegeben werden.

Die Spermatogenese des menschlichen Hodens ist ein komplexer Prozess, bei dem die Spermatogenesestadien räumlich versetzt vorkommen, so dass eine spiralförmige Anordnung innerhalb der Samenkanälchen entsteht (Schulze, 1984).

Die Steuerung der Spermatogenese und Hormonproduktion wird einerseits systemisch durch die Hypothalamus-Hypophysen-Gonadenachse, andererseits durch lokale regulative Mechanismen, also über parakrine und autokrine Regulationsprozesse, ermöglicht. Beide Achsen wirken auf beide Kompartimente des Hodens. Hierbei spielt die Mikrovaskulatur des Hodens über Versorgungsaspekte hinaus für die hormonelle Steuerung und Regulation der Spermatogenese eine wichtige Rolle (Damberg et al., 1992, Ergün et al., 1996).

2.1 Organisation der Mikrovaskulatur des menschlichen Hodens

Die beiden Kompartimente des Hodengewebes, also Tubuli Seminiferi und das Interstitium, sind über die Mikrovaskulatur miteinander verbunden (Abb. 1). Das zuführende Blutgefäß ist die **A. testikularis**. Ihre Endäste treten in das Hilum des Hodens ein und verlaufen dann in der inneren Schicht der Tunica albuginea.

Von hier aus gehen **Zentripetale Gefäße** aus, die innerhalb der Septula testis bis zum Rete testis ziehen. Hier bilden sie Gefäßschlaufen, deren rückläufige Schenkel als **Aa. recurrentes** innerhalb der Lobuli testis ziehen in Richtung Tunica albuginea. Dabei verzweigen sie sich innerhalb der Hodenläppchen im interstitiellen Gewebe und geben in regelmäßigen Abständen **Aa. segmentales** ab (Ergün et al., 1994). Aus den Ästen der Aa. segmentales hervorgehende **Kapillaren** werden zunächst von Leydig-Zellgruppen ummantelt, erreichen die Wand der Samenkanälchen (**Lamina propria**) und verlaufen dann als **Intramurale Kapillaren** innerhalb der Lamina propria. Nach dem Verlassen der Lamina propria werden diese Kapillaren erneut von Leydigzellen ummantelt, bevor sie schließlich in **Venulen** einmünden. Interessanterweise ist die kapilläre Strecke innerhalb der Lamina propria von Samenkanälchen teilweise fenestriert, ein morphologischer Hinweis auf eine besondere funktionelle Bedeutung dieser kapillären Strecke. Nährstoffe, Hormone und andere regulative Faktoren gelangen so über die Mikrovaskulatur (intramurale Kapillaren) zum Keimepithel (Ergün et al., 1997). Das Keimepithel selbst ist avaskulär.

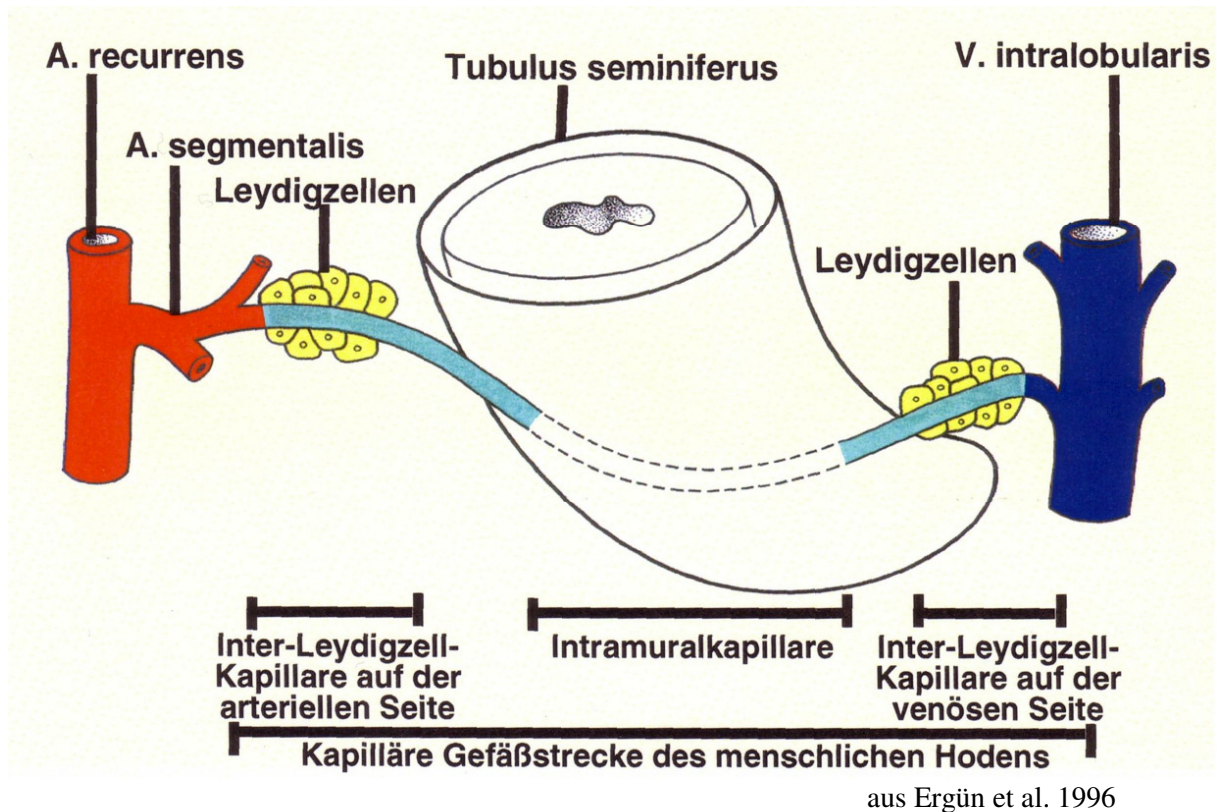


Abb. 1: Kapilläre Gefäßstrecke des menschlichen Hodens

Die graphische Darstellung gibt die kapilläre Gefäßstrecke in Zusammenhang mit Leydigzellen und Tubuli seminiferi beim Menschen wieder.

Die Permeabilität der testikulären Mikrovaskulatur ist für den Transport und die gleichmäßige Verteilung der Hormone sowie der lokal gebildeten Faktoren zwischen den Gewebskompartimenten des Hodens von großer Bedeutung (Damberg et al., 1992, Ergün et al., 1996). Daher bilden Substanzen, die die Kapillarisierung des Hodens und die Gefäßdurchlässigkeit der Hodengefäße steuern, eine wesentliche Grundlage für den Erhalt der Spermatogenese und somit der männlichen Fertilität.

Der potenteste Faktor darunter, welcher bei physiologischen und pathologischen Prozessen die Gefäßdurchlässigkeit reguliert und bei der Vaskularisation von Tumorgewebe eine zentrale Rolle spielt, ist der **Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)** (Dvorak et al., 1995 Senger et al., 1993). Hierbei wird VEGF hauptsächlich von Geweben oder Zellgruppen gebildet, die den Blutgefäßen benachbart sind. Die Rezeptoren für VEGF, VEGFR-1 und

VEGFR-2 sind zunächst hauptsächlich auf Endothelzellen gefunden worden. VEGF führt *in vitro* zur Migration und Proliferation der Endothelzellen und induziert *in vivo* die Angiogenese.

Unter dem Begriff **Angiogenese** versteht man die Neubildung von Blutgefäßen aus bereits bestehenden Gefäßen (Folkman, 1984, Risau, 1997, Carmeliet, 2000). Dieses ist ein hoch komplexer Vorgang, der mit der gezielten und strikt lokalisierten Auflösung der Gefäßwand beginnt und mit der Bildung mehr oder weniger ausgereifter neuer Gefäßstrukturen endet (Grant und Kleinman, 1997). In Gang gesetzt wird dieser Prozeß in aller Regel durch die kontrollierte Freisetzung von sogenannten angiogenen Faktoren und die präzise regulierte Expression der entsprechenden Rezeptoren für diese Faktoren auf den Gefäßendothelzellen (Vailhé et al., 2001). Physiologisch betrachtet findet Angiogenese bei der embryologischen Entwicklung sowie bei der Organentwicklung in der fetalen Periode statt (Risau und Flamme, 1995). Im adulten Organismus kommt Angiogenese im Rahmen zyklischer Prozesse im Eierstock, in der Plazenta und bei den zyklischen Veränderungen des Endometriums vor (Modlich et al., 1996). Sie ist auch an der Entwicklung der Milchdrüsengänge im adulten Organismus beteiligt (Asahara et al., 1997, Asahara et al., 1999, Lin et al., 2000, Luttun et al., 2002, Ribatti et al., 2001, Shi et al., 1998). Bei der Wundheilung und in zahlreichen pathologischen Prozessen, wie Wachstum und Metastasierung von Tumoren, sowie bei ischämischen und entzündlichen Vorgängen, findet Angiogenese ebenso statt (Findlay, 1986, Banda et al., 1982, Folkman und Shing, 1992, Folkman, 1995, Folkman, 1971).

2.2 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und seine Rezeptoren

VEGF ist der wichtigste bisher beschriebene Angiogenesefaktor, welcher über hochaffine Tyrosinkinaserzeptoren seine Wirkung hauptsächlich an Endothelzellen entfaltet.

VEGF ist ein homodimeres Glykopeptid von 46 kDa mit einem mitogenen Effekt für Endothelzellen (Yoshida et al., 1996). Es besteht eine strukturelle Homologie zu dem Placenta Like Growth Factor (PLGF) und zu dem Platelet Derived Growth Factor (PDGF) (Conn et al., 1990, Keck et al., 1989). Die erste Isolation erfolgte aus den FSH-produzierenden Zellen der Hypophyse (Ferrara und Henzel, 1989), sowie aus hypophysären Zell-Linien (Gospodarowicz et al., 1989).

Es gibt viele Isoformen (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D/ VEGF-related Protein (VPR), orf virus-VEGF (VEGF-E)), die eine unterschiedliche Affinität zu Heparin aufweisen (Olofsson et al., 1996, Joukovet et al., 1996, Lee et al., 1996, Senger et al., 1993, Orlandini et al., 1996) und sich in der Anzahl ihrer Aminosäuren unterscheiden. Diese Isoformen entfalten ihre Wirkung über verschiedene Rezeptoren aus der Familie der Tyrosinkinasen. Die funktionellen und strukturellen Eigenschaften der verschiedenen VEGF-Subtypen, sowie ihrer Rezeptoren sind in mehreren Übersichtsarbeiten beschrieben worden (Klagsbrun und D'Amore, 1996, Neufeld et al., 1999, Veikkola und Alitalo, 1999, Ferrara, 2000).

Zu **VEGF-A**: Fünf Isoformen von VEGF-A mit 121, 145, 165, 189 und 206 Aminosäuren konnten identifiziert werden, welche durch alternatives Spleißen von mRNA entstehen (Tischer et al., 1991). Im Folgenden wird VEGF-A kurz als VEGF benannt, so, wie es auch in der gängigen Literatur üblich ist.

Die Wirkung von VEGF wird durch **Tyrosin-Kinase-Rezeptoren** der Klasse III mit hoher Affinität zu VEGF vermittelt. Bisher sind zwei Rezeptoren für VEGF identifiziert und geklont worden: **VEGFR-1** (auch Fms-like Tyrosin-kinase-1; **Flt-1**) mit der höchsten Affinität zu VEGF-A sowie **VEGFR-2** (Fetal-liver-kinase der Maus; **Flk-1**), welcher beim

Menschen als Kinase-insert Domain-containing Receptor (**KDR**) bezeichnet wird (Quinn et al., 1993, DeVries et al., 1992, Terman et al., 1992, Quieren et al., 1993). **VEGFR-3 (Flt-4)**, ebenfalls ein Rezeptor der Tyrosin-Kinase-Familie von 180 kDa mit einer großen Ähnlichkeit zu VEGFR-1, dient hingegen als Ligand für VEGF-C und VEGF-D, aber nicht für VEGF-A (Galland et al., 1993, Pajusola et al., 1994). VEGFR-1 hat ein Molekulargewicht von 180 kDa, VEGFR-2 ein Molekulargewicht von 200 kDa (DeVries et al., 1992, Quinn et al., 1993). VEGFR-1 ist nicht nur ein hochaffiner Rezeptor für VEGF-A und seine Isoformen, sondern bindet darüberhinaus auch PIGF (Olofsson et al., 1998). VEGFR-2 ist der Rezeptor, der die verschiedenen Isoformen von VEGF-A bindet und auch eine gewisse Affinität zu VEGF-C hat. Diese Rezeptoren besitzen eine extrazelluläre Domäne aus sieben Immunglobulinen und eine intrazelluläre Domäne mit Tyrosinkinase Aktivität (DeVries et al., 1992, Terman et al., 1992). Über die Interaktion von **VEGFR-3** wird nicht nur Angiogenese, sondern auch Lymphangiogenese aktiviert (Jeltsch et al., 1997). VEGFR-1 und VEGFR-2 werden hauptsächlich in Endothelzellen exprimiert. Dementsprechend wirkt VEGF fast ausschließlich dort mitogen (Yamaguchi et al., 1993, Jakeman et al., 1992). In proliferierenden Endothelzellen sind die Expressionswerte der mRNA der beiden VEGF-Rezeptoren, VEGFR-1 und VEGFR-2 am höchsten (Plate et al., 1992). Einige Veröffentlichungen beschreiben aber auch die Expression des einen oder beider VEGF-Rezeptoren in nicht-endothelialen Zellen. VEGFR-1 wird u.a. exprimiert in Trophoblastzellen (Charnock-Jones et al., 1994), Monozyten (Barleon et al., 1996), Perizyten der Retina (Takagi et al., 1996), renalen Mesangiumzellen (Takahishi et al., 1995) und im menschlichen Hoden von Leydig- und Sertoli-Zellen (Ergün et al., 1997). VEGFR-2 wird unter anderem auch in hämatopoietischen Stammzellen exprimiert (Katho et al., 1995), in Megakaryozyten (Yang et al., 1996), in Leydig- und Sertoli-Zellen, sowie in perivaskulären Zellen im menschlichen Hoden (Ergün et al., 1997). Für die jeweiligen Rezeptoren sind spezifische Wirkungen beschrieben worden. Nachgewiesen ist eine hohe Affinität von VEGFR-1 im Vergleich zu VEGF₁₆₅ in Endothelzellen, seine

Funktion im adulten Gefäßsystem ist jedoch unzureichend geklärt. Mäuse, welchen das komplette VEGFR-1-Gen fehlt, sterben um den neunten Entwicklungstag. Sie weisen zwar eine hohe Anzahl an endothelialen Vorläuferzellen und Endothelzellen auf, zeigen aber keine Formierung endothelialer Gefäßrohre (Fong et al., 1995). Fehlt das VEGFR-2-Gen, sterben die Mäuse ebenfalls um den neunten Entwicklungstag. Die Differenzierung der Angioblasten zu Endothelzellen unterbleibt und somit entstehen keine Blutgefäße (Vaskulogenese) (Shalaby et al., 1995). Interessanterweise sterben heterozygote Mäuse, in denen nur ein Allel des VEGF-Gens inaktiviert wurde, zwischen dem 11. und 12. Entwicklungstag. Sie erscheinen im Wachstum retardiert und weisen eine Reihe von Abnormitäten in der Entwicklung auf.

Die Aktivierung von VEGFR-2 durch VEGF in Endothelzellen, welche keine oder geringe Mengen von VEGFR-1 exprimieren, führt zu gesteigerter Mitoserate, während die Aktivierung von VEGFR-1 auf Endothelzellen, welche kein VEGFR-2 exprimieren, keine Zellproliferation zur Folge hat (Seetharam et al., 1995, Waltenberger et al., 1994). Über VEGFR-1 wird die VEGFR-2-vermittelte Endothelzellproliferation antagonisiert und somit die Bildung neuer Blutgefäße vermindert (Zeng et al., 2001, Kearney et al., 2002).

Die Aktivierung von VEGFR-1 als auch VEGFR-2 durch VEGF induziert Zellmigration (Barleon et al., 1996, Yoshida et al., 1996). Isolierte Aktivierung von VEGFR-2 durch selektiv-bindende VEGF-Formen induziert *in vivo* im Gegensatz zu VEGFR-1 eine Steigerung der Gefäßpermeabilität (Gille et al., 2001). In jüngeren Studien konnte ein Zusammenhang zwischen VEGFR-2-vermittelten Reaktionen und NO-Wirkung (Stickstoffoxid) über Aktivierung der NO-Synthetase aufgezeigt werden (Shen et al., 1999). NO ist wesentlich an VEGFR-2-vermittelter Proliferation und Migration von Endothelzellen, erhöhter Gefäßpermeabilität und Hypotension sowie *in vivo* induzierter Angiogenese beteiligt (Fujii et al., 1997, Papapetropoulos et al., 1997, Hood et al., 1998, Ziche et al., 1997).

2.2.1 Regulation der Expression von VEGF

VEGF wird in verschiedenen Zelltypen fast aller Organe des menschlichen Körpers exprimiert, z.B. in den Podozyten der Niere (Senger et al., 1993), den Epithelzellen der Lunge und Leber (Breier et al., 1992, Monacchi et al., 1993, Berse et al., 1992) oder in den Epithelzellen des Plexus Choroideus (Flamme und Riesen 1995). Darüber hinaus wird VEGF in fetalem Hodengewebe (Shifren et al., 1994) und in Keimzelltumoren (Viglietto et al., 1996) produziert.

Die Expression von VEGF wird von vielen Hormonen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen (I1-6 β , PDGF, EGF, TGF- β) (Cohen et al., 1996, Finkenzeller et al., 1992, Godman et al., 1993, Pertovaara et al., 1994) sowie von Prostaglandin E₂ (Harada et al., 1995) und dem Luteotropischen Hormon reguliert (Garrido et al., 1993). Unter anderem ist in Zellkulturen die VEGF mRNA-Konzentration unter der Einwirkung von Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 β (IL-1 β) erhöht (Li et al., 1995). Stickstoffoxid steigert ebenso die Expression von VEGF und unterstützt die Vasodilatation und Gefäßpermeabilitätssteigerung (Tuder et al., 1995, Chin et al., 1997, Murohara, 1998). Weiterhin führen ATP-Mangel und Hypoxie (nicht bei VEGF-B und VEGF-C) sowohl über eine Steigerung der Transkription (Sheweiki et al., 1992, Plate et al., 1992, Levy et al., 1996) als auch über eine Stabilisierung von VEGF-mRNA (Stein et al., 1995, Levy et al., 1996) zu einer gesteigerten Expression von VEGF-Protein. Diese Hypoxie-induzierte Transkription wird über den Hypoxia-Inducible Factor-1 α (HIF-1 α) vermittelt (Levy et al., 1996, Liu et al., 1995, Forsythe et al., 1996). Andere Prozesse, welche hypoxieunabhängig zu erhöhter Expression von VEGF führen, kürzen den normalen Hypoxie-regulierten Mechanismus der VEGF-Produktion ab. Zum Beispiel kann das Onkogen *v-src* (Sarc kinase) hypoxieunabhängig die Expression von HIF-1 α induzieren und zu erhöhter Expression von VEGF führen (Jiang et al., 1997). Andere Zytokine, wie Interleukin-10 (IL-10) und Interleukin-13 (IL-13), können dagegen die Freisetzung von VEGF inhibieren (Matsomoto et al., 1997).

2.3 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und seine Rezeptoren im menschlichen Hoden

Die Expression und die Lokalisation des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors wurde im menschlichen Hodengewebe bereits untersucht (Ergün et al. 1997). VEGF war interessanterweise in den Sertoli-Zellen und Leydigzellen zu lokalisieren, nicht jedoch in Endothelzellen der Hodengefäße. Die VEGF-Rezeptoren, VEGFR-1 und VEGFR-2, waren hingegen sowohl in Sertoli- und Leydigzellen als auch in den Blutgefäßen zu finden (Abb. 2), was vermuten läßt, dass der Angiogenesefaktor VEGF seine Wirkung im Hoden als ein parakriner Faktor entfaltet. Anders als bei anderen physiologischen Prozessen, wo es zu Gefäßaussprossung kommt, ist eine Neubildung von Blutgefäßen im menschlichen Hodengewebe nicht zu beobachten. Da jedoch VEGF neben der Regulation der Angiogenese auch der bisher stärkste bekannte Permeabilitätsfaktor ist und die Gefäßdurchlässigkeit 50.000-fach stärker steigert als Histamin, wurde eine Gefäßpermeabilität regulierende Wirkung für Hodengewebe postuliert (Ergün et al., 1997).

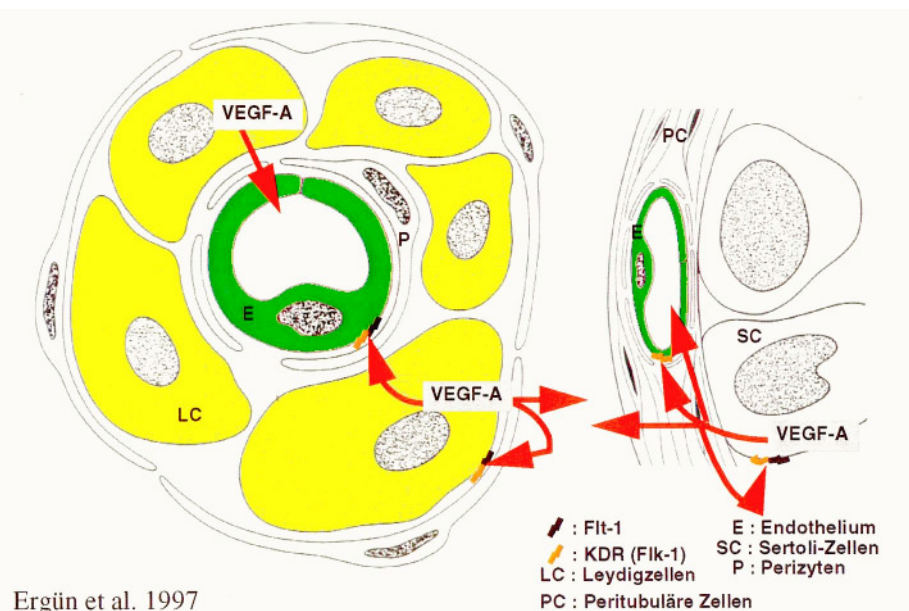


Abb. 2: VEGF-A und seine Rezeptoren im menschlichen Hoden

Die graphische Darstellung gibt die Lokalisationsorte von VEGF-A und seinen Rezeptoren VEGFR-1 (Flt-1) und VEGFR-2 (KDR) im normalem Hodengewebe wieder und zeigt die möglichen Wirkungsorte dieses Faktors.

Diese Hypothese wurde durch die Arbeit von Korpelainen et al. gestützt, wobei es bei den für VEGF transgenen Mäusen zu einer erhöhten Permeabilität der Kapillaren in den untersuchten Organen kam, ein Funktionsausfall hingegen nur für den Hoden festgestellt werden konnte (Korpelainen et al., 1998). Die Überexpression von VEGF führte bei diesen transgenen Mäusen zu erheblichen Fertilitätsstörungen. Während im basalen Kompartiment des Keimepithels dieser Tiere keine morphologisch erfassbaren Veränderungen sichtbar waren, war die Spermatogenese im apikalen Abschnitt in der Elongationsphase der Spermatiden gestört. Dieses lässt vermuten, dass dem VEGF im Hodengewebe eine funktionelle Rolle für die Regulation der Spermatogenese über nicht-endotheliale Zellen, wie Sertoli-Zellen, zukommt.

Auch wenn VEGF der potenteste der bisher bekannten Angiogenesefaktoren ist, so bedarf es der Mitwirkung weiterer Wachstumsfaktoren und Zelladhäsionsmolekülen, wie VE-Cadherin und carcinoembryonal antigen-related cell adhesion molecule-1 (CEACAM1) bei der Formierung neuer Blutgefäße.

2.4 Carcinoembryonal antigen-related cell adhesion molecule-1 (CEACAM1)

Es konnte gezeigt werden, dass CEACAM1 ein potenter angiogenetischer Faktor und ein wichtiger morphogenetischer Effektor für VEGF ist (Ergün et al., 2000; Wagener und Ergün, 2000).

CEACAM1, früher auch bekannt als biliäres Glykoprotein (BGP) oder CD66a, ist ein Mitglied der CEA-Familie, welches der Immunoglobulin Superfamilie angehört (Obrink, 1991). Es kann sowohl mit sich selbst eine homophile, als auch mit anderen Mitgliedern der CEA-Familie eine heterophile Bindung eingehen (Rojas et al., 1990). Bis heute sind 11 Isoformen von CEACAM1 bekannt (Obrink 1991, Kuroki et al., 1991, Barnett et al., 1993). CEACAM1 wird normalerweise an der luminalen Oberfläche zahlreicher Epithelien exprimiert und ebenso hochangereichert in Leukozyten gefunden (Prall et al., 1996).

Es wurde gezeigt, dass die Expression von CEACAM1-mRNA bei einigen Tumoren, wie bei kolorektalen Tumoren oder Prostatakarzinomen, supprimiert ist (Neumaier et al., 1993, Nollau et al., 1997, Lin und Pu, 1999). Basierend auf diesen Befunden wurde eine Tumorsuppressive Rolle für CEACAM1 postuliert. Ebenso wurde gezeigt, dass die Überexpression von CEACAM1 in der Prostatatumor-Zelllinie Du-145 zu einem signifikant reduzierten Tumorstadium führt (Lin und Pu, 1999, Volpert et al., 2002).

Neuere Untersuchungen belegen, dass die Überexpression von CEACAM1 in Epithelzellen, z.B. in der Harnblasenkarzinomzelllinie RT4, die Angiogenese über Herunterregulation von VEGFC und VEGFD unterdrückt (Oliveira-Ferrer et al., 2004). Hingegen führt eine Überexpression von CEACAM1 in Endothelzellen zu Aktivierung der Angiogenese über Hochregulation der genannten Faktoren sowie von VEGF-A, Angiopoietin-1 und -2 und Angiogenin (Kilic et al., 2005). Es wurde weiterhin berichtet, dass die Tumorstadium hemmende Wirkung von CEACAM1 von seiner Cis-Determinante in seiner cytoplasmatischen Domäne abhängig ist (Izzi et al., 1999). Ebenso wurde kürzlich festgestellt, dass die Expression von CEACAM1 in den proliferierenden und nicht-proliferierenden Epithelzellen unterschiedlich ist und eine höhere Expression die Proliferation steigert (Singer et al., 2000). Andererseits wurde gezeigt, dass CEACAM1 in Endothelzellen kleiner Tumorgefäße hochreguliert ist, während Endothelzellen der normalen Blutgefäße für CEACAM1 negativ waren (Ergün et al., 2000, Wagener und Ergün, 2000). CEACAM1 ist an der luminalen Oberfläche von Epithelzellen unterschiedlicher Organe wie Prostata, Colon, proximaler Tubuli der Niere und der Milchgänge exprimiert (Prall et al., 1996).

Die Beobachtung, dass CEACAM1 an der apikalen Membran von Epithelzellen lokalisiert ist, lässt die Annahme zu, dass CEACAM1 eine Rolle bei der Differenzierung und Polarisierung der Epithelzellen spielt, und zwar für Zell-Zell Adhäsion, aber möglicherweise auch für die Stabilisierung der tubulären oder glandulären Struktur in zahlreichen Drüsen und Organen. Die Zelladhäsion spielt ebenso eine entscheidende Rolle bei der Formation von

Samenkanälchen und damit in der Organisation des Keimepithels. Die Tatsache, dass die sich entwickelnden Keimzellen ihre Verbindung zu den Sertoli-Zellen beibehalten, bis sie als reife Spermatiden frei gesetzt werden, läßt vermuten, dass die Adhäsionskontakte eine wichtige Rolle beim Ablauf der Spermatogenese spielen. Hierbei sind insbesondere die *Tight-junctions* zwischen den Sertoli-Zellen zu nennen, die der Konstruktion und der Aufrechterhaltung der Blut-Hoden Schranke dienen (Setchell und Main, 1975).

Obwohl die Expression von VEGF und VEGF-Rezeptoren im menschlichen Hodengewebe beschrieben wurde und tierexperimentelle Studien einige Hinweise hinsichtlich der Wirkung von VEGF im Hoden zeigten, fehlen bisher diesbezüglich mechanistische Analysen. Dieses ist unter anderem bedingt durch die eingeschränkte experimentelle Zugänglichkeit von menschlichem Gewebe. Über die Bedeutung des Zelladhäsionsmoleküls CEACAM1 im Hodengewebe lagen bis zur Durchführung dieser Dissertation keine Erkenntnisse vor. Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, welche Bedeutung dem Angiogenesefaktor VEGF und seinen Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 sowie dem Zelladhäsionsmolekül CEACAM1 im menschlichen Hodengewebe zukommt. Um experimentelle Analysen am menschlichen Gewebe durchführen zu können, wurde ein zuvor etabliertes Kulturmodell unter Verwendung isolierter Samenkanälchenfragmente eingesetzt (Lauke et al., 1999), in dem Hodenkanälchen in ihrer originären Mikroumgebung kultiviert und mit Angiogenesefaktoren stimuliert wurden. Im Vergleich zur Zellkultur kommt dieses *Ex-vivo* organotypische Modell den *In-vivo-Bedingungen* näher. Die immunhistochemischen Befunde dieser Arbeit zeigen, dass die Ergebnisse von frisch fixiertem Hodengewebe mit den Befunden in kultivierten, nichtstimulierten Samenkanälchen übereinstimmen. Es kann vermutet werden, dass VEGF und CEACAM1 an den interzellulären Adhäsionsprozessen zwischen den Sertoli-Zellen untereinander und ebenso zwischen den Sertoli-Zellen und Keimzellen, beteiligt sind.

3 Material und Methoden

3.1 Eingesetzte Hodengewebe zur Untersuchung der CEACAM1 Expression

3.1.1 Normales Hodengewebe

Normales menschliches Hodengewebe und normales menschliches Nebenhodengewebe wurden von Patienten gewonnen, die wegen eines Prostatakarzinoms in der Urologie des AK-Barmbek/Hamburg orchidektomiert wurden. Das Gewebe wurde unmittelbar nach der operativen Entnahme in einem geschlossenen Gummibeutel auf Eis gelegt und in das Anatomische Institut transportiert (Feng und Holstein, 1990). Insgesamt wurde bei 10 Patienten das Hodengewebe und bei fünf Patienten das Nebenhodengewebe auf die Lokalisation und Expression von CEACAM1 durch Western Blot und Immunhistochemie hin untersucht. Um eine experimentelle Störung der Spermatogenese *in vitro* zu induzieren und im Zeitverlauf untersuchen zu können, wurden die Fragmente der Hodenkanälchen aus nativem gesunden Hodengewebe isoliert und kultiviert.

3.1.2 Tumorgewebe

Neben dem normalen Hodengewebe wurde CEACAM1 Expression und Lokalisation in Keimzelltumoren, speziell bei Seminomen studiert. Das Tumorgewebe stammte von Patienten, die wegen eines soliden Keimzelltumors im Bundeswehrkrankenhaus Wandsbek/Hamburg orchidektomiert worden waren. Verwendet wurde ebenso Hodengewebe aus dem Randbereich solider Tumore, welches Hodenkanälchen enthielt, das makroskopisch unauffällig erschien, mikroskopisch jedoch häufig einzelne Tumorzellen enthielt. Die morphologischen Analysen zeigten in keinem der untersuchten fünf Fälle eine Invasion in das Interstitium. Dieses Stadium wird als Carcinoma in Situ (CIS) bezeichnet. Dieses Stadium der Tumorentwicklung ist häufig mit Störungen der Spermatogenese assoziiert.

3.2 Morphologische Analyse des Hodengewebes

3.2.1 Morphologische Untersuchungen an Semidünnschnitten

Kleine Gewebsblöcke von Hodengewebe wurden 8h in Phosphat gepuffertem 5,5% Glutaraldehyd fixiert und in 1% OSO_4 (Osmiumtetroxid) nachfixiert. Nach Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe erfolgte die Einbettung in Epon 812 (Holstein und Wulfhekel, 1971). Von diesen in Epon eingebetteten Gewebstücken wurden dann Semidünnschnitte von 1µm Dicke hergestellt, mit Toluidinblau/Pyronin gefärbt und auf Objektträger aufgezogen. Die histologischen Schnittpräparate wurden mit Hilfe des Photomikroskopes (Firma: Zeiss, Jena, Deutschland) lichtmikroskopisch untersucht.

3.2.2 Morphologische Untersuchungen an Paraffinschnitten

Gewebsstücke von menschlichem Hoden und Nebenhoden wurden für 24 Stunden bei Raumtemperatur in Bouin'scher Lösung fixiert (50ml gesättigte Pikrinsäure, 50ml Formaldehydlösung und 10ml Eisessig).

Nach der Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe wurden die Gewebstücke in Paraffin eingebettet, von denen anschließend 6µm dicke Schnitte hergestellt wurden. Diese wurden auf unbeschichtete Objektträger aufgezogen, mit HE (Hämatoxilin/Eosin) gefärbt und anschließend lichtmikroskopisch untersucht.

3.3 Proben des menschlichen Ejakulats

Die Proben des menschlichen Ejakulats wurden in der Abteilung für Andrologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) nach den Kriterien der WHO (Weltgesundheitsorganisation (2000)) charakterisiert. Nur die Proben mit normaler Spermienzahl ($\geq 20 \times 10^6/\text{ml}$) und normaler Spermienmotilität ($\geq 50 \%$ Spermatozoen mit Vorwärtsbewegung oder $\geq 25 \%$ mit schneller, progressiver Motilität) wurden für die Western Blot-Analysen verwendet.

3.4 Organotypisches Kulturmodell aus menschlichen Hodenkanälchen

Um funktionelle Untersuchungen am menschlichen Material durchführen zu können, wurde ein zuvor im Anatomischen Institut etabliertes organotypisches Kulturmodell aus menschlichem Hodengewebe eingesetzt (Seidel und Holstein, 1990, Lauke et al., 1991). Hierzu wurden aus nativem Hodengewebe Fragmente der Hodenkanälchen von 3 - 4 mm Länge unter einer Stereolupe in Medium sorgfältig isoliert und anschließend kultiviert. In diesem organotypischen Kulturmodell wurden zum einen Hodenkanälchen aus normalem Hodengewebe von Patienten, die wegen eines Prostatakarzinoms orchidektomiert worden waren, verwendet, zum anderen auch Hodenkanälchen aus dem Randbereich solider Keimzelltumore eingesetzt. Im letzteren Falle wurde ein Schnelltest mit Lugolscher Lösung durchgeführt um die Isolierung und Kultivierung von tumortragenden Gewebeproben weitestgehend ausschließen zu können (Lauke 1997). Bei vorliegender Arbeit wurde das basale Zellkulturmedium (Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium/Ham's F-12) (Sigma) mit 0,1 % Bovine Serum Albumin, 1% Penicillin/Streptomycin, 50 $\mu\text{g/ml}$ Gentamycin ergänzt, ohne fetales Kalbserum zu supplementieren.

In dem bereits beschriebenen Kulturmodell wurden Hodenkanälchen mit normalem Keimepithel und kleine Gewebstücke bis zu 9 Tage im Nährmedium ohne Zusatzstoffe kultiviert. Dieses Vorgehen induzierte eine progressive Störung der Spermatogenese. Täglich wurden einige Fragmente der Tubuli seminiferi aus der Kultur herausgenommen und in Paraffin eingebettet. Von diesen Blöcken wurden dann Schnitte von 5-7µm Dicke angefertigt und in der Immunhistochemie eingesetzt. Außerdem wurden an diesen Geweben Proteinextraktionen durchgeführt und anschließend in Western Blot- Analysen verwendet. In einigen Fällen wurden die Samenkanälchenfragmente mit VEGF₁₆₅ 50 ng/ml (ROD-System) stimuliert.

3.5 SDS-PAGE und Western Blot

Als Untersuchungsmaterial diente normales menschliches Hodengewebe sowie normales menschliches Nebenhodengewebe von Patienten, welche wegen eines Prostatakarzinoms orchidektomiert waren. Desweiteren wurde Tumorgewebe von Patienten, welche wegen eines soliden Keimzelltumors orchidektomiert worden waren, bei den Untersuchungen verwendet. Für die Western Blot-Analysen wurde das Gewebe zuerst zerkleinert, homogenisiert und zur schnellen Denaturierung der Proteine für 5 min in SDS-Laemmli-Puffer (Laemmli 1970) gekocht. Im Anschluß wurde die Proteinkonzentration der Proben nach Lowry (Lowry et al., 1951) gemessen. Von jeder Probe wurden 50µg Totalproteinmenge in SDS-PAGE (Sodium Dodecyl sulphate-polyacrylamide Elektrophorese-Gel) aufgetragen und bei Applikation von 100 mA getrennt. Anschließend wurden die Proteine mittels eines BioRad-Transfersystems für 1.5 Stunden bei 1 mA/cm² auf eine Polyvinylidene-Fluorid-Membran (PVDF-Membran) (Immunobilon; Millipore, Bedford, MA, USA) transferiert. Danach wurde eine Ponceau-Färbung der Membran durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Proteine vom SDS-Gel auf die PVDF-Membran in einem vergleichbaren Ausmaß übertragen worden waren.

Die PVDF-Membran wurde dann über Nacht in einem 1%-igem Blockingpuffer von Boehringer-Mannheim (Mannheim, Deutschland) bei pH 7.5 eingesetzt und versiegelt. Nach dem Spülen mit TBS/Tween für 3 x 15 Minuten wurde die PVDF-Membran mit dem monoklonalen CEACAM1-Antikörper (4D1/C2) in einer Verdünnung von 2 µg/ml (Drzeniek et al., 1991, Stoffel et al., 1993) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen für 3x15 min erfolgte die Inkubation mit einem sekundären peroxidasegekoppelten Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur.

Nach wiederholtem Waschen (2x15 min in TBS/Tween und 1x10 min in TBS) wurde der Antigen-Antikörper-Komplex durch das Chemolumineszenz-Verfahren mit dem ECL-Reagenz (Amersham, Braunschweig, Deutschland) entwickelt und autoradiographisch auf einem Fuji-RX Film (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan) sichtbar gemacht.

Anhand von Western Blot-Analysen wurde ebenfalls das Vorhandensein von CEACAM1 in menschlichem Ejakulat untersucht. Hierbei wurde der gleiche CEACAM1-Antikörper verwendet. Eingefrorene Ejakulatproben von gesunden Individuen wurden aufgetaut und mit SDS-Laemmli-Puffer denaturiert. Anschließend fand, wie oben bereits beschrieben, das Auftrennen der Proteine durch SDS-PAGE statt, wobei von jeder Probe 25 µg aufgetragen wurde. Nach dem Transfer auf PVDF wurden CEACAM1-Banden wie bereits beschrieben sichtbar gemacht. Um eine Kreuzreaktion auszuschließen, wurde der CEACAM1-Antikörper 4D1/C2 mit aufgereinigtem CEACAM1 aus humanen Granulozyten über Nacht präinkubiert und an Stelle des primären CEACAM1-Antikörpers 4D1/C2 benutzt. Als interne Kontrolle für die eingesetzte Totalproteinmenge aus Geweben wurde Vimentin im gleichen Blot nachgewiesen. Der Antikörper 4D1/C2 wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe des Herrn Professor C. Wagener, Abteilung für Klinische Chemie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, zur Verfügung gestellt.

3.6 Immunhistochemie

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurde testikuläres und epididymales Gewebe und Gewebe von Keimzelltumoren (Seminomen) sowie kultivierte menschliche Tubuli seminiferi eingesetzt. Die Gewebsstücke wurden in Bouin'scher Lösung für 24 Stunden bei Raumtemperatur fixiert und nach der Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden Schnitte von 6µm Dicke angefertigt und auf mit Chromalaun-Gelatine beschichtete Objektträger aufgebracht. Vor der immunhistochemischen Behandlung wurden die Schnitte in absteigender Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert. Die hier durchgeführte immunhistochemische Methode ist bei Davidoff und Schulze (1990) (Ergün et al., 1997, Kilic und Ergün, 2001) detailliert beschrieben. Hierbei wurde eine Kombination zweier Nachweismethoden, nämlich der Peroxidase-Anti-Peroxidase Technik (PAP) mit dem Avidin-Biotin-Komplex (ABC) benutzt. Diese Technik verstärkt die Farbintensität und macht damit auch geringe Mengen von Antigen sichtbar. Die Nickel verstärkte Glukose-Oxidase-Technik (Itoh et al., 1979) wurde später durch Záborszky und Léránth (1985) modifiziert. Als sekundäre Antikörper wurden anti-mouse, anti-rabbit oder anti-goat Antikörper verwendet (DAKO, Dänemark).

Für die immunhistochemische Lokalisation von CEACAM1 wurde der monoklonale Antikörper 4D1/C2 als Primärantikörper in einer Endverdünnung von 1µg/200ml benutzt. Für die Lokalisation von VEGF und seinen Rezeptoren wurde von folgenden Antikörpern Gebrauch gemacht: Ein polyklonaler Antikörper, welcher gegen das Epitop am aminoterminalen Ende von VEGF gerichtet ist (Endverdünnung: 1µg/500ml) (Santa Cruz, CA, USA, Cat # Sc-507), ein polyklonaler Antikörper gegen den VEGF-Rezeptor-1 (VEGFR-1 oder Flt-1) (Endverdünnung: 1µg/100ml) (Santa Cruz, CA, USA, Cat # Sc-316-G) und ein ebenfalls polyklonaler Antikörper gegen VEGF-Rezeptor-2 (VEGFR-2 oder KDR) (Endverdünnung: 1µg/300) (Santa Cruz, CA, USA, Cat # Sc-504; Cat # Sc-315).

Als immunhistochemische Kontrollen wurden folgende Verfahren durchgeführt:

1. Präabsorptionsversuch: Hierbei wurde der primäre Antikörper 4D1/C2 vor der Benutzung mit CEACAM1 Protein für 4 Stunden inkubiert. Die primären Antikörper gegen VEGF wurden ebenso mit rekombinantem VEGF-Protein präinkubiert.
2. Primäre und sekundäre Antikörper wurden durch PBS ersetzt.
3. Anstelle der primären monoklonalen Antikörper wurden einige Schnitte mit normalem Mausserum (Konzentration 0.1 und 0.001%) und anstelle der primären polyklonalen Antikörper mit normalem Kaninchenserum (Konzentration 0.1% und 0.01%) inkubiert (Sigma; Dako, USA).

4 Ergebnisse

4.1 Morphologische Darstellung des untersuchten Gewebes

4.1.1 Normales menschliches Hodengewebe

Die Hoden befinden sich im Skrotum. Sie haben die Aufgabe, Samenzellen und Geschlechtshormone zu bilden. Der Hoden ist von einer etwa 1mm dicken derben Kapsel (Tunica albuginea) aus kollagenem Bindegewebe, mit vielen glatten Muskelzellen, umgeben. Wenn man die Tunica albuginea öffnet, werden in der Lupen-Übersicht Samenkanälchen (Tubuli seminiferi), welche 30 - 70cm lang sind und einen Durchmesser von 180 - 280 μm haben, sichtbar (Abb. 3 A). Sie sind stark gewunden, so dass sie in den Lobuli testis (Länge 2 - 3 cm) Platz finden. Aus solchen Gewebsarealen wurden längere Schleifen der Samenkanälchen zunächst herauspräpariert, dann als Fragmente isoliert und anschließend kultiviert. In solch einem Samenkanälchen sieht man unter dem Mikroskop betrachtet eine sehr differenzierte Zellpopulation (Abb. 3 B). Diese besteht aus Vor- und Endstufen der Samenzellen. Darüberhinaus kleiden die Sertoli-Zellen die Samenkanälchen aus, sie bilden eine zusammenhängende Schicht, fassen aber die verschiedenen, langsam zum Lumen der Samenkanälchen vorrückenden Klone der Keimzellen zwischen sich. Die Sertoli-Zellen dienen der Ernährung und dem Schutz der Samenzellen, sind bis zu 50 μm hoch und basal an der Basalmembran der Samenkanälchen verankert. Apikal erreichen sie das Lumen der Tubuli seminiferi. Zwischen den Tubuli seminiferi befindet sich sehr lockeres Bindegewebe mit Fibroblasten, undifferenzierten Bindegewebszellen, Mastzellen und Makrophagen. Dieses Bindegewebe enthält weiterhin Nerven, Blut- und Lymphgefäße sowie spezielle interstitielle Zellen (Leydigzellen), welche Testosteron bilden.

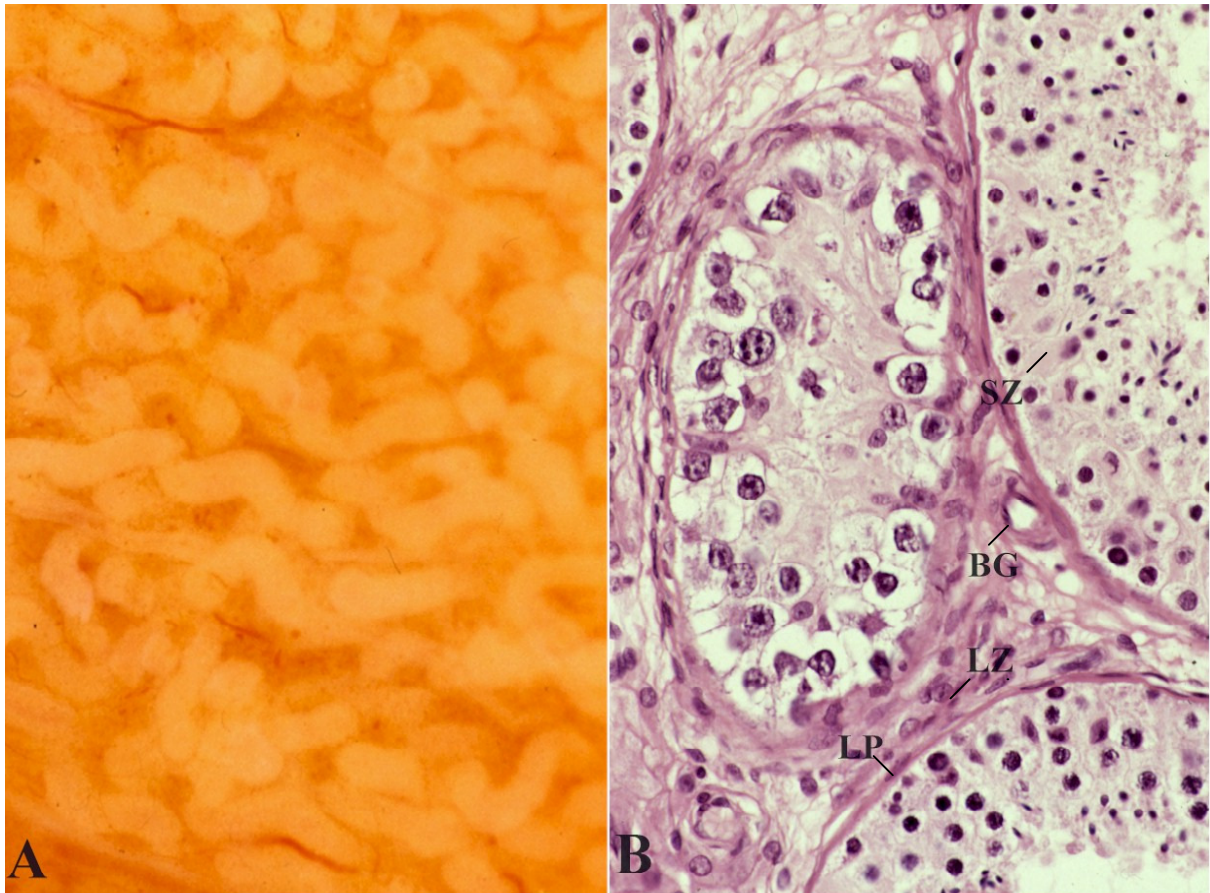


Abb. 3 A-B: Hodenparenchym

Abb. 3 A: Das native intakte testikuläre Gewebe beinhaltet ein Konvolut von Tubuli seminiferi (x 50).

Abb. 3 B: Dieser HE-gefärbte Paraffinschnitt zeigt nebeneinander zwei Anschnitte von Tubuli seminiferi mit intaktem Keimepithel (KE, rechte Bildhälfte) und einen Tubulus, der Tumorzellen (TC) trägt (linke Bildhälfte). Im Interstitium sind Leydigzellen (LZ) und Blutgefäße (BG) erkennbar.

SZ: Sertoli-Zellen, LP: Lamina propria (x 250).

4.1.2 Lichtmikroskopische Darstellung isolierter Samenkanälchen

Die isolierten Tubulusfragmente wurden an beiden Ende verschlossen und in Kultur genommen (Abb. 4 A). Die histologische Aufarbeitung der Tubulusfragmente zeigt im Semidünnschnitt (Abb. 4 B) und im Paraffinschnitt (Abb. 4 C) die verschiedenen Reifestadien der Keimzellen.

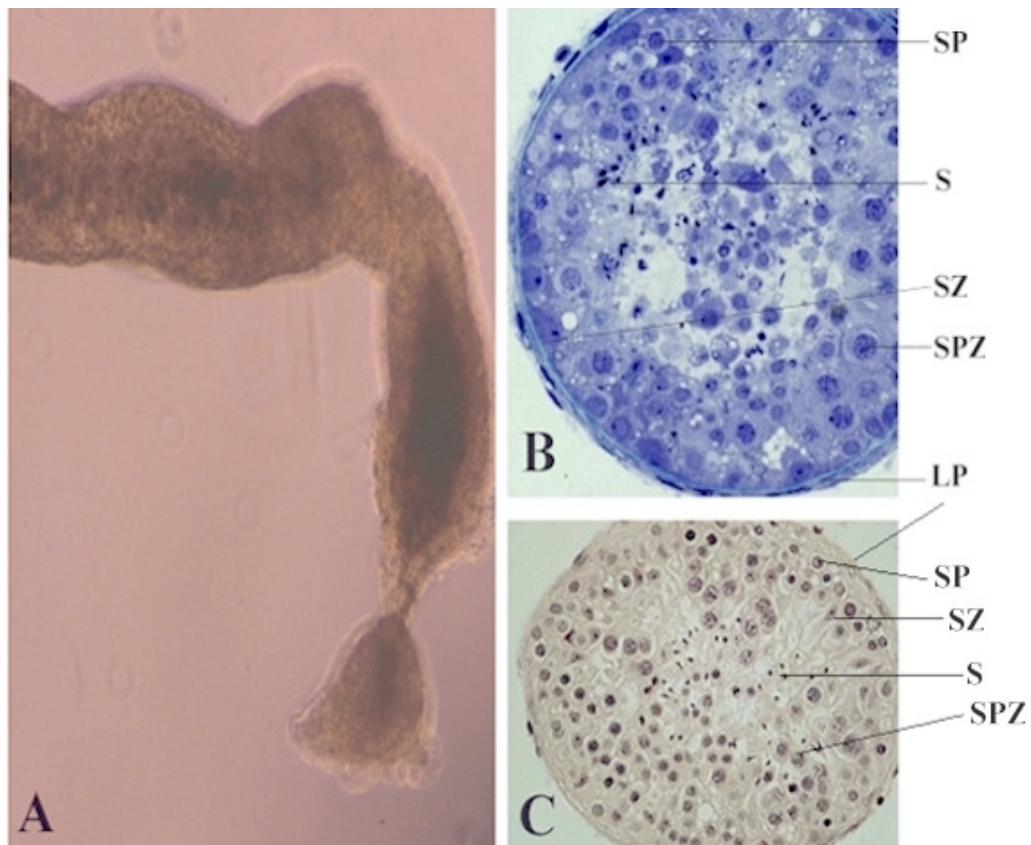


Abb. 4 A-C: Fragmente isolierter Tubuli aus dem Hodengewebe

Abb. 4 A: Stereoskopische Aufnahme eines isolierten Tubulusfragmentes zeigt ein verschlossenes Ende (x 150).

Abb. 4 B: Semidünnschnitt eines isolierten Samenkanälchens zeigt den typischen Aufbau des Keimepithels: Lamina propria (LP), Spermatogonien (SP), Sertoli-Zellen (SZ), Spermatozyten (SPZ) und reife Spermatiden (S) (x 150).

Abb. 4 C: Paraffinschnitt eines isolierten Samenkanälchens zeigt eine ähnliche zelluläre Zusammensetzung wie in Abb. 5 B (x 150).

4.2 Menschliches Hodengewebe mit gestörter Spermatogenese

4.2.1 Samenkanälchen ohne Keimzellen

Auch bei Männern mit normalem Aufbau des Hodengewebes kommen kleine Areale mit Samenkanälchen vor, die nur aus Sertoli-Zellen bestehen und keine Keimzellen enthalten (siehe Abb. 11 A, C).

4.2.2 Hodengewebe mit frühen Keimzelltumoren

Im makroskopisch unauffällig erscheinenden Randgewebe von soliden Keimzelltumoren sind häufig Samenkanälchen zu finden, die einzelne Tumorzellen beherbergen, während das Interstitium noch frei von Tumorzellen ist. Solche Samenkanälchen wurden in Anlehnung an den Begriff Carcinoma-in-situ als CIS-Tubuli bezeichnet (siehe Abb. 13 A, B).

Lichtmikroskopische Evaluation solcher Tubuli zeigt ein breites Spektrum von kaum verändertem Keimepithel bis zu massiver Spermatogenesestörung innerhalb solcher Kanälchen, wobei es hauptsächlich zu Beginn zu einem Verlust von differenzierten Keimzellen kommt.

4.2.3 Induzierte Spermatogenesestörung durch Kultivierung

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass es bei Kultivierungen der Fragmente von Samenkanälchen zu einem massiven Verlust von differenzierten Keimzellen kommt (Seidl und Holstein, 1990, Lauke et al., 1991) (siehe Abb. 12 A - C).

4.3 Expression von VEGF und seinem Rezeptor VEGFR-2 im normalen menschlichen Hodengewebe und in normalen isolierten Hodenkanälchen

Die Expression von VEGF und seinen Rezeptoren wurde bereits im normalen Hodengewebe gezeigt und beide, sowohl VEGF als auch VEGFR-2, wurden in Leydig- und Sertoli-Zellen nachgewiesen (Ergün., et al 1997). Diese Ergebnisse konnten bei den hier durchgeführten Untersuchungen am Hodengewebe reproduziert werden (Abb. 5 A, B).

Vor der Kultivierung zeigten die isolierten Hodenkanälchenfragmente (Abb. 5 C, D) erwartungsgemäß ein identisches Expressionsmuster für VEGF und VEGFR-2, wie zuvor im nativen Hodengewebe beschrieben (Abb. 5 A, B).

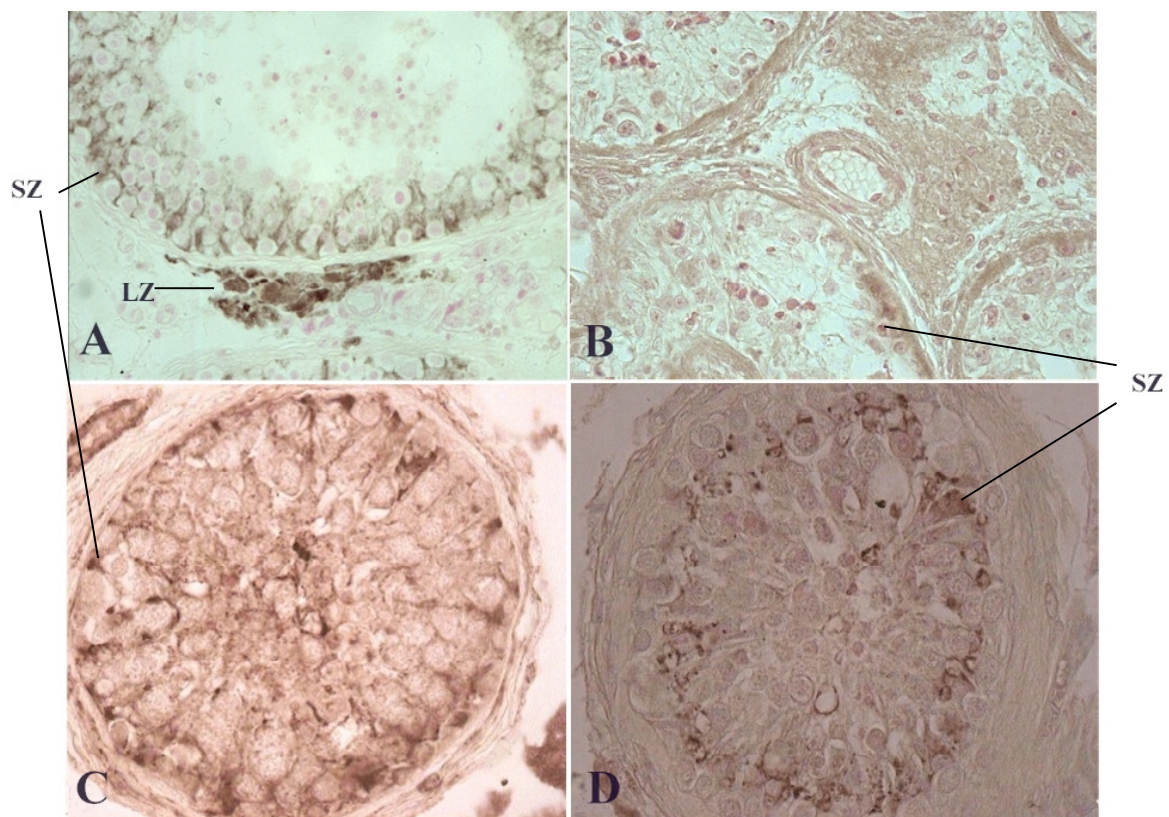


Abb. 5 A - D: Expression von VEGF und VEGFR-2 im menschlichen Hodengewebe und im menschlichen Tubulusfragment

Abb. 5 A: VEGF ist in Sertoli-Zellen (SZ) und Leydigzellen (LZ) zu lokalisieren.

Abb. 5 B: VEGFR-2 ist im Hoden ebenso wie bei VEGF, in den Sertoli-Zellen (SZ) und Leydigzellen (LZ) zu finden, allerdings ist die Markierung schwächer.

Abb. 5 C: Wie im normalen Gewebe, siehe Abb.6 A, findet man in den isolierten Hodenkanälchen eine VEGF Markierung in den Sertoli-Zellen.

Abb. 5 D: VEGFR-2 ist im Tubulusfragment ebenso schwach wie im Nativgewebe in den Sertoli-Zellen zu finden.

4.4 Expression von VEGF und seinen Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 in kultivierten Samenkanälchen

Die kultivierten Hodenkanälchen wurden immunhistochemisch für VEGF und seine Rezeptoren analysiert. Zu Beginn der Kultur konnten die bereits beschriebenen Expressionsmuster von VEGF und seinen Rezeptoren im normalen Hodengewebe ebenso bei kultivierten Hodenkanälchen vorgefunden werden. Mit dem weiteren Verlauf der Kultivierung der Samenkanälchen ging jedoch eine progrediente Störung der Spermatogenese einher. Im Laufe der gesamten Kultur konnte eine Reaktion für VEGF in den Sertoli-Zellen beobachtet werden (Abb. 6), diese nahm bis zum vierten Kulturtag deutlich an Intensität zu. Um den siebten Kulturtag herum wurde die Reaktion schwächer. Ebenso wie im Originalgewebe zeigten zu Kulturbeginn nur einige Sertoli-Zellen innerhalb der Tubuli eine schwache Reaktion für VEGFR-2 (Abb. 7). Um den dritten Kulturtag jedoch stieg die Intensität der Immunreaktion an. Zu diesem Zeitpunkt exprimierten nahezu alle Sertoli-Zellen VEGFR-2. VEGFR-1 wurde gleichbleibend exprimiert von KT1-7 (Abb. 8).

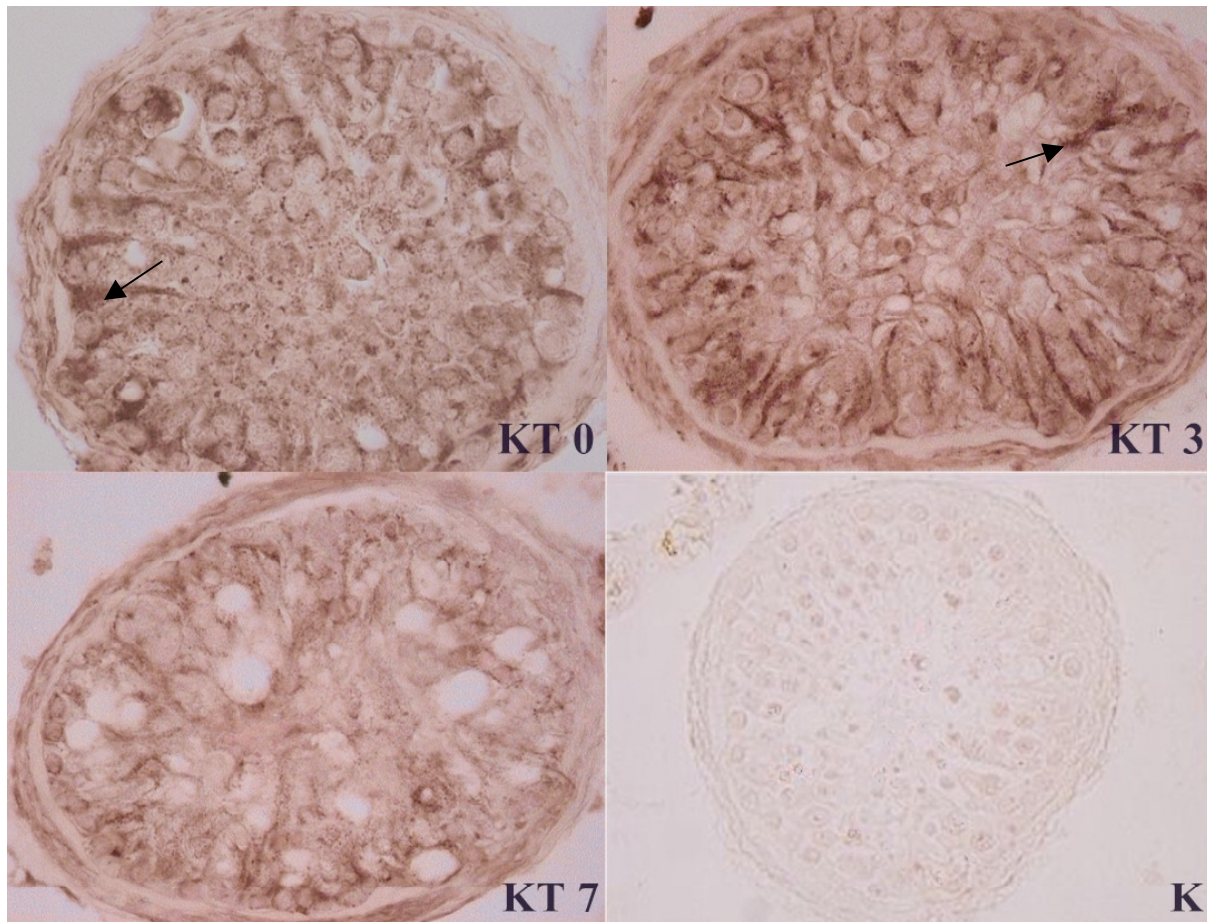


Abb. 6: Expression von VEGF in Tubuluskultur

Abb. 6: Zeigt die kultivierten Tubuli, die vor dem Kulturbeginn (KT 0) bis zum 7. Kulturtag (KT 7) immunhistochemisch auf VEGF untersucht wurden. Die Expression von VEGF ist zu Beginn der Kultur in den Sertoli-Zellen nachweisbar (Pfeil) (**KT 0**). Am Kulturtag 3, ist die Expression am intensivsten und fast in allen Sertoli-Zellen zu finden (Pfeil) (**KT 3**). Bei zunehmender Kulturdauer wird die Immunfärbung für VEGF schwächer (**KT 7**). Kontrollschnitt ohne spezifische Färbung (**K**).

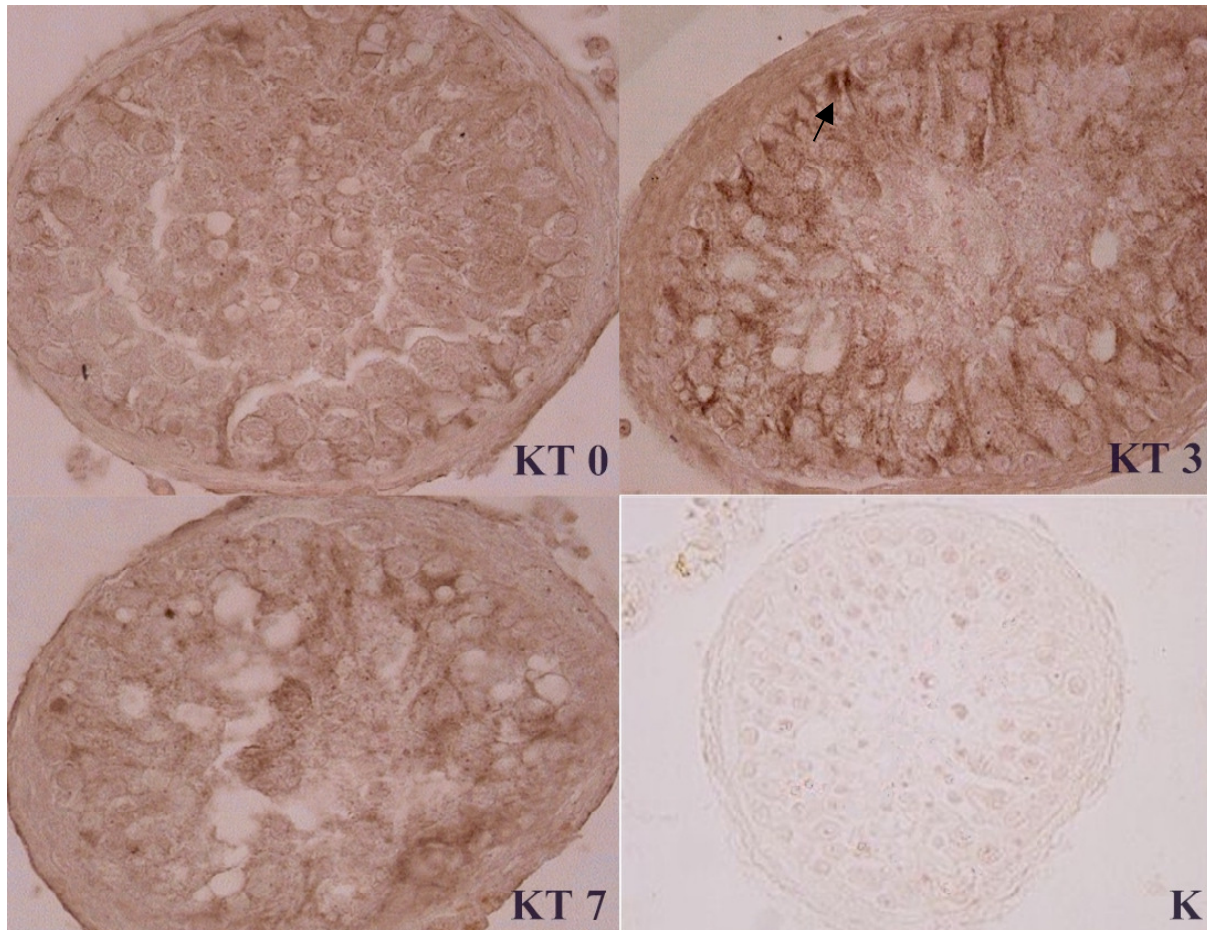


Abb. 7: Expression von VEGFR-2 in Tubuluskultur

Abb. 7: Zeigt die kultivierten Tubuli, die vor dem Kulturbeginn (KT 0) bis zum 7. Kulturtag (KT 7) immunhistochemisch auf VEGFR-2 untersucht wurden. VEGFR-2 Expression bei Kulturtag Null ist schwach (**KT 0**). Um den dritten Kulturtag kommt es zu einer starken Zunahme (Pfeil) von VEGFR-2 (**KT 3**). Die Expression wird jedoch in den Sertoli-Zellen ab 7. KT deutlich schwächer (**KT 7**). Kontrollschnitt ohne spezifische Färbung (**K**).

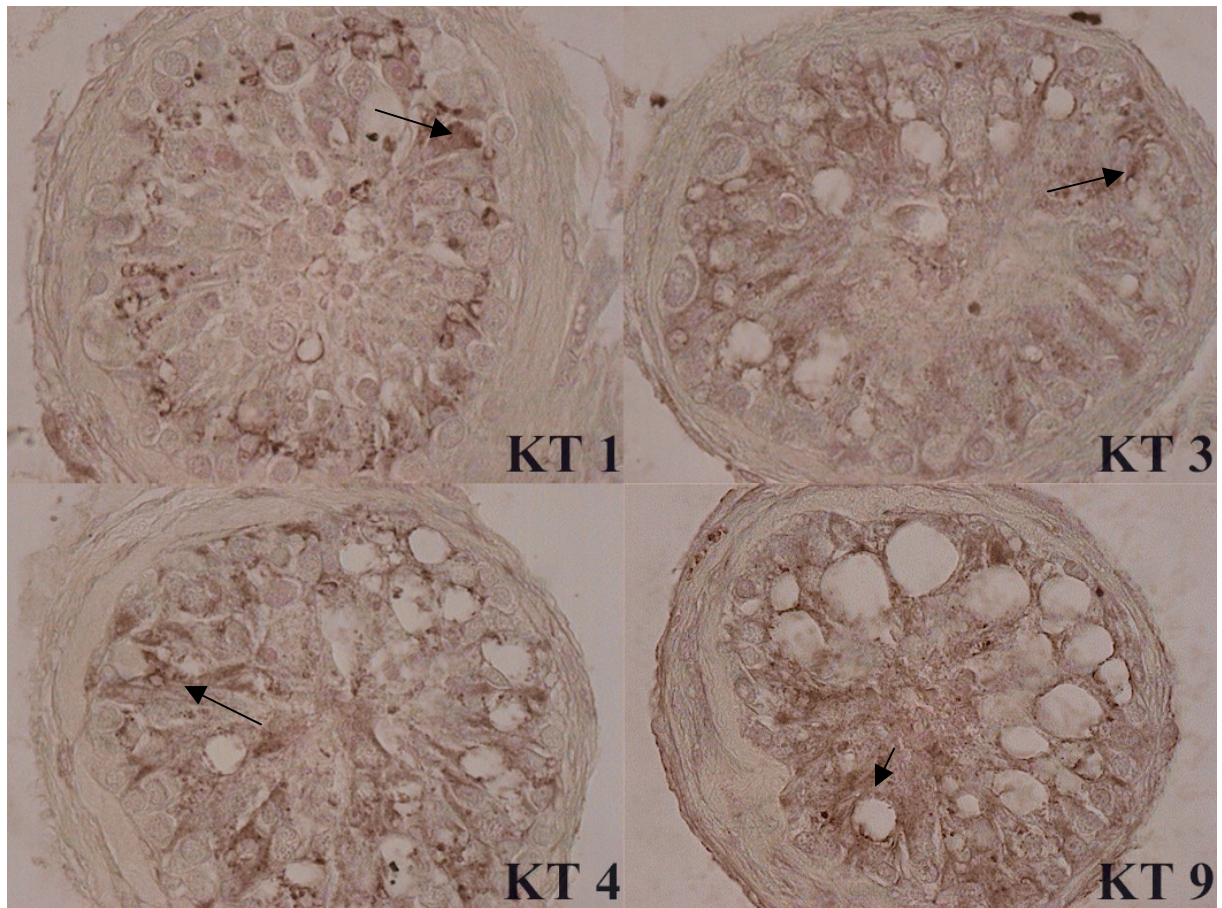


Abb. 8: Expression von VEGFR-1 in Tubuluskultur

Abb. 8: Zeigt die kultivierten Tubuli, die vom Kulturbeginn (KT 1) bis zum 9. Kulturtag (KT 9) immunhistochemisch auf VEGFR-1 untersucht wurden. Expression von VEGFR-1 in kultivierten Tubuli ist vom ersten Kulturtag an intensiv (Pfeil) und bleibt gleichbleibend bis zum neunten Kulturtag in den Sertoli-Zellen erhalten (KT 1 - KT 9).

4.5 Immunhistochemische Lokalisation von CEACAM1

4.5.1 Expression von CEACAM1 in normalem Keimepithel

Desweiteren wurde die Expression von CEACAM1 im normalen humanen testikulären und epididymalen Gewebe immunhistochemisch untersucht. Hierbei wurde derselbe CEACAM1-Antikörper wie für die Immunoblots verwendet.

Immunhistochemische Analysen zeigten, dass in normalem testikulären Gewebe CEACAM1 im adluminalen Kompartiment des Keimepithels in der Kontaktzone zwischen den Sertoli-Zellen und Keimzellen lokalisiert war (Abb. 9). An keiner Stelle erreichte die Reaktion die Basalmembran. Im Gegensatz dazu war keine spezifische Immunreaktion in den Keimzellen erkennbar, weder in den Spermatogonien noch in den differenzierenden Keimzellen.

Innerhalb des Keimepithels war CEACAM1 außerordentlich heterogen exprimiert, und zwar sowohl innerhalb des Keimepithels eines Tubulusquerschnittes wie auch im Vergleich der Tubuli untereinander. Einige Samenkanälchen zeigten keine Reaktion für CEACAM1.

Leydigzellen und Blutgefäße im interstitiellen Kompartiment von normalem testikulären Gewebe waren ebenfalls negativ für CEACAM1.

Diese Beobachtung konnte durch elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt werden (Lauke et al., 2004). Bei sehr hoher Auflösung zeigte sich, dass an den luminalen Oberflächen von Tubuli seminiferi, in der Umgebung der Spermatidenköpfe, die CEACAM1 Markierung besonders ausgeprägt war. Es gab keine Markierung bei Spermatogonien.

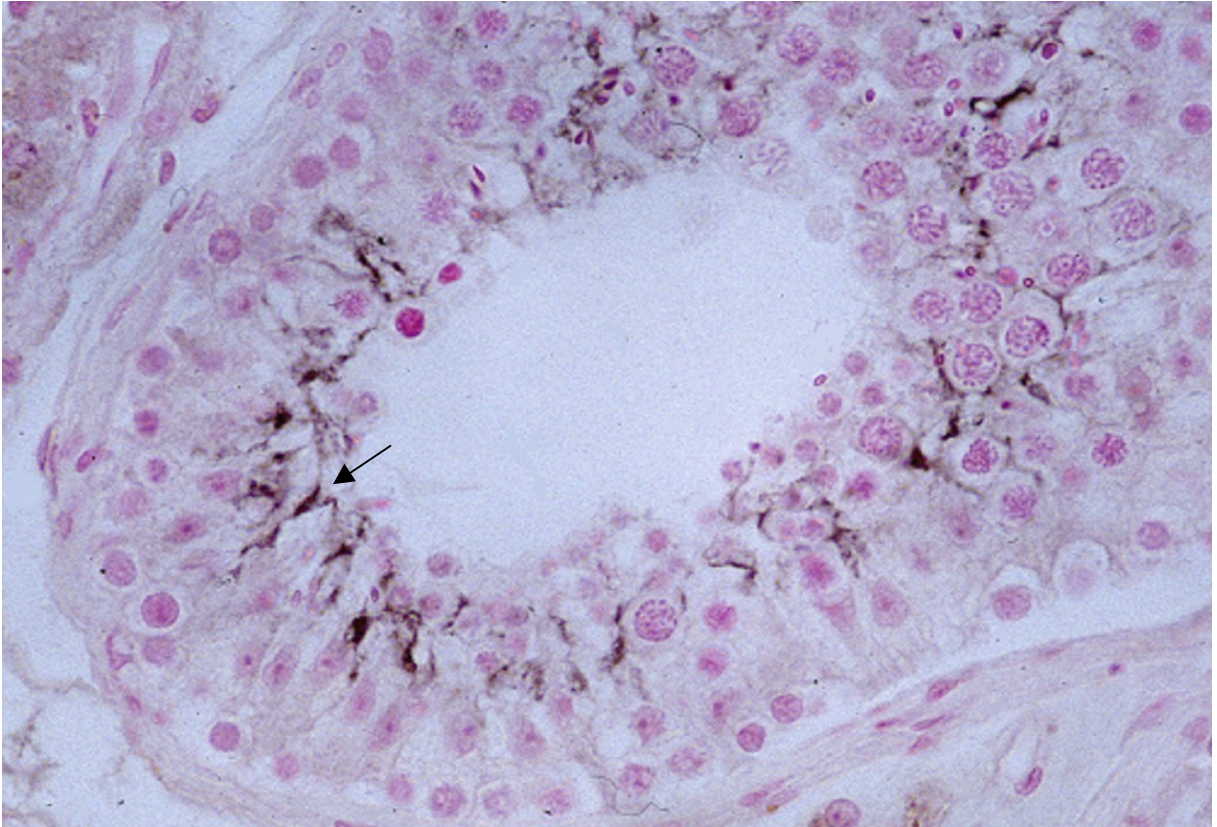


Abb. 9: Expression von CEACAM1 in normalen menschlichen Hodenkanälchen

Die Abbildung zeigt ein Samenkanälchen mit intaktem Keimepithel. Die CEACAM1-Färbung ist im adluminalen Abschnitt der Sertoli-Zellen zu finden (Pfeil) (x 450).

4.5.2 Expression von CEACAM1 im Ductus epididymidis

Eine apikale Lokalisation von CEACAM1 konnte ebenso in den Epithelien des Ductus epididymidis gefunden werden, während die Basalzellen, die Lamina propria und die Blutgefäße des Interstitiums für CEACAM1 negativ waren (Abb. 10).

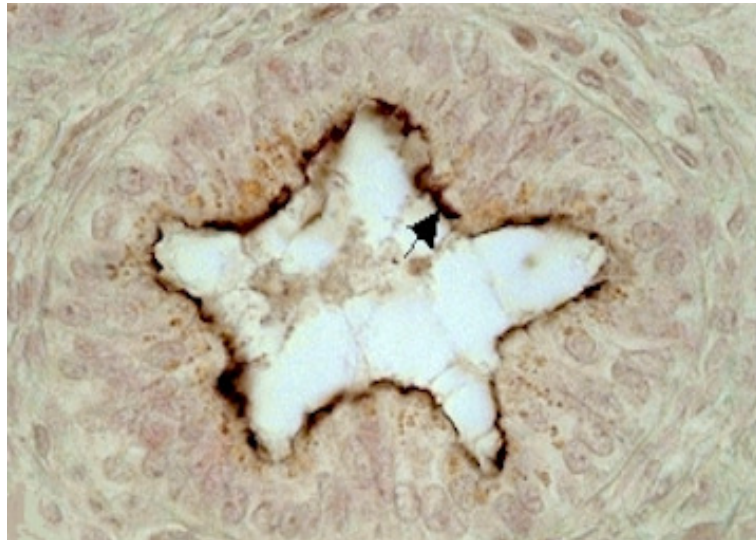


Abb. 10: Expression von CEACAM1 in normalem menschlichen Nebenhodengang

Immunhistochemisch ließ sich CEACAM1 an der luminalen Oberfläche (Pfeil) des Epithels des Ductus epididymidis lokalisieren (x 450).

4.5.3 Expression von CEACAM1 in Samenkanälchen, die ausschließlich Sertoli-Zellen enthalten

Um zu überprüfen, ob die Expression von CEACAM1 in Sertoli-Zellen von der Anwesenheit der Keimzellen abhängt, wurden immunhistochemische Untersuchungen an humanem testikulären Gewebe durchgeführt (Abb. 11 A). Einige Areale dieses Gewebes enthielten Tubuli seminiferi, die ausschließlich Sertoli-Zellen beinhalten. Hierbei zeigte sich, dass diese Sertoli-Zellen kein CEACAM1 exprimierten (Abb. 11 C), während die Sertoli-Zellen in den angrenzenden Tubuli seminiferi, die sowohl Sertoli-Zellen als auch Keimzellen besaßen, positiv für CEACAM1 waren (Abb. 11 B).

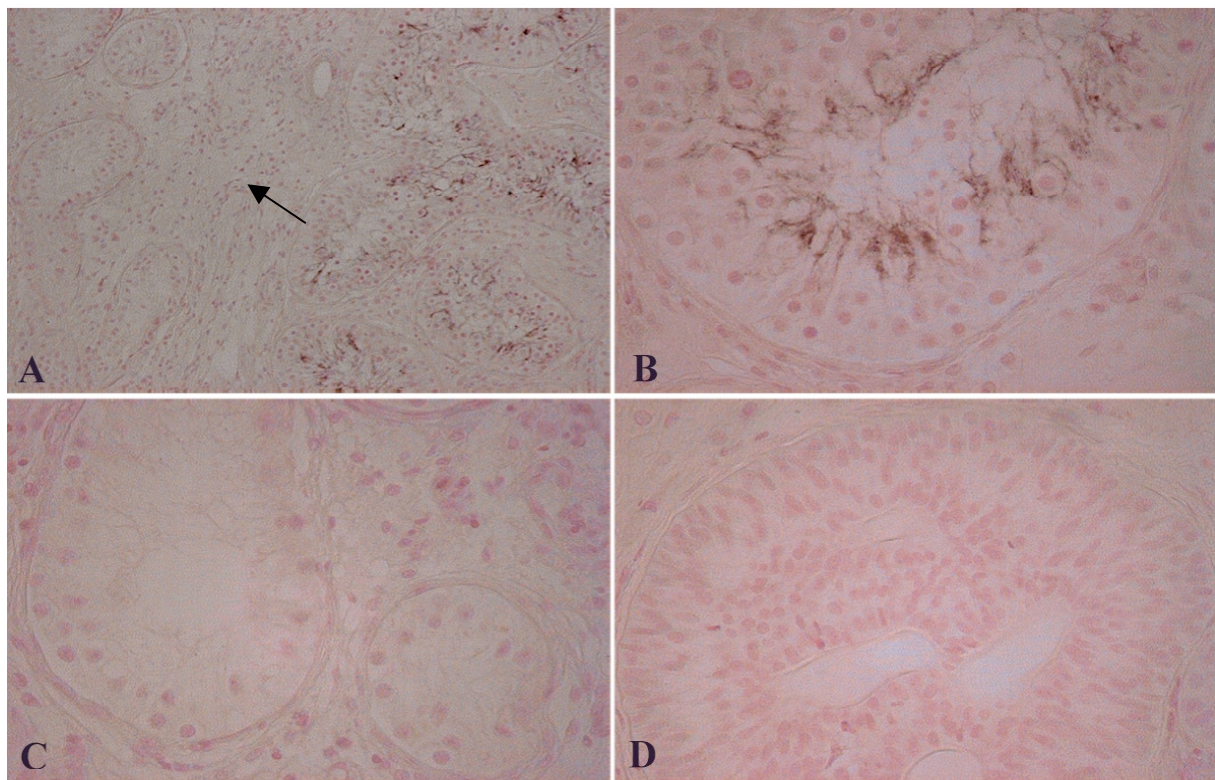


Abb. 11 (A-D): Expressionsmuster von CEACAM1 im normalen menschlichen Hodengewebe

Abb. 11 A: Die Markierung von CEACAM1 ist im Keimepithel sporadisch erkennbar, CEACAM1 konnte nicht in allen Tubuli seminiferi immunhistochemisch nachgewiesen werden (Pfeil). Einige Tubuli waren positiv und andere, in direkter Nachbarschaft, negativ. Es ist keine Reaktion in den Sertoli-Zellen von Tubuli seminiferi sichtbar, welche ausschließlich Sertoli-Zellen enthalten. **Abb. 11 B:** Eine stärkere Vergrößerung aus Abb. 13 A zeigt ein Samenkanälchen mit intakter Spermatogenese mit CEACAM1 Markierung. **Abb. 11 C:** Es ist keine Reaktion in den Tubuli ohne Keimzellen sichtbar. **Abb. 11 D:** Kontrollschnitt ohne spezifische Reaktion. Die hier gezeigten Schnitte wurden mit Eosin gegengefärbt.

4.5.4 Expression von CEACAM1 bei gestörter Spermatogenese

In Sertoli-Zellen der Tubuli seminiferi mit gestörter Spermatogenese konnte eine Verlagerung der CEACAM1 Markierung in die basale Membran der Sertoli-Zellen beobachtet werden. Um festzustellen, ob die Expression von CEACAM1 in humanem Keimepithel mit der Anwesenheit von Keimzellen in Beziehung steht, wurde ein *Ex-Vivo-Modell* benutzt, welches eine progrediente Störung der Spermatogenese und deren Beobachtung im Zeitverlauf erlaubt (Abb. 12 A-F). In morphologischen Untersuchungen wiesen die Tubuli seminiferi eine signifikante progressive Störung des Keimepithels auf, welche speziell bei den differenzierenden Keimzellen im adluminalen Kompartiment lokalisiert werden konnte (Abb. 12 A-C). Diese Störung war erstmalig an den Kulturtagen 2 bis 3 sichtbar. Von dem ersten bis zum dritten Tag gab es keine besondere Veränderung von CEACAM1 Expression in den Sertoli-Zellen, verglichen zu dem normalen Keimepithel. Ab dem dritten bis zum neunten Tag änderte sich unter den Kulturbedingungen die CEACAM1 Färbung. Während des Fortschreitens der Spermatogenesestörung intensivierte sich die CEACAM1 Färbung und die Markierung war nicht mehr auf die adluminalen Abschnitte der Sertoli-Zellen beschränkt, sondern reichte bis zur Basalmembran des Samenkanälchens (Abb. 12 D-F). Es waren keine spezifischen Reaktionen bei den Kontrollschnitten zu erkennen.

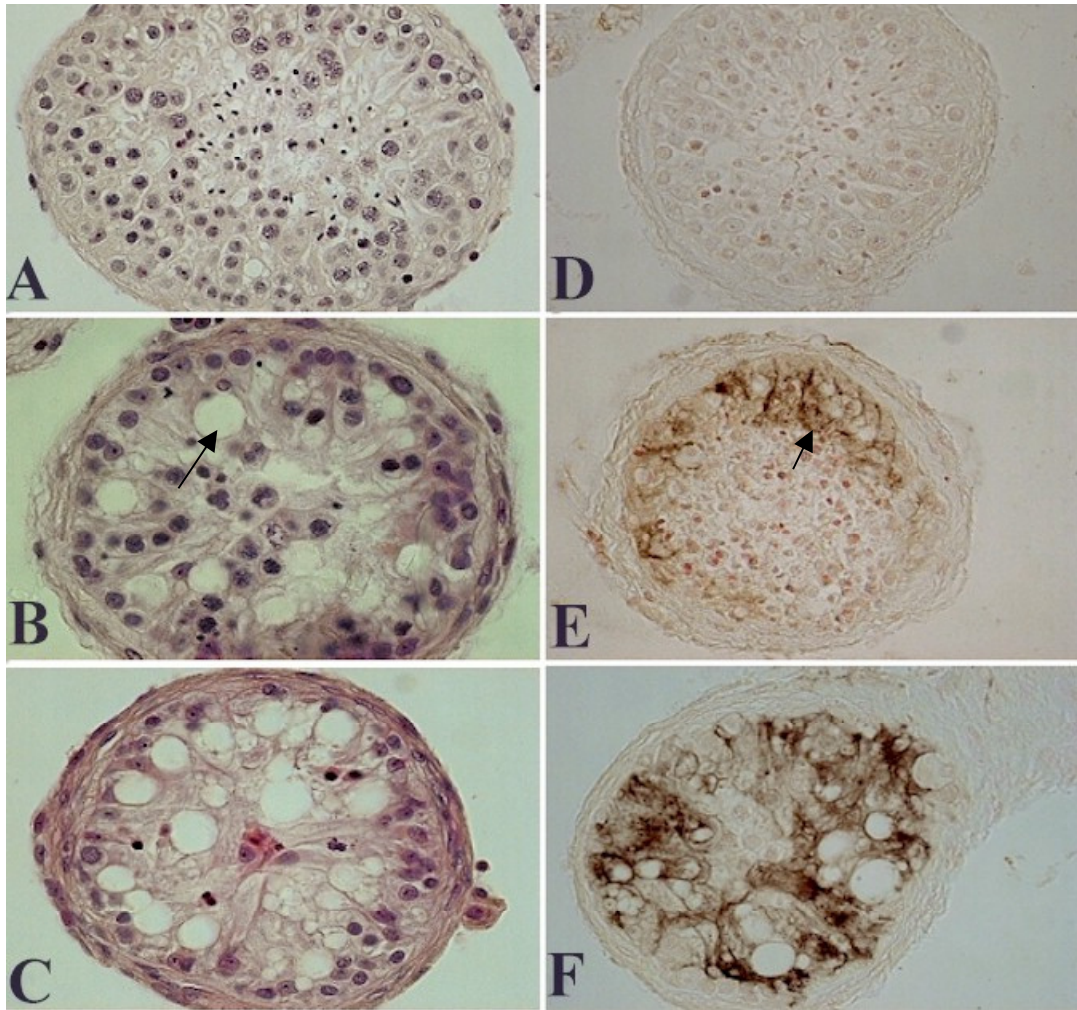


Abb. 12 A - F: Hodenkanälchen in Kultur / CEACAM1 Expression bei *in vitro* induzierter Spermatogenesestörung

Abb. 12 A - C: Man kann lichtmikroskopisch eine Destruktion des Keimepithels während der Kultur beobachten (Hämatoxylin-Eosin Färbung). **Abb. 12 A:** 1.Tag: Intakte Spermatogenese **Abb. 12 B:** 3.Tag: Untergang von differenzierenden Keimzellen im adluminalen Kompartiment des Keimepithels und Entstehung großer Vakuolen (Pfeil) durch Zelluntergang (Spermatogonien I) und strukturelle Destruktion. **Abb. 12 C:** 7.Tag: Kompletter Verlust von differenzierenden Keimzellen, während Sertoli-Zellen und Spermatogonien überleben, und die Anzahl der Vakuolen im Keimepithel ansteigt. Die Abbildungen **12 D - F** stellen die korrespondierenden Schnitte zu den Schnitten von den Abbildungen **12 A – C** mit CEACAM1-Markierung dar. **Abb. 12 D:** 1.Tag: Bei intakter Spermatogenese kaum eine CEACAM1 - Markierung sichtbar. **Abb. 12 E:** 3.Tag: Parallel zur beginnenden Spermatogenesestörung und Untergang von differenzierenden Keimzellen, kommt es zu einer gesteigerten Expression von CEACAM1 in den Sertoli-Zellen (Pfeil). **Abb. 12 F:** 7.Tag: Die stärkste Färbung für CEACAM1 wurde nach 7. Kulturtag in den Sertoli-Zellen gefunden, die Reaktion reicht bis zur Basalmembran.

4.5.5 Expression von CEACAM1 in Keimzelltumoren

Im makroskopisch unauffälligen Hodengewebe aus dem Randbereich solider Keimzelltumore findet man häufig nebeneinander Anschnitte von Samenkanälchen mit normaler Spermatogenese, mit gestörter Spermatogenese und frühe Stadien von Keimzelltumoren (Carcinoma-in-Situ (CIS)).

Im Vergleich zu der sehr feinen CEACAM1-Markierung in Sertoli-Zellen von Tubuli seminiferi mit normaler Spermatogenese, ließ sich eine Erhöhung der Expression in den Sertoli-Zellen beobachten, die sich in benachbarten Hodenkanälchen mit gestörter Spermatogenese befanden. Allerdings war die stärkste Markierung in den Sertoli-Zellen von Tubuli mit Tumorzellen vorzufinden (Abb. 13 A-C). In diesen Tubuli reichte die CEACAM1-Markierung bis zur Basalmembran, während die Tumorzellen selbst für CEACAM1 negativ waren. In diesem frühen Stadium des Keimzelltumors zeigten die Blutgefäße im Interstitium ebenso keine Markierung für CEACAM1. Es waren keine spezifischen Markierungen bei den Kontrollschnitten vorhanden.

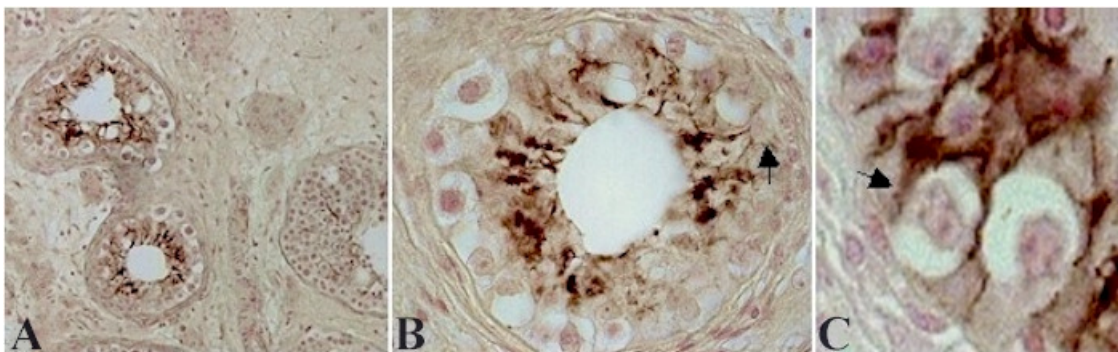


Abb. 13 A - E: Expressionsmuster von CEACAM1 in Keimzelltumoren

Abb. 13 A: Die Expression von CEACAM1 ist in den Sertoli-Zellen in Anwesenheit von Carcinoma in Situ (CIS), verglichen zu normalen Tubuli seminiferi, erhöht. In diesem frühen Stadium des Keimzelltumors gibt es keine CEACAM1-Markierung in den Blutgefäßen (x 150). **Abb. 13 B:** Die starke Reaktion bei CIS in den Sertoli-Zellen reicht bis zur Basalmembran (Pfeil) (x 450). Im Gegensatz zu intaktem Keimepithel ist bei CIS-Tubuli mit gestörter Spermatogenese eine Verlagerung der CEACAM1-Färbung in die basalen Abschnitte der Sertoli-Zellen sichtbar. **Abb. 13 C:** Ausschnittsvergrößerung von 15 B (x 1000).

Expression von CEACAM1 und VEGF und seinen Rezeptoren im kultivierten Tubuli seminiferi

Kulturtage	0-2	3-5	6-7
VEGF	++	+++	+
VEGFR-1	++	++	++
VEGFR-2	+	+++	+
CEACAM1	- / +	++	++++

Tab. 1.: Die hier gezeigten Ergebnisse bezüglich des Expressionsmusters von CEACAM1, VEGF und seine Rezeptoren in kultivierten Tubuli, sind im Zeitverlauf der Kultur zusammengefasst.

Die Expression von VEGF und VEGFR-1 ist bereits zu Beginn der Kultur in den Sertoli-Zellen, wie wir es auch bei nativem Hodengewebe beobachten können, vorhanden.

VEGFR-2 wird ebenso am Anfang der Kultur wie im Nativgewebe exprimiert, jedoch nicht so intensiv wie VEGFR-1. Im Verlaufe der Kultur und der daraus resultierenden

Spermatogenesestörung konnten wir eine Verstärkung der VEGFR-2-Expression in den Sertoli-Zellen am dritten Tag beobachten. Die Expression von VEGF erreicht ebenso seine höchste Intensität am 3. Kulturtag. CEACAM1 dagegen ist zu Beginn der Kultur spärlich in den Sertoli-Zellen sichtbar, aber im Laufe der Kultur nimmt es immer mehr an Intensität zu, ist bereits am 3. Kulturtag stark, jedoch am 7. Kulturtag am intensivsten ausgeprägt.

4.6 Expression von CEACAM1 nach Stimulation mit VEGF

Um zu überprüfen, ob die Expression von CEACAM1 in den Sertoli-Zellen von der Anwesenheit von VEGF abhängt, wurden kleine Gewebstücke im Tubuluskulturmodell mit VEGF stimuliert und diese anschließend immunhistochemisch auf CEACAM1 untersucht (Abb. 14 A, B). Die Expression von CEACAM1 verstärkte sich vom ersten Kulturtag an, nahm bis zum dritten Kulturtag stetig an Intensität zu und extendierte in das basale Kompartiment.

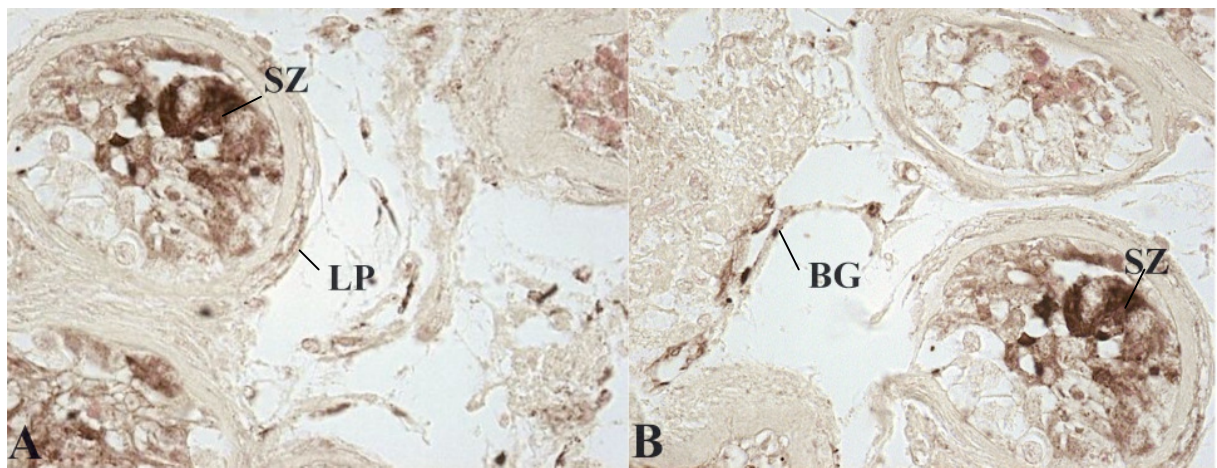


Abb. 14: CEACAM1 Expression in Kultur von Gewebsfragmenten nach Stimulation mit VEGF

Abb. 14 A - B: Zeigt die VEGF stimulierten Gewebstücke in der Kultur, welche mit 4D1/C2 gefärbt wurden. CEACAM1 Expression in den Sertoli-Zellen (SZ) wird verstärkt und extendiert zur Basalmembran des Keimepithels nach Stimulation mit VEGF. Diese Reaktion wird bereits zu Beginn des ersten Tages der Kultur sichtbar. Es ist ebenso eine CEACAM1-Markierung an einem Blutgefäß (BG) erkennbar, sowie in einigen peritubulären Zellen in Angrenzung zur Lamina propria (LP).

4.7 CEACAM1-Nachweis im humanen testikulären und epididymalen Gewebe sowie testikulären Tumoren mittels Western Blot

Zusätzlich zum immunhistochemischen Nachweis von CEACAM1 im Hodengewebe wurden auch an menschlichem testikulären und epididymalen Gewebe Western Blot-Analysen durchgeführt um CEACAM1 nachzuweisen (Abb. 15 A). Hierfür wurde der Antikörper 4D1/C2 benutzt, welcher spezifisch humanes CEACAM1 erkennt. Das Immunoblotting von normalem testikulären und epididymalen Gewebe ergab zwei Banden, eine bei 160 kDa, was der Größe des CEACAM1 entspricht und eine weitere bei 120 kDa. Immunoblots von testikulären Tumoren, wie Seminome und Teratome, zeigten die zwei Banden auf gleicher Höhe, jedoch, im Vergleich zu normalem testikulären und epididymalen Gewebe, in erheblich größerer Menge. Um mögliche Kreuzreaktivität auszuschließen, wurden für die Western Blot-Analysen Präabsorptionskontrollen durchgeführt (Abb. 15 C).

Nach der Präabsorption von CEACAM1 Antikörper 4D1/C2 mit aufgereinigtem CEACAM1 aus humanen Granulozyten zeigte sich weder bei 160 kDa noch bei 120 kDa eine spezifische Bande. Die Detektion von Vimentin, als interne Kontrolle in identischen Blots, läßt die Aussage zu, dass gleiche Mengen von Protein aufgebracht wurden.

4.8 CEACAM1-Nachweis im menschlichen Ejakulat

Western Blot-Analysen wurden außerdem an normalen menschlichen Ejakulaten durchgeführt, um zu prüfen, ob CEACAM1 in der Samenflüssigkeit nachgewiesen werden kann. Vergleichbar zu dem testikulären Gewebe wurden bei dieser Analyse ebenfalls zwei Banden bei 160 kDa und 120 kDa sichtbar gemacht (Abb. 15 B).

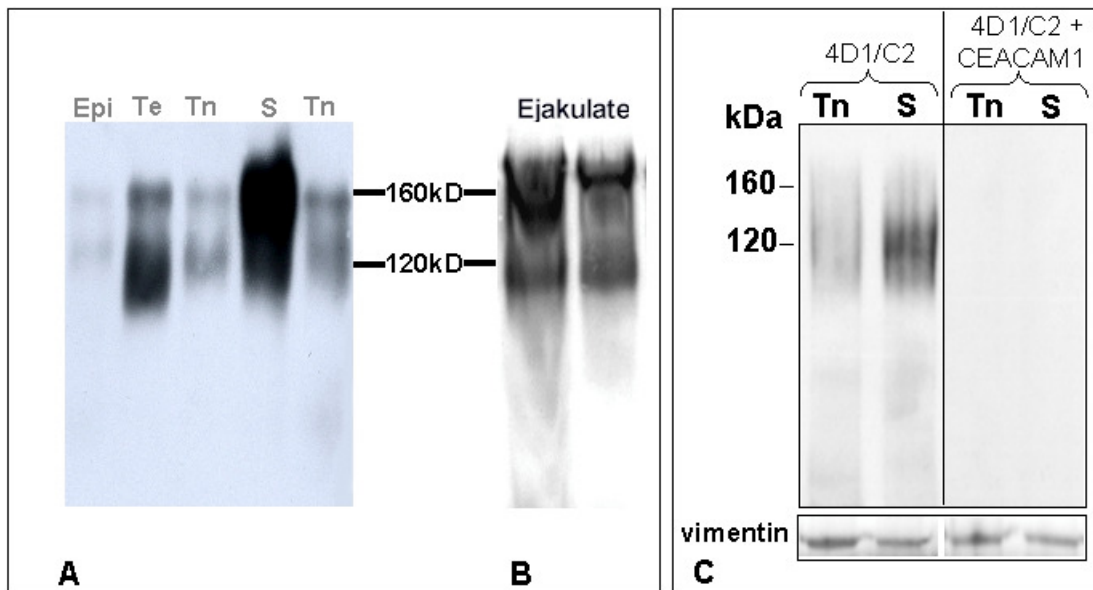


Abb. 15 A - C: Detektion von CEACAM1 durch Immunoblotting

Die Abbildungen A - B stellen die Immunoblots von CEACAM1 durch den spezifischen Antikörper 4D1/C2, dar.

Abb. 15 A: CEACAM1 ist in normalem testikulären Gewebe (Tn), in epididymalem Gewebe (Epi) und in testikulären Tumoren, sowohl in den Seminomen (S), als auch in den Teratomen (Te), bei 120 und 160 kDa, nachweisbar. Die Menge des CEACAM1 in den beiden Tumoren, ist mehr als in normalem testikulären Gewebe.

Abb. 15 B: In menschlichem Ejakulat von gesunden Individuen ließen sich, ähnlich wie im testikulären und epididymalen Gewebe, zwei Banden bei 120 kDa und 160 kDa nachweisen.

Abb. 15 C: In zwei parallel laufenden Immunoblots wurde der 4D1/C2 Antikörper verwendet.

Einmal gegen CEACAM1 gerichtet und ein anderes Mal zusammen mit CEACAM1 präabsorbiert. Hierbei wurde das gleiche Gewebstück vom normalen testikulären Gewebe und vom Tumorgewebe benutzt. Bei dem Präabsorptionsversuch wurden CEACAM1 und 4D1/C2 inkubiert. Dies ließ die spezifischen Banden bei 160 kDa und 120 kDa verschwinden, welche davor durch alleinige Verwendung von 4D1/C2 sichtbar gemacht worden waren. Die Detektion von Vimentin lieferte eine Kontrolle für die Proteinmenge, die zuvor in jede Tasche gegeben wurde. Dadurch konnte die größere CEACAM1 Menge in testikulären Tumoren, wie Seminomen, im Vergleich zu normalem Gewebe demonstriert werden.

5 Diskussion

Die hier vorgelegten Ergebnisse belegen erstmalig die Expression des Zell-Zell-Adhäsionsmoleküls CEACAM1 in männlichen Reproduktionsorganen und lassen vermuten, dass CEACAM1 im Zusammenspiel mit VEGF und seinen Rezeptoren in die Regulation der menschlichen Spermatogenese involviert ist. Zusammenfassend zeigen die hier vorgelegten Ergebnisse, dass CEACAM1 in normalen menschlichen Samenkanälchen in Sertoli-Zellen, nicht jedoch in Keimzellen zu finden ist. Im Rahmen der Spermatogenesestörung durch frühe Tumorzellen (Carcinoma-in-Situ; CIS) oder bei experimentell induziertem Keimzellverlust kommt es zu einer stärkeren Expression von CEACAM1 in den Sertoli-Zellen. Dies steht offensichtlich in einer Relation mit dem VEGF-System, da VEGF und der VEGFR-2 ebenfalls bei dem experimentell induzierten Keimzellverlust in Sertoli-Zellen stärker nachweisbar sind. Darüber hinaus zeigen die hier vorgelegten Befunde, dass lösliche Formen von CEACAM1 in der Samenflüssigkeit nachzuweisen sind.

5.1 Das *Ex-vivo-Kulturmodell* der Samenkanälchen ist geeignet für das Studium der Expression angiogenetischer Faktoren im Keimepithel

Experimentelle Untersuchungen am menschlichen Material sind verständlicherweise stark eingeschränkt bis kaum möglich. Um die Bedeutung der angiogenetischen Faktoren für den Ablauf der menschlichen Spermatogenese besser beurteilen zu können, wurde ein bereits etabliertes Kulturmodell unter Benutzung isolierter Fragmente menschlicher Samenkanälchen als *Ex-vivo-Essay* verwendet. Um festzustellen, inwieweit dieses Modell für Untersuchungen hinsichtlich der Expression angiogenetischer Faktoren geeignet ist, wurden zunächst an Gewebeschnitten der isolierten Samenkanälchen immunhistochemische Analysen durchgeführt. Diese Untersuchungen bestätigen die bereits publizierten Ergebnisse hinsichtlich der Expression und der Lokalisation von VEGF und seinen Rezeptoren in den

Sertoli-Zellen und Leydigzellen (Ergün et al. 1997). Die hier vorgelegten Ergebnisse belegen darüber hinaus das Expressionsmuster von VEGF und seinen Rezeptoren im Laufe der Gewebekultur, die mit einem experimentell induzierten Verlust der Keimzellen im adluminalen Kompartiment der Samenkanälchen einhergeht. Auch die Expression des Zell-Zell-Adhäsionsmoleküls CEACAM1 wurde hierbei untersucht. Über die Expression von CEACAM1 im normalen Hodengewebe lagen bis zur Durchführung dieser Arbeit keine Erkenntnisse vor.

5.2 Die Expression von CEACAM1 steht in Relation zur Expression von VEGF und VEGFR-2 in Sertoli-Zellen

Sowohl VEGF, als auch VEGFR-2 und CEACAM1 sind im normalen Hodengewebe in Sertoli-Zellen zu finden. Interessanterweise kommt es zu einer deutlichen Steigerung der Immunreaktion für alle drei Faktoren in Sertoli-Zellen isolierter und kultivierter Samenkanälchen am dritten Kulturtag. Da auch die Stimulierung der Samenkanälchenfragmente *in vitro* in einer erhöhten Expression von CEACAM1 in Sertoli-Zellen resultiert, ist anzunehmen, dass auch *in vivo* unter bestimmten Bedingungen eine solche Interaktion zwischen VEGF und CEACAM1 existieren könnte. Ähnlich wie bereits bei Endothelzellen beschrieben, könnte VEGF auch in Sertoli-Zellen zu einer erhöhten Expression von CEACAM1 führen. Das Interessante an den hier präsentierten Ergebnissen ist, dass VEGF einen solchen Effekt an einer nicht-endothelialen Zellform, nämlich der Sertoli-Zelle herbeizuführen scheint. Inwieweit diese Interaktion tatsächlich für die Spermatogenese im menschlichen Hoden von Bedeutung ist, bedarf weiterer Analysen. Es kann aber angenommen werden, dass die erhöhte Expression von CEACAM1 in Sertoli-Zellen mit der Wahrung oder der Reorganisation der strukturellen Integrität von Samenkanälchen im Zusammenhang steht, da durch Verlust der adluminal liegenden

differenzierenden Keimzellen die strukturelle Integrität der Samenkanälchen erheblich gestört wird.

5.3 CEACAM1 ist involviert in die tubuläre Organisation des Keimepithels

Der Nachweis von CEACAM1 in den Sertoli-Zellen der Tubuli seminiferi mit Keimzellen, jedoch nicht in den Sertoli-Zellen der Tubuli seminiferi ohne Keimzellen, läßt die Annahme zu, dass CEACAM1-Expression in Sertoli-Zellen von der Interaktion zwischen Sertoli-Zellen und Keimzellen abhängt. Da CEACAM1 nur in den adluminalen Abschnitten der Sertoli-Zellen lokalisiert ist, spielt es möglicherweise bei der Polarisierung und Differenzierung dieser Zellen eine Rolle.

Die Differenzierung der Sertoli-Zellen bildet eine wichtige Grundlage für den strukturellen und funktionellen Aufbau der Blut-Hoden-Schranke, welche durch *Tight-junctions* (Schulze, 1984, Wong et al., 2004, Yan HH and Cheng CY, 2005) zwischen den benachbarten Sertoli-Zellen gebildet und aufrechterhalten wird. Die Blut-Hoden-Schranke stellt eine essentielle Voraussetzung für den Ablauf der Spermatogenese dar. Nur die Spermatozyten Typ I passieren diese Barriere und migrieren von dem basalen zum adluminalen Kompartiment des Keimepithels. Es wird angenommen, dass die *Tight-junctions* beim Passieren der Spermatozyten Typ I kurzzeitig geöffnet und wieder geschlossen werden. Alle differenzierenden Keimzellen weisen eine Adhärenz zu der Zellmembran der adluminalen Abschnitte von Sertoli-Zellen auf, bis sie sich als reife Spermatozoen von der Sertoli-Zelle lösen, um dann im Rahmen der Spermiatio in das Lumen der Samenkanälchen abgegeben zu werden. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass das Expressionsmuster von CEACAM1 in den normalen Hodenkanälchen ebenfalls auf die genannten adluminalen Abschnitte der Sertoli-Zellen beschränkt ist.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass CEACAM1 möglicherweise an der Sertoli-Keimzell-Interaktion während der Differenzierung und Reifung der Keimzellen beteiligt ist. Als Zell-Zell-Adhäsionsmolekül scheint CEACAM1 für die dynamisch erfolgende Zell-Zell-Adhäsion zwischen Spermatozyten und Sertoli-Zellen prädestiniert zu sein. Obwohl CEACAM1 sowohl homophile als auch heterophile Bindungen eingehen kann, scheint die hier beschriebene Adhäsion nicht durch eine homotypische Bindung zu erfolgen, denn die Keimzellen selbst weisen in keinem Stadium ihrer Differenzierung CEACAM1 auf. Während des Ablaufs der Spermatogenese findet vermutlich nicht nur eine mechanische Zell-Zell-Adhäsion zwischen den Sertoli-Zellen und den Spermatozyten statt, sondern sie kommunizieren möglicherweise dadurch miteinander. Ob und wie diese Kommunikation erfolgt, ist allerdings im Detail noch nicht bekannt, vor allem sind die beteiligten molekularen Mechanismen noch weitestgehend unklar. Dennoch haben kürzlich publizierte Daten aus den Untersuchungen an Mäusehoden verblüffenderweise gezeigt, dass die N-Glycan-Kohlenhydratstruktur, welche sich auf den differenzierenden Keimzellen befindet, eine zentrale Rolle bei der Interaktion zwischen den Keimzellen und den Sertoli-Zellen spielt und für das Überleben der Keimzellen notwendig ist. Bei Knockout-Mäusen, bei denen das Gen für die Glykosilierung in Form von N-Glycan-Kohlenhydratstruktur ausgeschaltet worden war, verloren die Spermatozyten ihre Verbindung zu den Sertoli-Zellen (Akama et al., 2002). Diese Daten deuten insoweit auf eine mögliche Rolle von CEACAM1 bei diesen Prozessen hin, als die Expression des ebenfalls stark glykosilierten CEACAM1 sich im adluminalen Kompartiment der Sertoli-Zellen bis zur luminalen Oberfläche ausdehnt und stellenweise ein fokussiertes Lokalisationsmuster aufweist, was auf mögliche Adhäsionspunkte der Sertoli-Zellen hinweist. Basierend auf den gezeigten Befunden kann postuliert werden, dass das an adhäsiven Kontaktstellen der Sertoli-Zellen lokalisierte CEACAM1 mit seiner Kohlenhydrat-Determinante (Lewis Gal β (1,4)[Fuc α (1,3)]GlcNAc, Sialyl-Lewis NeuNAc α 2,3Gal β 1,4(Fuc α (1,3) GlcNAc sowie andere Glykane, z.B. *high-mannose*) dazu dienen könnte, den Kontakt zwischen den sich

differenzierenden Keimzellen und den Sertoli-Zellen während der Wanderung der Keimzellen zum Lumen der Samenkanälchen hin kontinuierlich wiederherzustellen und somit deren Differenzierung und Reifung zu beeinflussen. Ob diese Kohlenhydratepitope des CEACAM1 tatsächlich in die Zell-Zell-Adhäsionsprozesse zwischen Keimzellen und Sertoli-Zellen involviert sind, wie es von Akama und Kollegen für eine Gruppe von Kohlenhydratstrukturen beschrieben wurde, bedarf weiterer Untersuchungen.

Weiterhin ist anzunehmen, dass die Präsenz von zwei unterschiedlichen Isoformen des CEACAM1 bei 160 kDa und bei 120 kDa im testikulären und epididymalen Gewebe durch unterschiedliche Glykosylierung von CEACAM1 verursacht wird, welche möglicherweise die Zell-Zell-Adhäsion zwischen den Sertoli-Zellen regulieren könnte. Transfektionsstudien an CHO und HEK293-Zellen für CEACAM1 ergaben, dass diese Zellen CEACAM1-Form mit 120 kDa exprimieren. Massen-Spektrometrische-Sequenzierung dieser CEACAM1-Formen ergab das gesamte CEACAM1-Protein ohne den Sialyl-Lewis-X. Dies spricht für unterschiedliche Glykosylierung des CEACAM1-Moleküls (Prof. C. Wagener, Abt. der klinischen Chemie des Universitätskrankenhauses Eppendorf, Hamburg, mündliche Mitteilung). Weitere Studien werden benötigt, um die 120 kDa-Form von CEACAM1 im menschlichen Hodengewebe näher zu charakterisieren.

Samenkanälchen, die ausschließlich Sertoli-Zellen enthalten (SCO), sowie hypoplastische Samenkanälchen, welche solide Stränge von Sertoli-Zellen tragen, sind ein zufälliger Fund bei der mikroskopischen Evaluierung des Hodengewebes. Es wird angenommen, dass solche Segmente von Samenkanälchen während der testikulären Entwicklung nicht von den Keimzellen besiedelt werden (Huber et al., 1968; Knecht, 1976). Andere SCO-Tubuli repräsentieren wahrscheinlich die Endphase der kompletten Keimzelldegeneration. Das Fehlen von CEACAM1 in SCO-Tubuli impliziert, dass CEACAM1-Expression in Sertoli-Zellen möglicherweise durch Zell-Zell-Interaktion oder durch unbekannte Faktoren, welche von Keimzellen freigesetzt werden, induziert wird. Unbekannte Faktoren, die zur

Differenzierung der Keimzellen führen, können möglicherweise mit der CEACAM1-Expression in Sertoli-Zellen in Zusammenhang stehen. Da VEGF offenbar eine Hochregulierung von CEACAM1 bewirken kann und ebenso wie CEACAM1 am 3. Kulturtag seine höchste Intensität erreicht, scheint VEGF einer der Faktoren zu sein, welche an diesem Prozeß beteiligt sein könnten. Diese Art der Regulation könnte parakrin auf Sertoli-Zellen wirken und somit die Expression von CEACAM1 in diesen Zellen hochregulieren.

Ein früher Effekt von CIS ist ein massiver Verlust von Keimzellen, insbesondere gehen die differenzierenden Keimzellen des adluminalen Kompartiments frühzeitig zugrunde. Die hier gezeigten Ergebnisse demonstrieren eine signifikante Hochregulierung von CEACAM1 in Sertoli-Zellen der Tubuli seminiferi, welche eine gestörte Spermatogenese aufweisen.

CEACAM1 ist auch in Sertoli-Zellen der Tubuli seminiferi hochreguliert, die CIS tragen. Die hier gezeigte Ausdehnung der CEACAM1-Markierung bis zu den basalen Abschnitten der Sertoli-Zellen in CIS-Tubuli wird offensichtlich durch die Destruktion der Blut-Hoden-Schranke verursacht. Es wird grundsätzlich angenommen, dass die Zellen in dem adluminalen Kompartiment durch die Blut-Hoden-Schranke immunprotektiv geschützt sind und die entscheidende Barriere durch die *Tight-junctions* zwischen den Sertoli-Zellen geliefert wird.

Ob und wie CEACAM1 in die Konstruktion bzw. in das Aufrechterhalten der Blut-Hoden-Schranke involviert ist, ist unbekannt und bedarf näherer Untersuchung.

Um zu klären, ob die Präsenz von Tumorzellen oder der Verlust von Keimzellen, verursacht durch Tumorzellen, zu CEACAM1-Expression in den Sertoli-Zellen führt, wurde ein organotypisches Kulturmodell benutzt, bei dem Fragmente von menschlichen Hodenkanälchen isoliert und kultiviert wurden. Diese Methode war in unserer Arbeitsgruppe bereits erfolgreich erprobt (Seidl und Holstein, 1990; Lauke et al., 1991). Die Kultur von normalen Tubuli seminiferi in dieser Studie führte zu einer spermatogenetischen Störung, die der *in vivo* beobachteten Störung, wie bei CIS, sehr ähnlich erschien. Im Vergleich zum Beginn der Kultur stieg die CEACAM1-Expression in Sertoli-Zellen am 3. Kulturtag an.

Diese Hochregulierung von CEACAM1 in Sertoli-Zellen, induziert durch Spermatogenesestörung *in-vitro*, untermauert die Hypothese, dass der Untergang der differenzierten Keimzellen möglicherweise zu der Steigerung der Expression von CEACAM1 in Sertoli-Zellen führt. Es ist zu beachten, dass die Intensität der CEACAM1-Expression zwischen dem 7. und 8. Kulturtag am stärksten ausgeprägt war, während ab dem 2. Kulturtag die differenzierten Keimzellen progressiv untergingen und später nicht mehr nachweisbar waren. Um den 7. Kulturtag herum überlebten ausschließlich die basal liegenden Spermatogonien und Sertoli-Zellen. Daher könnte auch angenommen werden, dass auch die Spermatogonien eventuell Faktoren sezernieren, welche auf Sertoli-Zellen wirken, und schließlich zu einer Steigerung der CEACAM1-Expression führen.

Die Sertoli-Zellen liefern die morphologische Grundlage für die korrekte interne Organisation des Keimepithels. Der Verlust von Spermatozyten und reifen Spermatisiden setzt möglicherweise Mechanismen in Gang, welche die durch diesen Verlust bedingte Strukturstörung des Keimepithels beheben sollen. Die tubuläre Struktur könnte dadurch stabilisiert und somit eventuell auch die daraus resultierende Zerstörung der Blut-Hoden-Schranke verhindert werden. Daher ist die gesteigerte Expression von CEACAM1 sowie VEGF und seinen Rezeptoren eher als einen morphogenetischen Mechanismus für den Erhalt und den Wiederaufbau der tubulären Struktur des Keimepithels zu interpretieren, und weniger als einen durch den direkten Einfluss von CIS bedingten Prozess (Abb. 16 A, B). Dies ist ein Prozess, der offensichtlich unabhängig von der Beteiligung von CEACAM1 an der Vaskularisierung der Keimzelltumoren zu betrachten ist.

Auch das Muster der CEACAM1-Expression in Sertoli-Zellen nach einer Störung der Spermatogenese weist auf eine Bedeutung von CEACAM1 bei adhäsiven Prozessen im Keimepithel hin. Hierbei ist CEACAM1 in den Sertoli-Zellen nicht homogen, sondern fokal lokalisiert. Dies unterstützt die Hypothese, dass CEACAM1 für den Erhalt und die Reorganisation der tubulären Struktur von Bedeutung sein kann. Weiterhin könnte

CEACAM1 auch im Zusammenspiel mit VEGF und seinen Rezeptoren, die ebenfalls in Sertoli-Zellen exprimiert sind, Einfluss auf die tubuläre Struktur des Keimepithels nehmen. Es ist bereits gezeigt worden, dass im normalen menschlichen Hodengewebe VEGF und seine Rezeptoren in Leydigzellen und Sertoli-Zellen exprimiert werden (Ergün et al., 1997). Für die physiologische Relevanz des VEGF-Systems bei der Regulation der Spermatogenese sprechen die Befunde, dass die Überexpression von VEGF in Mäusen zur Infertilität führte, während in den übrigen Organen, außer einer mäßig erhöhten Gefäßpermeabilität, keine weiteren spezifischen Störungen der Organfunktionen beobachtet werden konnten (Korpelainen et al., 1998).

Die Tatsache, dass CEACAM1 innerhalb des Hodenparenchyms und auch innerhalb der selben Tubuli seminiferi mit normalem Keimepithel oft nicht homogen exprimiert ist, lässt vermuten, dass die Expression von CEACAM1 in Sertoli-Zellen möglicherweise mit den Stadien der Spermatogenese im Zusammenhang steht.

Der Nachweis von CEACAM1 im Ejakulat durch Western Blot-Analysen spricht für die Existenz einer löslichen Form von CEACAM1 in der Samenflüssigkeit. Als Quelle hierfür kommen einmal Sertoli-Zellen, sowie auch Epithelzellen des Ductus Epididymidis in Frage. Obwohl es bis heute keinen Hinweis für das Einwirken von CEACAM1 auf freigesetzte Spermien gibt, bleibt es offen, ob der Anteil von CEACAM1 in der Samenflüssigkeit eventuell in einem Zusammenhang zur Fertilität steht.

5.4 CEACAM1 ist exprimiert in den kleinen Blutgefäßen von Seminomen

CEACAM1 wird in den Blutgefäßen solider Seminome (Keimzelltumore) exprimiert, während die Blutgefäße des normalen menschlichen Hodengewebes negativ sind (Lauke et al., 2004). Auch der Nachweis von CEACAM1 in Western Blot zeigt eine deutlich höhere CEACAM1-Proteinmenge in den Seminomen im Vergleich zum normalen

Hodengewebe und bestätigt somit die publizierten immunhistochemischen Ergebnisse. In Übereinstimmung mit früheren Publikationen (Ergün et al., 2000, Oliveira et al., 2004 und Kilic et al., 2005) weisen diese Befunde darauf hin, dass CEACAM1 offensichtlich auch bei der angiogenetischen Vaskularisierung von Keimzelltumoren eine Rolle spielt. Inwieweit CEACAM1 bei der frühen Induktion der Angiogenese noch im CIS-Stadium eine Rolle spielt, bedarf weiterer Untersuchungen. Dieser Aspekt ist jedoch von klinischer Bedeutung, da die Induktion der Angiogenese den Prozess der Tumorentwicklung von einem nicht-invasiven Stadium wie CIS zu einer invasiven und sich interstitiell ausbreitenden Form mit beeinflussen bzw. beschleunigen kann. Am Beispiel der Urothelkarzinome der menschlichen Harnblase konnte kürzlich gezeigt werden, dass CEACAM1 sehr früh bei der Aktivierung der Angiogenese in Endothelzellen der kleinen Blutgefäße, die dem oberflächlichen und nicht-invasiven Tumorareal eng benachbart sind, stark exprimiert wird und dadurch die Angiogenese weiter verstärkt (Oliveira-Ferrer et al., 2004).

Zusammenfassend weisen die hier vorgelegten Befunde auf eine neuartige Funktion von CEACAM1 hin. Sie zeigen, dass die CEACAM1-Expression in menschlichen Sertoli-Zellen von der Präsenz der Keimzellen abhängig ist und bei der tubulären Organisation des Keimepithels eine wichtige Rolle spielt. Damit ist CEACAM1 offensichtlich an der morphogenetischen Regulation der Spermatogenese beteiligt. Weiterhin unterstützen die hier vorgelegten Ergebnisse die Vorstellung, dass CEACAM1 im Falle einer gestörten Spermatogenese möglicherweise eine Rolle bei der internen Reorganisation der Tubuli seminiferi spielt, und ebenso in die angiogenetische Vaskularisierung von Keimzelltumoren involviert ist. Weitere Studien sind obligatorisch, um zu evaluieren, ob der Nachweis von CEACAM1 in testikulärem Gewebe und im Ejakulat als ein Parameter für die Fertilitätsdiagnostik benutzt werden kann.

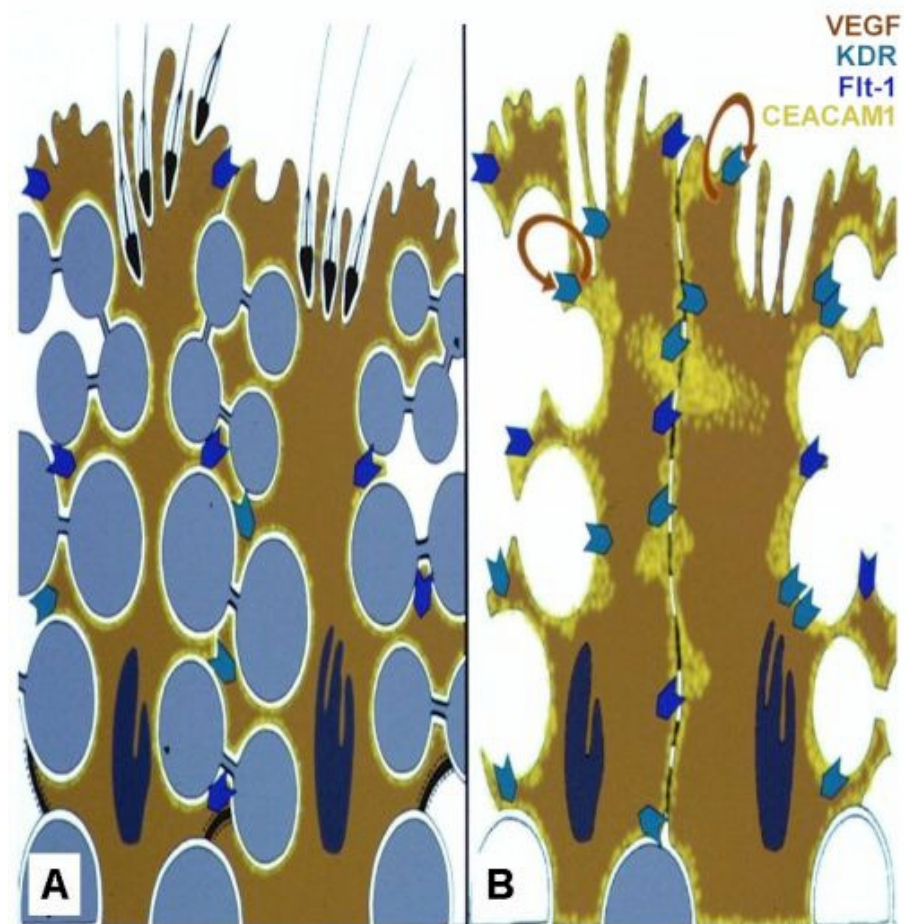


Abb. 16 A - B: Expression von CEACAM1, VEGF und seinen Rezeptoren im normalen und gestörten Keimepithel

Abb. 16 A: Expression von CEACAM1, VEGF und seinen Rezeptoren im normalen Keimepithel.
Abb. 16 B: Expression von CEACAM1, VEGF und seinen Rezeptoren im gestörten Keimepithel.

6 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
Ak	Antikörper
ATP	Adenosin-triphosphat
BGP	biliäres Glykoprotein
CEACAM1	Carcinoembryonic Antigen-Cell Adhesion Molecule1
EC-Proliferation	Entero Chromaffine (Zellen) Proliferation
EGF	Epidermal growth factor
et al.	“et alii”, und andere
FGF	Fibroblasten growth factor
Flk-1(KDR)	Fetal liver kinase-1 (kinase-insert domain receptor)
Flt-1	Fms-like tyrosinkinase-1
FSH	Folikel stimulierendes Hormon
GnRh	Gonadotropin Releasing Hormon
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF-1 α	Hypoxia-Inducible Factor-1 α
Il-1 β	Interleukin 1-1 β
Il-6 β	Interleukin 1-6 β
IL-10	Interleukin-10
IL-13	Interleukin-13
KDa	Kilo Dalton
LH	Lutein stimulierendes Hormon
NO	Stickstoffoxid
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
μ m	Mikrometer (1×10^{-6} m)
OSO4	Osmium tetroxid
PAP	Peroxidase anti-Peroxidase
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Plated derived growth factor
PIGF	Placenta Like growth factor
PVDF-Membran	Poly-vinylidene-difluoride-Membran
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
SCO-Syndrom	Sertoli-Cell-Only-Syndrom
TBS	Tris buffered saline
TGF- β	Transforming growth factor- β
TNF- α	Tumor Necroses Factor- α
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR-1	VEGF Rezeptor-1
VEGFR-2	VEGF Rezeptor-2
WHO	World Health Organization

7 Literatur

Akama TO, Nakagawa H, Sugihara K, Narisawa S, Ohyama C, Nishimura S, O'Brien DA, Moremen KW, Millan JL and Fukuda MN (2002) Germ cell survival through carbohydrate-mediated interaction with Sertoli cells. *Science* 295:124-127.

Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stoe J, Keshet E (1995) Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nature Med* 1:1024-1028.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275:964-67.

Asahara T, Masuda H, Takahashi T (1999) Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85:221-8.

Banda MJ, Knighton DR, Hunt TK and Werb Z (1982). Isolation of nonmitogenic angiogenesis factor from wound fluid. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 79:7773-7777.

Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D (1996) Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor Flt-1. *Blood* 87:3336-3343.

- Barnett TR, Drake L and Pickle W (1993) Human biliary glycoprotein gene: Characterization of a family of novel alternatively spliced RNAs and their expressed proteins. *Mol Cell Biol* 13:1273-1282.
- Bischoff J (1997) Cell adhesion molecules in angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 3:373-376.
- Breier G, Albrecht U, Sterrer S and Risau W (1992) Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* 114:521-532.
- Brown LF, Yeo KT, Berse B, Yeo TK, Senger DR, Dvorak HF and Van de Water L (1992) Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med* 176:1375-1379.
- Brown LF, Berse B, Jackman R, Tognazzi K, Manseau E, Dvorak HF and Senger DR (1993) Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am J Pathol* 143:1255-1262.
- Brümmer J, Neumaier M, Göpfert C and Wagener C (1995) Association of pp60^{c-src} with biliary glycoprotein (CD66a), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family downregulated in colorectal carcinomas. *Oncogene* 11:1649-1655.
- Bussolino F, Mantovani A and Persico G (1997) Molecular mechanisms of blood vessel formation. *TIBS* 22:251-256.
- Carmeliet P (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6:389-395.

Charnockjones DS, Sharkey AM, Boocock CA, Ahmed A, Plevin R, Ferrara N, Smith SK (1994) Vascular endothelial growth factor receptor localization and activation in human trophoblast and choriocarcinoma cells. *Biol Reprod* 51:524-530.

Chin K, Krashima Y, Ogura T, Tajiri H, Yoshida S and Esumi H (1997) Induction of vascular endothelial growth factor by nitric oxide in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene* 15:437-442.

Conn G, Soderman DD, Schaeffer MT, Wile M, Hatscher HB and Thomas K (1990) Purification of a glycoprotein vascular endothelial cell mitogen from a rat glioma-derived cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1323-1327.

Connolly DT (1991) Vascular permeability factor: An unique regulator of blood vessel function. *J Cell Biochem* 47:219-223.

Damber JE, Maddocks S, Widmark A and Bergh A (1992) Testicular blood flow and vasomotion can be maintained by testosterone in Leydig cell depleted rats. *Int J Androl* 15: 385-93.

Davidoff MS, Breucker H, Holstein AF and Seidl K (1990) Cellular architecture of the lamina propria of human seminiferous tubules. *Cell Tissue Res* 262:253-261.

Davidoff MS and Schulze W (1990) Combination of the peroxidase anti-peroxidase (PAP)- and avidin-biotin-peroxidase complex (ABC)-techniques: An amplification alternative in immunohistochemical staining. *Histochem* 93:531-536.

Detmar M, Brown L, Claffey K, Yeo KT, Kocher O, Jackman R, Berse B and Dvorak AM (1994) Overexpression of vascular permeability factor and its receptors in psoriasis. *J Exp Med* 180:1141-1146.

DeVries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N and Williams LT (1992) The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255:989-991.

Drzeniek Z, Lamerz R, Fenger U, Wagener C and Haubeck HD (1991) Identification of membrane antigens in granulocytes and clonic carcinoma cells by a monoclonal antibody specific for biliary glycoprotein, a member of the carcinoembryonic antigen family. *Cancer Lett* 56:173-179.

Dvorak HF, Lawrence FB, Detmar M and Dvorak AM (1992) Vascular permeability factor/ Vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 146:1029-1039.

Dym M and Fawcett DW (1970) The blood-testis barrier in the rat and physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 3:308-326.

Ergün S (1998) Organisation und Regulation der Mikrovaskulatur des menschlichen Hodens. Habilitationsschrift, vorgelegt dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg.

Ergün S, Davidoff M and Holstein AF (1996) Capillaries in the lamina propria of human seminiferous tubules are partly fenestrated. *Cell Tissue Res* 286:93-102.

Ergün S, Kilic N, Fiedler W and Mukhopadhyay AK (1997) Vascular endothelial growth factor and its receptors in normal human testicular tissue. *Mol Cell Endocrinol* 131:9-20.

Ergün S, Kilic N, Harneit S, Paust HJ, Ungefroren H, Mukhopadhyay A, Davidoff M and Holstein AF (1997) Microcirculation and the vascular control of the testis. *Adv Exp Med Biol* 424:163-80.

Ergün S, Kilic N, Lauke H, Hess V, Kilic E, Mukhopadhyay A and Holstein AF (1998) New aspects of remodeling and stability of vascular wall in tumor angiogenesis. *Europ J Clin Invest (Suppl.)* 28:A38.

Ergün S, Kilic N, Ziegler G, Hansen A, Nollau P, Gotze J, Wurnbach JH, Horst A, Weil J, Fernando M, Wagener C (2000) CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and major effector of vascular endothelial growth factor. *Mol Cell* 5:311-320.

Ergün S, Luttmer W, Fiedler W and Holstein AF (1998) Functional expression and localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in the human epididymis. *Biol Reprod* 58:160-168.

Ergün S, Stingl J and Holstein AF (1994) Segmental angioarchitecture of the testicular lobule in man. *Andrologia* 26:143-150.

Ergün S, Stingl J and Holstein AF (1994) Microvasculature of the human testis in correlation to Leydig cells and seminiferous tubules. *Andrologia* 26:235-262.

Ferrara N and Henzel WJ (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Comm* 161:850-858.

Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ and Moore MW (1996) Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380:439-42.

Ferrara N (2000) Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res* 55:15-35.

Finkenzeller G, Marme D, Weich H and Hug H (1992) Platelet-derived growth factor-induced transcription of the vascular endothelial growth factor gene is mediated by protein kinase C. *Cancer Res* 52:4821-4823.

Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285:1182-1186.

Folkman J (1984) What is the role of endothelial cells in angiogenesis? *Lab Invest* 51(6):601-604.

Folkman M, Shing Y (1992) Angiogenesis. *J Biol Chem* 267:10931-10934.

Folkman J (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid, and other disease. *Nat Med* 1:27-31.

Folkman J (1995) Tumor angiogenesis. In: Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Liotta LA, eds. The molecular basis of cancer. Philadelphia: W.B. Saunders 20:6-32.

Fong GH, Rossant J, Gerstenstein M and Breitman ML (1995) Role of the FLT-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376:66-70.

Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD and Semenza GI (1996) Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 16:4604-4613.

Frangmyr L, Baranov V, Prall F, Yeung MM, Wagener C and Hammarstrom S (1995) Cell and region-specific expression of biliary glycoprotein and its messenger RNA in normal human colonic mucosa. *Cancer Res* 55:2963-2967.

Fujii E, Irie K, Ohba K, Ogawa A, Yoshioka T, Yamakawa M and Muraki T (1997) Role of nitric oxide, prostaglandins and tyrosine kinase in vascular endothelial growth factor-induced increase in vascular permeability in mouse skin. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 356(4):475-80.

Galland F, Karamysheva A, Pebusque MJ, Borg JP, Rottapel R, Dubreuil P, Rosnet O, Birnbaum D (1993) The Flt-4 gene encodes transmembrane tyrosine kinase related to the vascular endothelial growth factor receptor. *Oncogene* 8:1233-1240.

Garrido G, Saule S and Gospodarowicz D (1993) Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ovarian bovine granulosa cells. *Growth Factors* 8:109-117.

Gille H, Kowalski J, Li B, LeCouter J, Moffat B, Zioncheck TF, Pelletier N and Ferrara N (2001) Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol Chem* 276(5):3222-3230.

Goldman B, Mach A and Wurzel J (1996) Epidermal growth factor promotes a cardiomyoblastic phenotype in human fetal cardiac myocytes. *Exp. Cell Res* 228(2):237-245.

Grant DS and Kleinman HK (1997) Regulation of capillary formation by laminin and other components of the extracellular matrix. *EXS* 79:317-33.

Harada S, Rodan S and Rodan G (1995) Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in osteoblasts. *Clin Ortho* 313:76-80.

Holstein AF, Orlandini GE and Möller R (1979) Distribution and fine structure of the lymphatic system in the human testis. In: Motta PM (ed): *Recent Advances in Microscopy of Cells, Tissues and Organs*. Roma, Antonio Delfino Editore, pp 569-577.

Hood JD, Meininger CJ, Ziche M and Granger HJ (1998) VEGF upregulates eNOS message, protein and NO production in human endothelial cells. *Am J Physiol* 274:H1054-8.

Huber R, Weber E and Hediger C (1968) On the microscopic anatomy of the so-called hypoplastic zones of the normal desended testis. *Virchows Arch A Pathol Anat* 344:47-53.

Izzi L, Turbide C, Houde C, Kunath T and Beauchemin N (1999) cis-Determinants in the cytoplasmatic domain of CEACAM1 responsible for its tumor inhibitory function. *Oncogene* 18:5563-5572.

Jakeman LB, Winter J, Bennet GL, Altar CA and Ferrara N (1992) Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *J Clin Invest* 89:244-253.

Jiang BH, Agani F, Passaniti A and Semenza GL (1997) V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer Res* 57:5328-5335.

Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov DA, Lahtinen I, Kukk E, Saksela O, Kalkkinen N and Alitalo K (1996) A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C is a ligand for the Flt-4 (VEGFR-3) and KDR (VEGF-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 15:290-298.

Katho O, Tauchi H, Kawaishi K, Kimura A and Satow Y (1995) Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res* 55:5687-5692.

Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J and Connolly DT (1989) Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 246(4935):1309-12.

Kearney JB, Ambler CA, Monac K-A, Johnson N, Rapoport RG and Bautch VL (2002)

Vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 negatively regulates development of blood vessel formation by modulating endothelial cell division. *Blood* 99(7):2397-2407.

Kilic N and Ergün S (2001) Methods to evaluate the formation and stabilization of blood vessels and their role in tumor growth and metastasis. In: Brooks SA and Schumacher U (eds), *Metastasis Research Protocols*. Humana Press, Oxford.

Kilic N, Oliveira-Ferrer L, Wurmbach JH, Loges S, Chalajour F, Neshat-Vahid S, Weil J, Fernando M and Ergün S (2005) Pro-angiogenic signaling by the endothelial presence of CEACAM1. *J Biol Chem* 280(3):2361-9.

Knecht H (1976) Tubular structure and germ cell distribution of cryptorchid or normal testes in early childhood. *Beitr Pathol* 159:249-270.

Klagsbrun M and D'Amore PA (1996) Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine-Growth-Factor-Rev* 7:259-270.

Kormano M and Souranta H (1971) Mikrovaskular organisation of the adult human testis. *Anat Rec* 170:31-40.

Korpelainen E, Karkkainen MJ, Tenhunen A, Lakso M, Rauvala H, Vierula M, Parvinen M and Alitalo K (1998) Overexpression of VEGF in Testis and Epididymis Causes Infertility in Transgenic Mice: Evidence for Nonendothelial Targets for VEGF. *J Cell Biol* 143:1705-1712.

Kuroki M, Arakawa F, Matsuo Y, Oikawa S, Nakazato H and Matsuoka Y (1991) Three novel molecular forms of biliary glycoprotein deduced from cDNA clones from a human leukocyte library. *Biochem Biophys Res Commun* 176:578-585.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:780-685.

Lauke H (1997) Rapid method to detect CIS- cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 424:69-70.

Lauke H, Behrens K and Holstein AF (1989) Leydig cell mitoses in human testes bearing early germ cell tumours. *Cell Tissue Res* 255:475-479.

Lauke H, Seidl K, Hartmann M and Holstein AF (1991) Carcinoma-in-Situ cells in cultured human seminiferous tubules. *Int J Androl* 14:33-43.

Lauke H, Sevinc S and Ergün S (1999) Expression von Angiogenesefaktoren in kultivierten menschlichen Hodenkanälchen. *Annals of Anatomy* 181:129.

Lee J, Gray A, Yuan J, Louth SM, Avraham H and Wood W (1996) Vascular endothelial growth factor-related protein: A ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor Flt-4. *Proc Natl Acad Sci* 93:1988-1992.

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV and Ferrara N (1989) Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246:1306-1309.

- Levy AP, Levy NS, Wegner S and Goldberg MA (1995) Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem* 270:13333-40.
- Levy AP, Levy NS and Goldberg MA (1996) Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *J Biol Chem* 271:2746-2753.
- Li J, Perrella MA, Tsai JC, Yet SF, Hsieh CM, Yoshizumi M, Patterson C, Endego WO, Zhou F and Lee M (1995) Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 270:308-312.
- Lin SH and Pu YS (1999) Function and therapeutic implication of C-CAM cell-adhesion molecule in prostate cancer. *Semin Oncol* 26:227-233.
- Lin T-N, Wang CK, Cheung WM and Hsu CY (2000) Induction of angiopoietin and tie receptor mRNA expression following cerebral ischemia-reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:387-395.
- Liu YX, Cox SR, Mortia T and Kourembanas S (1995) Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells-identification of a 5' enhancer. *Circ Res* 77:638-643.
- Luttun A, Tjwa M, Moons L, Wu Y, Angelillo-Scherrer A, Liao F, Nagy JA, Hooper A, Priller J, De Klerck B, Compernelle V and Daci E (2002) Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nature Med* 8:831-840.

Matsumoto K, Ohi H and Kanmatususe K (1997) Interleukin 10 and interleukin 13 synergize to inhibit vascular permeability factor release by peripher blood mononuclear cells from patients with lipoid nephrosis. *Nephron* 77:212-218.

Millauer B, Witzigmann-Voos S, Schurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W and Ullrich A (1993) High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 72:835-846.

Modlich U, Kaup FJ, and Augustin HG (1996). Cyclic angiogenesis and blood vessel regression in the ovary during luteolysis involves endothelial cell detachment and vessel occlusion. *Lab Invest* 74:771-780.

Monacci WT, Merrill MJ and Oldfield EH (1993) Expression of vascular permeability factor/Vascular endothelial growth factor in normal rat tissues. *Am J Physiol* 264:C995-C1002.

Murohara T, Horowitz JR, Silver M, Tsurumi Y, Chen D, Sullivan A and Isner JM (1998) Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation* 97:99-107.

Neufeld G, Cohen T and Gengrinovitch S (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 13:9-22.

Neumaier M, Paululat S, Chan A, Matthaes P and Wagener C (1993) Biliary glycoprotein, a potential human cell adhesion molecule, is down-regulated in colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10744-10748.

Nollau P, Scheller H, Kona-Horstmann M, Rohde S, Hagenmuller F, Wagener C and Neumaier M (1997) Expression of CD66a (human C-CAM) and other members of the carcinoembryonic antigen gene family of adhesion molecules in human colorectal adenomas. *Cancer Res* 57:2354-2357.

Obrink B (1991) C-CAM (cell-CAM 105) A member of the growing immunoglobulin superfamily of cell adhesion proteins. *Bioessays* 13:227-234.

Obrink B (1997) CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties. *Curr Opin Cell Biol* 9:616-626.

Oikawa S, Kuroki M, Matsuoka Y, Kosaki G and Nakazato H (1992) Homotypic and heterotypic Ca^{2+} -independent cell adhesion activities of biliary glycoprotein, a member of carcinoembryonic antigen family, expressed on CHO cell surface. *Biochem Biophys Res Commun* 186(2):881-7.

Oliveira-Ferrer L, Tilki D, Ziegeler G, Hauschild J, Loges S, Irmak S, Kilic E, Huland H, Friedrich M and Ergün S (2004) Dual role of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 in angiogenesis and invasion of human urinary bladder cancer. *Cancer Res* 64(24):8932-8.

Olofsson B, Korpelainen E, Mandriota S, Pepper MS, Aase K, Kumar V, Gunji Y, Yeltsch MM, Shibuya M, Alitalo K and Eriksson U (1998) Vascular endothelial growth factor (VEGF) B binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(20):11709-14.

Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, von Euler G, Joukov V, Sachsela O, Orpana A, Pettersson RF, Alitalo K and Eriksson U (1996) Vascular endothelial growth factor, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc natl Acad Sci USA* 93:2576-2581.

Orlandini M, Marconcini L, Ferruzzi R and Oliviero S (1996) Identification of a c-fos induced gene that is related to the PDGF/VEGF growth factor family. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:11675-80.

Pajusola K, Aprelikova O, Korhonen J, Kaipainen A, Pertovaara L, Alitalo R and Alitalo K (1992) FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. *Cancer Res* 52:5738–5743.

Papapetropoulos A, García-Cardena G, Madri JA and Sessa WC (1997) Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest* 100:3131-9.

Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O and Alitalo K (1994) Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor- β in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem* 269(9):6271-4.

Plate KH, Breier G, Weich HA and Risau W (1992) Vascular endothelial growth factor is a potential tumor angiogenesis factor in human glioma in vivo. *Nature* 359:845-8.

- Prall F, Nollau P, Neumaier M, Haunbeck HD, Drzenieck Z, Helmchen U, Loning T and Wagener C (1996) CD66a (BGP), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, is expressed in epithelium, endothelium, and myeloid cells in a wide range of normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 44(1):35-41.
- Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N and Williams LT (1993) Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:7533-7.
- Rajpert-de-Meyts E, Lauke H and Skakkebaek NE (1998) In vitro survival of human neoplastic germ cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 444:59-66.
- Ribatti D, Vacca A, De Falco G, Roccaro A, Roncali L, Dammacco F (2001) Angiogenesis, angiogenic factor expression and hematological malignancies. *Anticancer Res* 21(6B):4333-9.
- Risau W and Lemon V (1988) Changes in the vascular extracellular matrix during embryonic vasculogenesis and angiogenesis. *Dev Biol.* 125:441-450.
- Risau W and Flamme I (1995) Vasculogenesis. *Ann Rev Cell Dev Biol* 11:73-91.
- Risau W (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386:671-4.
- Roberts WG and Palade GE (1995) Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Science* 108:2369-2379.
- Roberts WG and Palade GE (1997) Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated. *Cancer Res* 57:765-772.

Rojas M, Fuks A and Stanners CP (1990) Biliary glycoprotein, a member of immunoglobulin supergene family, functions in vitro as a Ca^{2+} -dependent intercellular adhesion molecule. *Cell Growth Differ* 1:527-33.

Rudolfsson SH, Wikstrom P, Jonsson A, Collin O, and Bergh A (2004) Hormonal regulation and functional role of vascular endothelial growth factor A in the rat testis. *Biol Reprod* 70(2):340-7.

Schulze C (1984) Sertoli cells and Leydig cells in man. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 88:1-104.

Schwarzenbach H, Chakrabarti G, Paust HJ and Mukhopadhyay AK (2004) Gonadotropin-mediated regulation of the murine VEGF expression in MA-10 Leydig cells. *J Androl* 25(1):128-139.

Seetharam L, Gotoh N, Maru Y, Neufeld G, Yamaguchi S and Shibuya M (1995) A unique signal transduction from FLT tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor VEGF. *Oncogene* 10:135-147.

Seidl K and Holstein AF (1990) Organ culture of human seminiferous tubules: a useful tool to study the role of nerve growth factor in testis. *Cell Tissue Res* 261:539-547.

Senger DR, Van de Water L, Brown LF, Nagy JA, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackman RW, Dvorak AM and Dvorak HF (1993) Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev* 12:303-324.

Setchell BP and Main SJ (1975) The blood-testis barrier and steroids. *Curr Top Mol Endocrinol* 2:223-233.

Shen BQ, Lee DY and Zioncheck TF (1999) Vascular endothelial growth factor governs endothelial nitric-oxide synthase expression via a KDR/Flk-1 receptor and a protein kinase C signaling pathway. *J Biol Chem* 274:33057-63.

Sheweiki D, Itin A, Soffer D and Keshet E (1992) Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359:843-845.

Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF and Hammond WP (1998) Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 92:362-7.

Singer BB, Scheffrahn I and Obrink B (2000) The tumor growth-inhibiting cell adhesion molecule CEACAM1 (C-CAM) is differently expressed in proliferating and quiescent epithelial cells and regulates cell proliferation. *Cancer Res* 60:1236-44.

Stein I, Neeman M, Sheweiki D, Itin A and Keshet E (1995) Stabilization of vascular endothelial growth-factor messenger RNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes. *Mol Cell Biol* 15:5363-68.

Stoffel A, Neumaier M, Gaida FJ, Fenger U, Drzeniek Z, Haubeck HD and Wagener C (1993) Monoclonal, anti-domain and anti-peptide antibodies assign the molecular weight 160,000 granulocyte membrane antigen of the CD66 cluster to a mRNA species encoded by the biliary glycoprotein gene, a member of the carcinoembryonic antigen gene family. *J Immunol* 150:4978-84.

Takagi H, King GL and Aiello LP (1996) Identification and characterization of vascular endothelial growth factor receptor (Flt) in bovine retinal pericytes. *Diabetes* 45:1016-23.

Takahashi T, Shirakawa T, Miyake K, Yahagi Y, Maruyama N, Kasahara N, Kawamura T, Matsumura O, Mitarai T and Sakai O (1995) Protein tyrosine kinases expressed in glomeruli and cultured glomerular cells: Flt-1 and VEGF expression in renal mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 209:218-226.

Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, Rasmusen BA, Eddy RL and Shows TB (1991) Identification of new endothelial growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 6:1677-83.

Terman BI, Dougher Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarovicz D and Bohlen P (1992) Identification of KDR tyrosin kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 187:1579-86.

Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarovicz D, Fiddes JC and Abraham JA (1991) The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 266:11947-54.

Tuder R, Flook B, and Voelkel NF (1995) Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia - modulation of gene expression by nitric oxide. *J Clin Invest* 95:1798-1807.

Veikkola T and Alitalo K (1999) VEGFs, receptors and angiogenesis. *Canc Biol* 9:211-220.

Vailhé B, Vittet D and Feige JJ (2001) In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis. *Lab Invest* 81:439-452.

Wagener C and Ergün S (2000) Angiogenic properties of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1. *Exp Cell Res* 261:19-24.

Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M and Heldin CH (1994) Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 269:26988-95.

Wong CH, Mruk DD, Lui WY and Cheng CY (2004) Regulation of blood-testis barrier dynamics: an in vivo study. *J Cell Sci* 15:783-798.

Yamaguchi TP, Dumont DJ, Colon RA, Breitman ML and Rossant J (1993) Flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development* 118:489-498.

Yan HH and Cheng CY (2005) Blood-testis barrier dynamics are regulated by an engagement/disengagement mechanism between tight and adherens junctions via peripheral adaptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(33):11722-27.

Yang K and Cepko CL (1996) Flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor (VEGF), is expressed by retinal progenitor cells. *J Neurosci* 16:6089-99.

Yoshida A, Anand-Apte B and Zetter BR (1996) Differential endothelial migration and proliferation to basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor. *Growth Factors* 13:57-64.

Zeng H, Dvorak HF and Mukhopadhyay D (2001) VPF/VEGF receptor-1 down-modulates VPF/VEGF receptor-2 mediated endothelial cell proliferation, but not migration, through phosphatidylinositol 3-kinase dependent pathways. *J Biol Chem* 276(29):26969-79.

Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, Granger HJ and Bicknell R (1997) Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J Clin Invest* 99(11):2625-34.

8 Publikation

Lauke H, Kilic N, Bozorgzad R, Fernando M, Neshat-Vahid S, Pottek T and Ergün S (2004)
Expression of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1 (CEACAM1) in
normal human Sertoli cells and its up-regulation in impaired spermatogenesis. *Mol Hum
Reprod* 10:247-252.

9 Danksagung

Herrn PD Dr. med. S. Ergün danke ich besonders für die Überlassung des wissenschaftlichen Themas, seine intensive Betreuung und seine kritischen Anregungen.

Frau Dr. med. H. Lauke danke ich für ihre hervorragende Betreuung und Unterstützung, sowie ihr Engagement, welches einen hohen Beitrag am Fortgang dieser Arbeit hatte.

Frau Prof. Dr. med. G. Rune danke ich ausdrücklich dafür, dass ich die wissenschaftlichen Experimente im Rahmen dieser Dissertation in den Laboratorien ihres Institutes durchführen durfte.

Herrn Prof. Dr. med. M. Davidoff danke ich sehr für seine großzügige Hilfestellung und dafür, dass ich in seinem Labor immunohistochemische Untersuchungen durchführen durfte.

Herrn Prof. C. Wagener, Direktor der Abteilung für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Hamburg danke ich für die Bereitstellung des CEACAM1-Antikörpers.

Ganz herzlich danke ich den medizinisch technischen Assistentinnen des Anatomischen Institutes, Frau B. Kruck, Frau B. Knutz und Frau C. Kretzschmar für ihre liebevolle Begleitung und ihre hervorragende technische Hilfestellung.

Nicht zuletzt möchte ich ganz ausdrücklich meinem liebevollen Ehemann danken, ohne dessen Unterstützung und Geduld ich mich meiner Arbeit nicht so intensiv hätte widmen können.

8 LEBENSLAUF

Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

11 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: