

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Aus dem Heinrich-Pette-Institut in Hamburg

Abteilung 2: Allgemeine Virologie

Abteilungsleiter: Prof. Dr. Hans Will

und dem Institut für Anatomie II: Experimentelle Morphologie

Zentrum für Experimentelle Medizin

Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. U. Schumacher

Die Expression von SPOC1 in humanen und murinen Zellen sowie ausgewählten Tumorentitäten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Stefan Ficke

aus Weyhe

Hamburg 2013

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 06.08.2013

Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 12.08.2013

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. U. Schumacher

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. H. Will

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: Prof. Dr. M. Horstmann

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	5
1.1 Fragestellungen	5
1.2 SPOC1	6
1.3 Spermatogenese	9
1.3.1 Unterschiede der Spermatogenese in Maus und Mensch	11
1.4 Markerproteine im Hoden	14
1.4.1 PLZF	14
1.4.2 SOHLH1	15
1.4.3 PCNA	15
1.4.4 GSA-II-Lektin	16
1.5 Seminom	16
2 Material und Methoden	19
2.1 Lösungen	19
2.2 Gewebe und Fixierung	25
2.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.)	26
2.4 PAS-Hämatoxylin-Färbung	26
2.5 Feulgen-Färbung	27
2.6 Antigen-Demaskierung	27
2.7 Immunhistochemischer Nachweis von SPOC1	28
2.8 Entwickler und Verstärkungsreaktion	29
2.9 Signalverstärkung mit der Peroxidase-Anti-Peroxidase Methode	30
2.10 Immunfluoreszenz Doppelfärbung auf Paraffinschnitten	31
2.11 Immunfluoreszenz Doppelfärbung SPOC1 und GSA-II Lektin	32
2.12 Immunhistochemischer Nachweis von aktivierter Caspase3 zur Detektion von Zellen in Apoptose	33
2.13 TUNEL-Assay zur Detektion von Zellen in Apoptose	33
2.14 Gefrorene Frischgewebe und Gefrierschnitte	34
2.15 Fettfärbung mit Ölrot	35
2.16 shRNA Knockdown Maus für SPOC1	35
3 Ergebnisse	37
3.1 Fixative für Hoden-Gewebe	37
3.2 Histologische Färbungen von Mensch- und Maushoden	38
3.3 Immunhistochemischer Nachweis von SPOC1	42
3.3.1 Methodenvergleich verschiedener Antigendemaskierungsverfahren	42
3.3.2 Methodenvergleich verschiedener Detektionsenzyme und Verstärkungen	46
3.3.3 Vergleich der verschiedenen anti-SPOC1 Antikörper und die Expression von SPOC1 im humanen Hoden	49
3.3.4 Die Expression des SPOC1 Proteins im Maushoden	53
3.3.5 Die Expression von SPOC1 in anderen Mausgeweben	56
3.4 Immunfluoreszenzdoppelfärbungen am Maushoden	56
3.5 Immunfluoreszenzdoppelfärbungen am humanen Hoden	64
3.6 Knockdown von SPOC1 im Maushoden	66
3.6.1 Histologisch sichtbare und in der immunhistochemischen SPOC1 Färbung sichtbare Veränderungen	66
3.6.2 Charakterisierung der in Tubuli mit gestörter Spermatogenese verbliebenen Zellen durch Immunfluoreszenzdoppelfärbungen	71
3.6.3 Vergleich der Apoptose von SPOC1-Wildtyp- und induzierten SPOC1-Knockdown-Mäusen	82

3.7 Phänotyp im Ileum von homozygoten SPOC1 Knockdown Mäusen	87
3.8 Seminom.....	93
4 Diskussion	97
4.1 Methoden.....	97
4.1.1 Histologische Methoden.....	97
4.1.2 Fixative.....	97
4.1.3 Methodenvergleich verschiedener Antigendemaskierungsverfahren	98
4.1.4 Methodenvergleich verschiedener Detektionsenzyme und Verstärkungen	99
4.2 Expression von SPOC1 im Hoden	99
4.2.1 Antikörper gegen SPOC1	99
4.2.2 Expression von SPOC1 im humanen Hoden.....	101
4.2.3 Expression von SPOC1 im Maushoden	102
4.2.4 Expression von SPOC1 in anderen Mausegeweben	102
4.2.5 Immunfluoreszenzdoppelfärbungen im Maushoden.....	103
4.2.6 Immunfluoreszenzdoppelfärbungen im humanen Hoden	105
4.3 Knockdown von SPOC1 im Maushoden	105
4.4 Phänotyp im Ileum von homozygoten SPOC1 Knockdown Mäusen	107
4.5 Seminom.....	109
5 Zusammenfassung	111
6 Literaturverzeichnis.....	112
7 Danksagung	116
8 Lebenslauf	117
9 Eidesstattliche Versicherung	118

1 Einleitung

1.1 Fragestellungen

Die für das SPOC1-Protein codierende mRNA wurde 2005 von Mohrmann und Kollegen (Mohrmann, 2005) gefunden und eine Überexpression der SPOC1-mRNA mit verkürztem Überleben bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom in Verbindung gebracht. SPOC1 steht für Survival time – associated PHD protein in Ovarian Cancer.

Mohrmann und Mitarbeiter (Mohrmann, 2005) untersuchten ebenfalls die Transkription von SPOC1 in normalen humanen Geweben mittels Northernblot und erhielten im Hoden das stärkste Signal der SPOC1 RNA im Vergleich zu anderen Geweben. Daher ist eine hohe Expression des SPOC1-Proteins im Hoden anzunehmen. Außerdem färbt eine in situ Hybridisierung mit einer RNA-Sonde gegen die SPOC1-mRNA im Hoden ausschließlich basal in den Hodenkanälchen liegende Zellen an (Mohrmann, 2005). Zu Beginn meiner Dissertation fehlten noch Daten zur Proteinexpression von SPOC1.

Zur weiteren Erforschung von SPOC1 wurden monoklonale und polyklonale Antikörper gegen das Protein hergestellt (Kinkley, 2009). Diese Antikörper erkennen das SPOC1 Protein im Westernblot. Des Weiteren wurde eine transgene Maus mit einem durch Doxycyclin induzierbaren shRNA-Konstrukt gegen SPOC1 erzeugt (siehe 2.16 shRNA Knockdown Maus für SPOC1).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine immunhistochemische Färbung mit den vorhandenen Antikörpern zum Nachweis von SPOC1 etabliert werden, um folgende Fragen zu beantworten:

1. In welcher Zellpopulation im Hoden wird SPOC1 exprimiert?
2. In welchen Zellen in anderen Geweben wird SPOC1 exprimiert?
3. Wird SPOC1 in Hodentumoren exprimiert?
4. Führt ein Knock-Down der Proteinexpression von SPOC1 in der Maus zu einem Phänotyp?

1.2 SPOC1

Das humane SPOC1 Gen ist auf Chromosom 1 in der Region 1p36.23 lokalisiert. Diese Region wird mit der Entstehung und dem Wachstum von Tumoren in Verbindung gebracht.

Das SPOC1-Protein ist konserviert in höheren Eukaryonten. Es hat ein Molekulargewicht von 34 kD und besitzt eine PHD-Domäne (Plant Homeo Domain), sowie eine Kernlokalisationssequenz und eine, in den SPOC1-Proteinen verschiedener Spezies hochkonservierte, N-terminale Domäne, deren Funktion noch unbekannt ist. Diese N-terminale Domäne ist im SPOC1 verwandten Protein PHF23 ebenfalls zu finden.

Die PHD-Domäne zeichnet sich durch ein Cystein-Histidin-Cystein Motiv aus, das in ähnlicher Sequenz in über 400 eukaryoten Proteinen vorkommt (Mohrmann, 2005). Viele dieser PHD-Proteine sind Chromatin bindende Proteine, die sehr häufig mit N-terminal methylierten Histonen interagieren und als sogenannte epigenetische „Reader“ fungieren und an der Regulation der Chromatinstruktur und Funktion beteiligt sind (Li, 2012). Eine veränderte Methylierung von Histonen und Expression der dafür verantwortlichen Proteine ist ein Kennzeichen vieler Tumoren (Dawson, 2012). Daher wundert es nicht, dass einige der PHD-Proteine eine Rolle bei der Pathogenese von Kopf-Hals-, Ösophagus- und Mammatumoren sowie anderen Tumoren spielen (Mohrmann, 2005). Ein gutes Beispiel ist das SPOC1-verwandte Protein PHF23 (Plant Homeodomain Finger), das als Teil eines Fusionsproteins mit NUP98 (Nucleoporin) in den Blasten eines an akuter myeloischer Leukämie verstorbenen Mannes entdeckt wurde (Reader, 2007). Es konnte gezeigt werden, dass das PHF23 NUP98 Fusionsprotein in der Lage ist, hämatopoetische Stammzellen in leukämische Blasten zu transformieren, in dem es die Abschaltung der Expression entscheidender Gene verhindert (Wang, 2009).

Sarah Kinkley konnte im Rahmen ihrer Dissertation und der folgenden Publikation (Kinkley, 2009) einige Informationen über die Funktion des SPOC1-Proteins in somatischen Krebszellen gewinnen und zeigen, dass es eine wichtige Rolle in der Regulation der Chromatinstruktur und der Mitose spielt. SPOC1 ist demgemäß ein vorwiegend nukleäres, mit Chromatin assoziiertes Protein, das während der Mitose verstärkt exprimiert wird. In der frühen Prophase sowie in Anaphase und Telophase ist SPOC1 chromatinassoziiert, während es in den anderen Phasen der Mitose auch/oder ausschließlich cytoplasmatisch lokalisiert ist. Eine transiente Überexpression in U2OS–

Zellen, einer humanen Osteosarkomzelllinie, führte zu verstärkter Chromatinkondensation und einer Blockade des Zellzyklus in der G2-Phase.

Ein Knock-Down der SPOC1-Proteinexpression mithilfe von shRNA führt zu verminderter Chromatinkondensation, verzögerter Mitose und fehlerhafter Chromosomenverteilung auf die Tochterzellen.

Sarah Kinkley und Theres Schaub (Kinkley, 2009) konnten außerdem zeigen, dass lösliches, nicht Chromatin gebundenes SPOC1-Protein labil ist und schnell über das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut wird. Chromatinassoziiertes SPOC1 weist dagegen eine sehr lange, nicht messbare Halbwertszeit in der Zelle auf.

Die Glykogensynthasekinase 3 β (GSK3- β) scheint bei der Regulation des Abbaus von SPOC1 eine Rolle zu spielen, da für SPOC1 *in silico* acht Phosphorylierungsmotive vorhergesagt werden und die Inhibition von GSK3- β die Halbwertszeit von SPOC1 in der Zelle erhöht. Die GSK3- β spielt eine Rolle in zahlreichen Signalwegen, da sie viele Substrate hat wie beispielsweise Glykogensynthase, das Tau-Protein oder β -Catenin. Aus der Vielzahl an Substraten ergibt sich auch eine Vielzahl an Erkrankung bei deren Pathogenese die GSK3- β eine Rolle spielt, wie zum Beispiel Diabetes mellitus Typ 2, Morbus Alzheimer und der familiäre adenomatöse Polyposis. Die Phosphorylierung der Substrate führt zur Inaktivierung des Substrats und im Falle von β -Catenin auch zum Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System (Rayasam, 2009).

Des Weiteren wurden *in silico* zwei PEST-Domänen vorhergesagt. PEST-Domänen sind Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T) reiche Regionen, die vor allem in kurzlebigen Proteinen zu finden sind (Rechsteiner, 1996). Für viele Proteine, die PEST-Domänen enthalten, konnte gezeigt werden, dass Phosphorylierungen im Bereich der PEST-Domäne zum Abbau des Proteins über das Proteasom führen (Garcia-Alai, 2006). Interessanterweise liegen auch sechs der acht GSK3- β Phosphorylierungsmotive in den PEST Regionen. Lösliches, nicht Chromatin-gebundenes SPOC1 hat eine sehr kurze Halbwertszeit von nur 10 bis 15 Minuten in der Zelle. Deletionsmutanten von SPOC1, denen eine PEST-Domäne fehlt, weisen dagegen eine deutlich längere Halbwertszeit in der Zelle auf (Kinkley, 2009).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50
MDSDSCAA AFHPEEYSPSCKRRRTVEDFNKFCTFVLA YAGYIPYPKEELP

51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100
L RSSPSPANSTAGTIDSDGWDAGFSDIASSVPLPVSDRCFSHLQPTLLQR

101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150
AKPSNFLL DRKKTDKLKKKKKRKRDS DAPGKEGYRGGLL KLEAADPYVE

151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200
TPTSPTLQDIPQAPSDPCSGWDS DTPSSGSCATVSPDQV KEIKTEGKRTI

201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250
VRQ GKQV VFRDEDSTGNDEDIMVDSDDDSW DLVTCFCM KPFA GRPMIECN

251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300
ECHTWIHLSCAKIRKSNVPEVFVCQKCRDS KFDI RRSNR SRTGSRKLF LD

Abbildung 1: Domänenstruktur von SPOC1. Die N-terminale Domäne ist blau, die PEST1 und PEST2 Domänen sind grau und gelb, die Kernlokalisationsequenz rot und die PHD-Domäne grün dargestellt. (Grafik von Theres Schaub freundlicherweise zur Verfügung gestellt.)

Zusammengefasst deuten diese Daten auf eine Funktion von SPOC1 bei der Regulation der Chromatinstruktur und Zellteilung hin. Außerdem scheint SPOC1 ein stark reguliertes Protein zu sein, dessen Fehlregulation bei der Entstehung von Tumoren eine funktionelle Rolle spielen könnte.

1.3 Spermatogenese

Zunächst soll der Hoden und die Spermatogenese genauer beschrieben werden, da in diesem Organ die höchste Expression von SPOC1 RNA gemessen wurde. Die Spermatogenese ist die Entwicklung von Spermien im Hoden aus spezialisierten Keimzellen, den Spermatogonien. Die Spermatogonien gehen aus den Urkeimzellen hervor, die während der Embryonalzeit aus dem Endoderm des Dottersacks in die Gonadenanlage eingewandert sind. Die Urkeimzellen entwickeln sich zu Prospermatogonien, die zunächst ruhen und sich in der Pubertät zu Spermatogonien entwickeln und die Spermatogenese unterhalten.

Die Spermatogonien teilen sich mitotisch. Ein Teil der Spermatogonien behält seinen Stammzellcharakter bei und kann sich weiterhin mitotisch teilen, während der andere Teil beginnt, sich zu Spermatocyten I zu differenzieren. Die Spermatocyten I beginnen mit der Meiose, durchlaufen die verlängerte Prophase der ersten meiotischen Teilung, die sich in Leptotän, Zygotän, Pachytän, Diplotän und Diakinese gliedert. Daran schließen sich Metaphase I, Anaphase I und Telophase I an. Nach der Zytokinese ist die erste Reifeteilung abgeschlossen, die Tochterzellen werden als Spermatocyten II bezeichnet. Sie durchlaufen die zweite Reifeteilung der Meiose, aus der die Spermiden hervorgehen (Holstein, 2003).

Die Spermiden differenzieren sich zu reifen Spermatozoa. Dieser Prozess wird als Spermio-genese bezeichnet. Die Spermiden sind zunächst rund und werden im Verlauf länglicher bis Spermatozoa mit stark kondensiertem Kern, Akrosom und Flagellum entstehen. Die starke Kondensation des Kerns erfordert den Ersatz der normalen Histone durch Protamine (Yan, 2003). Das Akrosom enthält hydrolytische Enzyme, die zur Befruchtung der Eizelle benötigt werden, und geht aus dem Golgi-Apparat hervor.

Die Spermatogenese findet im Keimepithel der Hodenkanälchen statt. Das Keimepithel wird von den Sertoli-Zellen gebildet, die die Keimzellen in ihren verschiedenen Differenzierungsstufen beherbergen. Die Sertoli-Zellen bilden untereinander mit Tight-Junctions die Blut-Hoden-Schranke, die das Keimepithel in ein basales und ein adluminales Kompartiment unterteilt. Die Spermatogonien befinden sich im basalen Kompartiment. Im Preleptotän durchqueren die Spermatocyten I die Blut-Hoden-Schranke, sodass alle späteren Differenzierungsstufen der Keimzellen im adluminalen Kompartiment zu finden sind (Wang, 2007).

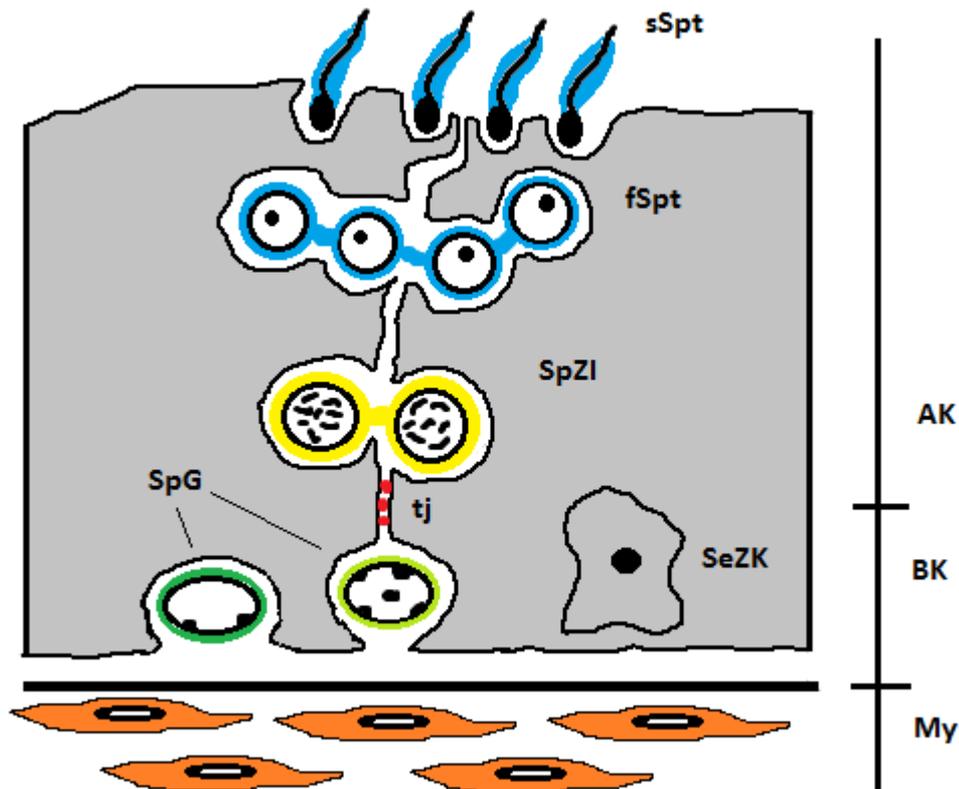


Abbildung 2: Schema des Keimepithels. Das Sertolizellplasma ist grau dargestellt, SeZK bezeichnet einen Sertolizellkern. Die Tight Junctions (tj) teilen das Keimepithel in ein basales (BK) und ein adluminales Kompartiment (AK). Unter dem Epithel befindet sich die Lamina propria mit Basalmembran und Myofibroblasten (My). Die Stammspermatogonien sind dunkelgrün, die differenzierenden Spermatozoen (SpG) hellgrün dargestellt. Alle Spermatozoen befinden sich im basalen Kompartiment. Die Spermatozyten I (SpZI) treten in die Meiose ein und differenzieren sich erst zu frühen (fSpt) und dann zu späten Spermatozoen (sSpt). Die Spermatozoen und Spermatozoen befinden sich im adluminalen Kompartiment. Abbildung erstellt nach einer Zeichnung aus Histologie – R. Lüllmann-Rauch, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2003.

Die Blut-Hoden-Schranke schützt die differenzierenden Keimzellen vor hydrophilen Noxen und dem Immunsystem, da die Keimzellen während der ersten Reifeteilung ihre genetische Ausstattung durch Rekombination verändern und deshalb zum Ziel autoimmuner Prozesse werden können.

Des Weiteren sorgen die Sertoli-Zellen, angeregt durch Follikel-Stimulierendes-Hormon (FSH), für ein spezielles Milieu, in dem die Spermatogenese stattfinden kann. Neben der Produktion und Abgabe von Androgen-bindenden Protein in das Tubuluslumen, um ausreichend Testosteron in der Tubulusflüssigkeit zu binden, produzieren die Sertoli-Zellen zahlreiche weitere parakrine Faktoren (Holstein, 2003).

1.3.1 Unterschiede der Spermatogenese in Maus und Mensch

Beim Menschen lassen sich morphologisch 3 Spermatogionientypen unterscheiden, A-dark, A-pale und B-Spermatogonien. Anhand der morphologischen Klassifizierung durch Clermont sind A-dark Spermatogonien an einem stark und homogen mit Hämatoxylin anfärbaren Zellkern mit einer nicht anfärbaren Kernvakuole zu erkennen. Der Zellkern von A-pale Spermatogonien färbt sich schwächer mit Hämatoxylin und weist ein bis zwei randständige Nucleoli auf. B-Spermatogonien weisen ebenfalls einen schwächer mit Hämatoxylin anfärbaren Kern mit einigen randständigen, stärker gefärbten Chromatinarealen auf und sind unter Umständen schwer von A-pale Spermatogonien zu unterscheiden (Clermont, 1963).

Die A-dark Spermatogonien stellen wahrscheinlich den Stammzellvorrat dar, während die A-pale Spermatogonien Progenitorzellen sind. Man nimmt an, dass sich ein A-pale Spermatogonium nach Teilung in 2 Typ B Spermatogonien differenziert, die sich in 4 Spermatocyten I differenzieren, sodass aus einem A-pale Spermatogonium letztendlich 16 Spermatozoa entstehen.

Bei der Maus lassen sich die Spermatogonien morphologisch in A-single, A-paired, A-aligned, A1, A2, A3, A4, Intermediate und B-Spermatogonien unterscheiden. Bei den A-single Spermatogonien handelt es sich um die eigentlichen Stammzellen. Die weiteren Stufen entstehen aus der jeweils vorherigen nach einer Teilung, sodass aus einem A-single-Spermatogonium theoretisch $512 (= 2^9)$ B-Spermatogonien entstehen können. Die Anzahl an Zellen (im folgenden Abschnitt als Klon bezeichnet), die aus einem A-single Spermatogonium der Maus hervorgehen, ist also wesentlich größer als die aus einem A-pale Spermatogonium des Menschen (Ehmcke, 2006).

Die Spermatogenese läuft synchronisiert ab, sodass einzelnen Gruppen von Keimzellen Stadien zugeordnet werden können. Die Anordnung der Gruppen und der Beginn der Synchronisierung sind bei Mensch und Maus verschieden, weshalb auch die Tubulusanschnitte im histologischen Schnitt durch Mensch- und Maushoden unterschiedlich aussehen. Die Stadieneinteilung des Keimepithels der Maus umfasst 12 verschiedene Stadien (Oakberg, 1956). Die Stadien werden anhand des Entwicklungsgrades von Spermatocyten und Spermatischen bestimmt, die in einem Abschnitt des Keimepithels zu sehen sind. Aufgrund der großen Anzahl Zellen pro Klon sieht man in der Maus in einem Tubulusquerschnitt fast immer nur ein Stadium. Die

verschiedenen Stadien sind longitudinal im Tubulus angeordnet, sodass man in Serien-Querschnitten eines Tubulus zuerst Spermatozyten I im Zygotän findet und auf tieferen Schnitten Spermatozyten I im Pachytän. Bei der Maus beginnt die Synchronisation mit den A1-Spermatogonien, die A-single, A-paired und A-aligned-Spermatogonien proliferieren stadienunabhängig.

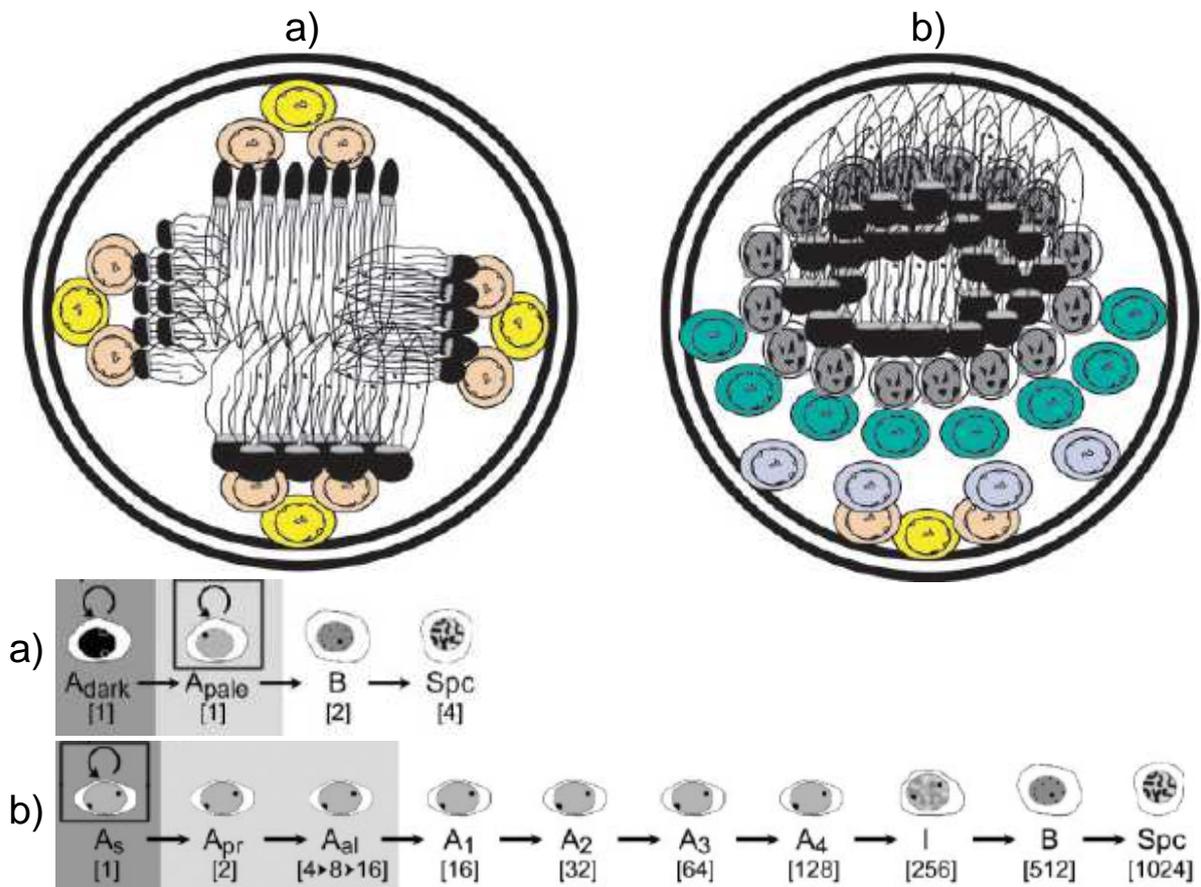


Abbildung 3: Schema zum Vergleich der Spermatogonien-Klone bei Mensch (a) und Maus (b). Es sind nicht alle Entwicklungsstufen eingezeichnet. Abbildung entnommen aus (Ehmcke, 2006).

Beim Menschen ist die Stadieneinteilung schwieriger, da die Klone wesentlich kleiner sind. Aus diesem Grund sind in einem Tubulusquerschnitt immer Spermatozyten und Spermatozyten in verschiedenen Stadien nebeneinander zu sehen. Trotzdem findet die Spermatogenese auch beim Menschen synchronisiert statt, allerdings nicht longitudinal wie in der Maus, sondern in Form einer Archimedischen Spirale: Das heißt, man findet in Serien-Querschnitten eines humanen Tubulus zuerst Spermatozyten I im Zygotän in einem Areal und in tieferen Schnitten Spermatozyten I im Pachytän in einem im Uhrzeigersinn verschobenen Areal (Schulze, 1984).

In der Maus konnten einige, von Sertoli-Zellen produzierte, für die Spermatogenese wesentliche Proteine identifiziert werden; ebenso wie die zugehörigen Rezeptoren auf Spermatozyten. Außerdem sind sowohl Sertolizell-spezifische als auch Spermatozyten-

spezifische Transkriptionsfaktoren bekannt, die für eine funktionierende Spermatogenese notwendig sind.

Ein wesentlicher Faktor ist die Sekretion von Glia cell line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) durch die Sertoli-Zellen. GDNF bindet an einen Rezeptorkomplex auf den Spermatogonien, bestehend aus der Rezeptortyrosinkinase c-Ret (Rearranged during Transfection) und Gfra1 (GDNF family receptor 1 alpha) (Meng, 2000). Ein weiteres Beispiel ist die Freisetzung von Stem Cell Factor (SCF) durch Sertoli-Zellen. Der SCF bindet an die Rezeptortyrosinkinase c-Kit (Ohta, 2000).

Ein Sertolizell-spezifischer Transkriptionsfaktor ist das Ets related Molecule (ERM). ERM kontrolliert die Expression zahlreicher Chemokine (Chen, 2005). Ein Knockout eines dieser Proteine führt zu verschiedenen Störungen der Spermatogenese. Ein Knockout eines Gens des SCF/c-Kit Signalwegs führt zu einer Störung der Differenzierung der Spermatogonien zu Spermatozyten. Ein Knockout von ERM oder einer der Komponenten des GDNF Signalwegs führt dagegen zu einem Verlust der Spermatogonien (Meng, 2000), (Chen, 2005).

Die Chemokine unter der Kontrolle von ERM und GDNF sowie weitere Faktoren bereiten den Stammzell Spermatogonien eine Nische, in der sie existieren und ihren Stammzellcharakter aufrecht erhalten können (Dadoune, 2007).

Die Spermatogonien selbst exprimieren neben den oben genannten Rezeptoren ebenfalls Transkriptionsfaktoren, die für die Spermatogenese und das Überleben der Spermatogonien selbst wichtig sind. Zwei dieser Transkriptionsfaktoren sind PLZF und SOHLH1, auf die hier genauer eingegangen wird, da sie jeweils nur in bestimmten Spermatogonienstadien exprimiert werden und daher hier als Marker dienen sollen.

OCT4 (Octamer-4) ist ein weiteres Protein, für das gezeigt werden konnte, dass es für Überleben in Kultur und Erneuerung der Spermatogonien im Rahmen eines Transplantationsassays essentiell ist (Dann, 2008). TAF4b (Transcription initiation factor TFIID subunit 4B) ist ein Transskriptionsfaktor, dessen Knockout in der Maus zu einem Verlust der Spermatogonien, ähnlich wie dies bei PLZF der Fall ist (siehe unten 1.4.1 PLZF), führt (Falender, 2005).

1.4 Markerproteine im Hoden

1.4.1 PLZF

Das Protein PLZF (Promyelocytic Leukemia Zinc Finger) wird vom Gen Zfp145 codiert und wurde als Teil eines Fusionsproteins in leukämischen Zellen bei einer Unterform der akuten Promyelozyten Leukämie gefunden. Bei dieser Form ist PLZF mit dem Retinsäurerezeptor RAR α (Retinoic Acid Receptor) fusioniert, was dazu führt, dass PLZF und RAR α ihre normalen Funktionen nicht ausüben können. Dies hat einen Differenzierungsblock der betroffenen Promyelozyten zur Folge.

PLZF ist ein Transkriptionsfaktor, der Apoptose und Proliferation reguliert. Dies wird in Mäusen ohne eine funktionsfähige Kopie von Zfp145 deutlich. Sie weisen Abnormalitäten an Skelett und Extremitäten auf, die auf unzureichende Apoptose während der Embryonalentwicklung zurückzuführen sind (Costoya, 2001).

Außerdem werden Männchen ohne eine funktionsfähige Kopie von Zfp145 mit der Zeit unfruchtbar durch Verlust undifferenzierter Spermato gonien, die den Stammzellpool darstellen. Es wird vermutet, dass PLZF nötig ist, um die Differenzierung eines Teils der Spermato gonien zu blockieren und dadurch den Stammzellpool zu erhalten. Dies wurde sowohl für eine Zfp145-Knockout-Maus (Costoya, 2004) als auch für die Luxoid Maus (Buaas, 2004), eine spontane entstandene Mutante, die eine Nonsense Mutation im Zfp145-Gen aufweist, gezeigt. In normalen Mäusen ist PLZF in A-single, A-paired und A-aligned Spermato gonien exprimiert.

In einer neueren Publikation (Hobbs, 2010) konnte gezeigt werden, dass PLZF das mTORC1-Protein (Mammalian Target Of Rapamycin Complex 1) in Spermato gonien-Vorläuferzellen supprimiert. Das mTORC1-Protein supprimiert die Expression des GDNF-Rezeptors bestehend aus c-Ret und Gfr α 1. In PLZF-Knockout-Mäusen ist mTORC1 vermehrt exprimiert, sodass c-Ret und Gfr α 1 vermindert exprimiert wird und die Spermato gonien-Vorläuferzellen nicht genug Überlebenssignale durch GDNF erhalten. Die Gruppe konnte ebenfalls zeigen, dass sich der Verlust der Spermato gonien-Vorläuferzellen in PLZF-Knockout-Mäusen durch den mTOR-Inhibitor Rapamycin in vivo vermindern lässt.

1.4.2 SOHLH1

Das Protein SOHLH1 ist ein Transkriptionsfaktor, der in Gonaden exprimiert wird. Das Protein weist ein DNA-bindendes Helix Loop Helix Motiv auf. SOHLH1 steht für Spermatogenesis and Oogenesis specific basic Helix Loop Helix transcription factor 1. Der Knockout des für SOHLH1 kodierenden Gens in männlichen Mäusen führt zu Infertilität (Ballow, 2006). Dabei kommt es zu einer Blockade der Differenzierung von Spermatogonien zu Spermatozyten, sodass im Hoden von SOHLH1 Knockout Mäusen nur Spermatogonien und keine späteren Differenzierungsstadien zu finden sind.

Im normalen Maushoden ist SOHLH1 in A-aligned bis B-Spermatogonien exprimiert.

1.4.3 PCNA

Das PCNA Protein (Proliferating Cell Nuclear Antigen) ist ein Cofaktor der DNA-Polymerasen, entspiralisiert DNA und lädt zahlreiche Faktoren auf die Replikationsgabel (Moldovan, 2007). PCNA dient als Marker für proliferierende Zellen, weil das Protein in proliferierenden Zellen stark exprimiert wird. PCNA-Antikörper wurden erstmals als Autoantikörper im Serum von einigen Patienten mit systemischem Lupus erythematoses gefunden (Miyachi, 1978).

Laut Wrobel und Kollegen färbt der gegen PCNA gerichtete monoklonale Mausantikörper PC10 im Rinderhoden alle Spermatogonien, außer die in G0, Meta-, Ana- und Telophase, sowie Spermatozyten von Preleptotän bis Pachytän (Wrobel, 1996). Kamel und Mitarbeiter geben an, dass der gleiche Antikörper in der Maus alle Entwicklungsstufen von A1-Spermatogonien bis Pachytän-Spermatozyten anfärbt (Kamel, 1997).

1.4.4 GSA-II-Lektin

Das GSA-II-Lektin (Griffonia Simplicifolia Agglutinin 2, ein Lektin aus der afrikanischen Schwarzbohne) bindet an eine N-Glykan-Struktur, die für die Zelladhäsion der spermatogenen Keimzellen an die Sertoli-Zellen notwendig ist. Dieses N-Glykan wird mit Hilfe von Mannosidase IIX (MX) synthetisiert. MX-Knockout-Mäuse sind infertil, da die unreifen Keimzellen zu früh aus dem Keimepithel freigesetzt werden.

Das GSA-II-Lektin bindet an alle spermatogenen Keimzellen außer an Spermatogonien (Akama, 2002).

1.5 Seminom

In Erweiterung zu den Ergebnissen von Mohrmann und Kollegen (Mohrmann, 2005), die SPOC1-RNA in Spermatogonien nachgewiesen haben, sollte untersucht werden, ob SPOC1 auch in Seminomen exprimiert wird, da sich das Seminom von veränderten Vorläuferzellen der Spermatogonien, den Gonocyten, ableitet.

Alle Keimzelltumoren, außer das spermatocytische Seminom, auf das hier nicht eingegangen werden soll, gehen von atypischen Gonocyten aus. Im Hoden stellen die atypischen Gonocyten zunächst eine testikuläre intraepitheliale Neoplasie (TIN) dar, die sich zum Seminom oder anderen Keimzelltumoren differenzieren kann (Skakkebaek, 1987). Skakkebaek publizierte diese Theorie nach einem Fallbericht eines Mannes mit Kryptorchismus, der zunächst im Alter von 10 Jahren atypische Keimzellen in einer Hodenbiopsie aufwies, dann im Alter von 12 Jahren TIN-Zellen in der Biopsie zeigte und schließlich im Alter von 21 Jahren ein invasives Seminom entwickelt hatte (Müller, 1984). Die Testikuläre intraepitheliale Neoplasie wird auch als intratubular germ cell neoplasia, unclassified type (IGCNU) oder als Carcinoma in situ (CiS) bezeichnet. Der Begriff Carcinoma in situ ist genau genommen falsch, da es sich um eine Keimzellneoplasie handelt, die zwar in einem Epithel stattfindet, aber das Epithel selbst, also die Sertolizellen, nicht neoplastisch verändert sind. Trotzdem wird der Begriff nach wie vor in der Literatur verwendet.

CiS-Zellen können in den Tubuli anhand ihrer Größe und veränderten Morphologie erkannt werden, da sie mit ca. 20 µm deutlich größer sind als Spermatogonien und optisch

leeres, ungefärbtes Zytoplasma aufweisen. Das Färbeverhalten des Zytoplasmas ist durch den hohen Glykogengehalt der CiS-Zellen bedingt, da das Glykogen bei der Paraffineinbettung herausgelöst wird. In Semidünnschnitttechnik kann das Glykogen mit der Laczko/Levai Färbung direkt nachgewiesen werden, um CiS-Zellen im Tubulus zu identifizieren (Holstein, 1996). Eine weitere Methode um CiS-Zellen in Paraffin eingebettetem Material nachzuweisen ist eine Silberfärbung, die argyrophile Nucleolus Organisator Regionen (AgNOR) in den CiS-Zellen anfärbt (Müller, 1994).

Normale, sowie atypische Gonozyten, CiS-Zellen und die daraus hervorgegangenen Keimzelltumoren exprimieren einige Proteine, die im Laufe der normalen Entwicklung der Gonozyten zu Spermatogonien abgeschaltet werden.

Zu diesen Proteinen gehören die Placenta like alkaline Phosphatase (PlaP), sowie die „Stammzellmarker“ AP-2 γ (Activating enhancer binding Protein 2 gamma), NANOG (der Name ist vom Land der ewigen Jugend aus der keltischen Mythologie abgeleitet (Edinburgh, 2003)) und OCT3/4 (Octamer 3/4). Der Marker PlaP wurde etabliert um CiS-Zellen und Seminome zuverlässig von normalem Hodengewebe zu unterscheiden (Burke, 1988).

OCT3/4 identifiziert Zellen mit pluripotentem Potential in Keimzelltumoren. Diese Zellen finden sich in sowohl in CiS und Seminomen, nicht aber in Keimzelltumoren, die aus differenziertem Gewebe bestehen, wie zum Beispiel reife Teratome (Looijenga, 2003).

Die Expression von PlaP und OCT3/4 in Gonocyten und die Abschaltung der beiden Proteine im Laufe der normalen Entwicklung zu Spermatogonien konnten Honecker et al. (Honecker, 2004) nachweisen.

Die Arbeitsgruppe Entwicklung und Reproduktion der Universität Kopenhagen konnte sowohl die Expression in Gonocyten, die Abschaltung während der normalen Entwicklung, als auch die Expression in CiS-Zellen und Keimzelltumoren der beiden Marker AP-2 γ (Hoei-Hansen, 2004) und NANOG (Hoei-Hansen, 2005) nachweisen. Diese Daten lassen vermuten, dass es sich bei CiS-Zellen um transformierte Gonocyten handelt.

Der Schritt von nicht-invasiven CiS-Zellen zum invasiven Seminom weist in fast allen Fällen eine Vervielfältigung des kurzen Arms von Chromosom 12 auf. Entweder als Isochromosom oder durch Aneuploidie oder durch andere Vermehrungen von Chromosom 12 (Rosenberg, 2000). Es wird spekuliert, dass 12p Gene enthält, die mit Sertoli-Zell unabhängigem Wachstum und Invasivität assoziiert sind, die bislang aber noch nicht genauer identifiziert werden konnten.

Stoop und Mitarbeiter vermuten auch, dass der c-Kit Ligand Stem cell factor (SCF) eine besondere Rolle einnimmt. In normalem embryonalen und adulten Gewebe sorgt SCF durch parakrine Signale für die Differenzierung und Erhaltung der Spermatogenese. In CiS Zellen dagegen wird ein autokriner Loop vermutet, während Seminome und andere Keimzelltumoren wieder unabhängig von SCF sind (Stoop, 2008).

Es konnte gezeigt werden, dass die DNA von normalen, sowie atypischen Gonozyten, CiS-Zellen und Seminomen hypomethyliert ist. Lediglich ein, gegen das zur Behandlung von Seminomen eingesetzte Chemotherapeutikum Cisplatin resistentes, Seminom wies stark methylierte DNA auf (Wermann, 2010).

2 Material und Methoden

2.1 Lösungen

Bouin-Lösung

- 15 ml gesättigte, filtrierte Pikrinsäure (Merck 623)
- 5 ml Formalin 37 % (Merck 1.04002)
- 1 ml Eisessig (Riedel de Haen 27225)

Neutral gepuffertes Formalin 3,7%

- 1,38 g NaH_2PO_4 (Merck 1.06346)
- 14,21 g Na_2HPO_4 (Merck 1.06580)
- 100 ml Formalin 37 % (Merck 1.04002)
- 900 ml Aqua dest.

Modifizierte Davidsonsche Lösung

- 30 ml Formalin 37 % (Merck 1.04002)
- 15 ml Ethanol 99 % (Walter CMP UN1170)
- 5 ml Eisessig (Riedel de Haen 27225)
- 50 ml Aqua dest.

0,1 M Phosphatpuffer

- 1,38 g NaH_2PO_4 (Merck 1.06346)
- 14,21 g Na_2HPO_4 (Merck 1.06580)
- 1000 ml Aqua dest.

Einbettungsprotokoll mit Isopropanol

- 2 h 50% Isopropanol (Riedel de Haen 24137)
- 2 h 70% Isopropanol
- 2 h 90% Isopropanol
- 2 h 90% Isopropanol
- 2 h 90% Isopropanol
- 3 h 30 min Isopropanol absolut
- 3 h 30 min Isopropanol absolut

- 3 h 30 min Isopropanol absolut
- 4 h 45 min 1:1 Gemisch aus Paraplast Plus (Sakura Finetek 4583) und absolutem Isopropanol bei 60°C
- 3 h 30 min Paraplast Plus bei 60°C
- 3 h 30 min Paraplast Plus bei 60°C

Entparaffinierung

- 5 min Xylol-Ersatz (XEM200 Vogel ND-HS-200)
- 5 min Xylol-Ersatz
- 3 min Ethanol absolut (Walter CPM UN1170)
- 5 min Ethanol absolut
- 5 min 96% Ethanol
- 5 min 70% Ethanol
- 5 min 50% Ethanol
- 2 min Aqua dest.

Entwässerung

- 15 sec 70% Ethanol
- 30 sec 96% Ethanol
- 5 min 96% Ethanol
- 5 min Ethanol absolut
- 5 min Ethanol absolut
- 5 min Xylol-Ersatz
- 5 min Xylol-Ersatz
- 5 min Xylol-Ersatz

PBS

- 8,9 g Na₂HPO₄ (Merck 1.06580)
- 8,77 g NaCl (Backer 0278)
- 1 l Aqua dest.
- pH einstellen mit 2 N HCl (Merck UN1789) auf pH 7,6

TBS

- 6,05 g Trizma Base (Sigma T1503)
- 8,71 g NaCl (Backer 0278)
- 1 l Aqua dest.
- pH einstellen mit 2 N HCl (Merck UN1789) auf pH 7,6 oder pH 8,24

TBST 0,05%

- 0,5 ml Tween 20 (Sigma P1379)
- 1l TBS pH 7,6

Lektinpuffer

- 6,05 g Trizma Base (Sigma T1503)
- 8,71 g NaCl (Backer 0278)
- 0,203 g MgCl₂ (Sigma M8266)
- 0,101 g CaCl₂ (C4901)
- 1 l Aqua dest.
- pH einstellen mit 2 N HCl (Merck UN1789) auf pH 7,6

10 N Natriumhydroxidlösung zum pH einstellen

- 40 g Natriumhydroxid Plätzchen (Merck 1.06495)
- in 100 ml Aqua dest. lösen

Citrat-Puffer pH 6 zur Antigen-Demaskierung:

- 2,1 g Citronensäure-Monohydrat (Merck 1.00244)
- 1 l Aqua dest.
- pH 6 einstellen mit 10 N NaOH

EDTA-Lösung pH 8 zur Antigen-Demaskierung

- 100 ml EDTA-Puffer pH 8 10x (DCS Innovative Diagnostik-Systeme EL008C500)
- 900 ml Aqua dest.

Borsäure pH 8,5 zur Antigen-Demaskierung

- 3,06 g Borsäure (0,05 M) (Merck 1.00165)
- 1 l Aqua dest.
- pH 8,5 einstellen mit 10 N NaOH

Tris-Puffer pH 9,5 zur Antigen-Demaskierung

- 6,057 g Tris-Base (Sigma T1503) (0,05 M)
- 1 l Aqua dest.
- pH 9,5 einstellen mit 10 N NaOH

PB-Puffer 0,1 M pH 7,4

- 2,45 g KH_2PO_4 (Merck 4871)
- 14,6 g Na_2HPO_4 (Merck 1.06580)
- 1 l Aqua dest.

Avidin-Biotin-alkalische Phosphatase-Komplex Gebrauchslösung

- 2,5 ml TBS
- 1 Tropfen Reagenz A aus dem Vector ABC-AP Kit AK5000
- 1 Tropfen Reagenz B aus dem Vector ABC-AP Kit AK5000
- Das Gemisch wurde 30 min durch Rollen vermischt

Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex Gebrauchslösung

- 2,5 ml TBS
- 1 Tropfen Reagenz A aus dem Vector ABC-POX Kit AK6100
- 1 Tropfen Reagenz B aus dem Vector ABC-POX Kit AK6100
- Das Gemisch wurde 30 min durch Rollen vermischt

Alkalische Phosphatase Entwickler

- In einem Erlenmeyerkolben 300 mg Natriumnitrit (Sigma S2252) in 7,5 ml Aqua dest. lösen
- 300µl Neufuchsin Stammlösung hinzufügen und schwenken (5 g Neufuchsin (Sigma N0638) in 100 ml 2 N HCl (Merck UN1789) lösen)
- 30 mg Naphtol-AS (Sigma N2250) in 750 µl Dimethylformamid (Sigma 4551) lösen, hinzufügen und erneut schwenken
- 200 µl Tween 20 (Sigma P1379) hinzufügen
- 92,5 ml TBS-Puffer pH 8,24 hinzufügen

Peroxidase Entwickler mit Glucoseoxidase

- 100 ml PB-Puffer in ein Becherglas mit Rührfisch geben
- 50 mg DAB-Pulver (Sigma D5637) unter rühren lösen
- 2 ml 10 % Glucoselösung (10 g D(+)Glucose (Merck 8342) in 100 ml Aqua dest. lösen) hinzufügen
- 333 µl Glucoseoxidaselösung (12 mg Glucoseoxidase (Sigma G2133) in 10 ml PB-Puffer lösen) hinzufügen

Peroxidase Entwickler mit Glucoseoxidase und Nickel

- 100 ml PB-Puffer in ein Becherglas mit Rührfisch geben
- 40 mg Ammoniumchlorid (Sigma A4514) unter rühren lösen
- 50 mg DAB-Pulver (Sigma D5637) unter rühren lösen
- 2 ml 0,05 M Nickelsulfatlösung (130 mg Nickel(II)sulfat (Sigma N4882) in 10 ml Aqua dest. lösen) hinzufügen
- 2 ml 10 % Glucoselösung (10 g D(+)Glucose (Merck 8342) in 100 ml Aqua dest. lösen) hinzufügen
- 333 µl Glucoseoxidaselösung (12 mg Glucoseoxidase (Sigma G2133) in 10 ml PB-Puffer lösen) hinzufügen

Hämatoxylin nach Mayer für den Färbeautomaten

- 500 ml Hämalan nach Mayer (Merck 1.09249)
- 500 ml Aqua dest.

Eosinlösung für den Färbeautomaten

- 1000 ml Aqua dest.
- 5 g Erythrosin B (Merck 1.15936)
- 1 Tropfen Eisessig

0,5 % Perjodsäurelösung

- 100 ml Aqua dest.
- 250 mg Perjodsäure (Merck 524)

SO²-Wasser

- 5 ml 10% Natriummetabisulfitlösung (10 g Natriummetabisulfit (Merck 616) gelöst in 100 ml Aqua dest.)
- 5 ml 1 N HCl (Merck UN1789)
- 90 ml Aqua dest.

Blockierlösung für endogene Peroxidase

- 45 ml Methanol (Backer 8045)
- 5 ml Wasserstoffperoxid (Merck 1.08597)

Ölrot Stammlösung

- 0,5 g Oilred O (Sigma O0625)
- 100 ml Isopropanol (Riedel de Haen 24137)
- Im Wasserbad über Nacht bei 37°C auflösen

Ölrot Gebrauchslösung

- 30 ml Ölrot Stammlösung
- 20 ml Aqua dest.
- 10 min stehen lassen und filtrieren

2.2 Gewebe und Fixierung

Das humane Hodengewebe stammte aus Orchiektomie-Präparaten oder Hoden-Biopsien aus dem Fundus des Anatomischen Instituts von Prof. Adolf Friedrich Holstein aus langjähriger Zusammenarbeit mit dem Bundeswehrkrankenhaus Hamburg und Dr. Michael Hartmann. Die Präparate wurden nach Entnahme mit Bouin-Lösung fixiert. Einige mit modifizierter Davidsonscher Lösung fixierte Hodenbiopsien stammen aus dem Fundus der Andrologie am UKE von Prof. Wolfgang Schulze und Kollegen.

Die murinen Gewebe wurden Black6-Mäusen entnommen und in neutral gepuffertem 3,7 % Formalin, modifizierter Davidsonscher Lösung oder Bouin-Lösung fixiert.

Nach Fixierung mit Bouin-Lösung wurde das Gewebe für mehrere Tage in 70 prozentigem Isopropanol gewaschen, um die überschüssige Pikrinsäure zu entfernen.

Die in neutral gepuffertem Formalin fixierten Gewebe wurden mindestens 3 Stunden in Phosphatpuffer gespült. Die in modifizierter Davidsonscher Lösung fixierten Gewebe wurden mindestens 3 Stunden in 50 prozentigem Isopropanol gespült.

Danach wurden die Gewebe mit einer aufsteigenden Isopropanol-Reihe entwässert und mit 60 °C heißem Paraplast durchtränkt.

Anschließend wurde das Gewebe in Paraffinblöcke ausgegossen und im Schlittenmikrotom auf 5 µm Dicke geschnitten. Die Schnitte wurden auf Histobond-Objekträger (Marienfeld) aufgezogen und über Nacht bei 37 °C getrocknet.

Für die Immunhistochemie wurden die Schnitte in Xylol-Ersatz und absteigender Alkohol-Reihe entparaffiniert und gewässert. Danach wurden die Antigene mit verschiedenen Methoden demaskiert.

2.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.)

Die H. E. Färbung wurde in einem Automaten durchgeführt, beginnend mit Xylol-Ersatz und einer absteigenden Alkoholreihe zur Entparaffinierung und Wässerung. Danach wurden die Schnitte 3 min in Hämatoxylin nach Mayer gefärbt, in Aqua dest. und Leitungswasser gebläut, 3 min in wässriger Eosinlösung gefärbt, 30 s in Aqua dest. gespült und schließlich mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol-Ersatz entwässert. Abschließend wurden die Schnitte mit Eukitt eingedeckt und mit einem Deckglas versehen.

2.4 PAS-Hämatoxylin-Färbung

Die PAS-Hämatoxylin-Färbung wurde entweder als eigenständige Färbung oder als Gegenfärbung nach immunhistochemischer Färbung mit Peroxidase eingesetzt. Hierfür wurden die Schnitte nach entparaffinieren oder immunhistochemischer Färbung zunächst in Aqua dest. überführt. Anschließend wurden die Schnitte für 10 Minuten in 0,5 prozentiger Perjodsäure-Lösung inkubiert, um Hydroxylgruppen in Glykanen zu oxidieren. Um die Perjodsäure zu entfernen, wurden die Schnitte für 10 Minuten unter fließend Wasser gespült und anschließend erneut in Aqua dest. überführt. Dann wurden die Schnitte für 15 bis 30 min in Schiff's Reagenz (Merck 1.09249) gefärbt. Die durch Oxidation entstandenen Aldehyde bilden mit dem Fuchsin in Schiff's Reagenz eine Schiffbase, was zu einer intensiven Rotfärbung führt. Nach der Färbung wurden die Schnitte 3 mal für 2 min mit SO₂-Wasser und für 10 min unter fließend Wasser gespült. Danach wurden die Schnitte wieder in Aqua dest. überführt und für 10 bis 30 sec in Hämatoxylin nach Mayer gegengefärbt und unter fließend Wasser für 5 min gebläut. Abschließend wurden die Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol-Ersatz entwässert, mit Eukitt eingedeckt und mit einem Deckglas versehen.

2.5 Feulgen-Färbung

Die Schnitte wurden nach Entparaffinierung für 15 min in, im Wasserbad auf 60° C, erwärmte 1 molare Salzsäure (Merck UN1789) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte für 15 bis 30 min in Schiff's Reagenz (Merck 1.09249) gefärbt. Nach der Färbung wurden die Schnitte 3 mal für 2 min mit SO₂-Wasser und für 10 min unter fließend Wasser gespült, in Aqua dest. überführt, mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol-Ersatz entwässert, mit Eukitt eingedeckt und mit einem Deckglas versehen.

Die Salzsäure hydrolysiert die DNA-Stränge und macht so die Aldehydgruppen der Desoxyribose für das Schiff-Reagenz zugänglich, woraufhin die gleiche Reaktion wie bei der PAS-Färbung abläuft.

2.6 Antigen-Demaskierung

Zur Antigen-Demaskierung wurden sechs verschiedene Verfahren getestet:

- Autoklavieren für 20 min bei 121 °C in TUF-Puffer (PanPath, Amsterdam).
- Kochen in der Mikrowelle bei 1000 W für 2 min und bei 500 W für 5 mal 2 min in Citrat-Puffer pH 6.
- Kochen in der Mikrowelle bei 1000 W für 2 min und bei 500 W für 5 mal 2 min in EDTA-Lösung eingestellt auf pH 8.
- Kochen in der Mikrowelle bei 1000 W für 2 min und bei 500 W für 5 mal 2 min in Borsäure pH 8,5.
- Verdau bei 37°C für 10 min in 0,1 prozentiger Trypsinlösung (Biochrom in TBS).
- Verdau bei 37°C für 10 min in 0,04 prozentiger Protease 24 (Sigma P8038 in TBS).

Bei den Verfahren in der Mikrowelle wurde nach jedem Erhitzen verdampfte Demaskierungslösung nachgefüllt. Für die weiteren immunhistochemischen und Immunfluoreszenz Färbungen wurde nach Austestung der Verfahren die Demaskierung mit Borsäure verwendet, sofern nicht anders angegeben.

2.7 Immunhistochemischer Nachweis von SPOC1

Nach der Antigen-Demaskierung wurden die Schnitte 3 mal für 5 min in TBS mit 0,05 % Tween 20 (TBST) gewaschen. Danach wurden die Schnitte für 30 min mit Kaninchenserum (DAKO X0902) bzw. Schweineserum (DAKO X0901) 1:10 in TBS blockiert, anschließend der Primärantikörper zugegeben und über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Bei Verwendung von Peroxidase als Detektionsenzym wurde die endogene Peroxidase nach der Antigen-Demaskierung durch Inkubation in Methanol mit 3% Wasserstoffperoxid für 20 min inaktiviert.

Als Primärantikörper für die Detektion von SPOC1 wurden die monoklonalen Rattenhybridomantikörper M11, M33 und M45 pur verwendet, sowie das aus einem Kaninchen gewonnene Serum 53 1:1000 verdünnt in DAKO Antibodydiluent (DAKO S3022). Die monoklonalen Rattenhybridomantikörper können in TBS bis zu 1:10 verdünnt werden, eine Verdünnung in DAKO Antibodydiluent ist allerdings nicht möglich. Als Isotypenkontrollen wurden Ratten IgG2b Isotypenkontrolle (American Antigenix CN230020) 1:20 in TBS verdünnt, sowie ein monoklonaler Rattenhybridomantikörper gegen Flag-Tag pur verwendet, sowie Serum des Kaninchens vor Immunisierung 1:1000 verdünnt in DAKO Antibodydiluent (DAKO S3022).

Nach der Inkubation über Nacht wurden die Schnitte 3 mal für 5 min in TBS mit 0,05 % Tween 20 (TBST) gewaschen und für 30 min mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ein biotinylierter Kaninchen-Anti-Ratte-Antikörper (DAKO E0468 bzw. Schwein-Anti-Kaninchen-Antikörper, DAKO E0353) verwendet. Die Sekundärantikörper wuren 1:200 in DAKO Antibodydiluent (DAKO S3022) verdünnt.

Anschließend wurden die Schnitte erneut 3 mal 5 min mit TBST gewaschen und für 30 min mit Avidin-Biotin-Enzymkomplex Gebrauchslösung inkubiert. Verwendet wurden Avidin-Biotin gekoppelte alkalische Phosphatase sowie Peroxidase (beide Vector Laboratories). Danach wurden die Schnitte erneut 3 mal für 5 min mit TBST gewaschen und für 10 bis 30 min mit einem passenden Entwickler gefärbt. Die Farbreaktion wurde durch spülen unter fließend Wasser gestoppt. Bei einigen Schnitten wurde mit Hämatoxylin nach Mayer oder Hämatoxylin und PAS-Reaktion (siehe unten) gegengefärbt.

Mit alkalischer Phosphatase gefärbte Schnitte wurden wässrig mit Crystal Mount I (Biomedica M03) eingedeckt und auf einer Heizplatte bei 70°C für 15 min getrocknet. Danach wurde mit Crystal Mount II (Biomedica 05) ein Deckglas aufgeklebt.

Peroxidase gefärbte Schnitte wurden mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol-Ersatz entwässert, mit Eukitt eingedeckt und mit einem Deckglas versehen.

2.8 Entwickler und Verstärkungsreaktion

Der Entwickler für alkalische Phosphatase besteht aus Natriumnitrit, Dimethylformamid, Neufuchsin und Naphthol-AS in TBS pH 8,24. Die alkalische Phosphatase spaltet Phosphatreste vom Naphthol-AS ab. Dies führt zur Bildung eines roten Farbstoffs an den Stellen, wo die alkalische Phosphatase gebunden wurde.

Der Entwickler für Peroxidase besteht normalerweise aus Diaminobenzidin und Wasserstoffperoxid in Phosphatpuffer pH 7,4. Um eine Verstärkung des Signals zu erreichen, wurde das Wasserstoffperoxid nicht direkt zugegeben, sondern durch die Umsetzung von Glucose durch Glucoseoxidase in der Reaktionslösung erzeugt, um kontinuierlich Wasserstoffperoxid zu Verfügung zu stellen. Diese Methode wurde zunächst für den Enzymnachweis in homogenisierten Frischgewebe verwendet (Lundquist, 1971) und später für die Anwendung in der Enzymhistochemie (Itoh, 1979) und Immunhistochemie (Zaborszky, 1989) modifiziert. Das Ergebnis ist nach wie vor die Bildung eines braunen Farbstoffs an dem Ort, wo die Peroxidase gebunden wurde. Vor Einbringen in die Entwicklerlösung wurden die Schnitte 2 mal in Phosphatpuffer pH 7,4 gespült.

In einigen Fällen wurde dem Entwickler 0,05 M Nickelsulfat und 7,5 mM Ammoniumchlorid zugesetzt. Hierbei erzeugt die Reaktion einen schwarzen Niederschlag, wo die Peroxidase gebunden wurde.

2.9 Signalverstärkung mit der Peroxidase-Anti-Peroxidase

Methode

Um geringere Mengen SPOC1 nachweisen zu können, wurde eine Kombination aus oben beschriebener Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode und Peroxidase-Antiperoxidase-Methode durchgeführt (Davidoff, 1990).

Hierfür wurde der oben beschriebene immunhistochemische Nachweis von SPOC1 mit der Peroxidase-Methode bis zur Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Peroxidasekomplex durchgeführt. Im Anschluss wurde 3 mal für 5 min mit TBST gewaschen und die Schnitte mit Ratten-anti-Meerrettichperoxidase-Antikörper (Rockland 100-5138), 1:100 in DAKO Antibodydiluent (DAKO S3022) verdünnt, inkubiert. Anschließend wurde 3 mal für 5 min mit TBST gewaschen und die Schnitte erneut mit biotinyliertem Kaninchen-Anti-Ratte-Antikörper (DAKO E0468), 1:200 in DAKO Antibodydiluent (DAKO S3022) verdünnt, inkubiert. Danach wurden die Schnitte erneut 3 mal für 5 min mit TBST gewaschen und für 30 min mit Avidin-Biotin-Peroxidasekomplex Gebrauchslösung inkubiert. Abschließend wurde die Peroxidaseaktivität mit der Glucoseoxidase-Methode mit Nickel entwickelt, mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol-Ersatz entwässert, mit Eukitt eingedeckt und mit einem Deckglas versehen.

2.10 Immunfluoreszenz Doppelfärbung auf Paraffinschnitten

Die Doppelfärbung wurde verwendet, um die Koexpression von Proteinen im Gewebe zu prüfen. Nach Entparaffinierung wurden die Schnitte in der Mikrowelle mit Borsäure pH 8,5 demaskiert, 3 mal 5 min mit TBST gewaschen und 30 min mit Ziegen Serum (DAKO X0907), 1:10 in TBS verdünnt, blockiert. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C mit einem Gemisch aus zwei Antikörpern von verschiedenen Spezies inkubiert (siehe Tabelle 1). Am nächsten Tag wurden die Schnitte 3 mal 5 min in TBST gewaschen und für 30 min mit dem passenden Sekundärantikörpergemisch (siehe Tabelle 2) inkubiert. Danach wurden die Schnitte 3 mal 5 min in TBST gewaschen, 10 min mit DraQ5 (Biostatus BOS889-001-R200) und Hoechst 33258 (Sigma B2883), 1:1000 in TBS verdünnt, gegengefärbt, erneut 3 mal für 5 min in TBST gewaschen und mit Fluorescent Mounting Medium (DAKO S3022) eingedeckt sowie mit einem Deckglas versehen. Nach Antrocknen des Mounting Mediums wurden die Schnitte mit handelsüblichem Nagellack versiegelt.

Antigen	Spezies und Isotyp	Verdünnung	Verwendeter Sekundärantikörper	Hersteller
PLZF	Maus IgG2a monoklonal	1:50	Ziege anti Maus AlexaFluor 488	Calbiochem OP128L
PCNA	Maus IgG2a monoklonal	1:100	Ziege anti Maus AlexaFluor 488	Calbiochem NA03
SOHLH1	Kaninchen IgG polyklonal	1:200	Ziege anti Kaninchen AlexaFluor 555, Esel anti Kaninchen AlexaFluor 488	Abcam ab49272
SPOC1 rm11	Ratte IgG2a monoklonal	Pur / 1:10	Ziege anti Ratte AlexaFluor 555	Dr. Elisabeth Kremmer
SPOC1 rm33	Ratte IgG2a monoklonal	Pur / 1:10	Ziege anti Ratte AlexaFluor 555	Dr. Elisabeth Kremmer
SPOC1 rm45	Ratte IgG2b monoklonal	Pur / 1:10	Ziege anti Ratte AlexaFluor 555	Dr. Elisabeth Kremmer

Tabelle 1: Auflistung der für Doppelfärbungen verwendeten primären Antikörper

Antigen	Spezies	Fluorophor	Verdünnung	Hersteller: Molecular Probes
Ratten Ig (H+L)	Ziege	AlexaFluor555	1:200	A21434
Kaninchen Ig (H+L)	Ziege	AlexaFluor555	1:200	A21428
Kaninchen Ig (H+L)	Esel	AlexaFluor488	1:200	A21206
Maus Ig (H+L)	Ziege	AlexaFluor488	1:200	A11029

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper

2.11 Immunfluoreszenz Doppelfärbung SPOC1 und GSA-II Lektin

Nach Entparaffinierung wurden die Schnitte in der Mikrowelle mit Borsäure pH 8,5 demaskiert, 3 mal für 5 min mit TBST gewaschen und für 30 min mit Ziegen Serum (DAKO X0907), 1:10 in TBS verdünnt, blockiert. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 4° C mit dem M45-Antikörper gegen SPOC1 inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 3 mal für 5 min in TBST gewaschen und für 30 min mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Als nächstes wurden die Schnitte 2 mal für 5 min in TBST und 2 mal für 5 min Lektinpuffer gespült und 1 h lang in biotinyliertem GSA-II Lektin (Vector B1215), 1:100 in Lektinpuffer verdünnt, inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 2 mal für 5 min in TBS gewaschen, für 30 min mit Streptavidin-Alexa 488 (Invitrogen/Molecular Probes S32354), 1:1000 in TBS verdünnt, inkubiert, erneut 2 mal für 5 min in TBS gewaschen, für 10 min mit DraQ 5 (Biostatus BOS889-001-R200) und Hoechst 33258 (Sigma B2883), 1:1000 in TBS verdünnt, gegengefärbt, wieder 2 mal für 5 min in TBS gewaschen und mit Fluorescent Mounting Medium (DAKO S3022) eingedeckt sowie mit einem Deckglas versehen.

2.12 Immunhistochemischer Nachweis von aktivierter Caspase3 zur Detektion von Zellen in Apoptose

Das vom Hersteller empfohlene Protokoll wurde leicht modifiziert. Die Schnitte wurden nach der Entparaffinierung in der Mikrowelle mit Citrat pH 6,0 demaskiert. Anschließend wurde die endogene Peroxidase durch Inkubation in Methanol mit 3 % Wasserstoffperoxid für 20 min inaktiviert. Die Schnitte wurden 3 mal für 5 min mit TBST gewaschen und für 30 min mit Schweineserum (DAKO X0901) 1:10 in TBS blockiert und über Nacht bei 4° C mit dem Anti-Caspase3-Antikörper (cleaved Caspase3 Cellsignaling #9661), 1:400 in DAKO Antibodydiluent (DAKO S3022) verdünnt, inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 3 mal für 5 min in TBS mit 0,05 % Tween 20 (TBST) gewaschen und für 30 min mit dem biotinylierten Schwein-Anti-Kaninchen-Antikörper (DAKO E0353), 1:200 in DAKO Antibodydiluent (DAKO S3022) verdünnt, inkubiert. Danach wurden die Schnitte erneut 3 mal für 5 min mit TBST gewaschen und für 30 min mit Avidin-Biotin-Peroxidasekomplex Gebrauchslösung inkubiert. Abschließend wurde die Peroxidaseaktivität mit der Glucoseoxidase-Methode ohne Nickel entwickelt, mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol-Ersatz entwässert, mit Eukitt eingedeckt und mit einem Deckglas versehen.

2.13 TUNEL-Assay zur Detektion von Zellen in Apoptose

TUNEL steht für TdT-mediated dUTP nick end labeling. Während der Apoptose wird die DNA durch Endonukleasen fragmentiert und 3'-OH-Gruppen am Desoxyribosegerüst der DNA werden frei. Das Enzym Terminal Desoxynucleotidyl Transferase (TnT) bindet Desoxyuridintriphosphat-Konjugate (dUTP) an die 3'-OH-Gruppen der Fragmentenden (Gavrieli, 1992). In dieser Arbeit wurde das In situ Cell Death Detection Kit von Roche Applied Science (#11684795910) mit dUTP-Fluorescein-Konjugaten verwendet. Die Schnitte wurden nach Entparaffinierung wie vom Hersteller empfohlen vorbehandelt und mit dem TUNEL Reaktionsgemisch aus TnT und dUTP-Fluorescein-Konjugaten inkubiert. Danach wurden die Schnitte 3 mal für 5 min mit TBST gewaschen, für 10 min mit DraQ 5 (Biostatus BOS889-001-R200) und Hoechst 33258 (Sigma B2883), 1:1000 in TBS verdünnt, gegengefärbt, wieder 2 mal für 5 min in TBS gewaschen und mit Fluorescent Mounting Medium (DAKO S3022) eingedeckt sowie mit einem Deckglas versehen.

2.14 Gefrorene Frischgewebe und Gefrierschnitte

Mausgewebe wurden nach der Präparation mit PBS gespült, in TissueTek (Sakura 4583) eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Blöcke wurden eingefroren bei -80° C gelagert.

Mit einem Leika-Gefriermikrotom wurden die Gewebe 7 µm dick bei -18° C geschnitten. Die Schnitte wurden auf Histobond-Objektträger (Marienfeld) aufgezogen und an der Luft getrocknet. Danach wurden die Schnitte entweder verwendet oder bei -80° C wieder eingelagert.

2.15 Fettfärbung mit Ölrot

Gefrierschnitte wurden 10 min in 4% Paraformaldehyd-Lösung fixiert und 2 mal für 5 min in PBS gespült. Anschließend wurden die Schnitte für 2 min in 60% Isopropanol gespült, 15 min in Ölrotgebrauchslösung gefärbt und erneut für 2 min in 60% Isopropanol gespült. Dann wurden die Schnitte in Aqua dest. überführt, 10 s in Hämatoxylin nach Mayer gegengefärbt, 5 min unter fließend Wasser gebläut und in Aqua dest. gespült. Die gefärbten Schnitte wurden wässrig mit Crystal Mount I (Biomedica M03) eingedeckt und auf einer Heizplatte bei 70°C für 15 min getrocknet. Danach wurde mit Crystal Mount II (Biomedica 05) ein Deckglas aufgeklebt.

2.16 shRNA Knockdown Maus für SPOC1

Eine Maus mit einem durch Doxycyclin induzierbaren shRNA-Konstrukt gegen SPOC1 wurde von der Firma Artemis Pharmaceuticals bezogen. Der Vektor enthält einen Tet-Repressor unter der Kontrolle eines Huhn-Beta-Actin-Promotors mit Cytomegalie-Virus-Verstärker-Sequenz. Dieser Promotor sollte in allen Geweben aktiv sein. Die shRNA steht unter der Kontrolle eines Tet-Operators und eines H1-Promotors, das heißt solange der Tet-Repressor aktiv ist, blockiert er den H1-Promotor der shRNA gegen SPOC1 und die shRNA wird nicht exprimiert. Des Weiteren enthält der Vektor eine Neomycin-Resistenz zur Selektion.

Wenn die Maus Doxycyclin ausgesetzt wird, ändert sich die Struktur des Tet-Repressors, sodass er nicht mehr an den H1-Promotor binden kann. Dies hat die Expression der shRNA zur Folge, wodurch die Expression von SPOC1 vermindert wird.

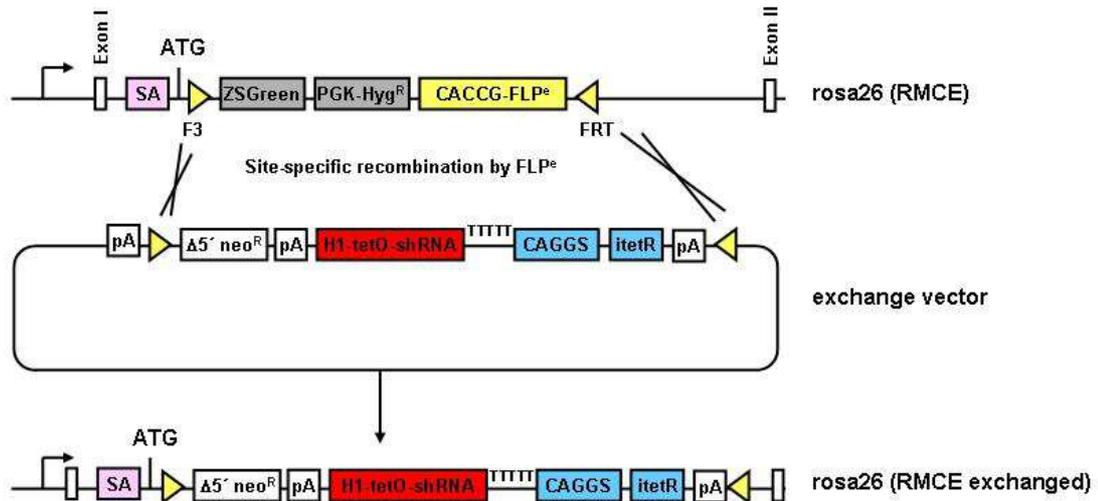


Abbildung 4: Austausch-Vektor mit induzierbarer shRNA spezifisch für SPOC1, Grafik von Dr. Hannah Staage freundlicherweise zur Verfügung gestellt. H1-tetO-shRNA entspricht einem H1 Promotor mit Tet-Operator, shRNA und 5 Thymidinen, CAGGS-itetR entspricht einem Huhn beta-Actin Promotor mit Cytomegalievirus Verstärker und Codon optimierten Tet-Repressor, SA entspricht Splice Acceptor, ZSGreen entspricht ZSGreen, PKG-Hyg entspricht der Hygromycin Resistenz, CAGGS-FLP entspricht der FLP-Rekombinase, $\Delta 5'$ neo entspricht Neomycin- Resistenz ohne ATG, pA entspricht einer synthetischen Polyadenyliersequenz. FRT und F3 entsprechen den FLP-Rekombinase Schnittstellen.

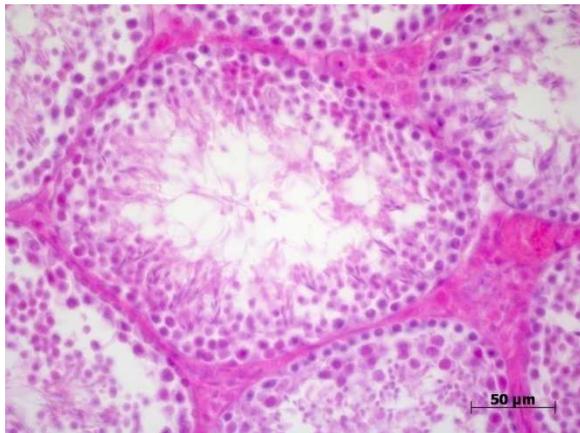
Der Vektor wurde durch rekombinanten Kassettenaustausch in die Maus eingebracht. Hierzu wurde von der Firma Artemis Pharmaceuticals der Austauschvektor in embryonale Stammzellen eines Mausstamms eingebracht, der im Rosa26-Locus eine Kassette mit ZSGreen, Hygromycin-Resistenz und der FLP-Rekombinase trägt. Beide Vektoren enthielten Schneidesequenzen für FLP, sodass der Vektor nach Transfektion durch Rekombination in das Genom im Rosa26 Locus integriert werden konnte (Abbildung 4). Nach der Transfektion wurden die embryonalen Stammzellen mit Neomycin selektiert und in tetraploide Blastocysten und dann in scheinchwangere Mäuse eingebracht.

3 Ergebnisse

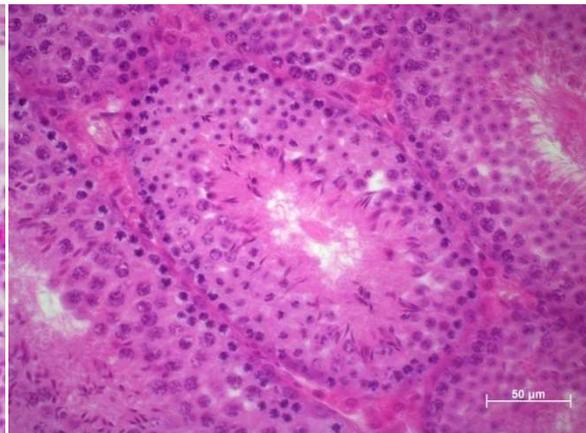
3.1 Fixative für Hoden-Gewebe

Da in dieser Arbeit die Expression des SPOC1 Proteins im Hoden untersucht werden sollte, wurden zunächst verschiedene Fixierungsmethoden getestet, mit deren Hilfe Hodengewebe histologisch untersucht werden sollte.

a) Formalin



b) Bouins Lösung



c) modifizierte Davidsonsche Lösung

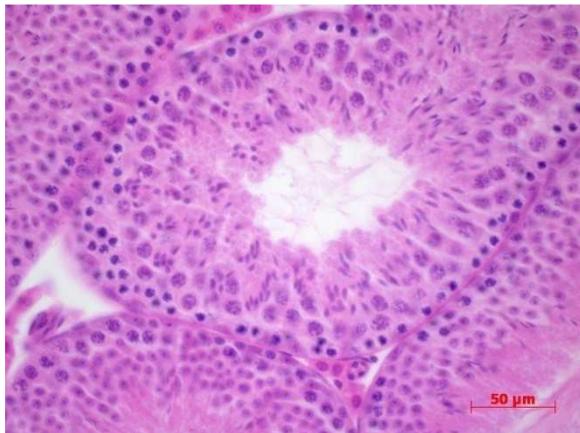


Abbildung 5: Verschieden fixierte Maushoden wurden mit HE gefärbt, um den Strukturhalt zu vergleichen. Gewebe a) wurde mit Formalin fixiert, das Sertoli-Zellplasma ist nicht erhalten. Gewebe b) wurde mit Bouins Lösung fixiert. Die Kernmorphologie ist gut sichtbar und die epitheliale Struktur des Tubulus ist ebenfalls zu erkennen. Gewebe c) wurde mit modifizierter Davidsonscher Lösung fixiert. Das Ergebnis ist mit der Bouin-Fixierung vergleichbar.

Der Einfluss der Fixierung wurde an Maushoden getestet. In der H.E.-Färbung zeigte die Bouin-Fixierung einen besseren Strukturhalt gegenüber der Formalin-Fixierung (Abbildung 5). Die modifizierte Davidsonsche Lösung zeigte einen ähnlich guten Strukturhalt wie Bouin-Fixierung und ermöglichte außerdem noch Immunfluoreszenzfärbungen (siehe: 3.5 Immunfluoreszenzdoppelfärbungen am humanen Hoden).

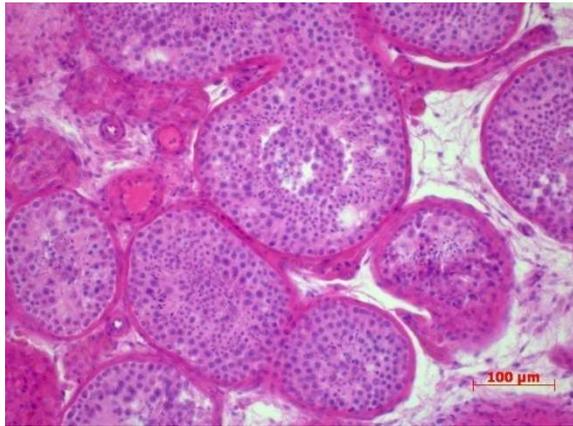
Dies ist mit Bouin-Fixierung nicht möglich, da die enthaltene Pikrinsäure DNA zerstört und so eine Färbung mit interkalierenden, fluoreszierenden DNA Farbstoffen nicht möglich ist (Daten nicht gezeigt). Mit Bouin-Fixierung und modifizierter Davidsonscher Lösung ist die epitheliale Struktur der Sertoli-Zellen sichtbar. Außerdem ist die Kernmorphologie gut erkennbar. Mit Formalin dagegen ist das Sertoli-Zellplasma nicht erhalten und die Kerne sind homogen gefärbt.

3.2 Histologische Färbungen von Mensch- und Maushoden

Verschiedene histologische Färbemethoden wurden verwendet, um die Morphologie von Mensch- und Maushoden zu untersuchen. In der H.E. Färbung werden die Unterschiede zwischen Mensch- und Maushoden ersichtlich (Abbildung 6). Im humanen Hoden bilden die Spermatogonien eine fast durchgängige Einzelschicht auf der Lamina propria. Sie weisen einen runden Kern und helles Zytoplasma auf. Im Maushoden sind weniger Spermatogonien zu sehen, ihr Kern ist oval bis dreieckig. Spermatogonien haben auch in der Maus Kontakt zur Lamina propria, allerdings können in der untersten Schicht des Keimepithels auch Spermatocyten vorkommen.

Die Spermatocyten haben sowohl im Menschen wie in der Maus die größten Zellkerne. Außerdem sind kondensierte Chromosomen im Kern zu erkennen. In der Maus ist je Tubulusanschnitt nur ein Stadium pro Zelltyp zu sehen, während im Menschen Spermatozyten und Spermatocyten verschiedener Differenzierungsstufen nebeneinander in einem Tubulus liegen.

a) humaner Hoden (HE)



b) muriner Hoden (HE)

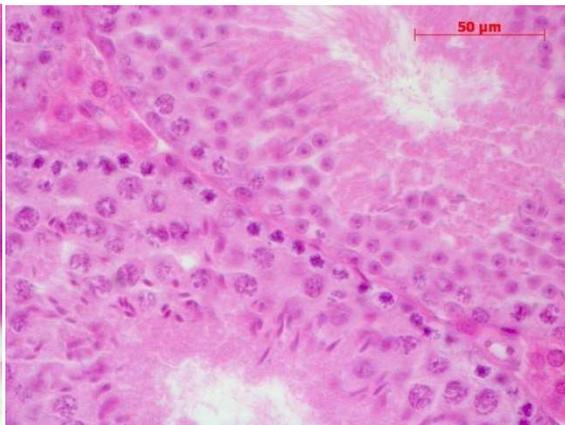
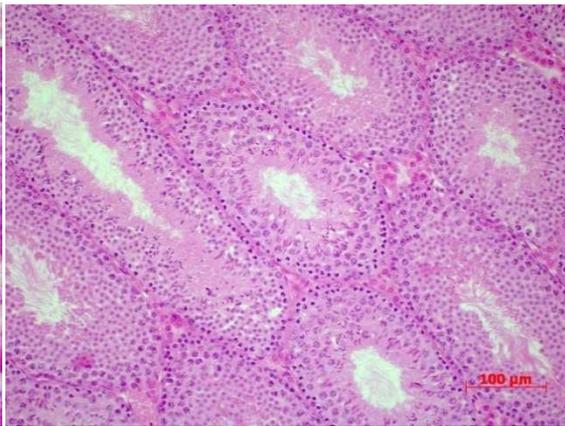


Abbildung 6: Die Bilder in Spalte a) zeigen einen humanen Hoden in HE-Färbung. In der Übersichtsvergrößerung fallen keine großen morphologischen Unterschiede zwischen den Tubuli auf. In der höheren Vergrößerung erkennt man, dass innerhalb eines Tubulus Abschnitte mit runden Spermatiden und einer Schicht Spermatocyten und Abschnitte mit elongierten Spermatiden und zwei Schichten Spermatocyten nebeneinander liegen. Dem ganzen Tubulus kann daher kein Stadium zugeordnet werden. Die Bilder in Spalte b) zeigen einen Maushoden in HE-Färbung. In der Übersichtsvergrößerung sind Unterschiede zwischen den Tubuli zu erkennen. In der höheren Vergrößerung sind im oberen Tubulus nur runde Spermatiden und eine Schicht Spermatocyten zu sehen, im unteren dagegen nur elongierte Spermatiden und zwei Schichten Spermatocyten. Daraus folgt, dass der obere Tubulus sich in einem frühen Stadium nach Oakerg befindet (I – IV), der untere Tubulus in einem späten Stadium (VII – XI). Eine genauere Zuordnung ist nicht möglich, da das Akrosom mit der H.E. Färbung nicht angefärbt ist.

In der Feulgen-Färbung, einer quantitativen DNA-Färbung, sind die verschiedenen Stadien der Spermatocyten gut zu sehen (Abbildung 7).

a) humaner Hoden (Feulgen)

b) muriner Hoden (Feulgen)

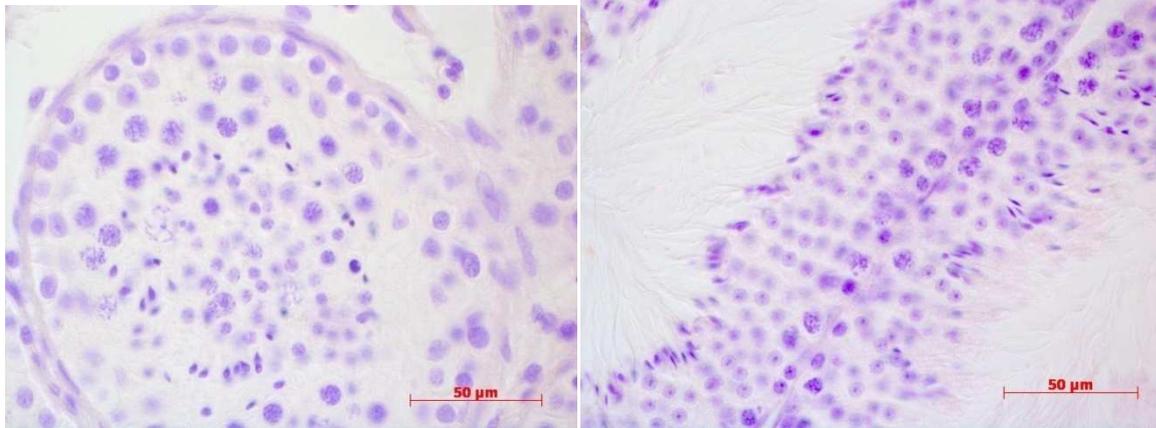


Abbildung 7: Bild a) zeigt einen Paraffinschnitt vom humanen Hoden, Bild b) zeigt einen Paraffinschnitt vom Maushoden. Beide Schnitte wurden mit der Feulgen-Färbung, die auf einer farbbildenden Reaktion mit DNA basiert, gefärbt. Je konzentrierter die DNA im Zellkern, desto stärker fällt die Färbung aus. Die elongierten Spermatiden werden durch ihr stark kondensiertes Chromatin stark angefärbt, in runden Spermatiden ist ein Nukleolus zu erkennen, in den Spermatocyten sind netz- oder punktförmig kondensierte Chromosomen zu sehen.

In der PAS-Färbung färbte sich die Lamina propria im Hoden an, sodass leichter zwischen Spermatogonien, die Kontakt zur Basalmembran haben und Spermatocyten I, die keinen Kontakt zur Basalmembran mehr besitzen, differenziert werden kann (Abbildung 8). Außerdem können die Spermatiden im Maushoden besser beurteilt werden, da sich das Akrosom bzw. seine Vorstufen anfärbte, wie von Oakberg (Oakberg, 1956) beschrieben. Im humanen Hoden sind das Akrosom und seine Vorstufen nicht PAS-positiv. Die Anfärbung der Akrosomen war mit Formalin-Fixierung deutlicher als mit der Fixierung mit modifizierter Davidsonscher Lösung (Abbildung 9).

Zusammenfassend konnten verschiedene histologische Fixierungs- und Färbemethoden erfolgreich angewendet werden, um die Morphologie des Hodengewebes von Mensch und Maus zu untersuchen.

a) humaner Hoden (PAS-Hämalaun)

b) muriner Hoden (PAS-Hämalaun)

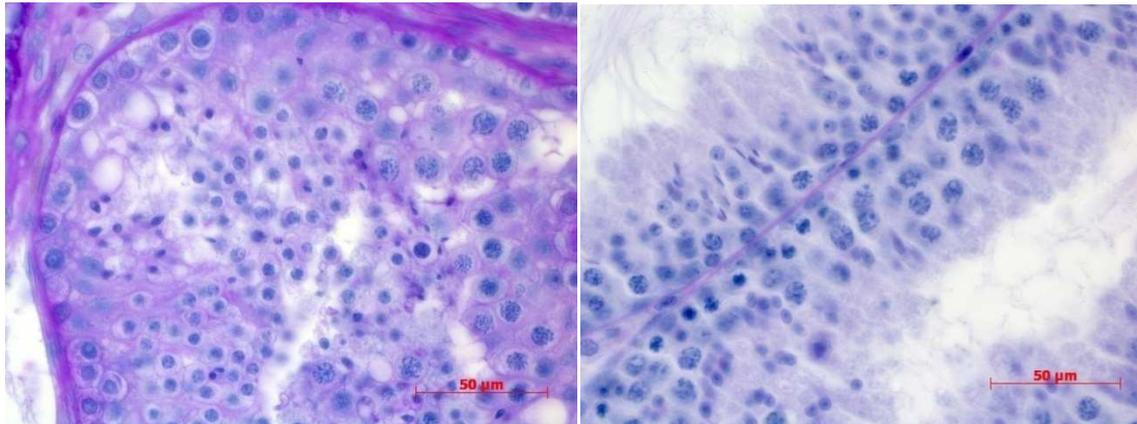


Abbildung 8: Bild a) zeigt einen humaner Hoden in PAS Hämalaun-Färbung, die Basalmembran und die Zellmembran der Keimzellen sind violett gefärbt. Bild b) zeigt einen Maushoden in PAS Hämalaun-Färbung, die Basalmembran ist violett angefärbt, die Akrosomen sind nur in höherer Vergrößerung zu sehen.

Muriner Hoden (PAS-Hämalaun)

a) Formalin

b) modifizierte Davidsonsche Lösung

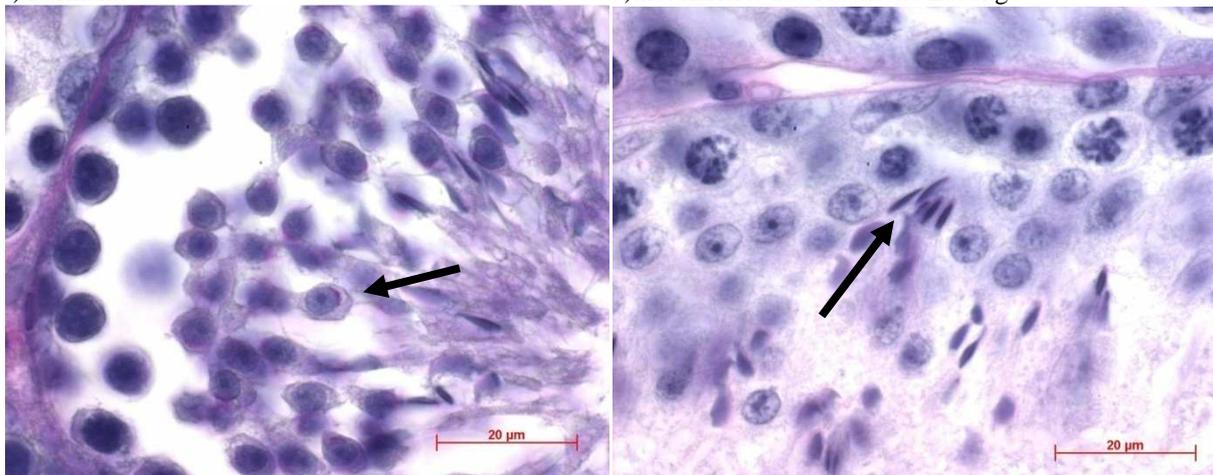


Abbildung 9: Bild a) zeigt einen formalinfixierten Maushoden in PAS Hämalaun-Färbung in 1000x Vergrößerung. Der Pfeil zeigt auf die kappenförmigen, PAS-positiven Akrosomenanlagen der runden Spermatiden. Die Akrosomenanlage liegt auf der luminalen Seite des Tubulus und es sind ebenfalls einige Spermatozoen zu sehen. Des Weiteren sind eine Reihe Spermatocyten zu sehen. Somit befindet sich dieser Tubulus im Stadium V nach Oakberg. Bild b) zeigt einen mit modifizierter Davidsonscher Lösung fixierten Maushoden in PAS Hämalaun-Färbung in 1000x Vergrößerung. Der Pfeil weist auf Spermatozoen mit PAS-positiven Akrosomen hin. Es sind runde Spermatiden ohne PAS-positive Akrosomenanlage, sowie späte elongierte Spermatiden mit PAS-positiver Akrosomenanlage und eine Reihe von Spermatocyten zu sehen. Somit befindet sich dieser Tubulus im Stadium I nach Oakberg.

3.3 Immunhistochemischer Nachweis von SPOC1

3.3.1 Methodenvergleich verschiedener Antigenmaskierungsverfahren

Zu Beginn der Arbeit war noch keine Methode für den immunhistochemischen Nachweis von SPOC1 etabliert. Aus diesem Grund wurden verschiedene immunhistochemische Methoden für die Detektion des SPOC1 Proteins im Hoden getestet.

Um den Einfluss der Demaskierung zu untersuchen, wurden sechs verschiedene Verfahren (siehe 2.6 Antigen-Demaskierung) auf Bouin fixierten humanen Hoden-Paraffinschnitten angewendet. Getestet wurde eine Demaskierung mit Citratpuffer, EDTA, Proteinase K, TUF-Puffer und Borsäure. Nach der Demaskierung wurde SPOC1 mit dem Ratte anti-SPOC1 Antikörper rm45 und der alkalischen Phosphatase- oder Peroxidase Glucosoxidase-Methode nachgewiesen. Als Isotypenkontrolle wurde ein Flag-Tag Antikörper verwendet. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Die Citratdemaskierung lieferte die besten Ergebnisse für die SPOC1 Färbung. Der rm45 Antikörper markierte basal in den Hodenkanälchen liegende Spermatogonien. Allerdings zeigte der Flag-Tag Antikörper eine unspezifische Bindung an Myofibroblasten in der Lamina propria der Hodenkanälchen und an glatte Muskelzellen in der Media von Gefäßen (Abbildung 10).
2. Die Demaskierung mit EDTA lieferte ein ähnliches Bild, jedoch fiel die SPOC1-Färbung schwächer aus (Abbildung 11).
3. Die Demaskierung mit Proteinase K zerstörte das Keimepithel (Abbildung 12).
4. Bei der Demaskierung mit Trypsin färbten sich ebenfalls Spermatogonien an, die basal in den Hodenkanälchen liegen. Allerdings färbte sich der intertubuläre Raum unspezifisch an. Der Flag-Tag Antikörper zeigte bei Trypsin-Demaskierung keine unspezifische Bindung an glatter Muskulatur (Abbildung 13).
5. Die Demaskierung mit TUF-Puffer lieferte ein ähnliches Bild wie die Trypsin-Demaskierung (Abbildung 14).
6. Die Demaskierung mit Borsäure pH 8,5 zeigte ein der Citratdemaskierung gleichwertiges Resultat (Abbildung 15).

a) anti SPOC1

b) anti Flag-Tag

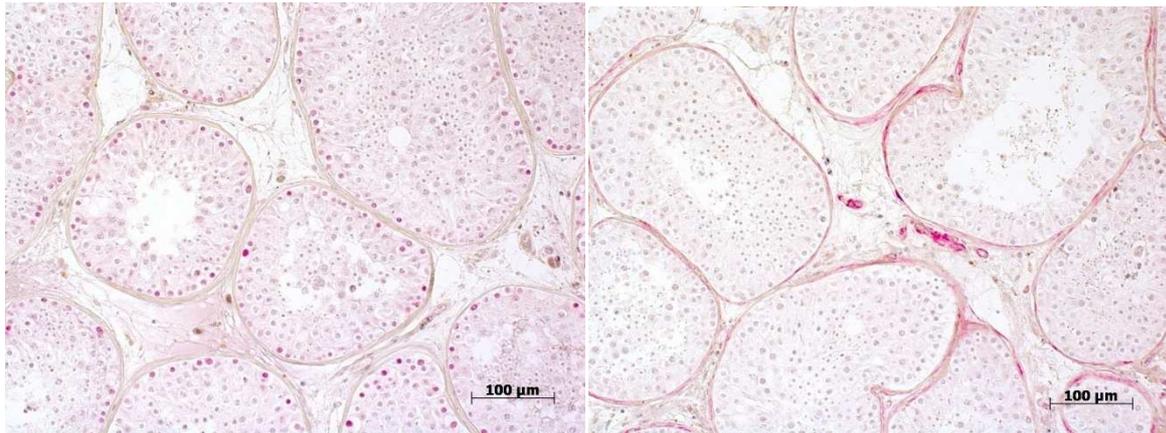


Abbildung 10: Paraffinschnitte vom humanen Hoden wurden mit Citrat demaskiert. Schnitt a) wurde mit dem Ratte anti SPOC1 Antikörper rm45 und der alkalischen Phosphatase Methode immunhistochemisch gefärbt. Es färbten sich Spermatogonien an. Schnitt b) wurde mit einem Flag-Tag Antikörper als Isotypenkontrolle gefärbt. Es trat eine unspezifische Färbung der Myofibroblasten der Lamina propria auf, die Spermatogonien blieben ungefärbt.

a) anti SPOC1

b) anti Flag-Tag

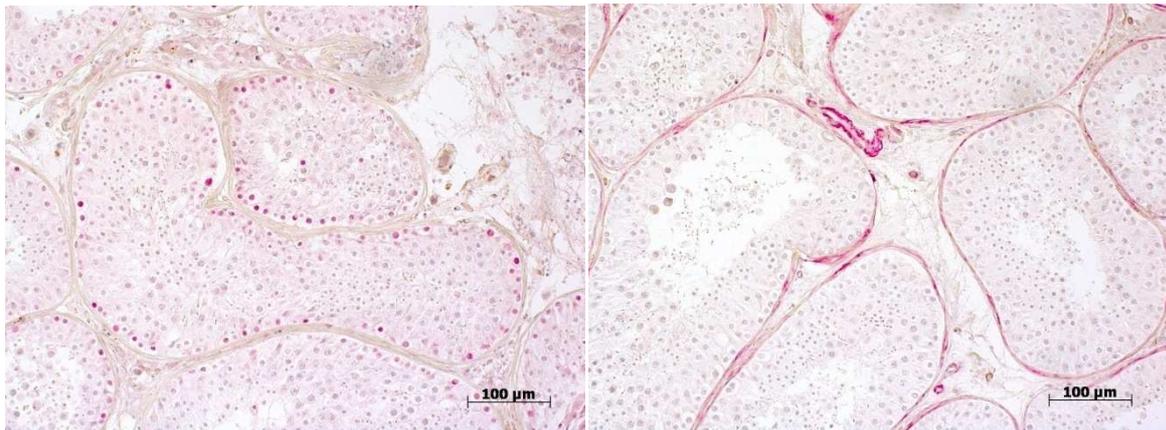


Abbildung 11: Paraffinschnitte vom humanen Hoden wurden mit EDTA demaskiert. Schnitt a) wurde mit dem Ratte anti SPOC1 Antikörper rm45 und der alkalischen Phosphatase Methode immunhistochemisch gefärbt. Es färben sich Spermatogonien an. Schnitt b) wurde mit einem Flag-Tag Antikörper als Isotypenkontrolle gefärbt. Es trat eine unspezifische Färbung der Myofibroblasten der Lamina propria auf, die Spermatogonien blieben ungefärbt.

a) anti SPOC1

b) anti Flag-Tag

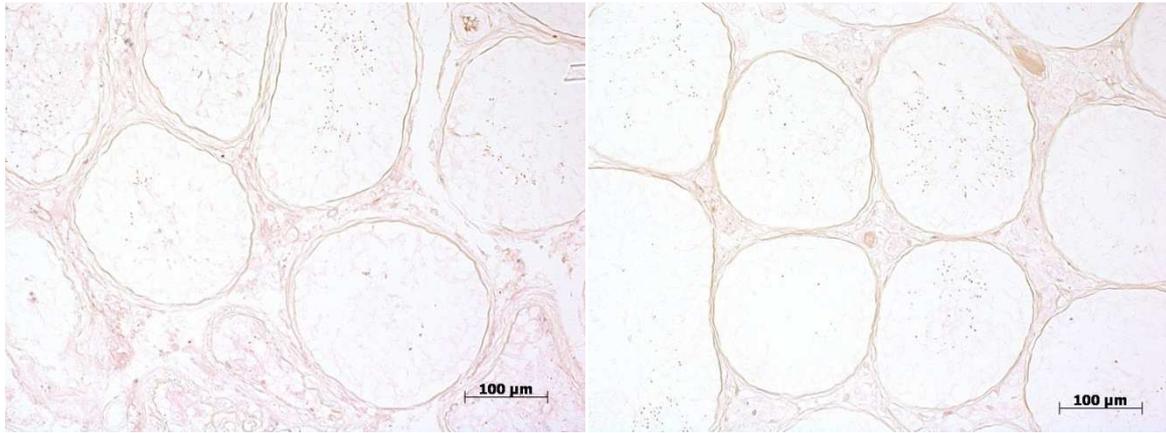


Abbildung 12: Paraffinschnitte vom humanen Hoden wurden mit Proteinase K demaskiert. Die Proteinase K zerstörte das Keimepithel. Weder die immunhistochemische Färbung mit dem Ratte anti SPOC1 Antikörper rm45 auf Schnitt (a) noch die immunhistochemische Färbung mit dem Flag-Tag Antikörper zur Isotypenkontrolle auf Schnitt (b) färbten die verbliebenen Zellen an.

a) anti SPOC1

b) anti Flag-Tag

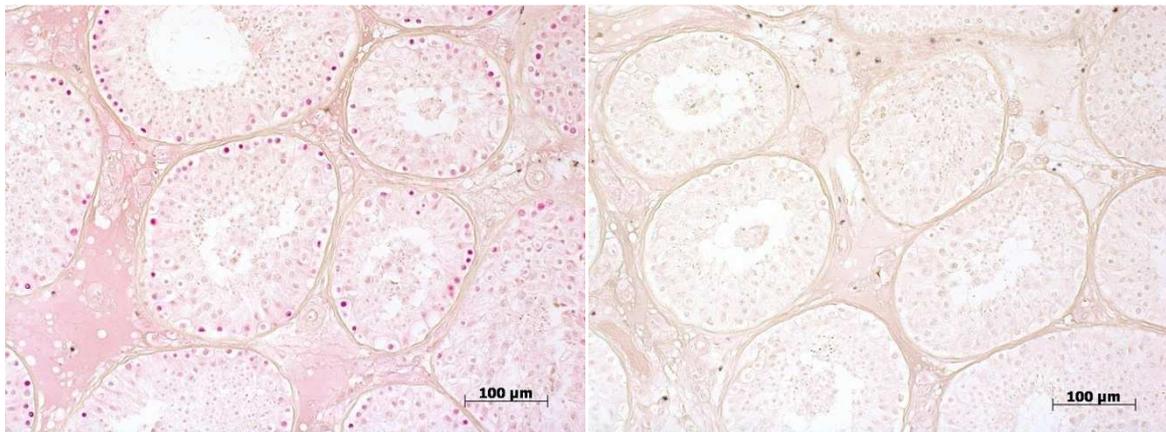


Abbildung 13: Paraffinschnitte vom humanen Hoden wurden mit Trypsin demaskiert. Schnitt a) wurde mit dem Ratte anti SPOC1 Antikörper rm45 und der alkalischen Phosphatase Methode immunhistochemisch gefärbt. Es färbten sich Spermatogonien und der intertubuläre Raum an. Schnitt b) wurde mit einem Flag-Tag Antikörper als Isotypenkontrolle gefärbt. Es färbte sich der intertubuläre Raum ebenfalls an, Spermatogonien blieben ungefärbt.

a) anti SPOC1

b) anti Flag-Tag

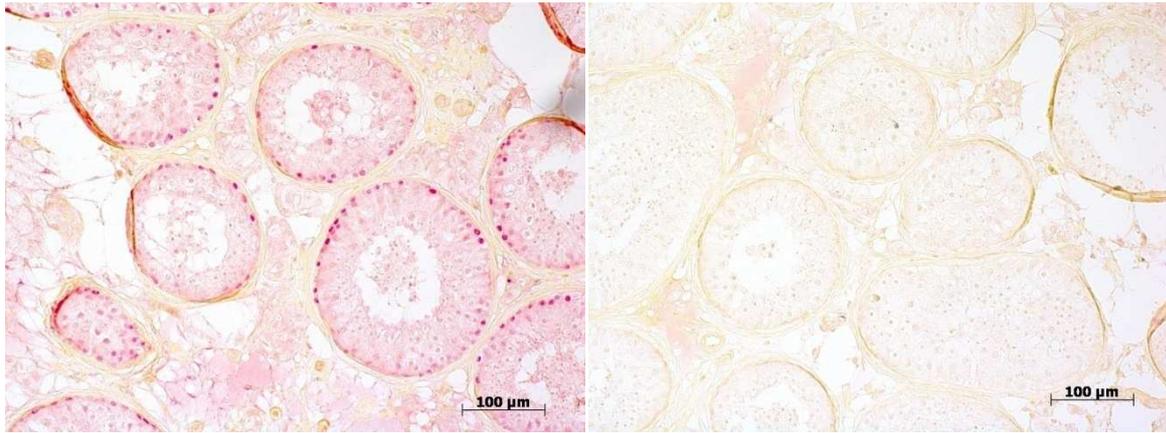


Abbildung 14: Paraffinschnitte vom humanen Hoden wurden mit TUF-Puffer demaskiert. Schnitt a) wurde mit dem M45 Antikörper immunhistochemisch gefärbt. Es färbten sich Spermatogonien und der intertubuläre Raum an. Schnitt b) wurde mit einem Flag-Tag Antikörper als Isotypenkontrolle gefärbt. Es färbte sich der intertubuläre Raum ebenfalls an, Spermatogonien blieben ungefärbt.

a) anti SPOC1

b) IgG Kontrolle

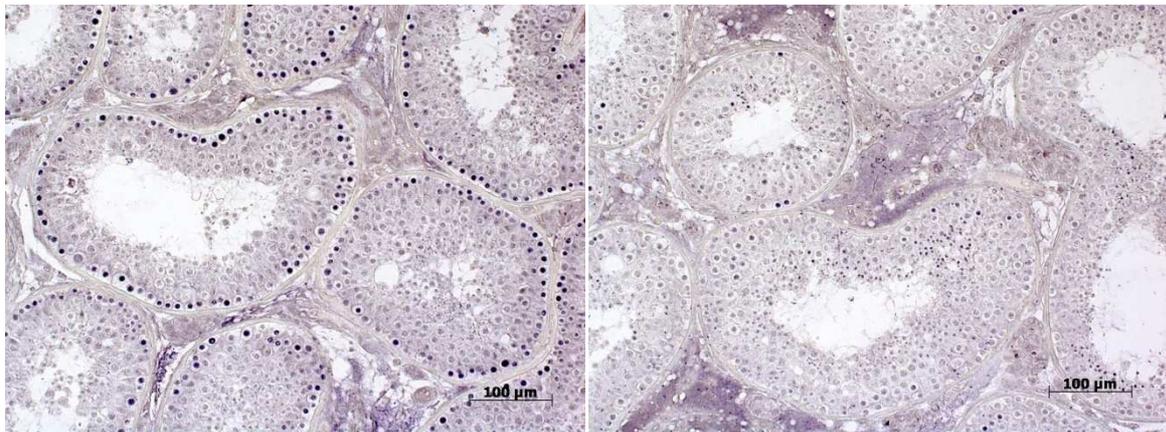


Abbildung 15: Paraffinschnitte vom humanen Hoden wurden mit Borsäure pH 8,5 demaskiert. Schnitt a) wurde mit dem Ratte anti SPOC1 Antikörper rm45 und der Peroxidase-Glucoseoxidase-Methode immunhistochemisch gefärbt. Es färbten sich Spermatogonien und der intertubuläre Raum an. Schnitt b) wurde mit einem Ratten IgG2b Isokontrollantikörper gefärbt. Es färbte sich der intertubuläre Raum ebenfalls an, Spermatogonien blieben ungefärbt.

Zusammenfassend war eine Demaskierung mit Citratpuffer und Borsäure am besten für die immunhistochemische Detektion von SPOC1 geeignet und wurde in weiteren experimenten verwendet.

3.3.2 Methodenvergleich verschiedener Detektionsenzyme und Verstärkungen

Im nächsten Schritt wurden die beiden Detektionssysteme alkalische Phosphatase, sowie das System aus Glucoseoxidase und Peroxidase auf Bouin fixierten humanen Hoden-Paraffinschnitten mit dem SPOC1-Antikörper rm45 und nach Demaskierung mit Citrat getestet. Das Signal des Systems aus Glucoseoxidase und Peroxidase konnte durch Zugabe von Nickel noch weiter verstärkt werden (Abbildung 17).

Die SPOC1-Färbungen mit alkalischer Phosphatase und Peroxidase waren im Prinzip gleichwertig (vergleiche Abbildung 16 und Abbildung 18), allerdings war das System aus Glucoseoxidase und Peroxidase besser steuerbar, da sich die Färbung kontinuierlicher entwickelte, sodass die Reaktion rechtzeitig gestoppt werden konnte bevor der Schnitt überfärbt wurde. Des Weiteren ist der Farbstoff, der bei der Peroxidase-reaktion entstand stabiler gegenüber organischen Lösungsmitteln und anderen Reagenzien, sodass die Schnitte mit der PAS-Reaktion gegengefärbt und mit Xylolersatz entwässert und wasserfrei eingedeckt werden konnten. Aus diesem Grund wurde in weiteren Experimenten die Glucoseoxidase Peroxidase Methode benutzt.

a) anti SPOC1

b) IgG Kontrolle

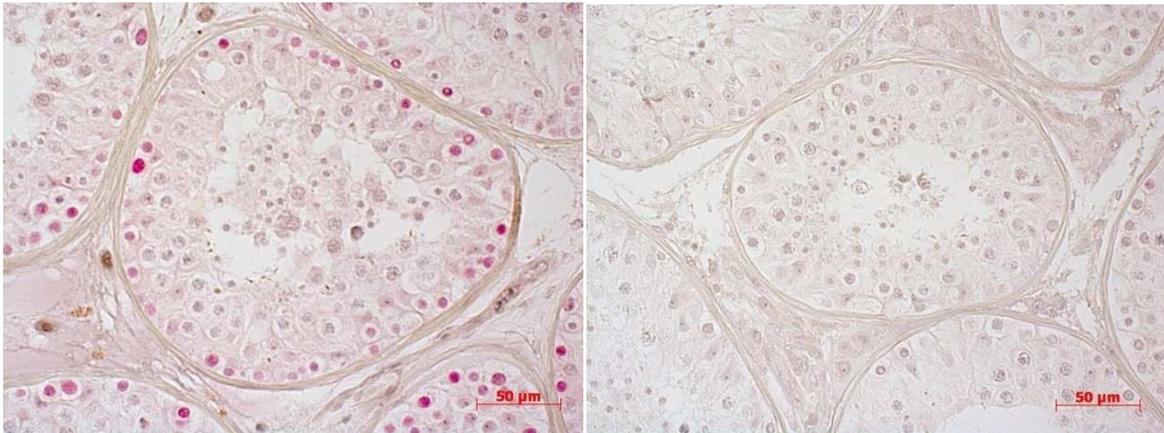


Abbildung 16: Immunhistochemischer Nachweis von SPOC1 mit dem Ratte anti SPOC1 Antikörper rm45 auf humanem Hoden. Die alkalische Phosphatase erzeugte ein rotes Reaktionsprodukt. Schnitt a) wurde mit dem rm45 Antikörper inkubiert und zeigte eine rote Kernfärbung in den Spermatogonien. Schnitt b) wurde mit einer Isotypenkontrolle (American Antigenix IgG2b) inkubiert und wies keine spezifische Färbung auf.

a) anti SPOC1

b) IgG Kontrolle

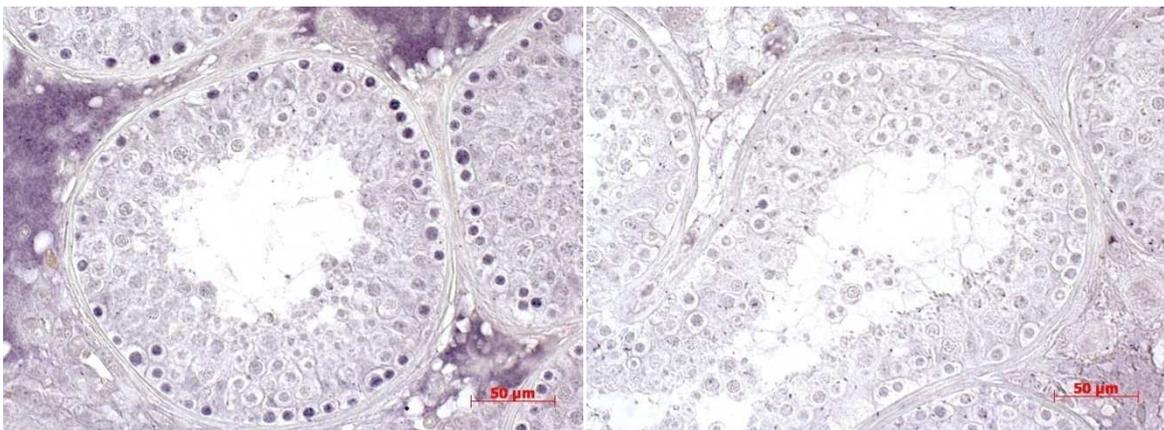


Abbildung 17: a) Immunhistochemischer Nachweis von SPOC1 mit dem Ratte anti SPOC1 Antikörper rm45 auf humanem Hoden. Die nickelverstärkte Glucoseoxidase-Peroxidase-Methode erzeugte ein schwarzes Reaktionsprodukt. Schnitt a) wurde mit dem rm45 Antikörper inkubiert und zeigte eine schwarze Kernfärbung in den Spermatogonien. Schnitt b) wurde mit einer Isotypenkontrolle (American Antigenix IgG2b) inkubiert und zeigte keine spezifische Färbung. Bei dieser Methode mit Nickelzusatz waren schwächer positive Zellen schwierig von den Hintergrundfärbung abzugrenzen.

a) anti SPOC1

b) IgG Kontrolle

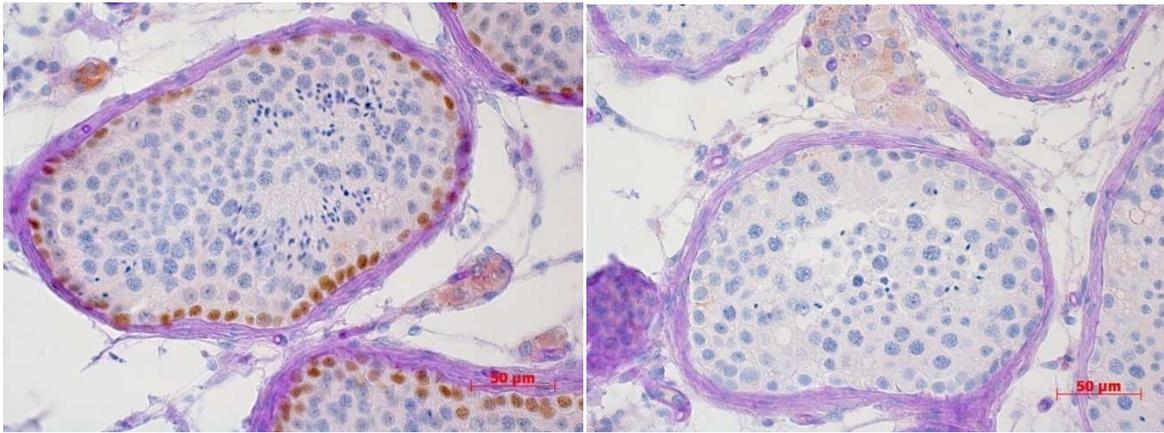


Abbildung 18: a) Immunhistochemischer Nachweis von SPOC1 mit dem Ratte anti SPOC1 Antikörper rm45 auf humanem Hoden. Die Glucoseoxidase-Peroxidase-Methode ohne Nickel erzeugte ein braunes Reaktionsprodukt. Hier wurde zusätzlich mit der PAS-Reaktion und Hämalaun gegengefärbt. Schnitt a) wurde mit dem rm45 Antikörper inkubiert und zeigte eine braune Kernfärbung in den Spermatogonien. Schnitt b) wurde mit einer Isotypenkontrolle (American Antigenix IgG2b) inkubiert und lies keine spezifische Färbung erkennen.

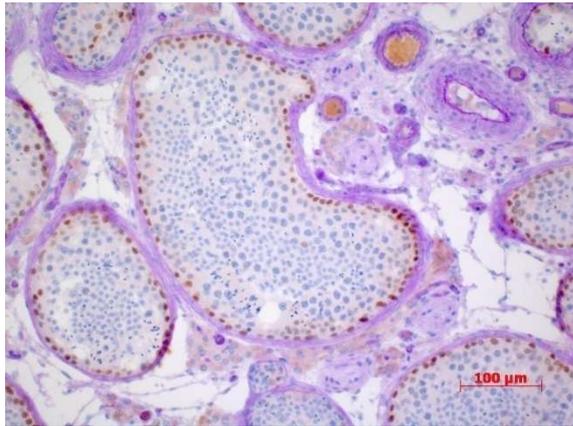
3.3.3 Vergleich der verschiedenen anti-SPOC1 Antikörper und die Expression von SPOC1 im humanen Hoden

Bisher konnte das SPOC1 Protein mit dem Ratte monoklonalen rm45 Antikörper im humanen Hoden nachgewiesen werden, und zwar in basalen Zellen an der Lamina propria, welche vermutlich Spermatogonien darstellen. Jetzt sollte getestet werden, ob auch weitere anti-SPOC1 Antikörper das SPOC1 Protein im Hoden detektieren und eine ähnliche Färbung im Hoden zeigen wie der Ratte anti-SPOC1 rm45 Antikörper. Dies sollte unter anderem auch als Kontrolle für die Spezifität der Färbung dienen. Getestet wurden zwei weitere monoklonale Ratte anti-SPOC1 Antikörper, deren Epitop im C-terminus von SPOC1 liegt, während das Epitop des rm45 Antikörpers im N-terminus von SPOC1 lokalisiert ist. Des Weiteren wurde ein Kaninchen anti-SPOC1 Antikörper getestet.

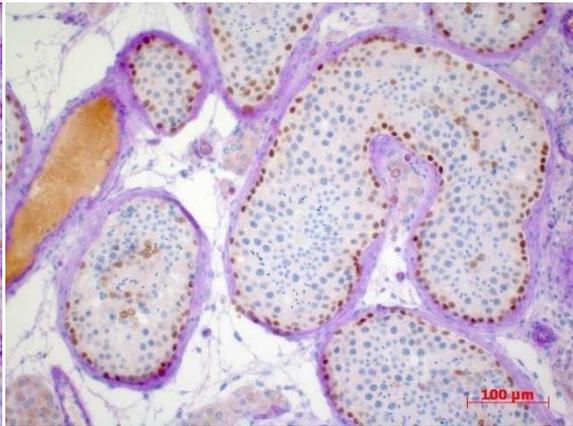
Um die Expression des SPOC1-Proteins im humanen Hoden mit weiteren monoklonalen Antikörpern zu untersuchen, wurden mit modifizierter Davidsonscher Lösung fixierte, 5 µm dicke Paraffinschnitte einer normalen Hodenbiopsie mit den monoklonalen anti-SPOC1-Rattenantikörpern rm11, rm33 und rm45 gefärbt. Die Antikörper wurden 1:10 in TBS verdünnt. Die gebundenen Antikörper wurden mit der Glucoseoxidase verstärkten Peroxidase-Reaktion detektiert (braunes Reaktionsprodukt). Außerdem wurde mit der PAS-Reaktion und Hämatoxylin gegengefärbt. So stellten sich SPOC1-positive Zellen braun, die Lamina propria der Hodenkanälchen violett und übrige Zellkerne blau dar.

Diese Färbungen zeigten das SPOC1 Protein größtenteils im Zellkern. Die positiven Zellen hatten Kontakt zur violett gefärbten Lamina propria, was nahelegte, dass es sich um Spermatogonien handelt. SPOC1 ließ sich in allen drei Differenzierungsstufen der Spermatogonien, A-pale, A-dark und B nachweisen. Spermatozyten, Spermatoide und Spermatozoen, sowie Sertolizellen weisen keine Braunfärbung auf. Die Leydig-Zellen waren stellenweise leicht braun gefärbt, allerdings trat diese Färbung auch in der Isotypenkontrolle auf. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um eine unspezifische Bindung. Die drei eingesetzten Antikörper rm11, rm33 und rm45 ergaben das gleiche Bild (Abbildung 19 und Abbildung 20).

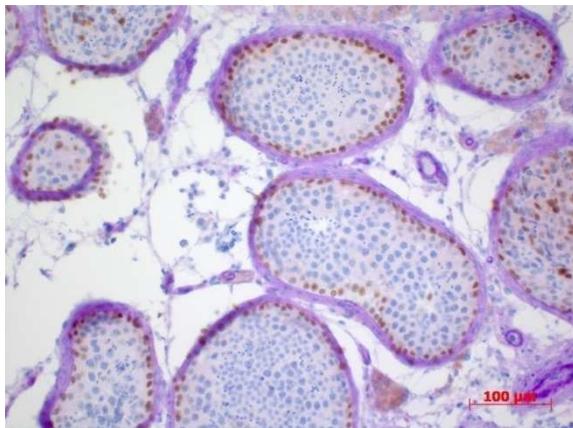
a) anti-SPOC1 (rm11)



b) anti-SPOC1 (rm33)



c) anti-SPOC1 (rm45)



d) IgG-Kontrolle

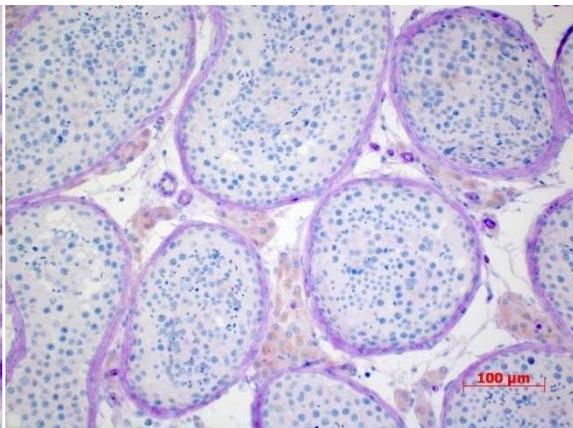
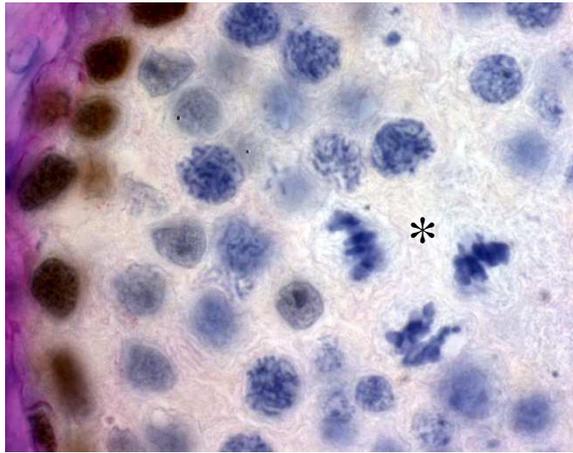
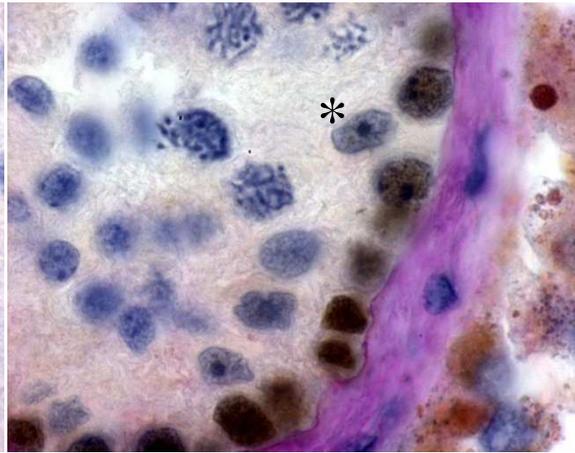


Abbildung 19: Immunhistochemie zum Nachweis von SPOC1 auf Paraffinschnitten vom humanen Hoden mit verschiedenen monoklonalen Rattenantikörpern, Schnitt a) wurde mit rm11 inkubiert, Schnitt b) mit rm33, Schnitt c) mit rm45, und Schnitt d) mit dem Ratten IgG2b Isotypenkontrollantikörper. Die Schnitte wurden mit PAS und Hämalaun gegengefärbt. Die drei eingesetzten Antikörper färbten die gleichen Zellen (Spermatogonien) an, die Isotypenkontrolle färbte diese Zellen nicht.

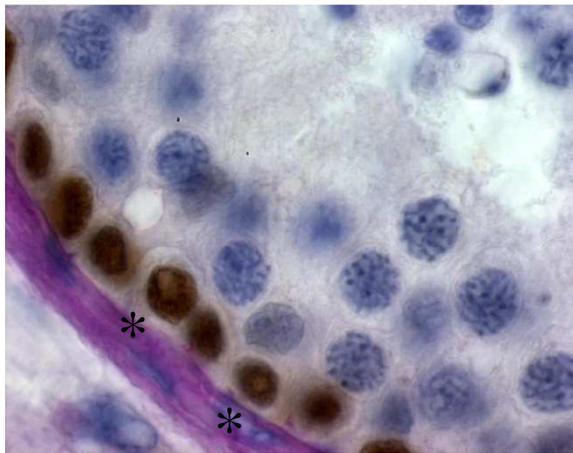
a) anti-SPOC1 (rm11)



b) anti-SPOC1 (rm33)



c) anti-SPOC1 (rm45)



d) IgG-Kontrolle

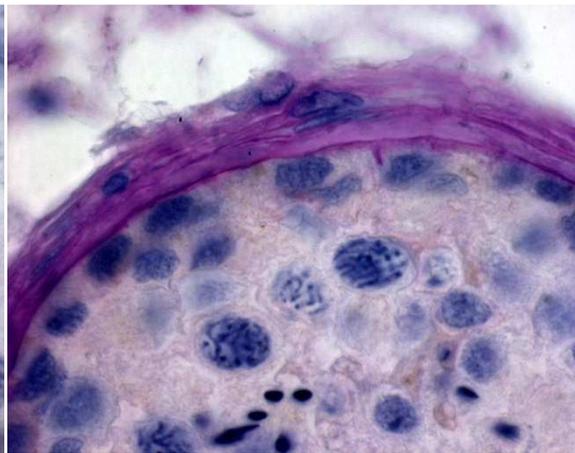


Abbildung 20: Immunhistochemie zum Nachweis von SPOC1 auf Paraffinschnitten von humanem Hoden mit monoklonalen Rattenantikörpern. Detailaufnahmen in 1000x Vergrößerung, Gegenfärbung mit PAS und Hämalaun. Schnitt a) wurde mit rm11 gefärbt, der Antikörper markierte die links im Bild liegenden Spermatogonien. Der Stern markiert drei Spermatocyten, zwei in Metaphase und einen in Anaphase. Schnitt b) wurde mit rm33 gefärbt. Der Stern markiert einen Sertolizellkern, daneben befinden sich zwei schwächer SPOC1 positive A-pale oder B Spermatogonien. Schnitt c) wurde mit rm45 gefärbt, die Sterne markieren 2 A-dark Spermatogonien. Schnitt d) wurde mit dem Ratten IgG2b Isotypenkontrollantikörper gefärbt. Die Isotypenkontrolle färbte keine Zellen an. Auch in der höheren Vergrößerung waren keine Unterschiede zwischen den drei anti-SPOC1-Antikörpern erkennen. In der höheren Vergrößerung können A-dark Spermatogonien anhand der Kernvakuole identifiziert werden.

Im Gegensatz zu den drei monoklonalen Rattenantikörpern färbte der polyklonale Kaninchen anti-SPOC1 Antikörper CR53 Spermatozyten II und Spermatozyten im adluminalen Kompartiment des Hodenkanälchens an (siehe Abbildung 21). Im Maus-Hoden färbt der polyklonale Kaninchen Anti-SPOC1 Antikörper 53 keine Zellen an (Daten nicht gezeigt).

a) anti-SPOC1 (CR53)

b) Präimmunserum

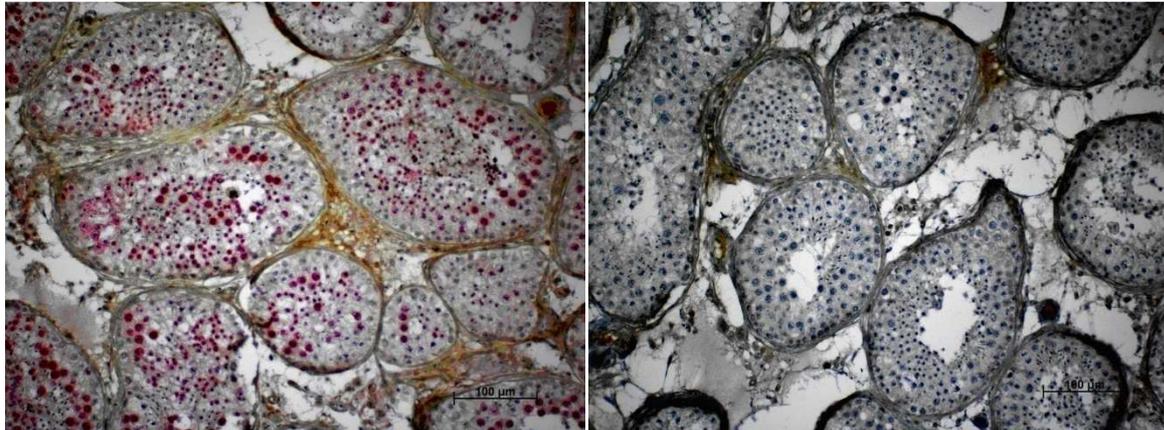


Abbildung 21: Immunhistochemie zum Nachweis von SPOC1 auf Paraffinschnitten vom humanen Hoden mit einem Kaninchenserum. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt. Schnitt a) wurde mit Serum53 gefärbt. Es zeigte sich eine positive Reaktion in Spermatozyten II und Spermatozyten. Schnitt b) wurde mit dem Präimmunserum gefärbt. Das Präimmunserum färbte keine Zellen an.

Zusammengefasst zeigten drei verschiedene monoklonale anti-SPOC1 Antikörper übereinstimmend eine Expression von SPOC1 in Spermatozyten im humanen Hoden. Das Kaninchenserum CR53 zeigte eine abweichende Färbung, vermutlich weil es mit einem anderen Protein kreuzreagiert und wurde daher in dieser Arbeit nicht weiter verwendet.

3.3.4 Die Expression des SPOC1 Proteins im Maushoden

Bisher konnte im humanen Hoden SPOC1 in Zellen detektiert werden, die basierend auf ihrer Morphologie und Lokalisation als Spermatogonien identifiziert wurden. Um festzustellen, in welchen Zellen im Maushoden SPOC1 exprimiert wird, wurden mit Formalin Lösung fixierte, 5 µm dicke Paraffinschnitte des Hodens einer sieben Wochen alten Maus mit den monoklonalen anti-SPOC1-Rattenantikörper rm45 gefärbt. Der Antikörper wurde unverdünnt verwendet. Die gebundenen Antikörper wurden mit der Glucoseoxidase verstärkten Peroxidase-Reaktion detektiert. Außerdem wurde mit der PAS-Reaktion und Hämatoxylin gegengefärbt. So stellten sich SPOC1-positive Zellen braun, die Lamina propria der Hodenkanälchen violett und übrige Zellkerne blau dar. Die SPOC1 positiven Zellen haben Kontakt mit der Basalmembran, was nahelegte, dass SPOC1 auch im Maushoden in Spermatogonien exprimiert wird (Abbildung 22).

a) anti-SPOC1 (Übersicht)

b) anti-SPOC1 (Detail)

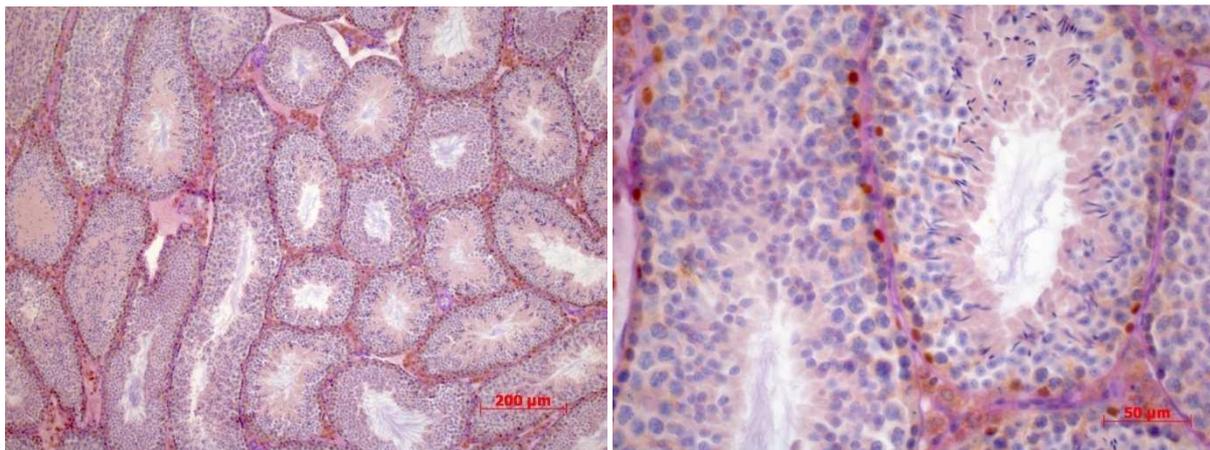


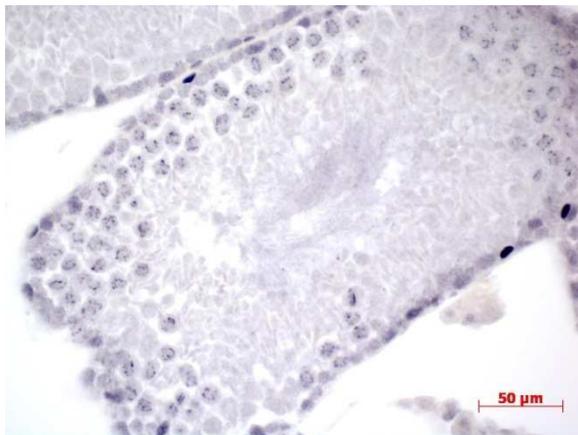
Abbildung 22: Immunhistochemie zum Nachweis von SPOC1 mit dem monoklonalen Rattenantikörper rm45 auf Paraffinschnitten vom Maushoden. Die Schnitte wurden mit PAS und Hämalaun gegengefärbt. In der Übersichtsvergrößerung auf Bild a) ist nur eine diffuse Braunfärbung am Rand der Tubuli zu erkennen. In der höheren Vergrößerung auf Bild b) erkennt man einzelne auf der violett markierten Basalmembran liegende Spermatogonien mit brauner Kernfärbung.

Des Weiteren wurden Formalin-fixierte, 5 µm dicke Paraffinschnitte des Hodens einer sieben Wochen alten Maus mit dem monoklonalen anti-SPOC1-Rattenantikörper rm45, unverdünnt gefärbt und das Signal mit der Peroxidase-Anti-Peroxidase Methode zusätzlich verstärkt. Die SPOC1-positiven Zellen stellten sich schwarz dar (Abbildung 23), weil dem DAB-Entwickler Nickel zugesetzt wurde. Mit dieser Methode sollte die Sensivität erhöht werden um auch geringere Mengen SPOC1 nachweisen zu können.

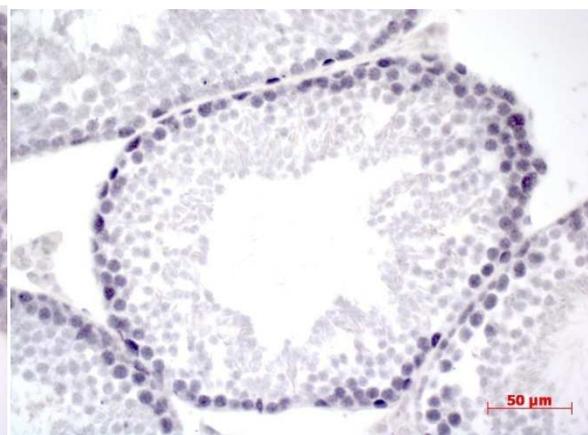
Tatsächlich färbten sich mit der zusätzlichen Peroxidase-Anti-Peroxidase Verstärkung zusätzlich zu den Spermatogonien auch Spermatocyten an. Während mit der vorher verwendeten Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode nur Spermatogonien angefärbt wurden. Einige Spermatocytenkerne wurden komplett angefärbt, in einigen färbten sich chromosomale Strukturen an, andere wurden nur schwach oder gar nicht angefärbt (Abbildung 24).

Diese Daten suggerierten eine starke Expression des SPOC1 Proteins in Spermatogonien und eine schwache Expression, die nur nach Verstärkung der Signale sichtbar wurde, in Spermatocyten.

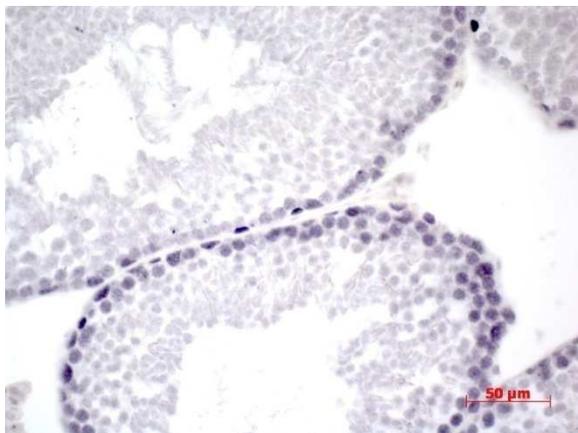
a) anti-SPOC1



b) anti-SPOC1



c) anti-SPOC1



d) Kontroll IgG

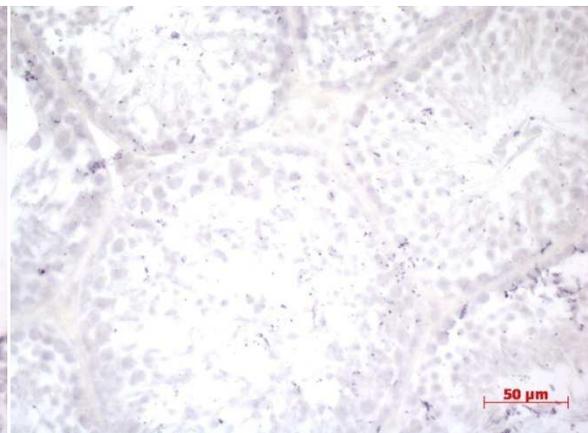


Abbildung 23: Immunhistochemie zum Nachweis von SPOC1 mit dem monoklonalen Rattenantikörper rm45 und der Peroxidase-Anti-Peroxidase Verstärkung mit Nickel-DAB Entwickler auf Paraffinschnitten vom Maushoden. Bild a) zeigt eine positive Reaktion in Spermatogonien und punktförmige Strukturen in Spermatocyten. In Bild b) und c) sind positive Reaktionen in Spermatogonien und Spermatocyten zu sehen. Bild d) zeigt eine Isotypenkontrolle mit einem Ratten IgG2b Antikörper, es ist keine Reaktion festzustellen.

a) anti-SPOC1



b) anti-SPOC1



c) anti-SPOC1



d) anti-SPOC1



Abbildung 24: Immunhistochemie zum Nachweis von SPOC1 mit dem monoklonalen Rattenantikörper rm45 und der Peroxidase-Anti-Peroxidase Verstärkung mit Nickel-DAB Entwickler auf Paraffinschnitten vom Maushoden. In den Bildern a) bis c) sind neben den stark und homogen gefärbten Spermatogonien auch punktförmige Strukturen in Spermatocyten zu erkennen. Auf Bild d) ist eine starke Reaktion in Spermatogonien und eine schwächere, aber in Gegensatz zu den Bildern a) bis c) homogene Reaktion in Spermatocyten zu erkennen.

3.3.5 Die Expression von SPOC1 in anderen Mausgeweben

Um festzustellen, in welchen anderen Geweben der Maus SPOC1 exprimiert wird, wurden mit Formalin Lösung fixierte, 5 µm dicke Paraffinschnitte von Milz, Ovar und Darm einer sieben Wochen alten Maus mit dem monoklonalen Anti-SPOC1-Rattenantikörper M45 gefärbt. In keinem der drei Gewebe ließ sich SPOC1 Protein immunhistochemisch nachweisen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Expression von SPOC1 am stärksten im Hoden ist und dass in anderen Geweben nur eine schwache Proteinexpression stattfindet. Dies wäre im Einklang mit vorherigen Daten, die gezeigt haben, dass die RNA Expression von SPOC1 im Hoden am höchsten ist (Mohrmann, 2005).

3.4 Immunfluoreszenzdoppelfärbungen am Maushoden

Bisher wurden die SPOC1 positiven Zellen im Hoden von Mensch und Maus anhand ihrer Morphologie und Lokalisation als Spermatogonien identifiziert. Ziel war es nun, die SPOC1 exprimierenden Zellen im Maushoden eindeutig zu bestimmen. Hierzu wurden Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen von SPOC1 und bekannten Markerproteinen durchgeführt.

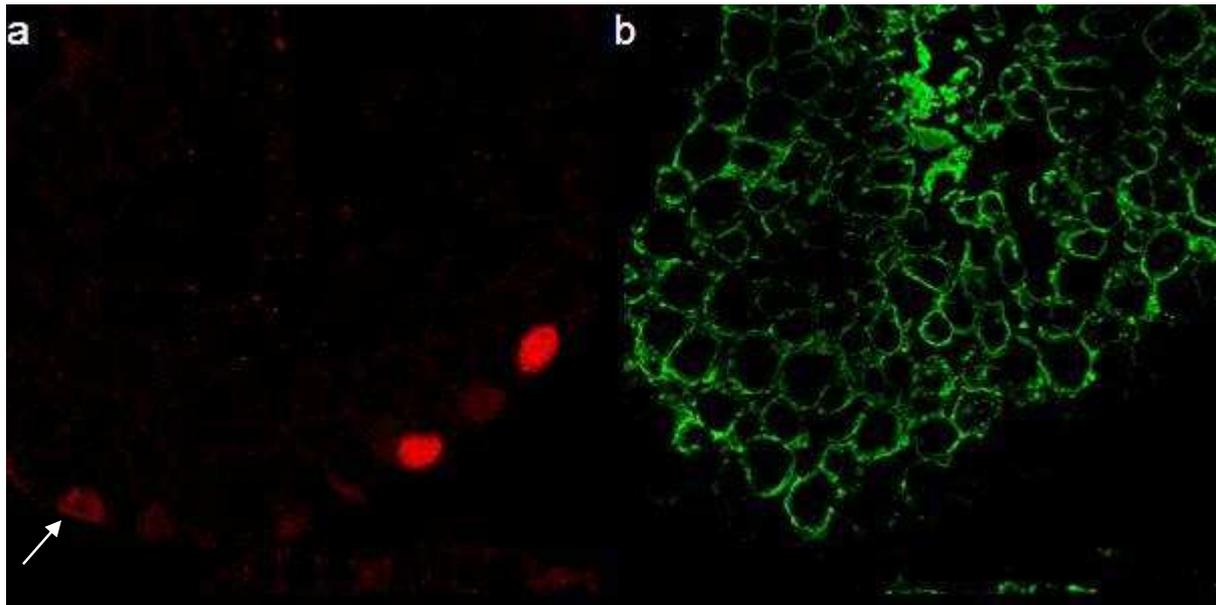
Zunächst wurde die Verteilung von SPOC1 im Verhältnis zu Bindungsstellen für GSA-II-Lektin anhand von Kofärbungen untersucht. Das GSA-II-Lektin bindet, wie von Akama und Kollegen (Akama, 2002) beschrieben, an die Zellmembran von Zellen, die auf der luminalen Seite der Blut-Hoden-Schranke liegen, also an alle spermatogenen Keimzellen außer Spermatogonien. Es bindet auch nicht an somatische Sertolizellen.

Für die Immunfluoreszenz Doppelfärbungen wurden Formalin-fixierte, 5 µm dicke Paraffinschnitte des Hodens einer sieben Wochen alten Maus mit dem monoklonalen anti-SPOC1-Rattenantikörper rm45 inkubiert. Die gebundenen Antikörper wurden mit einem AlexaFluor555 (rot) markierten Ziegen-anti-Ratten-Antikörper sichtbar gemacht. Die Zellkerne wurden mit DraQ5 sichtbar gemacht und das Signal in blau dargestellt. Das biotinylierte GSA-II-Lektin mit einem Streptavidin-AlexaFluor488 (grün) Konjugat dargestellt.

Die SPOC1 positiven Zellen zeigen in der Immunfluoreszenz das gleiche Verteilungsmuster wie mit der immunhistochemischen Färbung (Abbildung 22). Keine SPOC1-positive Zelle ließ sich mit GSA-II Lektin anfärben (Abbildung 25). Das heißt, dass SPOC1 nur in Spermatogonien und eventuell Sertolizellen exprimiert wird.

SPOC1

GSA-II



Überlagerung SPOC1 + GSAII

Überlagerung SPOC1 + GSAII + DNA

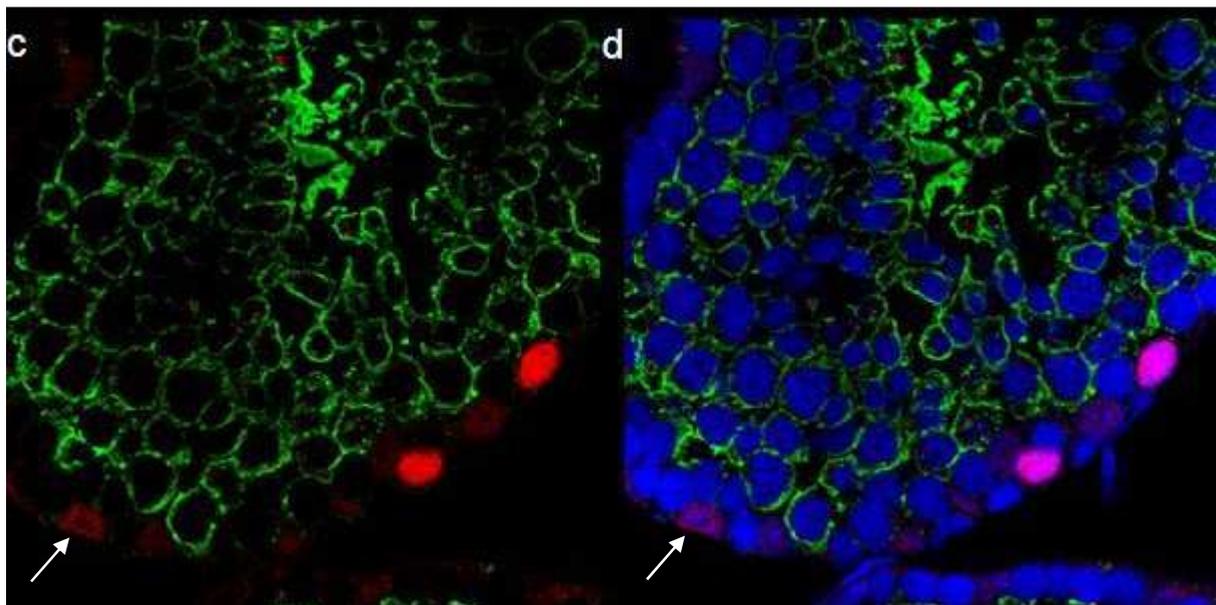
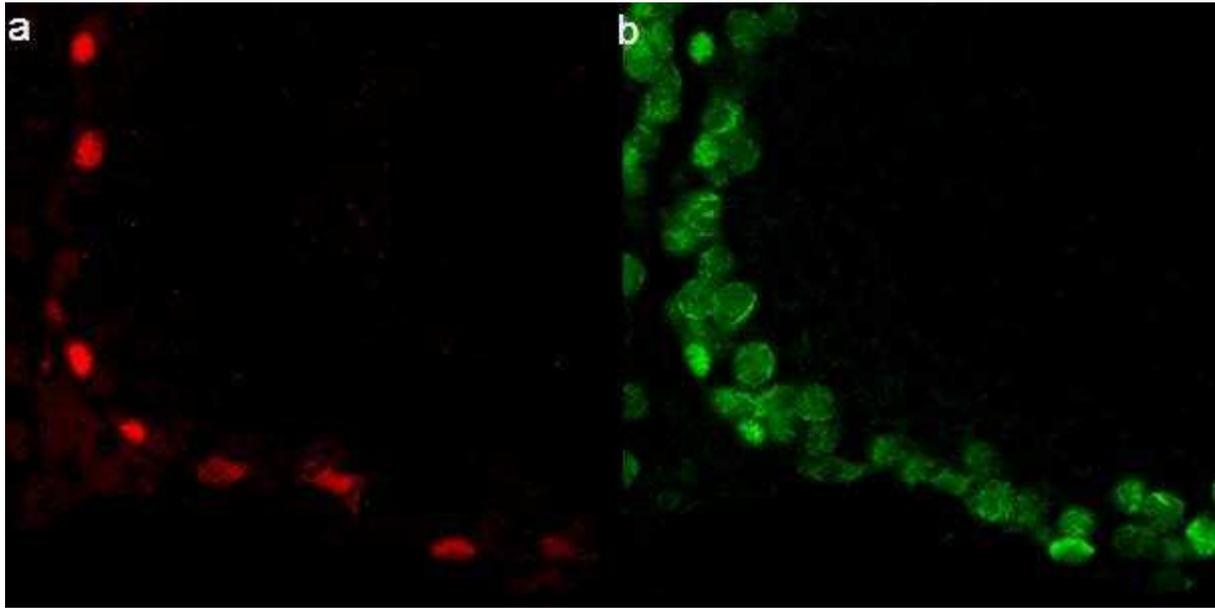


Abbildung 25: Immunfluoreszenzfärbung eines Maushodenparaffinschnitts, a) SPOC1 ist rot markiert, b) Bindungsstellen für GSA-II-Lektin sind grün markiert, c) Überlagerung von SPOC1 und GSA-II-Lektin Färbung, d) Überlagerung von SPOC1 und GSA-II-Lektin sowie DNA-Färbung mit DraQ5 in blau. Das GSA-II-Lektin bindet an die Zellmembran von Keimzellen, die auf der luminalen Seite der Blut-Hoden-Schranke liegen. Keine SPOC1 positive Zelle ist mit GSA-II-Lektin angefärbt. Der Pfeil markiert eine randständige, schwach SPOC1 positive Zelle mit deutlichen, zentralem Nucleolus, bei der es sich um eine Sertolizelle handeln könnte.

Bei den Spermatogonien handelt es sich um die proliferierende Zellpopulation des Hodens, bestehend aus Stamm- und Vorläuferzellen, die die große Anzahl an Zellen für die kontinuierliche Produktion von Spermien generieren. PCNA ist ein Marker, der in allen proliferierenden Zellen aber auch in meiotischen Spermatocyten während der Rekombination exprimiert wird. Um die Coexpression von PCNA und SPOC1 zu untersuchen, wurde der Maus-anti-PCNA-Antikörper mit einem AlexaFluor488 (grün) konjugierten Ziegen-anti-Maus-Antikörper sichtbar gemacht. Jede SPOC1-positive Zelle war ebenfalls positiv für PCNA (Abbildung 26). Bei den PCNA-positiven Zellen handelt es sich, wie von Wrobel und Kollegen (Wrobel, 1996) sowie Kamel und Kollegen (Kamel, 1997) beschrieben, um Spermatogonien und Spermatozyten I. Es wurden auch PCNA-positive Zellen beobachtet, die SPOC1 negativ waren. Bei diesen Zellen dürfte es sich ihrer Größe nach um die Spermatozyten I handeln.

SPOC1

PCNA



Überlagerung SPOC1 + PCNA

Überlagerung SPOC1 + PCNA + DNA

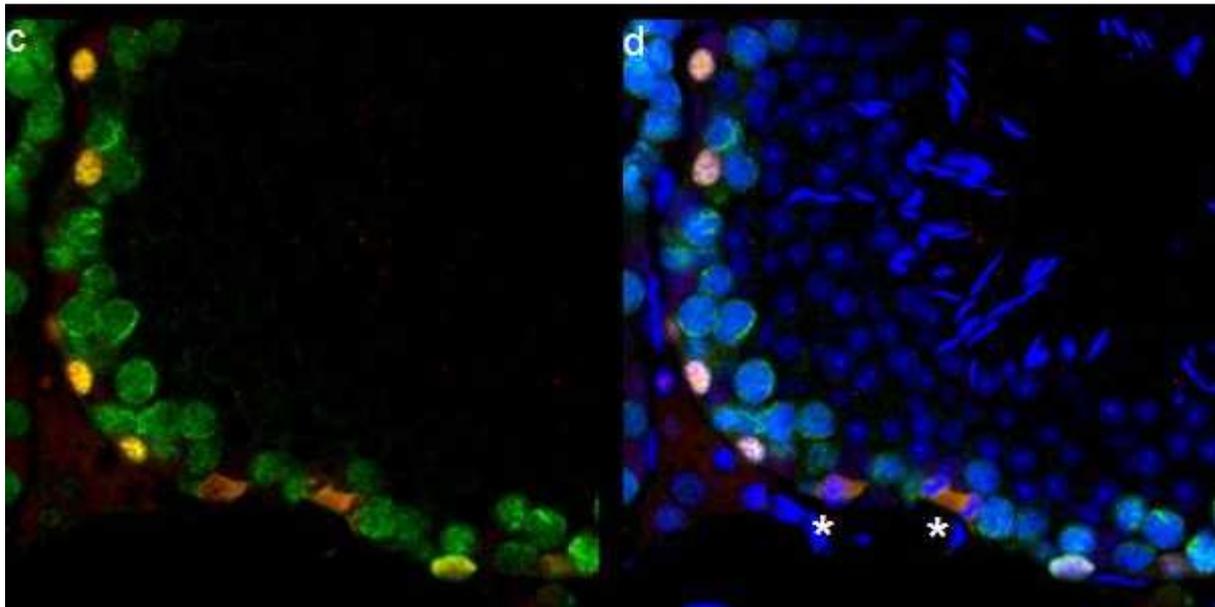


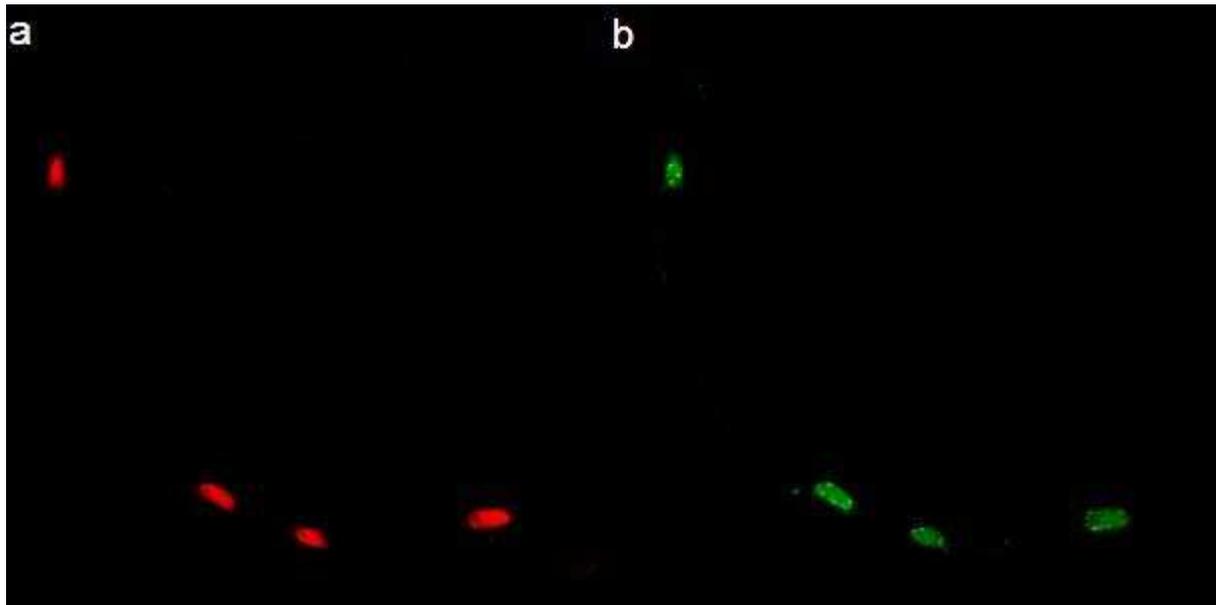
Abbildung 26: Immunfluoreszenzfärbung eines Maushodenparaffinschnitts, a) SPOC1 ist rot markiert, b) PCNA ist grün markiert, c) Überlagerung von SPOC1 und PCNA Färbung, d) Überlagerung von SPOC1 und PCNA sowie DNA-Färbung mit DraQ5 in blau. Alle SPOC1 positiven Zellen sind auch PCNA positiv. Die größeren SPOC1 negativen, PCNA positiven Zellen sind ihrer Größe und der Position im Keimepithel nach Spermatocyten I. Die Sterne markieren eine Zelle in der Metaphase und zwei Zellen in der späten Anaphase. SPOC1 und PCNA sind in der Metaphase und Anaphase im Zytoplasma lokalisiert.

Alle bisherigen Ergebnisse zeigen eine Expression von SPOC1 in Spermatogonien. Um genauer zu bestimmen, ob das SPOC1 Protein in allen Arten von Spermatogonien exprimiert wird, wurden weitere Cofärbungen von SPOC1 mit Markern unterschiedlicher Subpopulationen von Spermatogonien durchgeführt.

Um die Coexpression von PLZF und SPOC1 zu untersuchen, wurde der Maus-anti-PLZF-Antikörper mit einem AlexaFluor488 (grün) konjugierten Ziegen-anti-Maus-Antikörper sichtbar gemacht. Einige SPOC1-positive Zellen waren ebenfalls positiv für PLZF. Alle PLZF positiven Zellen waren auch SPOC1 positiv (Abbildung 27). PLZF war im Maushoden nur in den Spermatogonien A-single, A-paired und A-aligned exprimiert (Buaas, 2004), welche die Stammzellen und die weniger differenzierten Vorläuferzellen darstellen. In differenzierten Spermatogonien wurde PLZF nicht mehr exprimiert.

SPOC1

PLZF



Überlagerung SPOC1 + PLZF

Überlagerung SPOC1 + PLZF + DNA

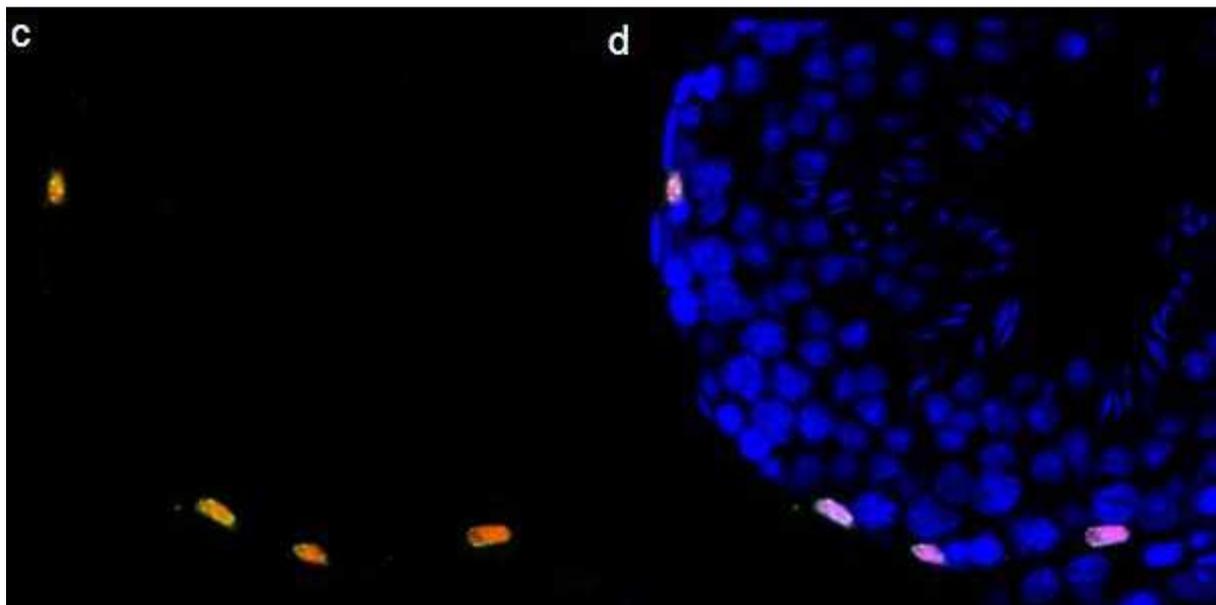


Abbildung 27: Immunfluoreszenzfärbung eines Maushodenparaffinschnitts, a) SPOC1 ist rot markiert, b) PLZF ist grün markiert, c) Überlagerung von SPOC1 und PLZF Färbung, d) Überlagerung von SPOC1 und PLZF sowie DNA-Färbung mit DraQ5 in blau. Es sind vier SPOC1 und PLZF positive Zellen zu sehen. PLZF wird nur in frühen Spermatogonien bis A-aligned exprimiert. Daher handelt es sich bei den vier SPOC1 positiven Zellen um A-single, A-paired oder A-aligned Spermatogonien. Das PLZF-Signal ist relativ homogen über den gesamten Spermatogonienkern verteilt, wobei einige punkt- bis strichförmige Areale in der Nähe der Kernmembran stärker markiert sind.

SOHLH1 ist im Maushoden in A-aligned bis B-Spermatogonien exprimiert (Ballow, 2006). SOHLH1 ist also ein Marker für differenzierte Spermatogonien. Um die Coexpression von SOHLH1 und SPOC1 zu untersuchen, wurde der Kaninchen-anti- SOHLH1-Antikörper mit einem AlexaFlour488 (grün) konjugierten Ziegen-anti-Maus-Antikörper sichtbar gemacht. Nahezu alle SPOC1-positiven Zellen sind ebenfalls positiv für SOHLH1 (Abbildung 28).

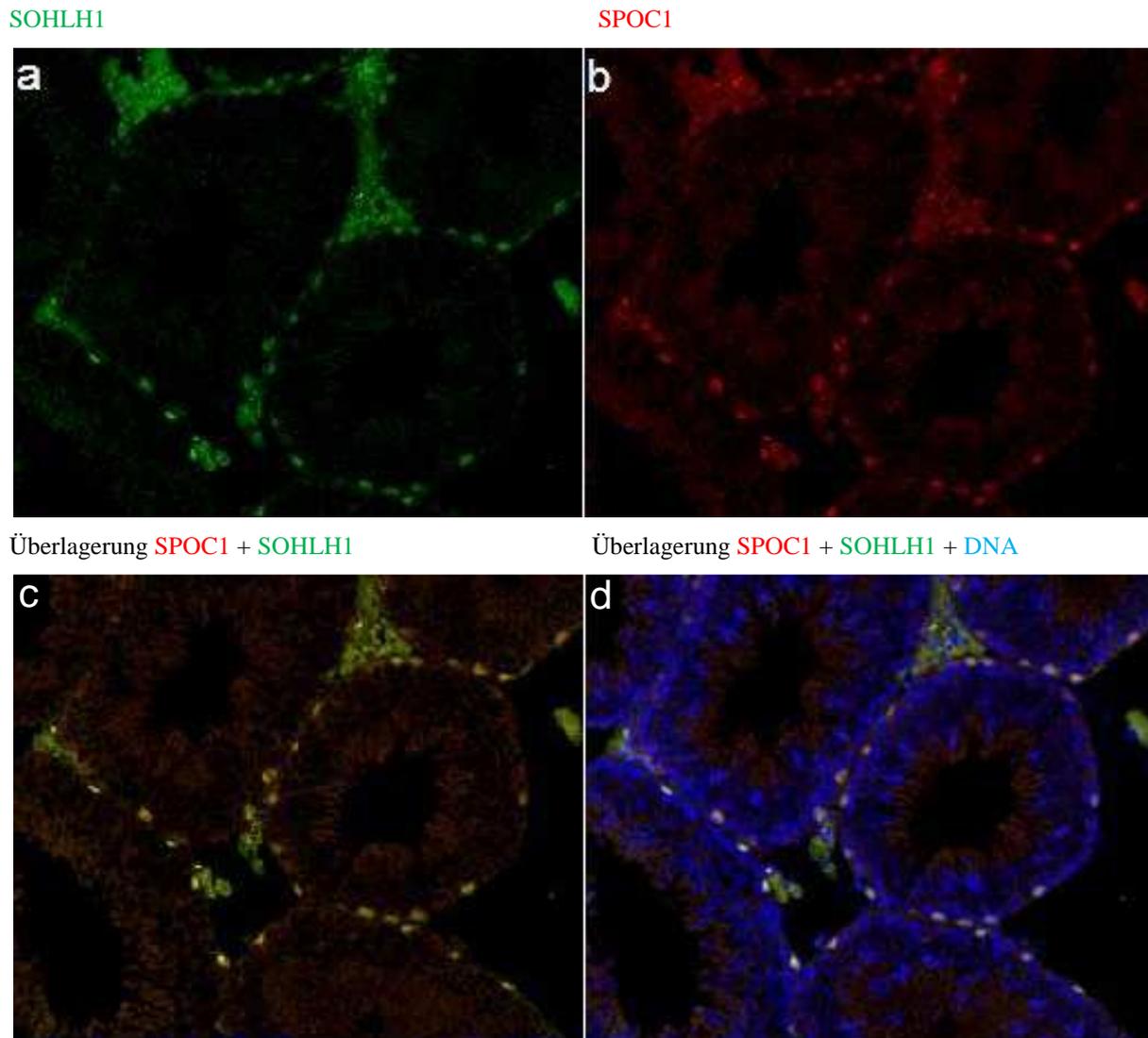


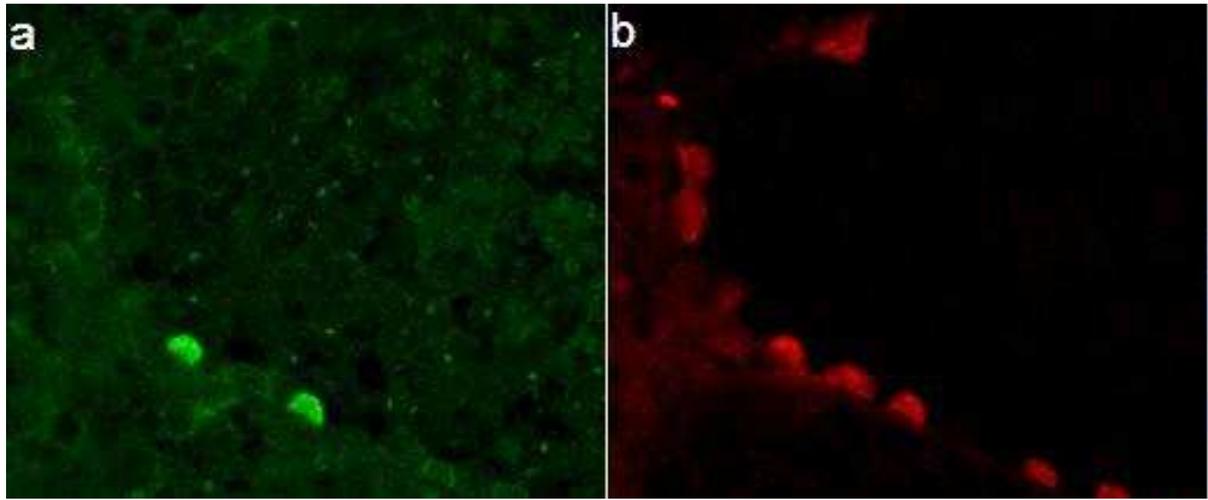
Abbildung 28: Immunfluoreszenzfärbung eines Maushodenparaffinschnitts, a) SOHLH1 ist grün markiert, b) SPOC1 ist rot markiert, c) Überlagerung von SPOC1 und SOHLH1 Färbung, d) Überlagerung von SPOC1 und SOHLH1 sowie DNA-Färbung mit DraQ5 in blau. Nahezu alle SPOC1-positiven Zellen sind ebenfalls positiv für SOHLH1. SOHLH1 wird in A-aligned bis B-Spermatogonien exprimiert. Die SPOC1 und SOHLH1 positiven Zellen sind somit A-aligned bis B-Spermatogonien.

Um die Coexpression der beiden Markerproteine PLZF und SOHLH1 zu überprüfen, wurde eine Cofärbung mit diesen beiden Markern durchgeführt. Einige SOHLH1-positive Zellen waren ebenfalls positiv für PLZF. Es gab aber auch Zellen die nur PLZF oder nur SOHLH1 positiv waren (Abbildung 29). Hieraus lässt sich schließen, dass nur PLZF positive Spermatogonien A-single und A-paired Spermatogonien darstellen, PLZF und SOHLH1

positive Spermato gonien A-aligned Spermato gonien darstellen und nur SOHLH1 positive Spermato gonien A1 bis B-Spermato gonien darstellen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Ballow (Ballow, 2006) und Buaas (Buaas, 2004).

PLZF

SOHLH1



Überlagerung PLZF + SOHLH1

Überlagerung PLZF + SOHLH1 + DNA

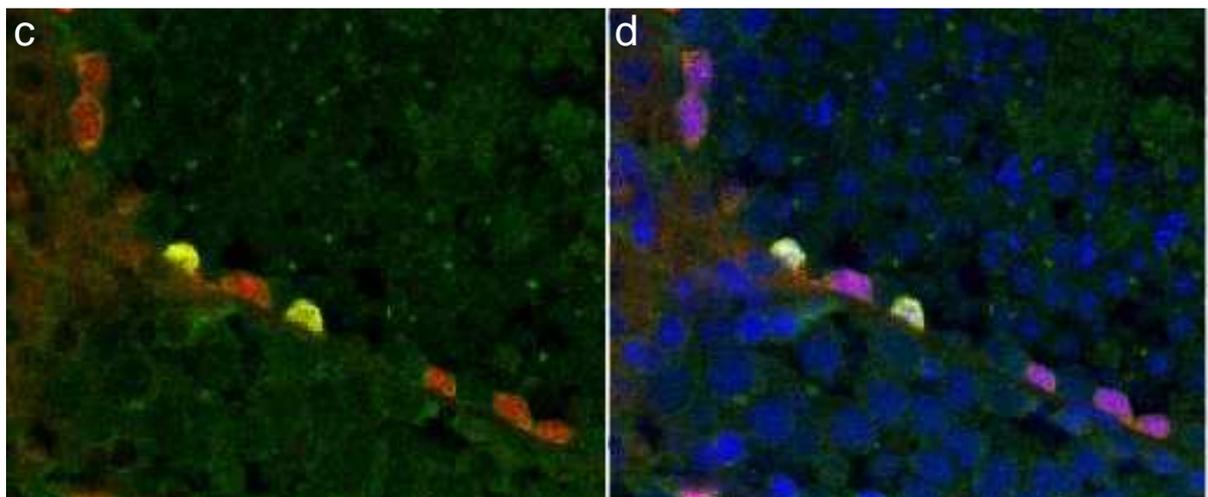
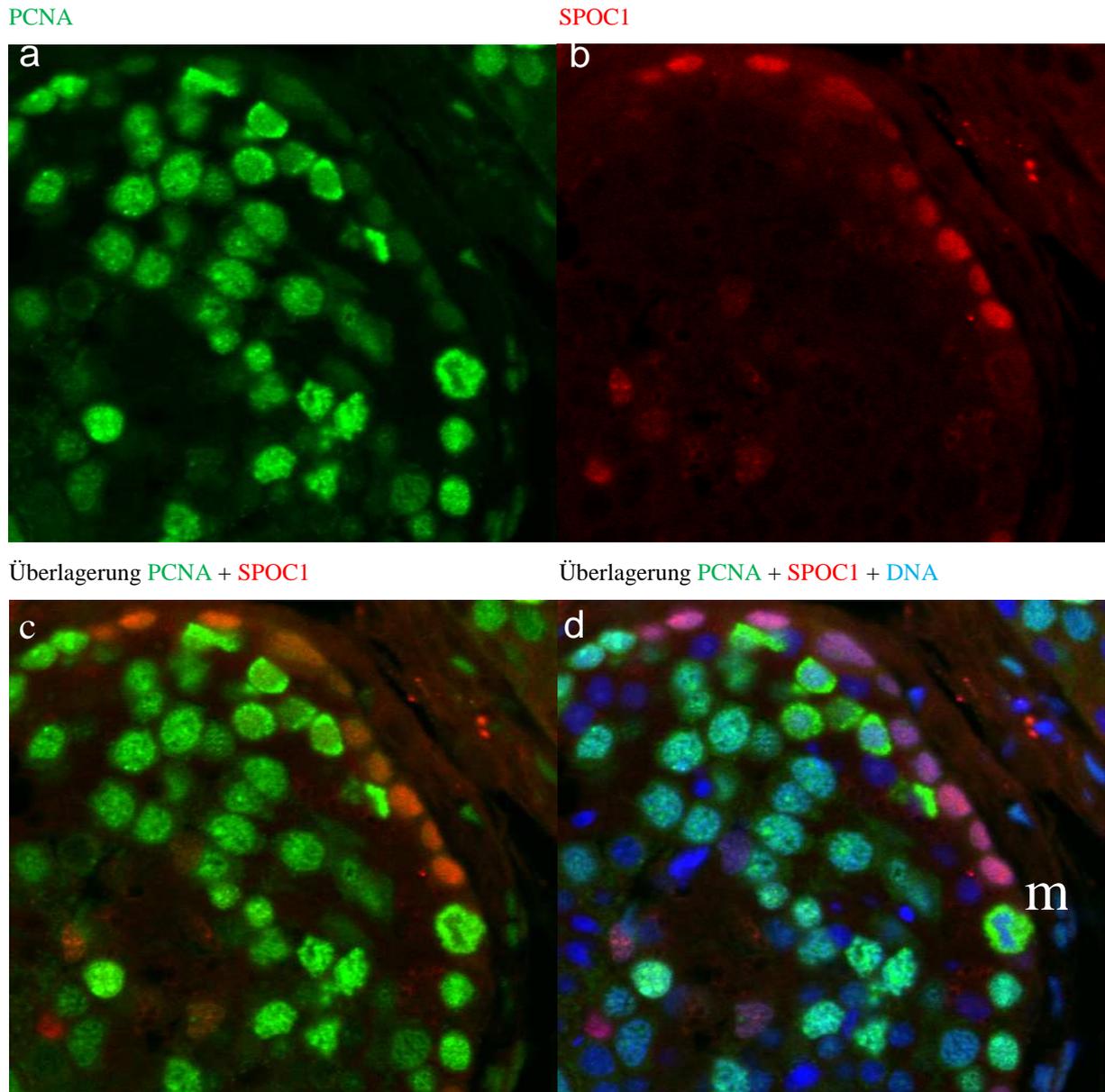


Abbildung 29: Immunfluoreszenzfärbung eines Maushodenparaffinschnitts, a) PLZF ist grün markiert, b) SOHLH1 ist rot markiert, c) Überlagerung von PLZF und SOHLH1 Färbung, d) Überlagerung von SPOC1 und SOHLH1 sowie DNA-Färbung mit DraQ5 in blau. Es sind zwei SOHLH1- und PLZF-positive Zellen sowie einige SOHLH1-positive Zellen zu sehen. Bei den zwei SOHLH1 und PLZF positiven Zellen handelt es sich um A-aligned Spermato gonien. Die übrigen nur SOHLH1 positiven Zellen sind A1- bis B-Spermato gonien.

3.5 Immunfluoreszenzdoppelfärbungen am humanen Hoden

Um die Expression des SPOC1-Proteins und PCNA im humanen Hoden zu untersuchen, wurden mit modifizierter Davidsonscher Lösung fixierte, 5 µm dicke Paraffinschnitte einer normalen Hodenbiopsie mit den monoklonalen anti-SPOC1-Rattenantikörpern rm45 und dem PC10 Antikörper gegen PCNA gefärbt.

Die Spermatogonien waren auch im humanen Hoden SPOC1 positiv, aber nur schwach PCNA positiv. Die Spermatocyten I zeigten wie in der Maus eine starke PCNA-Färbung, aber keine SPOC1-Färbung (Abbildung 30).



Überlagerung PCNA + SPOC1

Überlagerung PCNA + SPOC1 + DNA

Abbildung 30: Immunfluoreszenzdoppelfärbung auf einem Paraffinschnitt von humanen Hoden, a) PCNA ist grün markiert, b) SPOC1 ist rot markiert, c) Überlagerung von SPOC1 und PCNA Färbung, d) Überlagerung von SPOC1 und PCNA sowie DNA-Färbung mit DraQ5 in blau. Die SPOC1 positiven Spermatogonien sind nur schwach PCNA positiv, die Spermatozyten I sind stark positiv für PCNA, aber negativ für SPOC1. „m“ markiert eine Zelle in der Metaphase.

Die anderen, auf dem Maushoden verwendeten, Antikörper gegen die Markerproteine SOHLH1 und PLZF ergaben auf humanem Hoden kein Signal. Bei SOHLH1 war dies bereits explizit im Datenblatt angegeben.

Der Antikörper gegen PLZF sollte laut Datenblatt auf humanem Gewebe funktionieren, dies war aber nicht der Fall.

3.6 Knockdown von SPOC1 im Maushoden

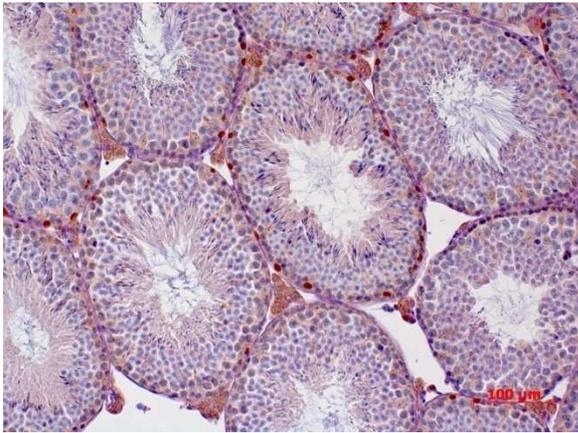
3.6.1 Histologisch sichtbare und in der immunhistochemischen SPOC1 Färbung sichtbare Veränderungen

Es sollte untersucht werden, ob der Knockdown von SPOC1 in Mäusen zu einem Phänotyp führte. Die Gewebe stammten von 4 heterozygoten, männlichen SPOC1-kd-Mäusen. Bei 2 Mäusen wurden ab dem 4. Tag post conceptionem durch Zugabe von 2 Gramm pro Liter Doxycyclin in das Trinkwasser der Mäuse, bzw. pränatal in das Trinkwasser der Mutter, die Transkription der shRNA gegen SPOC1 induziert. Die beiden anderen Mäuse dienten als Kontrolle und erhielten normales Trinkwasser. Die Tiere wurden nach 9 Monaten geopfert. Induzierte SPOC1-kd-Mäuse wiesen kleinere Hoden auf. Die Hoden der nicht induzierten Tiere wogen 154 und 153 mg, die Hoden der induzierten Tiere 82 und 127 mg. Im Westernblot war ein Knockdown von ca. 50 % der SPOC1 Expression zu sehen (Daten von Dr. Hannah Staeger zur Verfügung gestellt).

Zur Beurteilung der Spermatogenese im Zusammenhang mit der Expression von SPOC1 wurden 5µm dicke Paraffinschnitte von den Hoden dieser Mäuse mit dem monoklonalen anti-SPOC1-Rattenantikörper rm45 inkubiert. Die gebundenen Antikörper wurden mit der Glucoseoxidase verstärkten Peroxidase-Reaktion detektiert (braunes Reaktionsprodukt). Um die Spermatogenese beurteilen zu können, wurde mit der PAS-Reaktion und Hämalaun gegengefärbt.

In einer induzierten Maus fielen einige Tubuli seminiferi mit Störungen der Spermatogenese auf. Es fanden sich Tubuli, die nur Sertoli-Zellen enthielten (Abbildung 32), oder aber Tubuli, die nur Spermatozyten und Sertoli-Zellen enthielten (Abbildung 33, Abbildung 34, Abbildung 35), sowie Tubuli, die nur Spermatozyten oder Spermatozyten und Sertoli-Zellen enthielten (Abbildung 36). Zu erkennen sind ebenfalls Tubuli mit SPOC1 positiven Spermatozyten und Spermatozyten I, aber ohne Spermatozyten oder Spermatozoen (Abbildung 38). In der anderen induzierten Maus, sowie in den Kontrollmäusen, wurden solche Tubuli nicht gefunden.

a)



b)

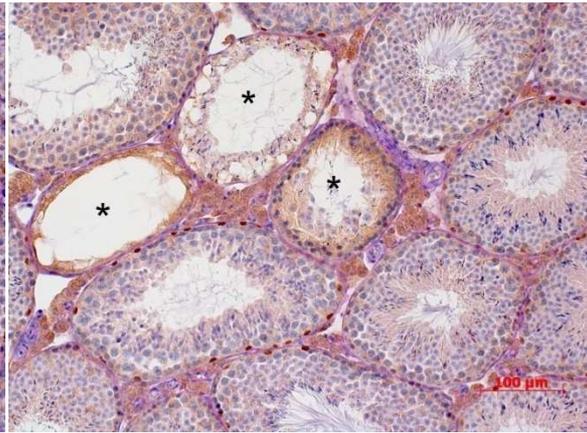
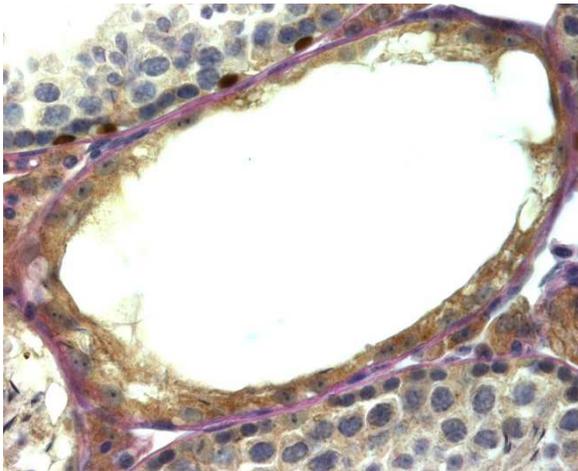


Abbildung 31: Immunhistochemie zum Nachweis von SPOC1 mit dem monoklonalen Rattenantikörper rm45 auf Paraffinschnitten vom Maushoden, Gegenfärbung mit PAS und Hämalaun. Bild a) zeigt eine Übersicht über den Hoden einer Maus mit nicht induzierter anti-SPOC1 shRNA. Die Tubuli sind intakt und enthalten alle Stufen der Spermatogenese. Bild b) zeigt eine Übersicht eines Hoden einer Maus mit induzierter anti-SPOC1 shRNA. Die Sterne markieren drei Tubuli mit reduzierter Spermatogenese.

a)

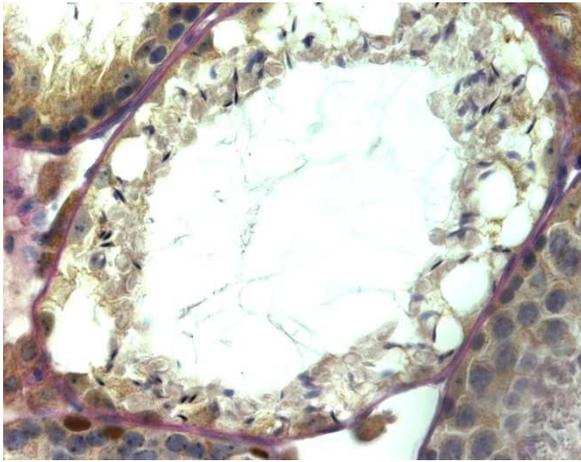


b)



Abbildung 32: Immunhistochemie zum Nachweis von SPOC1 mit dem monoklonalen Rattenantikörper rm45 auf Paraffinschnitten vom Hoden einer Maus mit induzierter anti-SPOC1 shRNA, Gegenfärbung mit PAS und Hämalaun. Bild a) zeigt einen Tubulus mit abgeflachtem Keimepithel, das nur noch Sertolizellen enthält. Im Detail auf Bild b) sind die verbliebenen Zellen anhand ihres zentralen, deutlichen Nucleolus als Sertolizellen zu erkennen (Pfeil).

a)



b)

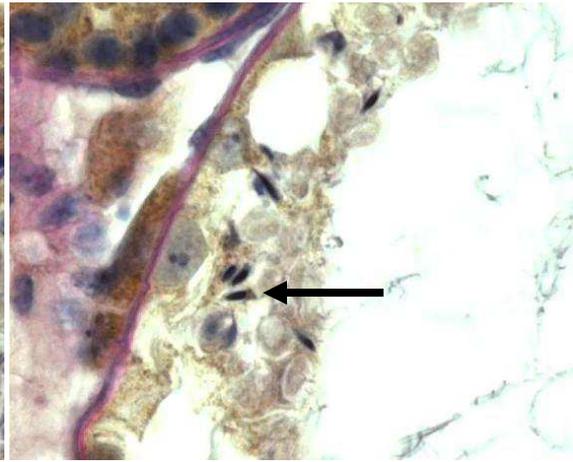
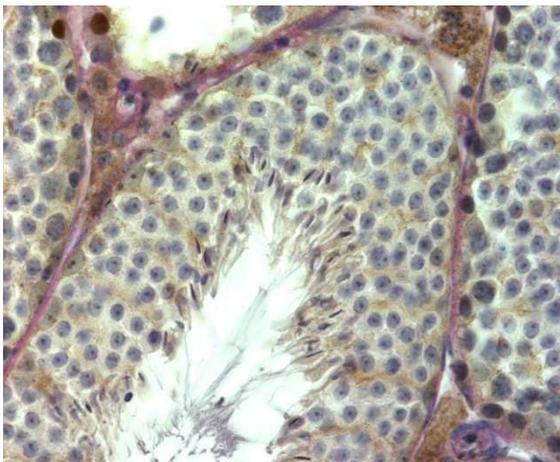


Abbildung 33: Immunhistochemie zum Nachweis von SPOC1 mit dem monoklonalen Rattenantikörper rm45 auf Paraffinschnitten vom Hoden einer Maus mit induzierter anti-SPOC1 shRNA, Gegenfärbung mit PAS und Hämalaun. Bild a) zeigt einen Tubulus mit gestörter Spermatogenese, der neben Sertolizellen einige wenige elongierte Spermatiden enthält. Im Detail auf Bild b) sind drei elongierte Spermatiden mit einem Pfeil markiert.

a)



b)

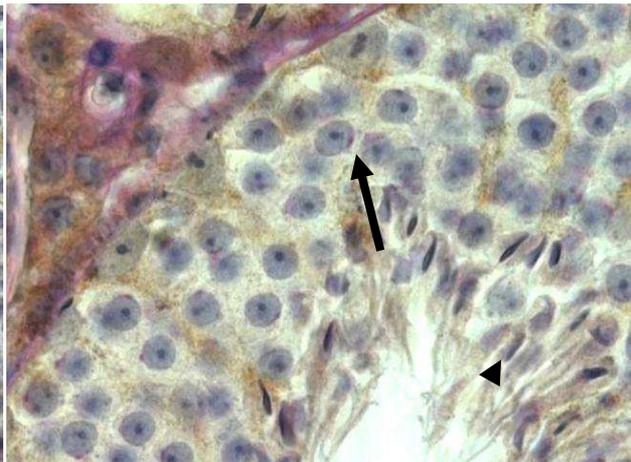
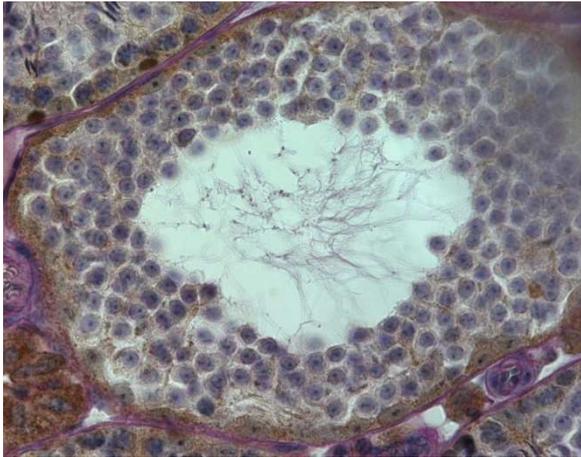


Abbildung 34: Immunhistochemie zum Nachweis von SPOC1 mit dem monoklonalen Rattenantikörper rm45 auf Paraffinschnitten vom Hoden einer Maus mit induzierter anti-SPOC1 shRNA, Gegenfärbung mit PAS und Hämalaun. Bild a) zeigt einen Tubulus mit gestörter Spermatogenese, der runde Spermatide und Spermatozoen enthält. Im Detail auf Bild b) sind runde Spermatiden mit PAS-positiver Akrosomenkappe (Pfeil) und Spermatozoen mit PAS-positivem Akrosom (Pfeilspitze) zu erkennen.

a)



b)

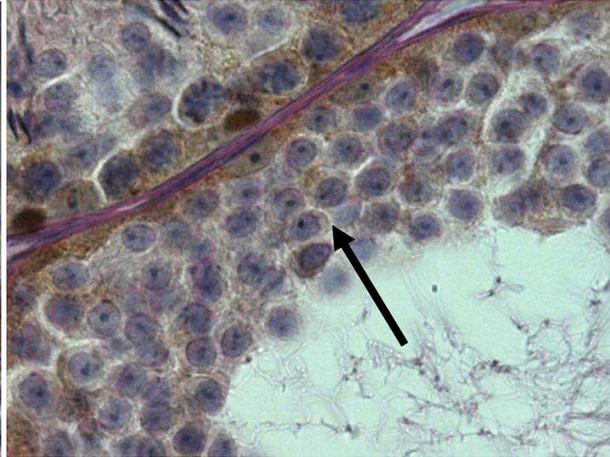
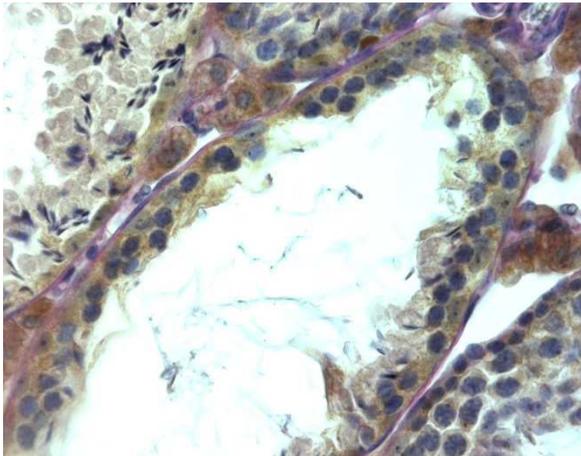


Abbildung 35: Immunhistochemie zum Nachweis von SPOC1 mit dem monoklonalen Rattenantikörper rm45 auf Paraffinschnitten vom Hoden einer Maus mit induzierter anti-SPOC1 shRNA, Gegenfärbung mit PAS und Hämalaun. Bild a) zeigt einen Tubulus mit gestörter Spermatogenese, der nur runde Spermatiden enthält. Im Detail auf Bild b) sind die PAS-positiven Akrosomenkappen der runden Spermatiden zu erkennen (Pfeil).

a)



b)

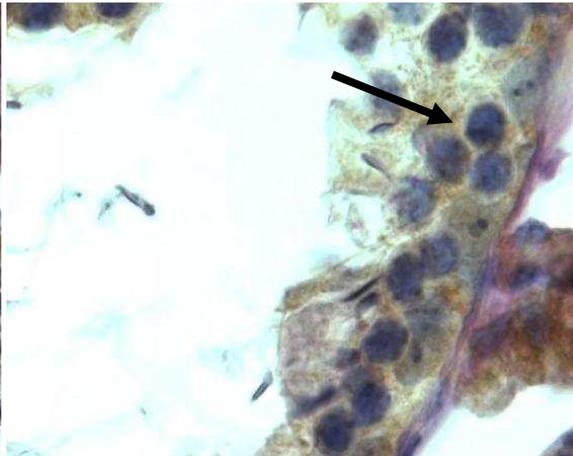
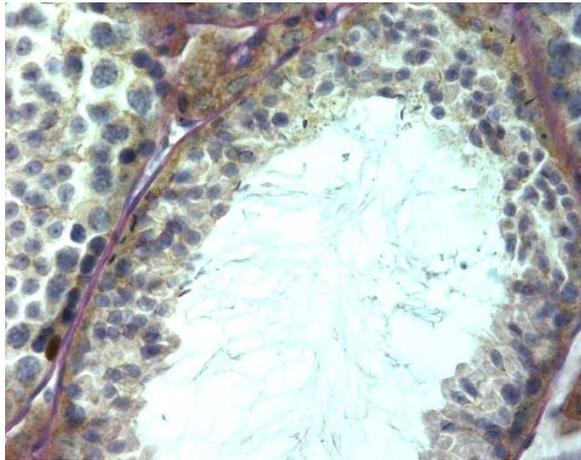


Abbildung 36: Immunhistochemie zum Nachweis von SPOC1 mit dem monoklonalen Rattenantikörper rm45 auf Paraffinschnitten vom Hoden einer Maus mit induzierter anti-SPOC1 shRNA, Gegenfärbung mit PAS und Hämalaun. Bild a) zeigt einen Tubulus mit gestörter Spermatogenese, der hauptsächlich Spermatocyten I und wenigen Spermatozoen enthält. Im Detail auf Bild b) sind drei Spermatocyten mit einem Pfeil markiert. Die Kerne haben keinen Kontakt zur Basalmembran, wie es bei Spermatogonien der Fall wäre.

a)



b)

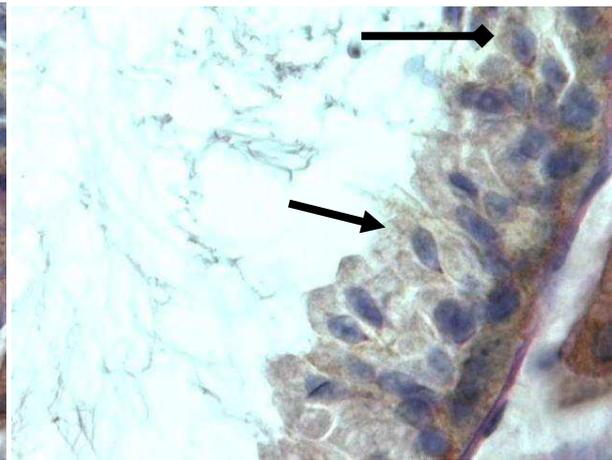
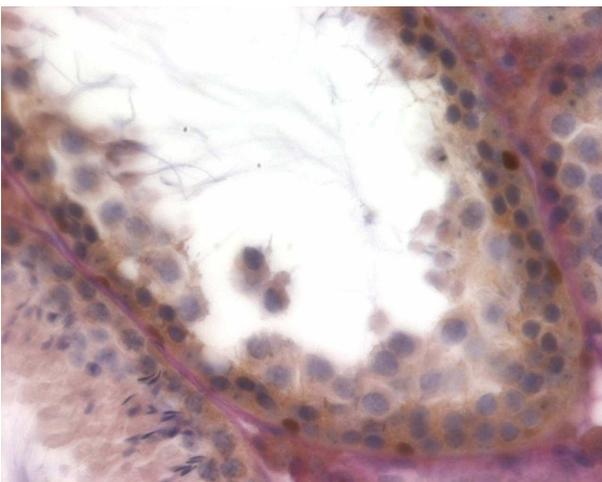


Abbildung 37: Immunhistochemie zum Nachweis von SPOC1 mit dem monoklonalen Rattenantikörper rm45 auf Paraffinschnitten vom Hoden einer Maus mit induzierter anti-SPOC1 shRNA, Gegenfärbung mit PAS und Hämalaun. Bild a) zeigt einen Tubulus mit gestörter Spermatogenese, der runde und elongierte Spermatiden enthält. Im Detail auf Bild b) erkennt man, dass die PAS-positive Akrosomenanlage der elongierte Spermatide zur Basalmembran zeigt (Pfeil). Bei der runden Spermatide liegt die PAS-positive Akrosomenanlage noch vertikal zur Basalmembran (Raute).

a)



b)

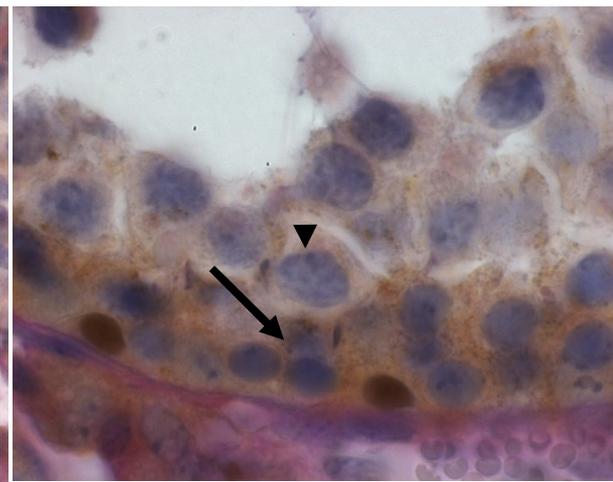


Abbildung 38: Immunhistochemie zum Nachweis von SPOC1 mit dem monoklonalen Rattenantikörper rm45 auf Paraffinschnitten vom Hoden einer Maus mit induzierter anti-SPOC1 shRNA, Gegenfärbung mit PAS und Hämalaun. Bild a) zeigt einen Tubulus mit gestörter Spermatogenese, der Spermatocyten I in unterschiedlichen Stadien enthält. Im Detail auf Bild b) markiert die Pfeilspitze eine große Pachytän-Spermatocyte in der schon stärker kondensierte Chromatinabschnitte zu erkennen sind. Der Pfeil markiert zwei Leptotän-Spermatocyten. Das Chromatin der Leptotän-Spermatocyten erscheint noch gleichmäßig. Spermatiden fehlen in diesem Tubulus, aber SPOC1-positive Spermatogonien sind vorhanden.

3.6.2 Charakterisierung der in Tubuli mit gestörter Spermatogenese verbliebenen Zellen durch Immunfluoreszenzdoppelfärbungen

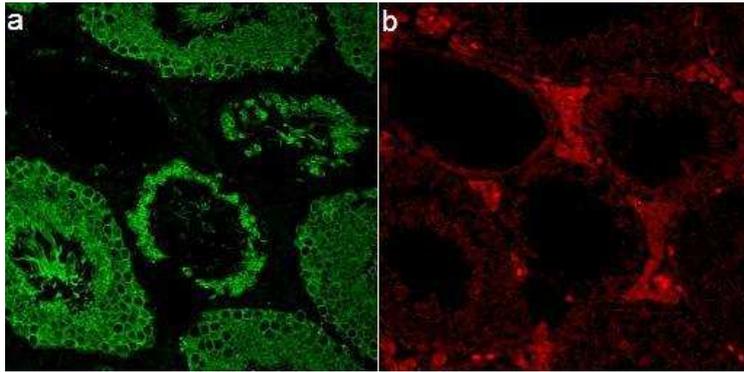
Anhand der vorangegangenen Daten konnte gezeigt werden, dass eine Depletion von SPOC1 zu Defekten in der Spermatogenese führt. Um die in den atrophischen Tubuli verbliebenen Zellen genauer zu charakterisieren, die in den Hoden der induzierten SPOC1-kd-Mäuse beobachtet wurden, wurden weitere Immunfluoreszenzdoppelfärbungen an 5µm dicken Paraffinschnitten der Hoden durchgeführt. Die Paraffinschnitte wurden mit dem monoklonalen anti-SPOC1-Rattenantikörper rm45 und den vorher im Abschnitt „3.4 Immunfluoreszenzdoppelfärbungen am Maushoden“ verwendeten Markern inkubiert.

In der Darstellung des GSA-II-Lektins mit SPOC1 fanden sich einige atrophische Tubuli, die nur GSA-II positive Zellen wie Spermatozyten, Spermatozoen oder Spermatozoen enthielten (Abbildung 40). Es fanden sich ebenfalls in einem Tubulus GSA-II negative und SPOC1 negative Zellen, die der Größe und Kernmorphologie nach frühe Spermatozyten oder späte Spermatozoen sein könnten (Abbildung 39, sc). Diese Daten bestätigen, dass der SPOC1 Knockdown sowohl zum Fehlen von Keimzellen eines frühen (Spermatozoen; GSII negativ), als auch späten Differenzierungsstadiums (Spermatozyten, Spermatozoen, Spermatozoen; GSII positiv) führen. Diese Veränderungen waren in den Kontrollmäusen nicht zu sehen (Abbildung 42).

Die Leydigzellen im intertubulären Bindegewebe zeigen Autofluoreszenz sowohl im roten als auch grünen Spektrum. Yang und Honaramooz führen diese Autofluoreszenz auf das in den Leydigzellen enthaltene Lipofuszin zurück (Yang, 2012).

GSAII

SPOC1



DNA

Überlagerung

Überlagerung

SPOC1 + GSAII + DNA

SPOC1 + GSAII

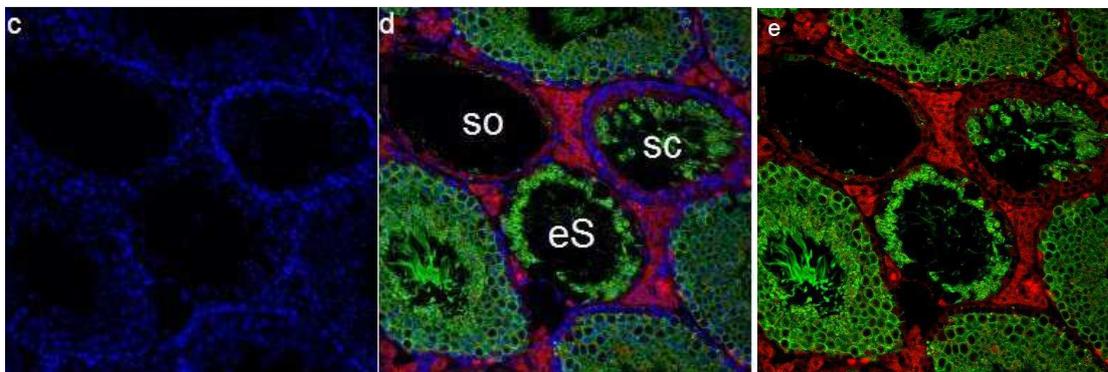
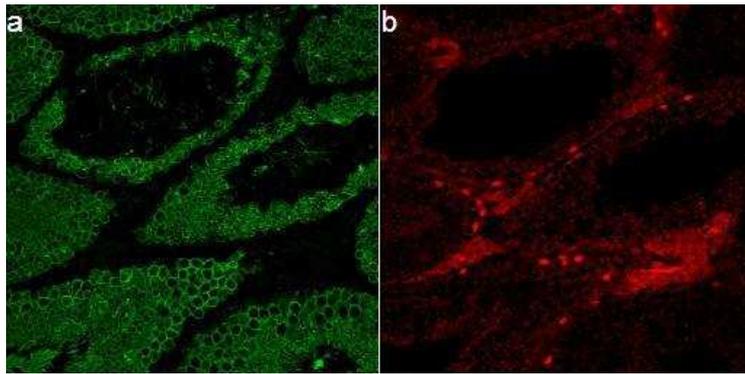


Abbildung 39: Immunfluoreszenzdoppelfärbung des Hodens einer 9 Monate alten Maus mit induzierter shRNA, die zum SPOC1 Knockdown führte. a) Bindungsstellen für GSA-II sind grün markiert, b) SPOC1 ist rot markiert, c) DNA-Färbung mit DraQ5 in blau, d) Überlagerung von GSA-II, SPOC1 und DNA-Färbung, e) Überlagerung von GSA-II und SPOC1. Es sind 3 veränderte Tubuli zu sehen. so: markiert einen Tubulus der nur noch Sertoli-Zellen enthält, sc: markiert einen Tubulus mit späten Spermatogonien oder frühen Spermatocyten, eS: markiert einen Tubulus der nur noch elongierte Spermatiden enthält. Es tritt Autofluoreszenz in den Leydig Zellen im intertubulären Bindegewebe auf.

GSAII

SPOC1



DNA

Überlagerung

Überlagerung

SPOC1 + GSAII + DNA

SPOC1 + GSAII

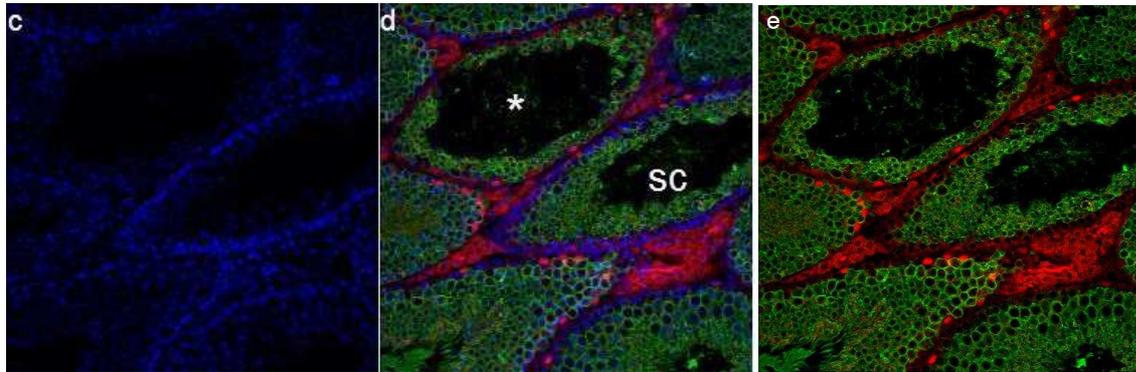


Abbildung 40: Immunfluoreszenzdoppelfärbung des Hodens einer 9 Monate alten Maus mit induzierter shRNA, die zum SPOC1 Knockdown führte. a) Bindungsstellen für GSA-II sind grün markiert, b) SPOC1 ist rot markiert, c) DNA-Färbung mit DraQ5 in blau, d) Überlagerung von GSA-II, SPOC1 und DNA-Färbung, e) Überlagerung von GSA-II und SPOC1. Es tritt Autofluoreszenz in den Leydig Zellen im intertubulären Bindegewebe auf. Es fallen 2 Tubuli mit verminderter Spermatogenese auf. Der Stern markiert einen Tubulus ohne Spermatozyten und wenigen Spermato gonien, sc markiert einen Tubulus der nur Spermatozyten enthält.

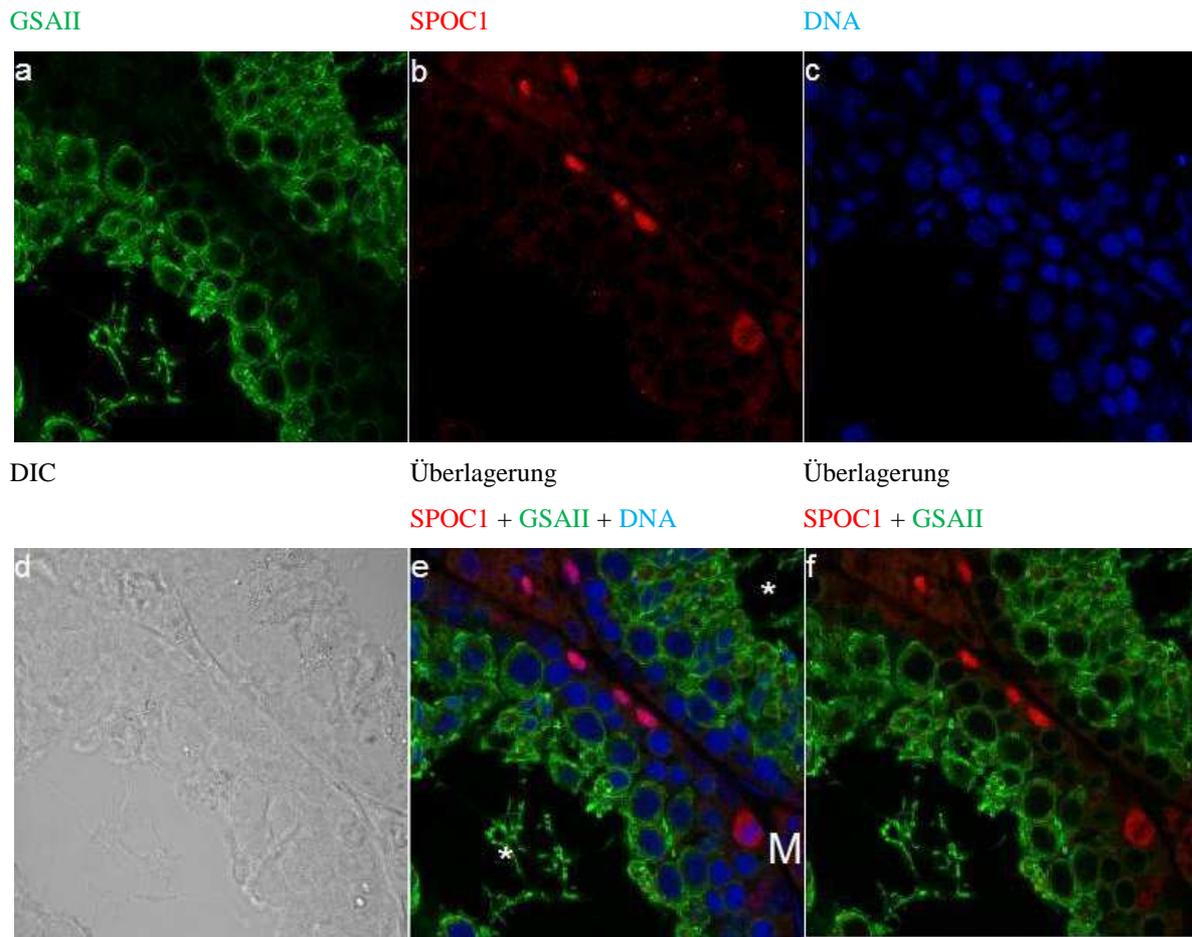


Abbildung 41: Immunfluoreszenzdoppelfärbung des Hodens einer 9 Monate alten Maus mit induzierter shRNA, die zum SPOC1 Knockdown führte. a) Bindungsstellen für GSA-II sind grün markiert, b) SPOC1 ist rot markiert, c) DNA-Färbung mit DraQ5 in blau, d) Differentialinterferenzkontrast (DIC) e) Überlagerung von GSA-II, SPOC1 und DNA-Färbung, f) Überlagerung von GSA-II und SPOC1. Es tritt Autofluoreszenz in den Leydig Zellen im intertubulären Bindegewebe auf. Es sind 2 Tubuli mit Spermatogonien und Spermatozyten, aber mit wenigen Spermatisden zu sehen (Sterne). M markiert eine Spermatogonie in der Metaphase.

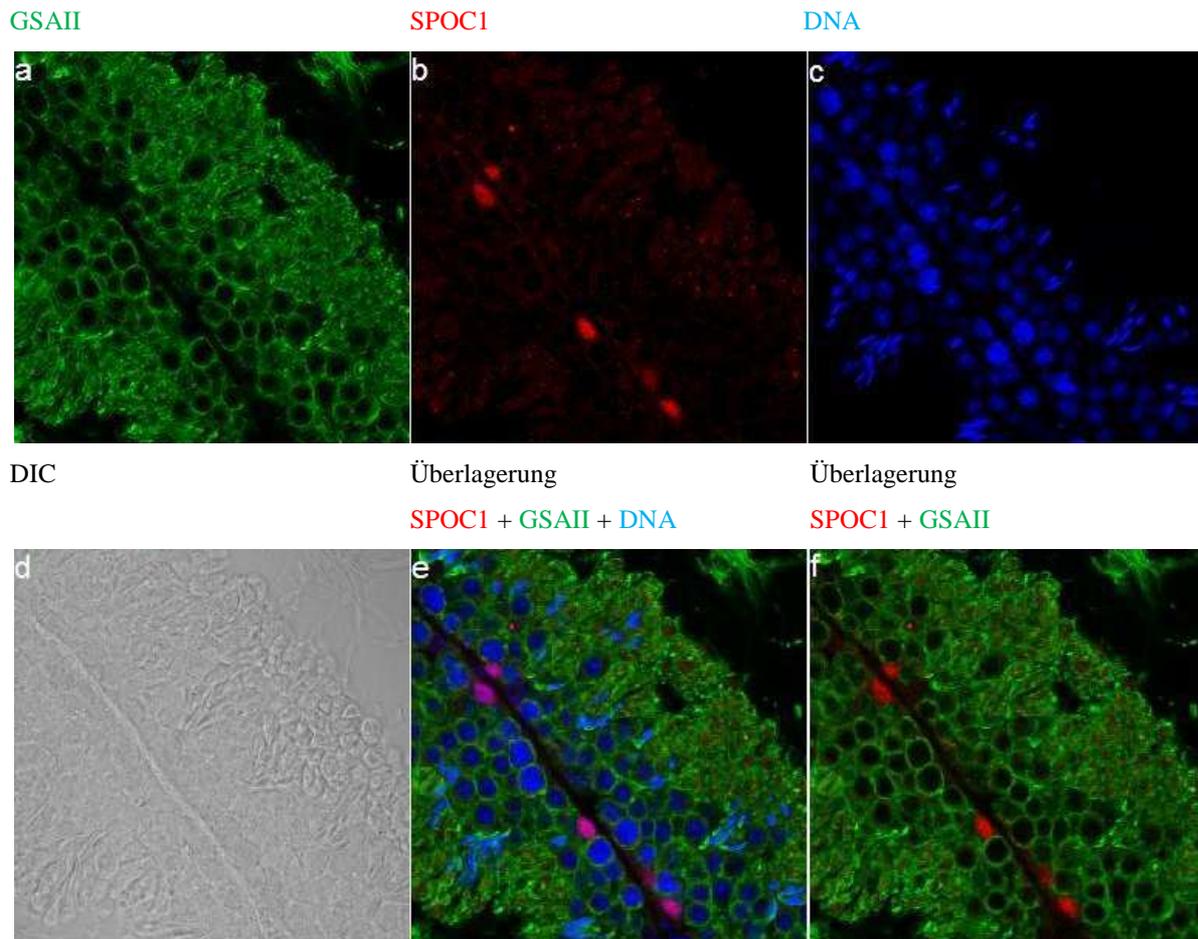


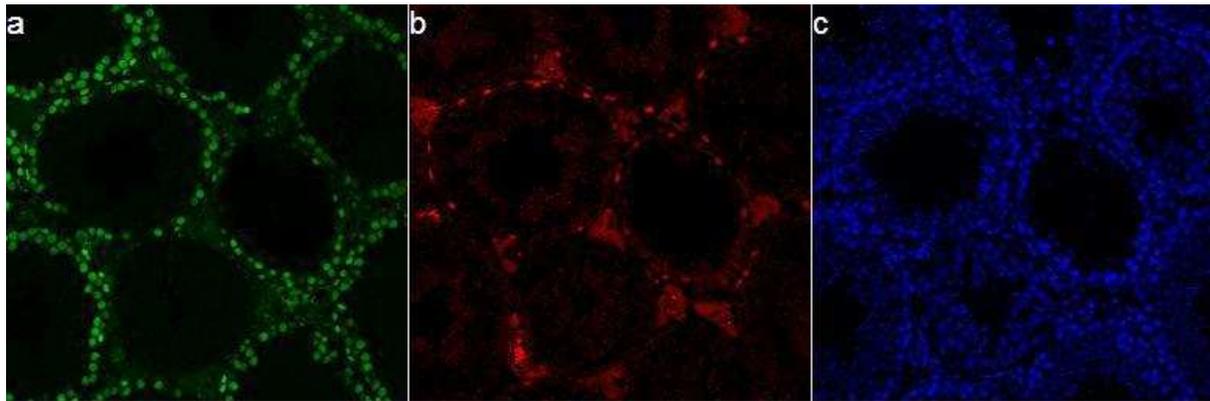
Abbildung 42: Immunfluoreszenzdoppelfärbung des Hodens einer 9 Monate alten Kontrollmaus.
a) Bindungsstellen für GSA-II sind grün markiert, b) SPOC1 ist rot markiert, c) DNA-Färbung mit DraQ5 in blau, d) Differentialinterferenzkontrast (DIC) e) Überlagerung von GSA-II, SPOC1 und DNA-Färbung, f) Überlagerung von GSA-II und SPOC1. Es tritt Autofluoreszenz in den Leydig Zellen im intertubulären Bindegewebe auf. Die beiden angeschnittenen Tubuli enthalten alle Zellen der Spermatogenese von der Spermatogonie bis zum fertigen Spermatozoon.

In der Darstellung von PCNA und SPOC1 in den Hoden einer SPOC-kd-Maus fanden sich ebenfalls veränderte Tubuli. Einige veränderte Tubuli wiesen weder SPOC1 noch PCNA positive Zellen auf (Abbildung 44). Andere zeigten eine verminderte Anzahl an PCNA positiven Zellen mit und ohne Vorhandensein von SPOC1 positiven Zellen (Abbildung 43). Dieser Befund wurde in Kontrollmäusen nicht gesehen (Abbildung 45). Das Fehlen SPOC1 positiver Zellen weist auf das Fehlen von Spermatogonien hin. Die verminderte Anzahl bzw. das Fehlen von PCNA positiven Zellen weist auf das Fehlen von Spermatogonien und/oder Spermatozyten I in den atrophischen Tubuli hin.

PCNA

SPOC1

DNA



Überlagerung

Überlagerung

SPOC1 + PCNA + DNA

SPOC1 + PCNA

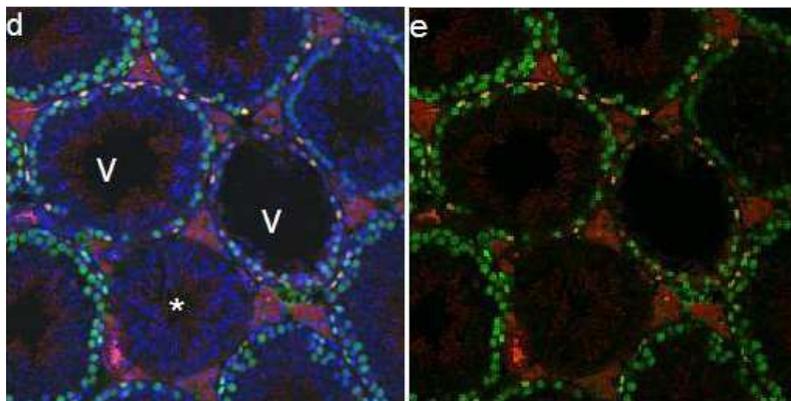
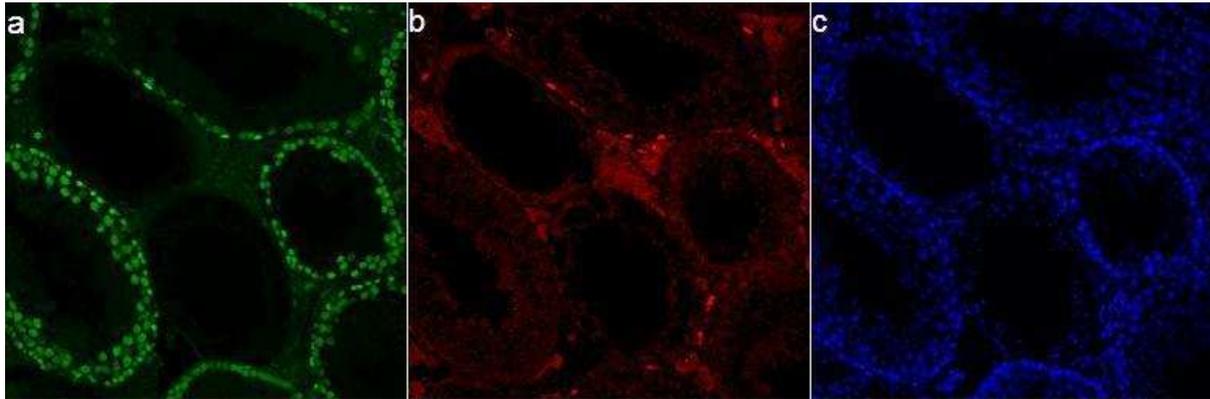


Abbildung 43: Immunfluoreszenzdoppelfärbung des Hodens einer 9 Monate alten Maus mit induzierter shRNA, die zum SPOC1 Knockdown führte. a) PCNA ist grün markiert, b) SPOC1 ist rot markiert, c) DNA-Färbung mit DraQ5 in blau, d) Überlagerung von PCNA, SPOC1 und DNA-Färbung, e) Überlagerung von PCNA und SPOC1. Es tritt Autofluoreszenz in den Leydig Zellen im intertubulären Bindegewebe auf. Es sind drei veränderte Tubuli zu sehen. Die mit v bezeichneten Tubuli zeigen eine verminderte Spermatogenese und eine verminderte Anzahl an SPOC1 sowie PCNA positiven Zellen. Der mit dem Stern bezeichnete Tubulus weist zahlreiche Spermatozyten und elongierte Spermatoziden auf, hat aber weder SPOC1 noch PCNA positive Zellen, was dafür spricht, dass die Spermatozoen erst vor kurzem verschwunden sind, da die schon differenzierten Zellen noch die Spermatogenese durchlaufen.

PCNA

SPOC1

DNA



Überlagerung

Überlagerung

SPOC1 + PCNA + DNA

SPOC1 + PCNA

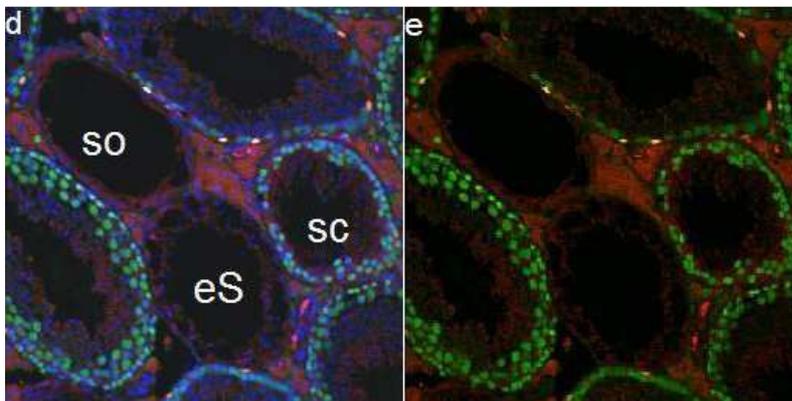


Abbildung 44: Immunfluoreszenzdoppelfärbung des Hodens einer 9 Monate alten Maus mit induzierter shRNA, die zum SPOC1 Knockdown führte. a) PCNA ist grün markiert, b) SPOC1 ist rot markiert, c) DNA-Färbung mit DraQ5 in blau, d) Überlagerung von PCNA, SPOC1 und DNA-Färbung, e) Überlagerung von PCNA und SPOC1. Es tritt Autofluoreszenz in den Leydig Zellen im intertubulären Bindegewebe auf. Es fallen drei veränderte Tubuli auf. In allen dreien finden sich keine SPOC1-positiven Zellen. Ein Tubulus (so) weist nur Sertoli-Zellen auf, der andere (eS) lediglich elongierte Spermatiden und Sertoli-Zellen und der dritte (sc) enthält PCNA-positive Spermatocyten und runde Spermatiden.

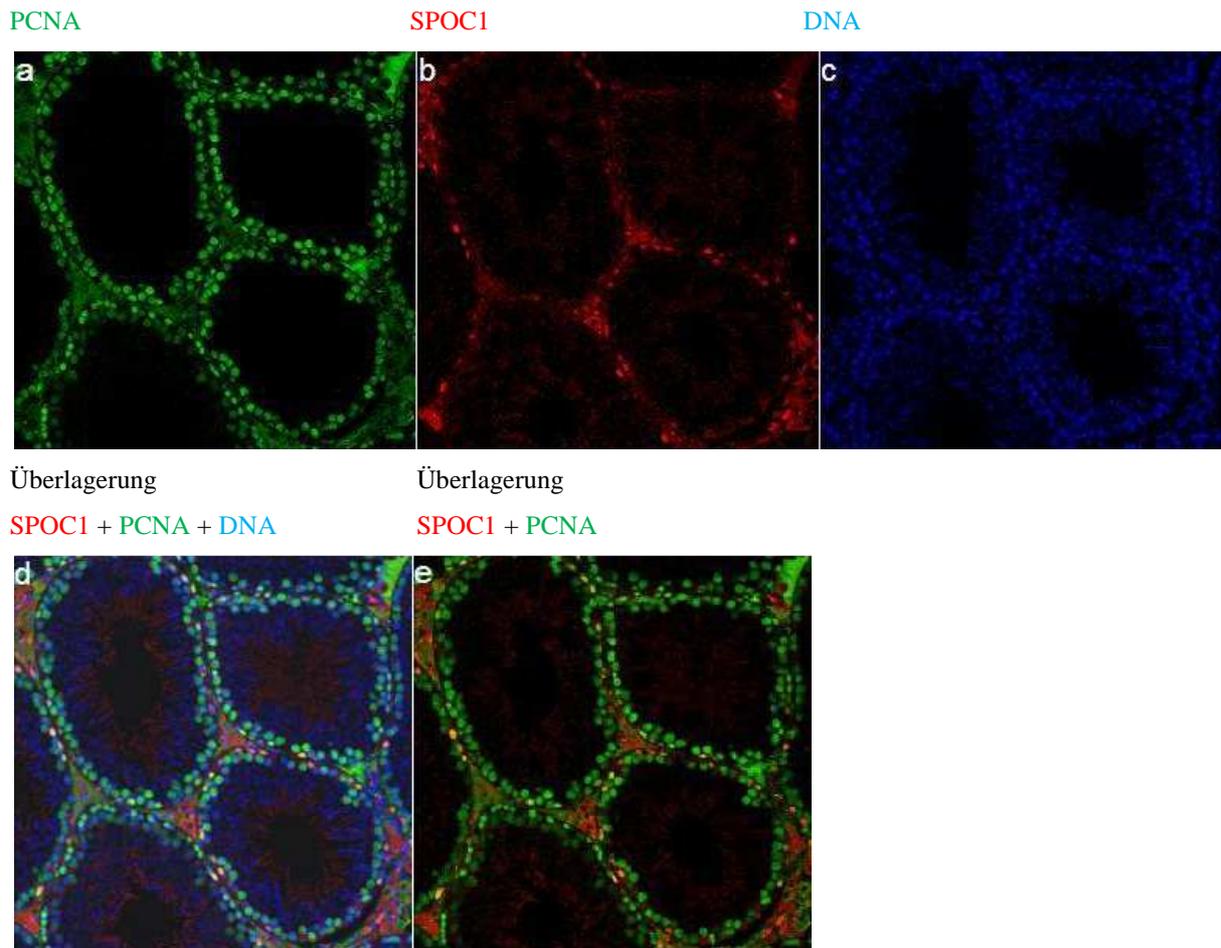
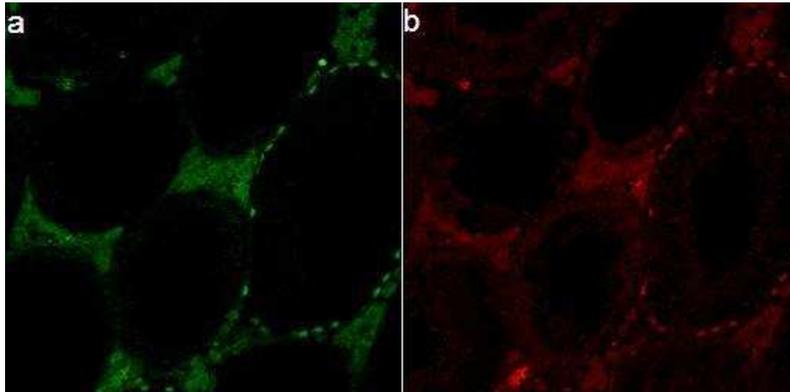


Abbildung 45: Immunfluoreszenzdoppelfärbung des Hodens einer 9 Monate alten, Kontrollmaus mit normaler Spermatogenese, a) PCNA ist grün markiert, b) SPOC1 ist rot markiert, c) DNA-Färbung mit DraQ5 in blau, d) Überlagerung von PCNA, SPOC1 und DNA-Färbung, e) Überlagerung von PCNA und SPOC1. Es tritt Autofluoreszenz in den Leydig Zellen im intertubulären Bindegewebe auf. Die angeschnittenen Tubuli enthalten alle Zellen der Spermatogenese inklusive SPOC1 positiven Spermatozyten und PCNA positiven Spermatozyten und Spermatozyten I.

Auch in der Darstellung von SPOC1 mit SOHLH1 fanden sich in einer induzierten SPOC-kd-Maus veränderte Tubuli (Abbildung 46 bis Abbildung 48). In keinem Tubulus wurde eine Zelle gesichtet, die SPOC1 oder SOHLH1 allein exprimiert. Es wurden erneut Tubuli mit verminderter Spermatogenese beobachtet. In einigen dieser Tubuli wurden Zellen, die SPOC1 und SOHLH1 positiv waren gefunden, in anderen Tubuli hingegen nicht. Diese Ergebnisse zeigen, dass einige atrophische Tubuli der induzierten SPOC1-kd Hoden keine differenzierten (SOHLH1 und SPOC1 positiven) Spermatozyten enthalten, während andere atrophische Tubuli dies tun. In den Kontrollmäusen wurden keine Veränderungen beobachtet (Abbildung 49).

SOHLH1

SPOC1



DNA

Überlagerung

Überlagerung

SPOC1 + SOHLH1 + DNA

SPOC1 + SOHLH1

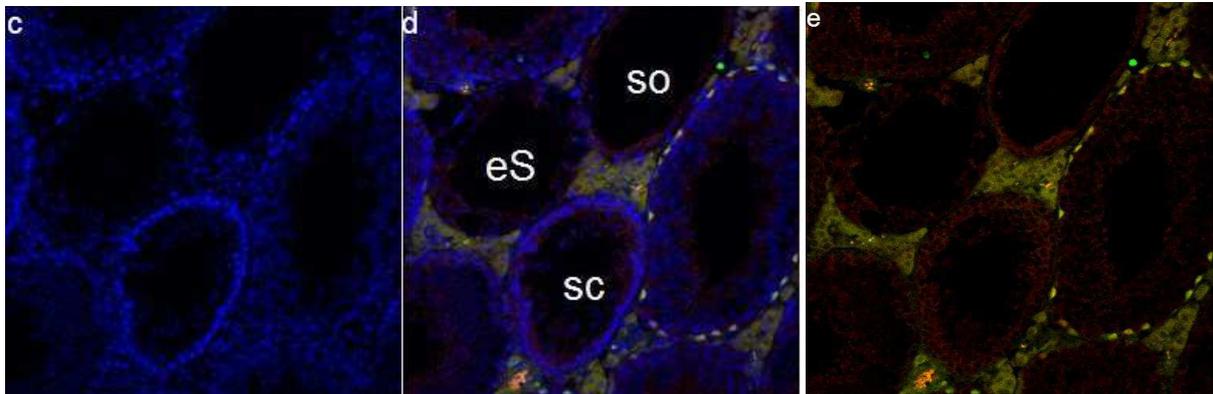
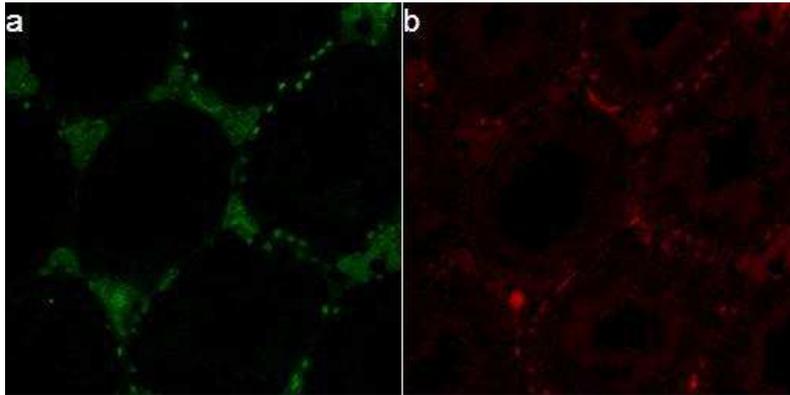


Abbildung 46: Immunfluoreszenzdoppelfärbung des Hodens einer 9 Monate alten Maus mit induzierter shRNA, die zum SPOC1 Knockdown führte. a) SOHLH1 ist grün markiert, b) SPOC1 ist rot markiert, c) DNA-Färbung mit DraQ5 in blau, d) Überlagerung von SOHLH1, SPOC1 und DNA-Färbung, e) Überlagerung von SOHLH1 und SPOC1. Es sind 3 veränderte Tubuli zu sehen. In allen dreien sind keine Zellen positiv für SOHLH1 oder SPOC1. Ein Tubulus (so) enthält nur noch Sertoli-Zellen, der andere (eS) enthält lediglich elongierte Spermatiden und Sertoli-Zellen und der dritte (sc) weist Spermatozyten und runde Spermatiden auf.

SOHLH1

SPOC1



DNA

Überlagerung

Überlagerung

SPOC1 + SOHLH1 + DNA

SPOC1 + SOHLH1

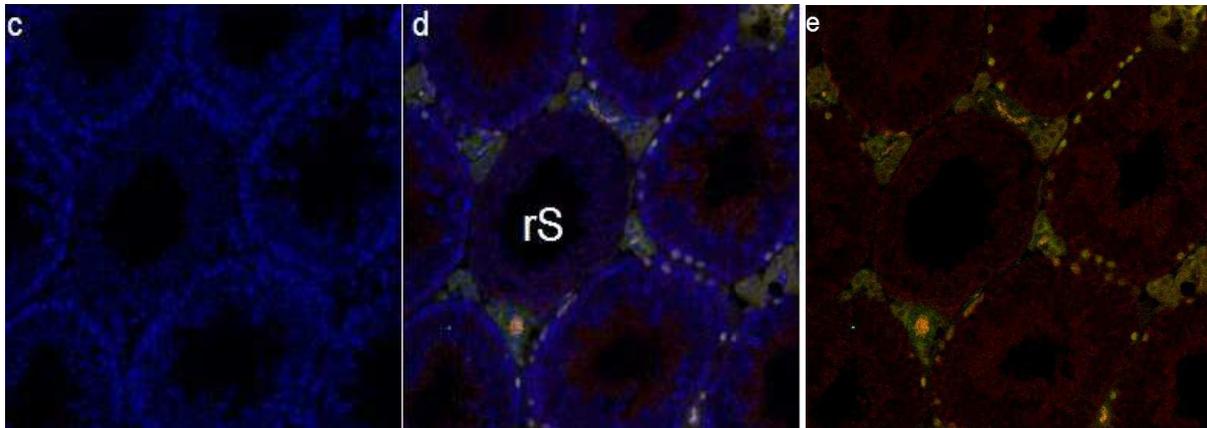
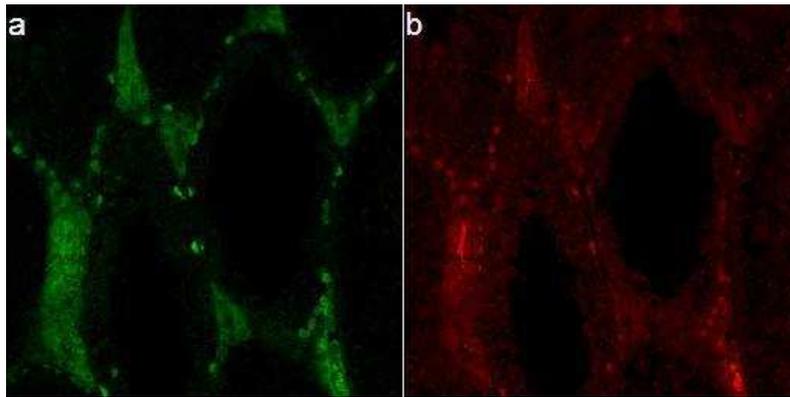


Abbildung 47: Immunfluoreszenzdoppelfärbung des Hodens einer 9 Monate alten Maus mit induzierter shRNA, die zum SPOC1 Knockdown führte. a) SOHLH1 ist grün markiert, b) SPOC1 ist rot markiert, c) DNA-Färbung mit DraQ5 in blau, d) Überlagerung von SOHLH1, SPOC1 und DNA-Färbung, e) Überlagerung von SOHLH1 und SPOC1. Es fällt ein veränderter Tubulus (rS) auf, der hauptsächlich runde Spermatiden enthält, aber keine anderen Zelltypen der normalen Spermatogenese.

SOHLH1

SPOC1



DNA

Überlagerung

Überlagerung

SPOC1 + SOHLH1 + DNA

SPOC1 + SOHLH1

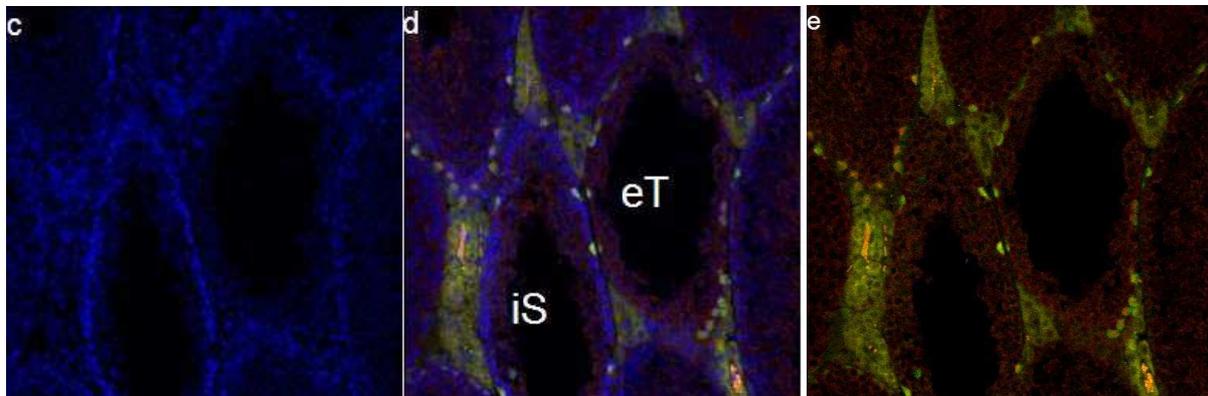


Abbildung 48: Immunfluoreszenzdoppelfärbung des Hodens einer 9 Monate alten Maus mit induzierter shRNA, die zum SPOC1 Knockdown führte. a) SOHLH1 ist grün markiert, b) SPOC1 ist rot markiert, c) DNA-Färbung mit DraQ5 in blau, d) Überlagerung von SOHLH1, SPOC1 und DNA-Färbung, e) Überlagerung von SOHLH1 und SPOC1. Es sind 2 veränderte Tubuli zu sehen. Der Tubulus eT enthält SPOC1 und SOHLH1 positive Spermatogonien und wenige elongierte Spermatiden sowie Sertoli-Zellen, die anderen Zellen fehlen. Der Tubulus iS zeigt ebenfalls SPOC1 und SOHLH1 positive Spermatogonien sowie Spermatocyten, aber nur wenige reifere Zellen der Spermatogenese.

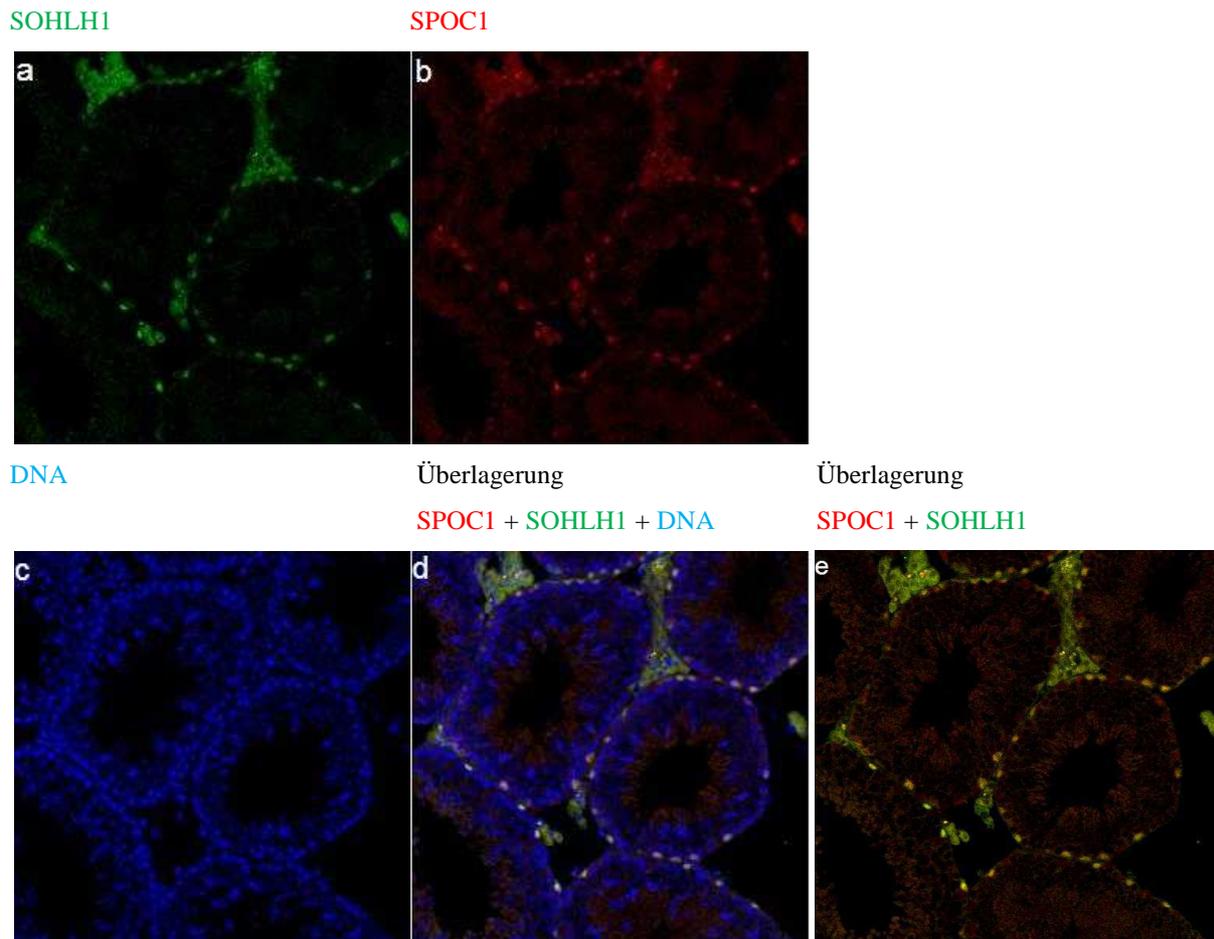


Abbildung 49: Immunfluoreszenzdoppelfärbung des Hodens einer 9 Monate alten Kontrollmaus mit normaler Spermatogenese. a) SOHLH1 ist grün markiert, b) SPOC1 ist rot markiert, c) DNA-Färbung mit DraQ5 in blau, d) Überlagerung von SOHLH1, SPOC1 und DNA-Färbung, e) Überlagerung der SOHLH1 und SPOC1-Färbung. Die angeschnittenen Tubuli enthalten alle Zellen der Spermatogenese inklusive den SPOC1 und SOHLH1 positiven A-aligned bis B-Spermatogonien.

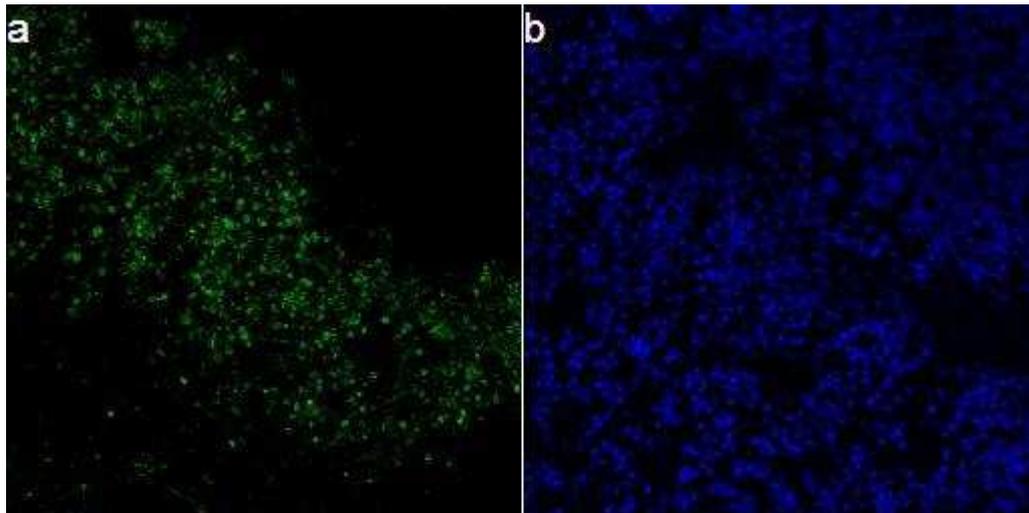
3.6.3 Vergleich der Apoptose von SPOC1-Wildtyp- und induzierten SPOC1-Knockdown-Mäusen

Um zu prüfen, ob die gestörte Spermatogenese in der einen induzierten Maus mit vermehrter Apoptose einhergeht, wurden der TUNEL-Assay und eine immunhistochemische Färbung zum Nachweis aktivierter Caspase3 verwendet.

Im TUNEL-Assay zeigt sich keine per Auge sichtbare, vermehrte Apoptose zwischen der induzierten Maus mit gestörter Spermatogenese und den Kontrollmäusen. Als Positivkontrolle für den TUNEL-Assay wurde ein Xenograft-Tumor der Kolonkarzinomzelllinie HT29 mitgefärbt. Der Xenograft-Tumor wuchs subkutan in einer immundefizienten Maus.

TUNEL-Reaktion

DNA



Überlagerung TUNEL-Reaktion + DNA

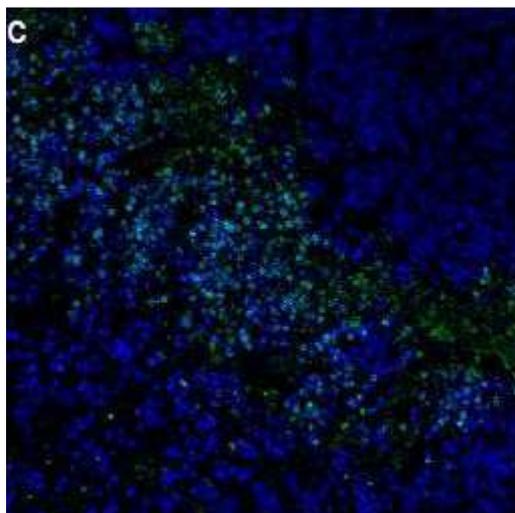
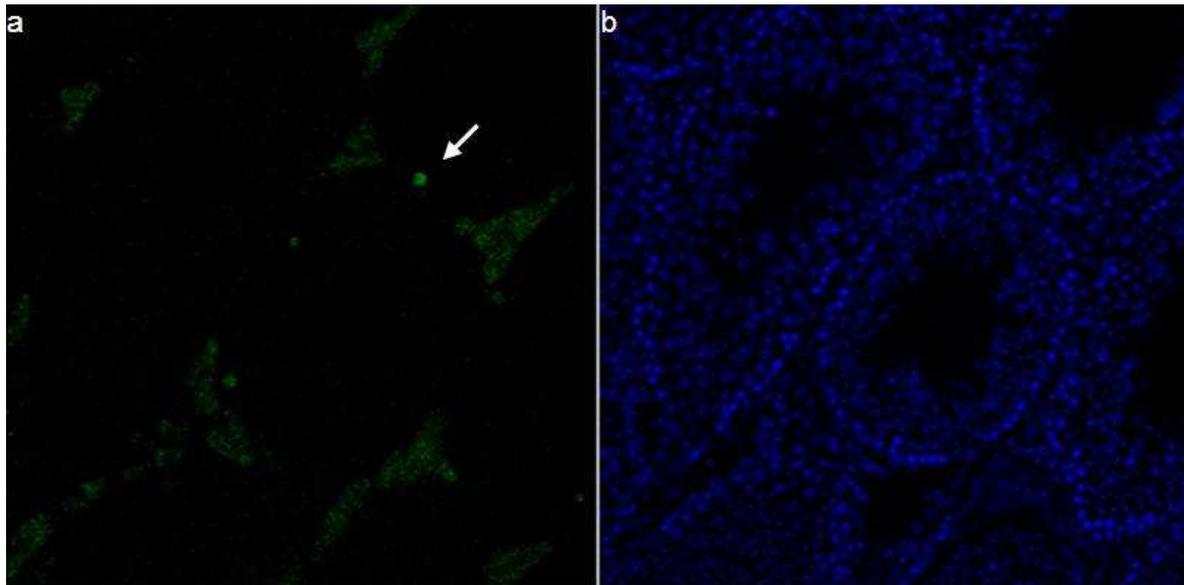


Abbildung 50: TUNEL-Assay eines HT29 Xenograft-Tumor mit großem apoptotischem Bereich als Positivkontrolle, a) TUNEL-Reaktion in grün, b) DNA-Färbung mit DraQ5 in blau, c) Überlagerung von TUNEL-Reaktion und DNA-Färbung. Die TUNEL-Reaktion färbte Teile der zerfallenden Kerne von apoptotischen Zellen an.

TUNEL-Reaktion

DNA



Überlagerung TUNEL-Reaktion + DNA

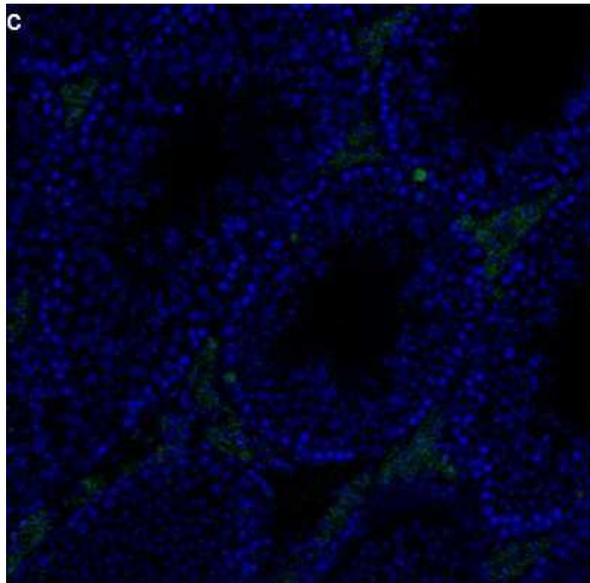
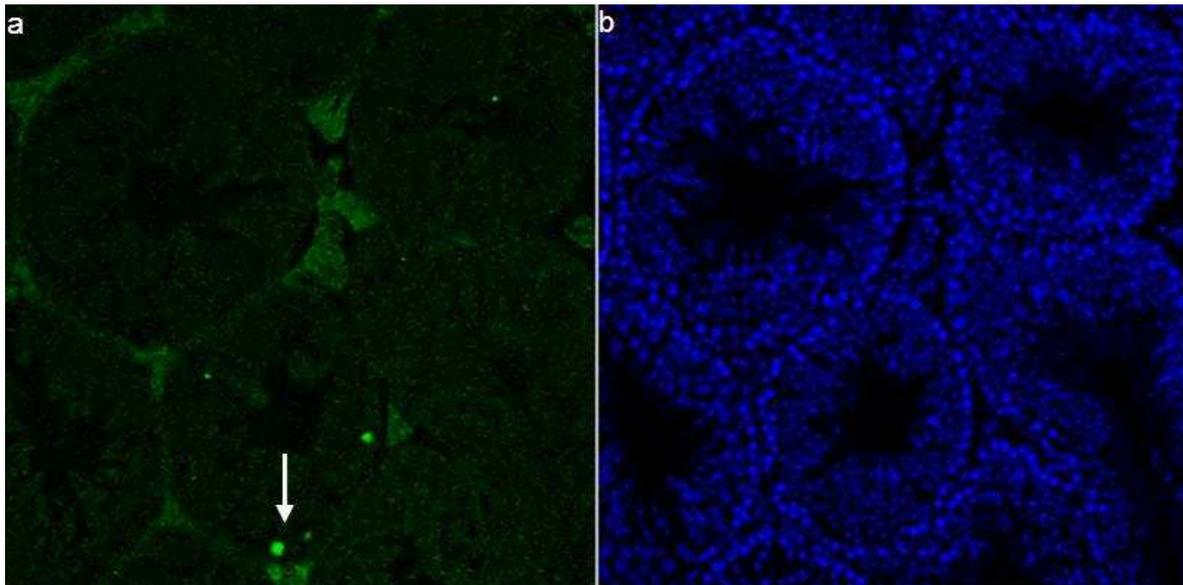


Abbildung 51: TUNEL-Assay des Hodens einer 9 Monate alten Maus mit induzierter shRNA, die zum SPOC1 Knockdown führte. a) TUNEL-Reaktion grün, b) DNA-Färbung mit DraQ5 in blau, c) Überlagerung von TUNEL-Reaktion und DNA-Färbung. Der Pfeil markiert eine positive Zelle im basalen Abschnitt eines Tubulus. Bereiche mit reduzierter Spermatogenese sind nicht klar abzugrenzen. Es tritt Autofluoreszenz in den Leydig Zellen im intertubulären Bindegewebe auf.

TUNEL-Reaktion

DNA



Überlagerung TUNEL-Reaktion + DNA

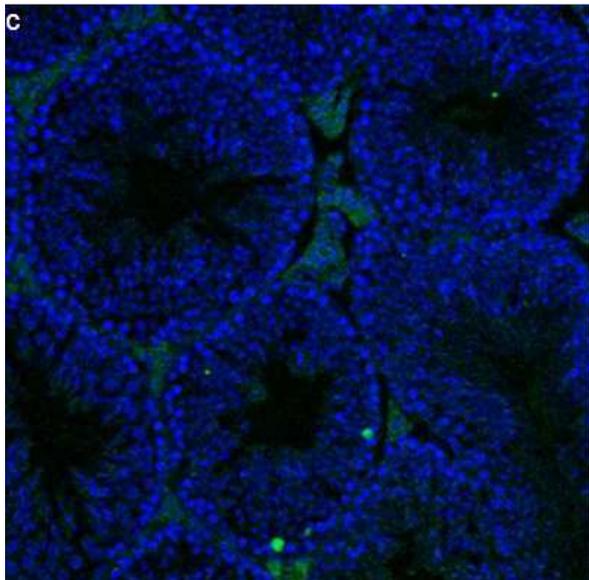
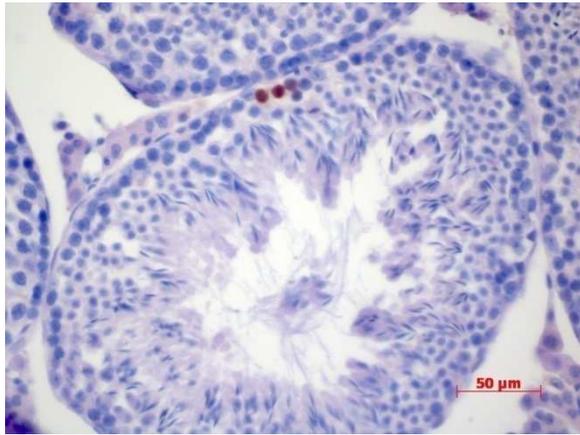


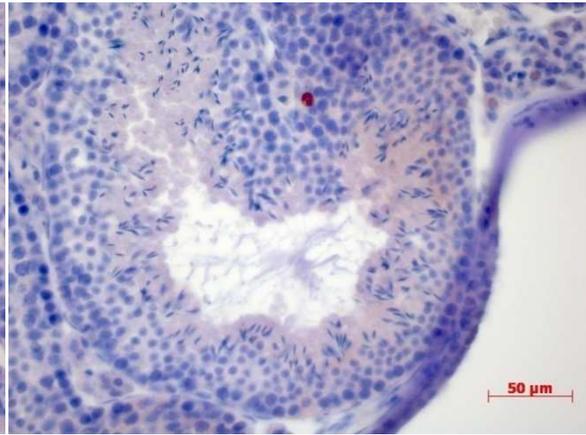
Abbildung 52: TUNEL-Assay des Hoden einer 9 Monate alten Kontrollmaus mit normaler Spermatogenese. Pfeile markieren positive Zellen. a) TUNEL-Reaktion grün, b) DNA-Färbung mit DraQ5 in blau, c) Überlagerung von TUNEL-Reaktion und DNA-Färbung. Der Pfeil markiert eine positive Zelle im basalen Abschnitt eines Tubulus. Es tritt Autofluoreszenz in den Leydig Zellen im intertubulären Bindegewebe auf. Es fällt kein wesentlicher Unterschied zum Hoden der induzierten SPOC-kd-Maus (Abbildung 53) auf.

Die Färbung auf aktivierte Caspase3 zeigte ebenfalls keinen Unterschied zwischen induzierten und nicht-induzierten Tieren. In beiden Fällen fanden sich nur wenige Tubuli mit wenigen aktivierte Caspase3 positiven Zellen.

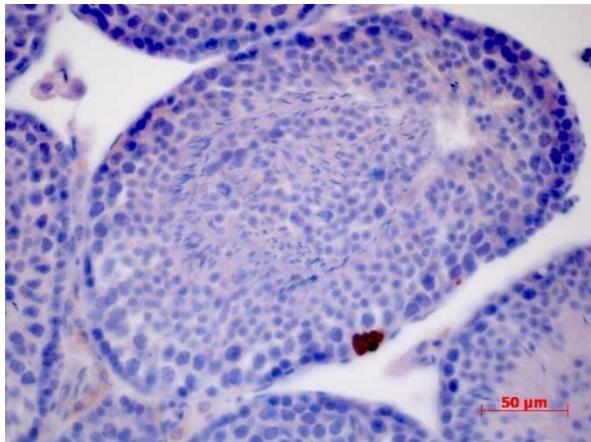
a) SPOC-kd induziert



b) SPOC-kd induziert



c) Kontrolle



d) Kontrolle

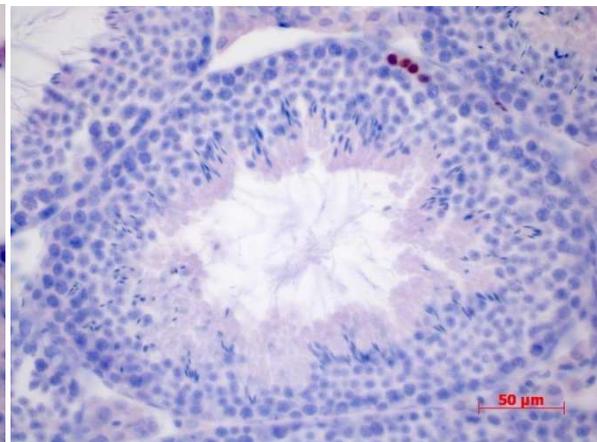


Abbildung 53: Immunhistochemischer Nachweis der aktivierten Caspase3 im Maushoden, das Reaktionsprodukt ist braun. Es wurde mit Hämatoxylin gegengefärbt. Die Schnitte a) und b) zeigen Hoden von 9 Monate alten Mäusen mit induzierter shRNA, die zum SPOC1 Knockdown führte. Die Schnitte c) und d) zeigen Hoden von 9 Monate alten Kontrollmäusen mit intakter Spermatogenese. In jedem Schnitt finden sich einzelne oder kleine Gruppen positiver, basal im Tubulus liegender Zellen. Das Gesamtbild ist analog zum TUNEL-Assay.

Bei einer Auszählung wurden alle Tubuli mit apoptotischen Zellen gezählt. Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl TUNEL positiver oder aktivierter Caspase-3 positiver Tubuli festgestellt werden. Diese Daten lassen vermuten, dass das Fehlen verschiedener Keimzellen nach SPOC1 Knockdown nicht durch vermehrte Apoptose zu erklären ist.

	Anzahl analysierter Tubuli insgesamt	Zahl / %Tubuli mit aktivierter Caspase3 positiven Zellen	Anzahl an Tubuli mit TUNEL positiven Zellen
induzierte SPOC1-kd Mäuse			
Maus 1	262	5 (1,91 %)	17 (6,48 %)
Maus 26	413	13 (3,15 %)	26 (6,30 %)
Kontrollmäuse			
Maus 14	273	15 (5,49 %)	16 (5,86 %)
Maus 39	380	9 (2,37 %)	22 (5,79 %)

Tabelle 3: Ergebnisse der Apoptosefärbungen. Mit der TUNEL-Methode fanden sich mehr apoptische Tubuli als durch die immunhistochemische Färbung auf aktivierte Caspase3. Mit beiden Methoden konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Knockdown- und Kontrollmäusen festgestellt werden.

3.7 Phänotyp im Ileum von homozygoten SPOC1 Knockdown Mäusen

Bei dem Versuch, homozygote SPOC1-kd-Mäuse zu züchten, wurde beobachtet, dass homozygote SPOC1-kd-Mäuse um den 19. Tag post partum starben. Diese Mäuse wurden nicht mit Doxycyclin induziert. Von insgesamt 47 Mäusen aus 6 Würfen waren 10 Tiere homozygot für die SPOC1 shRNA Kasette, 18 heterozygot und 15 wiesen den Rosa26 Wildtyp auf. Nach drei Wochen waren alle 10 homozygoten sowie eine Wildtyp-Maus verstorben. Einige Darmabschnitte der gestorbenen, homozygoten Mäuse sahen bei der Autopsie verändert aus. Daher wurden zwei Würfe mit homozygoten, heterozygoten und Wildtyp-Mäusen an Tag 17 geopfert, um die Veränderungen histologisch zu untersuchen.

Der Dünndarm der Maus ist wie der des Menschen in Zotten und Krypten aufgeteilt. Im normalen Dünndarmepithel der Maus finden sich fünf Zellpopulationen. Die Enterozyten sind die häufigsten Zellen. Sie weisen adluminal einen Bürstensaum aus Mikrovilli auf. Dieser Bürstensaum enthält zahlreiche Transporter und Enzyme, die der Resorption von Nährstoffen dienen, unter anderem die alkalische Phosphatase. Seltener sind die Becherzellen, die Muzine produzieren um den Speisebrei gleitfähig zu halten. Im Grund der Krypten befinden sich die Paneth-Körnerzellen, welche Lysozym und andere antimikrobielle Peptide produzieren und

die enteroendokrinen Zellen, die Peptidhormone und biogene Amine zur Regulierung der Darmtätigkeit herstellen. Außerdem befinden sich am Kryptengrund die Stammzellen, welche das Dünndarmepithel ständig erneuern. Überschüssige Zellen gehen an der Zottenspitze in Apoptose oder werden abgeschilfert.

In der H.E. Färbung fielen optisch leere Zellen in den Dünndarmzotten der homozygoten SPOC1 Knockdown Mäuse auf. In heterozygoten- oder Wildtyp-Mäusen war dieser Phänotyp nicht zu finden. Daher wurde dieser Phänotyp genauer untersucht.

a) homozygote SPOC1-kd-Maus



b) heterozygote SPOC1-kd-Maus



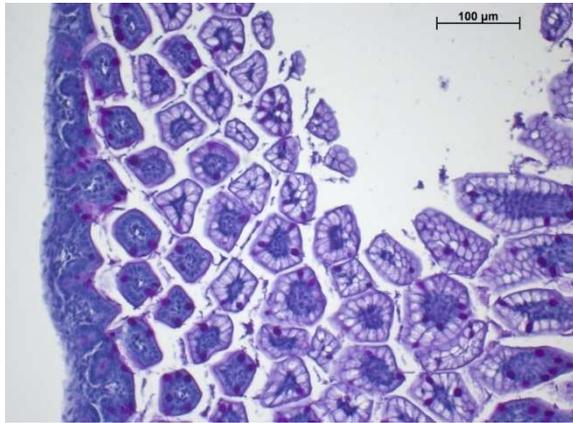
c) Wildtyp-Maus



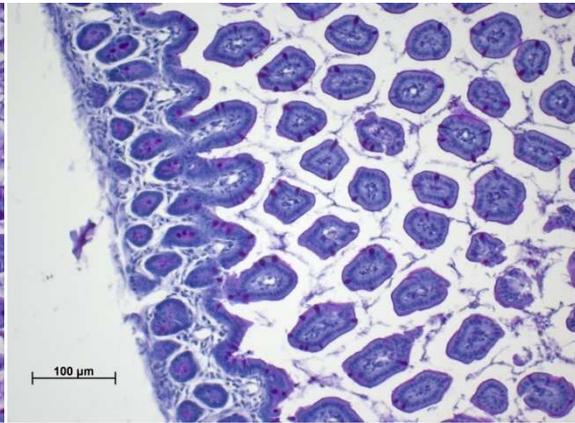
Abbildung 54: H.E. Färbung mit optisch leeren Zellen in den Dünndarmzotten der homozygoten SPOC1-kd-Maus. Die Dünndarmzotten der heterozygoten SPOC1-kd-Maus und der Wildtyp-Maus enthalten morphologisch normale Enterocyten mit eosinophilem Zytoplasma, apikalem Bürstensaum und basal liegendem Zellkern, sowie einige Becherzellen, deren Zytoplasma sich aufgrund des enthaltenen Schleims nur wenig mit Eosin anfärbt. Bild a) zeigt den Dünndarm einer homozygoten Maus, Bild b) den einer heterozygoten Maus und Bild c) den einer Wildtyp-Maus.

Bei den auffälligen Zellen im Dünndarm der homozygoten Mäuse handelt es sich nicht um Becherzellen. Becherzellen sind PAS-positiv, die auffälligen Zellen lassen sich dagegen nicht mit der PAS-Reaktion anfärben. Somit handelt es sich bei den auffälligen Zellen nicht um Becherzellen.

a) homozygote SPOC1-kd-Maus



b) heterozygote SPOC1-kd-Maus



c) Wildtyp-Maus

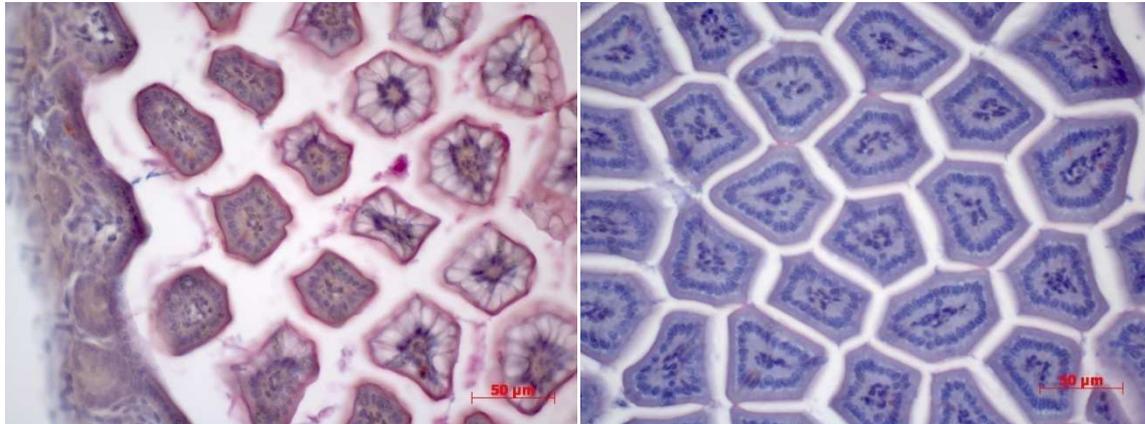


Abbildung 55: PAS Hämalaun Färbung, die veränderten Zellen der homozygoten SPOC1-kd-Maus sind PAS negativ, dazwischen erkennt man morphologisch intakte, PAS-positive Becherzellen. Das Zytoplasma der Becherzellen ist in allen drei Mäusen durch die PAS-Reaktion violett gefärbt. Bild a) zeigt den Dünndarm einer homozygoten Maus, Bild b) den einer heterozygoten Maus und Bild c) den einer Wildtyp-Maus.

Die auffälligen Zellen im Dünndarm der homozygoten Mäuse besitzen einen alkalischen Phosphatase positiven Bürstensaum, was nahelegt, dass es sich um Enterozyten handelt.

a) homozygote SPOC1-kd-Maus

b) heterozygote SPOC1-kd-Maus



c) Wildtyp-Maus

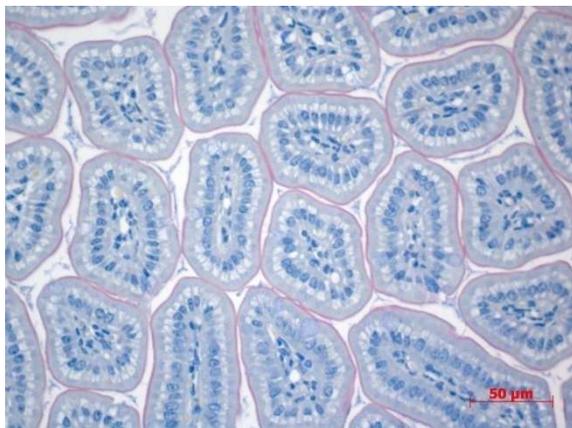
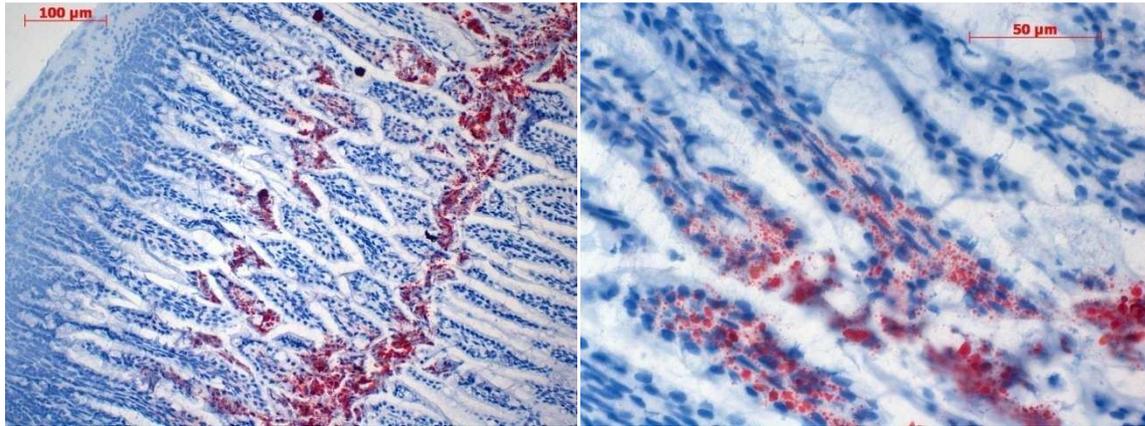


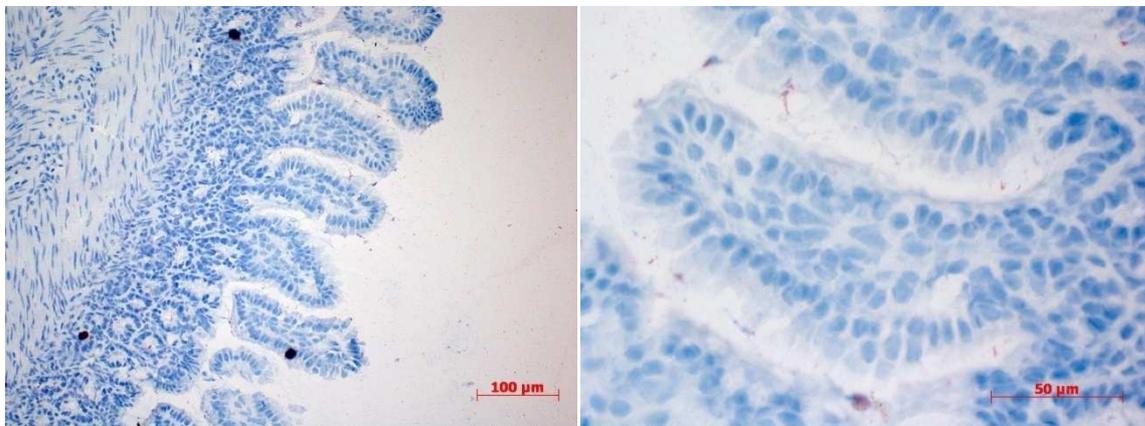
Abbildung 56: Enzymhistochemie für alkalische Phosphatase mit Hämalaun-Gegenfärbung, die veränderten Zellen der homozygoten SPOC1 Knockdown Maus weisen einen positiven Bürstensaum auf, wie ihn Enterozyten besitzen. Die normalen Enterozyten der heterozygoten- und Wildtyp-Maus besitzen ebenfalls einen positiven, apikalen Bürstensaum. Bild a) zeigt den Dünndarm einer homozygoten Maus, Bild b) den einer heterozygoten Maus und Bild c) den einer Wildtyp-Maus.

Um den Phänotyp im Dünndarm der homozygoten SPOC1-kd Mäuse noch genauer zu charakterisieren, wurden Gefrierschnitte hergestellt und mit Ölrot gefärbt. Mit der Ölrot-Färbung werden Lipide angefärbt. In der Ölrot-Färbung am Gefrierschnitt der homozygoten Mäuse zeigte sich eine vermehrte Einlagerung des lipophilen Farbstoffs in die veränderten Enterozyten der Zotten. Ballonierte, optisch leere Zellen sind im Gefrierschnitt nicht zu sehen. Allerdings ist sowohl die vermehrte Lipideinlagerung im Gefrierschnitt, als auch der Befund der ballonierten Zellen in PAS- und HE-Färbung in den Zottenspitzen zu sehen.

a) homozygote SPOC1-kd-Maus



b) heterozygote SPOC1-kd-Maus



c) Wildtyp-Maus

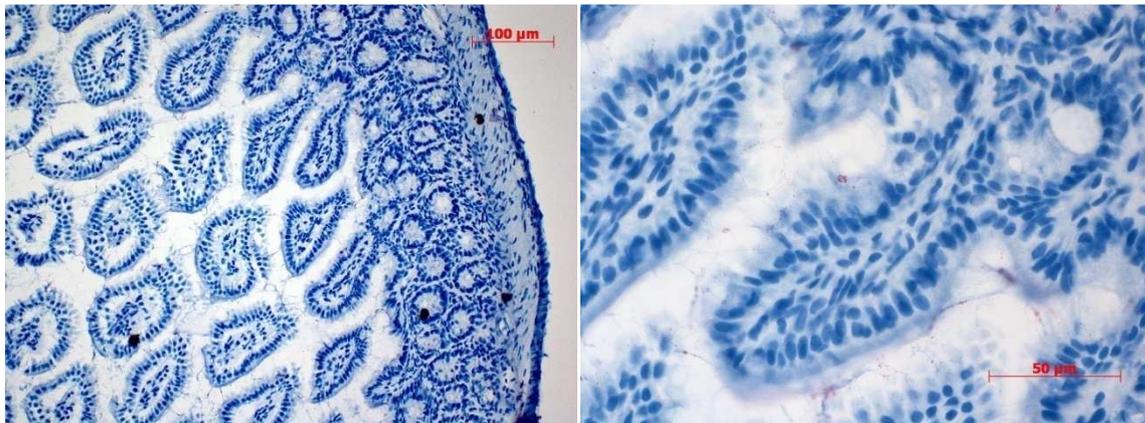


Abbildung 57: Ölrot-Hämalaun Färbung am Gefrierschnitt. Die Zotten der homozygoten SPOC1 Knockdown Maus lassen sich mit Ölrot anfärben. In der heterozygoten- und Wildtyp-Maus lässt sich nur wenig intraluminales Material schwach mit Ölrot anfärben. Bild a) zeigt den Dünndarm einer homozygoten Maus, Bild b) den einer heterozygoten Maus und Bild c) den einer Wildtyp-Maus.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die makroskopisch veränderten Därme der homozygoten Mäuse mikroskopisch atypische, vermehrt Lipide speichernde Enterocyten aufweisen.

Die oben genannten Würfe, die an Tag 17 post partum geopfert wurden, bestanden aus insgesamt 14 Tieren, davon waren fünf Tiere homozygot für die SPOC1 shRNA Kasette, fünf heterozygot und vier wiesen den Rosa26 Wildtyp auf. Alle fünf homozygoten Tiere wiesen Veränderungen im Dünndarm auf. Bei drei Tieren wiesen nur einzelne Zotten die oben beschriebenen Veränderungen auf. Beim vierten Tier waren zahlreiche Dünndarmzotten betroffen und beim fünften Tier abschnittsweise fast alle Zotten eines Blickfelds (siehe Abbildung 54a). Das fünfte Tier wirkte krank und geschwächt.

Die Ölrotfärbung wurde an einem später geborenen Wurf durchgeführt, da von den oben genannten Würfen kein Kryomaterial gesammelt wurde und die Ölrotfärbung nur an nicht in Paraffin eingebetteten Geweben möglich ist.

Des Weiteren wurden zwei Zuchtpärchen mit Doxycyclin induziert. Die beiden Würfe umfassten insgesamt 10 Tiere, davon waren 8 heterozygot und 2 homozygot für die SPOC1 shRNA Kasette. Auch nach 5 Wochen unter Doxycyclin waren alle 10 Tiere am Leben, inklusive der 2 homozygoten Tiere, die normalerweise ohne Induktion nach 3 Wochen verstarben. Dies lässt vermuten, dass die Induktion der shRNA mit Doxycyclin den lethalen Phänotyp im Darm homozygoter SPOC1-kd Mäuse verhindert oder zumindest verzögert.

3.8 Seminom

Ob SPOC1 nicht nur in Spermatogonien des normalen Hodens, sondern auch in Hodentumoren exprimiert wird, wurde an acht mit Bouins Lösung fixierte Hodenbiopsien geprüft. Hierzu wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte der Biopsien, die Seminome und Carcinoma in situ enthalten mit dem anti-SPOC1 rm45 Antikörper gefärbt. Zwei der gefärbten Biopsien waren stark positiv, andere nur schwach positiv. Das Verteilungsmuster von SPOC1 in den Zellkernen wirkte ungleichmäßig, einige Kerne wurden homogen angefärbt, andere nur teilweise an Stellen, an denen das Chromatin auch stärker mit Hämatoxylin anfärbbar ist. Gelegentlich war auch der Nucleolus SPOC1 positiv. Außerdem wurden bei drei Biopsien Streifen an der Kernmembran beobachtet. Es wurden auch eine eindeutig SPOC1 negative und zwei fraglich SPOC1 negative Biopsien gefunden. Insgesamt wurden acht Biopsien gefärbt. Diese Ergebnisse zeigen, dass SPOC1 von einer Subpopulation von Tumorzellen im Hoden exprimiert wird.

a) Seminom 32-99-2

b) Seminom 74-01-2

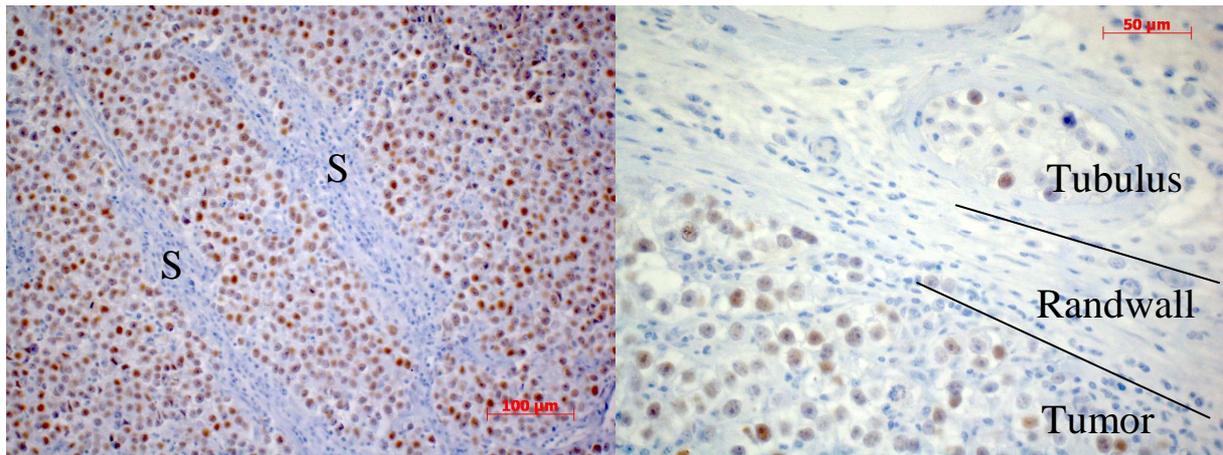


Abbildung 58: Immunhistochemie zum Nachweis von SPOC1 (braun) und Gegenfärbung mit Hämalaun auf verschiedenen Seminomen. Bild a) zeigt Gewebeprobe 32-99-2, ein SPOC1 positives Seminom mit Septen (S), die Lymphocyten enthalten. SPOC1 ist in den Zellkernen der Seminomzellen lokalisiert, wobei nicht alle Seminomzellen gleich stark angefärbt wurden. Auch die Verteilung von SPOC1 im Zellkern ist inhomogen. Das Bindegewebe und die Lymphocyten in den Septen sind SPOC1 negativ. Bild b) zeigt Gewebeprobe 74-01-2, ein SPOC1 positives Seminom. Der Tumor wird von einem bindegewebigen Randwall umgeben, der SPOC1 negativ ist. Über dem Randwall befindet sich ein atrophiertes Tubulus mit wenigen SPOC1 positiven Zellen. Wobei unklar ist, ob es sich um verbliebene Spermato gonien oder Tumorzellen handelt.

a) CiS 41-01-2

b) Seminom 79-00-3

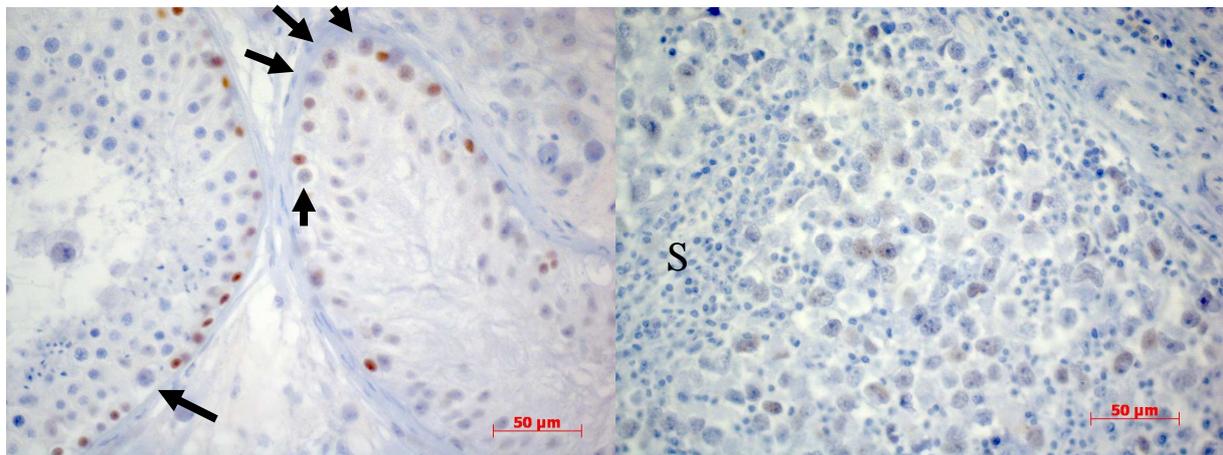


Abbildung 59: Immunhistochemie zum Nachweis von SPOC1 (braun) und Gegenfärbung mit Hämalaun auf verschiedenen Seminomen. Bild a) zeigt Biopsie 41-01-2, ein Carcinoma in situ. Die Pfeile zeigen auf CiS-Zellen. Die CiS-Zellen sind größer als Spermato gonien und SPOC1 negativ oder schwach positiv. Die stärker SPOC1 positiven Zellen sind wahrscheinlich verbliebene Spermato gonien. Bild b) zeigt Biopsie 79-00-3, ein schwach SPOC1 positives Seminom mit Septen. S bezeichnet ein Septum mit lymphocytärem Infiltrat, das ebenfalls keine SPOC1 positiven Zellen enthält.

a) Seminom 60-01-3

b) Seminom 89-00-3 Negativkontrolle

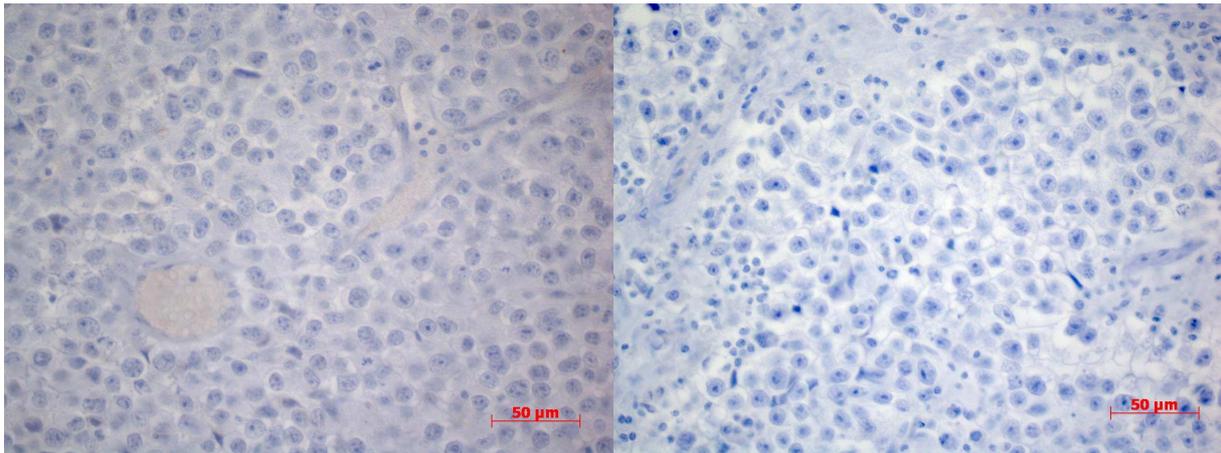


Abbildung 60: Immunhistochemie zum Nachweis von SPOC1 (braun) und Gegenfärbung mit Hämalaun auf verschiedenen Seminomen. Bild a) zeigt Biopsie 60-01-3, ein SPOC1 negatives Seminom. Bild b) zeigt Biopsie 89-00-3, ein Seminom. Auf diesem Schnitt wurde eine Isotypenkontrolle mit einem monoklonalen Ratten IgG2b Antikörper durchgeführt. Keine Struktur wurde durch den Kontrollantikörper angefärbt.

a) CiS 98-01-2

b) CiS 98-01-2

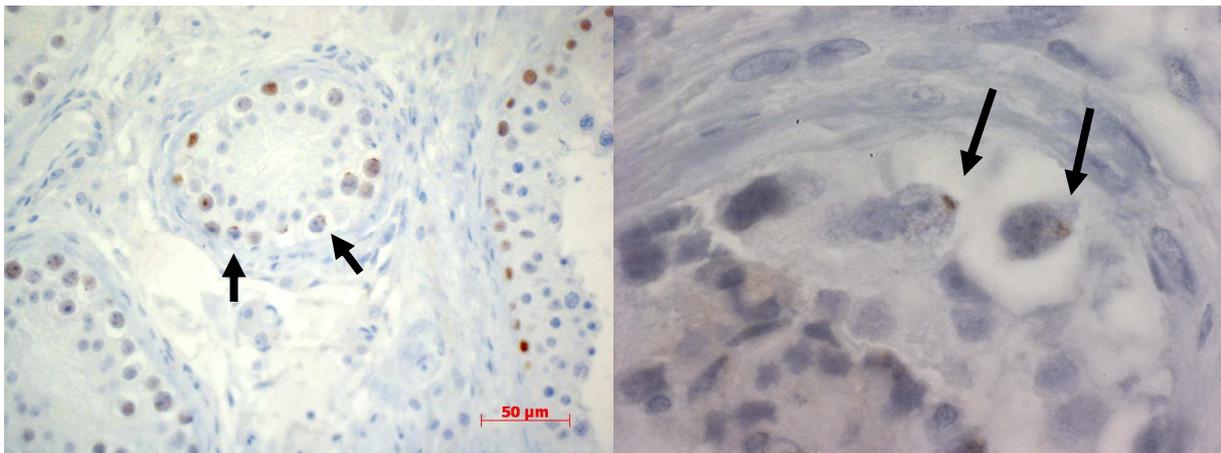


Abbildung 61: Immunhistochemie zum Nachweis von SPOC1 (braun) und Gegenfärbung mit Hämalaun auf verschiedenen Seminomen. Biopsie 98-01-2 ist ein Carcinoma in situ mit SPOC1 positivem Streifen an der Kernmembran. Die Pfeile auf Bild a) zeigen exemplarisch auf zwei Zellen mit positiven Kappen an der Kernmembran. Der Tubulus ist weitestgehend mit CiS-Zellen und verbliebenen Sertolizellen ausgefüllt. Verbliebene Zellen der normalen Spermatogenese sind nicht zu sehen, 400x Vergrößerung. Bild b) zeigt eine Detailaufnahme von zwei Zellen mit SPOC1 positiven Kappen an der Kernmembran (Pfeile) in 1000x Vergrößerung. Die Zellen sind aufgrund ihrer Größe und dem optisch leeren Zytoplasma als CiS-Zellen zu erkennen. SPOC1 liegt akkumuliert in Form einer Kappe an der Kernmembran vor, der übrige Kern ist dagegen nur sehr schwach gefärbt.

a) Seminom 64-01-2

b) Seminom 74-01-2

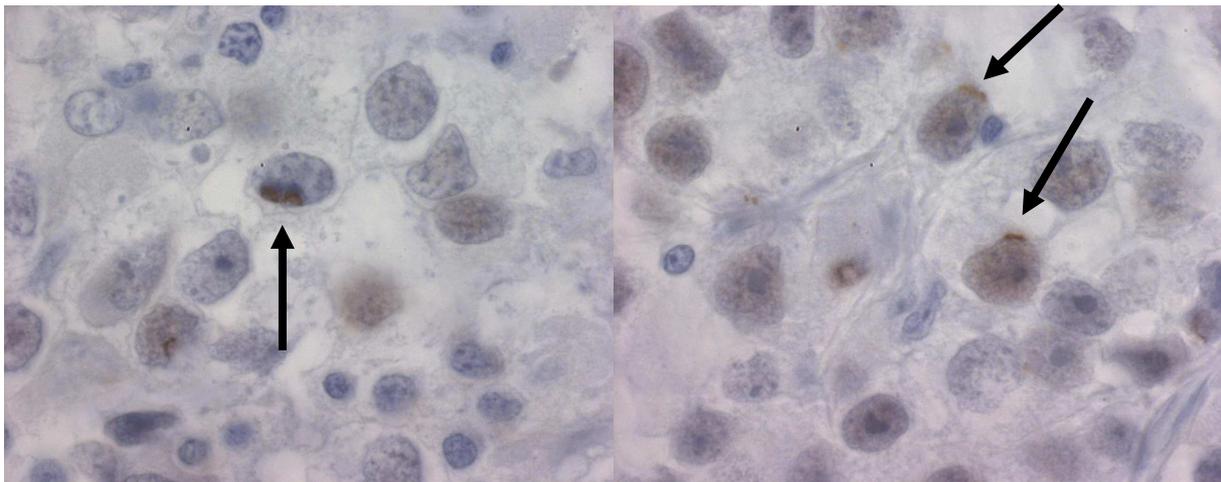


Abbildung 62: Immunhistochemie zum Nachweis von SPOC1 (braun) und Gegenfärbung mit Hämalaun auf verschiedenen Seminomen in 1000x Vergrößerung. Abbildung a) zeigt Biopsie 64-01-2, ein Seminom. Der Pfeil markiert eine Seminomzelle mit randständigem stark Hämatoxylin gefärbten und SPOC1 positivem Chromatin, das übrige Chromatin enthält kaum SPOC1. Abbildung b) zeigt Biopsie 74-01-2, ein Seminom mit SPOC1 positiver Kappe an der Kernmembran. Die Pfeile weisen auf zwei Seminomzellen mit SPOC1 positiven Kappen an der Kernmembran, das übrige Chromatin ist ebenfalls SPOC1 positiv, wenn auch schwächer, aber eindeutiger als in a).

Block-#	SPOC1	Kernmembrankappe	Kommentar
32-99-2	+++	-	Seminom
41-01-2	+	-	CiS
60-01-3	-	-	Seminom
64-01-2	+	+	Seminom
74-01-2	++	+	Seminom
79-00-3	+/-	-	Seminom
81-00-3	+/-	-	Seminom
98-01-2	+	+	CiS

Tabelle 4: Auflistung der SPOC1 homogen- oder Kappen-positiv und negativ gefärbten Hodenbiopsien. Die SPOC1 Färbung ist in den Tumoren unterschiedlich stark, von sehr stark (+++), fraglich positiv (+/-), bis hin zu nicht nachweisbar (-). Die SPOC1-Färbung in Form von Kernmembrankappen ist nicht immer nachweisbar.

4 Diskussion

4.1 Methoden

4.1.1 Histologische Methoden

Es wurden die klassischen histologischen Methoden der HE-Färbung, die Feulgen-Reaktion auf DNA und die PAS-Reaktion auf Glykane durchgeführt, um sich in die Morphologie des Hodens von Mensch und Maus einzuarbeiten und den Aufbau sowie die Stadieneinteilung des Keimepithels nachzuvollziehen.

Die HE-Färbung als Übersichtsfärbung für die Histologie ist auch für den Hoden gut geeignet. Die Feulgen-Reaktion eignet sich besonders zur Darstellung der Spermatozyten I, Hämalaun erfüllt jedoch den gleichen Zweck. Wichtiger als die Färbung ist hier das richtige Fixans, da in Fixativen mit Eisessig die Kernmorphologie besser erhalten bleibt.

Die PAS-Färbung ist für die Stadieneinteilung des Keimepithels im Maushoden von Nutzen, da die Akrosomenanlage der Spermatozyten PAS-positiv ist und somit sichtbar wird. Im humanen Hoden färbt sich die Akrosomenanlage nicht mit PAS an. Anhand der PAS-Hämalaun Färbung ließ sich die Stadieneinteilung des Hodens (Oakberg, 1956) nachvollziehen, dies erfordert allerdings einige Zeit und Übung.

4.1.2 Fixative

Untersuchungen zur Rolle des Fixans beim Strukturerhalt wurden angestellt, da die Bilder von Oakberg (Oakberg, 1956) deutlich besser aussahen als die selbst hergestellten Schnitte aus formalinfixierten Maushoden und einige Befunde von Oakberg nur schwer nachvollziehbar waren. Gepufferte Formalinlösung ist nur bedingt für Hodengewebe geeignet, da das Sertolizellzytoplasma nicht erhalten wird. Bouins Lösung und modifizierte Davidsonsche Lösung zeigen einen besseren Strukturerhalt mit Erhaltung des Sertolizellzytoplasmas. Des Weiteren ist die Kernmorphologie aufgrund der Essigsäure in Bouins Lösung und modifizierte Davidsonsche Lösung deutlicher, was für die Stadieneinteilung der Spermatogenese von Bedeutung ist (siehe: Abbildung 5). Letztendlich ist die modifizierte Davidsonsche Lösung zu bevorzugen. Modifizierte Davidsonsche Lösung enthält, im

Gegensatz zu Bouins-Lösung, keine Pikrinsäure. Damit ist modifizierte Davidsonsche Lösung weniger toxisch und besser für Immunfluoreszenzfärbungen geeignet, weil Pikrinsäure die DNA zerstört, was dazu führt, dass der Kern nicht mehr mit interkalierenden DNA-Farbstoffen wie zum Beispiel DraQ5 oder Hoechst anfärbbar ist. Ein Nachteil ist die geringere Anfärbbarkeit der Akrosomen für PAS (Vergleiche: Abbildung 9 a und b).

4.1.3 Methodenvergleich verschiedener Antigendemaskierungsverfahren

Grundsätzlich eignen sich fast alle getesteten Verfahren zur Antigendemaskierung. Ausgenommen ist die Demaskierung mit Proteinase K, welche das Keimepithel zerstört, sodass kein SPOC1 mehr nachgewiesen werden kann. Bei allen weiteren Verfahren färbten sich mit einem Ratte anti-SPOC1 Antikörper die Spermatogonien an.

Letztendlich wurde aufgrund von zwei Veröffentlichungen (Kim a, 2004), (Kim b, 2004) dem Einsatz von Borsäure der Vorzug gegeben, da es die meisten Antigene demaskierte, eine Eigenschaft die insbesondere für die Immunfluoreszenzfärbung von Bedeutung war. Dies bestätigte sich in der Immunfluoreszenzfärbung der Antigene PCNA (Abbildung 26), PLZF (Abbildung 27), und SOHLH1 (Abbildung 28), die durch die Borsäure besonders gut für die Antikörper zugänglich wurden.

Als Isotypenkontrolle wurde zunächst ein Flag-Tag Antikörper, der ebenfalls von Dr. Elisabeth Kremmer hergestellt wurde, verwendet. Mit diesem Antikörper färbten sich glatte Muskelzellen und Myofibroblasten an, was auf eine Kreuzreaktion mit glatten Muskelproteinen hinweist. Aufgrund dessen wurde im weiteren Verlauf der American Antigenix IgG2b Isotypenkontrollantikörper verwendet, welcher kein solches Bindungsverhalten zeigt. Dieser Antikörper ist laut Datenblatt gegen ein Epitop gerichtet, das auf humanen und murinen Leukozyten nicht vorkommt.

4.1.4 Methodenvergleich verschiedener Detektionsenzyme und Verstärkungen

Die Detektionsenzyme alkalische Phosphatase und Peroxidase ergeben ähnliche Bilder, wobei die Hintergrundfärbung mit der Peroxidase-Methode geringfügig schwächer ist. Des Weiteren hat die Peroxidase-Methode den Vorteil, dass mehrere Verstärkerreaktionen verfügbar sind. Neben der eingesetzten Verstärkung mit Nickel ist auch noch die Kombination mit einem anti-Peroxidase Antikörper möglich (Davidoff, 1990), wie in Abbildung 23 und Abbildung 24 zu sehen ist.

Da es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war, SPOC1 in anderen Geweben, mit laut Immunoblot schwächerer Expression, immunhistochemisch darzustellen, wurde der Peroxidase-Methode der Vorzug gegeben. Ausschlaggebend für diese Entscheidung ist die Möglichkeit, das Signal noch weiter zu verstärken.

4.2 Expression von SPOC1 im Hoden

4.2.1 Antikörper gegen SPOC1

Theres Schaub konnte mit einem Peptid-Chip kartieren, an welche Epitope auf SPOC1 die Antikörper binden (siehe Abbildung 63, nicht publizierte Daten). Im Vergleich mit den histologischen Bildern fällt auf, dass nur das Kaninchen anti-SPOC Serum 53 im humanen Hoden Spermatozyten II und Spermatoide anfärbt, obwohl es im gleichen Bereich, am C-terminalen Ende der PHD-Domäne, wie die Antikörper rm11 und rm33 bindet. rm11 und rm33 färben dagegen nur Spermatozoen an, genau wie der Antikörper rm45, der dagegen eher N-terminal bindet (siehe Abbildung 19).

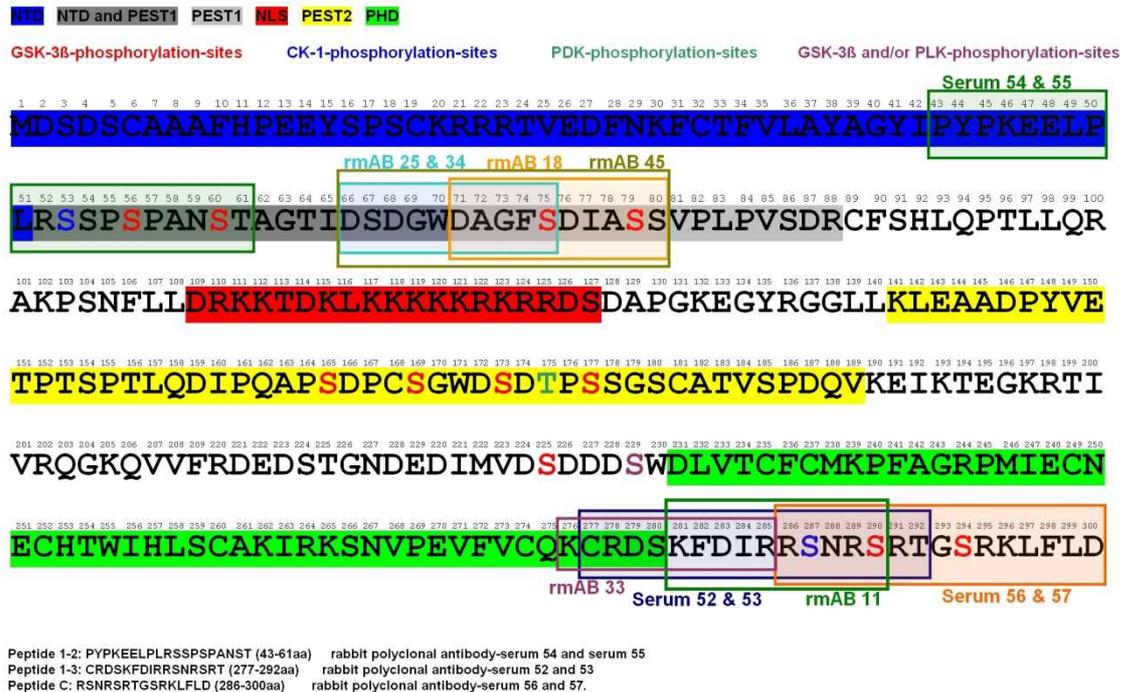


Abbildung 63: Aminosäuresequenz von SPOC1 mit gekennzeichneten Epitopen, welche von den eingesetzten Antikörpern laut Peptidkartierung erkannt werden. rmAB45 = rm45, rmAB33 = rm33, rmAB11 = rm11, Grafik von Theres Schaub, HPI Abteilung 2.

Mohrmann et al. (Mohrmann, 2005) konnten mit RNA in situ Hybridisierung am Maushoden ebenfalls zeigen, dass SPOC1 in Spermatozyten exprimiert wird. Dies legt nahe, dass die monoklonalen Antikörper rm11, rm33 und rm45 das SPOC1-Protein spezifisch erkennen. Eine sichere Evidenz für die SPOC-spezifische Färbung mit den monoklonalen Rattenantikörpern lieferte kürzlich der Einsatz von Gewebeschnitten einer Mauslinie mit einem polymorphic Knockout von SPOC1 (Bördlein, 2011). Dieses Mausmodell besitzt eine beta-Galactosidase unter der Kontrolle des endogenen SPOC1-Promotors. Hodenschnitte von homo- oder heterozygoten beta-Galactosidase-Mäusen, die mit X-Gal, einer Verbindung die von der beta-Galactosidase zu einem blauen Farbstoff umgesetzt wird, gefärbt wurden, zeigen ebenfalls X-Gal-Färbung in Spermatozyten, ähnlich wie die immunhistochemische Färbung von SPOC1 in Wildtyp- Mäusen (Bördlein, 2011).

In homozygoten SPOC1-knockout-Mäusen war keine immunhistochemische Färbung der Spermatozyten zu sehen (Bördlein, 2011) und zwar auch nicht nach Anwendung einer Signal verstärkten immunhistochemischen Färbung mit einem Peroxidase-Tyramid-System (persönliche Mitteilung von Dr. Hannah Staeger, HPI Abteilung 2).

Im Gegensatz zu den monoklonalen Ratte anti-SPOC1 Antikörpern bindet das Kaninchen anti-SPOC1 Serum 53 auch an Spermatozyten II und Spermatozyten. Dies legt nahe, dass das Serum 53 entweder mit höherer Affinität ein weiteres Antigen bindet, das in diesen Zellen

vorkommt, oder eine modifizierte Variante von SPOC1, die durch die monoklonalen Antikörper nicht erkannt wird.

Des Weiteren fiel auf, dass das Serum 53 in murinem Hoden keine Färbung ergibt. Eine Erklärung könnte der Austausch einer Aminosäure im Epitop sein. Humanes SPOC1 weist an Position 292 Threonin auf, das murine Protein dagegen Methionin. Andererseits sind im Epitop des rm45-Antikörpers 3 Aminosäuren (A72T, A78T, S79T) nicht konserviert und der Antikörper erkennt trotzdem sowohl humanes als auch murines SPOC1.

Der Sequenzvergleich liefert daher keine zufrieden stellende Erklärung. Wahrscheinlich spielt hier die Ausrichtung der Aminosäuren im Raum innerhalb der Aminosäurekette die größere Rolle, sodass die drei nicht konservierten Aminosäuren im Fall von rm45 nicht an der Interaktion von Epitop und Antikörper beteiligt sind, im Fall von Serum 53 die eine Aminosäure aber essentiell für dessen Bindung ist.

4.2.2 Expression von SPOC1 im humanen Hoden

Im humanen Hoden wird SPOC1 in allen drei morphologisch unterscheidbaren Spermatogiontypen, den A-dark, A-pale und B-Spermatogonien exprimiert. Das A-dark-Spermatogonium kann auf den Bildern an seiner Aufhellung im Zellkern erkannt werden. Bei den anderen positiven Zellen dürfte es sich ebenfalls um Spermatogonien handeln, da sie Kontakt mit der Lamina propria haben und die unterste Schicht des Keimepithels bilden. Zwischen A-pale und B-Spermatogonien kann allerdings nicht zuverlässig unterschieden werden. In Abbildung 20 b ist nicht klar, ob es sich bei den beiden mit dem Stern markierten Spermatogonien um Typ A-pale oder B handelt, da zwar in den blass gefärbten Spermatogonien jeweils zwei stärker Hämatoxylin gefärbte, randständige Strukturen zu erkennen sind, aber unklar bleibt, ob es sich dabei um einen Nukleolus oder stärker kondensiertes Chromatin handelt. Um zwischen A-pale und B Spermatogonien zuverlässig zu unterscheiden könnte eine Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit SPOC1, einem Nucleolusmarker und einem Kernfarbstoff durchgeführt werden.

Zusammenfassend kann SPOC1 als neuer Marker für die gesamte Spermatogonienpopulation dienen.

4.2.3 Expression von SPOC1 im Maushoden

Im Maushoden ergibt sich das gleiche Bild, wenn man die eingangs erläuterten morphologischen Unterschiede zwischen Mensch und Maus berücksichtigt. Da die Zellklonpopulationen, die von den einzelnen Spermatogonien ausgehen, in der Maus deutlich größer sind als beim Menschen, findet man bei der Maus nur einzelne oder eine kurze Reihe Spermatogonien in den Anschnitten eines Hodenkanälchens. SPOC1 wird im Maushoden ebenfalls in Spermatogonien exprimiert. Allerdings ist die Erkennung der einzelnen Spermatogonien-Stadien schwierig, weshalb Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen zur Unterscheidung der Stadien durchgeführt wurden.

Unklar bleibt, ob die mit der Verstärkungsreaktion angefärbten Strukturen in Spermatocyten I eine Bedeutung haben. Es könnte sich dabei um eine unspezifische Bindung oder um an Chromatin gebundenes SPOC1 handeln. Wenn dem so ist, stellt sich Frage, welche Funktion das Protein dort erfüllt. Die Färbung der Spermatocyten I wurde nur in einigen und nicht in allen Tubuli innerhalb eines Schnitts beobachtet. Dieser Befund legt nahe, dass es sich um Spermatocyten I in einem bestimmten Stadium handelt.

In einer Immunfluoreszenzdoppelfärbung fielen randständige, schwach SPOC1 positive Zellen mit deutlichen, zentralen Nukleoli auf (Abbildung 25). Der Kernmorphologie und der Position innerhalb des Tubulus nach zu urteilen, müsste es sich um Sertolizellen handeln. In anderen Immunfluoreszenzdoppelfärbungen oder konventionellen immunhistochemischen Färbungen ließ sich SPOC1 nicht eindeutig in Sertolizellen nachweisen. Mithilfe einer SPOC1-Knockout-Maus und einer Kontrollmaus würde sich nachweisen lassen, ob die schwach positiven Reaktionen mit der Verstärkungsreaktion und in der Immunfluoreszenz spezifisch sind.

4.2.4 Expression von SPOC1 in anderen Mausgeweben

In den Mausgeweben Milz, Ovar und Dünndarm konnte immunhistochemisch kein SPOC1 Protein nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu anderen Daten, da mit einem Dot-Blot Assay mit radioaktiv markierten Sonden SPOC1 spezifische RNA in zahlreichen humanen Geweben nachgewiesen werden konnte, wenn auch deutlich schwächer als im Hoden (Mohrmann, 2005). Dr. Hannah Staeger (HPI Abteilung 2, persönliche Mitteilung) konnte in den untersuchten Mausgeweben und auch in anderen Mausgeweben

mittels Westernblot eindeutig SPOC1 Protein nachweisen, allerdings mit deutlich geringeren Signalintensitäten als im Hoden.

Es bleibt unklar, warum sich SPOC1 in Geweben mit schwächerer Expression nicht anfärben lässt. Entweder ist die immunhistochemische Färbung nicht sensitiv genug um so geringe Mengen an SPOC1 anzufärben oder SPOC1 ist nur in sehr wenigen Zellen, wie zum Beispiel Stammzellen exprimiert, die im Schnitt übersehen wurden. Des Weiteren würde man einen Nachweis in mitotisch aktiven Zellen erwarten, die in den Krypten des Dünndarms und den Keimzentren der Lymphfollikel der Milz vorkommen, da SPOC1 in Zellkultur in mitotischen Zellen nachgewiesen werden konnte (Kinkley, 2009). Allerdings stammen die Zellkulturen aus Malignomen, sodass man annehmen könnte, dass SPOC1 nur in undifferenzierten Zellen, wie Spermato gonien oder Stammzellen, und in maligne transformierten Zellen exprimiert wird.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für den bisher nicht gelungenen immunhistochemischen Nachweis von SPOC1 in Nicht-Testis-Geweben wäre, dass die geringe Menge SPOC1, aufgrund der kurzen Halbwertszeit von SPOC1 in der Zelle abgebaut ist, bevor das Organ präpariert ist und die Fixationslösung den Proteinabbau in der Zelle stoppt. Zudem ist es denkbar, dass SPOC1 in manchen Geweben und Zellen nur nach intensiver Vorbehandlung der Gewebeschnitte für die Antikörper zugänglich wird.

4.2.5 Immunfluoreszenzdoppelfärbungen im Maushoden

Die Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit GSA-II-Lektinfärbung und einem anti-SPOC1-Antikörper zeigt klar, dass es sich bei den SPOC1 positiven Zellen um Spermato gonien handelt.

Die Immunfluoreszenzdoppelfärbung auf PCNA und SPOC1 zeigt, dass die SPOC1 positiven Zellen DNA replizieren oder andere Aktivitäten durchführen, für die das PCNA-Protein benötigt wird (Moldovan, 2007). Auf einem Schnitt (Abbildung 26) wurden die Mitosephasen Metaphase und Anaphase beobachtet. Hier fand sich nur eine zytoplasmatische, aber keine chromatin-assoziierte Färbung von SPOC1 und PCNA, eine Beobachtung, die auch mit Tumorzelllinien gemacht wurde (Kinkley, 2009).

Die Immunfluoreszenzdoppelfärbung auf PLZF und SPOC1 zeigt, dass die PLZF-positiven Spermato gonien, die wahrscheinlich den Stammzellpool darstellen (Costoya, 2004), (Buaas,

2004) ebenfalls positiv für SPOC1 sind. Allerdings färben sich noch weitere PLZF-negative Spermatogonien mit SPOC1 an, die wahrscheinlich differenzierte Spermatogonien darstellen. Die Immunfluoreszenzdoppelfärbung auf SOHLH1 und SPOC1 zeigt, dass alle SOHLH1 positiven Zellen auch SPOC1 positiv sind, aber nicht alle SPOC1 positiven Zellen gleichzeitig auch SOHLH1 positiv sind. Dies zeigt, dass SPOC1 auch in differenzierenden Spermatogonien bis zum Stadium des B-Spermatogoniums exprimiert wird.

Um die Ergebnisse zu prüfen, wurde eine Immunfluoreszenzdoppelfärbung auf PLZF und SOHLH1 durchgeführt. Diese zeigt, dass es Spermatogonien gibt, die entweder beide Proteine oder nur SOHLH1 exprimieren. Bei den Spermatogonien, die nur PLZF exprimieren, dürfte es sich um Stammspermatogonien, also A-single und A-paired Spermatogonien, handeln. Die Spermatogonien, die beide Marker exprimieren, dürften A-aligned Spermatogonien darstellen. Die Spermatogonien, die nur SOHLH1 exprimieren, dürften A1 bis B-Spermatogonien darstellen. Dieser Befund deckt sich mit dem publizierten Expressionsmuster für PLZF (Buaas, 2004) und dem publizierten Expressionsmuster für SOHLH1 (Ballow, 2006).

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen sagen, dass SPOC1 im Maushoden sowohl in den undifferenzierten, PLZF-positiven Stammspermatogonien, als auch in den differenzierten Spermatogonien, die SOHLH1 exprimieren, vorhanden ist. Dies impliziert, dass SPOC1 auch im Maushoden ein Marker für alle Spermatogonien darstellt.

Spermatogonientyp	A-single	A-paired	A-aligned	A1 - A4	Intermediate	B	präleptotän
SPOC1	+	+	+	+	+	+	-
PLZF	+	+	+	-	-	-	-
SOHLH1	-	-	+	+	+	+	-
PCNA	-	-	-	+	+	+	+

Tabelle 5: Zuordnung der Expression von SPOC1 , PLZF, SOHLH1 und PCNA zu Spermatogonienpopulationen im Maushoden.

4.2.6 Immunfluoreszenzdoppelfärbungen im humanen Hoden

Die SPOC1 positiven Spermatogonien sind im Maushoden stark PCNA positiv, im humanen Hoden dagegen nur schwach. Ehmcke et al. (Ehmcke, 2006) argumentieren, dass ein Großteil der A-pale und A-dark Spermatogonien eine Regenerationsreserve darstellen und deshalb mitotisch inaktiver im Vergleich zu den Spermatogonien der Maus ist. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die schwächere PCNA Färbung.

Die anderen Marker PLZF und SOHLH1 ließen sich im humanen Hoden immunhistochemisch leider nicht darstellen, sodass hier kein Vergleich zur Maus gezogen werden kann.

4.3 Knockdown von SPOC1 im Maushoden

Aus dem Experiment mit dem Doxycyclin induzierbaren SPOC1 Knockdown Mausmodell lassen sich allein keine genauen Schlüsse ziehen, da nur ein Tier einen Phänotyp aufwies und die Anzahl der Tiere zu gering war.

In der Zusammenschau der Ergebnisse mit denen von Bördlein und Kollegen (Bördlein, 2011) publizierten Daten kann aufgrund der gleichen Tendenz angenommen werden, dass der Knockdown von SPOC1 zur Depletion der Stammspermatogonien und damit zur Infertilität führt. Die Depletion der Stammspermatogonien würde zu einem histologischen Bild führen, wie es in den Mäusen beobachtet wurde. In den Tubuli fehlen Spermatogonien und frühe Differenzierungsstufen. Die restlichen Zellen differenzieren sich zu Spermatozoen bis der Tubulus leer ist. Ein ähnlicher Phänotyp wurde von den zwei eingangs erwähnten Gruppen (Costoya, 2004) und (Buaas, 2004) in Mäusen mit defektem PLZF beobachtet.

Im Gegensatz dazu stehen Tubuli mit gestörter Spermatogenese, aber vorhandenen SPOC1-positiven Spermatogonien. Dieser Phänotyp könnte entstehen, wenn intakte Stammspermatogonien atrophische Tubuli wieder besiedeln und deshalb keine späten Differenzierungsstufen zu sehen sind, weil die Spermatogenese gerade erst wieder beginnt. Es wurde publiziert, dass diese Wiederbesiedlung durch eine noch nicht näher charakterisierte Subpopulation der Stammspermatogonien erfolgt (Nakagawa, 2007).

Es bleibt daher noch zu klären wie die Stammspermatogonien verschwinden, ob durch Apoptose oder durch terminale Differenzierung.

Deshalb wurde sowohl mit der TUNEL-Methode als auch mit einer immunhistochemischen Färbung auf aktivierte Caspase3 nach einer erhöhten Apoptoserate gesucht, aber es war kein

signifikanter Anstieg der Apoptose in den Hoden der langzeit-induzierten Mäuse zu messen. Das heißt, dass das Fehlen der Zellen in der induzierten Maus wahrscheinlich nicht auf vermehrte Apoptose zurückzuführen ist oder der Effekt so gering war, dass er nicht gemessen werden konnte. Allerdings bleibt zu berücksichtigen, dass die Subpopulation der Stammspermatogonien, die in der Lage ist die Spermatogenese langfristig aufrecht zu erhalten, wahrscheinlich sehr klein ist. Oatley und Kollegen konnten nachweisen, dass Inhibitor of DNA Binding 4 (ID4) im Maushoden nur in A-single Spermatogonien vorkommt und ein Knockout von ID4 führt ebenfalls zu einem ähnlichen Phänotyp wie der Knockout von SPOC1 oder PLZF mit Depletion von Spermatogonien und Infertilität (Oatley, 2011). Die vermehrte Apoptose von A-single Spermatogonien nachzuweisen ist aufgrund ihrer geringen Anzahl sehr schwierig.

Eine alternative Erklärung für die Depletion der Spermatogonien ist eine terminale Differenzierung der Spermatogonien, also dass keine der Spermatogonien nach erfolgter Mitose die vollen Stammzelleigenschaften behält und alle Spermatogonien sich nach und nach zu reifen Spermatozoen differenzieren.

Des Weiteren bleibt zu klären, welche Menge Protein benötigt wird um die Spermatogenese aufrecht zu halten, beziehungsweise wie stark der Knockdown letztendlich im Tier ist. Dies dürfte insbesondere von der Pharmakokinetik und -dynamik des Doxycyclins abhängen. Genaue Plasmaspiegel wurden nicht bestimmt.

Trotz alledem weist das Experiment daraufhin, dass SPOC1 zur Aufrechterhaltung des Spermatogonienstammzellpools nötig ist. Um dies zu bestätigen sind weitere Experimente erforderlich. Ein Transplantationsexperiment wie es für OCT4 (Dann, 2008) oder für PLZF durchgeführt wurde (Buaas, 2004), (Costoya, 2004), könnte klären, ob SPOC1 bei der Aufrechterhaltung des Spermatogonienstammzellpools eine entscheidende Rolle spielt. Hierzu müsste man Spermatogonien der SPOC1-Knockdown-Mäuse in die Hoden von spermatogonien-depletierten Mäusen einbringen und untersuchen, ob die Spender-Spermatogonien in der Lage sind, die leeren Tubuli wieder zu besiedeln. Einmal mit und einmal ohne Induktion der shRNA-Expression durch Doxycyclin.

Des Weiteren wäre es wünschenswert zu untersuchen, ob sich die Expression von SPOC1 in Spermatogonien ändert, wenn andere für das Überleben der Spermatogonien essentielle Proteine - wie zum Beispiel PLZF oder TAF4b - ausgeschaltet sind. Dies könnte Rückschlüsse auf mögliche gegenseitige Abhängigkeiten dieser Proteine bezüglich deren Stabilität und Expressionshöhe oder durch sie regulierte Gene aufdecken.

4.4 Phänotyp im Ileum von homozygoten SPOC1 Knockdown Mäusen

Der homozygote Genotyp der SPOC1-kd-Maus weist eine vollständige Penetranz auf, da alle homozygoten Tiere einen Phänotyp im Dünndarm aufwiesen.

Durch die enzymhistochemische Färbung auf alkalische Phosphatase konnten die veränderten Zellen im Dünndarm als Enterozyten identifiziert werden. Die Ölrot-Färbung legt nahe, dass sich Fette in den Enterozyten anhäufen. Die negative Reaktion auf die PAS-Färbung legt diese Interpretation nahe, da die optisch leeren Räume nicht mit neutralen Kohlenhydraten ausgefüllt sind, was neben Fetten die zweite Interpretationsmöglichkeit für leere Räume im Paraffinschnitt in der H.E. Färbung darstellt.

Endgültig zu klären bleibt, weshalb die Zellen in der H.E. und PAS-Färbung balloniert wirken, während dies bei der Ölrot-Färbung nicht der Fall ist. Hierbei könnte es sich um ein Einbettungsartefakt handeln, da das Material für die Paraffinschnitte 3 Tage lang Isopropanol ausgesetzt war, im Gegensatz zu den Gefrierschnitten für die Ölrot-Färbung.

Über die genaue Ursache des Phänotyps kann nur spekuliert werden. Möglich wäre, dass eine zu hohe Expression des Tet-Repressors Einfluss auf Signalwege innerhalb der Zelle nimmt. Auf der anderen Seite wäre auch eine Expression der shRNA denkbar, die nicht durch den Tet-Repressor gehemmt wird, weil bei zwei Allelen nicht genügend Tet-Repressor vorhanden ist. Es bleibt jedenfalls noch zu klären, ob der Effekt vom Tet-Repressor, der shRNA und damit eines Knockdown von SPOC oder von der homozygoten Inaktivierung des Rosa26-Locus ausgeht. Einen Hinweis auf eine Beteiligung des Tet-Repressors liefert das Phänomen, dass mit Doxycyclin induzierte homozygote Tiere keinen tödlichen Phänotyp entwickeln, da das Doxycyclin eine Inaktivierung des Tet-Repressors bewirkt. In diesem Zusammenhang sollte überprüft werden ob mit Doxycyclin induzierte homozygote Tiere sterben, wenn sie kein Doxycyclin mehr erhalten.

Wang und Mitarbeiter (Wang, 2002) zeigten, dass eine Ausschaltung des Hedgehog-Signalwegs mit einem monoklonalen Antikörper in Mausembryonen zu einem ähnlichen Phänotyp führt. Die Tiere sterben ebenfalls etwa 3 Wochen nach der Geburt und weisen Fettanreicherungen in den Enterozyten auf.

Daher sollte überprüft werden, ob es eine Verbindung zwischen dem Hedgehog-Signalweg und SPOC1 gibt, denn es ist denkbar, dass SPOC1 über den Hedgehog-Signalweg reguliert

wird oder umgekehrt. Dieses Projekt ist schwierig zu realisieren, da noch nicht klar ist in welchen Zellen SPOC1 im Dünndarm exprimiert wird. Immunhistochemische Färbungen im Dünndarm auf SPOC1 haben bisher noch nicht funktioniert.

Des Weiteren sollte auch ein Einfluss des Tet-Repressors auf den Hedgehog-Signalweg überprüft werden.

Das Krankheitsbild der Abetalipoproteinämie beim Menschen zeigt einen mit ähnlichem Phänotyp im Dünndarm (Berriot-Varoqueaux, 2000). Die Krankheit wird durch einen homozygoten Defekt des microsomal triglyceride transport protein (MTP) verursacht. Die Betroffenen können aufgrund des Defekts nicht ausreichend Chylomikronen und VLDL produzieren, was zur Malabsorption von Lipiden und damit verbunden auch zur Malabsorption der fettlöslichen Vitamine führt. Die Abetalipoproteinämie manifestiert sich im Säuglingsalter mit Steatorrhoe, Erbrechen und abdomineller Schwellung. Die Symptome bessern sich mit fettarmer Ernährung. Allerdings kommt es im weiteren Verlauf zu neurologischen und opthalmologischen Symptomen wie Verlust der Propriozeption mit Dysmetrie, Ataxie und verändertem Gangbild sowie Muskelschwäche und Nachtblindheit sowie im späteren Verlauf Skotome. Die neurologischen und opthalmologischen Symptome sind wahrscheinlich Vitaminmangel bedingt. Des Weiteren kann eine Fettleber durch die gestörte Lipoproteinproduktion und Akantocytose mit Hämolyse auftreten. Mögliche Ursache ist die gestörte Lipidzusammensetzung der Erythrocytenmembran. Blutungsneigung und Herzinsuffizienz können ebenfalls vorkommen.

Entscheidend ist der identische Phänotyp im Dünndarm mit ballonierten Enterocyten mit klarem Zytoplasma in den oberen zwei Dritteln der Villi. Die veränderten Enterocyten sind ebenfalls mit Ölrot anfärbbar. Außerdem zeigt sich endoskopisch eine weiße Verfärbung der Dünndarmmukosa durch die eingelagerten Lipide.

Es wurde publiziert, dass der MTP-Inhibitor T-0126 ein ähnliches histologisches Bild im Dünndarm der Ratte hervorruft (Miyazaki, 2007). Des Weiteren beobachteten Miyazaki und Mitarbeiter Leberverfettung und Veränderungen der Blutgerinnung wie bei der Abetalipoproteinämie.

Des Weiteren wurde über einen ähnlichen Phänotyp in homozygoten Rosa26-CreERT2 Mäusen berichtet (Glaser, 2009). Das CreERT2 Fusionsprotein enthält die Cre-Rekombinase und den Östrogenrezeptor 2. Die Rekombinaseaktivität wird in Gegenwart von Tamoxifen aktiviert. Wenn das Fusionsprotein durch Tamoxifen in homozygoten Rosa26-CreERT2 Mäusen aktiviert wurde, starb ungefähr die Hälfte der Mäuse an gastrointestinalen Komplikationen. Histologische Untersuchungen der verstorbenen Mäuse wurden von den

Autoren nicht durchgeführt. Trotzdem liefert diese Publikation einen Hinweis, dass der inaktivierte Rosa26-Locus für das Problem verantwortlich sein könnte, da hier ein anderer Vektor in den Rosa26-Locus eingebracht wurde.

4.5 Seminom

Die Arbeit zeigte das Seminome unterschiedlich viel SPOC1 exprimieren, bis hin zu nicht nachweisbaren Mengen. Dies wirft die Frage auf, ob eventuell ein ähnlicher Zusammenhang zwischen der Expression von SPOC1 und dem Überleben der Krebspatienten besteht, wie Mohrmann und Mitarbeiter für das Ovarialkarzinom berichteten (Mohrmann, 2005). Allerdings könnte das Verhältnis von SPOC1-Expression und Überleben hier auch umgekehrt sein, da normale Spermatogonien ebenfalls SPOC1 exprimieren und die Expression von SPOC1 in Seminomen eventuell eine hohe Differenzierung anzeigt und gut differenzierte Tumoren generell weniger aggressiv sind als schlecht differenzierte Tumoren. Der Zusammenhang zwischen SPOC1 und dem Überleben der Patienten sollte genauer untersucht werden. Es sollte ebenfalls geprüft werden, ob ein Unterschied im Ausmaß der DNA-Methylierung zwischen SPOC1 positiven und negativen Seminomen besteht, da hohe DNA-Methylierung mit Chemotherapieresistenz in Seminomen, und somit Überleben, in Verbindung gebracht werden konnte (Wermann, 2010). SPOC1 könnte, als chromatin-assoziiertes Protein, auch selbst an der DNA-Methylierung beteiligt sein, da andere Proteine mit PHD-Domänen, wie zum Beispiel MLL5 (Mixed Lineage Leukaemia), ebenfalls an DNA-Methylierung beteiligt sind (Heuser, 2009).

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob SPOC1 auch in Gonocyten und Präspmatogonien exprimiert wird, wie dies bei den anderen Markerproteinen OCT4, NANOG und AP-2 γ der Fall ist. Mit dieser Information könnte man eine Aussage treffen, ob SPOC1 positive Seminome eher frühen oder eher späten Entwicklungsstufen der Gonocyten bzw. Präspmatogonien zuzuordnen sind und zudem möglicherweise Rückschlüsse daraus ziehen, ob die maligne Transformation der Vorläuferzellen von SPOC1 positiven Seminomen zu einem anderen Zeitpunkt in der Entwicklung stattgefunden hat als die der Vorläuferzellen von SPOC1 negativen Seminomen.

Einige Tumorzellen enthalten auch SPOC1 positive Nukleoli oder zumindest eine fokale Verteilung von SPOC1 positivem Chromatin. Daher könnte auch eine Assoziation mit dem Nukleolus beziehungsweise der Nukleolus Organisator Region vorliegen. Die Nukleolus

Organisator Region ist durch eine Silberfärbung anfärbbar und ist in CiS-Zellen vermehrt vorhanden (Müller, 1994).

Zu erklären bleibt auch noch, was die SPOC1 positiven Kappen an der Kernmembran zu bedeuten hat. Ein Artefakt ist unwahrscheinlich, da es nur in einigen Tumoren auftritt, sowohl in einem CiS als auch in zwei soliden Tumoren. Butler et al. konnten ähnliche Strukturen bestehend aus Lamin A/C, Emerin und PML in differenzierten embryonalen Stammzellen finden. Lamin B ist in undifferenzierten embryonalen Stammzellen perinukleär lokalisiert (Butler, 2009). In allen Keimzelltumoren wurde Lamin B nachgewiesen, aber in Seminomen und CiS mit Ras-Mutation auch Lamin A/C (Machiels, 1997). Es sollte daher untersucht werden, ob die Kappen-Strukturen neben SPOC1 auch Lamin A/C, Emerin oder PML enthalten und ob die Keimzelltumoren mit SPOC1-positiver Kappen-Struktur eine Ras-Mutation aufweisen.

5 Zusammenfassung

SPOC1 steht für “Survival time – associated PHD protein in ovarian cancer”, da für erhöhte RNA-Spiegel des SPOC1-Gens eine Assoziation mit verkürztem Überleben bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom berichtet wurde. Dieser Bericht zeigte höchste RNA-Spiegel im humanen Testis und dort ausschließlich in Spermato gonien. Zu Beginn der Arbeit war über die Expression, Lokalisation und Funktion des SPOC1-Proteins im Testis nichts bekannt und sollte daher erstmals untersucht werden. Zunächst wurde eine immunhistochemische Färbung zum Nachweis des SPOC1 Proteins entwickelt. Hierdurch konnte erstmals nachgewiesen werden, dass das SPOC1 Protein im humanen Hoden in allen drei morphologisch unterscheidbaren Spermato gonientypen exprimiert wird.

Ähnlich wie beim Menschen, wurde auch im Maushoden nukleäre SPOC1-Proteinexpression sowohl in undifferenzierten, PLZF positiven, als auch in SOHLH1 positiven, differenzierten Spermato gonien immunhistochemisch nachgewiesen. Um Einsichten in die Funktion des Proteins zu erhalten, wurde ein partieller Doxycyclin induzierbarer Knockdown von SPOC1 in der Maus histologisch untersucht. Bei einem von zwei untersuchten männlichen Tieren wurde in den Tubuli seminiferi eine unterschiedlich stark ausgeprägte Depletion von Keimzellen bis hin zum Sertoly only Phänotyp beobachtet, ein Indiz für die Funktion von SPOC1 in der Differenzierung und Erhalt der Keimzellen.

Mäuse mit homozygoter Integration der shRNA Knockdown Konstrukte verstarben 3 Wochen post partum und zeigten vermehrte Lipidspeicherung im Dünndarm, die auf den stärkeren SPOC1 Knockdown oder auf andere Effekte des Transgens zurück zu führen sein könnte.

Stimuliert durch die nachgewiesene SPOC1-Proteinexpression in Spermato gonien und dem Zusammenhang von SPOC1 mit Karzinomen wurde analysiert, ob das SPOC1-Protein auch in Seminomen, einem Tumor der aus Vorläuferzellen von Spermato gonien entsteht, exprimiert wird. Granuläres SPOC1 Protein wurde in Zellkernen von mehreren Tumorbiopsien nachgewiesen. In einigen Biopsien fand sich das Protein kappenförmig an der Kernmembran, ähnlich wie für spezifische Stadien von embryonalen Stammzellen beschrieben.

Zusammenfassend gelang es mit dieser Arbeit detaillierte Informationen über die Spermato gonienstadium-spezifische Expression, subzelluläre Lokalisation und Funktion von SPOC1 im Testis zu gewinnen. Der Nachweis der SPOC1-Expression in Hodentumoren ist ein weiteres Indiz für die mögliche Rolle von SPOC1 bei Entstehung oder Progression von Tumorerkrankungen.

6 Literaturverzeichnis

- Akama, T.O., Nakagawa, H., Sugihara, K., Narisawa, S., Ohyama, C., Nishimura, S.I., O'Brien, D.A., Moremen, K.W., Millan, J.L., Fukuda, M.N. 2002.** Germ cell survival through carbohydrate-mediated interaction with Sertoli cells. *Science*. 2002, Bd. 295, S. 124-7.
- Ballow, D., Meistrich, M.L., Matzuk, M. & Rajkovic, A. 2006.** Sohlh1 is essential for spermatogonial differentiation. *Dev Biol*. 2006, Bd. 294, S. 161-7.
- Berriot-Varoqueaux, N., Aggerbeck, L.P., Samson-Bouma, M., Wetterau, J.R. 2000.** The role of the microsomal triglyceride transfer protein in Abetalipoproteinemia. *annu rev nutr*. 2000, Bd. 20, S. 663-697.
- Bördlein, A., Scherthan, H., Nelkenbrecher, C, Molter, T, Bösl, MR, Dippold, C, Birke, K, Kinkley, S, Staeger, H, Will, H, Winterpacht, A. 2011.** SPOC1 (PHF13) is required for spermatogonial stem cell differentiation and sustained spermatogenesis. *Journal Cell Science*. 2011, 124, S. 3137-48.
- Buaas, F.W., Kirsh, A.L., Sharma, M., McLean, D.J., Morris, J.L., Griswold, M.D., de Rooij, D.G., Braun, R.E. 2004.** Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat Genet*. 36, 2004, S. 647-52.
- Burke, A.P. & Mostofi F.K. 1988.** Placental Alkaline Phosphatase Immunohistochemistry of Intratubular Malignant Germ Cells and Associated Testicular Germ Cell Tumors. *Hum Pathol*. 1988, Bd. 9, 6, S. 663-70.
- Butler, J.T., Hall, L.L., Smith, K.P. & Lawrence, J.B. 2009.** Changing Nuclear Landscape and Unique PML Structures During Early Epigenetic Transitions of Human Embryonic Stem Cells. *J Cell Biochem*. 2009, Bd. 107, S. 609–621.
- Chen, C., Ouyang, W., Grigura, V., Zhou, Q., Carnes, K., Lim, H., Zhao, G.Q., Arber, S., Kurpios, N., Murphy, T.L., Cheng, A.L., Hassell, J.A., Chandrashekar, V., Hofmann, M.C., Hess, R.A., Murphy, K.M. 2005.** ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche. *Nature*. 2005, Bd. 436, S. 1030-34.
- Clermont, Yves. 1963.** The Cycle of the Seminiferous Epithelium in Man. *Am J Anat*. 1963, Bd. 112, S. 35-51.
- Costoya, J.A. & Pandolfi, P.P. 2001.** The role of promyelocytic leukemia zinc finger and promyelocytic leukemia in leukemogenesis and development. *Curr Opin Hematol*. 2001, Bd. 8, S. 212-7 .
- Costoya, J.A., Hobbs, R.M., Barna, M., Cattoretti, G., Manova, K., Sukhwani, M., Orwig, K.E., Wolgemuth, D.J., Pandolfi, P.P. 2004.** Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat Genet*. 2004, Bd. 36, S. 653-9 .
- Dadoune, J.P. 2007.** New insights into male gametogenesis: what about the spermatogonial stem cell niche? *Folia Histochem Cytobiol*. 2007, Bd. 45, S. 141-7.
- Dann, C.T., Alvarado, A.L., Molyneux, L.A., Denard, B.S., Garbers, D.L., Porteus, M.H. 2008.** Spermatogonial stem cell self-renewal requires OCT4, a factor downregulated during retinoic acid-induced differentiation. *Stem Cells*. 2008, Bd. 26, S. 2928-37.
- Davidoff, M. & Schulze, W. 1990.** Combination of the peroxidase anti-peroxidase (PAP)- and avidin-biotin-peroxidase complex (ABC)-techniques: an amplification alternative in immunocytochemical staining. *Histochemistry*. 1990, Bd. 93, S. 531-6 .
- Dawson, Mark A. Kouzarides, Tony. 2012.** Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy. *Cell*. 2012, Bd. 150, S. 12 - 27.
- Edinburgh, The University Of. 2003.** Cells Of The Ever Young: Getting Closer To The Truth. *ScienceDaily*. 2. Juni 2003.
- Ehmcke, J., Wistuba, J. & Schlatt, S. 2006.** Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives. *Hum Reprod Update* . 2006, Bd. 12, S. 275-82.

- Falender, A.E., Freiman, R.N., Geles, K.G., Lo, K.C., Hwang, K.S., Lamb, D.J., Morris, P.L., Tjian, R., Richards, J.S. 2005.** Maintenance of spermatogenesis requires TAF4b, a gonad-specific subunit of TFIID. *Genes Dev.* 2005, Bd. 19, S. 794-803.
- Garcia-Alai, M.M., Gallo, M., Salame, M., Wetzler, D.E., McBride, A.A., Paci, M., Cicero, D.O., de Prat-Gay, G. 2006.** Molecular basis for phosphorylation-dependent, PEST-mediated protein turnover. *Structure.* 2006, Bd. 14, S. 309-19.
- Glaser, S, Lubitz, S, Loveland, KL, Ohbo, K, Robb, L, Schwenk, F, Seibler, J, Roellig, D, Kranz, A, Anastassiadis, K, Stewart, AF. 2009.** The histone 3 lysine 4 methyltransferase, Mll2, is only required briefly in development and spermatogenesis. *Epigenetics & Chromatin.* 2009, Bd. 2, 5.
- Heuser, M, Yap DB, Leung, M, Ruiz de Algora, T, Tafech, A, McKinney, S, Dixon, J, Thresher, R, Colledge, B, Carlton, M, Humphries, RK, Aparicio, SA. 2009.** Loss of Mll5 results in pleiotropic hematopoietic defects, reduced neutrophil immune function, and extreme sensitivity to DNA demethylation. *Blood.* 2009, Bd. 113, S. 1432-1443.
- Hobbs, R.M., Seandel, M., Falciatori, I., Raffi, S. & Pandolfi, P.P. 2010.** Plzf Regulates Germline Progenitor Self-Renewal by Opposing mTORC1. *Cell.* 2010, Bd. 142, S. 468–479.
- Hoei-Hansen, C.E., Almstrup, K., Nielsen, J.E., Brask Sonne, S., Graem, N., Skakkebaek, N.E., Leffers, H., Rajpert-De Meyts, E. 2005.** Stem cell pluripotency factor NANOG is expressed in human fetal gonocytes, testicular carcinoma in situ and germ cell tumours. *Histopathology.* 2005, Bd. 47, S. 48–56.
- Hoei-Hansen, C.E., Nielsen, J.E., Almstrup, K., Brask Sonne, S., Graem, N., Skakkebaek, N.E., Leffers, H., Rajpert-De Meyts, E. 2004.** Transcription Factor AP-2gamma Is a Developmentally Regulated Marker of Testicular Carcinoma In situ and Germ Cell Tumors. *Clin Cancer Res.* 2004, Bd. 10, S. 8521–8530.
- Holstein, A.F., Lauke, H. 1996.** Histologic Diagnostics of Early Testicular Germ-Cell Tumor. *Int J Urol.* 1996, Bd. 3, S. 165-172.
- Holstein, A.F., Schulze, W., Davidoff, M. 2003.** Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol.* November 2003, Bd. 1:107.
- Honecker, F., Stoop, H., de Krijger, R.R., Lau, Y.F.C., Bokemeyer, C., Looijenga, L.H.J. 2004.** Pathobiological implications of the expression of markers of testicular carcinoma in situ by fetal germ cells. *J Pathol.* 2004, Bd. 203, S. 849–857.
- Itoh, K, Konishi, A, Nomura, S, Mizuno, N, Nakamura, Y, Sugimoto, T. 1979.** Application of coupled oxidation reaction to electron microscopic demonstration of horseradish peroxidase, cobalt-glucose oxidase method. *Brain Research.* 1979, Bd. 175, S. 341-334.
- Kamel, D., Mackey, Z.B., Sjoblom, T., Walter, C.A., McCarrey, J.R., Uitto, L., Palosaari, H., Lahdetie, J., Tomkinson, A.E., Syvijoja, J.E. 1997.** Role of deoxyribonucleic acid polymerase epsilon in spermatogenesis in mice. *Biol Reprod.* 1997, Bd. 57, S. 1367-74.
- Kim a, S.H., Kook, M.C., Shin, Y.K., Park, S.H. & Song, H.G. 2004.** Evaluation of antigen retrieval buffer systems. *J Mol Histol.* 2004, Bd. 35, S. 409-16.
- Kim b, S.H., Kook, M.C. & Song, H.G. 2004.** Optimal conditions for the retrieval of CD4 and CD8 antigens in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Histol.* 2004, Bd. 35, S. 403-8.
- Kim, S.H., Kook, M.C. & Song, H.G. 2004.** Optimal conditions for the retrieval of CD4 and CD8 antigens in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Histol.* 2004 йил, Vol. 35, pp. 403-8.
- Kim, S.H., Kook, M.C., Shin, Y.K., Park, S.H. & Song, H.G. 2004.** Evaluation of antigen retrieval buffer systems. *J Mol Histol.* 2004 йил, Vol. 35, pp. 409-16.
- Kinkley, S., Staeger, H., Mohrmann, G., Rohaly, G., Schaub, T., Kremmer, E., Winterpacht, A., Will, H. 2009.** SPOC1: a novel PHD-containing protein modulating

- chromatin structure and mitotic chromosome condensation. *J Cell Sci.* 2009, Bd. 122, S. 2946-56.
- Li, Yuanyuan, Li, Haitao. 2012.** Many keys to push: diversifying the ‘readership’ of plant homeodomain fingers. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2012, Bd. 44, S. 28 - 39.
- Looijenga, L.H.J., Stoop, H., de Leeuw, H.P.J.C., de Gouveia Brazao, C.A., Gillis, A.J.M., van Roozendaal, K.E.P., van Zoelen, E.J.J., Weber, R.F.A., Wolffenbuttel, K.P., van Dekken, H., Honecker, F., Bokemeyer, C., Perlman, E.J., Kononen, J., Sauter, G., Oosterhuis, J.W. 2003.** POU5F1 (OCT3/4) Identifies Cells with Pluripotent Potential in Human Germ Cell Tumors. *Cancer Res.* 2003, Bd. 63, S. 2244–2250.
- Lundquist, I, Josefsson, JO. 1971.** Sensitive Method for Determination of Peroxidase Activity in Tissue by Means of Coupled Oxidation Reaction. *Analytical Biochemistry.* 1971, Bd. 41, S. 567-577.
- Machiels, B.M., Ramaekers, F.C.S., Kuijpers, H.J.H., Groenewoud, J.S., Oosterhuis J.W., Looijenga, L.H.J. 1997.** Nuclear Lamin Expression in normal Testis and Testicular Germ Cell Tumours of Adolescents and Adults. *J Pathol.* 1997, Bd. 182, S. 197–204.
- Meng, X., Lindahl, M., Hyvoenen, M.E., Parvinen, M., de Rooij, D.G., Hess, M.W., Raatikainen-Ahokas, A., Sainio, K., Rauvala, H., Lakso, M., Pichel, J.G., Westphal, H., Saarma, M., Sariola, H. 2000.** Regulation of Cell Fate Decision of Undifferentiated Spermatogonia by GDNF. *Science.* 2000, Bd. 287, S. 1489-93.
- Miyachi, K., Fritzler, M.J. & Tan, E.M. 1978.** Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol.* 1978, Bd. 121, S. 2228-34.
- Miyazaki, T., Miwa, S., Kodama, H., et al. 2007.** Hepatic and Intestinal Changes in Rats treated with T-0126, a microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTP) Inhibitor. *J Toxicol Sci.* 2007, Bd. 32, 2, S. 161-177.
- Mohrmann, G., Hengstler, J.G., Hofmann, T.G., Ende S.U., Lee, B., Stelzer, C., Zabel, B., Brieger J., Hasenclever, D., Tanner, B., Sagemueller, J., Sehoul, J., Will, H., Winterpacht, A. 2005.** SPOC1, a novel PHD-finger protein: Association with residual disease and survival in ovarian cancer. *Intl J Cancer.* 2005, Bd. 116, S. 547–554.
- Moldovan, G.L., Pfander, B. & Jentsch, S. 2007.** PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell.* 2007, Bd. 129, S. 665-79.
- Müller, J., Skakkebek, N.E., Nielsen, O.H., Graem, N. 1984.** Cryptorchidism and Testis Cancer: Atypical Infantile Germ Cells Followed by Carcinoma in Situ and Invasive Carcinoma in Adulthood. *Cancer.* 1984, Bd. 54, S. 629-634.
- Müller, M., Lauke, H., Hartmann, M. 1994.** The Value of the AgNOR staining Method in Identifying Carcinoma in Situ Testis. *Path. Res Pract.* 1994, Bd. 190, S. 429-435.
- Nakagawa, T., Nabeshima, Y. & Yoshida, S. 2007.** Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. *Dev Cell.* 2007, Bd. 12, S. 195-206.
- Oakberg, E.F. 1956.** A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am J Anat.* 1956, Bd. 99, S. 391-413.
- Oatley, M. J., Kaucher, A. V., Racicot, K. E., and Oatley J. M. 2011.** Inhibitor of DNA Binding 4 Is Expressed Selectively by Single Spermatogonia in the Male Germline and Regulates the Self-Renewal of Spermatogonial Stem Cells in Mice. *Biology of Reproduction.* 2011, Bd. 85, S. 347–356.
- Ohta, H., Yomogida, K., Dohmae, K. & Nishimune, Y. 2000.** Regulation of proliferation and differentiation in spermatogonial stem cells: the role of c-kit and its ligand SCF. *Development.* 2000, Bd. 127, S. 2125-2131.
- Rayasam, G.V., Tulasi, V.K., Sodhi, R., Davis, J.A., Ray, A. 2009.** Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake. *Br J Pharmacol.* 2009, Bd. 156, S. 885-98.

- Reader, J.C. Meekins, J.S. Gojo, I. Ning, Y. 2007.** A novel NUP98-PHF23 fusion resulting from a cryptic translocation t(11;17)(p15;p13) in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2007, Bd. 21, S. 842 – 844.
- Rechsteiner, M. & Rogers, S.W. 1996.** PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci*. 1996, Bd. 21, S. 267-71 .
- Rosenberg, C., Van Gurp, R.J.H.L.M., Geelen, E., Oosterhuis, J.W., Looijenga, L.H.J. 2000.** Overrepresentation of the short arm of chromosome 12 is related to invasive growth of human testicular seminomas and nonseminomas. *Oncogene*. 2000, Bd. 19, S. 5858-62.
- Schulze, W. & Rehder U. 1984.** Organization and morphogenesis of the human seminiferous epithelium. *Cell Tissue Res*. 1984, Bd. 237, S. 395-407.
- Skakkebaek, N.E., Berthelsen, J.G., Giwercman, A., Müller, J. 1987.** Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. *Int J Androl*. 1987, Bd. 10, S. 19-28.
- Stoop, H., Honecker, F., van de Geijn, G.J.M., Gillis, A.J.M., Cools, M.C., de Boer, M., Bokemeyer, C., Wolffenbuttel, K.P., Drop, S.L.S, de Krijger, R.R., Dennis, N., Summersgill, B., McIntyre, A., Shipley, J., Oosterhuis, J.W., Looijenga, L.H.J. 2008.** Stem cell factor as a novel diagnostic marker for early malignant germ cells. *J Pathol*. 2008, Bd. 216, S. 43-54.
- Wang, C.Q. & Cheng, C.Y. 2007.** A seamless trespass: germ cell migration across the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *J Cell Biol*. 2007, Bd. 178, S. 549-56.
- Wang, Gang G. Song, Jikui. Wang, Zhanxin. Dormann, Holger L. Casadio, Fabio. Li, Haitao. Luo, Jun-Li. 2009.** Haematopoietic malignancies caused by dysregulation of a chromatin-binding PHD finger. *Nature*. 2009, Bd. 459, S. 847 - 853.
- Wang, L.C. et al. 2002.** Disruption of hedgehog signaling reveals a novel role in intestinal morphogenesis and intestinal-specific lipid metabolism in mice. *Gastroenterology*. 2002, Bd. 122, S. 469-82.
- Wermann, H., Stoop H., Gillis A.J.M., Honecker, F., van Gurp, R.J.H.L.M., Ammerpohl, O., Richter, J., Oosterhuis, J.W., Bokemeyer, C., Looijenga, L.H.J. 2010.** Global DNA methylation in fetal human germ cells and germ cell tumours: association with differentiation and cisplatin resistance. *J Pathol*. 2010, Bd. 221, S. 433–442.
- Wrobel, K.H., Bickel, D. & Kujat, R. 1996.** Immunohistochemical study of seminiferous epithelium in adult bovine testis using monoclonal antibodies against Ki-67 protein and proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *Cell Tissue Res*. 1996, Bd. 283, S. 191-201.
- Yan, W., Ma, L., Burns, K.H. & Matzuk, M.M. 2003.** HILS1 is a spermatid-specific linker histone H1-like protein implicated in chromatin remodeling during mammalian spermiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003, Bd. 100, S. 10546-51.
- Yang, Y., Honaramooz, A. 2012.** Characterization and Quenching of Autofluorescence in Piglet Testis Tissue and Cells. *Anatomy Research International*. 2012, Bd. 2012.
- Zaborszky, L. & Cullinan, W.E. 1989.** Hypothalamic axons terminate on forebrain cholinergic neurons: an ultrastructural double-labeling study using PHA-L tracing and ChAT immunocytochemistry. *Brain Res*. 1989, Bd. 479, S. 177-84.

7 Danksagung

Ich danke allen Menschen, die mich bei meiner Dissertation unterstützt haben:

- den Professoren Udo Schumacher und Hans Will für die Stellung des Themas und die fortwährende Unterstützung
- Dr. Hannah Staege und Dr. Sarah Kinkley für die fortwährende Beratung
- Dr. Heidrun Lauke für die zur Verfügung gestellten Gewebe, die Unterstützung beim Mikroskopieren und Empfehlungen
- Prof. Adolf Friedrich Holstein und Dr. Michael Hartmann für die zur Verfügung gestellten Gewebe
- Susanne Feldhaus, Urte Matschl, Tjandra Cöllen, Christine Knies, Dorothee Köhler, Renathe Gehrcke und Carsten Köpke für die Einführung in die Histologie und Immunhistochemie
- Prof. Wolfgang Schulze und Prof. Christiane Kirchhoff sowie Dr. Kathrein von Kopylow für die zur Verfügung gestellten Gewebe und Materialien, sowie die Unterstützung beim Mikroskopieren und die Tipps
- Theres Schaub für die Überlassung einiger Grafiken und erteilten Anregungen
- Dr. Elisabeth Kremer für die Herstellung der Antikörper gegen SPOC1, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre
- Prof. Andreas Winterpacht und Prof. Harry Scherthan für die Anregungen bei unseren Treffen
- Dr. Gabor Rohaly für die zur Verfügung gestellten Antikörper und auch allen anderen Kollegen der Abteilung 2 des Heinrich Pette Instituts, die hier nicht namentlich genannt sind
- Dr. Rudolph Reimer und den anderen Kollegen der Abteilung für Elektronenmikroskopie des Heinrich Pette Instituts für die Unterstützung beim Mikroskopieren mit dem konfokalen Mikroskop
- Prof. Leendert Looijenga und Dr. Friedemann Honecker für die Anregungen und Diskussionen zum Seminom bei unseren Treffen

8 Lebenslauf

Stefan Ficke

Geburtsort und Datum: 12.12.1984 in Bremen

Ausbildung:

Seit 08.2012	Klinikum Links der Weser, Bremen Facharztausbildung Innere Medizin
10.2005 – 06.2012	Universität Hamburg, Hamburg Studium der Humanmedizin 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung 09.2007 Studienwahlfach: Experimentelle Medizin PJ-Wahlfach: Anästhesie 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung 06.2012
07.2005 – 09.2005	Klinikum Links der Weser, Bremen Krankenpflegepraktikum
06.2005	Rettungsschule Goslar Abschlusslehrgang zum Rettungssanitäter
08.2004 – 05.2005	DRK-Rettungswache Leeste, Weyhe Zivildienst als Rettungshelfer
1995 – 2004	Kooperative Gesamtschule Leeste, Weyhe
25.6.2004	Abitur (Physik, Biologie, Politik, Englisch)
1991 – 1995	Grundschule Lahausen, Weyhe

9 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig 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: