

**Diplomarbeit**

**Immunhistochemische Analyse von Molekülen der  
Blut-Hoden-Schranke und des Zytoskeletts von Sertoli-  
und Leydig-Zellen**

eingereicht von

**Mark Barwig**

zur Erlangung des Akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde**

**(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt am

**Institut für Zellbiologie, Histologie und Embryologie**

Unter der Anleitung von

**Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Heinz Hutter**

**O. Univ.-Prof. Dr. Gottfried Dohr**

## **Eidesstaatliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 10.09.2015

Mark Barwig eh.

## **Danksagung**

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen BetreuerInnen Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Heinz Hutter, BMA Prof. Astrid Blaschitz und O. Univ.-Prof. Gottfried Dohr für ihre hervorragende Unterstützung durch ihr fachliches Wissen und ihre Erfahrung bei der Erstellung dieser Diplomarbeit bedanken. Sie behandelten mich stets sehr freundlich, ich konnte mich mit meinen Fragen jederzeit an sie wenden und konnte durch ihre Hilfe sehr viel lernen, mir verschiedene Fertigkeiten aneignen und neue Erfahrungen sammeln.

Bedanken möchte ich mich aber auch bei allen MitarbeiterInnen des Instituts für Zellbiologie, Histologie und Embryologie für ihre Hilfsbereitschaft und fachkundige Unterstützung.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Freundin für ihre Ermutigung, für ihr Verständnis und ihre Unterstützung in der Zeit der Entwicklung dieser Arbeit danken.

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	6
Zusammenfassung.....	7
Abstract.....	8
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 Allgemeines zum Keimepithel und zur Blut-Hoden-Schranke.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2 Die Sertoli-Zelle.....</b>	<b>11</b>
<b>1.3 Zytoskelett der Sertoli-Zelle.....</b>	<b>12</b>
<b>1.4 Leydig-Zellen.....</b>	<b>13</b>
<b>1.5 Spermatogenese und die Blut-Hoden-Schranke.....</b>	<b>13</b>
1.5.1 Mitose.....	14
1.5.2 Meiose.....	14
1.5.3 Differenzierung (Spermiogenese).....	15
<b>1.6 Stadien des Keimepithels.....</b>	<b>15</b>
<b>1.7 Funktionen der Blut-Hoden-Schranke.....</b>	<b>16</b>
1.7.1 Einschränkung der parazellulären Diffusion von Molekülen (Barrierefunktion).....	16
1.7.2 Immunologische Barriere.....	16
1.7.3 Aufrechterhaltung der Zellpolarität.....	17
<b>1.8 Tight Junctions der Sertoli-Zellen.....</b>	<b>17</b>
<b>1.9 Transmembranproteine der Tight Junctions.....</b>	<b>18</b>
1.9.1 Occludin.....	18
1.9.2 Claudin.....	20
1.9.3 JAMs (junctional adhesion molecules).....	20
<b>1.10 Tight Junction-Dynamik in den Hoden.....</b>	<b>21</b>
<b>1.11 Regulation der Tight Junction-Dynamik und der Blut-Hoden-Schranke.....</b>	<b>22</b>
1.11.1 Steroidhormone.....	22
1.11.2 Proteinkinasen.....	23
1.11.3 Zytokine.....	23
1.11.4 ICAMs (Intercelluläre Adhesions Moleküle/ intercellular adhesion molecules).....	24
<b>1.12 Adherens Junctions der Hoden.....</b>	<b>24</b>
<b>1.13 Pathologien im Zusammenhang mit der Blut-Hoden-Schranke.....</b>	<b>25</b>
<b>1.14 Fragestellung und Zielsetzung.....</b>	<b>27</b>
<b>2. Material und Methode.....</b>	<b>28</b>
<b>2.1 Geräte.....</b>	<b>28</b>
<b>2.2 Chemikalien.....</b>	<b>28</b>

<b>2.3 Verbrauchsmaterialien</b> .....	29
<b>2.4 Antikörper</b> .....	30
<b>2.5 Versuchstiere</b> .....	30
<b>2.6 Gewebepräparation und Fixierung</b> .....	31
2.6.1 Protokoll zur Gewebepräparation und Fixierung .....	32
<b>2.7 Einbettung</b> .....	33
2.7.1 Protokoll zur Einbettung .....	34
<b>2.8 Gefrierschnitt</b> .....	35
<b>2.9 Paraffinschnitt</b> .....	36
<b>2.10 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)</b> .....	36
2.10.1 Protokoll zur Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	37
<b>2.11 Immunhistochemie</b> .....	38
2.11.1 Protokoll zur Immunhistochemie .....	40
<b>2.12 Lichtmikroskopie und Photomikroskopie</b> .....	43
<b>3 Ergebnisse</b> .....	44
<b>3.1 Vergleich der Fixiermedien</b> .....	44
<b>3.2 Vimentin</b> .....	46
<b>3.4 Occludin</b> .....	50
<b>3.5 Claudin-11</b> .....	51
<b>3.6 Cytokeratin-7</b> .....	52
<b>4 Diskussion</b> .....	54
<b>4.1 Diskussion zur Methodik der Fixierung, Färbung und Immunhistochemie</b> .....	54
4.1.1 Fixierung: Diskussion, mögliche Alternativen und Verbesserungsvorschläge .....	54
4.1.2 Histologische Färbung: Vorteile der HE-Färbung und mögliche Alternativen.....	55
4.1.3 Antikörper und Immunhistochemie.....	55
<b>4.2 Diskussion zur spezifischen Darstellung der BHS und zur Beurteilung der Zellstrukturen</b> .....	56
4.2.1 Auswirkungen der Fixierung.....	56
4.2.2 Darstellung zellulärer Strukturen durch Antikörper.....	57
<b>5. Referenzen</b> .....	60

## **Abkürzungsverzeichnis**

AJ Adherens Junctions

AR Androgenrezeptor

EO Epididymoorchitis

BHS Blut-Hoden-Schranke

BL Bouin`sche Lösung

BTB Blood-Testis Barrier

CL Claudin

CK-7 Cytokeratin-7

ES Ectoplasmatic Spezialisaton

kDa Kilodalton

PFA Paraformaldehyd

FAK Focal Adhesion Kinase

FSH Follikelstimulierendes Hormon

HPR horseradisch peroxidase

IHC Immunhistochemie

ICAMs Intercelluläre Adhesions Moleküle

IF Intermediärfilamente

LH Luteinisierendes Hormon

mDF modified Davidsons Fluid

PAS Periodic acid-Schiff

SA Spondylitis ankylosans

TJ Tight Junctions

## Zusammenfassung

**Ziel:** In dieser Arbeit wurden spezifisch ausgewählte Antikörper eingesetzt, um Strukturen der Stützzellen des Keimepithels darzustellen, wie die Blut-Hoden-Schranke, das Zytoskelett der Sertoli-Zellen, aber auch das Zytoskelett der Leydig-Zellen. Diese Arbeit soll klären, ob die ausgewählten Antikörper die gesuchten Proteine des Stützepithels darstellen können.

Außerdem sollen die Paraformaldehyd-4%-Lösung und die Bouin'sche Lösung für die Fixierung von Hodengewebe hinsichtlich Erhalt der Morphologie und Auswirkungen auf die anschließende Immunhistochemie untersucht werden.

Des Weiteren sollen in dieser Arbeit aktuelle Kenntnisse über das Stützepithel und die BHS veranschaulicht werden.

**Material und Methode:** Das untersuchte Hodengewebe stammt von zwei gesunden Ratten (Wild-Typ) im Alter von 20 und 21 Wochen. Zur Fixierung wurde entweder eine Paraformaldehyd-4%-Lösung oder eine Bouin'sche Lösung verwendet. Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden Antikörper gegen folgende Antigene verwendet: Vimentin, Claudin-11, Occludin und Cytokeratin-7.

**Ergebnisse:** Präparate, die mit Bouin'scher Lösung fixiert wurden, zeigen deutlich besser erhaltene Morphologie als Präparate die mit 4 %-gepufferten Paraformaldehyd fixiert wurden. Dafür zeigen Präparate, die in PFA fixiert wurden, eine stärkere Färbung durch Antikörper bei der Immunhistochemie. Mit einem der drei verwendeten Claudin-11-Antikörper sowie mit dem verwendeten Occludin-Antikörper konnte eine spezifische Färbung im Bereich der BHS erzielt werden. Auch mit dem verwendeten Vimentin-Antikörper ließ sich das intrazelluläre Protein spezifisch anfärben. Der verwendete CK-7-Antikörper zeigte eine schwache Färbung der Leydig-Zellen und geringe Hintergrundfärbung.

**Schlussfolgerung:** Trotz der besser erhaltenen Morphologie nach Fixierung des Hodengewebes mit BL ist zur Detektion von Antigenen die Fixierung mit PFA zu bevorzugen. Mit den verwendeten Antikörpern gegen die Antigene Vimentin, Occludin und Claudin-11 lassen sich hervorragende Ergebnisse erzielen. Durch diese Studie werden außerdem folgende Fragen aufgeworfen: Wie stark sind Intermediärfilamente am Aufbau der BHS beteiligt? Wird in den Leydig-Zellen auch CK-7 exprimiert?

## **Abstract**

**Purpose:** In this diploma thesis specifically selected antibodies were used to represent structures of the blood-testis barrier, the cytoskeleton of Sertoli cells and the cytoskeleton of Leydig cells. This study will clarify whether the selected antibodies can represent the desired proteins of the seminiferous epithelium.

Also the paraformaldehyd 4%-solution and the Bouin`s fluid will be investigated for the fixation of testicular tissue with respect of preservation of morphology and impact on the subsequent immunhisochemistry. In addition, up-to-date knowledge of the seminiferous epithelium and the BTB should be illustrated in this study.

**Material and Methods:** The testicular tissue comes from two healthy rats (wild type) at the age of 20 and 21 weeks. A paraformaldehyde 4%-solution or a Bouin's fluid was used either to fixation. Antibodies were used for immunohistochemical investigations against following antigens: vimentin, claudin-11, occludin and cytokeratin-7.

**Results:** Compounds, which were fixed with Bouin's fluid show far better preserved morphology as compounds which were fixed with PFA 4%-solution. In return compounds, which have been fixed in paraformaldehyde, show a stronger antigen-antibody-staining. A specific staining in the area of the BTB could be obtained with one of three used claudin-11 antibodies as well as with the used occludin antibody. With the use of the anti-vimentin antibody it was possible to obtain a specific staining of the intracellular protein. The used CK-7 antibody showed a weak staining of leydig cells and low background staining.

**Conclusion:** Despite the better preserved morphology after fixation of the testicular tissue with Bouin`s fluid the fixation with PFA should be preferred for the detection of antigens. Excellent results can be achieved with the used antibodies to the antigens of vimentin, occludin and claudin-11. Following questions are raised by this study: How much are intermediate filaments involved in the structure of the BTB? Is CK-7 also expressed in leydig cells?

# 1. Einleitung

## 1.1 Allgemeines zum Keimepithel und zur Blut-Hoden-Schranke

Die Hoden sind der Ort der Keimzellreifung sowie der Produktionsort wichtiger Hormone. Sie werden von einer Kapsel aus Bindegewebe (Tunica albuginea) umgeben, von der aus Bindegewebssepten in die Tiefe des Organs ziehen und die Hoden in Läppchen (Lobuli testis) teilen. In diesen Läppchen liegen die Hodenkanälchen (Tubuli seminiferi concorti), die funktionellen Einheiten der Hoden, in denen die Spermatogenese stattfindet. Im Keimepithel der Hodenkanälchen lassen sich zwei sehr unterschiedliche Zellpopulationen finden: die Sertoli-Zellen (die Stützzellen des Keimepithels) und die Keimzellen. Außerdem finden sich im Interstitium zwischen den Tubuli seminiferi die Testosteronproduzierenden Leydig-Zellen, sowie Blut- und Lymphgefäße, Nerven und Makrophagen. Die Blut-Hoden-Schranke (BHS) wird durch spezialisierte Zellverbindungen (Junctions) zwischen benachbarten Sertoli-Zellen gebildet und teilt die Hodenkanälchen in einen basalen und einen adluminalen Anteil (Dym & Fawcett, 1970). Daher kann der Begriff Blut-Hoden-Schranke zu unzutreffenden Annahmen verleiten, weshalb oft der Begriff Sertoli-Zell-Schranke verwendet wird. Die Blut-Hoden- oder Sertoli-Zell-Schranke ist eine der dichtesten Epithelbarrieren, die sich bei Säugetieren finden lässt. Es ist wichtig, sich die BHS nicht als starres Gerüst vorzustellen, denn als Ort der Keimzellreifung befindet sich das Hodenepithel in einem ständigen Umbauprozess.

Meiose I und II und die Spermiogenese finden in einem spezialisierten Mikromilieu überwiegend luminal der BHS statt. In dem basalen Kompartiment finden sich die Stammzellen, die sogenannten Spermatogonien. Hier finden die mitotische Teilung, erste Stadien der Meiose I sowie viele Differenzierungsprozesse der Keimzellen statt.

Im Vergleich zu anderen Epithelbarrieren zeigt das Epithel der Tubuli seminiferi concorti in Bezug auf die Lokalisation der Tight Junctions (TJ) eine Besonderheit: Die TJ der Sertoli-Zellen sind nicht wie bei anderen Epithelzellen apikal, sondern basal, nahe der Basalmembran zu finden (Cheng & Mruk, 2002).

Die BHS bei Säugetieren wird aus TJ, basalen Ectoplasmatic Specialisations (ES), Gap Junctions und Desmosomen gebildet (Cheng & Mruk 2012; Xiao et al., 2013). Durch Abbildung 1 sollen die Strukturen des Keimepithels veranschaulicht werden.

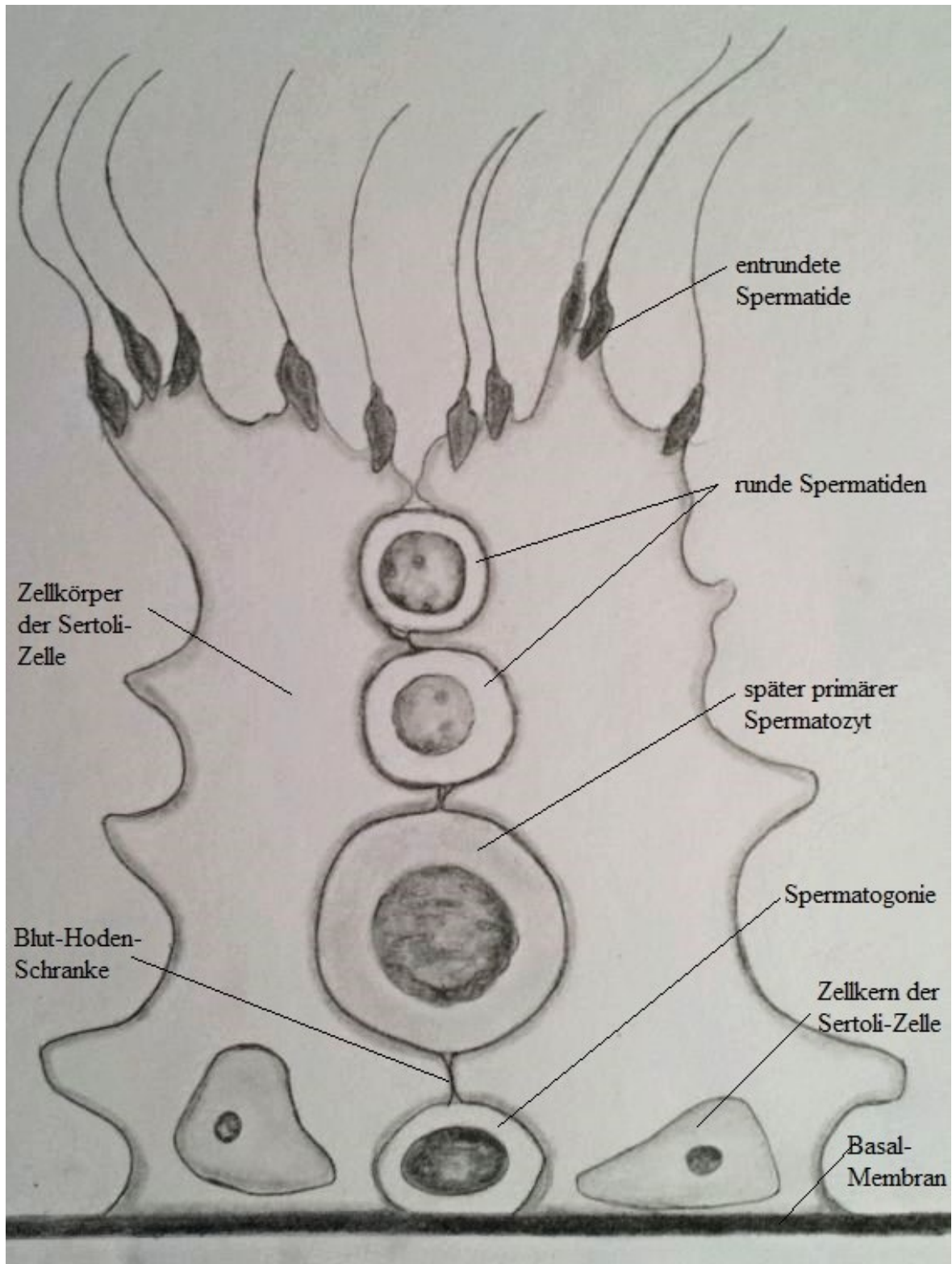


Abbildung 1

*Schematische Darstellung der Strukturen des Epithels der Tubuli seminiferi concerti.*

## 1.2 Die Sertoli-Zelle

Sertoli-Zellen wurden erstmals 1865 von dem italienischen Physiologen Enrico Sertoli beschrieben, dem die Zellen ihren Namen verdanken.

Die Sertoli-Zellen sind von säulenförmiger Gestalt und reichen von der Basalmembran bis in das Lumen der Hodenkanälchen. Sie durchziehen also mit ihrem Zellkörper die gesamte Höhe des Keimepithels. Durch zahlreiche Ausläufer bilden sie ein Gitterwerk, in dem die Keimzellen Platz finden und reifen können. Sie sind die eigentlichen Epithelzellen der Hodenkanälchen und dienen als Stützzellen und versorgen die Keimzellen mit Nährstoffen. Aufgrund ihrer unterstützenden Funktionen bei der Keimzellreifung werden Sertoli-Zellen auch als Ammenzellen (nurse cells) bezeichnet.

Bis zur Pubertät haben Sertoli-Zellen ihre Teilungsfähigkeit verloren. Zu dieser Zeit kommt es auch zur Ausbildung von TJ zwischen den Sertoli-Zellen, wodurch die Keimzellen im luminalen Kompartiment von vielen Nährstoffen abgeschnitten werden und deshalb auf die weitere Versorgung mit essentiellen Nährstoffen durch die Sertoli-Zellen angewiesen sind (Sharpe et al., 2003). Jede Sertoli-Zelle hat Kontakt zu einer bestimmten Anzahl an Keimzellen, so dass die Anzahl der heranreifenden Spermien von der Anzahl der Sertoli-Zellen limitiert wird. Diese Zahl ist speziesspezifisch. Somit bestimmt die Anzahl der Sertoli-Zellen auch die Menge an Spermatozoen, die an einem Tag „produziert“ werden können. Bei Ratten zum Beispiel ist eine Sertoli-Zelle in Kontakt mit 30 bis 50 Keimzellen (Cheng & Mruk, 2002). Während der Spermatogenese zeigen Sertoli-Zellen Änderungen der Form und der inneren Organisation.

Sertoli-Zellen und ihre Funktionen stehen unter hormonellem Einfluss. Dies zeigt sich beispielsweise dadurch, dass Sertoli-Zellen Rezeptoren wie das Androgen-bindende-Protein (ABP) synthetisieren, das Testosteron, Estradiol und Dihydrotestosteron binden kann (Ma et al., 2015). Die Spermatogenese ist hormonell durch die Hypothalamus-Hypophysen-Hoden-Achse geregelt. Durch die Freisetzung von Gonathropin-releasing Hormon (GnRH) im Hypothalamus kommt es zur Freisetzung von luteinisierendem Hormon (LH) und follikelstimulierendem Hormon (FSH) aus der Hypophyse. FSH wirkt stimulierend auf Sertoli-Zellen und fördert die Spermatogenese, LH wirkt auf die Leydig-Zellen und beeinflusst dadurch die Synthese von Steroidhormone. Durch Inhibin, einem von den Sertoli-Zellen selbst produzierten Peptidhormon, sowie durch die von den Leydig-Zellen produzierten Hormone Testosteron und Estradiol-17 $\beta$ , kommt es zu einer negativen

Feedbackschleife, wodurch die Ausschüttung von FSH und LH gehemmt wird (Cheng & Mruk, 2010a).

### **1.3 Zytoskelett der Sertoli-Zelle**

Wie in den meisten anderen Zellen auch, besteht das Zytoskelett der Sertoli-Zellen aus Mikrotubuli, Intermediärfilamente (IF) und Aktinfilamenten.

Anders als in den meisten Epithelien, die IF vom Keratin-Typ besitzen, besitzen Sertoli-Zellen IF vom Vimentin-Typ (Vogl et al., 2008). Vimentin befindet sich in Zellen mesenchymalen Ursprungs und ist ein Typ-III-IF. Das Molekül besteht aus einem Monomer mit zentraler Alpha-Helix und besitzt ein N- sowie einen C-Terminus. Vimentin hat eine molekulare Masse von etwa 54 kDa. Es wird oft als Tumormarker für Tumore mesenchymalen Ursprungs verwendet.

Es wird berichtet, dass IF in den Sertoli-Zellen von Ratten vermehrt in dem Bereich um den basal gelegenen Zellkern zu finden sind und von dort aus zu Strukturen der Zellmembran ziehen. An vielen Stellen verflechten sich die IF mit den Mikrotubuli und laufen parallel zur Längsachse der Sertoli-Zellen, aber ihre Dichte nimmt mit zunehmender Entfernung vom Zellkern ab. In einer Studie wurde gezeigt, dass IF enge Nachbarschaft zu den Köpfen der entrundeten Spermatozoen aufweisen (Zhu et al., 1997). Es wurde auch eine enge Beziehung von IF zu den Aktinbündeln der apikalen Ectoplasmic Spezialisations (ES), also zwischen Sertoli-Zellen und Spermatozoen, festgestellt. Die Verteilung der IF zeigt gewisse Unterschiede in den einzelnen Stadien der Spermatogenese (siehe Seite 16). Vor allem in den Stadien III bis VIII zeigt sich eine starke Vimentinfärbung um die Köpfe der entrundeten Spermatozoen. Außerdem ist die Verteilung der IF abhängig vom Alter des Versuchstieres (Zhu et al., 1997). Die IF zeigen nicht nur Verbindung zu ES sondern auch zu Desmosom-like Junctions und Hemidesmosom-like Junctions (Zhu et al., 1997; Vogl et al., 2008). Die IF sind die am wenigsten erforschten Zytoskelettbestandteile und vor allem in Hinsicht auf die Sertoli-Zellen hat sich in den letzten Jahren wenig Neues in diesem Bereich ergeben. Da Desmosomen auch im Komplex mit TJ der BHS vorkommen, stellt sich die Frage, ob sich die Vimentinfärbung auch im Bereich der BHS beobachten lässt. Die Frage, ob IF auch in nahem Kontakt zu den basalen ES stehen, die dieselben strukturellen Eigenschaften wie die apikalen ES aufweisen, ist ebenfalls unbeantwortet.

## 1.4 Leydig-Zellen

Leydig-Zellen liegen gruppenweise im Interstitium zwischen den Hodenkanälchen. Es sind zytoplasmareiche Zellen, die intrazelluläre Lipidtröpfchen aufweisen, was ein Anzeichen für die Produktion von Steroidhormonen ist. Sie finden sich in enger Beziehung zu Kapillaren. Leydig-Zellen produzieren unter dem Einfluss von LH aus der Hypophyse Androgene und unterstützen somit auch die Spermatogenese. Neue Studien behaupten, dass Leydig-Zellen von der Neuralleiste stammen, da die Zellen einige neuronal spezifische Proteine exprimieren (Ortega et al., 2004). Außerdem konnte in der Studie von Ortega et al. (2004) in Bezug auf IF von Leydig-Zellen festgestellt werden, dass sowohl Vimentin, Neurofilamentprotein als auch CK von den Zellen exprimiert werden können. Cytokeratine sind Proteine, die vor allem in epithelialen Zellen vorkommen. In der Studie von Ortega et al. (2004), wurde ein CK-Antikörper-Gemisch aus CK-1,-5,-6,-8,-10,-14 und -18 verwendet, um die IF der Leydig-Zellen anzufärben. Ob Leydig-Zellen CK-7, ein basisches Typ-II-Keratin, exprimieren, wurde bisher nicht beschrieben.

Neue Erkenntnisse lassen auch vermuten, dass es sich bei vaskulären glatten Muskelzellen und Perizyten um die Progenitorzellen (Vorläuferzellen) der Leydig-Zellen handeln könnte. Außerdem wird gezeigt, dass die vermuteten Progenitorzellen der Leydig-Zellen das IF-Protein Nestin exprimieren, ein Protein, das auch als Marker für Stammzellen des Nervensystems verwendet wird (Davidoff et al., 2004).

## 1.5 Spermatogenese und die Blut-Hoden-Schranke

Unter dem Begriff Spermatogenese versteht man den Prozess der Bildung von männlichen Keimzellen.

In diesem Prozess entstehen aus Spermatogonien durch Teilung und Differenzierung reife Spermatozoen. Bei adulten Ratten zum Beispiel gehen durch die Spermatogenese aus einer diploiden Spermatogonie (2n), 256 reife haploide Spermatozoen (1n) hervor. Dies geschieht in 14 voneinander unterscheidbaren Stadien, in denen es zu insgesamt sechs Mitosen und zwei Meiosen kommt (Siu & Cheng, 2008). Bei Menschen erfolgt dies in sechs voneinander unterscheidbaren Stadien (Abb. 2).

Die Spermatogenese findet im Epithel der Tubuli seminiferi concorti statt und kann bei Säugetieren in drei Phasen unterteilt werden: Mitose, Meiose und Differenzierung.

### 1.5.1 Mitose

Hierbei kommt es zur Proliferation der Typ-A-Spermatogonien. Die Vermehrung der Spermatogonien findet schon pränatal statt; in der Kindheit verläuft die Proliferation dann langsamer und ab der Pubertät wieder schneller. Von den Typ-A-Spermatogonien differenzieren sich einige zu Typ-B-Spermatogonien. Spermatogonien sind diploide Keimzellen, die an der Basalmembran zu finden sind. Bei Ratten lassen sich vier Klassen von Spermatogonien morphologisch unterscheiden. Diese Klassen lassen sich folgendermaßen unterteilen: undifferenzierte Typ-A-Spermatogonien [A single (As)], proliferierende Zellen [A paired (Apr), A aligned (Aal)], differenzierende Typ-A-Spermatogonien (A1, A2, A3, A4), intermediäre Spermatogonien (In), und Typ-B-Spermatogonien (B). Die Aufgabe der Typ-A-single-Spermatogonien ist es, zum einen durch mitotische Teilung einen konstanten Zellbestand zu schaffen und zum anderen die Produktion von A-paired-Spermatogonien (Ehmcke et al., 2006; Hess & Franca, 2008). Diese durchlaufen eine Serie von mitotischen Teilungen, um Ketten von A-chain-Spermatogonien zu produzieren, die durch intrazelluläre Brücken miteinander verbunden sind. Daraufhin kommt es zu einer Abfolge von Differenzierungen bis zur Typ-B-Spermatogonie, die sich zur frühen primären Spermatozyte entwickelt (Mruk & Cheng, 2010). Bei Menschen lassen sich Spermatogonien folgendermaßen einteilen: Typ-A-Spermatogonien [adult dark spermatogonia (AD), adult pale Spermatogonia (AP)] und Typ-B-Spermatogonien (de Rooij, 1998; Dym, 1994). Dieser Vorgang findet zur Gänze im basalen Kompartiment des Hodenepithels statt (Abb. 2).

Durch Mitose formen sich aus einer Typ-B-Spermatogonie zwei primäre Spermatozyten, die im Präleptotän-Stadium noch an der Basalmembran zu finden sind. Der Kontakt der Präleptotän-Spermatozyten zur Basalmembran ist allerdings geringer als bei Typ-B-Spermatogonien. Im späten Leptotän- und frühen Zygotänstadium werden die Spermatozyten durch die BHS geschleust (Dym & Cavicchia, 1978; Russell, 1977a).

### 1.5.2 Meiose

Im adluminalen Anteil des Hodenepithels schließen die primären Spermatozyten die erste Reifeteilung ab. So gehen aus einer primären Spermatozyte zwei sekundäre Spermatozyten (haploid, 1n) hervor. Die sekundären Spermatozyten beginnen umgehend mit der zweiten Reifeteilung, weshalb sie im histologischen Schnitt selten zu finden sind. Durch die zweite Meiose entstehen so aus zwei sekundären Spermatozyten vier Spermatisden (Hess & Franca, 2008; Cheng & Mruk, 2010b)

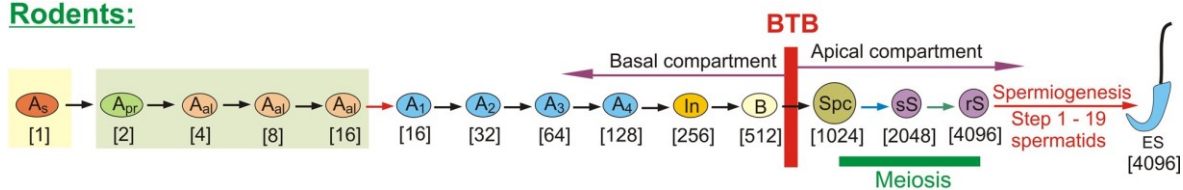
### 1.5.3 Differenzierung (Spermiogenese)

Darunter versteht man die Umwandlung von kugelförmigen Spermatiden mit rundem Kern zu entrundeten Spermatiden, die daraufhin als Spermatozoen vom Keimepithel in das Tubuluslumen entlassen werden.

Während der Spermiogenese kommt es zur Kernkondensierung, Bildung des Akrosoms und zur Schwanzbildung der Keimzellen (Hess & Franca 2008).

Zu erwähnen ist, dass Keimzellen über keine eigene Mobilität verfügen, weshalb sie bei ihrer Wanderung durch das Keimepithel auf die Unterstützung der Sertoli-Zellen angewiesen sind (Xiao et al., 2013).

#### Rodents:



#### Men:

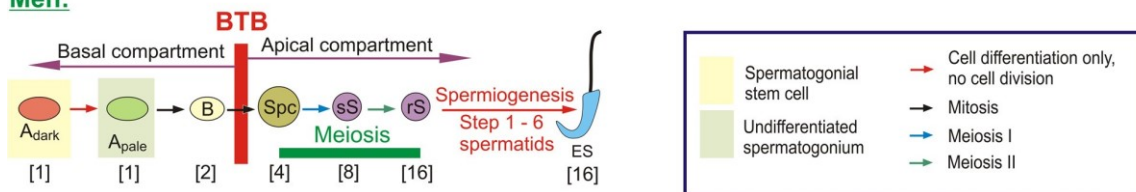


Abbildung 2

Vergleich der Spermatogenese zwischen Nagetieren und Menschen. Dargestellt werden die Entwicklungsstadien der Keimzellen von der Spermatogonie bis zum reifen Spermium.

$A_s$ : A single spermatogonium,  $A_{pr}$ : A paired spermatogonium,  $A_{al}$ : A aligned spermatogonium,  $A_1$ - $A_4$ : differenziert typ A spermatogonia,  $In$ : intermediate spermatogonium,  $B$ : Typ B spermatogonium,  $Spc$ : spermatocyte,  $sS$ : secondary spermatocyte,  $rS$ : round spermatid,  $ES$ : elongated spermatid.

(adaptiert aus Cheng CY and Mruk DD. *The blood-testis barrier and its implications for male contraception*. 2012).

### 1.6 Stadien des Keimepithels

Die Anordnung und Organisation der unterschiedlichen Stadien der Keimzellen im Hodenepithel zeigt von basal nach luminal folgendes Schema: Spermatogonien, Spermatozyten, runde Spermatiden und die entrundeten Spermatiden. Allerdings kann die morphologische Darstellung des Epithels der Tubululi seminiferi concerti in histologischen Schnittbildern variieren. Diese morphologischen Unterschiede sind abhängig davon, in welchem Stadium der Spermatogenese sich die Keimzellen in diesem Abschnitt des Tubulus gerade befinden.

Auf diese Weise lassen sich bei Ratten 14 verschiedene Stadien beschreiben, die mit römischen Nummern gekennzeichnet werden (Stadien I-XIV). Jedes Stadium enthält zahlreiche Keimzellen derselben Entwicklungsstufe. Dabei zeigen die Stadien I bis VIII fünf und die Stadien IX bis XIV vier Entwicklungsstufen der Keimzellen. Diese Stadien laufen sequenziell von Stadium I bis XIV und beginnen dann wieder von neuem bei Stadium I. Dies wird als der Zyklus des Epithels der Tubuli seminiferi bezeichnet (Cycle of the seminiferous epithelium). Die Dauer eines gesamten Zyklus ist konstant und speziesspezifisch. Bei Ratten dauert der Zyklus des Epithels der Tubuli seminiferi 13 Tage, bei Menschen dauert der Zyklus 16 Tage.

Die Welle des Epithels der Tubuli seminiferi (Wave of the seminiferous epithelium) beschreibt die räumliche Abfolge der Stadien entlang der Tubuli seminiferi concorti. Die Tubuli seminiferi concorti sind an deren Enden mit den Rete testis verbunden. Von den Rete testis aus gesehen zeigen sich die Stadien in abnehmenden Stufen entlang der Tubuli seminiferi concorti (Herms et al., 2010).

## **1.7 Funktionen der Blut-Hoden-Schranke**

Die hier beschriebenen Funktionen der BHS lassen sich größtenteils durch die Eigenschaften der TJ erklären.

### 1.7.1 Einschränkung der parazellulären Diffusion von Molekülen (Barrierefunktion)

Durch diese Funktion wird ein einzigartiges Milieu für die Reifung der Keimzellen im apikalen Anteil der Tubuli seminiferi concorti erzeugt. Es kommt zur Limitierung der parazellulären Diffusion von Wasser, Nährstoffen, Ionen, Hormonen und vielen weiteren Stoffen. Während die zytologische Beschaffenheit der TJ den Durchtritt von Molekülen durch die Sertolizell-Schranke einschränkt, finden sich an der apikalen und basolateralen Membran der Sertoli-Zellen spezifische Transporter für Moleküle, die den Durchtritt dieser Moleküle in oder aus dem Lumen regeln. So wird der Eintritt gewisser Moleküle wie Nährstoffe (Zucker, Aminosäuren) und Botenstoffe (z.B. Hormone) in das apikale Kompartiment ermöglicht und geregelt.

### 1.7.2 Immunologische Barriere

Durch die immunologische Barriere der Sertolizell-Schranke wird der Eintritt von Immunglobulinen und Immunzellen in das Lumen der Hodenkanälchen verhindert.

Dadurch wird eine Immunreaktion gegen die Autoantigene der haploiden Keimzellen verhindert (Mital et al., 2011).

### 1.7.3 Aufrechterhaltung der Zellpolarität

Die TJ bilden eine Abgrenzung zwischen dem apikalen und basalen Pol der Sertoli-Zelle. Dies lässt sich gut anhand des Zellkerns der Sertoli-Zellen veranschaulichen, welcher immer basal, nahe der Basalmembran, zu finden ist. Außerdem sind auch Zellorganellen wie der Golgi-Apparat und das endoplasmatische Retikulum nicht gleichmäßig im Zytosol der Sertoli-Zelle verteilt (Cheng & Mruk, 2002; Cheng & Mruk, 2012).

## **1.8 Tight Junctions der Sertoli-Zellen**

Tight Junctions, auch bekannt als Zonula Occludentes, zeigen sich in elektronenmikroskopischer Vergrößerung als fokale Kontakte zwischen den Plasmamembranen benachbarter Zellen. In der Freeze-Fracture Elektronenmikroskopie erscheinen die TJ als kontinuierliche, bandförmige und zusammenhaltende Strukturen (Stahelin, 1971). Man kann sich TJ also als bandförmige Strukturen vorstellen, die eine Zelle vollständig umranden. An diesen bandförmigen Strukturen kommt es zu sehr engem Kontakt von Zellmembranen benachbarter Zellen. In den TJ verbinden sich integrale Membranproteine, die sogenannten Transmembranproteine, der gegenüberliegenden Sertoli-Zellen im Extrazellulärspalt und errichten so eine Diffusionsbarriere.

Transmembranproteine sind Moleküle, die die aus einer Lipiddoppelschicht bestehende Zellwand durchziehen und sowohl einen intrazellulären als auch einen extrazellulären Anteil besitzen. In den meisten Epithelien finden sich die TJ als die am weitesten apikal liegenden zellulären Kontakte (Balda & Matter, 1998). Wie schon erwähnt, finden sich die TJ des Keimepithels nicht im apikalen Bereich der Sertoli-Zellen, sondern weit basal, nahe der Basalmembran. Außerdem finden sich die TJ der BHS in unmittelbarer Nachbarschaft mit basalen ES, Gap Junctions und Desmosomen. Die Hauptfunktion der TJ ist die Errichtung einer selektiven Diffusionsbarriere durch die der parazelluläre Molekülaustausch eingeschränkt wird. Dabei sind die TJ der Sertoli-Zellen eine der dichtesten Zellverbindungen, die in Säugetieren zu finden sind (Dym & Fawcett, 1970). Die wichtigsten Klassen von Transmembranproteinen der TJ im Keimepithel sind folgende: Occludine, Claudine und JAMs (junctional adhesion molecules) (Fanning et al., 1999). Erwähnenswert sind auch die sogenannten Tight Junction-assoziierten Proteine, die

die Transmembranproteine an das Zytoskelett (an intrazelluläre Aktinfilamente) der Sertoli-Zellen binden. Die wichtigsten zurzeit bekannten Proteine dieser Art sind folgende: Zonula Occludens-1,-2 (ZO-1, ZO-2,), Cingulin, Symplekin und viele mehr; eine detaillierte Beschreibung dieser Moleküle würde allerdings den Umfang dieser Arbeit sprengen (Citi & Cordenosi 1998; Cheng & Mruk, 2002; Lee & Cheng, 2004; Cheng & Mruk, 2012; Siu & Cheng, 2008). Die Transmembranproteine der TJ und einige TJ-assozierte Proteine werden schematisch in Abbildung 3 dargestellt.

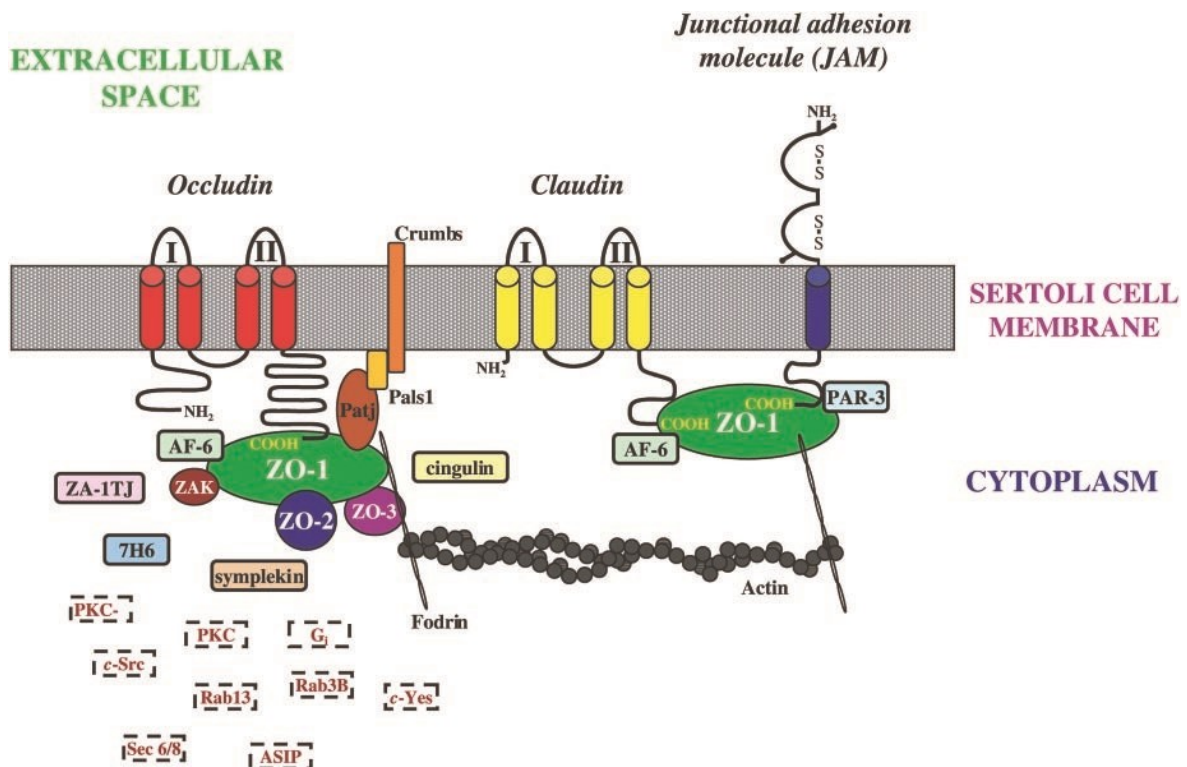


Abbildung 3

*Schematische Darstellung der Transmembranproteine der TJ und der TJ-assozierten Proteine.  
(adaptiert aus Cheng CY and Mruk DD. The blood-testis barrier and its implications for male contraception. 2012)*

## 1.9 Transmembranproteine der Tight Junctions

### 1.9.1 Occludin

Occludin wurde erstmals in den TJ einer Hühnerleber durch die Verwendung monoklonaler Antikörper entdeckt (Furuse et al., 1993).

Occludin ist ein  $\text{Ca}^{+}$  abhängiges interzelluläres Adhensionsmolekül mit der molaren Masse von etwa 65 kDa. Jedes Occludin-Molekül besteht aus vier Transmembran-Domänen mit einem langen (250 Residuen) Carboxyl-Ende ( $\text{COOH}$ ) und einem kurzen (60 Residuen) Amino-Ende ( $\text{NH}_2$ ), die im Zytoplasma der Zelle liegen. Die beiden intrazellulären Enden des Moleküls sind reich an den Aminosäuren Tyrosin und Glycin. Das Molekül zeigt zwei größere extrazelluläre Schleifen (Schleife eins: Aminosäuren Residuen 90-138; Schleife zwei: Aminosäuren Residuen 199- 243 vom  $\text{NH}_2$ -Ende bei Ratten) und eine kleinere intrazelluläre Schleife. Die erste extrazelluläre Schleife weist einen charakteristischen Aminosäureinhalt auf. Sie besteht zu 60% aus Tyrosin und Glyzin (Furuse, 2010). Es hat sich gezeigt, dass die erste extrazelluläre Schleife an der Zelladhäsion beteiligt ist (Ando-Akatsuka et al., 1996). Die zweite extrazelluläre Schleife ist am Versiegeln der TJ beteiligt und trägt dadurch wesentlich zur Barrierefunktion der TJ bei (Liu et al. 2003; Wong & Gumbiner 1997). Obwohl die Struktur des Occludinmoleküls dem des Claudins ähnelt, weisen diese Moleküle keine Sequenzähnlichkeit auf. Das Carboxyl-Ende steht in Verbindung mit den Zonula Occludens-Proteinen ZO-1, ZO-2 und ZO-3, wobei ZO-3 noch nicht im Keimepithel nachgewiesen werden konnte (Cheng & Mruk, 2002; Furuse, 2010). Erwähnenswert ist, dass Occludin im Keimepithel von Ratten nachgewiesen werden kann, nicht aber im Hodenepithel von Menschen zu finden ist. Daher scheint Occludin für die Ausbildung von TJ nicht unbedingt nötig zu sein, weshalb die physiologische Funktion des Moleküls noch immer ein Diskussionsthema darstellt (Moroi et al., 1998). Eine Studie an Occludin-Knock-Out-Mäusen zeigt außerdem keine Auffälligkeiten in der Struktur von TJ. Allerdings zeigen diese Mäuse postnatale Wachstumsverzögerung, chronische Entzündung der Magenschleimhaut, Kalkablagerungen im Gehirn, Verdünnung der Knochen und, was davon für diese Arbeit die größte Bedeutung hat, Veränderungen an den Hoden. Es wurde beobachtet, dass sich bei diesen Occludin-Knock-Out-Mäusen in den frühen Lebenswochen noch ein normales Keimepithel zeigt, aber ab der vierzigsten bis sechzigsten Lebenswoche eine Atrophie der Hodentubuli zu erkennen ist. In den Tubuli seminiferi concorti sind nur noch Sertoli-Zellen auffindbar, jedoch ist das Keimepithel frei von Keimzellen (Saitou et al., 2000). Aufgrund dieser Erkenntnisse wird vermutet, dass Occludin regulatorische Funktionen erfüllt.

Es wurde nachgewiesen, dass das zum größten Teil von den Leydig-Zellen des Hodens produzierte Testosteron die Expression von Occludinmolekülen in Ratten steigern kann (Chung & Cheng, 2010a). Occludin ist zudem stark von Phosphorylierung abhängig und interagiert stark mit einigen Proteinkinasen und Phosphatasen wie Src, c-YES,  $\text{PKC}\eta$ , FAK,

ERK1/2, PP2A und PP. Die Endozytose des Proteins wird durch Zytokine wie TGF $\beta$  und TNF $\alpha$  beschleunigt (Mruk & Cheng, 2010).

### 1.9.2 Claudin

Wie Occludin besitzen auch Moleküle, die zur Claudinfamilie gehören, vier Transmembrandomänen, zwei extrazelluläre Schleifen, eine intrazelluläre Schleife sowie ein kurzes NH<sub>2</sub>- und ein langes COOH-Ende, die im Zytoplasma der Zelle liegen. Kurz gesagt weisen Occludin und CL eine ähnliche räumliche Struktur auf. Trotz dieser Gemeinsamkeiten zeigen Claudinmoleküle keine Sequenzähnlichkeiten zu Occludin, womit gezeigt wird, dass es sich um unterschiedliche Moleküle handelt. Mit einer molekularen Masse von etwa 22 kDa sind CL signifikant kleinere Moleküle als Occludin. Zurzeit sind 24 unterschiedliche Claudine bekannt. Davon wurden Claudin-1,-3,-4,-5,-7,-8 und -11 im Hoden nachgewiesen (Furuse et al., 1998; Cheng & Mruk, 2002; Mitic et al., 2000). Unter all diesen Claudinmolekülen ist Claudin-11 das bislang am besten erforschte. CL-11, auch bekannt als Oligodendrocyten-spezifisches Protein (oligodendrocyte-specific-protein, OSP), scheint in den Hoden auf die Sertoli-Zellen beschränkt zu sein, da es in den Keimzellen nicht nachgewiesen werden konnte.

Zytokine und Androgene scheinen eine wichtige Rolle in der Regulation der Expression von Claudinmolekülen zu spielen, aber auch Proteolyse, Ubiquitinierung, Phosphorylierung, Endozytose und Palmitoylierung regulieren die CL-Levels (Mruk & Cheng, 2010).

Es konnte gezeigt werden, dass FSH und das Zytokin TNF $\alpha$  einen inhibitorischen Effekt auf die Expression von CL-11 haben (Helani et al., 2000). Die Rolle von CL-11 in Bezug auf Spermatogenese und die Funktionen der BHS zeigt sich dadurch, dass männliche CL-11-knockout-Mäuse steril sind (Gow et al., 1999). Aufgrund dieser Erkenntnisse wird vermutet, dass CL-11 das primäre Protein für die Aufrechterhaltung der physiologischen und strukturellen Barriere ist (Mitic et al., 2000).

### 1.9.3 JAMs (junctional adhesion molecules)

JAM ist die dritte Proteinfamilie, die zu den integralen Membranproteinen gezählt wird. Zurzeit sind fünf JAM-Moleküle bekannt, die JAM-1, JAM-2, JAM-3, JAM-4 und Jam-like bezeichnet werden und an epithelialen sowie endothelialen Zellen gefunden werden können (Arrate et al., 2001; Aurrand et al., 2001; Martin-Padura et al., 1998; Mruk & Cheng, 2002). Bisher konnten JAM-1 und JAM-2 im Keimepithel nachgewiesen werden.

Es ist noch nicht bekannt, ob JAM-3 in den Hoden vorhanden ist (Aurrand et al., 2001). Die molekulare Masse beträgt gewebeabhängig zwischen 36 und 41 kDa. JAMs gehören zur Familie der Immunglobulin-ähnlichen Proteine. JAM-Moleküle bestehen aus einer extrazellulären Domäne, die zwei Immunglobulin-ähnliche V-Windungen beinhaltet. Diese V-Windungen werden durch zwei Disulfidbrücken gestützt. Außerdem besteht das Molekül aus einer Transmembrandomäne und einer Interzellulardomäne (Martin-Padura et al., 1998; Liu et al., 2000).

JAMs sind ebenfalls mit intrazellulären TJ-assoziierten Proteinen vergesellschaftet, wie ZO-1, AF-6, MUPP1, ASIP/ PAR-3, und Cingulin (Lui et al., 2003). Es wird vermutet, dass JAM sowohl an der Zelladhäsion sowie an der Transmigration von Monozyten beteiligt ist (Fanning et al., 1999).

CAR (Coxsackie-Virus und Adenovirus-Rezeptor) ist ein weiteres integrales Membranprotein in TJ und ist sehr homolog zu JAM (Mruk & Cheng, 2010).

## **1.10 Tight Junction-Dynamik in den Hoden**

Um die Entwicklung einer Autoimmunreaktion zu vermeiden und um das spezielle Mikromilieu für die Spermatogenese aufrechtzuerhalten, darf es beim Durchtritt der Spermatozyten durch die Sertolizell-Schranke zu keiner Störung der funktionalen Beschaffenheit der Barriere kommen.

In der Literatur lassen sich drei Theorien finden, die versuchen die Vorgänge der Umstrukturierung, den Abbau und den Wiederaufbau der Sertolizell-Tight Junctions während der Spermatogenese zu erklären.

Die „Zipper“-Theorie behauptet, dass es zur Aufteilung und zum Zusammenbruch der TJ kommt, während die Präleptoten-Spermatozyten beginnen die BHS zu durchwandern. Während des Zusammenbruchs der TJ, die sich „über“ den passierenden Spermatozyten befinden, kommt es zur Neubildung von TJ-Kontakten an der „Unterseite“ der Präleptoten-Spermatozyten. Allerdings würde es zu einer vermehrten Durchlässigkeit der BHS führen, wenn es zu dem Zerfall der apikal liegenden TJ kommen würde, bevor die basalen TJ neu gebildet worden wären (Cheng & Mruk, 2002; Lui et al., 2003).

Die „intermediate cellular compartment theory“ behauptet, dass sich Keimzellen in einem eigenen Raum befinden, der durch gleichzeitig bestehende apikale und basale TJ gebildet wird, während die Keimzellen durch die BHS geschleust werden (Russell, 1977a, Cheng & Mruk 2002).

In einer Studie von 2012 scheint sich diese Theorie zu bestätigen. Es wird gezeigt, dass sich „unterhalb“ der Präleptoten-Spermatozyten die basalen Anteile der Sertoli-Zellen zusammenfügen, sobald sich die Präleptoten-Spermatozyten von der Basalmembran entfernen. Somit werden die Präleptoten-Spermatozyten in eine tunnelförmige Struktur eingeschlossen. Es kommt an den neu aufgetretenen Kontaktstellen der Sertoli-Zellen an der basalen Seite der Spermatozyten zur Ausbildung „neuer“ TJ, während die „alten“ TJ noch bestehen bleiben. Dabei zeigt sich in den neu ausgebildeten TJ zuerst eine Ansammlung an CL-3-Molekülen, die dann durch CL-11 ersetzt werden. Erst wenn die neue Schicht aus TJ vollständig ausgebildet ist, zerfällt die alte apikale Schicht aus TJ und die Spermatozyten werden in das apikale Lumen der Hodenkanälchen entlassen (Smith & Braun, 2012).

Die „Stress-Theorie“, oder auch „Theorie der repetitiven Entfernung von Membransegmenten“ (repetitive removal of membrane segments) nimmt an, dass die Aufwärtsbewegung der Spermatozyten Stress an den TJ der Sertoli-Zellen auslöst, welcher den Zerfall und die Proliferation sowie die Änderung der Orientierung von TJ-Fibrillen bewirkt (Lui et al, 2003).

## **1.11 Regulation der Tight Junction-Dynamik und der Blut-Hoden-Schranke**

### 1.11.1 Steroidhormone

Testosteron wird von den Leydig-Zellen des Hodens produziert und ist eines der wichtigsten Hormone in der Hypothalamus-Hypophysen-Hoden-Achse für die Regulation der Spermatogenese. Dies zeigt sich auch daran, dass der Testosteronlevel in den Tubuli seminiferi 25- bis 125-fach höher ist als im Serum des Blutes (Walker, 2010). Ebenso wichtig ist auch Estradiol 17 $\beta$ , das von Leydig-Zellen, Sertoli-Zellen und Keimzellen produziert wird.

Testosteron ist wichtig für die Regulation von fast jedem Aspekt der Spermatogenese einschließlich Proliferation und Differenzierung von Spermatogonien, Keimzellzyklus-Progression und Zelladhäsion zwischen den Sertoli-Zellen untereinander sowie zwischen Sertoli-Zellen und Keimzellen. Auch an der Aufrechterhaltung der immunologischen Barriere ist Testosteron beteiligt (Meng et al, 2011, O'Donnell et al., 2001). Diese Funktionen werden über den Androgenrezeptor (AR) vermittelt. Bei Mäusen mit Sertoli-Zell-spezifischen „Knockout“ von AR zeigt sich Infertilität und eine defekte BHS mit

reduzierter Expression von Occludin, CL-11 und ZO1, dafür aber mit deutlich erhöhter Expression von Vimentin (Wang et al., 2006; Cheng & Mruk, 2012; Walker, 2010). Estrogene wie Estradiol 17 $\beta$  wirken über den Estrogenrezeptor  $\beta$  (ER $\beta$ ), der im Hoden hauptsächlich von Sertoli-Zellen exprimiert wird. Estrogene sind ebenfalls äußerst wichtig für die männliche Fortpflanzungsfunktion und haben Einfluss auf die BHS (Cheng & Mruk, 2012). Wenn Ratten neonatal mit DES (ein synthetisches nichtsteroidales Estrogen) behandelt werden, kommt es erst nach einer Verzögerung von vier bis fünf Wochen (in der siebenten bis achten, anstatt in der dritten Neonatal-Woche,) zur Ausbildung der BHS (Toyama et al., 2001).

Wird neonatalen Ratten Bisphenol-A, ein estrogener Umweltgiftstoff, verabreicht, kommt es zur Störung der BHS; allerdings zeigt sich dieser Effekt nicht bei erwachsenen Tieren, die bereits eine funktionierende BHS ausgebildet haben. (Li et al., 2009; Cheng & Mruk, 2012).

#### 1.11.2 Proteinkinasen

Die adhäsive Funktion vieler Transmembranproteine ist von deren Phosphorylierung abhängig, wofür non-receptor-Proteinkinasen zuständig sind. Zu den phosphorilierungsabhängigen Proteinen gehören Proteine der AJ (z.B. N-Catenin,  $\beta$ -Catenin), TJ (z.B. Occludin, CL), Gap Junctions (z.B. Keratine) und Desmosome (z.B. Desmocollin, Desmoglein) [Cheng & Mruk, 2002; Cheng & Mruk, 2012].

Zu diesen Proteinkinasen gehören die Focal-Adhesion-Kinase (FAK), C-Src und C-Yes. FAK wurde in der BHS, an den apikalen ES und den TJ lokalisiert. FAK bildet einen funktionellen Komplex mit Occludin und ZO1 und kann durch Phosphorylierung die Endozytose dieser Proteine bewirken (Siu et al., 2009).

Auch C-Src und C-Yes lassen sich an den apikalen ES und an der BHS finden. Beide Proteinkinasen formen strukturelle Komplexe mit FAK und N-cadherin, C-Yes interagiert strukturell auch mit Occludin. Diese Moleküle sorgen mit ihren Funktionen ebenfalls für zelluläre Adhäsion (Cheng & Mruk, 2012).

#### 1.11.3 Zytokine

Zytokine wie TNF  $\alpha$ , Interferon  $\gamma$ , TGF $\beta$  2/ $\beta$ 3, IL-1  $\alpha$ , und IL-12, spielen ebenfalls eine Rolle bei der Regulierung der TJ-Dynamik. Es wird vermutet, dass Zytokine eine „kommandierende“ Funktion in der Regulierung der TJ-Dynamik einnehmen. Sie

regulieren Proteinadhension, interagieren mit Polaritätsproteinen, beeinflussen die Actin-Dynamik und die Wirkung von Steroidhormonen (Cheng & Mruk, 2012).

#### 1.11.4 ICAMs (Intercelluläre Adhensions Moleküle/ intercellular adhesion molecules)

ICAMs sind keine TJ-Proteine, da sie aber auch wichtige Funktionen bei der Regulierung der BHS einnehmen, werden sie hier ebenfalls kurz besprochen. ICAMs gehören zu den Immunoglobulin superfamily (IgSF) CAMs. Zu ihren Mitgliedern gehören ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, ICAM-4 und ICAM-5. Sie sind, wie es der Name schon sagt, an der zellulären Adhension beteiligt und es wird angenommen, dass diese Moleküle Funktionen bei der Regulierung der Junction-Dynamik einnehmen. Es wurde festgestellt, dass ICAM-1(membran bound ICAM) und sICAM-1(soluble ICAM) antagonistische Effekte auf die Permeabilität der BHS haben. Man nimmt an, dass ICAM-1 bei dem Aufbau der „neuen“ BHS beteiligt ist, während sICAM-1 möglicherweise bei dem Abbau der „alten“ BHS eine Rolle spielt. ICAM-2, das nur im Bereich der apikalen ES zu finden ist, spielt möglicherweise eine Rolle bei der Adhension von Spermatozoen (Xiao et al., 2013).

## **1.12 Adherens Junctions der Hoden**

Diese Arbeit befasst sich hauptsächlich mit den TJ – da aber auch die AJ des Hodenepithels einige Besonderheiten aufweisen und an vielen Funktionen der BHS mitbeteiligt sind, soll an dieser Stelle auch kurz darauf eingegangen werden. AJ verbinden Zytoskelettanteile benachbarter Zellen miteinander und sorgen so für mechanische Stabilität. Die AJ der Sertoli-Zellen und Keimzellen unterscheiden sich morphologisch von AJ anderer Epithelien. Die am besten untersuchten hodenspezifischen AJ-Strukturen sind die Ectoplasmic Specialisations und die basalen Tubulobulären Komplexe (basal tubulobular complex) [Cheng & Mruk, 2002]. Bei den ES handelt es sich um eine spezialisierte Form der Aktin-basierten AJ. Ectoplasmic Specialisations befinden sich im apikalen Bereich des Hodenepithels zwischen Sertoli-Zellen und den Zellköpfen der entrundeten Spermatozoen (apikale ES) sowie basal zwischen benachbarten Sertoli-Zellen (basale ES). Basale und apikale ES zeigen die gleichen strukturellen Eigenschaften. Die basalen ES finden sich in Komplexen mit anderen Junctions wie Gap Junctions, TJ und Desmosomen und sind damit auch Bestandteile der BHS (Vogl et al., 2000; Amlani & Vogl, 1988; Guttman et al., 1999; Lie et al., 2010; Xiao et al., 2013).

Die ES bestehen aus Teilen der Plasmamembran, aus einer oberflächlichen Zisterne des endoplasmatischen Reticulums und aus Aktinfilamenten. Die Aktinfilamentbündel liegen „sandwich-förmig“ zwischen der Plasmamembran und der Zisterne des endoplasmatischen Reticulums. Dabei sind die Aktinfilamente in jedem Bündel hexagonal angeordnet und unipolar ausgerichtet (Dym & Fawcett, 1970; Russell, 1977b; Toyama et al., 2003; Grove & Vogl, 1988; Siu & Cheng, 2008). Zu den zurzeit bekannten Proteinen, die am Aufbau der ES beteiligt sind, gehören folgende: Aktin,  $\alpha$ -Aktinin, Fimbrin, Espin, Vinculin,  $\beta$ 1-Integrin, Paxillin, Gelsolin, Myosin VIIa, und ILK (Cheng & Mruk; 2002). Eine Hauptfunktion der ES ist die Aufrechterhaltung der interzellulären Adhesion. Dies zeigt sich vor allem durch den Verlust des zellulären Kontakts zwischen Sertoli-Zellen und frühen entrundeten Spermatozyten nach der pharmakologischen Unterbrechung von Aktinfilamenten (Russell, et al; 1988). Eine weitere wichtige Funktion an denen ES wahrscheinlich beteiligt sind, ist die Positionierung und die Lokalisierung der Spermatozyten im Hodenepithel. Erwähnenswert ist hierbei, dass bei Ratten eine Translokation der entrundeten Spermatozyten in unterschiedlichen Stadien der Spermatogenese erfolgt. In Stadium II und III zeigen sich die Spermatozyten in der apikalen Hälfte des Hodenepithels. Im Stadium V liegen die Köpfe der Spermatozyten viel weiter basal im Keimepithel. Ab Stadium VII liegen die entrundeten Spermatozyten wieder am apikalen Rand des Epithels um daraufhin in das Lumen der Hodenkanälchen entlassen zu werden (Vogl et al., 2000).

### **1.13 Pathologien im Zusammenhang mit der Blut-Hoden-Schranke**

Die meisten entzündlichen Prozesse, die den männlichen Genitaltrakt betreffen, haben eine infektiöse Ätiologie. Dennoch zeigen schätzungsweise 5-10% der Fälle von männlicher Unfruchtbarkeit suspektes Entzündungszeichen oder eine Autoimmunbeteiligung, die sich zum Beispiel durch Bildung von Spermien-Antikörpern, Orchitis, Epididymitis und Epididymoorchitis (EO) präsentiert. Die Inzidenz der Epididymitis ist bei Menschen viel größer als die der Orchitis, außerdem tritt die Orchitis selten isoliert auf und präsentiert sich meist als EO. Dies könnte bedeuten, dass im Vergleich mit der BHS, die Epithelbarriere der Nebenhoden weitaus weniger effektiv ist (Hedger, 2011). Chronische Entzündungen der Hoden sind gekennzeichnet durch peritubuläre lymphozytische Infiltrate, assoziiert mit Schädigung des Epithels der Tubuli seminiferi concorti und Unterbrechung der Spermatogenese. Da die Autoimmunorchitis selten auftritt und fast nie isoliert beobachtbar ist, wird zur Untersuchung dieser Erkrankung oft im

Tierversuch das Modell der experimentellen Autoimmunorchitis (experimental autoimmune orchitis) verwendet. Dabei wird eine Autoimmunorchitis durch aktive Immunisierung mit Spermien-Antigenen ausgelöst. Bei Versuchen an Ratten konnte gezeigt werden, dass die experimentelle Autoimmunorchitis zu starker Reduktion der Occludin-Expression und zur Delokalisation von CL-11 führt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die experimentelle Autoimmunorchitis die Funktion der BHS beeinträchtigt, da im Tierversuch beobachtet wurde, dass die BHS für die Permeabilitäts-Tracer Biotin und Lanthannitrat durchlässig wird (Hedger, 2011).

In einer Studie konnte gezeigt werden, dass männliche Ratten, die transgen für HLA B27 (20 Kopien) und Humanes  $\beta$ 2-Mikroglobulin (50 Kopien) sind, Epididymoorchitis gefolgt von Spondylitis ankylosans (SA), auch bekannt als Morbus Bechterew, entwickeln (Taurog et al., 2012). Die Pathogenese für die EO scheint auch in diesen Fällen ein Autoimmunprozess zu sein.

Nicht nur das  $\beta$ 2-Mikroglobulin, sondern auch die schweren Ketten des Haupthistokompatibilitätskomplexes-Klasse-I (MHC-Klasse-I), die in den Hoden dieser Ratten in freier Form (also nicht in Molekülkomplexen gebunden) gefunden werden können, stehen im Verdacht mit diesen Erkrankungen assoziiert zu sein (Ziegler et al., 2013).

Erwähnenswert ist hierbei, dass eine Kastrierung der Ratten auch nach dem Einsetzen der EO scheinbar die Entwicklung einer SA verhindern kann (Taurog et al., 2012). Die AutorInnen der Studie kommen außerdem zu dem Schluss, dass bei diesen Ratten die EO in einem kausalen Zusammenhang mit der Entwicklung der SA steht. Zur SA kommt es möglicherweise durch eine Form von molekularem Mimikri. Auch bei Menschen konnten Epididymitis und Orchitis bei einigen AS-Patienten beobachtet werden (Taurog et al., 2012). Ob diese Erkrankungen bei Menschen in Zusammenhang stehen, wurde meines Wissens noch nicht erforscht.

## 1.14 Fragestellung und Zielsetzung

In dieser Arbeit sollen folgende Fragestellungen beantwortet werden:

Erstens:

1.) Um Strukturen der Stützzellen des Keimepithels wie die Blut-Hoden-Schranke, das Zytoskelett der Sertoli-Zellen, aber auch das Zytoskelett der Leydig-Zellen darzustellen, werden spezifisch ausgewählte Antikörper eingesetzt. Zur Lokalisation der BHS an den Sertoli-Zellen, werden mehrere Antikörper gegen CL-11 und Occludin verwendet. Um das Zytoskelett – genauer gesagt die Intermediärfilamente – der Sertoli-Zellen und Leydig-Zellen sichtbar zu machen, werden Vimentin und CK-7 eingesetzt. Diese Arbeit soll klären, ob die ausgewählten Antikörper die gesuchten Proteine der Stützzellen darstellen können. Die Ergebnisse werden schließlich mit der bestehenden Fachliteratur abgeglichen.

2.) Es werden in dieser Arbeit aktuelle Kenntnisse über die Stützzellen des Keimepithels und die BHS veranschaulicht. Zusätzlich werden die Vor- und Nachteile der Paraformaldehyd-4%-Lösung und der Bouin'schen Lösung für die Fixierung von Hodengewebe sowie die Auswirkung dieser Fixiermaterialien auf die Immunhistochemie gezeigt und diskutiert.

In dieser Arbeit werden auch die Eigenschaften der Hämatoxylin-Eosin-Färbung beschrieben und mögliche Alternativen erläutert.

## **2. Material und Methode**

### **2.1 Geräte**

#### **Fixierung und Einbettung**

- Einbettautomat Tissue TEK V.I.P. 5 (Sanova, Staufen, Deutschland)

#### **Paraffin/ Gefrierschnitt**

- Gefriermikrotom HM 550 (Zeiss, Wien, Österreich)
- Rotationsmikrotom Microm HM 355 S (Histocom, Wiener Neustadt, Österreich)
- Tissue Flotation Bath TFB 45 (Medite, Burgdorf, Deutschland)
- Objektträger- Strecktisch TFP 40 (Medite, Burgdorf, Deutschland)

#### **Immunhistochemie**

- pH-Meter (Thermo Electron Corporation/ Thermo scientific, LAB Vision, Fremont, CA, USA)
- Decloaking Chamber DC2002 (Biocare Medical, Concord, CA, USA)
- Pipetus (Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland)
- Pipetten (Eppendorf/Reserch, Wien, Österreich)

#### **Auswertung und Dokumentation**

- Lichtmikroskop Olympus PHT (Olympus, Wien, Österreich)
- LEICA Photomikroskop DM 6000 B (Leica Microsystems, Wien, Österreich)

### **2.2 Chemikalien**

- Tissue Tek (OCT Compound) (Sakura, Rijn, Niederlande)
- Tissue Clear (Xylolersatz)
- Paraformaldehyd 4% (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Hämalaun nach Mayers (1000 ml Aqua dest, 1 g Hämatoxylin, 200 mg Natriumjodat, 50 g Kalialaun, 50 g Chloralhydrat, 1 g Zitronensäure)
- Bouinsche` Lösung (Pikrinsäure 5%, Essigsäure 10%, Formaldehyd)
- Ammoniaklösung 25% (MERCK, Darmstadt, Deutschland)
- IHC Diluent (Novocastra/ Leica microsystems, Wien, Österreich)

- Epitope Retrieval Solution 10x Concentrated pH9 (Leica Biosystems, Wien Österreich)
- Epitope Retrieval Solution 10x Concentrated pH6 (Leica Biosystems, Wien, Österreich)
- Peroxidase-Blocking Solution (Dako REAL, Wien, Österreich)
- Ultra Vision LP Large Volume Detection System HRP Polymer (Thermo scientific, LAB Vision, Fremont, CA, USA) beinhaltet: Ultra-Vision Protein Block, Primary Antibody Enhancer, Large Volume HRP Polymer
- AEC Chromogen Single Solution (Thermo scientific, LAB Vision, Fremont, CA, USA)
- Kaiser`s Glyceringelatine (MERCK, Darmstadt, Deutschland)
- Tween 20x (MERCK, Darmstadt, Deutschland)

### **2.3 Verbrauchsmaterialien**

- Einmalklingen C35-ALG (Feather, Osaka, Japan)
- Einmalklingen R35 (Feather, Osaka, Japan)
- Objektträger Superfrost Plus (Thermo scientific, Braunschweig, Deutschland)
- Deckgläser (Assistent, Sondheim v. d. Röhn, Deutschland)
- Einbettkassetten (McCormick Scientific/Thermo Fischer Scientific, Waltham, Ma, USA)
- PAP- Pen (DakoCytomotion Pen, Carpinteria, CA, USA)

## 2.4 Antikörper

**Tabelle 1**

*Verwendete Antikörper, ihre Eigenschaften und Herstellerfirma*

Antikörper	Ausrichtung	Host	Spezifität	Hersteller
Anti-Claudin-11 (AP55120SU-N)	polyclonal	Kaninchen	Ratte	Acris Antibodies, Herford, Deutschland
Anti-Vimentin	monoclonal	Maus	Mensch	DakoCytomotion, Glostrup, Dänemark
Anti-Cytokeratin-7	polyclonal	Kaninchen	Mensch	Acris Antibodys Herford, Deutschland
Anti-Occludin	polyclonal	Kaninchen	Mensch, Ratte, Maus	Acris Antibodys Herford, Deutschland
Anti-Claudin-11 (12152-1-AP)	polyclonal	Kaninchen	Mensch	Proteintech Manchester, Großbritannien
Anti-Claudin-11 (AP15483PU-M)	polyclonal	Kaninchen	Mensch	Acris Antibodys Herford, Deutschland
Negativ Kontrolle IgG	polyclonal	Kaninchen	-	NeoMarkers, Fremont, California, USA

**Anmerkungen.** Da drei unterschiedliche Claudin-11 Antikörper verwendet wurden, wurde zusätzlich die Katalognummer der Antikörper angegeben.

## 2.5 Versuchstiere

Das Versuchsgewebe stammt von zwei Ratten (Wild-Typ). Im Folgenden werden diese als Ratte 1 und Ratte 2 bezeichnet.

Ratte 1: Alter 21 Wochen (147 Tage)

Ratte 2: Alter 20 Wochen (140 Tage)

Die Tiere wurden vom Institut für Biomedizinische Forschung der Medizinischen Universität Graz bereitgestellt.

Die Tötung der Ratten erfolgte vor Ort mit Diethylether. Anschließend wurden die Tiere vom Institut für Biomedizinische Forschung in das Institut für Zellbiologie, Histologie und Embryologie der Medizinischen Universität Graz transportiert. Um die Qualität des Gewebes sicherzustellen, wurden die Tiere in einer gekühlten Polystyrol-Box transportiert.

## **2.6 Gewebepräparation und Fixierung**

Unter Präparation ist die Entnahme von Organen oder Organteilen zu verstehen. In diesem Fall bezieht sich die Gewebepräparation auf die beiden Hoden, Nebenhoden, Milz und Leber der Ratten.

Unter Fixierung versteht man einen Prozess, der den Zellzerfall (Autolyse, Fäulnis) stoppt. Ziel ist es, eine möglichst lebensähnliche Morphologie der Zellen zu erhalten.

Für diese Untersuchung wurden 4%-gepuffertes Paraformaldehyd und Fixiergemisch nach Bouin (Bouin'sche Lösung) als Fixiermittel verwendet. Diesen Vorgang bezeichnet man als chemische Fixierung.

Einige Präparate wurden zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff gelegt. Durch das Gefrieren kommt es in den Zellen zum Stillstand des Stoffwechsels. Man bezeichnet diesen Vorgang als physikalische Fixierung.

Formaldehyd ist ein farbloses, stechend riechendes Gas, das gut wasserlöslich ist. Im gelösten Zustand wird es Formalin genannt. Paraformaldehyd ist ein Polymer des Formaldehyds.

Als Standard in histologischen Labors wird meist 4-10% neutral gepufferte Paraformaldehydlösung verwendet. Die Wirkungsweise von PFA basiert auf einer Proteinvernetzung. Die Eindringgeschwindigkeit in das Gewebe beträgt bei Formalin etwa 1 Millimeter pro Stunde. Da die Proteinvernetzung relativ langsam abläuft, ergibt sich erst nach etwa 24 Stunden eine ausreichende Gewebefixierung.

Die Bouin'sche Lösung (BL) setzt sich aus Pikrinsäurelösung, Formaldehyd und Essigsäure zusammen. Die Wirkung der BL basiert auf der Fällung von Eiweiß (Denaturierung) durch die Pikrinsäure. Durch den niedrigen pH-Wert der BL kommt es zur Zerstörung der Tertiär- und Quartärstruktur von Proteinen und zur Neuvernetzung der Proteine untereinander. Dadurch kann es allerdings zu Verlust an Antigenität kommen.

### 2.6.1 Protokoll zur Gewebepräparation und Fixierung

Unmittelbar nach der Tötung der Ratten wurden die Hoden und die Nebenhoden beider Tiere entnommen. Auch die Milz und die Leber der Ratte 1 wurden präpariert. Dies wurde mithilfe eines Skalpells, einer Schere und einer Pinzette durchgeführt.

Der rechte Hoden der Ratte 1 wurde in zwei gleich große Teile geschnitten. Eine Hälfte wurde mit Tissue Tek (OCT-Compound, Gefriermedium zum Aufblocken - ALG) angefroren um Gefrierschnitte herstellen zu können. Die zweite Hälfte wurde in BL fixiert.

Der linke Hoden der Ratte 1 wurde in 4%-gepuffertem PFA fixiert. Der rechte Nebenhoden der Ratte 1 wurde in BL fixiert.

Der linke Nebenhoden wurde in zwei gleich große Teile geschnitten, wobei ein Teil in BL fixiert und der andere Teil für den Gefrierschnitt vorbereitet wurde.

Als Kontrollgewebe für die geplante immunhistochemische Färbung wurde auch die Leber der Ratte 1 entnommen. Die Leber wurde in zwei Hälften geteilt, wobei die eine Hälfte in BL und die andere Hälfte in PFA fixiert wurde.

Die Milz der Ratte 1 wurde ebenfalls entnommen und in zwei Hälften geteilt. Die eine Hälfte wurde in BL fixiert, die andere in PFA.

Der linke Hoden der Ratte 2 wurde zur Aufbewahrung und Lagerung in flüssigen Stickstoff (N<sub>2</sub>) gelegt.

Der rechte Hoden der Ratte 2 wurde in zwei gleich große Hälften geteilt und anschließend wurde eine Hälfte in BL, die andere Hälfte in PFA fixiert.

Abschließend wurde der rechte Nebenhoden der Ratte 2 in BL fixiert und der linke Nebenhoden in PFA.

Nachdem die Präparate 24 Stunden in den Fixiermedien inkubiert waren, wurden die Präparate in kleinere Stücke geschnitten, um das Eindringen des Fixiermittels in das Gewebe zu verbessern. Dies wurde so durchgeführt, dass die einzelnen Gewebestücke einen Durchmesser von fünf Millimeter nicht überschreiten. Jeder dieser Gewebeschnitte wurde in je eine Einbettkassette gelegt, die zuvor mit einer eindeutigen Kennnummer beschriftet wurden. Anschließend wurden die Präparate wieder in das Fixiermedium gelegt. Nachdem die Präparate 24 Stunden im Fixiermittel inkubiert waren, wurden beide Fixiermedien abgegossen.

Die in 4% PFA fixierten Präparate wurden für 30 Minuten unter fließendes Leitungswasser gestellt, um die Reste des Fixiermittels vor der Paraffineinbettung zu entfernen.

Die in BL fixierten Präparate wurden in 70% Alkohol gelegt (Abb.7). Der Alkohol wurde einmal nach 30 Minuten und einmal nach 24 Stunden gewechselt. Insgesamt wurden die

Präparate, die in BL fixiert waren, für vier Tage in 70% Alkohol gelagert. Dies war notwendig, um das Fixiermittel auszuwaschen und dadurch Verfärbungen am Paraffin durch die pikrinsäurehaltige BL zu vermeiden.



Abbildung 4

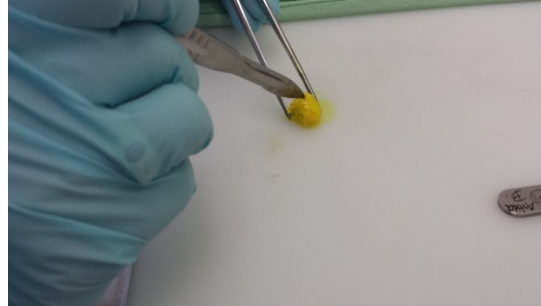


Abbildung 5

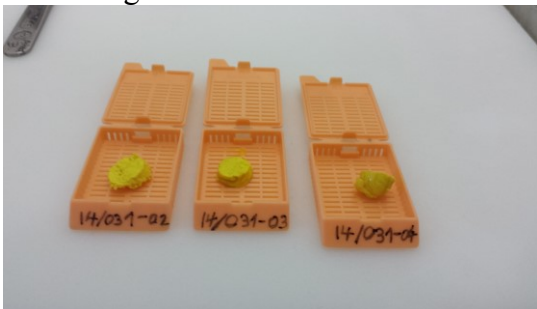


Abbildung 6

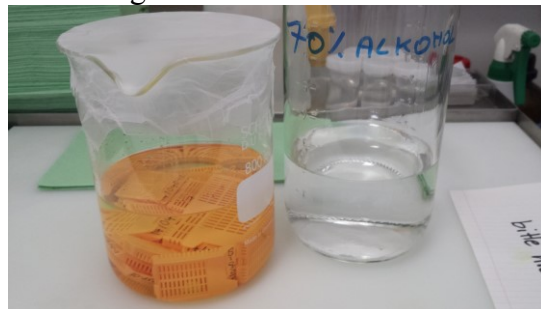


Abbildung 7

Abbildung 4: *rechter Hoden und Nebenhoden (Ratte 1) nach Präparation.*

Abbildung 5: *Zerkleinerung der Präparate um das Eindringen der Fixiermedien in das Gewebe zu verbessern. Durch die Pikrinsäure kommt es zur Gelbfärbung des Gewebes.*

Abbildung 6: *Präparate in Einbettkassetten.*

Abbildung 7: *Präparate in 70% Alkohol.*

## 2.7 Einbettung

Nach der Fixierung muss das Gewebe in einen Zustand gebracht werden, der es ermöglicht dünne und regelmäßige Schnitte der Präparate zu erzeugen. Um dies zu erreichen, wird das Gewebe mit einem Einbettungsmittel durchtränkt. Da Paraffin nicht mit Wasser mischbar ist, müssen die Präparate zuerst entwässert werden. Durch eine „aufsteigende Alkoholreihe“ (60%, 80%, 96%, 100%) entzieht man dem Gewebe stufenweise Wasser. Diese schrittweise Entwässerung ist notwendig, um Effekte wie Zerreißen und Schrumpfung des Gewebes möglichst zu vermeiden.

Zu diesem Zweck wurde Paraffin als Einbettungsmittel verwendet. Paraffin ist ein polykristallines Gemisch aus Alkanen (gesättigte Kohlenwasserstoffe).

Bevor die Präparate mit Paraffin durchtränkt werden können, müssen sie zuerst in ein Intermedium, also einen Stoff, der sowohl mit Alkohol als auch mit Paraffin mischbar ist,

gelegt werden. Dieser Vorgang wird *Clearing* genannt. In diesem Versuch wurde hierfür Tissue Clear (ein Xylolersatzstoff) verwendet.

Damit Paraffin ausreichend das Gewebe infiltrieren kann, muss das Einbettmedium in flüssiger Form vorliegen (Schmelzpunk ca. 52-60°C). Die Verfestigung des Paraffins erfolgt durch Abkühlen.

Diese Schritte erfolgen in einem modernen histologischen Labor meist automatisiert durch einen Einbettautomaten.

### 2.7.1 Protokoll zur Einbettung

Nachdem das Fixiermittel ausgewaschen wurde, wurden die Gewebekassetten in den Kassettenkorb gelegt. Der Korb wurde in die Retorte des Einbettautomaten gestellt.

Anschließend wurde der Einbettprozess gestartet.

Bei den Paraformaldehyd-fixierten Präparaten wurde das Gewebe zuerst für 60 Minuten in 60% Alkohol gelegt, anschließend für 60 Minuten in 80% Alkohol und für weitere 60 Minuten in 96% Alkohol.

Danach wurden die Präparate für drei Stunden in 100% Alkohol getaucht, wobei der Alkohol alle 60 Minuten gewechselt wurde. Auf die gleiche Weise wurde dies mit Tissue Clear (Xylolersatz) und danach mit Paraffin durchgeführt. Bei den mit BL fixierten Präparaten verlief dieser Vorgang gleich, mit der Ausnahme, dass die Entwässerung des Gewebes nicht mit 60% Alkohol, sondern mit 70% Alkohol gestartet wurde (da das Fixiermittel bereits mit 70% Alkohol ausgewaschen wurde).

Nach dem Ende des Programmes wurden die Präparate aus dem Einbettautomaten genommen und zur Ausgießstation gebracht. Dort wurde das Gewebe in Paraffinblöcke gegossen. Dazu wurden die Einbettkassetten geöffnet und die Gewebestücke einzeln in Ausgießformen gelegt, die der Größe der Präparate angepasst waren. Die Ausgießformen wurden schließlich mit flüssigem Paraffin aufgegossen. Um die Präparate unterscheiden zu können, wurde auch der beschriftete Teil der Einbettkassetten in das Paraffin gedrückt. Anschließend wurden die Metallbehälter für 20 Minuten auf eine Kühlplatte gelegt um das Paraffin auszuhärten. Abschließend wurden die ausgehärteten Paraffinblöcke vorsichtig mit Hilfe eines Schraubenziehers aus den Metallbehältern gebrochen.

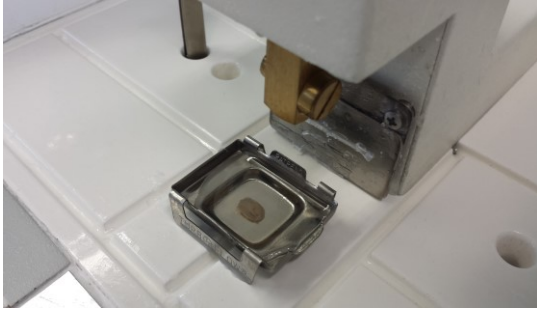


Abbildung 8

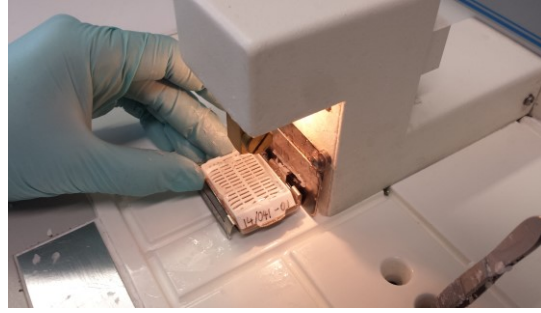


Abbildung 9

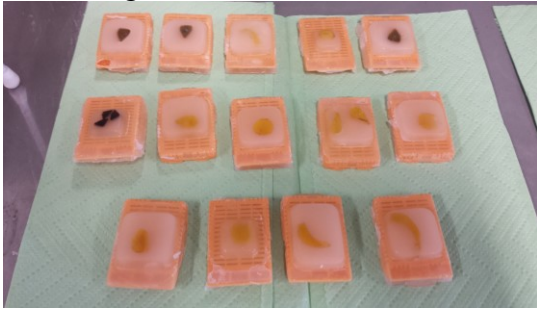


Abbildung 10

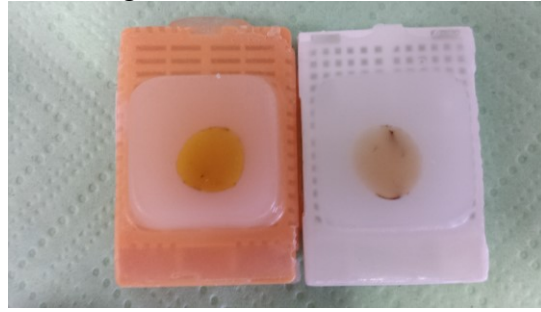


Abbildung 11

Abbildung 8: *Gewebe wird in der Ausgießstation mit Paraffin übergossen.*

Abbildung 9: *Der Deckel der Einbettkassette wird in das Paraffin gedrückt und nochmals mit Paraffin übergossen.*

Abbildung 10: *Fertige Paraffinblöcke.*

Abbildung 11: *Vergleich eines in BL fixierten Präparats (links) mit einem in PFA fixierten Präparats.*

## 2.8 Gefrierschnitt

Das Gewebe, das für den Gefrierschnitt vorgesehen war, wurde in Tissue Tek (OCT-Compound) eingelegt und bei minus 20°C angefroren. Zur Schnittherstellung wurde das Gefriermikrotom HM 550 verwendet, in das eine Einmalklinge (Feather/C35 – ALG) eingespannt wurde. Nach dem Einspannen des Gewebeblocks, wurde der Block getrimmt (näheres zu „Trimmen“ siehe Kapitel *Paraffinschnitt*). Von dem Gewebe wurden Schnitte mit der Schichtdicke von je fünf Mikrometer angefertigt. Die Schnitte wurden mithilfe einer Pinzette und einem Pinsel auf Objektträger (Superfrost Plus) aufgebracht und für zwei Minuten luftgetrocknet. Anschließend wurde eine HE-Färbung durchgeführt.

## 2.9 Paraffinschnitt

Zur Herstellung der Paraffinschnitte wurde ein Rotationsmikrotom Microm HM 355 verwendet, in das Einmalklingen (Feather/R35) eingespannt wurden. Auch die Paraffinblöcke wurden in eine dafür vorgesehene Halterung eingespannt und eine Schichtdicke von fünf Mikrometer gewählt. Zuerst wurde der Block getrimmt, das heißt, dass der Paraffinblock soweit eingeschnitten wurde, dass genug Zellmaterial auf den darauffolgenden Schnitten vorhanden war. Das Trimmen erfolgte manuell mit 10 Mikrometer dicken Schnitten. Für die fünf  $\mu\text{m}$  Schnitte wurde das Mikrotom auf Automatik umgestellt. Die Schnitte wurden mithilfe eines Pinsels von der Klinge abgehoben und zuerst in ein kaltes Wasserbad gelegt. Dort wurden die Paraffinschnitte glattgezogen um grobe Falten im Gewebe zu entfernen. Danach wurden die Schnitte in ein Becken mit erwärmtem Wasser (Tissue Flotation Bath TFB 45) gelegt um die Schnitte von kleineren Unebenheiten zu befreien. Die Schnitte wurden auf die Objektträger (Superfrost Plus) aufgetragen und zum Trocknen für 24 Stunden auf eine Heizplatte (Objektträger-Strecktisch TFP 40) bei  $45^{\circ}\text{C}$  gelegt.

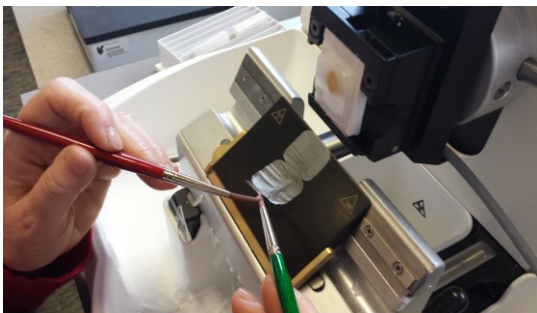


Abbildung 12



Abbildung 13

Abbildung 12: *Anfertigung von Paraffinschnitten mit dem Rotationsmikrotrom.*

Abbildung 13: *Strecken der Schnitte im Tissue Flotation Bath.*

## 2.10 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff, der aus Blauholz gewonnen wird. Durch die Oxidation (durch Luftsauerstoff oder durch Verwendung geeigneter Oxidanzien) des Hämatoxylins entsteht der leicht saure, wirksamere Farbstoff Hämatein. Dieser Vorgang wird als Reifung bezeichnet. Da Hämatein schlecht an Gewebekomponenten bindet, müssen erst Alaunsalze (Beize) zugesetzt werden. Alaune sind Doppelsalze von Kalium

und Aluminium. Durch den Zusatz von Alaunen kommt es zur Komplexbildung von mehrwertigen Metallkationen und dem Hämatein. So entstehen Hämatoxylinlacke. Hämatoxylinlacke des Aluminiums nennt man auch Hämalaune. Am Institut für Zellbiologie, Histologie und Embryologie der Medizinischen Universität Graz wird Hämalaun nach Mayers hergestellt (siehe Materialliste). Gewebebehandlung mit Hämalaun führt vor allem zur violetten oder bläulichen Färbung der Zellkerne. Dies lässt sich folgendermaßen erklären: Hämalaunlösungen sind stark positiv geladene Farbstoffe mit einem niedrigen pH-Wert. Sie binden daher vor allem an negativ geladene, basophile Strukturen wie zum Beispiel die DNA des Kernchromatins.

Bei niedrigem pH-Wert zeigen Hämatoxylinlacke eine rötlich-bräunliche Farbe. Man färbt das Gewebe in der sauren Lösung und spült es anschließend mit Leitungswasser oder einer schwachen Base (in diesem Fall mit Amoniumwasser), um den blauen Farbton zu erhalten. Man nennt diesen Vorgang Bläuen.

In histologischen Labors wird meist eine Kombination von Hämatoxylin-Färbung und Eosin-Färbung verwendet.

Eosin ist ein saurer Farbstoff (pH-Wert zwischen 4 und 6), der Strukturen wie Zytoplasma und Kollagenfasern kräftig rot färbt. Dies geschieht durch eine Ionenbindung zwischen dem negativ geladenen Farbstoff und den überwiegend positiv geladenen Zytoplasma-Proteinen. Somit ergibt sich bei der HE-Färbung ein starker Kontrast zwischen den bläulich gefärbten Zellkernstrukturen und dem rötlich gefärbtem Zytoplasma.

#### 2.10.1 Protokoll zur Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Da das Paraffin den Zugang (Infiltration) der Farbstoffe in das Gewebe verhindern würde, müssen die Präparate zuerst entparaffiniert und anschließend wieder in ein wässriges Medium gebracht werden. Um dies zu erreichen, ist es nötig das Gewebe zuerst mit einem Intermedium zu behandeln. Darauffolgend werden die Präparate mithilfe einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert.

Dafür wurden zwei Glas Küvetten Tissue Clear bereitgestellt. Die Gewebeschnitte wurden für 10 Minuten in den ersten Behälter und für 10 Minuten in den zweiten Behälter gelegt. Danach wurden die Präparate in ein 1:1 Gemisch aus 100% Alkohol und Tissue Clear gegeben. Die Präparate wurden erst wieder aus dem Gemisch genommen, sobald sich keine sichtbaren Schlieren des Paraffins mehr von dem Gewebe lösten. Anschließend wurden die Präparate mit Alkohol in absteigender Konzentration (100%, 96%, 80%, 70%, 50%) behandelt. Die Präparate wurden nur für einige Sekunden in die entsprechende

Alkoholkonzentration gelegt. Dabei war darauf zu achten, dass die Schnitte, wenn sie von einer Alkoholkonzentration in die nächste gebracht wurden, nicht zu lange an der Luft waren, um ein Austrocknen des Gewebes zu verhindern. Daraufhin wurden die Schnitte in destilliertes Wasser (Aqua dest.) gelegt. Für die Kernfärbung wurden die Schnitte für 10 Minuten in Mayer`s Hämalaun getaucht. Anschließend wurden die Präparate in Aqua dest. gelegt. Das Aqua dest. wurde gewechselt (zwei bis drei Mal) bis sich keine Farbe mehr von den Objektträgern löste. Um den Farbstoff zu bläuen wurden die Schnitte in Amoniumwasser (2,5 ml Ammoniak/ 1 L Aqua dest.) gelegt. Dieser Vorgang dauert nur einige Sekunden, wobei man selbst mitverfolgen kann, wie sich das Gewebe blau färbt. Danach werden die Präparate in 96% Alkohol gelegt, wobei der Alkohol so oft gewechselt wird, bis keine Farbwolken mehr abgehen. Um das Gewebe wieder zu dehydrieren wurden die Schnitte für einige Sekunden in 100% Alkohol, dann in ein 1:1 Alkohol-Xylolersatz-Gemisch und schließlich in Tissue Clear gebracht. Abschließend erfolgte das Eindeckeln mit Cytoseal. Dafür wurde ein Tropfen des Eindeckel-Mediums auf das Gewebe gebracht und das Deckglas sorgfältig aufgesetzt um Luftblasen zu vermeiden.

## **2.11 Immunhistochemie**

Das Prinzip der Immunhistochemie beruht auf dem Sichtbarmachen und der Lokalisierung eines Stoffes bzw. einer histologischen Struktur mittels der Antigen-Antikörperreaktion.

Die Antikörper sind dabei mit einem speziellen Detektionssystem gekoppelt.

Antikörper (Immunglobuline) sind Glykoproteine, deren Aufgabe es ist, ein Antigen spezifisch zu binden. Antikörper werden von Plasmazellen sezerniert, welche sich aus Antigenstimulierten B-Lymphozyten differenzieren. Diese Zellen sind Teil der adaptiven (erworbenen) Immunabwehr.

Antikörper zeigen eine Y-förmige Molekülstruktur. Sie bestehen aus zwei identischen „leichten“ und aus zwei identischen „schweren“ Peptidketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Anhand der konstanten Domäne (C-Region), der schweren Ketten, lassen sich fünf Isotypen von Antikörpern unterscheiden (IgM, IgG, IgA, IgE, IgD). Die leichten Ketten lassen sich in zwei Gruppen aufteilen ( $\kappa$ ,  $\lambda$ ).

Sowohl die schweren als auch die leichten Peptidketten besitzen auch eine variable Domäne (VL und VH). Diese Region ist für die Antigen-Spezifität verantwortlich.

Da das Antikörper-Molekül eine Y-förmige Struktur hat, besitzt es eine sogenannte Gelenksregion (hinge region). Die leichten Peptidketten liegen dabei zur Gänze auf einer

Seite dieser Gelenksregion und bilden mit dem Abschnitt der schweren Ketten, der sich auf der gleichen Seite der Gelenksregion befindet, das antigenbindende Fragment (Fab-Fragment). Auf der gegenüberliegenden Seite der Gelenksregion liegt das sogenannte kristallisierbare Fragment (Fc - Fragment), das nur aus der konstanten Domäne der schweren Kette gebildet wird.

Die Antikörper für die Immunhistochemie werden aus Versuchstieren (v.a. Maus, Kaninchen, Schwein, Ziege) gewonnen. Hierzu wird das Versuchstier mit dem Antigen, das untersucht werden soll, immunisiert. Dadurch kommt es im Versuchstier zur Produktion von Antikörpern gegen das Antigen.

Diese Antikörper können dann aus dem Serum des Versuchstieres gewonnen werden. Man spricht dann von polyklonalen Antikörpern, da sie von verschiedenen Plasmazellen stammen.

Antikörper, die nur von einer Plasmazelle stammen, nennt man monoklonale Antikörper. Um einen antikörperproduzierenden Zellklon zu gewinnen, muss man eine Plasmazelle mit einer Myelomzelle (langlebige Tumorzelle) kreuzen. Mit diesem Zellklon wird eine Zellkultur angelegt.

Es lassen sich drei Prinzipien der immunhistochemischen Färbung unterscheiden:

Bei der direkten Methode ist die markierende Substanz (z.B. Enzyme, Fluorochrome, Biotin) direkt an den Primärantikörper gekoppelt.

Da Immunglobuline selbst antigene Eigenschaften besitzen, lassen sich Antikörper gegen das Fc-Fragment anderer Antikörper binden. Dieses Prinzip wird bei der indirekten Methode angewendet. Dabei wird ein primärer Antikörper mittels eines markierten Sekundärantikörpers nachgewiesen, indem der primäre Antikörper selbst als Antigen dient. Als dritte Methode ist das Enzym-Immunglobulin-Komplexverfahren zu nennen. Hierbei bindet wieder der Primärantikörper an das Antigen. Der Sekundärantikörper dient als Brückenantikörper, der ein weiteres Immunglobulin bindet. Dieser Antikörper ist gegen ein Enzym gerichtet, das mithilfe einer immunhistochemischen Reaktion sichtbar gemacht werden kann.

Kontrollen in der Immunhistochemie werden vor allem zur Überprüfung der Antikörper-Spezifität eingesetzt.

Man unterscheidet dabei die positive Gewebe-Zell-Kontrolle, die negative Gewebe-Zell-Kontrolle und die Negativ-Antikörper-Kontrolle.

Positive Gewebe-Zell-Kontrolle: Hierzu wird neben dem Zielgewebe auch Kontrollgewebe mitgefärbt, das das gesuchte Antigen mit Sicherheit beinhaltet (z.B. Vimentin: Zielgewebe: Hoden, Kontrollgewebe: Leber)

Negatives Kontrollgewebe: Ein Gewebe wird gewählt, das das zu untersuchende Antigen mit Sicherheit nicht enthält.

Negativ Antikörper-Kontrolle: Das Gewebe wird mit einem unspezifischen Antikörper behandelt, um die Qualität der Gewebepreparation und des Detektionssystems zu bewerten und um unspezifische Färbungen frühzeitig zu erkennen. Im Rahmen dieses Projektes wurde bei jeder immunhistochemischen Färbung ein Kontrollantikörper als Negativkontrolle verwendet.

### 2.11.1 Protokoll zur Immunhistochemie

Vor dem Start der immunhistochemischen Färbung mussten eine Pufferlösung hergestellt werden. Dies ist zur Optimierung des Reaktionsmilieus nötig, da Antikörper, wie andere Proteine auch, durch den pH-Wert beeinflusst werden. Dafür wurde ein TBS-T Puffer (Tris-buffered saline + Tween 20) gewählt. TBS-T besteht aus 20x TBS (60.57g Tris und 175.3g NaCl, die in einem Liter Aqua. dest. aufgelöst werden und mit konzentrierter Salzsäure auf einen pH-Wert von 7.4 - 7.6 gebracht werden), Aqua. dest., und Tween 20x. Ein Liter TBS-T Puffer besteht aus 950 ml Aqua dest., 50 ml 20x TBS und 0.5 ml Tween. Der Zusatz von Tween 20x dient zur Reduktion der Oberflächenspannung.

Wie vor der HE-Färbung muss auch vor der immunhistochemischen Färbung das Gewebe zuerst entparaffiniert und rehydriert werden. Hierzu wurden wieder ein Xyloersatzstoff und die absteigende Alkoholreihe verwendet, bis die Schnitte schließlich in Aqua dest. gelegt werden konnten (für das genauere Vorgehen siehe Protokoll zur HE-Färbung).

Nach dem Entparaffinieren ist darauf zu achten, dass es während des gesamten Vorgangs nicht zur Austrocknung des Gewebes kommt.

Im Anschluss an das Entparaffinieren und Rehydrieren erfolgt das „Antigen-Retrieval“ (Antigendemaskierung, Epitop-Demaskierung). Unter Maskierung versteht man, dass dem Primärantikörper der Zugang zu seiner Bindungsstelle (Epitop) erschwert ist, da es durch die Fixierung zur Vernetzungen und Verdünnung der Molekülstruktur im Gewebe kommt. Das Lösen dieser Vernetzungen kann entweder mit Enzymen, Hitze oder einer Kombination dieser Verfahren geschehen. Für diese Versuchsreihe war ein Druckkochtopf im Einsatz. Oft lassen sich die Ergebnisse der Demaskierung durch Retrieval-Lösungen verbessern. Es wurden entweder eine Epitope Retrieval Solution pH9 oder eine Epitope

Retrival Solution pH6 verwendet. Empfehlungen für eine dieser Lösungen waren meist auf den Gebrauchsanweisungen (Datasheets) der Antikörper zu finden. Waren keine Angaben zur Antigendemaskierung auf dem „Datasheet“, wurde die Antikörperdemaskierung sowohl mit der pH6- als auch mit der pH9-Lösung durchgeführt. Außerdem wurde in einem solchen Fall auch eine Immunhistochemie ohne Antigen-Retrieval durchgeführt. Zur Durchführung der AGR wurden 20 ml der Retrival-Lösung in ein hitzefestes Gefäß gegossen. Dann wurde das Gefäß mit 180 ml Aqua dest. auf 200 ml aufgefüllt und die Schnitte in die Lösung gelegt. Das Gefäß mit den Präparaten wurde in den Druckkochtopf gestellt. Im Druckkochtopf wurden die Schnitte für sieben Minuten bei 120 °C erhitzt (Wobei es etwa 30 Minuten dauert bis der Druckkochtopf diese Temperatur erreicht und etwa genau solange, bis der Druck wieder abgebaut ist und die Schnitte wieder so abgekühlt sind, dass man sie aus dem Topf entnehmen kann). Nachdem die Schnitte wieder aus dem Kochtopf entnommen wurden, blieben sie noch für etwa 20 Minuten in der AGR- Lösung um abzukühlen. Anschließend wurden sie für fünf Minuten in miterwärmtes Aqua dest. überführt. Erst dann wurden sie in Aqua dest. bei Raumtemperatur gelegt. Mit einem PAP-Pen (wasserabweisender Stift) wurde das Gewebe auf dem Objektträger umrandet, um das Abrinnen der Reagenzien zu verhindern. Die Objektträger wurden in eine Inkubationskammer gelegt, in der die Reaktionen lichtgeschützt ablaufen können und die Reagenzien abgespült werden können.

Als Detektionssystem wurde das Ultra Vision LP Detection System verwendet. Dieses Detektionssystem beinhaltet Ultra Vision Block, Primary Antibody Enhancer und HRP Polymer (näheres siehe Materialliste).

Um unspezifische Hintergrundfärbung durch die endogene Peroxidase zu verringern, wurde für 10 Minuten Peroxidase-Blocking Solution (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Block) auf das Gewebe aufgetragen. Nach den 10 Minuten wurde die Peroxidaselösung mit destilliertem Wasser abgespült. Um die Hintergrundfärbung durch unspezifische Proteinbindung noch weiter zu reduzieren, wurden die Präparate für fünf Minuten mit Ultra Vision Block präinkubiert. Nach dem Abkippen der Blockierlösung wurde der Primäantikörper mit Hilfe einer geeigneten Pipette aufgetragen.

Vor diesem Schritt müssen die Antikörper jedoch verdünnt werden. Dies geschieht mit IHC Diluent (Antibody Diluent). Angaben zu den geeigneten Verdünnungen der Antikörper finden sich auf den jeweiligen „Datasheets“. Zu den in diesem Versuch verwendeten Verdünnungen siehe Tabelle 2.

Die Inkubationszeit mit dem Primärantikörper betrug 45 Minuten. Nach dieser Zeit wurden die Schnitte mindestens drei Mal mit TBS-T Puffer ab gespült.

Um die Signalintensität zu steigern und eine spezifischere Antikörper-Antigenbindung zu erhalten, wurden Präparate nachdem sie mit dem Primärantikörper inkubiert wurden, für 10 Minuten mit dem Antibody-Enhancer behandelt und anschließend nochmals mit TBS-T Puffer ab gespült. Dies war allerdings nur nötig, wenn der verwendete Antikörper (in diesem Versuch Vimentin) aus Mäusen gewonnen wurde.

Dieser Schritt ist bei Gewebe, das mit Kaninchen-Antikörpern behandelt wurde, nicht nötig.

Im nächsten Schritt wird der Primärantikörper durch einen Sekundärantikörper gebunden, der an ein Enzym (horseradish peroxidase, HRP) gekoppelt ist. Dazu wurde HRP Polymer für 15 Minuten auf das Gewebe aufgetragen.

HRP Polymer wurde mindestens drei Mal mit TBS-T Pufferlösung abgeschwemmt. Als nächster Schritt folgte das Visualisieren des Antikörper-Immunkomplexes. Dazu wurde AEC Single Solution (Amino-ethylcarbazol) für 10 Minuten auf das Gewebe aufgetragen. Anschließend wurden die Schnitte in eine Rillenküvette mit Aqua dest. übertragen und das destillierte Wasser drei Mal gewechselt.

Zur Gegenfärbung wurden die Präparate für 10 Minuten mit Mayer`s Hämalaun inkubiert. Danach wurden die Schnitte mehrmals mit Aqua dest. gespült bis sich keine Farbe mehr von den Objektträgern löste. Um den Farbstoff zu bläuen wurden die Schnitte in Amoniumwasser (2,5 ml Ammoniak/ 1 L Aqua dest.) gelegt. Dieser Vorgang dauerte nur einige Sekunden und anschließend wurden die Präparate wieder in destilliertes Wasser gelegt.

Abschließend wurden die Objektträger mit Filterpapierstreifen trockengetupft und ein Tropfen von erwärmter Kaiser-Glycerin-Gelatine auf das Gewebe gebracht. Die Deckgläser wurden sorgfältig (um Luftblasen zu vermeiden) auf den Objektträger aufgebracht.

**Tabelle 2**

Primäre Antikörper, verwendete Antigen Retrieval-Puffer und Verdünnungen

Antikörper Spezies	Antigen Retrieval-Puffer	Verdünnung ( $\mu\text{g/ml}$ )	Hersteller
Anti-Claudin-11 (AP55120SU-N)	pH 9	1:50, 1:100, 1:500	Acris Antibodies, Herford, Deutschland
Anti-Vimentin	pH 9	1:3000, 1:5000	DakoCytomotion, Glostrup, Dänemark
Anti-Cytokeratin7	pH 9	1:200	Acris Antibody, Herford, Deutschland
Anti-Occludin	Ohne AGR, pH 9, pH 6	1:300, 1:400, 1:500,	Acris Antibody, Herford, Deutschland
Anti-Claudin-11 (12152-1-AP)	Ohne AGR, pH 9, pH 6	1:50	Proteintech, Manchester, Großbritannien
Anti-Claudin-11 (AP15483PU-M)	pH 6, pH 9	1:200, 1:300, 1:400	Acris Antibody, Herford, Deutschland
Negativ Kontrolle IgG	Ohne AGR, pH 9, pH 6	Wurde auf die Konzentrationen der anderen Antikörper. angepasst.	NeoMarkers, Fremont, California, USA

## 2.12 Lichtmikroskopie und Photomikroskopie

Zur Beurteilung der Ergebnisse der HE-Färbung und der immunhistochemischen Färbungen wurde ein Lichtmikroskop der Firma Olympus verwendet.

Zur Dokumentation und Aufzeichnung der Ergebnisse wurde das LEICA Photomikroskop DM 6000 B der Firma Leica Microsystems verwendet. Zur Aufnahme und Bearbeitung der Bilder wurde das Computerprogramm Irfanview verwendet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Vergleich der Fixiermedien

Die Strukturen des Keimepithels sind morphologisch in den mit Bouin`scher Lösung fixierten Präparaten besser erhalten geblieben als in den mit 4%-gepuffertem Paraformaldehyd fixierten Präparaten. Dies zeigt sich am besten in Paraffinschnitten, die mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt wurden (Abb. 14 und 15). In den mit PFA fixierten Präparaten zeigt sich eine starke Vergrößerung des interzellulären Raums, die durch Konzentration und dadurch Schrumpfung des Zytoplasmas der Zellen entsteht. Es ist trotz dieser Effekte möglich, in dem mit PFA fixierten Gewebe die meisten Zelltypen des Keimepithels und des Interstitiums voneinander zu unterscheiden (Abb. 15). Allerdings war bei der immunhistochemischen Färbung zu erkennen, dass die Antigene besser erhalten bleiben und die Epitope durch die meisten der verwendeten Antikörper bei den in PFA fixierten Präparaten stärker färbbar sind, als in den Präparaten, die mit BL fixiert wurden.

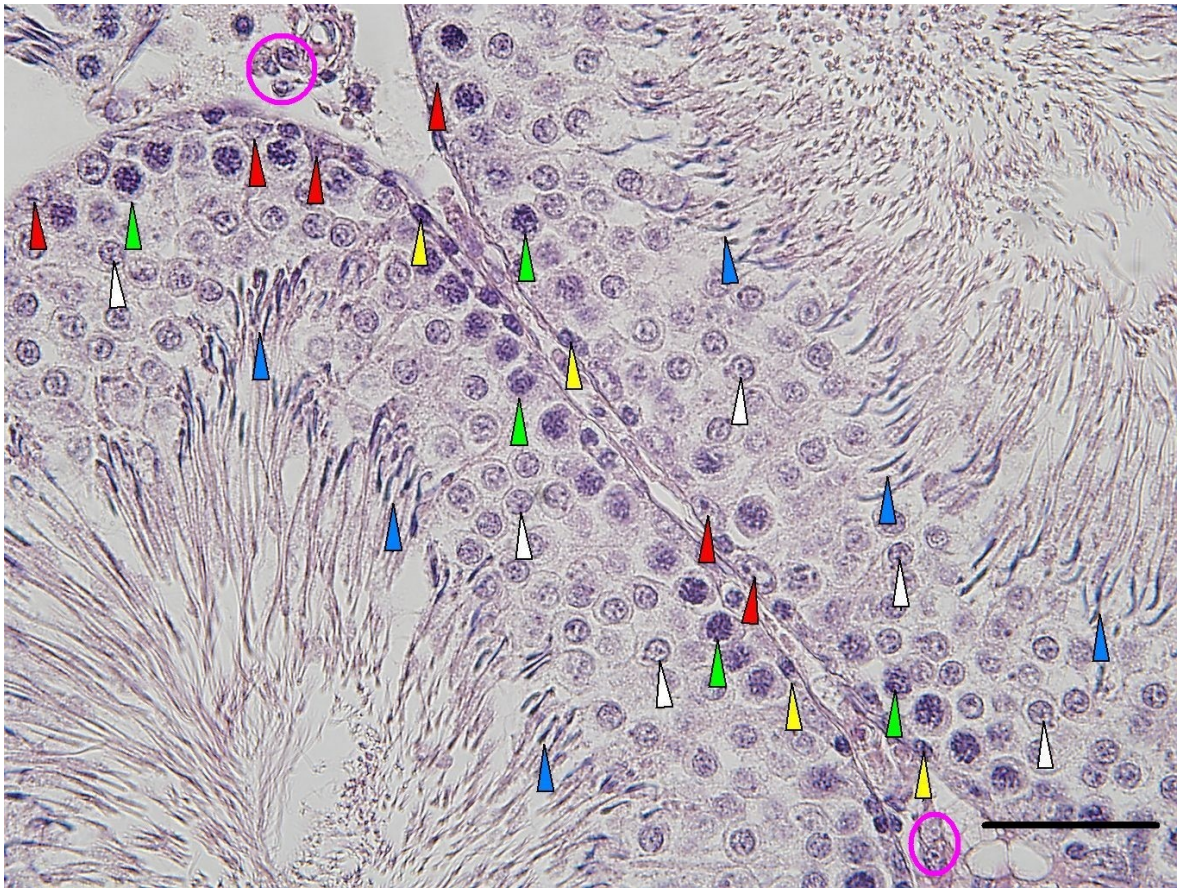


Abbildung 14

*HE-Färbung, BL fixiertes Präparat (Vergrößerung 40-fach).  
rote Pfeilköpfe: Sertoli-Zellen, gelbe Pfeilköpfe: Spermatogonien, grüne Pfeilköpfe:  
Spermatocyten, weiße Pfeilköpfe: runde Spermatiden, blaue Pfeilköpfe: entrundete  
Spermatiden, rosa Kreise: Leydig-Zellen. Scale bar: 40  $\mu$ m*

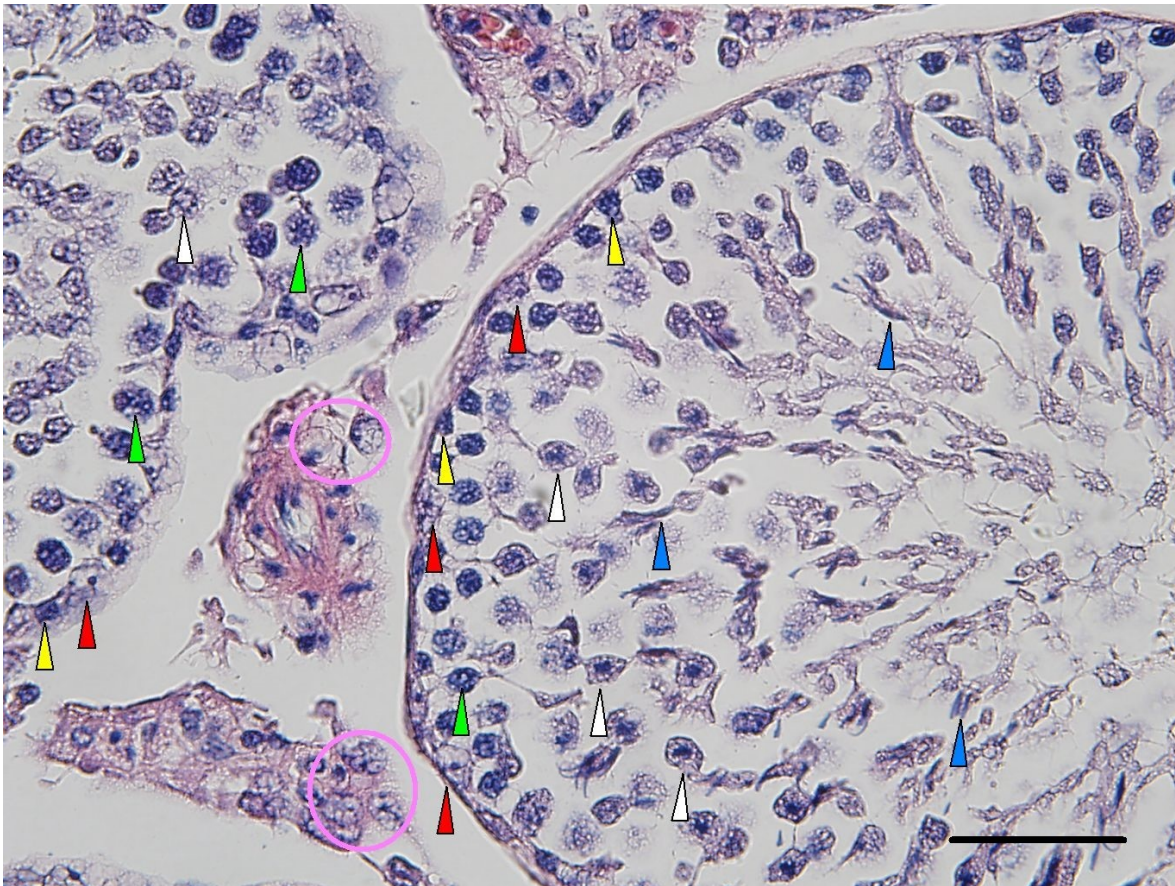


Abbildung 15

*HE-Färbung, PFA fixiertes Präparat (Vergrößerung 40-fach).*

*Im Gegensatz zu dem Präparat, das in BL fixiert wurde, zeigt sich hier eine deutlich schlechter erhaltene Struktur des Stütz- und Keimepithels.*

*rote Pfeilköpfe: Sertoli-Zellen, gelbe Pfeilköpfe: Spermatogonien, grüne Pfeilköpfe: Spermatozyten, weiße Pfeilköpfe: runde Spermatiden, blaue Pfeilköpfe: entrundete Spermatiden, rosa Kreise: Leydig-Zellen. Scale bar: 40  $\mu$ m*

### 3.2 Vimentin

Mit dem verwendeten Antikörper lassen sich sehr gute Ergebnisse erzielen. Schon ab einer Verdünnung von 1:5000 erkennt man die spezifische Proteinbindung des Antikörpers, die allerdings in den PFA fixierten Präparaten deutlich stärker zu erkennen ist als in den mit BL fixierten Präparaten. Meist wurde eine Verdünnung von 1:3000 gewählt. Abbildung 16 und 17 sollen zeigen wie sich die Ergebnisse der Vimentin-Färbung bei gleicher Konzentration des Antikörpers unterscheiden, wenn die Gewebeschnitte zuvor mit unterschiedlichen Fixierlösungen behandelt wurden. Die Färbung zeigt sich, wie in der bestehenden Fachliteratur beschrieben, am stärksten im Bereich um die basal gelegenen Zellkerne der Sertoli-Zellen. Wie in der Studie von Zhu et al. (1997) gezeigt, lässt sich

erkennen, dass die Vimentin-Färbung entlang des Zellkörpers der Sertoli-Zellen nach luminal abnimmt. Es lässt sich an manchen Stellen auch eine Protein-Färbung in den Zellfortsätzen erkennen, in denen man die BHS vermuten kann (Abb.18). Dies ist allerdings nur in den PFA fixierten Präparaten beobachtbar. Es zeigt sich außerdem eine starke Färbung des Interstitiums sowie der darin zu findenden Leydig-Zellen. Die Vimentin-Färbung lässt sich in manchen Tubuli bis zu den Köpfen der entrundeten Spermatiden verfolgen (Abb. 19).

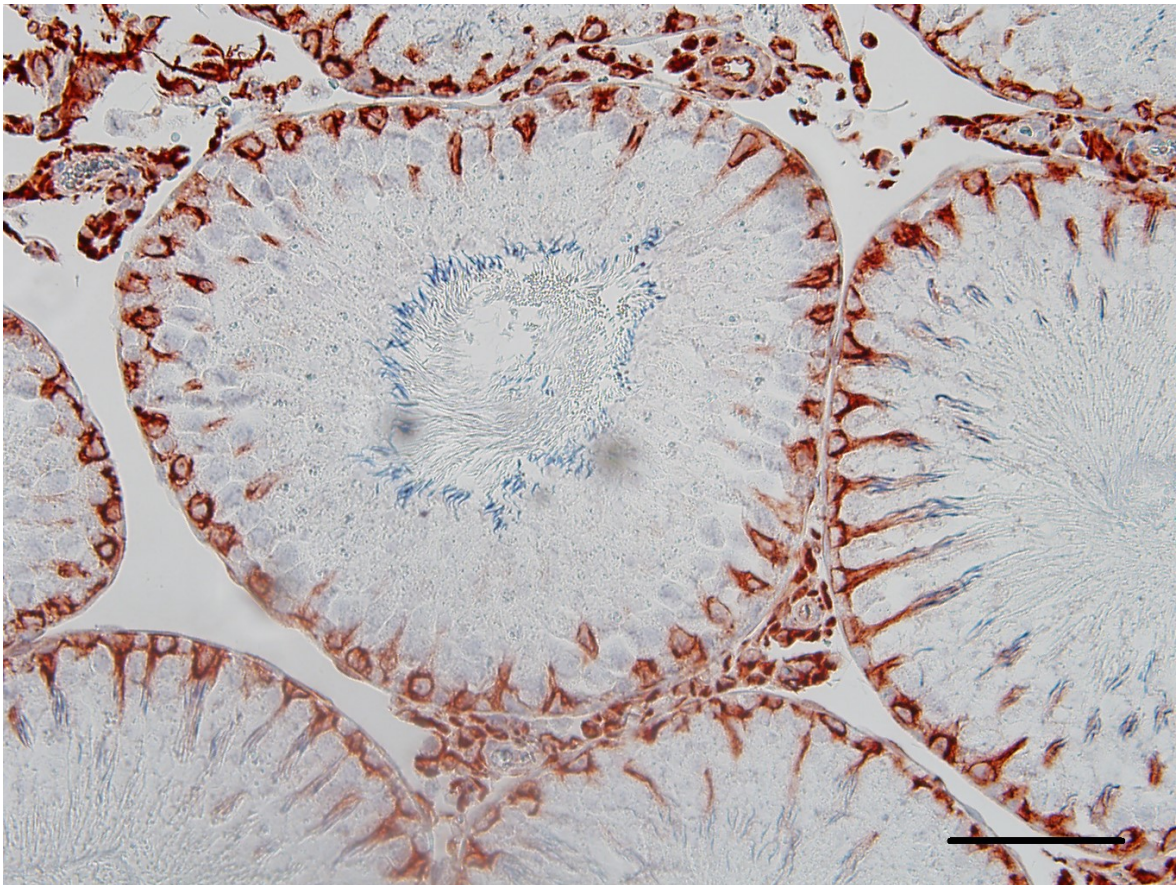


Abbildung 16

*Vimentin-Färbung (Verdünnung: 1:3000), PFA fixiertes Präparat (Vergrößerung 20-fach).  
Scale bar: 80  $\mu$ m*

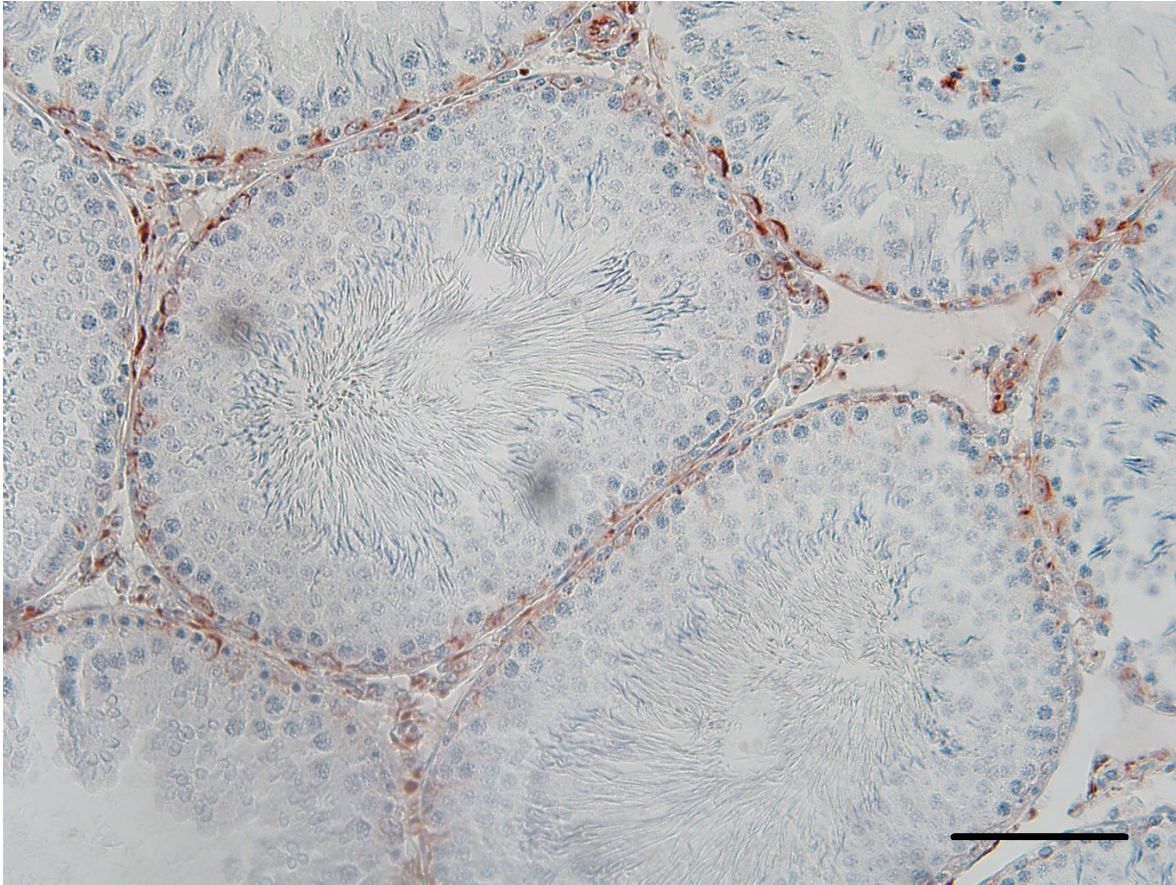


Abbildung 17

*Vimentin-Färbung (Verdünnung 1:3000), BL fixiertes Präparat (Vergrößerung 20-fach).  
Scale bar: 80  $\mu$ m*

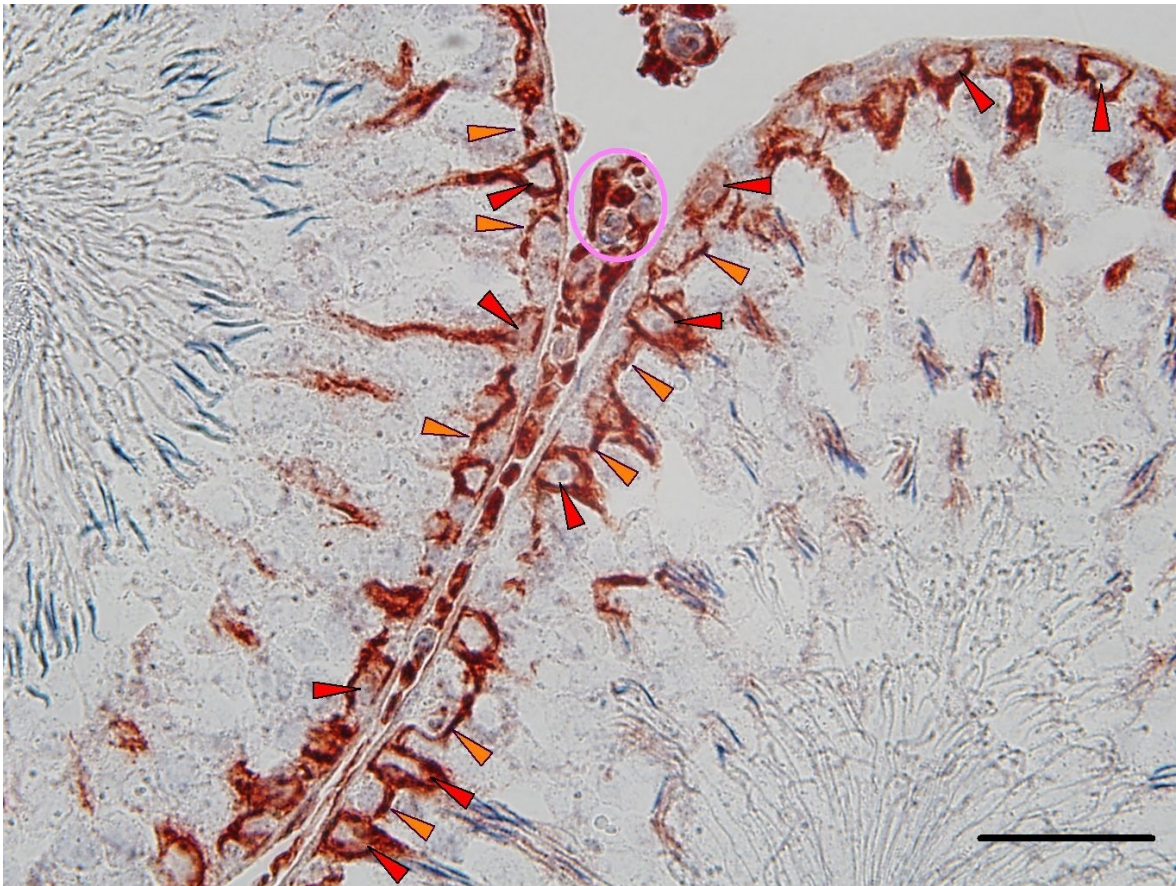


Abbildung 18

*Vimentin-Färbung (Verdünnung: 1:3000) PFA fixiertes Präparat (Vergrößerung 40-fach). orange Pfeilköpfe: Fortsätze der Sertoli-Zellen in denen die BHS vermutet wird und die Vimentin-positiv erscheinen, rote Pfeilköpfe: Zellkerne der Sertoli-Zellen, rosa Kreis: Vimentin-positives Interstitium mit Leydig-Zellen. Scale bar: 40  $\mu$ m*

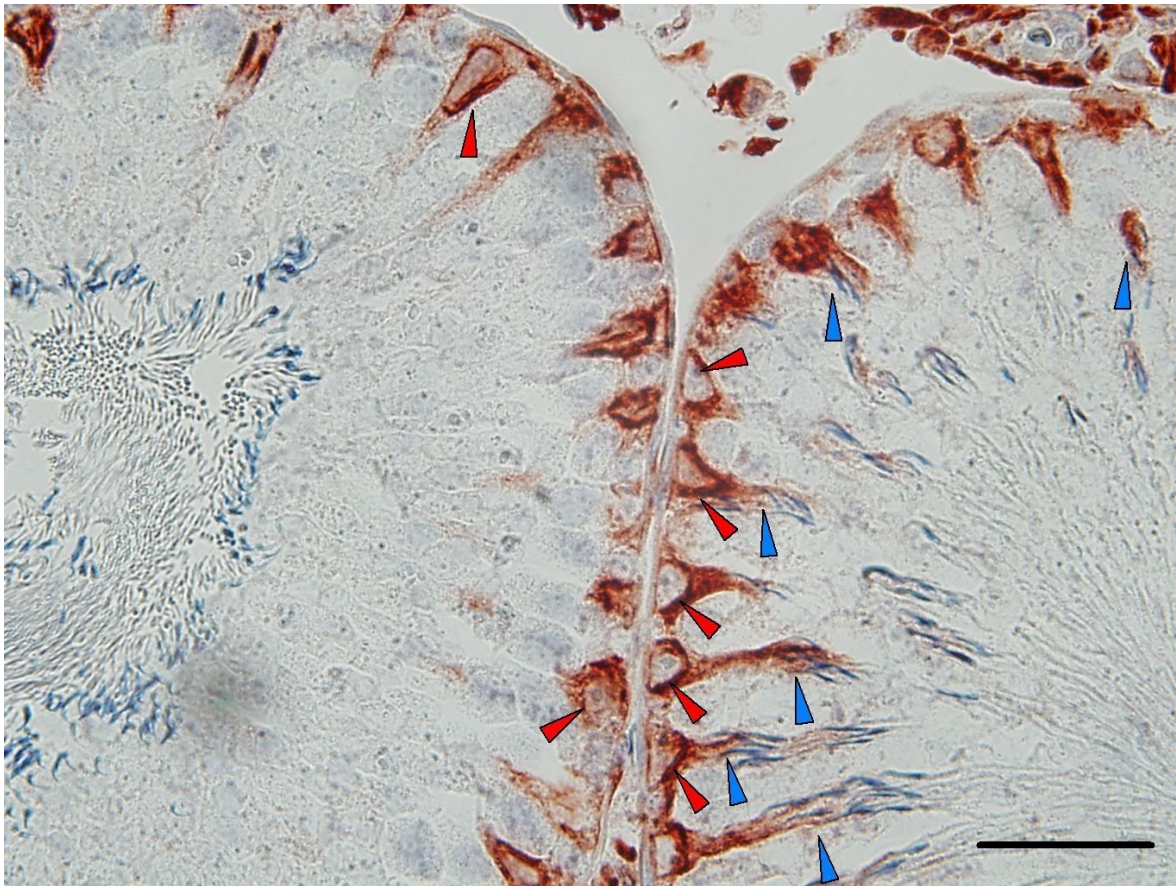


Abbildung 19

*Vimentin-Färbung (Verdünnung: 1:3000) PFA fixiertes Präparat (Vergrößerung 40-fach). rote Pfeilköpfe: Zellkerne der Sertoli-Zellen, blaue Pfeilköpfe: entrundete Spermatiden an denen sich die Vimentin-Färbung beobachten lässt. Scale bar: 40  $\mu$ m*

### 3.4 Occludin

Mit dem verwendeten Occludin-Antikörper lassen sich ebenfalls gute Ergebnisse erzielen (Abb. 20). Allerdings zeigt sich nur in den PFA fixierten Präparaten eine Antigen-Färbung. Der Antikörper wurde bei einer Verdünnung von 1:300, 1:400 und 1:500 getestet. Bei jeder der ausgetesteten Verdünnungen zeigt sich in den PFA fixierten Präparaten eine spezifische Färbung im Bereich der BHS, jedoch werden mit den Verdünnungen von 1:300 und 1:400 die besten Ergebnisse erzielt. In den Präparaten die zuvor in BL fixiert wurden, kann keine Antigen-Färbung beobachtet werden.



Abbildung 20

*Occludin-Färbung (Verdünnung: 1:400), PFA fixiertes Präparat (Vergrößerung 40-fach). orange Pfeilköpfe: Fortsätze der Sertoli-Zellendie am Aufbau der BHS beteiligt sind. rote Peilköpfe: Zellkerne der Sertoli-Zellen. Scale bar: 40  $\mu$ m*

### 3.5 Claudin-11

Bei den verwendeten CL-11-Antikörpern zeigt nur einer eine spezifische Proteinfärbung. Mit dem Antikörper der Firma Acris mit der Seriennummer AP15483PU-M kann ein vorzeigbares Ergebnis erzielt werden (Abb. 21). Wie auch bei dem verwendeten Occludin-Antikörper zeigt auch dieser CL-11-Antikörper nur bei den in PFA fixierten Präparaten eine spezifische Färbung im Bereich der BHS. Allerdings ist die Protein-Färbung nicht so stark ausgeprägt wie bei dem verwendeten Occludin-Antikörper. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:200, 1:300 und 1:400 verwendet. Bei allen drei Verdünnungen kann die Protein-Färbung beobachtet werden. Allerdings können mit diesem Antikörper nur dann positive Ergebnisse erzielt werden, wenn für das „Antigen-Retrieval“ eine Epitope Retrieval Solution pH9 verwendet wird. Wenn die Epitope Retrieval Solution pH6

verwendet wird, zeigt sich starke Hintergrundfärbung im gesamten Keimepithel sowie im Interstitium.

Bei dem anderen Antikörper der Firma Acris (AP55120SU-N) sowie bei dem CL-11-Antikörper der Firma Proteintech (12152-1-AP) zeigt sich eine starke Hintergrundfärbung und eine spezifische Anreicherung der Antikörper im Bereich der BHS kann nicht beobachtet werden.

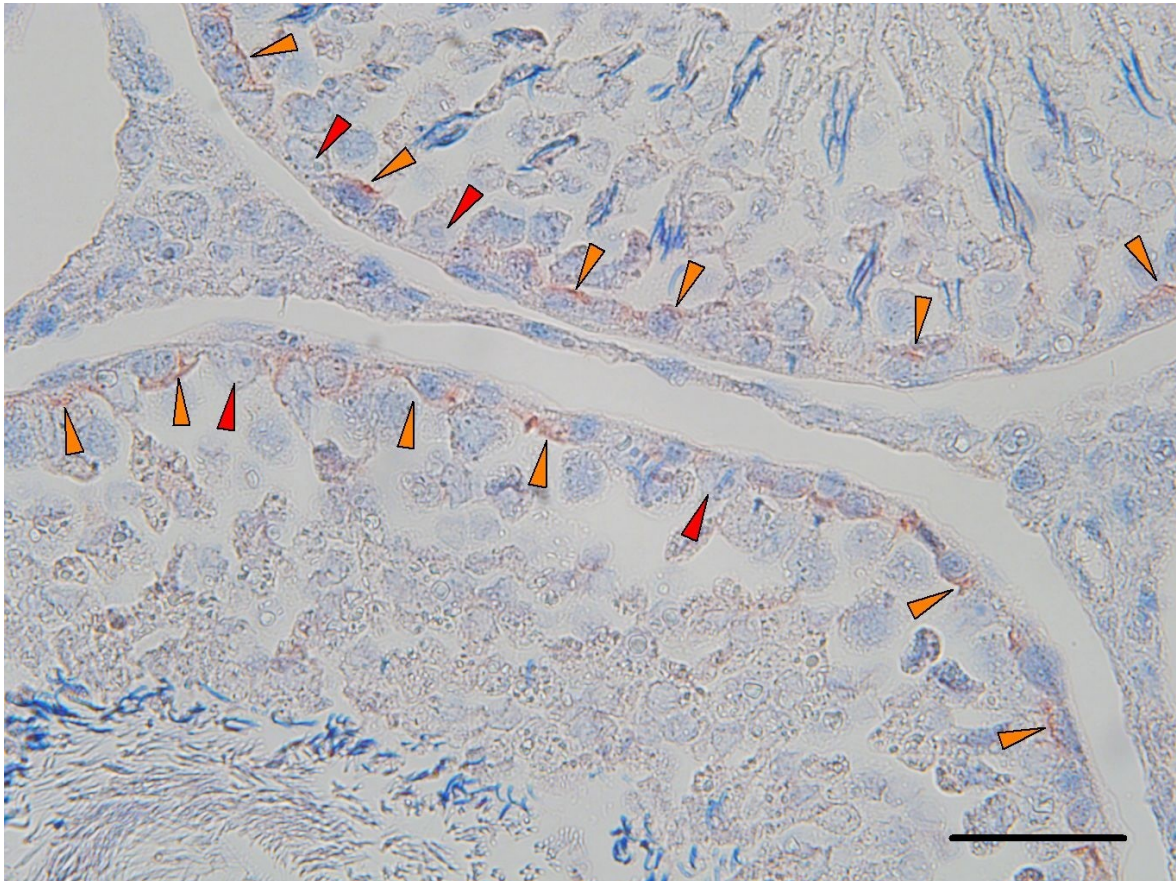


Abbildung 21

*CL-11-Färbung (Acris, AP15483PU-M, Verdünnung 1:200), PFA fixiertes Präparat (Vergrößerung 40-fach).  
orange Pfeilköpfe: Fortsätze der Sertoli-Zellen zwischen denen die BHS gebildet wird.  
rote Pfeilköpfe: Zellkerne der Sertoli-Zellen. Scale bar: 40  $\mu$ m*

### 3.6 Cytokeratin-7

Durch den verwendeten CK-7-Antikörper zeigt sich eine leichte Färbung des Interstitiums. Diese Färbung zeigt sich sowohl in den PFA fixierten Präparaten, als auch in den mit BL fixierten Präparaten. Die beobachtete Proteinfärbung ist nur schwach ausgeprägt und es

lässt sich geringe Hintergrundfärbung erkennen. Das Zytoplasma der Leydig-Zellen zeigt im Verhältnis zu dem restlichen Interstitium eine etwas intensivere Färbung (Abb. 22).

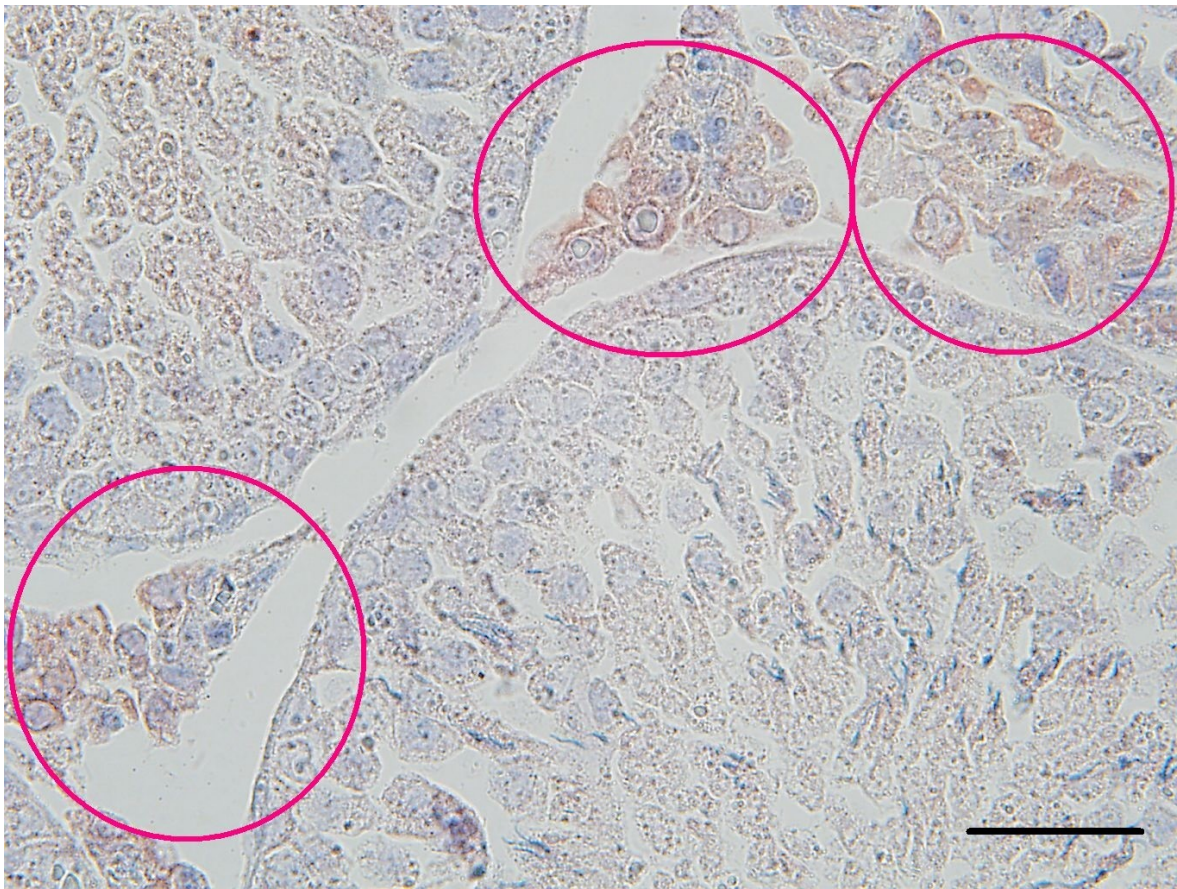


Abbildung 22

*CK-7-Färbung (Verdünnung 1:200), PFA fixiertes Präparat (Vergrößerung 40-fach).  
rosa Kreise: Interstitium des Hodens mit Leydig-Zellen.  
Im Bereich des Hodenepithels lässt sich geringe Hintergrundfärbung erkennen.  
Scale bar: 40  $\mu$ m*

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion zur Methodik der Fixierung, Färbung und Immunhistochemie

#### 4.1.1 Fixierung: Diskussion, mögliche Alternativen und Verbesserungsvorschläge

Wie schon in den Ergebnissen erwähnt, zeigen die in BL fixierten Präparate eine besser erhaltene morphologische Struktur als die Präparate, die in PFA fixiert wurden. Allerdings zeigt sich bei den in BL fixierten Präparaten in den immunhistochemischen Untersuchungen meist eine schlechtere Antigen-Färbung als in den Präparaten, die in PFA fixiert wurden. Oft lassen sich die gesuchten Antigene mit den verwendeten Antikörpern in den mit BL fixierten Präparaten nicht anfärben, obwohl die Färbung in den PFA fixierten Gewebestücken zu sehen ist. Dies ist bei den verwendeten CL-11- und Occludin-Antikörpern der Fall (Abb.16 und 17).

In einer Studie von Howroyd et al. (2005) in der „modified Davidson`s fluid“ (mDF), BL und 10% neutral gepuffertes Formalin als Fixiermedien verwendet wurde, wird gezeigt, dass Hodengewebe, welches mit mDF fixiert wurde, eine besser erhaltene morphologische Struktur aufweist, als Hodengewebe, welches mit Formalin oder BL fixiert wurde. In einer anderen Studie wird ebenfalls berichtet, dass bei der Fixierung mit mDF die histologischen Strukturen des Hodengewebes geringfügig besser erhalten bleiben, als bei der Fixierung des Gewebes mit BL (Lantendresse et al., 2002). In der Studie von Howroyd (2005) wurde allerdings auch gezeigt, dass es bei einer immunhistochemischen Färbung mit einem Vimentin-Antikörper bei den in BL und den mit PFA fixierten Präparaten zu einer stärkeren Antigen-Färbung kommt als in den mit mDF fixierten Präparaten. Da die Verwendung eines Vimentin-Antikörpers ein wichtiger Teil dieser Arbeit ist, war es daher sinnvoll die BL zu verwenden, obwohl die erwähnten Studien eine gering besser erhaltene Morphologie bei dem Verwenden der mDF beschreiben.

Zu der Vergrößerung des interzellulären Raums im Keimepithel bei der PFA-fixierung kommt es vor allem durch Konzentration des Zytoplasmas der Sertoli-Zellen und durch Keimzell-Schrumpfung (Chapin et al., 1984). Dies kommt vor allem durch die langsame Penetration des Fixierungsmittels in das Gewebe zustande. Das Eindringen des PFA wird durch die Tunica albuginea noch erschwert, diese muss allerdings am Beginn des Fixierungsprozesses erhalten bleiben, um die Integrität der Tubuli seminiferi concorti

aufrechtzuerhalten. Um die Penetration des Fixiermittels zu verbessern, könnte eventuell die Tunica albuginea an den Polen des Hodens mit einer Nadel punktiert werden.

Zum Erhalt der morphologischen Strukturen des Keimepithels bei der PFA-fixierung ist die Technik der intrakardialen Perfusion am besten geeignet (Mazaud-Guittot et al., 2011). Diese Methode ist allerdings mit großem Aufwand verbunden, da dabei eine Infusion des Fixiermittels in das Herz des noch lebenden Tieres injiziert werden muss.

In der Studie von Chapin (1984) wird behauptet, dass sich geringere Artefakte der Zellschrumpfung in Präparaten, die in Formaldehyd fixiert wurden, finden, wenn anschließend eine Einbettung in Glycol Methacrylat erfolgt.

#### 4.1.2 Histologische Färbung: Vorteile der HE-Färbung und mögliche Alternativen

Für die histologische Übersichtsfärbung wurde die Hämatoxylin-Eosin-Färbung gewählt, da dies eine Routinemethode in den meisten histologischen Labors darstellt und gut zur generellen Beurteilung der Morphologie geeignet ist. Als Alternativen bei der Färbung von Hodengewebe können nach der Studie von Mazaud-Guittot (2001) die Periodic-Acid-Schiff (PAS)-Färbung und die Tuchmann-Duplessin-Trichrome-Färbung verwendet werden. Bei der PAS-Färbung lassen sich die Umrisse und die Orientierung des Akrosoms darstellen während sich bei der Tuchmann-Duplessin-Trichrome-Färbung Matrix-Glykoproteine der Basalmembran, Akrosome und Nukleoli gut färben lassen (Mazaud-Guittot et al., 2011).

Die PAS-Färbung ist sehr gut geeignet, um die Stadien der Spermatogenese in den Tubuli seminiferi zu unterscheiden (Lanning et al., 2002). Falls die Bestimmung der Stadien der Spermatogenese das Ziel einer Studie sein sollte, was bei diesen Untersuchungen allerdings nicht im Vordergrund stand, sollte eventuell die PAS-Färbung verwendet werden. Zur generellen Übersicht der Strukturen des Hodenepithels ist die HE-Färbung zu empfehlen, da damit gute Resultate erzielt werden können (Abb. 11).

#### 4.1.3 Antikörper und Immunhistochemie

Die Antikörper für die immunhistochemische Untersuchung wurden so gewählt, dass sich damit sowohl die BHS gezielt darstellen lässt, als auch das Zytoskelett der Sertoli-Zellen veranschaulicht werden kann. Darüber hinaus wurde zusätzlich ein Antikörper gegen CK-7 gewählt, der gezielt auf die Strukturen des Hodeninterstitiums, insbesondere die Leydig-Zellen gerichtet ist. In der Studie von Ortega (2004), wurde ein Cytokeratin-Antikörper-Gemisch aus CK-1,-5,-6,-8,-10,-14 und -18 verwendet um die IF der Leydig-Zellen

anzufärben. In der Vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Leydig-Zellen vermutlich auch CK-7 exprimieren (Abb.19).

Einige der Antikörper wurden zuvor noch nicht an Ratten getestet. Die Notwendigkeit ein sogenanntes „Antigen Retrieval“ durchzuführen war oft nicht auf den „Datasheets“ der Antikörper angegeben und musste erst ausgetestet werden.

Dem Datenblatt des Vimentin-Antikörpers kann man eine Empfehlung zur Konzentration und zur zu verwendenden Antigen Retrieval-Lösung (pH 9) entnehmen. Außerdem wurde der Antikörper bereits an Ratten ausgetestet. Unter Berücksichtigung dieser Angaben konnten hervorragende Ergebnisse erzielt werden (Abb. 13, 14, 15 und 16).

Dem Datenblatt des verwendeten Occludin-Antikörpers kann entnommen werden, dass der Antikörper bereits bei Ratten getestet wurde und eine Empfehlung zur zu verwendenden Konzentration ist ebenfalls vorhanden. Allerdings ist keine Angabe bezüglich des „Antigen Retrieval“ zu finden. Bei meinen Versuchen wurden die besten Ergebnisse erzielt, wenn bei der Immunhistochemie das „Antigen Retrieval“ mit der Epitope Retrieval Solution pH9 durchgeführt wurde.

Bei dem CL-11-Antikörper von Acris mit der Seriennummer AP-15483PU-M sind Empfehlungen für die zu verwendende Antikörperkonzentration und für das „Antigen Retrieval“ auf dem Datasheet vorhanden. Allerdings wurde der Antikörper zuvor nur bei Mäusen getestet. Es zeigten sich bei den Versuchen im Rahmen dieser Arbeit, dass bei Rattengewebe nur dann positive Ergebnisse erzielt werden, wenn für das „Antigen Retrieval“ eine Antigen Retrieval-Lösung pH 9 verwendet wird und nicht, wie auf dem Datenblatt empfohlen, eine Antigen Retrieval-Lösung pH 6.

Der verwendete CK-7-Antikörper wurde zuvor noch nicht an Ratten getestet und es gibt keine Angaben über das „Antigen Retrieval“. Diese Arbeit zeigt, dass der Antikörper auch an Rattengewebe verwendet werden kann. Eine Antigen Retrieval-Lösung pH 9 ist für die Immunhistochemie zu empfehlen.

## **4.2 Diskussion zur spezifischen Darstellung der BHS und zur Beurteilung der Zellstrukturen**

### 4.2.1 Auswirkungen der Fixierung

Hier zeigt sich, wie schon bei den Ergebnissen erwähnt und in der Diskussion zu den Methoden erklärt, die deutlich schlechtere Morphologie des in PFA fixierten Gewebes.

Sollte also bei folgenden histologischen Untersuchungen die Beurteilung der Morphologie

des Hodens im Vordergrund stehen, wäre also die BL zu bevorzugen. Auch mit der in dieser Studie nicht verwendeten „modified Davidson`s fluid“ lassen sich, wie die bestehende Fachliteratur zeigt, gute Ergebnisse erzielen, wenn es darum geht die Strukturen des Hodenepithels darzustellen (Lantendresse et al, 2002; Howroyd et al, 2005). Zur Erkennung von Antigenen durch ein immunhistochemisches Verfahren ist jedoch eindeutig eine Fixierung mit PFA zu bevorzugen.

#### 4.2.2 Darstellung zellulärer Strukturen durch Antikörper

Blut-Hoden-Schranke:

Es konnte sowohl mit einem Occludin-Antikörper als auch mit einem CL-11-Antikörper (beide sind Transmembranproteine der TJ, welche maßgeblich am Aufbau der BHS beteiligt sind) eine spezifische Färbung erzielt werden. Damit können zwei Erkenntnisse gewonnen werden: Zum einen zeigt sich die Färbung im basalen Bereich des Epithels der Tubuli seminiferi concorti (Abb. 17,18). Die Färbung beider Moleküle zeigt sich an derselben Stelle im Keimepithel. Damit lässt sich die Lokalisation der BHS, die bereits in einigen Studien nachgewiesen und beschrieben wurde, auch in dieser Studie bestätigen (Dym & Fawcett 1970; Cheng & Mruk, 2008; Cheng & Mruk, 2012).

Zum anderen kann gezeigt werden, dass nur bestimmte Antikörper zufriedenstellende Ergebnisse erzielen und damit eventuell für Folgestudien genutzt werden können.

Zytoskelett der Sertoli-Zellen:

Mit dem verwendeten Vimentin-Antikörper lässt sich die Verteilung des Zytoskelettproteins in der Sertoli-Zelle nachweisen, wie dies in der Studie von Zhu et al. (1997) schon beschrieben wurde. Dabei wird vor allem die starke Konzentration des Moleküls um den basal gelegenen Zellkern beschrieben, wie auch die Verbindung der Intermediärfilamente zu den Köpfen der entrundeten Spermatozoen und die von den Stadien des Keimepithels abhängige Verteilung des Proteins (Zhu et al., 1997). In der Studie von Zhu et al. (1997) zeigt sich, dass die Assoziation von Vimentin zu den Köpfen der entrundeten Spermatozoen abhängig ist vom Stadium des Keimepithels und sich vor allen in den Stadien I bis VI beobachten lässt. In dieser Studie wird die Verteilung von Vimentin im Bereich der BHS genauer betrachtet. Wie in Abbildung 15 erkennbar, zeigt sich eine deutliche Antikörperanreicherung im Bereich der BHS. In der Studie von Zhu (1997) wird eine Beziehung von Intermediärfilamenten zu den Aktinbündeln der apikalen ectoplasmic Specialisations, also zwischen Sertoli-Zellen und den entrundeten Spermatozoen, beschrieben. Dort wird auch die Hypothese aufgestellt, dass die basalen ES

möglicherweise auch mit den IFs in enger Beziehung stehen. Nach den Ergebnissen dieser Studie, die deutlich eine starke Konzentration von Vimentin im Bereich der BHS zeigen, kann diese Hypothese untermauert werden. Um diese Hypothese genauer zu überprüfen, könnten elektronenmikroskopische Untersuchungen der Strukturen erfolgen.

Es ist möglich, dass die Verteilung des Vimentins im Bereich der BHS von den Stadien des Keimepithels abhängig ist. Dies wirft die Frage auf, in wieweit die Intermediärfilamente an dem Auf- und Abbau der BHS beteiligt sind. Da die Versuchstiere in dieser Studie dasselbe Alter aufweisen, wird bei dieser Arbeit nicht geklärt, ob die Verteilung von Vimentin in der BHS altersabhängig ist. Dass die Verteilung des Vimentins vom Alter des Versuchstieres abhängig ist, wurde schon von Zhu et al. (1997) beschrieben, jedoch wurde auf die Expression dieser Moleküle nicht im Detail eingegangen.

Um die Strukturen des Hodenepithels zu veranschaulichen und die Verteilung der untersuchten Antigene darzustellen, wurden die Abbildungen 23 und 24 angefertigt.

Zytoskelett der Leydig-Zellen:

Die Leydig-Zellen des Hodeninterstitiums zeigen wie in Abbildungen 18 zu erkennen eine starke Färbung mit dem Vimentin-Antikörper. Wie in Abbildung 22 zu sehen, zeigen die Leydig-Zellen auch eine leichte Färbung mit dem verwendeten CK-7 Antikörper. Da aber bekannt ist, dass Leydig-Zellen Vimentin als Intermediär-Filament-Protein exprimieren, ist es fraglich ob tatsächlich auch CK-7 in den Leydig-Zellen gefunden werden kann. Auch diese Frage könnte eventuell durch Folgestudien geklärt werden.

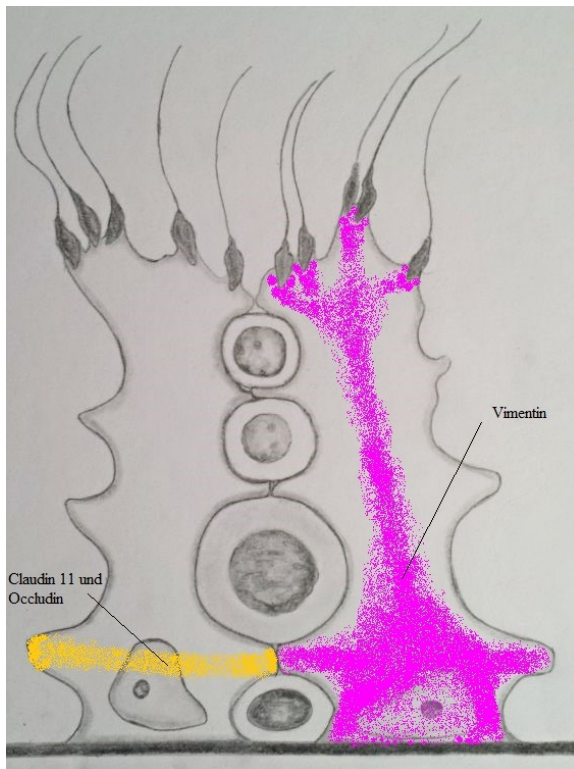


Abbildung 23

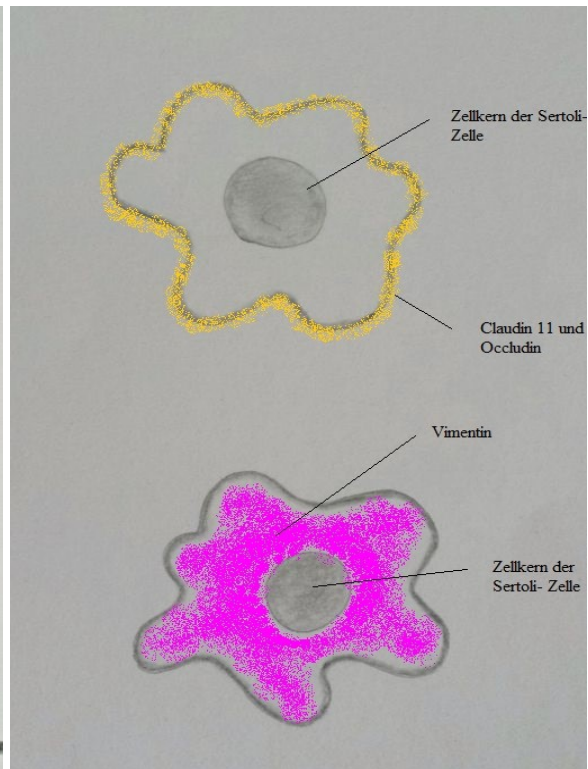


Abbildung 24

Abb. 23: Verteilung der Moleküle Occludin, CL-11 und Vimentin. Occludin und CL-11 sind beide im Bereich der BHS zu finden. Bei Vimentin kann man erkennen, dass das Protein großteils um den basal gelegenen Zellkern zu finden ist, aber es wird auch die Beziehung der Intermediärfilamente zu den Köpfen der entrundeten Spermatozoen gezeigt. Es wird auch die Verteilung des Proteins in dem Bereich der BHS dargestellt. Es ist darauf zu achten, dass die Moleküle Occludin und CL-11 an der Zellmembran der Sertoli-Zellen zu finden sind, während Vimentin nur intrazellulär vorkommt. Es ist jedoch darauf zu achten, dass Vimentin nicht in allen Stadien des Keimepithels eine Verbindung zu den entrundeten Spermatozoen aufweist (Zhu et al., 1997).

Abb. 24: Horizontaler Schnitt durch die Sertoli-Zelle auf Höhe der BHS schematisch dargestellt. Die Graphik zeigt die Verteilung der sich in der Zellmembran befindenden Moleküle Occludin und CL-11 (oben), als auch die Verteilung des intrazellulär liegenden Zytoskelettmoleküls Vimentin (unten).

## 5. Referenzen

Amlani S, Vogl AW. Changes in the distribution of microtubules and intermediate filaments in mammalian Sertoli cells during spermatogenesis. *Anat Rec.* 1988; 220:143-160.

Ando-Akatsuka Y, Saitou M, Hirase T, Kishi M, Sakakibara A, Itoh M, Yonemura S, Furuse M, Tsukita S. Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and ratkangaroo homologues. *J Cell Biol.* 1996; 133:43-47.

Arrate MP, Rodriguez JM, Tran TM, Brock TA, Cunningham SA. Cloning of human junctional adhesion molecule 3 (JAM3) and its identification as the JAM2 counter-receptor. *J Biol Chem.* 2001; 276:45826-45832.

Aurrand-Lions M, Duncan L, Ballestem C, Imhof BA. JAM-2, a novel immunoglobulin superfamily molecule, expressed by endothelial and lymphatic cells. *J Biol Chem.* 2001; 276:2733-2741.

Balda MS, Matter K. Tight junctions. *J Cell Sci.* 1998; 111:541-547.

Chapin RE, Ross MD, Lamb JC. IV: Immersion fixation methods for glycol methacrylate-embedded testes. *Toxicol Pathol.* 1984; 12:221-227

Cheng CY, Mruk DD. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germcell interactions and male contraceptive development. *Physiol Rev.* 2002; 82:825-874.

Cheng CY, Mruk DD. A local autocrine axis in the testes that regulates spermatogenesis. *Nat Rev Endocrinol.* 2010a; 6:380-395.

Cheng CY, Mruk DD. The biology of spermatogenesis: the past, present and future. *Phil Trans R Soc B.* 2010b; 15:1459-1463.

Cheng CY., Mruk DD. The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacological Reviews.* 2012; 64(1):16-64.

Chung NP, Cheng CY. Is cadmium chloride-induced inter-Sertoli tight junction permeability barrier disruption a suitable in vitro model to study the events of junction disassembly during spermatogenesis in the rat testis? *Endocrinology.* 2001; 142:1878-1888.

Citi S, Cordesani M. Tight junction proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1448:1-11.

Davidoff S, Middendorff R, Enikolopov G, Riethmacher D, Holstein A, Muller D. Progenitor cells of the testosterone-producing Leydig cells revealed. *J Cell Biol.* 2004; 167:935-944.

De Rooij DG. Stem cells in the testis. *Int J Exp Pathol.* 1998; 79(2):67-80.

Dym M. Spermatogonial stem cells of the testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1994; 91:11287-11289.

- Dym M, Fawcett DW. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod.* 1970; 3:308–326.
- Dym M, Cavicchia J. Junctional morphology of the testis. *Biol Reprod.* 1978; 18:1–15.
- Ehmcke J, Wistuba J, Schlatt S. Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives. *Human Reproduction Update.* 2006; 12(3):275–282.
- Fanning AS, Mitic LL, Anderson JA. Transmembrane proteins in the tight junction barrier. *J Am Soc Nephrol.* 1999; 10:1337–1345.
- Furuse M, Fujita K, Hiragata T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence homology to occludin. *J Cell Biol* 1998; 141:1539–1550.
- Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol.* 1993; 123:1777–1788.
- Furuse, M. Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010; 2:a002907.
- Gow A, Southwood CM, Li JS, Pariali M, Riordan GP, Brodie SE, Danias J, Bronstein JM, Kachar B, Lazzarini RA. CNS myelin and Sertoli cell tight junction strands are absent in *Osp/Claudin-11* null mice. *Cell.* 1999; 99:649–659.
- Grove BD, Vogl AW. Sertoli cell ectoplasmic specializations: a type of actin-associated adhesion junction? *J Cell Sci.* 1989; 93:309–323.
- Guttman JA, Mulholland DJ, Vogl W. Plectin is Concentrated at Intercellular Junctions and at the Nuclear Surface in Morphologically Differentiated Rat Sertoli Cells. *The Anatomical Record.* 1999; 254:418–428
- Hedger MP. Immunophysiology and pathology of inflammation in the testis and epididymis. *J Androl.* 2011; 32(6):625–640. doi:
- Hellani A, Ji JW, Manguit C, Deschildre C, Tabone E, and Benahmeh M. Developmental and hormonal regulation of the expression of oligodendrocyte-specific protein/claudin 11 in mouse testis. *Endocrinology.* 2000; 141:3012–3019.
- Hermo L, Pelletier RM, Cry DG, Smith CE. Surfing the Wave, Cycle, Life History, and Genes/Proteins Expressed by Testicular Germ Cells. Part 1: Background to Spermatogenesis, Spermatogonia, and Spermatocytes. *Microsc Res Tech.* 2010; 73(4):241–78.
- Hess RA, Franca LR. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Adv Exp Med Biol.* 2008; 636:1–15.
- Howroyd P, Hoyle-Thacker R, Lyght O, Williams DEK. Morphology of the fetal rat testis preserved in different fixatives. *Toxicol Pathology.* 2005; 33:300–304.

- Lanning LL, Creasy DM, Chapin RE, Mann PC, Barlow NJ, Regan KS, et al. Recommended approaches for the evaluation of testicular and epididymal toxicity. *Toxicol Pathol.* 2002; 30:507–520.
- Latendresse JR., Warbritton AR., Jonassen H, and Creasy, DM. Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. *Toxicol Pathol.* 2002; 30:524–33
- Lee NP, Cheng CY. Adaptors, junction dynamics, and spermatogenesis. *Biol Reprod.* 2004; 71:392–404.
- Li MW, Mruk DD, Lee WM, and Cheng CY. Disruption of the blood-testis barrier integrity by bisphenol A in vitro: is this a suitable model for studying blood-testis barrier dynamics? *Int J Biochem Cell Biol.* 2009; 41:2302–2314.
- Lie PP, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. Cytoskeletal dynamics and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2010; 365:1581–1592.
- Liu Y, Nusrat A, Schnell FJ, Reaves TA, Walsh S, Pochet M, Parkos CA. Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J Cell Sci.* 2000; 113:2363–2374.
- Lui WY, Mruk D, Lee WM, Cheng CY. Sertoli cell tight junction dynamics: their regulation during spermatogenesis. *Biol Reprod.* 2003; 68:1087–97.
- Ma Y, Yang HZ, Xu LM, Huang YR, Dai HL, Kang XN. Testosterone regulates the autophagic clearance of androgen binding protein in rat Sertoli cells. *Sci Rep.* 2015; 5:8894.
- Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol.* 1998; 142:117–127.
- Mazaud-Guittot S, Gow A, Le Magueresse-Battistoni B. Phenotyping the claudin 11 deficiency in testis: from histology to immunohistochemistry. *Methods Mol Biol.* 2011; 763:223–236
- Meng J, Greenlee AR, Taub CJ, Braun RE. Sertoli cell-specific deletion of the androgen receptor compromises testicular immune privilege in mice. *Biol Reprod.* 2011; 85:254–260.
- Mital P, Hinton BT, Dufour JM. The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *Biol. Reprod.* 2011; 84:851–858.
- Mitic LL, Van Itallie CM, Anderson JM. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000; 279:250–254.

Moroi S, Saitou M, Fujimoto K, Sakakibara A, Furuse M, Yoshida O, Tsukita S. Occludin is concentrated at tight junctions of mouse/ rat but not human/guinea pig Sertoli cells in testes. *Am J Physiol.* 1998; 274:1708–1717.

Mruk DD & Cheng CY Tight junctions in the testis: new perspectives. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2010; 365:1621–1635.

O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev.* 2001; 22:289–318.

Ortega HH, Lorente JA, Salvetti NR. Immunohistochemical study of intermediate filaments and neuroendocrine marker expression in Leydig cells of laboratory rodents. *Anat Histol Embryol.* 2004; 33:309–315.

Pérez CV, Sobarzo CM, Jacobo PV, Pellizzari EH, Cigorraga SB, Denduchis B, Lustig L. Loss of occludin expression and impairment of blood-testis barrier permeability in rats with autoimmune orchitis: effect of interleukin 6 on Sertoli cell tight junctions. *Biol Reprod.* 2012; 87: 1–12.

Russell LD. Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. *Am J Anat.* 1977a; 148(3):313-328.

Russell LD. Observations on rat Sertoli ectoplasmic (“junctional”) specializations in their association with germ cells of the rat testis. *Tissue Cell.* 1977b; 9:475–498.

Russell LD, Goh JC, Rashed RMA, Vogl AW. The consequences of actin disruption at Sertoli ectoplasmic specialization sites facing spermatids after *in vivo* exposure of rat testis to cytochalasin D. *Biol Reprod.* 1988; 39:105–18.

Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, and Tsukita S. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell.* 2000; 11:4131-42.

Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction.* 2003; 125:769–784.

Siu MK and Cheng CY. Extracellular matrix and its role in spermatogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 2008; 636:74–91.

Siu ER, Wong EW, Mruk DD, Porto CS and Cheng CY. Focaladhesionkinase is a blood-testis barrier regulator. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106:9298–9303.

Smith BE, Braun RE. Germ cell migration across Sertoli cell tight junctions. *Science.* 2012; 338:798–802.

Staehein, LA. Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions. *J Cell Sci.* 1973; 13:763–786.

Taurog JD, Rival C, van Duivenvoorde LM, Satumtira N, Dorris ML, Sun M, John M. Shelton, Richardson JA, Hamra FK, Hammer ER, Tung KSK. Autoimmune epididymoorchitis is essential to the pathogenesis of male-specific spondylarthritis in HLA-B27-transgenic rats. *Arthritis Rheum.* 2012; 64:2518–28.

Toyama Y, Maekawa M, and Yuasa S. Ectoplasmic specializations in the Sertolicells:new vistas based ongenetic defects and testicular toxicology. *AnatSci Int.* 2003; 78:1–16.

Toyama Y, Ohkawa M, Oku R, Maekawa M, and Yuasa S. Neonatally administered diethylstilbestrol retards the development of the blood-testis barrier in the rat. *J Androl.* 2001; 22:413–423.

Vogl AW, Pfeifer DC, Mulholland D, Kimel G, and Guttman J. Unique and multifunctional adhesion junctions in the testis: ectoplasmic specializations. *Arch Histol Cytol.* 2000; 63:1–15.

Vogl AW, Vaid KS, Guttman JA. The Sertoli cell cytoskeleton. *Adv Exp Med Biol.* 2008; 636:186–211.

Walker WH. Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2010; 365:1557–1569.

Wang RS, Yeh S, Chen LM, Lin HY, Zhang C, Ni J, Wu CC, di Sant’Agnese PA, deMesy-Bentley KL, Tzeng CR, et al. Androgen receptor in Sertoli cell is essential for germ cell nursery and junction complex formation in mouse testes. *Endocrinology.* 2006; 147:5624–5633.

Wong V, Gumbiner BM. A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier. *J Cell Biol* 1997; 136:399–409.

Xiao X, Mruk DD, Cheng CY. Intercellular adhesion molecules (ICAMs) and spermatogenesis. *Hum Reprod Update.* 2013; 19(2):167–186

Zhu LJ, Zong SD, Phillips DM, Moo-Young AJ, Bardin CW. Changes in the distribution of intermediate filaments in rat Sertoli cells during the seminiferous epithelium cycle and postnatal development. *Anat Rec.* 1997; 248(3):391–405.

Ziegler A, Uchanska-Ziegler B, Blaschitz A, Hutter H, Dohr G. Expression of free HLA class I heavy chains in an immune-privileged site: comment on the article by Taurog et al. 2013; 65(2):540-1.