

INHALTSVERZEICHNIS

VERÖFFENTLICHUNGEN	X
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	XI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XVII
TABELLENVERZEICHNIS	XX
EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	XXI
1 LITERATURÜBERSICHT	1
1.1 Histologischer Aufbau des Hodens und normale Spermatogenese	1
1.1.1 Aufbau des Keimepithels (Epithelium spermatogenicum)	1
1.1.1.1 Die KZ und Ablauf der KZ-Reifung	1
1.1.1.1.1 Zeitliches Auftreten der verschiedenen KZ-Populationen bei der Maus.....	3
1.1.1.1.2 Stadien- und KZ- spezifische Genexpression	3
1.1.1.1.3 Regulation der KZ-Reifung	4
1.1.1.2 Die SZ, ihre Funktionen und die Blut-Hoden-Schranke	5
1.1.1.2.1 Die SZ-Differenzierung	6
1.1.1.2.2 Regulation von Proliferation und Differenzierung der SZ	7
1.1.1.2.3 Differenzierungsmarker der SZ	8
1.1.1.2.4 Morphologische Veränderungen der SZ	9
1.1.2 Das interstitielle Gewebe	10
1.2 Störungen der Spermatogenese	10
1.2.1 Hypospermatogenese	11

1.2.2	Spermatogenescarreste	11
1.2.3	SCO-Syndrom	12
1.3	Zellverbindungen und Blut-Hoden-Schranke	12
1.3.1	GJ	14
1.3.1.1	Aufbau der GJ	14
1.3.1.2	Aufbau der Connexone.....	15
1.3.1.3	Cx - Die Proteine der GJ	16
1.3.1.3.1	Nomenklatur der Cx	16
1.3.1.3.2	Aufbau eines Cx	17
1.3.1.3.3	Aufbau des Cx-Gens.....	18
1.3.1.3.4	Cx43.....	19
1.3.2	Bildung von GJ-Kanälen.....	19
1.3.3	Abbau von GJ-Kanälen	20
1.3.4	Regulation der GJIC.....	20
1.3.4.1	Regulation der Cx-Expression	21
1.3.4.1.1	Transkriptionskontrolle	21
1.3.4.1.2	Epigenetische Mechanismen	22
1.3.4.1.3	Post-Transkriptionelle Regulation.....	22
1.3.4.2	Regulation des Öffnungszustandes von GJ-Kanälen	23
1.3.5	GJ und Cx im Hoden.....	23

1.3.5.1	GJ und Cx im Hoden mit normaler Spermatogenese	23
1.3.5.1.1	Räumliche Expression von GJ und verschiedenen Cx	24
1.3.5.1.2	Zeitliche Expression von GJ und Cx43	25
1.3.6	GJ, Cx und ihre Funktion(en) im Hoden	26
1.3.6.1	GJ und Cx im Hoden und Störungen der Spermatogenese	27
1.3.6.2	Regulation der GJIC und der Cx-Expression in den SZ	27
1.4	KO und Knockin(KI) Modelle	28
1.4.1	Cx-KO und KI-Modelle	29
1.4.1.1	Auswirkungen von CxKO auf die Embryonalentwicklung	29
1.4.2	CxKO-Mäuse und Spermatogenese	30
1.4.3	SZ-spezifischer KO von Cx43(SCCx43KO)	31
2	MATERIAL UND METHODEN	33
2.1	Material/ Gewebe	33
2.1.1	SCCx43KO-Mäuse und WT-Mäuse	33
2.1.1.1	Gewinnung des Schwanzbiopsats	33
2.1.1.2	Hodengewebsentnahme und Bestimmung des Hodengewichtes	33
2.2	Methoden.....	34
2.2.1	Behandlung der Mäuseschwanzbiopsien und DNA-Extraktion.....	34
2.2.2	Genotypisierung der genutzten Mäuse	35
2.2.2.1	PCR zur Detektion der Cre-Rekombinase „Cre PCR“	35
2.2.2.2	PCR zur Detektion der LoxP-Elemente „Flox-PCR“	36

2.2.2.3	Gelelektrophorese der Cre- und Flox-PCR-Produkte	37
2.2.2.3.1	Erstellen eines Agarose-Gels.....	38
2.2.2.3.2	Vorbereitung der PCR-Produkte und des Markers.....	38
2.2.2.3.3	Auftrennung der PCR-Produkte und Dokumentation	39
2.2.3	Gefrorenes Gewebe	39
2.2.4	Paraffin-eingebettetes Gewebe.....	39
2.2.4.1	Fixation in Bouin'scher Lösung.....	40
2.2.4.2	Fixation in Formalin.....	40
2.2.4.3	Einbettung der Proben in Paraffin.....	40
2.2.4.4	APES-Beschichtung der Objektträger (OT).....	41
2.2.4.5	Herstellung histologischer Schnitte.....	42
2.2.4.6	HE-Färbung.....	42
2.2.4.7	Lichtmikroskopie und quantitative Bestimmung der SZ- und KZ-Zahl je Tubulus	43
2.2.4.8	Statistische Auswertung der erhobenen Daten (Zellzahlen)	43
2.2.5	Allgemeine Vorbemerkung zur IHC	44
2.2.6	β -Galaktosidase-IHC.....	45
2.2.7	Extraktion und Isolation von RNA aus Gefriermaterial.....	49
2.2.7.1	Stabilisierung der RNA	49
2.2.7.2	Extraktion der RNA	49
2.2.7.2.1	Extraktion	51
2.2.7.2.2	Messung des RNA-Gehaltes und Kontrolle der RNA-Qualität.....	52

2.2.8	Microarray.....	53
2.2.8.1	Allgemeine Vorbemerkungen zur Microarray-Analyse.....	53
2.2.8.2	Verwendete Proben	53
2.2.8.3	Herstellung von markierter cRNA	53
2.2.8.4	Fragmentierung der cRNA und Hybridisierung auf dem Array	55
2.2.8.5	Waschungen und Färbung mit Fluorophoren.....	55
2.2.8.6	Scan des IF-Signal, Hintergrundkorrektur und Intra-Array Normalisierung...	55
2.2.8.7	Weitere Auswertung und Qualitätskontrolle der Daten	56
2.2.8.7.1	Statistische Auswertung der Daten	57
2.2.8.7.2	Funktionelle Auswertung der Daten	58
2.2.8.7.3	Clusteranalyse.....	58
2.2.8.7.4	Pathway-Analyse der Daten	59
2.2.9	RT-PCR.....	61
2.2.9.1	Überprüfung der RT-PCR und des DNase Verdaus	62
2.2.9.2	Aufreinigung der cDNA	64
2.2.10	qRT-PCR.....	65
2.2.10.1	Auswahl der Primerpaare für die qRT-PCR	65
2.2.10.2	Erstellung der cDNA-Verdünnungsreihe	65
2.2.10.3	Vergleich der Genexpression in der qRT-PCR	67
2.2.10.4	Sequenzierung der PCR-Produkte.....	69
2.2.10.5	Statistische Auswertung der qRT-PCR-Daten	70
2.2.11	Bestimmung der Korrelation zwischen Microarray-Daten und qRT-PCR-Ergebnissen	71

2.2.12	IHC zur Bestätigung der Ergebnisse der Microarray-Analyse und qRT-PCR.....	72
2.2.12.1	Cx43-IHC.....	72
2.2.12.2	Occludin-IHC.....	74
2.2.12.3	Amh-IHC.....	75
2.2.12.4	Stra8-IHC.....	75
2.2.12.5	Dazl-IHC.....	76
2.2.12.6	Lichtmikroskopie und Auswertung der Immunreaktion.....	78
2.2.13	IF.....	78
2.2.13.1	Allgemeine Vorbemerkungen zur IF.....	78
2.2.13.2	IF von Dmrt7.....	78
2.2.13.3	Detektion des IF-Signals und Auswertung der Immunreaktion.....	80
3	ERGEBNISSE.....	81
3.1	Genotypisierungen.....	81
3.1.1	PCR.....	81
3.1.1.1	Crc-PCR.....	81
3.1.1.2	Flox-PCR.....	83
3.2	Bestimmung des relativen Hodengewichtes.....	84
3.3	Evaluation von HE gefärbten Schnitten.....	84
3.3.1	WT-Mäuse.....	85
3.3.2	SCCx43KO-Mäuse.....	86
3.4	Morphometrische Bestimmung der SZ- und KZ-Zahl.....	86
3.5	β-Galaktosidase-IHC.....	87

3.5.1	WT-Mäuse.....	88
3.5.2	SCCx43KO-Mäuse.....	89
3.6	Microarray-Analyse	90
3.6.1	Signifikant regulierte Gene	90
3.6.2	GO-Analyse.....	91
3.6.3	KZ-spezifische Gene	93
3.6.4	Pathway-Analyse.....	94
3.6.4.1	Funktionelle Analyse des gesamten Datensatzes	94
3.6.4.2	„Network“-Bildung	94
3.6.4.3	Korrelation zwischen den signifikant regulierten Genen und Cx43	97
3.6.4.4	Self-made Pathways	98
3.6.4.5	Canonical Pathways	98
3.7	RT-PCR.....	100
3.8	qRT-PCR.....	101
3.8.1	cDNA-Verdünnungsreihe.....	102
3.8.1.1	Ergebnis der qRT-PCR.....	104
3.8.2	Korrelation FC Microarray-Analyse und FC qRT-PCR	105
3.9	IHC-Färbungen ausgewählter Gene.....	105
3.9.1	Cx43-IHC.....	105
3.9.1.1	WT-Mäuse.....	106
3.9.1.2	SCCx43KO-Mäuse.....	107

3.9.2	Occludin-IHC	108
3.9.2.1	WT-Mäuse.....	108
3.9.2.2	SCCx43KO-Mäuse.....	109
3.9.3	Amh-IHC.....	110
3.9.3.1	WT-Mäuse.....	110
3.9.3.2	SCCx43KO-Mäuse.....	111
3.9.4	Stra8-IHC	111
3.9.4.1	WT-Mäuse.....	112
3.9.4.2	SCCx43KO-Mäuse.....	113
3.9.5	Dazl-IHC	113
3.9.5.1	WT-Mäuse.....	114
3.9.5.2	SCCx43KO-Mäuse.....	115
3.10	IF von Dmrt7	116
3.10.1.1	WT-Mäuse.....	116
3.10.1.2	SCCx43KO-Mäuse.....	117
4	DISKUSSION	118
4.1	Einfluss der Cx43-Deletion in SZ auf die Zellzusammensetzung und Hodenmorphologie	118
4.1.1	Einfluss der Cx43-Deletion auf die SZ-Zahl.....	118
4.2	Einfluss der Cx43-Deletion auf die KZ-Zahl.....	119
4.3	Von der Cx43-Deletion betroffene Gene	120
4.4	Funktionskategorien der signifikant regulierten Gene.....	120

4.5	KZ-spezifische Gene der Spermatogenese	121
4.6	Pathway-Analyse der signifikant regulierten Gene	124
4.7	Netzwerk-Analyse der signifikant regulierten Gene.....	125
4.8	Canonical Pathway-Analyse der signifikant regulierten Gene	126
4.9	Cx43 und die Blut-Hoden-Schranke.....	127
4.10	Retinsäure und Cx43.....	127
4.11	Cx43 und Dazl.....	129
4.12	Die Dm-Genfamilie und Cx43	130
4.13	Weitere signifikant regulierte Gene und Cx43	130
5	ZUSAMMENFASSUNG	133
6	SUMMARY.....	135
7	LITERATURVERZEICHNIS	137
8	BEZUGSQUELLEN	153
8.1	Stoffe und Reagenzien.....	153
8.2	Sonstiges Material	157
8.3	Geräte	158
8.4	Software.....	160
9	LISTE DER SIGNIFIKANT VERÄNDERTEN GENE.....	161
	ERKLÄRUNG	184
	DANKSAGUNG	185