

1	Inhaltsverzeichnis	
1	Inhaltsverzeichnis	1
2	Einleitung	6
2.1	Der Nebenhoden (Epididymis).....	6
2.1.1	Lage und makroskopischer Aufbau des Nebenhodens.....	6
2.1.2	Histologie des Nebenhodens	8
2.1.2.1	Ductuli efferentes	8
2.1.2.2	Ductus epididymidis.....	8
2.1.2.2.1	Epithel des Ductus epididymidis	9
2.1.2.2.1.1	Hauptzellen.....	10
2.1.2.2.1.2	Basalzellen	10
2.1.2.2.2	Gangumgebende glatte Muskulatur.....	11
2.1.3	Funktion des Nebenhodens.....	12
2.1.3.1	Spermienreifung	12
2.1.3.2	Spermientransport.....	12
2.1.3.3	Spermienlagerung.....	13
2.1.4	Kontraktionen des Ductus epididymidis	13
2.2	Kontraktion glatter Muskulatur	15
2.2.1	Anstieg und Abnahme der intrazellulären Kalziumkonzentration	15
2.2.2	Querbrückenzyklusregulierung	17
2.2.3	Ablauf des Querbrückenzyklus	18
2.2.4	Adrenerger Einfluss auf Kontraktionen der glatten Muskulatur des Nebenhodens	19
2.3	Bitterstoffe	21
2.3.1	Die gustatorische Signaltransduktionskaskade für Bitterstoffe.....	21
2.3.2	Vorkommen der Bittergeschmacksrezeptoren	23
2.3.3	Funktion der extraoralen Bitterstoffwahrnehmung	29
2.3.4	Denatoniumbenzoat	29
2.3.5	Beeinflussung der Kontraktion glatter Muskulatur durch Denatoniumbenzoat	30
3	Ziel der Arbeit	34
4	Material und Methoden	35

Inhaltsverzeichnis

4.1	Materialien.....	35
4.1.1	Chemikalien.....	35
4.1.2	Kits	37
4.1.3	Geräte	37
4.1.4	Verbrauchsmaterialien.....	38
4.1.5	Softwareprogramme	38
4.1.6	Serum zur Blockung von immunhistochemischen Färbungen.....	39
4.1.7	Primäre Antikörper für immunhistochemische Färbungen	39
4.1.8	Sekundäre Antikörper für Immunhistologische Färbungen	39
4.1.9	Primer für Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	40
4.1.10	Herstellung von Gebrauchslösungen und -puffern.....	41
4.1.10.1	Bouin'sche Lösung.....	41
4.1.10.2	Citratpuffer pH 6.0	41
4.1.10.3	MEM+ P/S.....	41
4.1.10.4	Orange-G-Lösung.....	41
4.1.10.5	4 % PFA-Lösung für Gewebefixierung.....	41
4.1.10.6	Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS).....	41
4.1.10.7	0,1 M oder 0,2 M Phosphatpuffer (PP)	42
4.1.10.8	PBS-Verdünnungspuffer (PBS-VP)	42
4.1.10.9	Rattenkollagenlösung	42
4.1.10.10	Tris-Acetat-Essigsäure- (TAE-)Puffer	42
4.1.10.11	Zamboni-Lösung	42
4.1.11	Herkunft des Gewebes.....	43
4.2	Methoden.....	44
4.2.1	„Live-Imaging“-Kontraktionsversuche:	44
4.2.1.1	Gewebepräparation und Einbettung	44
4.2.1.2	Versuchsabläufe	45
4.2.1.3	„Live-Imaging“.....	45
4.2.1.4	Videoauswertung.....	45
4.2.1.4.1	„Reslice“-Analyse	46
4.2.1.4.2	Multidirektionale Bewegungsanalyse	46
4.2.1.4.2.1	„Heatmap“-Darstellung.....	48
4.2.1.4.2.2	Statistische Auswertung der Videoanalyse	48

4.2.2	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	49
4.2.2.1	RNA-Isolierung	49
4.2.2.1.1	RNA-Isolierung aus ganzem Gewebe	49
4.2.2.1.2	RNA-Isolierung aus gepicktem Gewebe	50
4.2.2.1.2.1	Gewebevorbereitung für „Laser-Capture“-Mikrodissektion..	50
4.2.2.1.2.2	„Laser-Capture“-Mikrodissektion	50
4.2.2.1.2.3	RNA-Isolierung aus LCM-gepicktem-Gewebe	51
4.2.2.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	51
4.2.2.3	cDNA-Synthese	52
4.2.2.3.1	cDNA-Synthese mit RNA aus Gesamtgewebe	52
4.2.2.3.2	cDNA-Synthese mit RNA aus gepicktem Gewebe	52
4.2.2.4	PCR.....	53
4.2.2.5	Gelelektrophorese	54
4.2.3	Immunfluoreszenzfärbung.....	55
4.2.3.1	Anfertigung von Paraffin-Gewebeschnitten	55
4.2.3.2	Anfertigung von Kryo-Gewebeschnitten	55
4.2.3.3	Demaskierung mit Citratpuffer.....	55
4.2.3.4	Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung.....	56
4.2.3.5	Bildaufnahmen von Immunfluoreszenzfärbungen	57
5	Ergebnisse.....	58
5.1	Denatoniumbenzoat löst keine Kontraktionen aus im spontan nicht kontrahierenden Gangabschnitt (Segment 10) des murinen Nebenhodens	58
5.2	Reine Mediumzugaben initiieren keine Kontraktion und eine längere Vorinkubationszeit beeinflusst Noradrenalin-induzierte Kontraktionen des distalen Nebenhodengangabschnittes (Segment 10) nicht	60
5.3	Vorinkubation mit Denatoniumbenzoat verhindert NA-induzierte komplexe Kontraktionen in Segment 10 des murinen Nebenhodens.....	61
5.4	Denatoniumbenzoat hemmt laufende, zuvor durch Noradrenalin induzierte Kontraktionen im distalen murinen Nebenhodengang (Segment 10)	62
5.5	mRNA-Expression von Komponenten der gustatorischen Signaltransduktionskaskade für Bitterstoffe im Nebenhoden der Maus	66

Inhaltsverzeichnis

5.6	Nachweis von GNAT3-, PLCB2- und TRPM5-positiven Zellen im murinen Nebenhoden auf Proteinebene per Immunfluoreszenz.....	68
5.6.1	α -Gustducin-Immunfluoreszenzfärbung.....	70
5.6.2	PLCB2-Immunfluoreszenzfärbung.....	72
5.6.3	TRPM5-Immunfluoreszenzfärbung.....	74
5.6.4	<i>Trpm5</i> -RT-PCR-Analyse von Muskulatur des kaudalen Ductus epididymidis.....	76
5.7	Kontraktionsstudien mit Knock-out-Mäusen.....	77
5.7.1	<i>Trpm5</i> -Knock-out.....	77
5.7.2	<i>Skn1a/Pou2f3</i> -Knock-out.....	80
5.7.3	Vergleich zwischen Wildtyp- und <i>Trpm5</i> -Ko-Mäusen bezüglich des DNT-Effekts auf NA-induzierte Kontraktionen im distalen Nebenhodengang (Segment 10).....	83
6	Diskussion.....	84
6.1	Effekt von DNT auf die Basalaktivität der glatten Muskulatur des distalen Nebenhodenganges.....	84
6.2	Effekt der Vorinkubation mit DNT auf NA-induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur des distalen Nebenhodenganges.....	86
6.3	Veränderung von NA-induzierten Kontraktionen durch anschließende Behandlung mit DNT.....	86
6.4	Stärken und Limitationen von Kontraktionsstudien mittels „Live-Imaging“ im Vergleich zu Organbad-Kontraktionsstudien.....	88
6.4.1	Präparation und Gewebebehandlung.....	88
6.4.2	Informationsgewinn und Zeitaufwand der Auswertung.....	89
6.4.3	Zusammenfassung des Vergleichs von Organbad und „Live-Imaging“.....	90
6.4.4	Vergleich von „Reslice“-Analyse und multidirektionale Bewegungsanalyse.....	90
6.5	Expression und Lokalisation von Bestandteilen der Bittergeschmack-Signalkaskade im Nebenhoden.....	91
6.6	Mögliche Zusammenhänge zwischen dem DNT-Effekt im Nebenhoden und der klassischen Signalkaskade für Bitterstoffe.....	94

6.7 Mögliche Wirkungsweise von DNT in Bezug auf kontraktionsregulierende
 Effekte95

6.8 Mögliche Funktion der Bitterstoffwahrnehmung im Nebenhoden.....97

6.9 Ausblick.....100

7 Zusammenfassung101

8 Summary.....102

9 Abkürzungsverzeichnis103

10 Abbildungsverzeichnis106

11 Literaturverzeichnis108

12 Publikationsverzeichnis121

13 Ehrenwörtliche Erklärung122

14 Danksagung123

15 Lebenslauf124