

Inhaltsverzeichnis

Publikationsverzeichnis	14
Abkürzungsverzeichnis.....	15
Abbildungsverzeichnis	18
Tabellenverzeichnis	20
1 Einleitung und Ziele	21
2 Literaturübersicht	23
2.1 Funktion, Lage und Aufbau des menschlichen Hodens.....	23
2.2 Histologie des menschlichen Hodens	23
2.2.1 Keimzellen	24
2.2.2 Sertoli-Zellen	25
2.2.3 Leydig-Zellen.....	26
2.2.4 Peritubuläre Myoidzellen.....	27
2.3 Ablauf der normalen Spermatogenese	27
2.4 Kinetik der humanen Spermatogenese.....	29
2.5 Störungen der humanen Spermatogenese.....	30
2.6 Östrogene.....	33
2.6.1 Biosynthese	34
2.6.2 Wirkungsweise	35
2.6.3 Östrogenwerte im Blut	36
2.6.4 Einfluss von Östrogenen auf Spermatogenese und Fertilität	36
2.7 Östrogenrezeptoren (ERs).....	37
2.8 Zelluläre Lokalisation und Expression des ERα im Hoden	39
2.9 Zellzyklus und Proliferationsmarker Ki-67	42
3 Material und Methoden	44
3.1 Probenumfang.....	44
3.2 Probengewinnung.....	46
3.2.1 Herstellung histologischer Schnittpräparate (Paraffinschnitte)	46
3.2.1.1 Fixation in Bouin'scher Lösung.....	46

3.2.1.2 Entwässerung der Proben	46
3.2.1.3 Einbettung der Proben	47
3.2.1.4 Beschichtung der Objektträger (OT).....	47
3.2.1.5 Herstellung der Paraffinschnitte	47
3.2.1.6 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung)	48
3.2.2 Herstellung histologischer Schnittpräparate (Gefrierschnitte)	49
3.2.2.1 Vorbereitungen	49
3.2.2.2 Herstellung der Gefrierschnitte.....	49
3.2.2.3 Fixation der Gefrierschnitte	50
3.3 Nachweis der ER α -Expression mittels RT-PCR nach UV-LAM.....	50
3.3.1 UV-LAM.....	50
3.3.2 RNA-Extraktion aus mikrodisseziertem Gewebe mit dem RNeasy Micro Kit (Cat.No. 74004)	51
3.3.3 RT-PCR	52
3.3.3.1 DNase-Verdau	52
3.3.3.2 Reverse Transkription (RT)	53
3.3.3.3 PCR	54
3.3.3.4 Agarosegel-Elektrophorese	55
3.4 Nachweis der zellulären Lokalisation des ER α auf mRNA-Ebene mittels In-situ-Hybridisierung (ISH)	56
3.4.1 Herstellung Digoxigenin-markierter cRNA-Sonden	56
3.4.1.1 Extraktion und Isolation von RNA aus Gefriermaterial	56
3.4.1.1.1 Vorbereitungen	56
3.4.1.1.2 RNA-Extraktion mit TRIzol® Reagent	57
3.4.1.1.3 Isolation der RNA	57
3.4.1.1.4 RT-PCR	58
3.4.1.1.5 Aufreinigung des PCR-Fragmentes	58
3.4.1.1.6 Klonierung	59
3.4.1.1.7 Plasmid-Extraktion mit dem QIAprep Spin Plasmid Kit	61
3.4.1.1.8 Herausschneiden des ER α -Inserts aus dem Plasmid mit Hilfe von Not-I (antisense) und Neo-I (sense).....	62
3.4.2 ISH ER α	63

3.5 Nachweis der zellulären Lokalisation des ERα mittels	
Immunhistochemie (IHC)	66
3.6 Verifizierung der zytoplasmatischen ERα-Lokalisation mittels RT-PCR.....	68
3.6.1 RNA-Extraktion aus Paraffingewebe mit dem RNeasy	
FFPE Kit (Cat.No. 74404).....	69
3.6.2 RNA-Messung	70
3.6.3 RT-PCR	70
3.7 Charakterisierung immunpositiver interstitieller Zellen nach	
ERα-IHC (HC-20) und UV-LAM mittels RT-Nested-PCR.....	71
3.7.1 Herstellung histologischer Schnittpräparate (Paraffinschnitte)	
für die IHC	71
3.7.2 IHC ERα.....	71
3.7.3 UV-LAM.....	71
3.7.4 RNA-Extraktion aus mikrodisseziertem Gewebe mit dem	
RNeasy Plus Mini Kit (Cat.No. 74134)	72
3.7.5 Reverse Transkription	72
3.7.6 Nested-PCR	73
3.8 Nachweis der ERα-Expression auf Proteinebene mittels	
Immunoblot Analyse (IB)	74
3.8.1 Extraktion und Isolation der Proteine.....	74
3.8.2 IB ERα	75
3.8.2.1 Probenvorbereitung.....	75
3.8.2.2 Gelelektrophorese und Elektroblotting	75
3.8.2.3 Immunbestimmung.....	76
3.9 Nachweis der ERα-, ERβ- und GPER-Expression mittels	
quantitativer RT-PCR (RT-qPCR).....	77
3.9.1 Herstellung histologischer Schnittpräparate (Paraffinschnitte)	
für die Extraktion von RNA aus Paraffinmaterial	77
3.9.2 RNA-Extraktion aus Paraffingewebe mit dem RNeasy	
FFPE Kit (Cat.No. 74404).....	77
3.9.3 Einstellung der RNA	77
3.9.4 RT-PCR	78
3.9.5 qPCR.....	79
3.9.5.1 cDNA-Verdünnungsreihe.....	79

3.9.5.2 Genexpressionsvergleich unterschiedlicher Hodenbiopsien	82
3.9.5.3 Statistische Verfahren	83
3.10 Nachweis des Proliferationsmarkers Ki-67 mittels IHC.....	83
3.11 Bestimmung des peripheren Östrogenwertes	85
3.12 Histomorphometrische Analyse an Ki-67-gefärbten Paraffinschnitten und Korrelation mit dem peripheren Östrogenwert.....	85
4 Ergebnisse	87
4.1 RT-PCR ERα nach UV-LAM.....	87
4.1.1 Normale Spermatogenese.....	87
4.1.2 Sertoli cell only-Syndrom.....	87
4.2 ISH ERα	89
4.3 IHC ERα.....	90
4.3.1 HC-20-Antikörper	90
4.3.2 F-10-Antikörper	90
4.3.3 H-184-, 1F3-, 1D5- und 60C-Antikörper	93
4.4 RT-PCR von Paraffinschnitten mit nsp und TIN	94
4.5 RT-Nested-PCR	95
4.5.1 ERα	95
4.5.2 StAR	95
4.6 IB ERα	97
4.6.1 HC-20-Antikörper	97
4.6.2 F-10-Antikörper	98
4.6.3 H-184-, 1F3-, 1D5- und 60C-Antikörper	99
4.7 RT-qPCR ERα	100
4.8 RT-qPCR ERα, ERβ und GPER im Vergleich.....	102
4.9 IHC Ki-67	104
4.10 Histomorphometrische Analyse an Ki-67-gefärbten Paraffinschnitten und Zusammenhang zwischen mitotischer Aktivität und peripherem Östrogenwert.....	105

5 Diskussion	108
6 Zusammenfassung.....	117
7 Summary	119
8 Literaturverzeichnis.....	121
9 Anhang	134
9.1 Puffer, Nährböden und Lösungen	134
9.2 Bezugsquellen.....	142
9.2.1 Reagenzien.....	142
9.2.2 Geräte.....	147
9.2.3 Sonstige Materialien	148
9.2.4 Software	149
10 Danksagung.....	150