

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein
der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. J. Ring)

GABAerges System in Leydigzellen und die Stimulation der Zellproliferation durch GABA

Christof Geigerseder

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dr. J. Ring
2. Univ.-Prof. Dr. M. Gratzl,
Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 30.06.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.10.2003 angenommen.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Regulation der Hodenfunktion	9
1.1.1	Hormonelle und lokale Steuerung	9
1.1.2	Aufbau des Hodens	11
1.1.3	Spermatogenese.....	11
1.1.4	Synthese von Steroidhormonen durch Leydigzellen	13
1.1.5	TM3 Zellen als Modell für Leydigzellen	14
1.2	GABA als Neurotransmitter und auto- bzw. parakriner Faktor	15
1.2.1	GABA: Prototyp inhibitorischer Neurotransmitter im ZNS	15
1.2.2	GABAerge Systeme in peripheren endokrinen Organen.....	16
1.2.3	GABA in Organen des weiblichen und männlichen Reproduktionstraktes	17
1.3	Zielsetzung	18
2	Material	19
2.1	Menschliche Hodenbiopsien	19
2.2	Versuchstiere	19
2.3	Verwendete Lösungen.....	20
2.4	Herstellerverzeichnis.....	21
3	Methoden.....	23
3.1	Molekularbiologie	23
3.1.1	RNA-Extraktion	23
3.1.2	Reverse Transkription (RT)	23
3.1.3	Polymerase Chain Reaction (PCR)	24
3.1.4	DNA-Agarose-Gelelektrophorese	27

3.1.5	cDNA-Array.....	28
3.2	Zellbiologie	30
3.2.1	Zellkultur	30
3.2.2	Stimulationsbedingungen.....	30
3.2.3	Proliferationsmessungen	31
3.3	Proteinbiochemie	31
3.3.1	Antikörper.....	31
3.3.2	SDS-PAGE und Western Blotting.....	32
3.3.3	GAD-Assay	33
3.3.4	Proteinbestimmung	34
3.4	Immunhistochemie	35
3.5	Lasermikrodissektion (LMD).....	36
3.6	Datenbank und Sequenzierung	37
4	Ergebnisse	39
4.1	Synthese und Speicherung von GABA im Hoden.....	39
4.1.1	Unterschiedliche Expression der Gene GAD65/67 und VIAAT/VGAT im Hoden.....	39
4.1.2	Nachweis der Proteine GAD65 und GAD67 im Rattenhoden	40
4.1.3	Nachweis der enzymatischen Aktivität von GAD.....	40
4.1.3.1	Funktionelles GAD im Rattenhoden und in TM3 Zellen.....	40
4.1.3.2	Vergleich der testikulären GAD-Aktivität von jungen und alten Ratten	42
4.2	Identifikation von GABA-Rezeptoruntereinheiten im Hoden	43
4.2.1	RT-PCR Analyse von testikulären GABA-Rezeptoruntereinheiten	43
4.2.2	Nachweis von GABA _A -Rezeptoruntereinheiten im Rattenhoden auf Proteinebene	45
4.3	Lokalisation des GABAergen Systems im Hoden.....	46
4.3.1	Immunhistochemische Untersuchungen (IHC).....	46

4.3.1.1	Zelluläre Lokalisation von GAD65/67 und VIAAT/VGAT im Hoden	46
4.3.1.2	Zelluläre Lokalisation von GABA-Rezeptoruntereinheiten im Hoden	47
4.3.1.3	Vergleich der Lokalisation des GABAergen Systems bei jungen und alten Ratten	48
4.3.2	Lasermikrodissektion (LMD) von Leydigzellen	50
4.3.2.1	Isolation von Leydigzellen aus Rattenhoden durch LMD.....	50
4.3.2.2	Nachweis von GABA _A -α1 durch RT-PCR in Leydigzellen nach LMD.....	50
4.4	Funktionelle Aspekte von GABA im Hoden	51
4.4.1	GABA induziert die Proliferation von TM3 Zellen über GABA _A -Rezeptoren	51
4.4.2	GABA Stimulation verstärkt die Bildung von PCNA in TM3 Zellen	52
4.4.3	Verstärkte Expression von c-fos und hsf-1 in stimulierten TM3 Zellen	54
5	Diskussion.....	56
5.1	Identifikation und Lokalisation eines lokalen GABAergen Systems im Hoden	56
5.2	GABA als auto- und parakriner Faktor im Reproduktionstrakt.....	58
5.3	GABA als Regulator der zellulären Proliferation und Differenzierung im ZNS	59
5.4	Funktion von GABA in fetalen und adulten Leydigzellen.....	60
5.5	Signaltransduktion der GABA induzierten Proliferation von TM3 Zellen	62
5.6	Ausblick: GABA wird vom Neuro- zum „Zytotransmitter“	64
6	Zusammenfassung	65
7	Literaturverzeichnis.....	67
Anhang	78

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Regelkreis der Hypothalamus-Hypophysen-Hoden-Achse	10
Abbildung 1-2: Ablauf der menschlichen Spermatogenese	12
Abbildung 1-3: Synthesewege für Testosteron im Hoden.....	14
Abbildung 1-4: Synthese und Wirkung von GABA.....	16
Abbildung 3-1: Schema des cDNA-Arrays Mouse PathwayFinder-1	28
Abbildung 3-2: Technik der Lasermikrodissektion (LMD)	37
Abbildung 4-1: RT-PCR Analyse von GAD65/67 im Hoden	39
Abbildung 4-2: Western Blot von GAD65/67 im Rattenhoden	40
Abbildung 4-3: GAD-Aktivität im Rattenhoden und in TM3 Zellen.....	41
Abbildung 4-4: GAD-Aktivität im Rattenhoden in unterschiedlichen Entwicklungsphasen.....	42
Abbildung 4-5: RT-PCR Analyse testikulärer GABA-Rezeptoren bei Mensch und Ratte.....	44
Abbildung 4-6: Western Blot von GABA _A -β2/3 im Rattenhoden	45
Abbildung 4-7: Nachweis von GAD65/67 und VIAAT/VGAT in Leydigzellen durch IHC	47
Abbildung 4-8: Immunhistochemischer Nachweis von GABA _A -α in Leydigzellen	48
Abbildung 4-9: Lokalisation des GABAergen Systems im Hoden von jungen und alten Ratten	49
Abbildung 4-10: Lasermikrodissektion (LMD) von Leydigzellen im Rattenhoden.....	50
Abbildung 4-11: Proliferationsmessungen bei stimulierten TM3 Zellen.....	52
Abbildung 4-12: Western Blot von PCNA aus stimulierten TM3 Zellen im Zeitverlauf	53
Abbildung 4-13: PCNA Gehalt von stimulierten TM3 Zellen im Zeitverlauf.....	54
Abbildung 4-14: Änderungen in der Genexpression bei GABA _A -Stimulation	55

Abkürzungsverzeichnis

#	Nummer
™	eingetragenes Warenzeichen
AET	2-Aminoethyl-isothiuronium-bromid
AK	Antikörper
ALC	Adulte Leydigzelle
bp	Basenpaare
cDNA	complementary DNA
cpm	radioaktive Zerfälle pro Minute
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethyl-pyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylen-diamin-tetraessigsäure
FKS	Fetales Kälberserum
FLC	Fetale Leydigzelle
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
GABA	γ -Aminobuttersäure
GAD	Glutamat-Decarboxylase
GH	Wachstumshormon
GnRH	Gonadotropin-Releasinghormon
hCG	humanes Choriongonadotropin
ICSI	intrazelluläre Spermieninjektion
IHC	Immunhistochemie
IU	Internationale Einheit Enzymaktivität
IVF	In-vitro-Fertilisation
kDa	Kilodalton
LH	Luteinisierendes Hormon
LMD	Lasermikrodissektion
M	Molar (mol/l)
min	Minute
MMLV-RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
Mr	Molecular range
mRNA	messenger-RNA
NIH	National Institute of Health
NPE	Natriumchlorid/Pipes/EDTA

nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
p	Wahrscheinlichkeit für einen irrtümlich gefundenen Unterschied zweier Beobachtungsgruppen für die vorliegende Stichprobe
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pipes	Piperazin-1,4-bis-2-ethansulfon-säure
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
POX	Peroxidase
PS	Pferdeserum
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
R.T.	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TBE	Tris/Borat/EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
µm	Mikrometer
VIAAT	Vesicular Inhibitory Amino Acid Transporter
VGAT	Vesicular GABA Transporter
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

Das evolutionsbiologische Fortbestehen einer Art hängt ganz entscheidend von einer effektiv funktionierenden sexuellen Fortpflanzung ab. Beim Menschen sind etwa 10-15% aller Paare von Infertilität betroffen, wobei sich die Ursachen der Unfruchtbarkeit zu jeweils etwa der Hälfte auf Frau und Mann verteilen. Für über 90% der männlichen Infertilität ist dabei eine fehlerhafte Spermatogenese verantwortlich. Therapeutisch setzt man hierbei zumeist auf *in-vitro*-Fertilisationstechniken (IVF) wie die intrazelluläre Spermieninjektion (ICSI). Dies stellt jedoch nur eine symptomatische Therapieform dar, die benutzt wird, da man die biologischen Zusammenhänge der Spermatogenese und ihrer Störungen noch nicht ausreichend versteht um eine kausale Therapieform wählen zu können. Zur Entwicklung solcher Behandlungsstrategien gegen Infertilität ist eine genaue Aufklärung des Zusammenspiels der funktionellen Einheiten im Hoden und der zugrunde liegenden hormonellen, neuronalen und lokalen Regulationsmechanismen notwendig. Im folgenden sollen die Grundlagen der Regulation der Hodenfunktion genauer erläutert werden sowie die Rolle des Neurotransmitters GABA in endokrinen Systemen dargestellt werden.

1.1 Regulation der Hodenfunktion

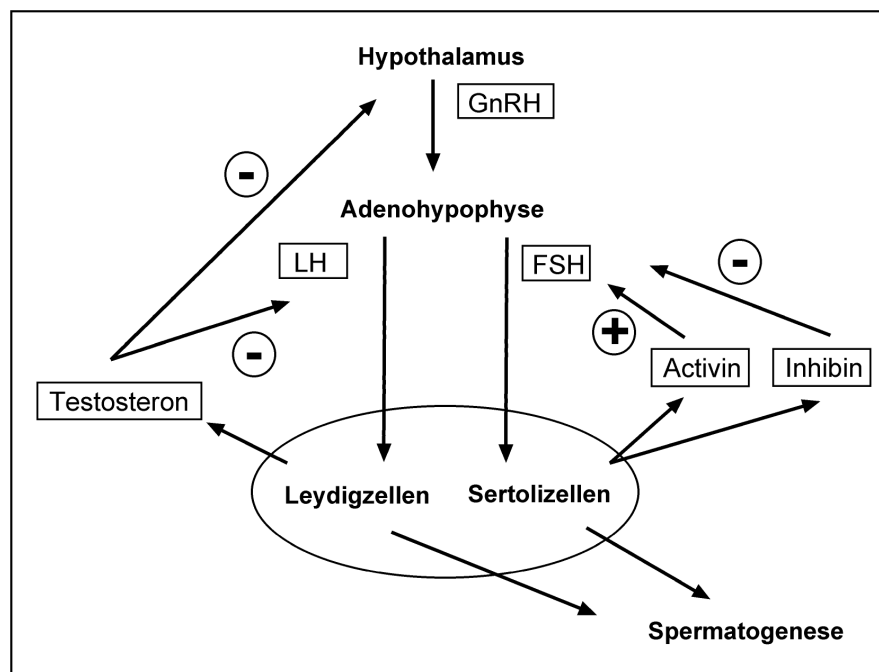
1.1.1 Hormonelle und lokale Steuerung

Sowohl die Produktion von Testosteron, als auch die Spermatogenese setzen einen funktionsfähigen Regelkreis, die Hypothalamus-Hypophysen-Hoden-Achse, voraus (siehe **Abbildung 1-1**). Dabei steht die Ausschüttung der Gonadotropine LH (Luteinisierendes Hormon) und FSH (Follikel stimulierendes Hormon) durch gonadotrope Zellen der Adenohypophyse unter der Kontrolle des Peptidhormons GnRH (Gonadotropin-Releasinghormon). Dieses wird von hypothalamischen Neuronen pulsatil in das Portalgefäßsystem der Hypophyse freigesetzt, was wiederum synchrone Pulse von LH und FSH zur Folge hat. LH steuert über LH-Rezeptoren die Testosteronproduktion der Leydigzellen im Hoden, während FSH durch FSH-Rezeptoren auf Sertolizellen die Spermatogenese reguliert. Nur bei optimaler Steuerung der pulsatilen Freisetzung von GnRH kommt es zu einer synchronen Ausschüttung von LH und FSH in der Hypophyse. Bei veränderter Frequenz oder konstanter GnRH-Freisetzung erlischt die Sekretion von

Gonadotropinen. Die Aktivität der dem hypothalamischen GnRH-Pulsgenerator zugrunde liegenden Neurone wird durch höhere ZNS-Zentren gesteuert, aber auch durch eine Vielzahl von anderen Faktoren moduliert. Einen wichtigen Rückkopplungsmechanismus stellt dabei das Testosteron dar. So führt ein hoher Testosteronspiegel sowohl zur Hemmung der GnRH-Freisetzung im Hypothalamus, als auch direkt zur verminderten LH-Ausschüttung in der Hypophyse. Ein niedriger Testosteronspiegel bewirkt das Gegenteil. Außerdem ist Testosteron neben FSH der zweite entscheidende Regulator der Spermatogenese im Hoden.

Abbildung 1-1: Regelkreis der Hypothalamus-Hypophysen-Hoden-Achse

Die Abbildung stellt einen Überblick über die wichtigsten Regulationsmechanismen dar. Die Freisetzung der Gonadotropine **LH** und **FSH** in der Hypophyse wird durch hypothalamisches **GnRH** gesteuert. Eine Rückkopplung findet durch das von Leydigzellen gebildete **Testosteron**, sowie durch die Peptide **Inhibin** und **Activin**, die von Sertolizellen synthetisiert werden, statt.



Die von Sertolizellen synthetisierten Peptidhormone Inhibin und Activin bilden einen weiteren Feedbackmechanismus innerhalb der Hypothalamus-Hypophysen-Hoden-Achse. Inhibin führt dabei in der Adenohypophyse zur Verminderung der FSH-Freisetzung, Activin hingegen zur vermehrten Ausschüttung von FSH. Welchen Einfluss diese Peptide auf die GnRH-Freisetzung haben, ist derzeit noch nicht vollständig geklärt. Außer diesen Regulationsmechanismen auf die

Hypothalamus-Hypophysen-Hoden–Achse, gibt es auch noch vom endokrinen System weitgehend unabhängige lokale Modulatoren der Hodenfunktion. Zum Beispiel beeinflussen eine Reihe von Wachstumsfaktoren, wie IGF-1 (Insulin-like growth factor 1), PDGF (Platelet-derived growth factor) oder TGF β (Transforming growth factor β), die Zellentwicklung und Differenzierungsvorgänge im Hoden. Darüber hinaus können leukozytäre Zellen des Immunsystems, wie Mastzellen oder Makrophagen, mit Sertoli- und Leydigzellen interagieren. Dabei üben sie nicht nur immunologische Funktionen aus, sondern sind auch in der Lage die Steroidsynthese und die zelluläre Aktivität von Leydigzellen zu regulieren.

1.1.2 Aufbau des Hodens

Die paarig angelegten Hoden des erwachsenen Mannes haben die Form von Rotationsellipsoiden (Längsachse: 40-45 mm, Durchmesser: 20-25 mm) und liegen im Skrotum in einer nach vorne geneigten Position. An der dorsalen Fläche ist der Hoden mit den Gefäßen und Nerven des Samenstranges verbunden. Der Hoden grenzt dorsolateral an den Nebenhoden, dessen oberer Pol den Hoden überragt. Die Hodenoberfläche ist vom viszeralem Blatt des Cavum serosum testis bedeckt, das am Gefäßstiel ins parietale Blatt umschlägt. Histologisch teilt sich der Hoden in zwei Bereiche, die Samenkanälchen (Tubuli seminiferi contorti) und das interstitielle Gewebe. In den Samenkanälchen findet die Spermatogenese des Keimepithels in der Obhut von Sertolizellen statt. Im interstitiellen Bereich finden sich neben Gefäßen und Nerven Leydigzellen, die das männliche Geschlechtshormon Testosteron produzieren. Die Sertolizellen bilden durch interzelluläre Zellkontakte (tight junctions) die Blut-Hoden-Schranke aus, welche eine Barriere zwischen Interstitium und den Samenkanälchen mit dem Keimepithel bilden.

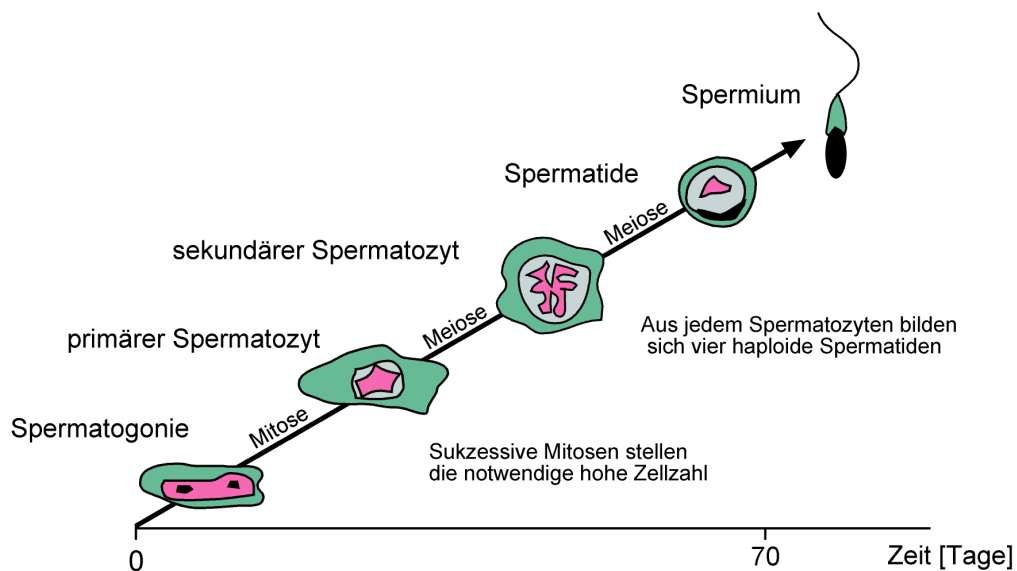
1.1.3 Spermatogenese

Die Spermatogenese ist ein durch FSH und Testosteron gesteuerter Entwicklungsprozess von Spermien, der mit der Pubertät durch einen von GnRH ausgelösten Gonadotropinanstieg einsetzt. Sie findet in den Tubuli seminiferi des Hodens statt und stellt einen sehr komplexen und organisierten Differenzierungsvorgang dar, in dem sich aus Stammzellspermatogonien reife Spermien entwickeln. Der menschliche Hoden produziert etwa 120 Millionen reife Spermien pro Tag, wobei die gesamte Entwicklungszeit ca. 75 Tage beträgt. Die

Spermatogenese beginnt zuerst mit mitotischen Teilungen der Stammzell-spermatogonien, die zum einen dem Erhalt des Stammzellbestandes, zum anderen der weiteren Differenzierung zu Spermatozyten dienen. Anschließend finden meiotische Teilungen der Spermatozyten zu haploiden Spermatischen statt, die sich dann zu reifen Spermien differenzieren (siehe **Abbildung 1-2**).

Abbildung 1-2: Ablauf der menschlichen Spermatogenese

Die Spermatogenese produziert pro Hoden 120 Millionen Spermien am Tag. Stammzell-spermatogonien teilen sich in hoher Zahl mitotisch. Einige differenzieren sich zu **primären Spermatozyten**, die den ersten Teil der Meiose durchlaufen. Durch den zweiten Teil der Meiose entstehen dann aus **sekundären Spermatozyten** Spermatischen. Aus einem diploiden primären Spermatozyten entwickeln sich in der Meiose vier haploide **Spermatischen**. Diese differenzieren sich zum reifen **Spermium** weiter (modifiziert nach [26]).



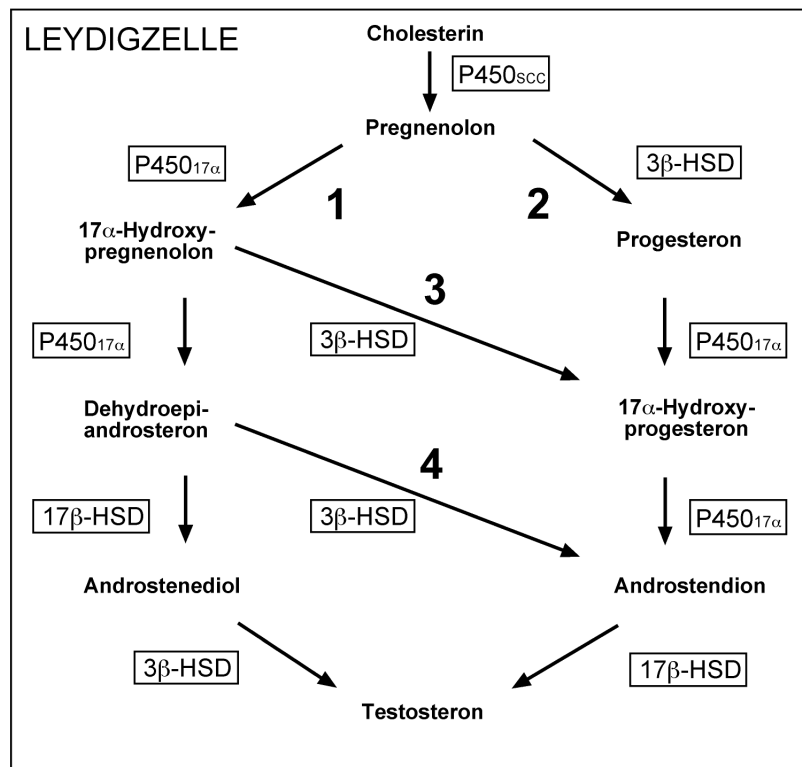
Im ersten Teil der Meiose durchlaufen die primären Spermatozyten das Präleptotän, Leptotän, Zygotän, Pachytän und Diplotän und werden zu sekundären Spermatozyten. Durch den zweiten Teil der Meiose entstehen nun Spermatischen, wobei sich aus einem diploiden primären Spermatozyten vier haploide Spermatischen entwickeln. Diese differenzieren in der Spermio-genese zu reifen Spermien, die anschließend ins Lumen der Samenkanälchen freigesetzt werden. Die Spermatogenese wird dabei hauptsächlich durch zwei Mechanismen reguliert, den endokrinen Einfluß von FSH und die parakrine Wirkung von Testosteron aus Leydigzellen. Deshalb ist das perfekte Zusammenspiel beider Hormone die Grundvoraussetzung für einen physiologischen Ablauf der Spermatogenese.

1.1.4 Synthese von Steroidhormonen durch Leydigzellen

Das wichtigste männliche Geschlechtshormon Testosteron wird von Leydigzellen im Hoden gebildet. Morphologisch sind Steroid produzierende Zellen durch glattes endoplasmatisches Retikulum und durch eine hohe Dichte von Mitochondrien vom tubulären Typ gekennzeichnet, in denen wichtige Enzyme der Steroidsynthese lokalisiert sind. Auch finden sich in Steroid produzierenden Zellen sehr viele Lipidtröpfchen, die Speicher für das Ausgangsmolekül Cholesterin darstellen. Bei Bedarf wird es von dort aus Cholesterinestern freigesetzt, durch Rezeptor vermittelte Endozytose von Lipoprotein aus dem Blut aufgenommen oder in den Steroid produzierenden Zellen neu synthetisiert. StAR (steroidogenic acute regulated protein) vermittelt die Cholesterin-Translokation vom Zytoplasma zur inneren Mitochondrienmembran. Hier katalysiert das Enzym P450_{scc} (Cholesterin-Monooxygenase, side-chain cleavage enzyme) die Bildung von Pregnenolon durch Abspaltung eines C6-Körpers. Ausgehend von Pregnenolon gibt es vier mögliche Synthesewege um Testosteron zu synthetisieren (siehe **Abbildung 1-3**). Bei Nagern, also auch bei Ratte, Maus und Hamster, dominiert in Leydigzellen der Syntheseweg 2. Dabei entsteht im Zytoplasma durch die Aktivität von 3 β -HSD (3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase) Progesteron, das durch die Monooxygenase P450_{17 α} (17 α -Hydroxylase Cytochrom P450) zuerst in 17 α -Hydroxyprogesteron und anschließend durch das gleiche Enzym in Androstendion umgewandelt wird. Als letzter Schritt wird dann aus Androstendion durch 17 β -HSD (17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase) Testosteron gebildet. In menschlichen Leydigzellen wird hingegen Testosteron ausgehend von Pregnenolon hauptsächlich nach dem Syntheseweg 1 gebildet. Dabei wird zuerst im Zytoplasma durch die Aktivität der P450_{17 α} aus Pregnenolon 17 α -Hydroxypregnenolon und anschließend durch das gleiche Enzym Dehydroepiandrosteron gebildet. Dieses wird nun durch 17 β -HSD zu Androstendiol umgewandelt, das schließlich von 3 β -HSD in Testosteron überführt wird. Die Synthesewege 3 und 4 stellen alternative Reaktionsabläufe für die Bildung von Testosteron in Zellen dar, sind allerdings bei Säugetieren von untergeordneter Bedeutung.

Abbildung 1-3: Synthesewege für Testosteron im Hoden

Die Abbildung (modifiziert nach [9]) zeigt einen Überblick der Synthese von Steroidhormonen in den Leydigzellen des Hodens. Dabei gibt es vier potentielle Biosynthesewege um aus Cholesterin Testosteron zu bilden. Während bei Nagern der Syntheseweg 2 dominiert, synthetisiert der Mensch sein Testosteron hauptsächlich über den Syntheseweg 1. (P450_{scc}=Cholesterin-Monooxygenase, side-chain cleavage enzyme; P450_{17 α} =17 α -Hydroxylase Cytochrom P450; 17 β -HSD=17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase; 3 β -HSD=3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase).



1.1.5 TM3 Zellen als Modell für Leydigzellen

Als *in-vitro*-Modell zur Untersuchung von Leydigzellen bietet sich die Leydigzellreihe TM3 an. TM3 Zellen stammen von funktionell entdifferenzierten Leydigzellen von Mäusen ab. Sie produzieren Testosteron und dessen Steroidvorstufen nur in geringen Mengen. In früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe stellte sich heraus, dass die von TM3 Zellen produzierte Menge an Steroiden, wie z. B. Testosteron oder Progesteron, entweder nicht messbar war oder ein so niedriger Wert gemessen wurde, dass dadurch Untersuchungen mit Steroid-Assays bei TM3 Zellen nicht in sinnvoller Weise durchführbar waren. Andere Leydigzellreihen, die von Leydigzelltumoren abstammen, weisen ähnliche Einschränkungen hinsichtlich ihrer Steroidproduktion auf. Somit stellen TM3 Zellen

kein gutes Modell zur Beurteilung von Auswirkungen auf die Steroidproduktion dar. Im Gegensatz dazu eignen sich TM3 Zellen als *in-vitro*-Modell besonders für die Untersuchung der Zellproliferation von Leydigzellen. Sie weisen eine konstante basale Proliferationsrate auf. Übertragen auf die physiologischen Verhältnisse im Hoden kann man TM3 Zellen am ehesten mit proliferierenden Leydigzellen in einer frühen Entwicklungsphase vergleichen.

1.2 GABA als Neurotransmitter und auto- bzw. parakriner Faktor

1.2.1 GABA: Prototyp inhibitorischer Neurotransmitter im ZNS

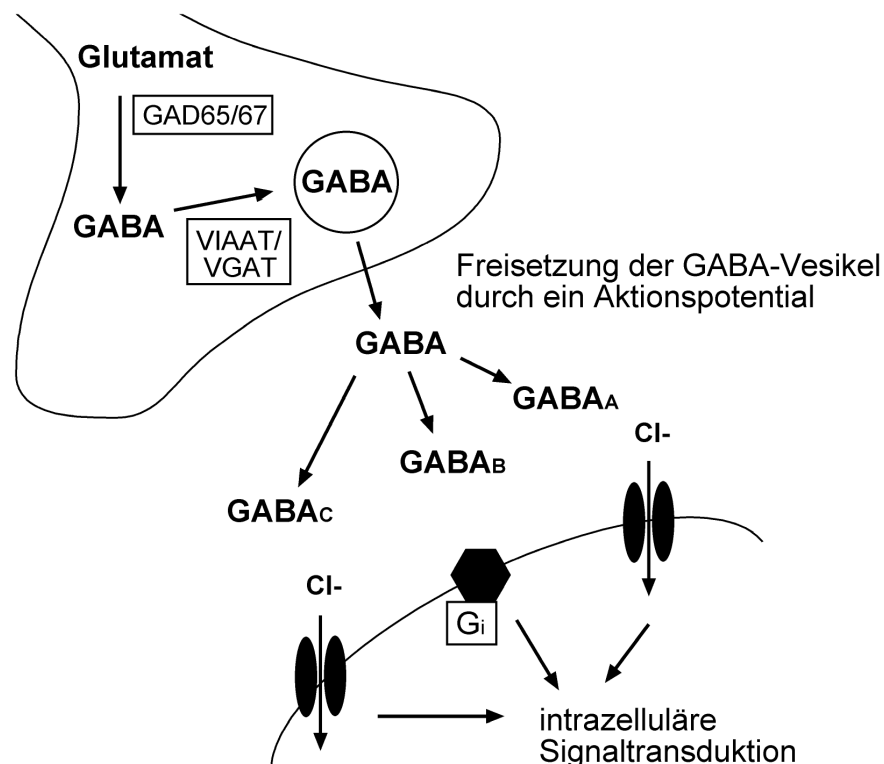
Die γ -Aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter des ZNS. GABA ist eine nicht proteinogene Aminosäure, die durch das zytoplasmatische Enzym Glutamat-Decarboxylase (GAD) aus Glutamat gebildet wird. Es sind 2 Isoformen von GAD bekannt. Die beiden enzymatisch aktiven Formen GAD65 und GAD67 sind im gesamten ZNS verbreitet, weisen aber regionale Expressionsunterschiede auf. Die GAD67-Splicevariante GAD25 hingegen scheint keine enzymatische Aktivität zu besitzen. GABA wird durch das Transportprotein VIAAT/VGAT (vesicular inhibitory amino acid transporter /vesicular GABA transporter) in Vesikeln gespeichert. Wird eine präsynaptische Membran durch ein Aktionspotential erregt, so kommt es zur Freisetzung von vesikulärem GABA in den synaptischen Spalt. Es sind drei Arten von GABA-Rezeptoren bekannt. Die ionotropen GABA_A-Rezeptoren sind aus fünf Untereinheiten aufgebaute Chloridkanäle. Es sind bisher zwanzig verschiedene GABA_A-Rezeptoruntereinheiten der Gruppen α , β , γ , δ , ϵ , θ und π mit teilweise mehreren Splicevarianten bekannt. GABA_B-Rezeptoren sind hingegen an ein G_i-Protein gekoppelte metabotrope Rezeptoren, die sich aus den Untereinheiten R1 und R2 zusammensetzen. Die Struktur der ionotropen GABA_C-Rezeptoren ist noch nicht eindeutig geklärt, es handelt sich aber ebenfalls um Chloridkanäle, die sich aus Untereinheiten der Gruppe ρ zusammensetzen. Eine Darstellung der synaptischen Übertragung durch GABA zeigt die **Abbildung 1-4**.

Die GABA-Rezeptoren sind an eine Vielzahl intrazellulärer Signaltransduktionswege gekoppelt, wie z. B. die Aktivierung von Ca²⁺-Kanälen, K⁺-Kanälen, Adenylatzyklase, Proteinkinase C oder die Hyperpolarisation der postsynaptischen Membran. Nach der Erregungsübertragung wird GABA entweder in Gliazellen zu

Glutamin abgebaut oder durch Wiederaufnahme in die Nervenzellen aus dem synaptischen Spalt entfernt.

Abbildung 1-4: Synthese und Wirkung von GABA

Im ZNS wird der Neurotransmitter **GABA** im Zytoplasma eines Neurons durch die Enzyme **GAD65/67** synthetisiert und durch das Transportprotein **VIAAT/VGAT** in Vesikel verpackt. Erregt ein Aktionspotential die präsynaptische Membran kommt es zur Verschmelzung der Vesikel mit der Membran und zur GABA-Freisetzung in den synaptischen Spalt. GABA kann **GABA_A**-, **GABA_B**- und **GABA_C**-Rezeptoren auf postsynaptischen Membranen aktivieren. Bei den ionotropen **GABA_A**- und **GABA_C**-Rezeptoren handelt es sich um Chloridkanäle. Die metabotropen **GABA_B**-Rezeptoren sind G_i -Protein gekoppelt. Alle drei GABA-Rezeptortypen können verschiedenste intrazelluläre Signaltransduktionswege aktivieren.



1.2.2 GABAerge Systeme in peripheren endokrinen Organen

Neben der klassischen Funktion als Neurotransmitter im ZNS, kommt GABA auch außerhalb des Nervensystems, z. B. in einer Reihe von endokrinen Organen vor [105]. GAD wurde zum Beispiel in β -Zellen des Pankreas bei Nagern und Menschen gefunden [24,33,78,96]. Wachstumshormon produzierende Zellen des

Hypophysenvorderlappens synthetisieren ebenfalls GABA [72]. Dort stimuliert es über GABA_B-Rezeptoren die Ausschüttung von Wachstumshormon (GH) [42]. Da auch in anderen endokrinen Organen GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren nachgewiesen wurden [5,22], könnte GABA in diesen Organen als auto- bzw. parakriner Faktor seine Wirkung entfalten [42,72].

1.2.3 GABA in Organen des weiblichen und männlichen Reproduktionstraktes

Auch im weiblichen und männlichen Reproduktionstrakt finden sich Hinweise auf die Präsenz eines GABAergen Systems. So wurde im Ovar und im Eileiter durch immunhistochemische Untersuchungen GAD nachgewiesen [28,29,106,107]. Während die Rolle von GABA im Ovar unklar bleibt, ist das im Eileiter synthetisierte GABA in der Lage, ejakulierte Spermien zu aktivieren. Stimulation mit GABA führt zur Initiierung der Akrosomenreaktion und erhöht die Spermienmotilität [20,21,32,50,60,74,100,101]. Diese GABAergen Effekte werden sehr wahrscheinlich über die bekannten GABA-Rezeptoren übertragen, da GABA_A-Rezeptoren auf menschlichen Spermien [1,89] und sowohl GABA_A-Rezeptoren [50,51], als auch GABA_B-Rezeptoren [22,48] auf Rattenspermien identifiziert wurden. Allerdings sind in der männlichen Gonade nicht nur GABA-Rezeptoren auf Spermien vorhanden, sondern GABA wird dort auch gebildet. Testikuläres GABA wurde in der Ratte [40], in der Maus [33], im Hamster [39,40] und im Menschen [86] nachgewiesen. Im menschlichen Hoden wird die GAD-Isoform GAD67 und ihre Splicevariante GAD25, die allerdings nicht enzymatisch aktiv ist, gebildet [23]. Es ist jedoch nicht klar, welche testikulären Zellen GAD exprimieren und damit GABA synthetisieren können. In einigen Untersuchungen wurde mRNA von GAD im tubulären Kompartiment des Hodens nachgewiesen [86,106], allerdings ist unbekannt ob GAD dort enzymatisch aktiv ist.

Darüber hinaus kann GABA im Hoden nicht dieselbe physiologische Funktion - die Aktivierung von Spermien – wie im weiblichen Reproduktionstrakt haben. Somit könnte der Nachweis von GABA-Rezeptoruntereinheiten im Hoden von Nagern [5,22,48,93] bedeuten, dass nicht nur Spermien GABA-Rezeptoren besitzen, sondern vielmehr, dass auch andere testikuläre Zellen als Ziele einer GABAergen Wirkung in Frage kommen. In der Tat wurde in pharmakologischen Studien erwiesen, dass GABA bei Ratten die Produktion von Androgenen erhöht [90,92]. Dies könnte auf das Vorkommen von GABA-Rezeptoren in Leydigzellen schließen lassen.

1.3 Zielsetzung

Die Fertilität des Mannes kommt durch eine konzertierte Aktion von Gehirn, Hypophyse und Hoden zustande, die zu einer erfolgreichen Spermatogenese im Hoden führt. Im Hoden ist das Zusammenspiel von Leydigzellen und Sertolizellen eine wichtige Grundvoraussetzung für die Spermatogenese. Außer dem Einfluss von Gonadotropinen und der hypothalamischen Steuerung durch GnRH gibt es neben Testosteron auch lokale Faktoren im Hoden, die wichtige Aufgaben in der Steuerung der Hodenfunktion übernehmen. Neurotransmitter, wie z. B. GABA, könnten hierbei als auto- bzw. parakrine Regulatoren eine Rolle spielen. Die mögliche Bedeutung von GABA in diesem Zusammenhang ist jedoch weitgehend unklar. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass Leydigzellen als Zielort für GABA in Frage kommen. Diese Arbeit hatte daher folgende Ziele:

1. Identifizierung der Bestandteile des GABAergen Systems im Hoden von Nagern und Menschen und zelluläre Zuordnung des GABA-Synthesapparats und der GABA-Rezeptoren.
2. Zellbiologische und molekularbiologische Charakterisierung der Komponenten des GABAergen Systems in Leydigzellen.
3. Untersuchung der Funktionen von GABA und der GABAergen Signalwege in TM3 Zellen als Modell für Leydigzellen.

2 Material

2.1 Menschliche Hodenbiopsien

In dieser Arbeit wurden archivierte Hodenbiopsien erwachsener Männer (Alter: 22-44 Jahre) untersucht. Die verwendeten Hodenbiopsien zeigten histologisch normale Spermatogenese oder teilweise Spermatogenesestörungen. Alle Biopsien wurden in Bouin's Lösung fixiert und in Paraffin eingebettet. Von dem so eingebetteten Hodengewebe wurden mit dem Mikrotom *SM 2000 R* (Leica) 5 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Die wissenschaftliche Untersuchung der menschlichen Hodenbiopsien wurde durch die Ethikkommission der Technischen Universität München begutachtet und genehmigt.

2.2 Versuchstiere

Es wurden Hoden von erwachsenen männlichen Ratten (n=29) der Stämme Sprague-Dawley und Wistar, von 5-6 Tage alten bzw. 14 Tage alten männlichen Ratten (n=14) des Stammes Sprague-Dawley und von erwachsenen männlichen Mäusen (BALB/c, n=7) entnommen. Diese Tiere wurden unter Beachtung der Tierhaltungsrichtlinien des National Institute of Health (NIH) [25] an der Technischen Universität München aufgezogen und schmerzfrei unter Äthernarkose durch Eröffnen der Halsgefäße getötet. Sowohl die Hoden, als auch das Kleinhirn wurden daraufhin schnell entnommen. Außerdem wurden Hoden von erwachsenen männlichen Goldhamstern (n=12) verwendet, die am Instituto de Biología y Medicina Experimental in Buenos Aires, Argentinien unter Beachtung der Tierhaltungsrichtlinien des NIH [25] aufgezogen wurden. Die Goldhamster wurden in Räumen bei 23±2° C und seit ihrer Geburt mit einem Hell-Dunkel-Verhältnis von 14:10 (Licht von 7.00 Uhr bis 21.00 Uhr) gehalten, wobei ihnen Futter und Wasser frei zur Verfügung standen. Die Goldhamster wurden durch Enthauptung getötet und ihre Hoden anschließend schnell entnommen.

2.3 Verwendete Lösungen

Im folgenden ist die Zusammensetzung von Lösungen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, angegeben. H₂O wurde zweifach destilliert verwendet. Alle Zahlenangaben sind in der Einheit mM bezeichnet, soweit sie nicht anders angegeben sind. Die Prozentangaben entsprechen Gewichtsprozent.

PBS (10 mM; 1 l): 0,386 g NaH₂PO₄ × H₂O; 1,282 g Na₂HPO₄ × 2 H₂O; 8,776 g NaCl; pH 7,4

TBE Puffer (5 ×; 1 l): 4 g Tris; 27,5 Borsäure; 20 ml 0,5 M EDTA; pH 8,0

Probenpuffer (1 ×): 62,5 Tris; 2% SDS; 10% Saccharose; pH 6,8

DEPC H₂O: 500 µl DEPC in 1 l H₂O über Nacht rühren lassen

NPE: 150 NaCl; 10 Pipes; 1 EDTA; pH 7,2

DNA-Auftragspuffer (6 ×): 0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol; 40% Saccharose

APS 10% (1 ×; 0,1 l): 10 g Ammoniumpersulfat

Elektrophoresepuffer (10 ×; 1 l): 30,28 g Tris; 144,12 g Glycin; 10 g SDS; pH 8,3

Trenngelpuffer (1 ×): 1,5 M Tris; 0,4% SDS; pH 8,8

Sammelgelpuffer (1 ×): 0,5 M Tris; 0,4% SDS; pH 6,8

Transferpuffer (1 ×): 192 Glycin; 25 Tris; 20% Methanol

Ponceau S (10 ×; 0,5 l): 1 g Ponceau S; 3% Trichloressigsäure

TBS (10 ×): 0,5 M Tris; 1,5 M NaCl; pH 7,6

TBS-Tween (10 ×; 1 l): 0,05% Tween 20; 100 ml 10 × TBS

SDS 10% (1 ×; 0,1 l): 10 g Sodiumdodecylsulfat

Homogenisationspuffer (1 ×; 0,1 l): 0,6 K₂PO₄ pH 7,1; 0,5% Triton X-100; 1 AET; 1 PMSF

2.4 Herstellerverzeichnis

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Reagenzien, Materialien und Geräte wurden von folgenden Firmen bezogen:

AGOWA GmbH, Berlin, Deutschland

Alomone labs, Jerusalem, Israel

Amersham Life Science Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland

Beckman, München, Deutschland

BIORAD, München, Deutschland

Biozym Diagnostic GmbH, Oldendorf, Deutschland

BioLabs, Schwalbach, Deutschland

BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland

Boehringer Ingelheim Pharma KG, Ingelheim, Deutschland

Canberra Packard, Dreieich, Deutschland

Clontech Inc., Palo Alto, USA

DNASTAR Inc., Madison, USA

DPC Biermann, Bad Nauheim, Deutschland

DYNEX Technologies, Denkendorf, Deutschland

Eppendorf–Netheler–Hinz GmbH, Köln, Deutschland

Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, Frankreich

GibcoBRL Life technologies GmbH, München, Deutschland

GraphPad Software Inc., San Diego, USA

Hamilton, Bonaduz, Schweiz

Heraeus Instruments GmbH, München, Deutschland

Heto-Holten A/S, Allerød, Dänemark

IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland

Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA

Leica, Bensheim, Deutschland

Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland

Mikrotek GmbH, Kiel, Deutschland

MJ Research, Watertown, USA

MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland

NEN™ Life Science Products Inc., Boston, USA

NIMH, RSB National Institute of Mental Health, Bethesda, USA

NUNC, Wiesbaden, Deutschland

PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
P.A.L.M. GmbH, Bernried, Deutschland
PeQLAB, Erlangen, Deutschland
Pierce, Köln, Deutschland
Pharmazia Biotech, Freiburg, Deutschland
Promega, Mannheim, Deutschland
Quiagen AG, Hilden, Deutschland
Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Stratagene, Heidelberg, Deutschland
Superarray Inc., Bethesda, USA
Upstate biotechnology, Lake Placid, USA
Vector Laboratories, Burlingame, USA
Zeiss Jena GmbH, München, Deutschland

3 Methoden

3.1 Molekularbiologie

3.1.1 RNA-Extraktion

Zur Extraktion der gesamten zellulären RNA aus frisch gewonnenem Hodengewebe von Ratte, Maus und Hamster sowie von TM3 Zellen wurde der Präparations-Kit *RNeasy* (QIAGEN) verwendet. Gemäß dem Arbeitsprotokoll des Herstellers wurden die mitgelieferten Puffer zur Lyse des Gewebes bzw. der Zellen (*RLT*, basierend auf Guanidinisothiocyanat, zuvor versetzt mit β -Mercaptoethanol) und zum Waschen der Säule verwendet (*RW1* und *RPE/70%* Ethanol). Alle Zentrifugationsschritte wurden mit der Mikrozentrifuge *Biofuge fresco* (Heraeus) bei 4° C durchgeführt. Schließlich wurde die RNA mit 50 μ l DEPC-H₂O eluiert und bei -80° C gelagert.

Da RNA leicht degradiert, wurde ihre Qualität vor weiteren Arbeitsschritten durch Elektrophorese mit einem Agarosegel (2%) geprüft. Hierfür wurden die bei der DNA-Gelelektrophorese beschriebenen Chemikalien, Puffer und Geräte verwendet. Pro Spur wurde 1 μ l der gewonnenen RNA aufgetragen und mittels Ethidiumbromid (1 mg/ml) sichtbar gemacht. Bei intakter RNA verhält sich die Intensität von ribosomaler 28S zu 18S RNA etwa wie 2:1.

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit der RNA wurde die Absorption (A) einer 1:100 verdünnten Lösung bei 260 nm und 280 nm gemessen. Ein Verhältnis $A_{260}:A_{280}$ von weniger als 1,5 deutet auf eine Proteinverunreinigung, von mehr als 2,0 auf eine Phenolverunreinigung hin. Aus A_{260} können die Konzentrationen wie folgt berechnet werden:

$$\text{RNA-Konzentration} = A_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor} [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

3.1.2 Reverse Transkription (RT)

Für die RT von mRNA in cDNA wurden das Enzym MMLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) und alle weiteren Reagenzien von Promega benutzt. Die **Tabelle 3-1** zeigt den Reaktionsansatz für ein Gesamtvolumen von 20 μ l. Zunächst wurde das einer Menge von 200 ng RNA entsprechende Volumen mit DEPC-H₂O auf 11,8 μ l aufgefüllt und anschließend

nach Zugabe von *RQ1 RNase free DNase*, *10× First strand Buffer* und *RNase Block Ribonuclease Inhibitor* ein DNase-Verdau bei 37° C für 20 min durchgeführt. Nach Zugabe von *Oligo dT15* und EDTA wurde die Reaktionslösung für 15 min auf 70° C erhitzt. Daraufhin wurde auf 4° C gekühlt und sofort *10× First strand Buffer*, dNTPs, MMLV-RT und MgCl₂ zugegeben. Die RT erfolgte dann bei 37° C für 60 min. Danach wurde bei 90° C für 5 min denaturiert, auf 4° C gekühlt und die so gewonnene cDNA bei -20° C aufbewahrt oder direkt zur PCR eingesetzt. Als cDNA aus menschlichen Hoden wurde *Multiple Tissue cDNA Panel Testis™* (n=11, Kaukasier, Alter: 10-61 Jahre) von Clontech verwendet.

Tabelle 3-1: Reaktionsansatz für eine Reverse Transkription mit dem Gesamtvolumen 20 µl.

Reagenz	Volumen
RNA in DEPC-H ₂ O	11,8 µl
RQ1 RNase free DNase (1IU/µl)	1 µl
10× First strand Buffer	1 µl
RNase Block Ribonuclease Inhibitor (40 IU/µl)	0,2 µl
EDTA (84 mM)	1 µl
Oligo dT15 (85 µM)	1 µl
10× First strand Buffer	1 µl
dNTPs (25 mM)	1 µl
MMLV-RT (20 IU/µl)	1 µl
MgCl ₂ (180 mM)	1 µl
Gesamtvolumen	20 µl

3.1.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die testikuläre cDNA von Ratten, Mäusen, Hamstern und Menschen wurde mit Hilfe speziesspezifischer Primer für GAD65/67, VGAT/VGAT, GABA_A- und GABA_B-Rezeptoruntereinheiten durch PCR untersucht. Diese Primer wurden anhand publizierter Genbankeinträge der jeweiligen Sequenz erstellt. Einen Überblick über die verwendeten Primer zeigt die **Tabelle 3-2**. Die PCR wurde mit dem Thermocycler *PTC-200* (MJ Research) durchgeführt. Der Reaktionsansatz für eine PCR ist in **Tabelle 3-3** dargestellt, wobei alle Reagenzien von Promega bezogen wurden.

Tabelle 3-2: Die Tabelle zeigt Name, Spezifität und Sequenz der verwendeten PCR-Primer und nested PCR-Primer sowie die Größe der jeweiligen PCR-Produkte.

Name	Genbank #	Spezies	Sequenz (5' → 3')	bp
GAD65	M72422	Ratte	5': CAAGTGAAGCTGAACGGTGT 3': CTTCCAGAAGCTCGAACTAG	422
	NM008078	Maus	5': CTTCTCCGGATGGTCATCTC 3': AGAGGTATTCTAACTTAAGA	445
GAD67	M76177	Ratte, Hamster	5': TGCAGTTCTTACTGGAGGTGG 3': GATGCTGTACATGTTGGATAT	440
	NM008077	Maus	5': CTTCTCCGGATGGTCATCTC 3': ACGAGCAACATGCTATGGTCT	393
	NM000817	Mensch	5': ATTCTTGAAGCCAAACAG 3': TAGCTTTTCCCGTCGTTG	624
VIAAT/VGAT	AF030253	Ratte, Maus	5': CATTGAGGGCATGTTTCGT 3': CTATGATGGACCAGGACT	356
	NM080552	Mensch	5': GTATCTTGTACGTCGTGG 3': GGATGTTGATGACGAAGTGGG	186
GABA _A -α1	L08490	Ratte, Maus	5': CTACAGCAACCAGCTATACCC 3': GCTCTCTGTTTAAATACGTGG	231
	nested L08490	Ratte	5': AACTTAGGCCAGGGTGAC 3': GATTCCAAATAGCAGCGG	169
	NM000806	Mensch	5': AGAGTTATGCATGGGATGG 3': GATCTATTGATGTGGTGTGG	357
GABA _A -α2	L08491	Ratte, Maus, Hamster	5': AAGGCTCCGTCATGATACAG 3': ACTAACCCTAATACAGGC	282
GABA _A -α3	X51991	Ratte	5': ACTTGCTTGGTCATGTTGTTGGG 3': TTTCTTCATCTCCAGGGCCTCTG	418
	NM008067	Maus	5': GACTTGCTTGGTCATGTTGTTGGG 3': CAGAGGCCCTGGAGATGAAGAAGA	418
	NM000808	Mensch	5': GGTTCATAGCCGTCTGTTATGC 3': TTGTAGGTCTTGGTCTCAGTCG	331
GABA _A -β1	NM008069	Maus	5': ATGATGCATCTGCAGCCA 3': TGGAGTTCACGTCAGTCA	540
	NM000812	Mensch	5': AGCAAACAAGACCAGAGTGC 3': AACATTCGGGACCACTTGTC	344
GABA _A -β2	NM000813	Mensch	5': CATTGACATGTACCTGATGG 3': ATCAGTCAAGTCAGGGATGG	424
GABA _A -β3	X15468	Ratte, Maus, Hamster	5': AGCCAAGGCCAAGAATGATCG 3': TGCTTCTGTCTCCCATGTACC	224
GABA _A -γ1	X57514	Ratte	5': TTTCTTACGTGACAGCAATGG 3': CATGGGAATCAGAGTAGATCC	191
	X55272	Maus	5': TTTCTTACGTGACAGCAATGG 3': CATGGGAATGAGAGTGGATCC	191

Name	Genbank #	Spezies	Sequenz (5' → 3')	bp
GABA _A -γ2	L08497	Ratte	5': GCAATGGATCTCTTCGTC 3': GTCCATTTTGGCAATGCG	351
	NM008073	Maus	5': GCAATGGATCTCTTTGTA 3': GTCCATTTTGGCAATGCG	351
	XM003986	Mensch	5': CAGCGATGGATCTCTTTG 3': GTCCATTTTGGCAATGCG	329
GABA _A -γ3	X63324	Ratte, Maus	5': TGTCGAAAGCCAACCATCAGG 3': GACTTGCACTCCTCATAGCAG	251
GABA _B -R1	NM031028	Mensch, Ratte, Maus	5': GTACGTCTGGTTCCTCAT 3': AGATCATCCTTGGTGCTG	519
GABA _B -R2	AF095784	Mensch	5': ACCATCTCAGGAAAGACT 3': CCTTATCATCCTTGGAGG	596
	AJ011318	Ratte, Maus	5': CATCATCTTCTGCAGCAC 3': TCTGTGAAGTTGCCCAAG	354

Tabelle 3-3: Reaktionsansatz für eine PCR mit einem Gesamtvolumen von 50 µl.

Reagenz	Volumen
10× Taq-Buffer	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
dNTPs (2 mM)	5 µl
H ₂ O	33 µl
Primer 5' (50 µM)	1 µl
Primer 3' (50 µM)	1 µl
Template (200 ng cDNA) in H ₂ O	1,5 µl
Taq-Polymerase (20 IU/µl)	0,5 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Zuerst wurde ein Mix aus 5 µl 10× Taq-Buffer, 3 µl 25 mM MgCl₂, 5 µl 2 mM dNTPs und 33 µl H₂O erstellt. Diesem Mix wurde dann jeweils 1 µl 50 µM Primer 5', 1 µl 50 µM Primer 3', sowie 200 ng cDNA als Template in 1,5 µl H₂O zugegeben. Zur Denaturierung des Templates wurde zunächst auf 94° C erhitzt und dann 0,5 µl Taq-Polymerase (20 IU/µl) zugegeben. Anschließend erfolgten 35 Zyklen der folgenden Reaktionsschritte:

- Denaturierung bei 94° C für 30 s
- Annealing der Primer bei 55° C für 30 s
- Elongation bei 72° C für 60 s

Danach wurde eine Temperatur von 4° C konstant gehalten, bis der Ansatz zunächst eingefroren oder sofort elektrophoretisch aufgetrennt wurde.

Bei den Untersuchungen der cDNA, die durch LMD aus Leydigzellen von Rattenhoden gewonnen wurde, wurde eine 2.PCR durchgeführt. Diese wurde als nested PCR zur Erhöhung der Sensitivität mit 30 Zyklen nach dem gleichen Ablauf wie bereits beschrieben durchgeführt. Als Template wurden 5 µl des Reaktionsprodukts der 1.PCR nach Aufreinigung mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* von QIAGEN verwendet. Gemäß dem Arbeitsprotokoll des Herstellers wurde mit Hilfe der mitgelieferten Säule und den Puffern die DNA von Reagenzien und kurzen DNA-Sequenzen gereinigt. Der Reaktionsansatz für die nested PCR ist in **Tabelle 3-4** dargestellt.

Tabelle 3-4: Reaktionsansatz für eine nested PCR mit einem Gesamtvolumen von 50 µl.

Reagenz	Volumen
10× Taq-Buffer	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
dNTPs (2 mM)	5 µl
H ₂ O	29,5 µl
Primer 5` (50 µM)	1 µl
Primer 3` (50 µM)	1 µl
Template (aufgereinigtes Reaktionsprodukt der 1.PCR)	5 µl
Taq-Polymerase (20 IU/µl)	0,5 µ
Gesamtvolumen	50 µl

3.1.4 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Zur Visualisierung des durch PCR amplifizierten Fragments wurde der Ansatz mit DNA-Auftragspuffer versetzt und elektrophoretisch in einem 1% Agarose-Gel (*SeaKemL*, Biozym) mit 1× TBE-Puffer, der auch als Laufpuffer verwendet wurde, aufgetrennt. Die Größe der Fragmente wurde durch Vergleich mit einem 100 bp DNA-Molekulargewichtsmarker (Roche Diagnostics) bestimmt. Die horizontale Elektrophorese (*Sub Cell GT Agarose Gel Electrophoresis System*, Biorad) erfolgte für 30 min bei 100 V. Die durch UV-Licht induzierte Fluoreszenz der mit Ethidiumbromid angereicherten DNA-Banden wurde anschließend mit einem Kamerasystem detektiert und digitalisiert.

3.1.5 cDNA-Array

Um die Signaltransduktion der stimulierten Proliferation von TM3 Zellen zu untersuchen wurde RNA aus TM3 Zellen wie bereits beschrieben isoliert und mit Hilfe eines cDNA-Arrays [37] (*Mouse PathwayFinder-1 GEArray™* Kit, Superarray) mit photochemischer Detektion untersucht. Gemäß den Angaben des Herstellers wurde zuerst eine RT von 5 µg RNA aus stimulierten und nicht stimulierten (Kontrolle) TM3 Zellen mit Biotin gekoppeltem UTP (anstatt TTP) als Nukleotid durchgeführt. Anschließend wurde jeweils eine Membran, die mit DNA-Segmenten von 25 unterschiedlichen Genen beladen ist, mit der cDNA hybridisiert. Die Zusammensetzung des cDNA-Arrays mit 23 Markergenen in Duplikaten für intrazelluläre Signaltransduktionswege und 2 Kontrollgenen ist in **Abbildung 3-1** und in **Tabelle 3-5** dargestellt.

Abbildung 3-1: Schema des cDNA-Arrays Mouse PathwayFinder-1

Anordnung der in **Tabelle 3-5** aufgelisteten Gene des cDNA-Array Mouse PathwayFinder-1 (Promega).

1	1	2	2	3	3	A
4	4	5	5	6	6	A
7	7	8	8	9	9	B
10	10	11	11	12	12	B
13	13	14	14	15	15	C
16	16	17	17	18	18	C
19	19	20	20	21	21	C
22	22	23	23	C	C	C

Tabelle 3-5: Zusammensetzung des Mouse PathwayFinder-1 GEArray Kits (Promega).

#	Genname	Genbank #	Bezeichnung
1	ATF-2	U46026	Activating transcription factor 2
2	Bax	L22472	Bcl2-associated X protein
3	CD5	M15177	Lymphocyte differentiation antigen 5
4	c-fos	V00727	FBJ osteosarcoma oncogene
5	c-jun	J04115	Jun oncogene
6	c-myc	X01023	Myc oncogene
7	CYP19	D00659	Aromatase P450
8	egr-1	M20157	Early growth response 1
9	EI24	U41751	P53 responsive mRNA
10	FasL	U06948	Fas ligand
11	Gadd45	L28177	DNA-damage inducible transcript 1
12	hsf1	X61753	Heat shock factor 1
13	hsp86	J04633	Heat shock protein 86
14	ikB α	U36277	I-kappa B alpha chain
15	IL-2	K02292	Interleukin 2
16	INOS	M92649	Inducible nitric oxid synthase
17	NF κ B	M57999	Nuclear factor of kappa light chain gene Enhancer in B-cells
18	P16 ^{Ink4a}	L76150	CDK4 and CDK6 inhibitor p16 ^{Ink4a}
19	P19	U19597	Cyclin-dependent Kinase inhibitor p19
20	P21 ^{Waf1}	U24173	Cyclin-dependent Kinase inhibitor p21 ^{Waf1}
21	P27 ^{Kip1}	U09968	Cyclin-dependent Kinase inhibitor p27 ^{Kip1}
22	P53	K01700	Transformation related protein 53
23	P57 ^{Kip2}	U22399	Cyclin-dependent Kinase inhibitor p57 ^{Kip2}
A	pUC18	-	Bacterial plasmid
B	β -Actin	M12481	Cytoplasmatic β -Actin
C	GAPDH	M32599	Glyceraldehyd-3-phosphat dehydrogenase

Auf beiden Membranen wurde dann Streptavidin gekoppelte alkalische Phosphatase an die biotinylierte und hybridisierte cDNA gebunden. Durch die Zugabe von *CDP-Star-Reagenz* wurde diese Hybridisierung als photochemische Reaktion auf einem *Hyper Film ECL* (Amersham Life Science) sichtbar gemacht. Nach der Digitalisierung der Messergebnisse (*Scan Maker 4*, Mikrotek) wurde die optische Dichte der Banden mit der Software *Image™ 1.62* (NIMH) gemessen. Als Standard dienten die optischen Dichten der Banden von β -Actin und Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

3.2 Zellbiologie

3.2.1 Zellkultur

Die TM3 Zellen wurden in dem Medium *F12-DME* (pH 7,2; Sigma) plus 5×10^4 IU/l Penicillin (Biochrom), 5×10^4 $\mu\text{g/l}$ Streptomycin (Biochrom), 2,5% FKS (*FCS Gold*, PAA) und 5% PS (Biochrom) bei 37° C und 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert. Für die anschließenden molekularbiologischen Untersuchungen wurden die Zellen auf Kulturschalen (Durchmesser: 35 mm, 60 mm; NUNC) und für die Proliferationsmessungen in 96er Mikrotiterplatten ausgesät. Soweit nicht anders angegeben betrug die Dichte 5×10^4 Zellen pro 60 mm Schale, 3×10^4 Zellen pro 35 mm Schale und 1×10^4 Zellen pro Vertiefung der 96er Mikrotiterplatte. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage erneuert, wobei 3 ml Medium pro 60 mm Schale, 1,5 ml Medium pro 35 mm Schale und 200 μl Medium pro Vertiefung einer 96er Mikrotiterplatte zugegeben wurde. Konfluent wachsende Zellen wurden entweder gemäß oben angegebener Dichte ausgesät oder zu Versuchszwecken behandelt. Zur Aussaat wurden sie 5 min mit 0,5 ml Trypsin/EDTA bei 37° C inkubiert. Daraufhin wurde die Trypsinaktivität mit 4,5 ml *F12-DME*-Medium plus 2,5% FKS und 5% PS gestoppt, die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und ausgesät.

3.2.2 Stimulationsbedingungen

Für molekularbiologische Untersuchungen wurden die TM3 Zellen einen Tag nach der Aussaat in 35 mm oder 60 mm Schalen für einen Tag in Medium mit geringerem Serumgehalt, also *F12-DME* (pH 7,2; Sigma) plus 5×10^4 IU/l Penicillin (Biochrom), 5×10^4 $\mu\text{g/l}$ Streptomycin (Biochrom), 1% FKS (*FCS Gold*, PAA) und 2% PS (Biochrom), bei 37° C und 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert. Dann wurden die Zellen 5, 10, 15 und 30 min in diesem Medium stimuliert. Zur Proteingewinnung wurden die Zellen mit jeweils 5 ml NPE von der Schale gelöst und zunächst bei 1000 rpm 5 min zentrifugiert (*Biofuge fresco*, Heraeus). Nach einem weiteren Waschschrift mit 1 ml NPE und folgender Zentrifugation bei 4° C mit $1,3 \times 10^4$ rpm für 5 min (*Biofuge fresco*, Heraeus) wurde das Zentrifugat in Probenpuffer aufgenommen. Die RNA-Extraktion aus den stimulierten TM3 Zellen ist unter 3.1.1 beschrieben. Zur Proliferationsmessung wurden die TM3 Zellen einzeln in einer 96er Mikrotiterplatte ausgesät, nach dem gleichen Ablauf wie oben beschrieben kultiviert und 24 h in Medium mit geringerem Serumgehalt stimuliert.

Als Stimulationsreagenzien wurden Stocklösungen von GABA (100 mM in H₂O, BIOTREND), des GABA_A-Agonisten Isoguvacinhydrochlorid (100 mM in H₂O, BIOTREND), des GABA_A-Antagonisten Bicucullin (50 mM in Ethanol, BIOTREND), des GABA_B-Agonisten Baclofen (100 mM in 1 mM NaOH, BIOTREND) und des GABA_B-Antagonisten Phaclofen (100 mM in 1 mM NaOH, BIOTREND) in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet.

3.2.3 Proliferationsmessungen

Die Messung der Proliferation von TM3 Zellen nach Stimulation wurde mit einem kolorimetrischen Test durchgeführt (*CellTiter 96TM AQueous One Solution Cell Proliferation Assay*, Promega). Dieser Proliferationsassay basiert auf der Reduktion von MTS (Dimethylthiazolcarboxymethoxyphenylsulfophenyltetrazolium) zu Formazan durch Dehydrogenasen in Abhängigkeit von der Zellzahl. Formazan hat bei 490 nm ein Absorptionsmaximum und kann kolorimetrisch bestimmt werden. Der Assay wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt: Die auf einer 96er Mikrotiterplatte ausgesäten Zellen wurden wie bereits beschrieben 24 h stimuliert. Für jede Messung wurde pro 96er Mikrotiterplatte eine interne Standardmessung mit unterschiedlicher Anzahl an TM3 Zellen durchgeführt, um zu überprüfen, ob die gemessenen Absorptionswerte im linearen Bereich der Absorptionskurve liegen. Hierfür wurden jeweils zwei Reihen mit je 0–2×10⁴ Zellen pro Vertiefung gefüllt. Es wurden 20 µl der MTS-Reagenz pro Vertiefung 60 min vor der Proliferationsmessung zugegeben. Die Absorption wurde in einem *Mikroplate Reader* (DYNEX) bei 490 nm gemessen. Die Messwerte wurden mit der Software *PrismTM* (GraphPad) entweder mit der einseitigen Varianzanalyse ANOVA gefolgt von einem Student-Newmann-Keuls-Test oder mit einem ungepaarten Student's t-Test statistisch analysiert. Die Messwerte wurden in Mittelwerten±Standardfehler angegeben.

3.3 Proteinbiochemie

3.3.1 Antikörper

Alle primären und sekundären spezifischen Antikörper, die im Western Blot und in der Immunhistochemie verwendet wurden, sind in **Tabelle 3-6** aufgeführt.

Tabelle 3-6: Bezeichnung, Herkunft und Konzentrationen aller verwendeten Antikörper.

Bezeichnung	Antikörper	Hersteller	WB	ICH
PCNA	monoklonaler Maus-Ig-G AK	Oncogene™	1:500	-
GABA _A - α 1	polyklonaler Kaninchen-Ig-G AK	Alomone labs	1:500	1:750
GABA _A - α	monoklonaler Maus-Ig-G AK	Roche	1:500	1:1000
GABA _A - β 2/3	monoklonaler Maus-Ig-G AK	Upstate	1:500	1:500
GAD65/67	polyklonaler Kaninchen-Ig-G AK	DPC Biermann	1:500	1:500
VIAAT/VGAT	Kaninchen-Ig-G AK	SySy GmbH	1:500	1:750
Maus-Ig-G	POX konjugierter 2.AK Pferd-Ig-G	Vector	1:5000	-
Maus-Ig-G	Biotin konjugierter 2.AK Ziege-Ig-G	Jackson Inc.	-	1:500
Kaninchen-Ig-G	POX konjugierter 2.AK Ziege-Ig-G	Jackson Inc.	1:5000	-
Kaninchen-Ig-G	Biotin konjugierter 2.AK Ziege-Ig-G	Jackson Inc.	-	1:500

3.3.2 SDS-PAGE und Western Blotting

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen wurden die mit Probenpuffer versetzten Zell- bzw. Gewebelysate zunächst durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit 1% Bromphenolblau versetzt sowie durch 10% β -Mercaptoethanol und Kochen bei 95° C für 5 min denaturiert. Durch Zugabe von SDS 10% wurden die Proteinproben negativ geladen. Es wurden 10 cm breite und 7 cm hohe Gele mit einer Dicke von 0,75 mm gegossen (*Mini-Protean*, BIORAD). Das Trenngel enthielt 12,5% Acrylamid und wurde mit einem Sammelgel mit 4% Acrylamid überschichtet. Zur Größenbestimmung der Proteine diente der Molekulargewichtsmarker *LMW* (14,4–94 kDa) von Pharmazia. Die Elektrophorese erfolgte im Elektrophoresepuffer bei 180 V für 60 min.

Im Western Blot Verfahren wurden nun die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine immunologisch nachgewiesen. Dazu wurden die Proteine in einer *Mini Trans-Blot* Kammer (BIORAD) bei 100 V für 60 min im Transferpuffer von dem SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell) übertragen. Nach dem Anfärben der Membran mit Ponceau-S-Lösung zum Sichtbarmachen des Molekulargewichtsmarkers und der Transferbanden wurde die Membran 60 min in 5% Milchpuffer/TBS-Tween blockiert. Die Inkubation mit dem jeweiligen spezifischen Antikörper in 0,5% Milchpulver/TBS-Tween erfolgte über Nacht bei 4° C. Es folgten 3 Waschschrte für 5 min in TBS-Tween und dann die Inkubation mit dem sekundären Peroxidase (POX) gekoppelten Antikörper in 0,5% Milchpulver/TBS-Tween für 60 min. Nach 3 weiteren Waschschrten mit TBS-Tween für 5 min wurde die immunologische Reaktion mit Hilfe von *ECL-Reagenz*

(Amersham Life Science) als photochemische Reaktion auf einem *Hyper Film ECL* (Amersham Life Science) sichtbar gemacht. Die Filme wurden digitalisiert (*Scan Maker 4*, Mikrotek) und die optische Dichte der Banden mit der Software *Image™ 1.62* (NIMH) gemessen. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen ungepaarten Students's t-Test, die erhaltenen Messwerte wurden in Mittelwerten \pm Standardfehler angegeben.

3.3.3 GAD-Assay

Um die Aktivität von GAD in TM3 Zellen und in frisch lysiertem testikulären Gewebe zu messen wurden die Proben mittels eines enzymatischen Assays [58] untersucht. Bei dieser Methode wird radioaktiv markiertes Glutamat als Substrat mit der zu untersuchenden Probe versetzt, das durch GAD abgespaltene radioaktive CO₂ an einem Filter absorbiert und dessen radioaktiver Zerfall im Szintillationszähler gemessen. Zuerst wurden dabei die TM3 Zellen bzw. die frisch gewonnen Hodengewebeproben im Homogenisationspuffer lysiert und mittels Ultraschall im *Ultra-Turrax T-25* (IKA Labortechnik) homogenisiert. Anschließend wurde 2 min bei 5000 rpm in der Mikrozentrifuge *Biofuge fresco* (Heraeus) abzentrifugiert und der Überstand als Probe im GAD-Assay und in der Proteinbestimmung eingesetzt. Als positive Kontrolle wurde Kleinhirngewebe von Ratten benutzt. Erhitzte Proteinproben (5 min, 95° C) aus Rattenhoden und Rattenkleinhirn dienten als negative Kontrollen.

Die enzymatische Reaktion fand in einem 50 ml Reaktionsgefäß statt, durch dessen Verschlussdeckel eine Injektionsnadel G21 gesteckt wurde. An der Spitze der Nadel wurde ein mit 12,5 µl 1 M Benzethoniumhydroxid getränkter Filter (Schleicher & Schuell) befestigt, der das frei gesetzte CO₂ absorbierte. Nach der Vorbereitung des Filters wurde dieser nun 30 min getrocknet. Während der Trockenzeit des Filters wurden dann 2 µl L-1-¹⁴C-Glutamat (0,1 mCi/ml, NEN™ Life Science Products) mit 2,3 µl 0,1 M KOH und 5,7 µl H₂O neutralisiert. Diesem neutralisierten L-1-¹⁴C-Glutamat wurden anschließend 30 µl der Inkubationslösung und 20 µl Probe zugegeben. Die Zusammensetzung der Inkubationslösung für den GAD-Assay wird in **Tabelle 3-7** gezeigt.

Tabelle 3-7: Zusammensetzung der Inkubationslösung für den GAD-Assay.

Reagenz	Volumen
EDTA (0,5 M)	20 μ l
Triton X-100	500 μ l
DTT (1 M)	10 μ l
L-Glutamat (40 mM)	22500 μ l
K ₂ PO ₄ (60 mM)	26970 μ l
PLP (8,1 mM)	625 μ l
Gesamtvolumen	50625 μl

Die Reaktionslösung wurde für 60 min bei 37° C inkubiert. Daraufhin wurde die Reaktion mit 100 μ l TCA 10%, die durch die Injektionsnadel in das Reaktionsgefäß gespritzt wurde, gestoppt und noch einmal für 60 min bei 37° C inkubiert. Jetzt wurde der Filter mit 10 ml *Ultima Gold™* LSC Puffer (Packard) versetzt und anschließend der jeweilige radioaktive Zerfall in einem Szintillationszähler (*Tri Carb™* Liquid Szintillation Analyzer, Packard) gemessen. Der gesamte Reaktionsansatz für den GAD-Assay ist in der **Tabelle 3-8** dargestellt.

Tabelle 3-8: Reaktionsansatz für einen GAD-Assay mit einem Gesamtvolumen von 60 μ l.

Reagenz	Volumen
Inkubationslösung	30 μ l
L-1- ¹⁴ C-Glutamat (0,1 mCi/ml)	2 μ l
KOH (0,1 M)	2,3 μ l
H ₂ O	5,7 μ l
Probe	20 μ l
Gesamtvolumen	60 μl

Die erhaltenen Messwerte wurden mit der Software *Prism™* (GraphPad) entweder mit der einseitigen Varianzanalyse ANOVA gefolgt von einem Student-Newmann-Keuls-Test oder mit einem ungepaarten Student's t-Test statistisch analysiert. Die Messwerte wurden in Mittelwerten \pm Standardfehler angegeben.

3.3.4 Proteinbestimmung

Sowohl bei den im GAD-Assay, als auch bei den im Western Blot eingesetzten Proben wurde der Proteingehalt mittels Bicinchoninsäurereaktion (*protein assay reagent*, Pierce) ermittelt. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte durch

Absorptionsmessung eines Bicinchoninsäure-Kupfer-Komplexes bei 562 nm. Zur Erstellung der Eichgeraden wurden Albumin-Lösungen von 0-20 mg/ml in 1× Probenpuffer verwendet. Die photometrische Messung erfolgte mit dem Spektrophotometer *DU 640* (Beckman).

Für den GAD-Assay wurde anschließend die gesamte Proteinmenge einer Probe durch Multiplikation des Konzentrationswertes mit dem Volumen des Probenpuffers ermittelt, um daraufhin die gemessene Radioaktivität auf die Proteinmenge (cpm/μg Protein) beziehen zu können.

3.4 Immunhistochemie

Von dem bereits in Paraffin eingebetteten Hodengewebe wurden 5 μm dicke Schnitte auf Objektträger aufgezogen und 2 h bei 37° C getrocknet. Anschließend wurde die immunhistochemische Färbung der Schnitte nach einer Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode [71,73] in folgenden Arbeitsschritten durchgeführt:

- Entparaffinisierung:
 - Xylol 5 min (2×)
 - 100% Isopropanol 4 min (2×)
 - 90% Isopropanol 3 min (2×)
 - 80% Isopropanol 3 min (2×)
 - 70% Isopropanol 3 min (1×)
 - H₂O 5 min
- Inkubation für 5-10 min in 0,01% Trypsin/0,1% CaCl₂ (pH 7,8) bei 37° C
- 3× 5 min waschen mit 10 mM PBS (pH 7,4)
- Blockierung der endogenen Peroxidase mit 0,06% H₂O₂ in PBS für 30 min bei R.T.
- 3× 5 min waschen mit PBS
- Blockierung mit 5% Normalserum (Spezies wie 2.Antikörper) in PBS für 30 min
- Normalserum abgießen
- Inkubation mit 1.Antikörper über Nacht bei 4° C
- 3× 5 min waschen mit PBS
- Inkubation mit 2.Antikörper für 2 h bei R.T. unter schütteln
- 3× 5 min waschen mit PBS
- Tris-HCl für 10 min
- Tris-HCl/DAB (Diaminobenzidin) mit H₂O₂ für 5-10 min bei R.T.

- 10 min waschen mit Tris-HCl
- 3× 5 min waschen mit PBS
- Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 10-15 s (fakultativ)
- Bläuen unter fließendem Wasser für 3 min, abspülen mit H₂O
- Eindecken mit EntellanTM (Merck)

Es wurden bei allen immunhistochemischen Untersuchungen zwei Kontrollen durchgeführt. Bei einer Kontrolle wurde der 1.Antikörper durch PBS ersetzt, bei der anderen Kontrolle durch Normalserum (Sigma) der Spezies (Maus, Kaninchen), in der der 1.Antikörper hergestellt wurde.

3.5 Lasermikrodisektion (LMD)

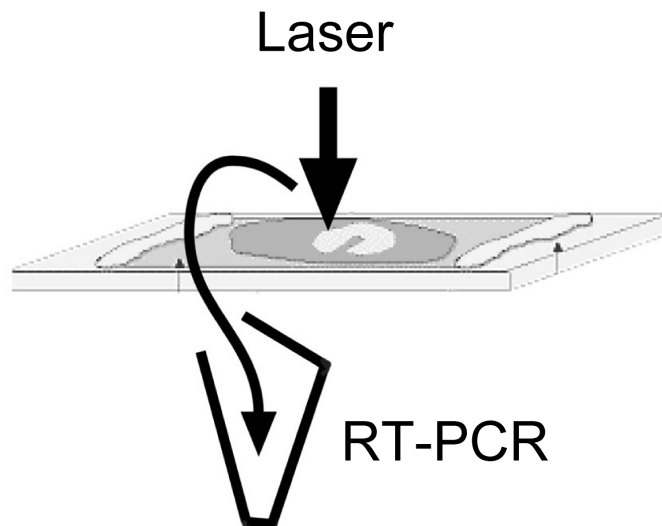
Aus Gewebeschnitten von Rattenhoden wurden durch LMD [38,42,44] Leydigzellen herausgeschnitten, um sie anschließend durch RT-PCR selektiv untersuchen zu können. Zuerst wurden 5-10 µm breite Gewebeschnitte aus in Paraffin eingebetteten Rattenhoden angefertigt. Dann wurde eine 1,35 µm dünne Polyethylen-Naphthalen-Membran mit Hilfe von 100% Isopropanol faltenfrei auf eine Glasplatte aufgebracht und mit Nagellack an den Rändern fixiert. Die Glasplatte wurde getrocknet und 30 min mit UV-Licht bestrahlt, bevor die Gewebeschnitte auf die Polyethylen-Naphthalen-Membran aufgetragen wurden. Daraufhin wurden die Gewebeschnitte wie folgt entparaffinisiert:

- Xylol 5 min (2×)
- 100% Isopropanol 4 min (2×)
- 90% Isopropanol 3 min (2×)
- 80% Isopropanol 3 min (2×)
- 70% Isopropanol 3 min (1×)
- H₂O 5 min

Anschließend wurden sie mit Hämatoxylin 1 min gefärbt, mit H₂O gewaschen und getrocknet. Als Laserquelle wurde für die LMD der *Robot-MicroBeam* (P.A.L.M. GmbH Mikrolaser Technologie) verwendet. Der Ablauf der LMD ist in **Abbildung 3-2** dargestellt.

Abbildung 3-2: Technik der Lasermikrodissektion (LMD)

Die Abbildung zeigt den Ablauf der LMD von Leydigzellen aus testikulären Gewebeschnitten der Ratte. Zuerst werden die Zellen mit dem Laser ausgeschnitten, anschließend katapultiert man diese durch die um 40% erhöhte Laserenergie in ein RT-PCR-Gefäß.



Durch die hohe Lichtenergie des Stickstofflasers wurden gezielt Leydigzellen aus den Gewebeschnitten isoliert. Der Laser wurde dann auf die Mitte der ausgeschnittenen Zellgruppe fokussiert, die Energie um 40% erhöht und schließlich die Zellgruppe mit einem einzelnen Laserschuss in ein RT-PCR-Reagenzgefäß katapultiert. Nach dem Katapultieren der ausgeschnittenen Zellgruppe entsteht auf dem Gewebeschnitt eine Lücke, die frei von biologischem Material ist. Zur Kontrolle der Spezifität wurden in den jeweils folgenden Gewebeschnitten die entsprechenden Leydigzellen gezielt durch Laserschüsse zerstört und dann ebenfalls ausgeschnitten und herauskatapultiert, um diese Proben als Negativkontrolle zu verwenden. Alle durch LMD gewonnenen Proben wurden mit 50 μ l *RNA stabilization reagent* (*RNEasy Protect Mini-kit*, QIAGEN) versetzt und bei -80° C bis zur RT-PCR aufbewahrt.

3.6 Datenbank und Sequenzierung

Als Datenbank für DNA-Sequenzen wurde die Genbank des National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/Nucleotide) verwendet. Aufgrund der jeweiligen Einträge dieser Datenbank wurden alle Primer mit Hilfe der Software *EditSeq*TM und *MegAlign*TM (DNASTAR) erstellt. Alle PCR-Ergebnisse

wurden durch Sequenzierungen verifiziert. Dazu wurden die PCR-Produkte zuerst mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* von QIAGEN aufgereinigt, indem gemäß des Arbeitsprotokoll des Herstellers mit Hilfe der mitgelieferten Säule und den Puffern die DNA von Reagenzien und kurzen DNA-Sequenzen getrennt wurde. Anschließend wurden die aufgereinigten PCR-Produkte mit den Originalprimern von einem kommerziellen Dienst (AGOWA) direkt sequenziert und ihre Übereinstimmung mit der jeweiligen Sequenz der Genbank verifiziert (*MegAlign™*, DNASTAR).

4 Ergebnisse

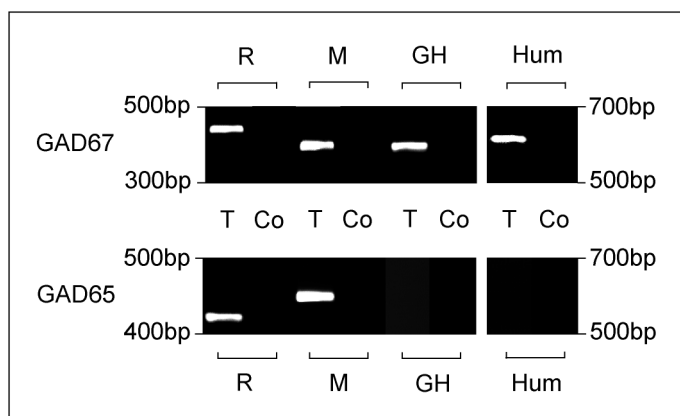
4.1 Synthese und Speicherung von GABA im Hoden

4.1.1 Unterschiedliche Expression der Gene GAD65/67 und VIAAT/VGAT im Hoden

Zuerst wurde die Verteilung der GABA synthetisierenden Enzyme GAD65 und GAD67 im testikulären Gewebe von Mensch, Ratte, Maus und Hamster anhand von RT-PCR untersucht. Im Hoden von Maus und Ratte konnten GAD65 und GAD67 mit RT-PCR und anschließender Sequenzierung nachgewiesen werden. Im menschlichen Hoden hingegen wurde nur GAD67 gefunden und durch Sequenzierung bestätigt. Da die Sequenzen von beiden GAD-Isoformen für den Hamster nicht bekannt waren, wurden die Untersuchungen im Hamsterhoden mit Primern durchgeführt, die anhand von Ratten- und Mäusesequenzen erstellt wurden. Mit diesen Primern konnten im Hamsterhoden Teilsequenzen nachgewiesen werden, die mit GAD67 der Ratte identisch sind (Sequenzinformation deponiert unter Genbank accession number M76177, Position 690–721). GAD65 wurde im Hamsterhoden mit den verwendeten Primern nicht gefunden. Die **Abbildung 4-1** zeigt einen Überblick über die RT-PCR-Ergebnisse bezüglich der Verteilung von GAD65/67.

Abbildung 4-1: RT-PCR Analyse von GAD65/67 im Hoden

Die Abbildung zeigt einen Überblick über RT-PCR-Untersuchungen von GAD im Hoden (**T**=Testis, **Co**=Kontrolle) von Ratten (**R**), Mäusen (**M**), Hamstern (**GH**) und Menschen (**Hum**). Die Isoform GAD67 ist in allen vier Spezies im Hoden exprimiert, während die Isoform GAD65 nur im Hoden der Ratte und der Maus, nicht jedoch beim Hamster und beim Menschen gefunden wurde.



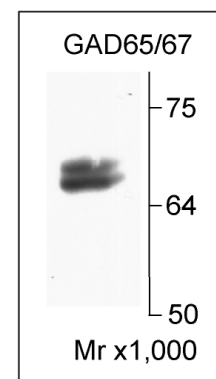
Ein weiterer wichtiger Bestandteil eines GABA produzierenden Gewebes ist der GABA-Transporter VIAAT/VGAT, der ebenfalls mit RT-PCR im Hoden von Mensch, Ratte und Maus nachgewiesen werden konnte und durch Sequenzierung bestätigt wurde. Mit den verwendeten Primern, die anhand von Ratten- und Mäusesequenzen erstellt wurden, wurde VIAAT/VGAT jedoch nicht im Hamsterhoden gefunden.

4.1.2 Nachweis der Proteine GAD65 und GAD67 im Rattenhoden

Um zu zeigen, dass der Hoden nicht nur mRNA für GAD65 oder GAD67 exprimiert, sondern diese Enzyme vielmehr in translaterter Form als Proteine im Hoden vorliegen, wurde Hodengewebe mit Western Blot Technik untersucht. Die Proteine aus Hodengewebe von Ratte und Maus wurden aufgetrennt und anschließend mit einem Antikörper, der beide GAD-Isoformen (GAD65/67) gleichermaßen erkennt, behandelt. In beiden Fällen zeigte sich eine deutlich immungefärbte Doppelbande bei 65 bzw. 67 kDa. Die **Abbildung 4-2** zeigt diese Doppelbande in einem Western Blot von Rattenhodengewebe.

Abbildung 4-2: Western Blot von GAD65/67 im Rattenhoden

15 μ g Protein aus Rattenhoden wurde mit Hilfe von SDS-Page aufgetrennt und anschließend in Western Blot Technik mit einem Antikörper gegen beide GAD-Isoformen (**GAD65/67**) behandelt. Man erkennt eine Doppelbande für GAD65/67.



4.1.3 Nachweis der enzymatischen Aktivität von GAD

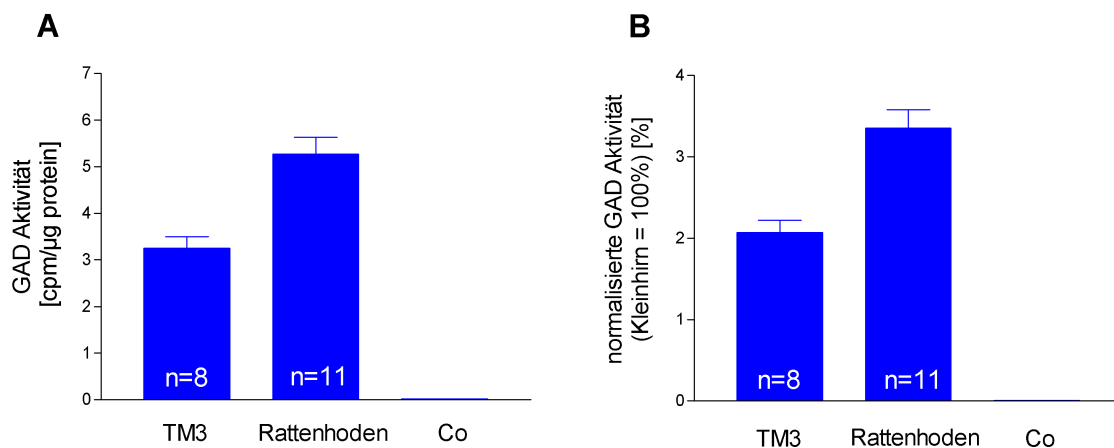
4.1.3.1 Funktionelles GAD im Rattenhoden und in TM3 Zellen

Nachdem die Präsenz von GAD im Hoden auf mRNA-Ebene (Ratte, Maus, Hamster, Mensch) und auf Proteinebene (Ratte, Maus) gezeigt wurde, sollte nun ein Funktionalitätsnachweis für GAD erbracht werden. Die physiologische Funktion von GAD liegt in der Umwandlung von Glutamat in GABA. Um diese im Rattenhoden nachzuweisen wurde ein radioaktiver GAD-Assay mit Gewebelysaten aus Rattenhoden durchgeführt. Außerdem wurde mit dieser

Methode auch die GAD-Aktivität von TM3 Zellen untersucht. Die der GAD-Aktivität proportionale, im GAD-Assay gemessene Radioaktivität wurde in Beziehung zur Proteinmenge der Proben gesetzt. Dabei zeigte sich (siehe **Abbildung 4-3 A**) im Rattenhoden (n=11) eine GAD-Aktivität von $5,27 \pm 0,36$ cpm/ μ g und in TM3 Zellen (n=8) eine GAD-Aktivität von $3,25 \pm 0,24$ cpm/ μ g. Als negative Kontrollen (n=3) wurden Gewebelysate von Rattenhoden für 5 min auf 95° C erhitzt. Diese zeigten eine GAD-Aktivität die mit $0,01 \pm 0,00$ cpm/ μ g knapp über der gemessenen Hintergrundaktivität lag.

Abbildung 4-3: GAD-Aktivität im Rattenhoden und in TM3 Zellen

Die **Abbildung A** stellt die absolut gemessenen GAD-Aktivitäten [cpm/ μ g] dar, während die **Abbildung B** die auf die GAD-Aktivität im Kleinhirn normalisierten Werte angibt. Die GAD-Aktivität im Rattenhoden beträgt $3,35 \pm 0,23\%$, die Aktivität von TM3 Zellen entspricht $2,07 \pm 0,15\%$ der GAD-Aktivität im Kleinhirn (**B**). Die Balken drücken Mittelwerte+Standardfehler aus. Als Kontrollen (Co) dienen für 5 min auf 95° C erhitzte Rattenhodenproben (n=3).



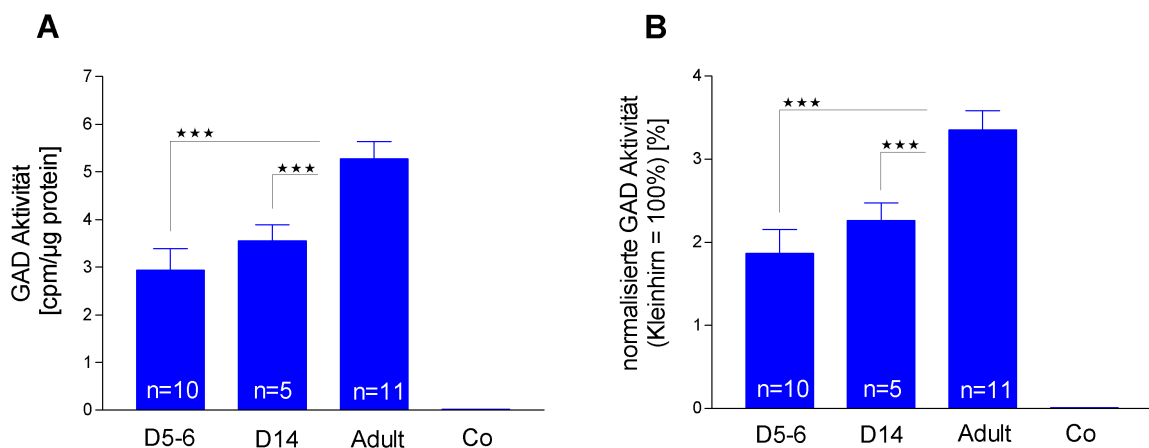
Als positive Kontrolle wurden Gewebelysate von Rattenkleinhirnen (n=3) untersucht. Die gemessenen GAD-Aktivitäten im Rattenhoden und in TM3 Zellen wurden anhand der Positivkontrolle (100%) normalisiert. Die GAD-Aktivität im Rattenhoden (n=11) beträgt $3,35 \pm 0,23\%$, die GAD-Aktivität in TM3 Zellen (n=8) $2,07 \pm 0,15\%$ der GAD-Aktivität im Rattenkleinhirn (siehe **Abbildung 4-3 B**). Im Rattenhoden ist demnach funktionelles GAD vorhanden. Aufgrund der ebenfalls nachgewiesenen GAD-Aktivität in TM3 Zellen kommen Leydigzellen als intratestikuläre GABA-Quelle in Frage.

4.1.3.2 Vergleich der testikulären GAD-Aktivität von jungen und alten Ratten

Um weitere Einflussfaktoren auf die GAD-Aktivität und damit auf die testikuläre GABA-Synthese zu erhalten wurden mit Hilfe des GAD-Assays auch Hodengewebelysate von Ratten unterschiedlicher Entwicklungsstadien untersucht. Dazu wurden drei Gruppen unterschiedlich alter männlicher Ratten verglichen. Eine Gruppe setzte sich aus 5-6 Tage alten Ratten (frühe postnatale Entwicklungsphase, n=10), eine weitere aus 14 Tage alten Ratten (späte präpubertäre Entwicklungsphase, n=5) und die dritte aus fertilen, erwachsenen Ratten (n=11) zusammen. Dabei zeigte sich ein Anstieg der GAD-Aktivität (siehe **Abbildung 4-4 A**) von $2,94 \pm 0,45$ cpm/ μ g bei den jüngsten Ratten über $3,55 \pm 0,33$ cpm/ μ g bei 14 Tage alten Ratten auf $5,27 \pm 0,36$ cpm/ μ g bei erwachsenen Ratten.

Abbildung 4-4: GAD-Aktivität im Rattenhoden in unterschiedlichen Entwicklungsphasen

Die Abbildungen stellen die Ergebnisse der GAD-Assays bei 5-6 Tage alten (**D5-6**), 14 Tage alten (**D14**) und erwachsenen Ratten (**Adult**) dar. **Abbildung A** zeigt, dass die absolute GAD-Aktivität des erwachsenen Rattenhodens signifikant ($p < 0,0001 = ***$, ANOVA+Newmann-Keuls-Test) über der testikulären GAD-Aktivität der jüngeren Ratten liegt. **Abbildung B** zeigt, dass sich auch die an der GAD-Aktivität des Kleinhirns genormten Aktivitäten im Hoden der jungen Ratten (**D5-6**: $1,87 \pm 0,29\%$, **D14**: $2,26 \pm 0,21\%$) signifikant ($p < 0,0001 = ***$, ANOVA+Newmann-Keuls-Test) von denen erwachsener Ratten (**Adult**: $3,35 \pm 0,23\%$) unterscheiden. Die Säulen drücken Mittelwerte+Standardfehler aus. Als Kontrollen (**Co**) dienten für 5 min auf 95° C erhitzte Rattenhodenproben (n=3).



Dabei war die GAD-Aktivität der erwachsenen Ratten sowohl gegenüber den 5-6 Tage alten Ratten, als auch gegenüber den 14 Tage alten Ratten signifikant höher. Die **Abbildung 4-4 B** zeigt die auf die GAD-Aktivität von Rattenkleinhirn (n=3) normalisierten Messwerte. Die testikuläre GAD-Aktivität steigt von

1,87±0,29% bei 5-6 Tage alten Ratten (n=10) über 2,26±0,21% bei 14 Tage alten Ratten (n=5) auf 3,35±0,23% bei erwachsenen Ratten (n=11) der GAD-Aktivität im Rattenkleinhirn (100%) an. Dabei war die prozentuale GAD-Aktivität der erwachsenen Ratten sowohl gegenüber den 5-6 Tage alten Ratten, als auch gegenüber den 14 Tage alten Ratten signifikant höher.

4.2 Identifikation von GABA-Rezeptoruntereinheiten im Hoden

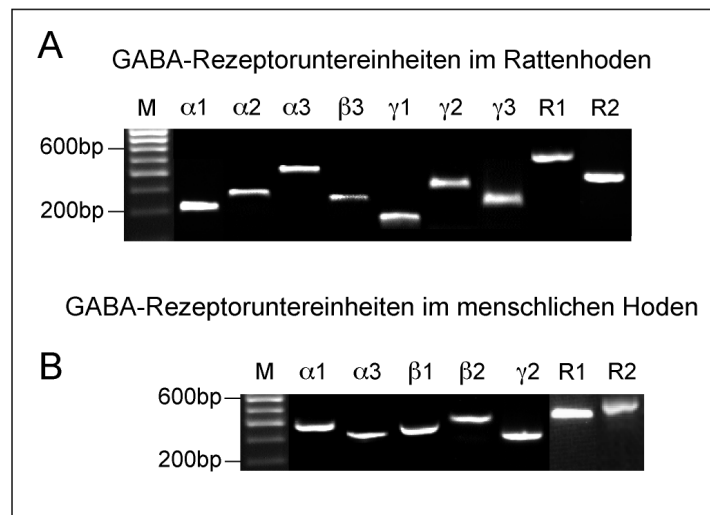
4.2.1 RT-PCR Analyse von testikulären GABA-Rezeptoruntereinheiten

Die Anwesenheit von funktionellem GAD im Hoden wirft die Frage auf, ob im Hoden auch GABA-Rezeptoren vorhanden sind. Dazu wurden Hoden von Ratte, Maus, Hamster und Mensch mit Hilfe von RT-PCR auf GABA-Rezeptoruntereinheiten untersucht. Für alle vier genannten Spezies wurden dabei spezifische Primer für die GABA_A-Rezeptoruntereinheiten α 1-3, β 1-3, γ 1-3 und für die GABA_B-Rezeptoruntereinheiten R1 und R2 verwendet. Alle RT-PCR-Resultate wurden dabei durch Sequenzierung und Vergleich mit der jeweiligen Datenbanksequenz bestätigt, soweit nicht anders erwähnt. Die **Abbildung 4-5** zeigt Details dieser Ergebnisse im menschlichen Hoden und im Rattenhoden. Im Rattenhoden wurden die GABA_A-Rezeptoruntereinheiten α 1-3, β 3, γ 1-3 und die GABA_B-Rezeptoruntereinheiten R1 und R2 mit RT-PCR nachgewiesen. Die übrigen untersuchten GABA-Rezeptoruntereinheiten konnten im Rattenhoden nicht gefunden werden.

Im humanen Hoden fanden sich die GABA_A-Rezeptoruntereinheiten α 1, α 3, β 1-2 und γ 2, sowie die GABA_B-Rezeptoruntereinheiten R1 und R2. Bei der Maus zeigte sich wiederum ein anderes Expressionsmuster der GABA-Rezeptoruntereinheiten im testikulären Gewebe. Die RT-PCR ergab hier, dass die GABA_A-Rezeptoruntereinheiten α 1-3, β 1, β 3, γ 1, γ 3 und die GABA_B-Rezeptoruntereinheiten R1 und R2 im Mäusehoden vorhanden sind. Zur Untersuchung im Hamsterhoden mussten Primer benutzt werden, die anhand von bekannten Gensequenzen von Ratte oder Maus erstellt wurden, da die Gensequenzen der GABA-Rezeptoruntereinheiten beim Hamster unbekannt sind. Dies hatte zur Folge, dass negative Resultate beim Hamster entweder aufgrund speziesspezifischer Sequenzunterschiede, die zu unpassenden Primer führen, zustande kommen können, oder durch eine fehlende Expression der gesuchten Gensequenz.

Abbildung 4-5: RT-PCR Analyse testikulärer GABA-Rezeptoren bei Mensch und Ratte

Die Abbildungen **A** und **B** zeigen Zusammenfassungen der RT-PCR Ergebnisse in Bezug auf das Vorkommen der GABA-Rezeptoruntereinheiten im Rattenhoden und im menschlichen Hoden. Im Rattenhoden (**A**) sind die GABA_A-Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$ (231 bp), $\alpha 2$ (282 bp), $\alpha 3$ (418 bp), $\beta 3$ (224 bp), $\gamma 1$ (191 bp), $\gamma 2$ (351 bp), $\gamma 3$ (251 bp) und die GABA_B-Rezeptoruntereinheiten **R1** (519 bp) und **R2** (354 bp) exprimiert. Menschlicher Hoden (**B**) besitzt dagegen die GABA_A-Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$ (357 bp), $\alpha 3$ (331 bp), $\beta 1$ (344 bp), $\beta 2$ (424 bp) und $\gamma 2$ (329 bp), sowie die GABA_B-Rezeptoruntereinheiten **R1** (519 bp) und **R2** (596 bp).



Unter diesen eingeschränkten Bedingungen konnten im Hamsterhoden dennoch die GABA_A-Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$ -3, $\beta 1$, $\beta 3$, $\gamma 3$ und die GABA_B-Rezeptoruntereinheit R1 durch RT-PCR gefunden werden.

Allerdings wurden nur GABA_A- $\alpha 2$ und GABA_A- $\alpha 3$ durch mehrfache Sequenzierungen bestätigt. Dabei weist die erhaltene Sequenz für GABA_A- $\alpha 3$ vollständige Übereinstimmung mit der Gensequenz der Ratte für GABA_A- $\alpha 3$ auf. Die beim Hamster gefundene Teilsequenz für GABA_A- $\alpha 2$ (Genbank #AF533532) hingegen stellt eine neue Sequenzinformation dar, die 97% Homologie zur Ratte, 95% Homologie zur Maus und 85% Homologie zum Menschen aufweist. Für die anderen im Hamsterhoden gefundenen GABA-Rezeptoruntereinheiten konnten keine eindeutigen Sequenzinformationen aufgrund multipler Mischsequenzen ermittelt werden. Die **Tabelle 4-1** zeigt eine Zusammenfassung der RT-PCR-Ergebnisse für die GABA-Rezeptoruntereinheiten im Hoden aller vier untersuchten Spezies.

Tabelle 4-1: Übersicht über das Vorkommen der GABA_A- und GABA_B-Rezeptoruntereinheiten im Hoden von Ratte, Maus, Hamster und Mensch anhand der Ergebnisse der RT-PCR Untersuchungen. In allen vier Spezies wurde nach den GABA_A-Rezeptoruntereinheiten α 1-3, β 1-3 und γ 1-3, sowie nach den GABA_B-Rezeptoruntereinheiten R1 und R2 gesucht.

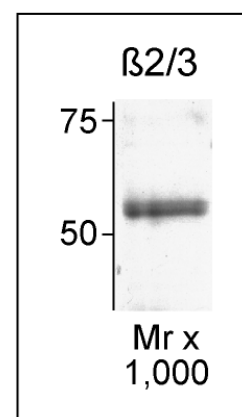
Bezeichnung	Ratte	Maus	Hamster	Mensch
GABA _A - α 1	+	+	+	+
GABA _A - α 2	+	+	+	-
GABA _A - α 3	+	+	+	+
GABA _A - β 1	-	+	+	+
GABA _A - β 2	-	-	-	+
GABA _A - β 3	+	+	+	-
GABA _A - γ 1	+	+	-	-
GABA _A - γ 2	+		-	+
GABA _A - γ 3	+	+	+	-
GABA _B -R1	+	+	+	+
GABA _B -R2	+	+	-	+

4.2.2 Nachweis von GABA_A-Rezeptoruntereinheiten im Rattenhoden auf Proteinebene

Um exemplarisch nachzuweisen, dass die im Hoden exprimierten GABA-Rezeptoruntereinheiten auch auf Proteinebene vorliegen, wurde Rattenhodengewebe mit Hilfe von Western Blot Technik mit einem Antikörper gegen GABA_A- β 2/3 untersucht. Hierbei zeigte sich, dass im Hoden der Ratte beide GABA_A-Rezeptoruntereinheiten als Proteine vorhanden sind. Diese stellten sich im Western Blot als Doppelbande bei der erwarteten Molekülgröße von 55 kDa für GABA_A- β 2 und 57 kDa für GABA_A- β 3 dar (siehe **Abbildung 4-6**).

Abbildung 4-6: Western Blot von GABA_A- β 2/3 im Rattenhoden

15 μ g Protein aus Rattenhoden wurde mit Hilfe von SDS-Page aufgetrennt und anschließend in Western Blot Technik mit einem Antikörper gegen die GABA_A-Rezeptoruntereinheiten β 2 und β 3 behandelt. Man erkennt eine Doppelbande bei 55 kDa (β 2) bzw. bei 57 kDa (β 3).



4.3 Lokalisation des GABAergen Systems im Hoden

4.3.1 Immunhistochemische Untersuchungen (IHC)

Die Ergebnisse der GAD-Assays ergaben erste Hinweise darauf, dass die testikuläre GABA-Synthese in Leydigzellen stattfindet. Zur genaueren Analyse der Lokalisation von GAD und VIAAT/VGAT wurden Hodengewebeschnitte von Ratten, Mäusen und Hamstern immunhistochemisch untersucht. Ebenfalls mit immunhistochemischen Methoden wurde im Hoden von Ratten und Menschen die Lokalisation der GABA-Rezeptoren analysiert.

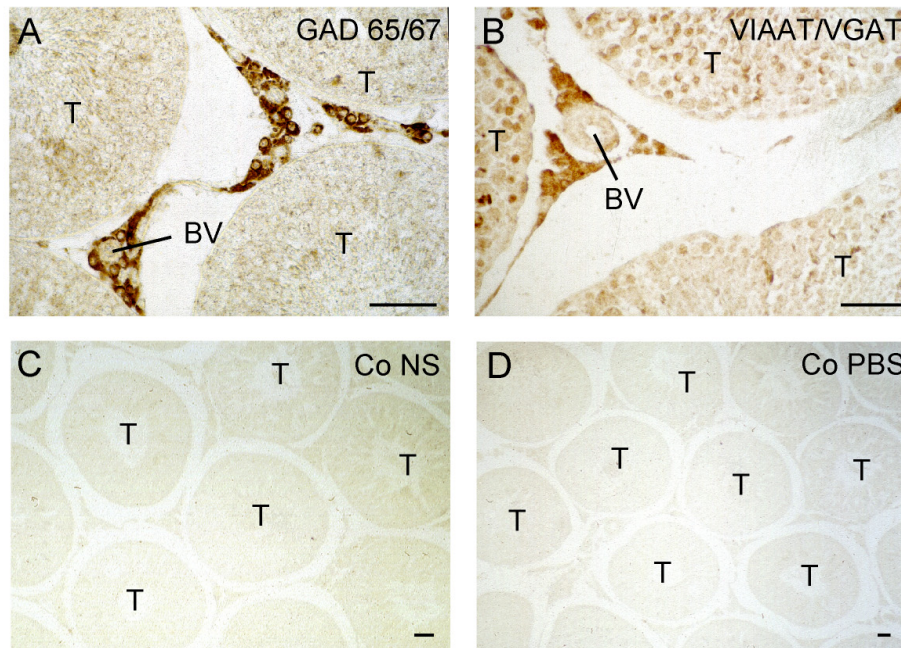
4.3.1.1 Zelluläre Lokalisation von GAD65/67 und VIAAT/VGAT im Hoden

Um die zelluläre Lokalisation von GAD und VIAAT/VGAT zu untersuchen wurde in der Immunhistochemie ein Antikörper gegen VIAAT/VGAT und ein Antikörper gegen beide GAD-Isoformen, GAD65 und GAD67, verwendet. Dabei färbten sich sowohl für GAD65/67, als auch für VIAAT/VGAT Zellen im interstitiellen Kompartiment des Hodens an. Diese Färbung trat bei allen vier Spezies auf.

Die **Abbildung 4-7** stellt die immunhistochemischen Ergebnisse im Rattenhoden dar, wo die Immunfärbungen am stärksten waren. Bei den Zellen, die sich im Interstitium anfärbten, handelt es sich histologisch um Leydigzellen, die sich deutlich von ungefärbten Gefäßen abgrenzen lassen (siehe **Abbildung 4-7 B**). Gelegentlich reagierten auch Zellkernbestandteile des tubulären Kompartiments immunpositiv. Diese Färbungen stellen jedoch wahrscheinlich unspezifische Reaktionen dar, da es sich bei GAD und VIAAT/VGAT um nicht-nukleäre Proteine handelt. Sowohl in den Kontrollen mit Normalserum, als auch in den Kontrollen mit PBS zeigten sich keine Färbungen (siehe **Abbildung 4-7 C, D**). Ebenso wie der GAD-Aktivitätsnachweis in TM3 Zellen, deuten diese immunhistochemischen Erkenntnisse daraufhin, dass GAD und VIAAT/VGAT in Leydigzellen vorkommen und diese in der Lage sind GABA zu synthetisieren und in Vesikel zu speichern.

Abbildung 4-7: Nachweis von GAD65/67 und VIAAT/VGAT in Leydigzellen durch IHC

Die Proteine **GAD65/67** (A) und **VIAAT/VGAT** (B) sind in Leydigzellen des adulten Rattenhodens, die sich zwischen den Tubuli seminiferi contorti (T) befinden, immunhistochemisch zu lokalisieren. Auch Blutgefäße (BV) finden sich in den interstitiellen Räumen. Die Abbildung C zeigt eine Kontrolle (Co) mit Normalserum (NS) anstatt des primären spezifischen Antikörpers. In einer weiteren Kontrolle wurde der primäre Antikörper durch PBS ersetzt (D). Die Balkenlänge in den Abbildungen entspricht 50 μm .



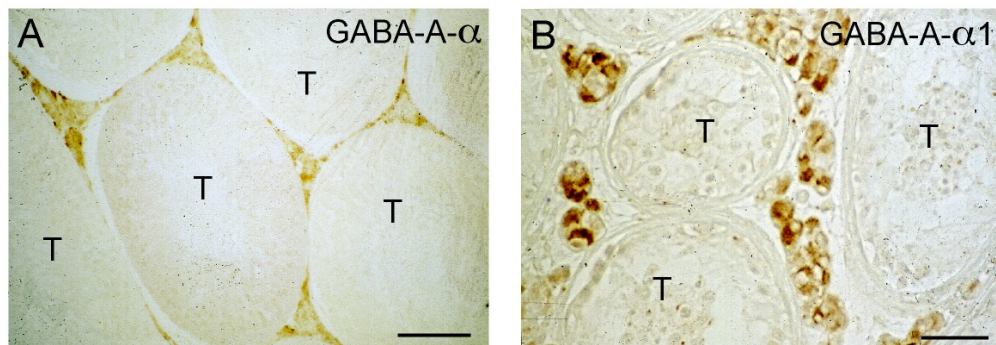
4.3.1.2 Zelluläre Lokalisation von GABA-Rezeptoruntereinheiten im Hoden

Um nun auch herauszufinden, welche testikulären Zellen GABA-Rezeptoren besitzen, wurden Hodengewebeschnitte von Ratten und Menschen immunhistochemisch zum einen mit einem Antikörper gegen GABA_A- α 1, GABA_A- β 2/3 sowie gegen alle GABA_A- α -Rezeptoruntereinheiten (GABA_A- α), zum anderen gegen GABA_B-R1/2 untersucht. Im Rattenhoden reagierten interstitielle Zellen spezifisch immunpositiv für GABA_A- α 1, GABA_A- α (siehe **Abbildung 4-8 A**) und GABA_A- β 2/3. Auch Rattenspermien zeigten schwache Immunfärbungen für GABA_A- α 1 und GABA_A- β 2/3. Im humanen Hodengewebe bestand bei interstitiellen Zellen eine deutliche Immunfärbung gegen GABA_A- α 1 (siehe **Abbildung 4-8 B**) und eine schwache, aber spezifische Immunfärbung gegen GABA_A- α und GABA_A- β 2/3. Morphologisch entsprachen die immungefärbten Zellen bei Ratten und Menschen Leydigzellen. In beiden Spezies konnte GABA_B-R1/2 immu-

histochemisch nicht nachgewiesen werden. In den Kontrollen waren keine Färbungen zu erkennen.

Abbildung 4-8: Immunhistochemischer Nachweis von $GABA_A-\alpha$ in Leydigzellen

Die Abbildungen zeigen immunhistochemische Färbungen eines adulten Rattenhodens und eines humanen Hodens (Spermatogenesestörung). Im Rattenhoden reagieren Leydigzellen im interstitiellen Kompartiment, das zwischen den Tubuli seminiferi contorti (T) liegt, immunpositiv für $GABA_A-\alpha$ (A). Im menschlichen Hoden färbt ein Antikörper gegen $GABA_A-\alpha 1$ die interstitiellen Leydigzellen an (B). Die Balkenlänge in den Abbildungen entspricht 50 μm .

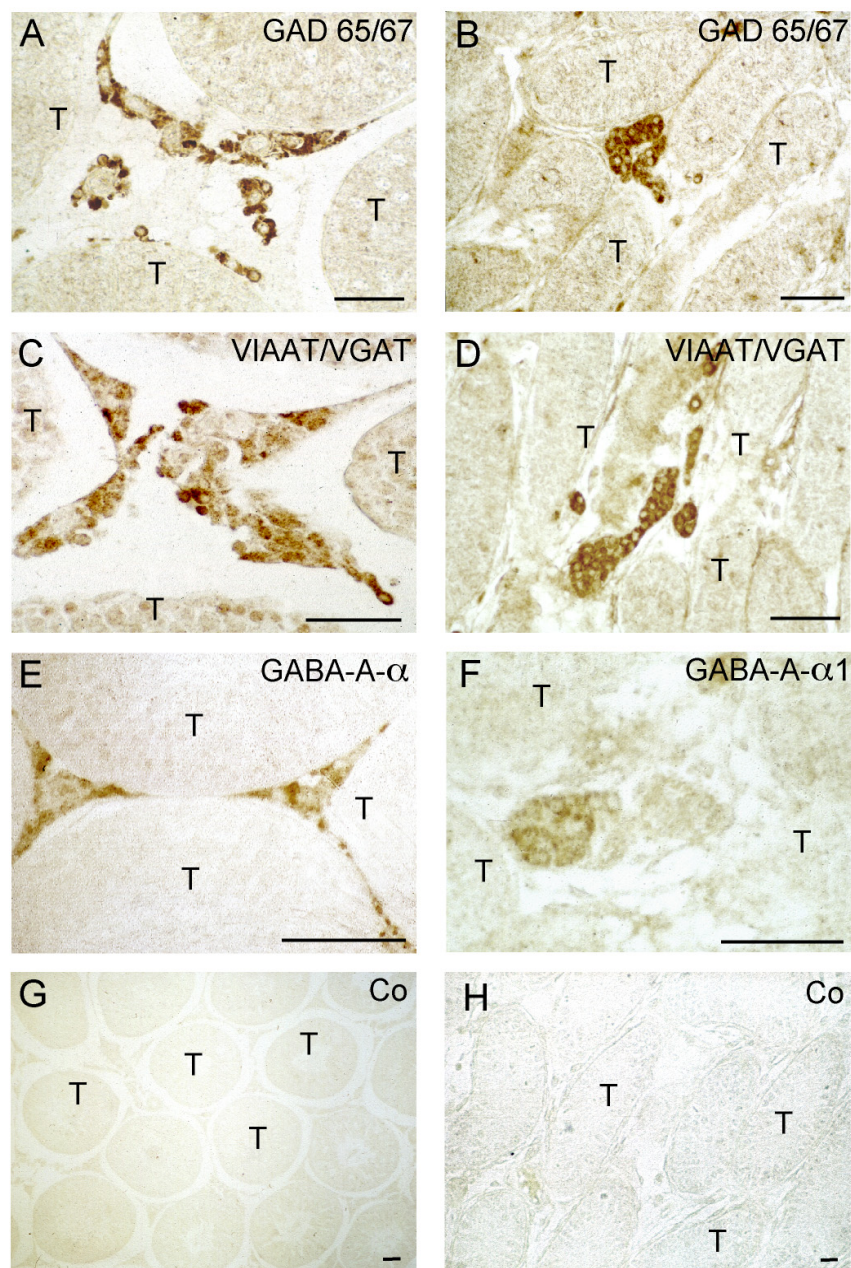


4.3.1.3 Vergleich der Lokalisation des GABAergen Systems bei jungen und alten Ratten

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen immunhistochemischen Untersuchungen wurden auch Hodengewebeschnitte von 5-6 Tage alten Ratten und von erwachsenen Ratten mit Antikörpern gegen GAD65/67, VIAAT/VGAT, $GABA_A-\alpha$ und $GABA_A-\alpha 1$ immungefärbt. Die **Abbildung 4-9 A-F** zeigt diesen immunhistochemischen Vergleich zwischen den beiden Altersgruppen. Man erkennt, dass sich auch bei 5-6 Tage alten Ratten Leydigzellen im interstitiellen Kompartiment des Hodens spezifisch immunpositiv für GAD65/67 und VIAAT/VGAT darstellen. Während sich bei erwachsenen Ratten Leydigzellen kräftig immunpositiv für $GABA_A-\alpha$ färbten, reagierten bei 5-6 Tage alten Ratten die Leydigzellen nicht mit dem $GABA_A-\alpha$ -Antikörper und nur schwach mit dem Antikörper gegen $GABA_A-\alpha 1$. Bei 5-6 Tage alten Ratten findet man relativ wenige immunpositive Leydigzellen. Allerdings sind zu diesem Zeitpunkt der postnatalen Entwicklung einerseits nur vereinzelt Zellgruppen von fetalen Leydigzellen im Interstitium vorhanden und andererseits finden sich in den Gewebeschnitten auch ungefärbte Leydigzellgruppen. Die Kontrollen zeigten keine Färbungen (siehe **Abbildung 4-9 G, H**).

Abbildung 4-9: Lokalisation des GABAergen Systems im Hoden von jungen und alten Ratten

Die Abbildungen **A-H** zeigen einen immunhistochemischen Vergleich der Lokalisation von **GAD65/67**, **VIAAT/VGAT** und **GABA_A- α** bzw. **GABA_A- α 1** im Hoden junger (**B, D, F, H**) und alter Ratten (**A, C, E, G**). Während bei alten Ratten in den Abbildungen **A** und **C** **GAD65/67** und **VIAAT/VGAT** in nahezu jedem interstitiellen Kompartiment in Leydigzellen lokalisiert sind, finden sich bei jungen Ratten (**B, D**) nur vereinzelt Leydigzellnester zwischen den Tubuli seminiferi contorti (**T**) positiv immungefärbt. Bei alten Ratten zeigen sich Leydigzellen in nahezu allen interstitiellen Kompartimenten immunpositiv für **GABA_A- α** (**E**), während sich im jungen Rattenhoden nur vereinzelt für **GABA_A- α 1** schwach positive Leydigzellen finden (**F**). Die Abbildungen **G** und **H** stellen Kontrollen (**Co**) dar, wobei der spezifische primäre Antikörper durch Normalserum ersetzt wurde. Die Balkenlänge in den Abbildungen entspricht 50 μ m.



4.3.2 Lasermikrodissektion (LMD) von Leydigzellen

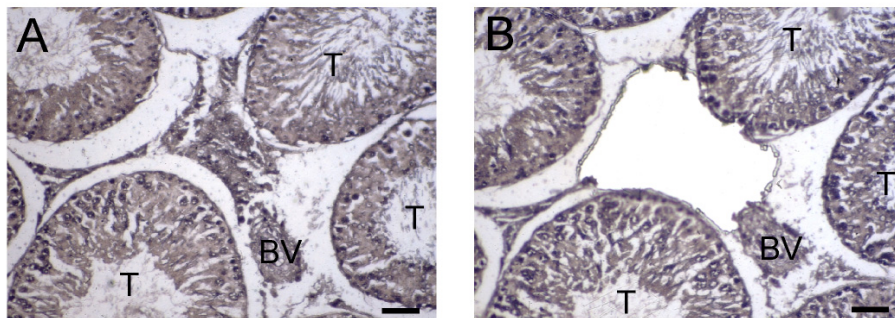
Die immunhistochemischen Untersuchungen legten den Schluss nahe, dass Leydigzellen nicht nur in der Lage sind GABA zu synthetisieren, sondern auch GABA-Rezeptoren besitzen. Die Lasermikrodissektion von Leydigzellen aus histologischen Schnitten und die anschließende RT-PCR-Analyse dieser Zellen in Hinblick auf die Expression von GABA-Rezeptoruntereinheiten stellt eine weitere Möglichkeit dar, die Präsenz von GABA-Rezeptoren explizit in interstitiellen Leydigzellen nachzuweisen.

4.3.2.1 Isolation von Leydigzellen aus Rattenhoden durch LMD

Die **Abbildung 4-10** zeigt zwei aufeinander folgende histologische Schnitte eines Rattenhodens, wobei bei einem dieser Schnitte eine LMD der Leydigzellen durchgeführt wurde (siehe **Abbildung 4-10 B**).

Abbildung 4-10: Lasermikrodissektion (LMD) von Leydigzellen im Rattenhoden

Die Abbildung zeigt zwei aufeinander folgende Hämatoxylin gefärbte Gewebeschnitte eines Rattenhodens. Bild A zeigt in der Mitte das interstitielle Kompartiment des Hodens, das zwischen den Tubuli seminiferi contorti (T) liegt. In diesem sieht man neben Blutgefäßen (BV) auch viele Leydigzellen. Die Leydigzellen wurden selektiv durch LMD herausgeschnitten. Bild B zeigt den entsprechenden Abschnitt auf dem Folgeschnitt nach der erfolgreichen LMD der Leydigzellen.



4.3.2.2 Nachweis von GABA_A- α 1 durch RT-PCR in Leydigzellen nach LMD

Die entnommenen Leydigzellproben (n=9), die von 3 unterschiedlichen Rattenhoden stammten, wurden exemplarisch auf die Präsenz von GABA_A- α 1 untersucht. Dabei konnte GABA_A- α 1 in den Leydigzellen mit Hilfe von RT-PCR und anschließender nested PCR nachgewiesen werden. Dies wurde durch Sequenzierung und Vergleich mit der Datenbanksequenz bestätigt. Als zusätzliche

Negativkontrollen (n=3) für die RT-PCR dienten Leydigzellen, die selektiv durch Laserschüsse zerstört und dann ebenfalls durch LMD ausgeschnitten wurden.

4.4 Funktionelle Aspekte von GABA im Hoden

Die immunhistochemischen Untersuchungen haben gezeigt, dass das GABAerge System bereits in einer frühen Entwicklungsstufe in Leydigzellen präsent ist. Diese jungen Leydigzellen sind eine stark proliferierende Zellgruppe, für die sich TM3 Zellen ideal als Proliferationsmodell eignen. An den TM3 Zellen kann somit untersucht werden, ob GABA einen Einfluss auf die Zellproliferation von Leydigzellen hat.

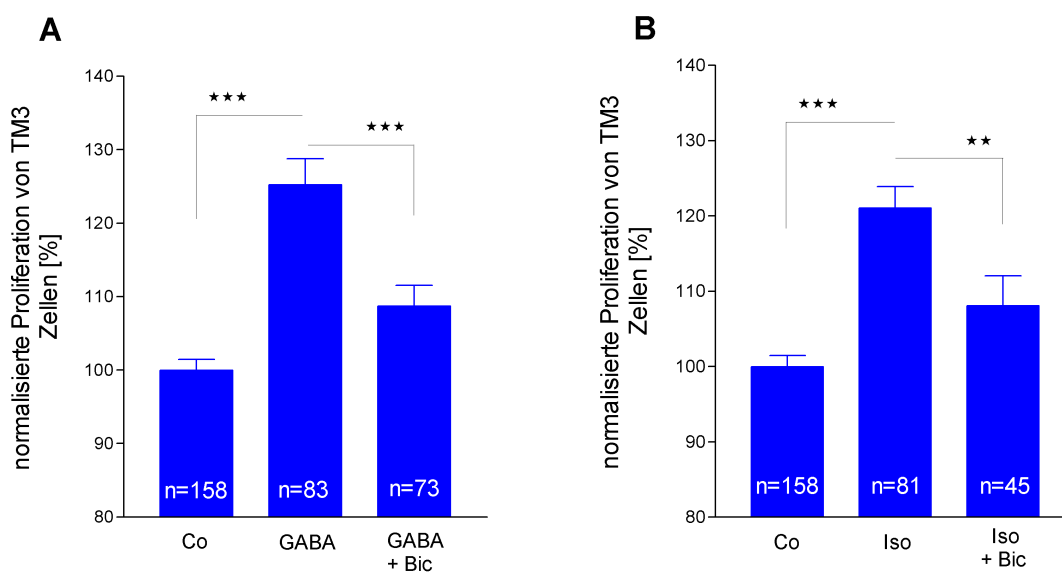
4.4.1 GABA induziert die Proliferation von TM3 Zellen über GABA_A-Rezeptoren

Um die Auswirkungen von GABA auf die Proliferation von TM3 Zellen zu untersuchen wurden TM3 Zellen für 24 h in Medium mit reduziertem Serumgehalt kultiviert und anschließend für 24 h mit GABA (10^{-5} M), dem GABA_A-Agonisten Isoguvacin (10^{-5} M), dem GABA_A-Antagonisten Bicucullin (10^{-5} M), dem GABA_B-Agonisten Baclofen (10^{-5} M) und dem GABA_B-Antagonisten Phaclofen (10^{-5} M) stimuliert. Die Proliferationsraten wurden bei allen Stimulationsexperimenten aufgrund des Vergleichs mit unstimulierten Kontrollen (Co=100%, n=158) berechnet und sind in der **Abbildung 4-11** dargestellt. Die Stimulation mit GABA (n=83) erhöhte die Proliferationsrate der TM3 Zellen signifikant um $25,2 \pm 3,5\%$. Auch der GABA_A-Agonist Isoguvacin (n=81) war in der Lage die Proliferationsrate von TM3 Zellen um $21,1 \pm 2,9\%$ signifikant zu steigern. Die Proliferation steigernde Wirkung von GABA bzw. Isoguvacin konnte durch gleichzeitige Applizierung von Bicucullin signifikant gehemmt werden. So betrug der Proliferationsanstieg bei Stimulation mit GABA und Bicucullin (n=73) nur noch $8,7 \pm 2,8\%$, bei Stimulation mit Isoguvacin und Bicucullin (n=45) nur noch $8,1 \pm 3,9\%$.

Werden die TM3 Zellen mit dem GABA_B-Agonisten Baclofen (n=63) stimuliert, führt dies zu einer geringeren, nicht signifikanten ($p > 0,05$, Student's t-Test) Erhöhung der Proliferationsrate um $8,4 \pm 3,1\%$. Die simultane Stimulation mit Baclofen und Phaclofen führt ebenfalls zu keinen signifikanten Veränderungen der Proliferationsrate.

Abbildung 4-11: Proliferationsmessungen bei stimulierten TM3 Zellen

Die Abbildung **A** zeigt die Proliferation von TM3 Zellen nach Stimulation mit GABA 10^{-5} M (**GABA**) sowie GABA 10^{-5} M und Bicucullin 10^{-5} M (**GABA+Bic**) für 24 h. Die Abbildung **B** zeigt die Proliferationsraten von TM3 Zellen nach Stimulation mit Isoguvacin 10^{-5} M (**Iso**), sowie Isoguvacin 10^{-5} M und Bicucullin 10^{-5} M (**Iso+Bic**) für 24 h, jeweils verglichen mit der basalen Proliferation von unstimulierten TM3 Zellen (**Co**, 100%). Die basale Proliferation steigert sich mit GABA signifikant ($p < 0,0001 = ***$, Student's t-Test) um $25,2 \pm 3,5\%$, mit dem GABA_A-Agonisten Isoguvacin ebenfalls signifikant ($p < 0,0001 = ***$, Student's t-Test) um $21,1 \pm 2,9\%$. Beide Effekte lassen sich durch den GABA_A-Antagonisten Bicucullin signifikant blockieren (**A**: $p < 0,0001 = ***$, Student's t-Test; **B**: $p < 0,001 = **$, Student's t-Test). Die Anzahl der jeweils durchgeführten Experimente ist in den Säulen angegeben. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte+Standardfehler.



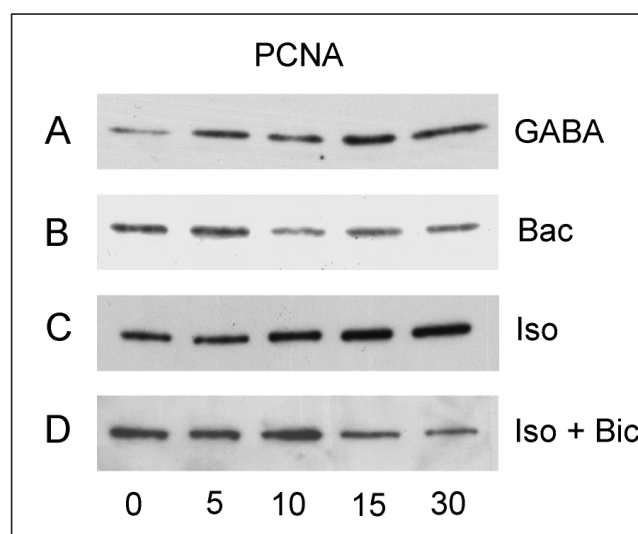
4.4.2 GABA Stimulation verstärkt die Bildung von PCNA in TM3 Zellen

Für den molekularbiologischen Nachweis der GABA induzierten Proliferationssteigerung bei TM3 Zellen wurde der Gehalt des zellulären Proliferationsmarkers PCNA (proliferating cell nuclear antigen) in TM3 Zellen nach Stimulation mit GABA (10^{-5} M), Baclofen (10^{-5} M), Isoguvacin (10^{-5} M) und einer Kombination von Isoguvacin (10^{-5} M) und Bicucullin (10^{-5} M) im Western Blot Verfahren ermittelt. Es wurden TM3 Zellen mit diesen Reagenzien für 0, 5, 10, 15 und 30 Minuten stimuliert und deren Proteine nach gelelektrophoretischer Auftrennung mit einem Antikörper gegen PCNA behandelt. Die **Abbildung 4-12** zeigt die Zeitverläufe der Stimulationsreihen im Western Blot. Eine Stimulation mit GABA oder Isoguvacin führte zu einem Anstieg von PCNA in TM3 Zellen, während dieser Effekt nicht durch Baclofen-Stimulation erreicht wurde. Behandelt man die Zellen mit einer Kombination aus Isoguvacin und Bicucullin so kommt es nach einem kurzen

Anstieg von PCNA zum Abfall des Proliferationsmarkers unter das Ausgangsniveau.

Abbildung 4-12: Western Blot von PCNA aus stimulierten TM3 Zellen im Zeitverlauf

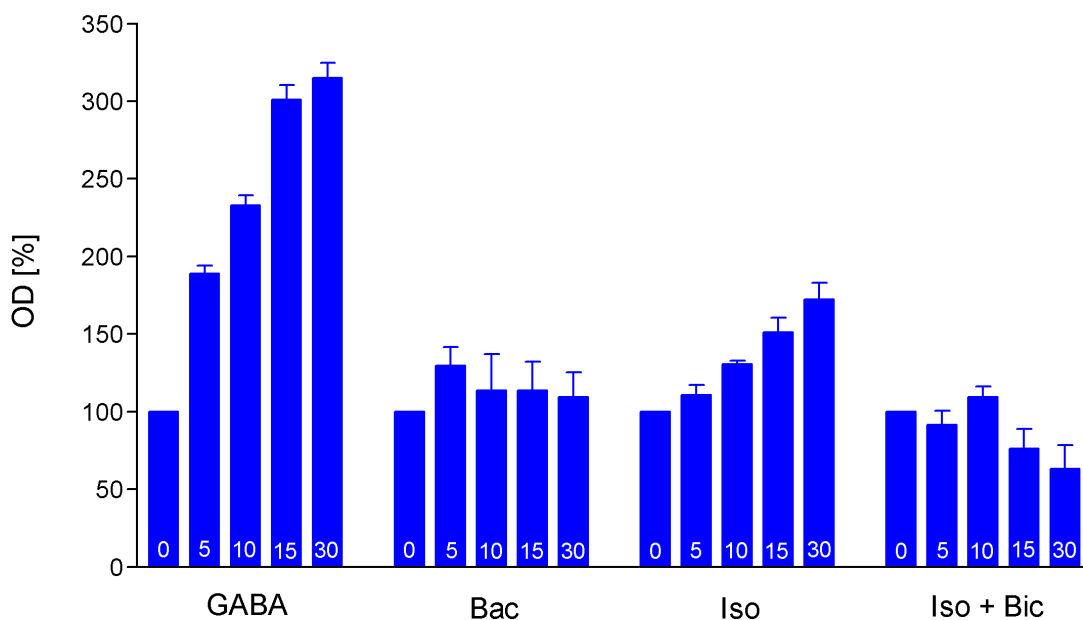
Die Abbildungen **A**, **B**, **C**, **D** zeigen Western Blot Ergebnisse bei stimulierten TM3 Zellen. Man erkennt immungefärbte Banden für den Proliferationsmarker PCNA (proliferating cell nuclear antigen) bei 34 kDa bei unstimulierten (0) TM3 Zellen und nach 5, 10, 15 und 30 minütiger Stimulation. Eine Stimulation mit GABA 10^{-5} M (**A**) oder dem GABA_A-Agonisten Isoguvacin 10^{-5} M (**C**) führt zu einem Anstieg von PCNA in TM3 Zellen, während dieser Anstieg bei Stimulation mit dem GABA_B-Agonisten Baclofen 10^{-5} M (**B**) ausbleibt. Der Anstieg bleibt ebenfalls bei Stimulation mit Isoguvacin 10^{-5} M und dem GABA_A-Antagonisten Bicucullin 10^{-5} M (**D**) aus.



Analysiert man die optischen Dichten (OD) der PCNA-Banden aller Western Blots, erhält man detaillierte Verläufe des PCNA-Gehaltes der TM3 Zellen während der Stimulation (siehe **Abbildung 4-13**). Stimuliert man TM3 Zellen mit GABA (n=3), so steigert sich die OD der PCNA-Bande signifikant auf $314,8 \pm 10,1\%$ nach 30 min, bei Stimulation mit Isoguvacin (n=3) erhöht sich die OD im gleichen Zeitraum ebenfalls signifikant auf $172,2 \pm 10,6\%$. Stimuliert man die TM3 Zellen hingegen mit Baclofen (n=5) ergeben sich keine signifikanten Änderungen der OD der PCNA-Bande im Western Blot. Auch bei synchroner Stimulation der TM3 Zellen mit Isoguvacin und Bicucullin (n=4) zeigt sich keine signifikante Änderung der OD von PCNA, allerdings erkennt man eine Tendenz zur Erniedrigung der OD im Zeitverlauf der Stimulation. Dieser Stimulationsverlauf verdeutlicht, dass der Proliferationsmarker PCNA bei Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren kontinuierlich während der Stimulationsdauer (30 min) in TM3 Zellen ansteigt.

Abbildung 4-13: PCNA Gehalt von stimulierten TM3 Zellen im Zeitverlauf.

Die Abbildung zeigt die zeitliche Entwicklung der optischen Dichte (OD) der PCNA Banden im Western Blot für unterschiedliche Stimulationsreihen von TM3 Zellen. Stimuliert man TM3 Zellen mit **GABA** 10^{-5} M, so steigert sich die OD der PCNA-Bande von 100% (unstimuliert, 0 min) signifikant auf $314,8 \pm 10,1\%$ nach 30 min ($p < 0,0004$, Student's t-Test), bei Stimulation mit Isoguvacin 10^{-5} M (**Iso**) steigert sich die OD im gleichen Zeitraum ebenfalls signifikant ($p < 0,0079$, Student's t-Test) auf $172,2 \pm 10,6\%$. Stimuliert man die TM3 Zellen hingegen mit Baclofen 10^{-5} M (**Bac**) ergeben sich keine signifikanten ($p < 0,2981$, Student's t-Test) Änderungen der OD der PCNA-Bande im Western Blot. Auch bei synchroner Stimulation der TM3 Zellen mit Isoguvacin 10^{-5} M und Bicucullin 10^{-5} M (**Iso + Bic**) zeigt sich keine signifikante Veränderung der OD von PCNA, allerdings erkennt man eine Tendenz zur Erniedrigung der OD im Zeitverlauf der Stimulation. Die Zahlen in den Säulen geben die Stimulationsdauer in min an. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte+Standardfehler.



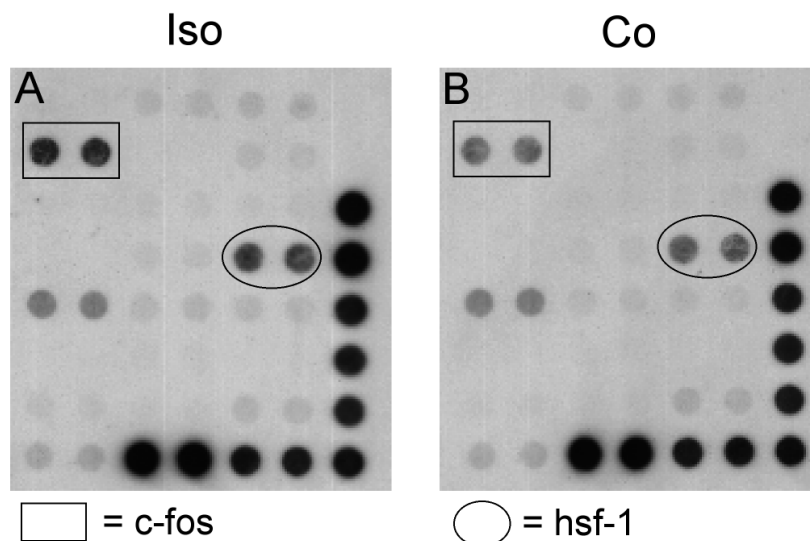
4.4.3 Verstärkte Expression von c-fos und hsf-1 in stimulierten TM3 Zellen

Um Hinweise auf den Signaltransduktionsweg der GABA_A -Rezeptor vermittelten Proliferationssteigerung bei TM3 Zellen zu erhalten wurde der cDNA-Array *Mouse PathwayFinder-1* (Superarray) eingesetzt (siehe **Tabelle 3-5** und **Abbildung 3-1**). Die **Abbildung 4-14** zeigt cDNA-Arrays, die mit cDNA von unstimulierten TM3 Zellen (**B**) bzw. stimulierten TM3 Zellen (**A**, Isoguvacin 10^{-5} M, Stimulationsdauer: 1,5 h) beladen wurden. Die gemessenen optischen Dichten entsprechen der Expression der jeweiligen Gene. Die Stimulation mit dem GABA_A -Agonisten Isoguvacin erhöhte die OD und damit die Expression des Gens für c-fos um etwa

das Doppelte und die des Gens für hsf-1 (heat shock factor 1) um etwa die Hälfte. Die OD der restlichen untersuchten Gene veränderte sich um weniger als 5%, die der Kontrollgene für β -Actin und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase um weniger als 3%.

Abbildung 4-14: Änderungen in der Genexpression bei GABA_A-Stimulation

Die Abbildungen **A** und **B** zeigen den cDNA-Array Mouse PathwayFinder-1 (Superarray). Abbildung **A** stellt den cDNA-Array nach Auftrag von cDNA aus TM3 Zellen, die mit Isoguvacin 10^{-5} M für 1,5 h stimuliert wurden, dar. Als Kontrolle (**B**) wurde cDNA aus unstimulierten TM3 Zellen aufgetragen. Die untersuchten Gene des cDNA-Array sind in **Tabelle 3-5** und in **Abbildung 3-1** aufgelistet. Im wesentlichen ändern sich die optischen Dichten (OD) der Gene **c-fos** (Rechteck) und **hsf-1** (Oval). Die OD von c-fos nimmt um 203,4% zu, die von hsf-1 nimmt um 49,3% zu. Die OD der Kontrollgene ändert sich in einem Bereich unter 3%.



5 Diskussion

5.1 Identifikation und Lokalisation eines lokalen GABAergen Systems im Hoden

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde durch die molekulare Identifizierung der testikulären Komponenten von GABA-Synthese, GABA-Speicherung und GABA-Rezeptoren gezeigt, dass ein GABAerges System im endokrinen Kompartiment des Hodens bei Nagern und Menschen existiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass die entscheidenden Synthesenzyme für GABA im Hoden von mehreren Spezies vorhanden sind. In Bezug auf die Präsenz der beiden aktiven GAD-Isoformen wurden dabei Unterschiede deutlich. GAD67 wurde im Hoden aller untersuchten Spezies gefunden, zusätzlich wurde im Hoden von Ratte und Maus auch GAD65 nachgewiesen. Nach Splicevarianten der GAD-Isoformen wurde nicht gesucht, hauptsächlich da die bereits beschriebene testikuläre Splicevariante GAD25 [23] nicht funktionell zu sein scheint. Hingegen stellten sich GAD65/67 im Rattenhoden als enzymatisch aktiv heraus. In früheren Untersuchungen [39] mit einem vergleichbaren GAD-Assay wurde auch im Hamsterhoden funktionelles GAD nachgewiesen. Allerdings wurde in dieser Studie im Hamsterhoden mit molekularbiologischen Methoden kein GAD gefunden. Im Hoden von Ratte und Mensch konnte in anderen Arbeiten mRNA für GAD [86,106] mittels in-situ-Hybridisierung und RT-PCR in Spermien und in Keimzellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu stehen die immunhistochemischen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, da immunpositives GAD mit einem Antikörper, der GAD65 und GAD67 erkennt, nicht innerhalb der Tubuli seminiferi, sondern im Interstitium des Hodens lokalisiert wurde. Die Gründe für diese widersprüchlichen Ergebnisse sind bislang nicht klar. Zum einen könnte die Proteinmenge von GAD im tubulären Kompartiment sehr gering sein, so dass es mit immunhistochemischen Methoden nicht nachweisbar ist, zum anderen könnte in den Tubuli seminiferi des Hodens auch eine Splicevariante von GAD, z.B. GAD25, in Proteinform vorliegen, die durch den verwendeten Antikörper gegen GAD65/67 nicht erkannt wird.

Die Tatsache, dass sich bei der Verwendung des Antikörpers gegen VIAAT/VGAT das gleiche Reaktionsmuster wie bei der Immunfärbung mit dem Antikörper gegen GAD65/67 im Hoden zeigte, unterstreicht den Rückschluss, dass interstitielle Zellen im Hoden aller untersuchten Spezies in der Lage sind GABA zu bilden und

zu speichern. Histologisch handelt es sich bei diesen Zellen eindeutig um Leydigzellen.

GABA benötigt GABA-Rezeptoren um seine Funktion ausüben zu können. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene GABA_A- und GABA_B-Rezeptoruntereinheiten im Hoden gefunden. Akinci et al. [5] identifizierten im Rattenhoden ebenfalls die GABA_A-Rezeptoruntereinheiten α 1-3, β 3, γ 1 und γ 2. Die von diesen Autoren beschriebenen GABA_A-Rezeptoruntereinheiten β 1 und β 2 konnten in den RT-PCR-Untersuchungen dieser Arbeit nicht gefunden werden, während zusätzlich die GABA_A-Rezeptoruntereinheit γ 3 im Rattenhoden gefunden wurde. Andere Autoren identifizierten nur GABA_A- γ 1 im Rattenhoden [53], während in den RT-PCR Untersuchungen dieser Arbeit alle drei γ -Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors im Rattenhoden nachgewiesen wurden. Ob die unterschiedlichen Ergebnisse methodisch begründet sind oder ob Zellaktivität, Zelldifferenzierung, Zellentwicklung oder auch hormonelle Regulation [19,54,55] die Expression von GABA_A-Rezeptoruntereinheiten im Hoden beeinflussen, bleibt ungeklärt. Die Konstellation der GABA_A-Rezeptoruntereinheiten macht es in allen untersuchten Spezies möglich, dass sich ein funktioneller GABA_A-Rezeptor bildet.

Bei der Suche nach der genauen Lokalisation der GABA_A-Rezeptoren im Hoden zeigte sich, dass diese Rezeptoren in zwei funktionell unterschiedlichen Bereichen vorhanden sind. Es ist bekannt, dass bei Ratten und Menschen Keimzellen und Spermien GABA_A-Rezeptoruntereinheiten besitzen [1,20,21,60,74,89]. Einige immunhistochemische Untersuchungen dieser Arbeit zeigen ebenfalls vereinzelte Immunfärbungen auf Rattenspermien für GABA_A- α 1 und GABA_A- β 2/3. Jedoch zeigte die Immunhistochemie auch eindeutig, dass Leydigzellen GABA_A-Rezeptoruntereinheiten besitzen. Durch die Lasermikrodissektion von Leydigzellen und den anschließenden Nachweis von GABA_A- α 1 in den ausgeschnittenen Leydigzellen wurde dies auch auf molekularbiologischer Basis verifiziert.

Darüber hinaus gibt es Hinweise für die Existenz von GABA_B-Rezeptoren im Hoden, da GABA_B-Rezeptoruntereinheiten im Rattenhoden und in Rattenspermien nachgewiesen wurden [48,50]. Zusätzlich zu der Existenz von GABA_B-Rezeptoruntereinheiten im Rattenhoden zeigten die RT-PCR-Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass GABA_B-Rezeptoruntereinheiten auch bei anderen Nagern (Maus, Hamster) und im menschlichen Hoden vorkommen. Über die zelluläre Lokalisation von GABA_B-Rezeptoruntereinheiten gibt es keine detaillierten Erkenntnisse. Pharmakologische Experimente lassen vermuten, dass Rattenspermien GABA_B-Rezeptoren besitzen, wobei deren genaue Funktion

unklar bleibt [48,50]. Die Existenz von GABA synthetisierenden bzw. speichernden funktionellen Proteinen und gleichzeitig von GABA-Rezeptoren im Hoden wirft die Frage auf, welche Rolle dieses lokale GABAerge System in der männlichen Gonade spielt ?

5.2 GABA als auto- und parakriner Faktor im Reproduktionstrakt

Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, gibt es im männlichen Reproduktionstrakt GABAerge Einflüsse auf die Steuerung endokriner Zellen. Auch aus anderen Bereichen des endokrinen Systems wurde bereits über GABAerge Effekte berichtet [5,22,31]. GABA wird beispielsweise von Wachstumshormon produzierenden Zellen der Adenohypophyse produziert [72] und steuert auto- bzw. parakrin die Hormonbildung dieser Zellen [42,67]. Auch in den Langerhanszellen des Pankreas [4,23,43,94,97] oder im Nebennierenmark [56] greift GABA lokal regulierend in endokrine Funktionen ein. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit nun zeigen, existiert im endokrinen Kompartiment des Hodens von Nagern und Menschen ein lokales GABAerges System. Dieses ist zum einem funktionell durch die Blut-Hoden-Schranke vom Keimepithel getrennt und präsentiert sich zum anderen sowohl als „Empfänger“, wie auch als „Sender“ für durch GABA vermittelte Informationen. Eine Aufgabe übernimmt GABA dabei in der Regulation der endokrinen Hauptfunktion der Leydigzellen, nämlich der Produktion von Androgenen. Hinweise dafür ergaben sich aus einer Reihe von pharmakologischen Experimenten, die nachwiesen, dass die Androgenproduktion im Rattenhoden durch GABA beeinflussbar ist [90-92]. Darüber hinaus wird auch beim Hamster die Sexualhormonbildung durch GABA moduliert [40]. Leydigzellen könnten demnach durch das von ihnen gebildete GABA auto- oder parakrin die Syntheseleistung ihres endokrinen Hauptproduktes Testosteron steuern. Damit würde neben der hypophysären Regulation durch LH und dem Einfluss von Inhibinen und Activinen ein weiterer lokaler Steuerungsmechanismus der Steroidsynthese in Leydigzellen bestehen.

Eine weitere Funktion von testikulärem GABA könnte die Mitwirkung in der Reifung und Differenzierung von männlichen Keimzellen darstellen. Da es nicht bekannt ist, ob das von Leydigzellen gebildete GABA die Blut-Hoden-Schranke überwinden kann, könnte in diesem Zusammenhang auch eine GABA-Quelle im tubulären Kompartiment in Frage kommen. Dort wurde zwar mRNA für GAD nachgewiesen [86,106], jedoch ist unsicher, ob auch enzymatisch aktives GAD

vorliegt. Ebenso wurde GAD in der vorliegenden Arbeit nicht in Proteinform im tubulären Kompartiment gefunden.

Im weiblichen Reproduktionstrakt synthetisiertes GABA könnte aktiv in die Steuerung der Spermienaktivierung im Eileiter eingreifen. Dafür spricht, dass neben der Existenz von GABA-Rezeptoren auf Spermien [1,20,21,60,74,89] auch ein Transportsystem für GABA in Spermien [2,3,52] auf Proteinebene nachgewiesen wurde. Desweiteren sind bei einigen Spezies GABAerge Effekte auf Spermien beschrieben, die zur Einleitung [20,32,50,60,74,100,101] der Akrosomenreaktion oder zur Steigerung der Spermienmotilität [21] führen. Zudem zeigen mehrere Arbeiten, dass GABA im Eileiter, der den physiologischen Ort für Spermienaktivierung und Akrosomenreaktion darstellt, synthetisiert werden kann [28-30,35,63,69,79,83,105-107]. GABA könnte demzufolge als parakriner Faktor, der von Epithelien des weiblichen Eileiters gebildet wird, die Aktivierung des Spermiums steuern und damit eine wichtige Voraussetzung für den Befruchtungsprozess schaffen.

5.3 GABA als Regulator der zellulären Proliferation und Differenzierung im ZNS

In den letzten Jahren zeigte sich neben der klassischen Rolle als inhibitorischer Neurotransmitter im ZNS und der eben beschriebenen lokalen Wirkung in der Steuerung von Organfunktionen auch, dass GABA als trophischer Faktor Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Zellmigration steuert [84,109]. Im sich entwickelnden Nervensystem ist die GABAerge Neurotransmission sehr früh ausgebaut und reguliert wichtige Entwicklungsvorgänge in Nervenzellen [10,64,80,108]. So ist bekannt, dass proliferierende neuronale Vorläuferzellen GABA_A-Rezeptoren besitzen, sich diese in der Entwicklung immer wieder in ihrer molekularen Zusammensetzung verändern und wesentlich an der Gehirnentwicklung beteiligt sind [19,36,85]. GABA induziert durch GABA_A-Rezeptoren in den jungen Neuronen das Dendritenwachstum [68,110], reguliert die zur Proliferation notwendige DNA-Synthese [34,47,66], steuert aber auch die Synaptogenese der Nervenzellen [14,59] und die Migration der embryonalen Neurone [11-13]. Dabei entfaltet sich diese GABAerge Wirkung in der frühen Entwicklung des ZNS hauptsächlich durch Rezeptor vermittelte Depolarisation der Zellmembran an unreifen Synapsen oder aber durch parakrine Wirkungsmechanismen [66,85]. Durch die beschriebenen GABAergen Effekte werden in der

frühen Embryonalentwicklung des Nervensystems also Zelldifferenzierung, Zellmigration und Zellproliferation reguliert. Unter anderem werden diese Aufgaben dabei sowohl stimulierend, als auch inhibierend durch GABA im direkten Zusammenspiel mit Wachstumsfaktoren, wie z. B. BDNF (brain-derived neurotrophic factor), beeinflusst [17,70].

Neben der Interaktion zwischen GABA und Wachstumsfaktoren, ist in der Entwicklung des Nervensystems auch die durch GABA_A-Rezeptoren vermittelte Zelldifferenzierung und Zellproliferation durch Neurosteroiden von Bedeutung [18,99]. Neurosteroiden sind von Neuronen, Gliazellen oder peripheren Steroid bildenden Zellen produzierte bioaktive Steroide auf der Basis von Pregnenolon oder Progesteron und deren Sulfateestern, die auf synaptische Informationsübertragungen durch Veränderung von Rezeptoreigenschaften einwirken können [75,99]. Sie entfalten ihre Wirkung hauptsächlich durch allosterische Modulation von GABA_A-Rezeptoren [18,61]. Andererseits ist GABA in der Lage die Biosynthese dieser Neurosteroiden wiederum über GABA_A-Rezeptoren zu steuern [27,77]. Somit existiert im Zentralnervensystem eine Regulation Steroid bildender Zellen (Neurone, Gliazellen) durch GABA und darüber hinaus greift GABA entweder parakrin über GABA-Rezeptoren oder im Zusammenspiel mit Wachstumsfaktoren und Neurosteroiden in wichtige Entwicklungsschritte des Nervensystems ein.

5.4 Funktion von GABA in fetalen und adulten Leydigzellen

In der pränatalen und postnatalen Entwicklung des endokrinen Kompartiments im Hoden kommt es zu wichtigen Zellproliferations- und Zelldifferenzierungsvorgängen von Leydigzellen. Bei Nagern und Menschen existieren zwei voneinander verschiedene Arten von Leydigzellen - die fetalen Leydigzellen (FLC) und die adulten Leydigzellen (ALC) [45,65,88]. Die Entwicklung von Leydigzellen ist am besten im Hoden von Ratten und Mäusen untersucht. Dort differenzieren sich früh in der Embryonalentwicklung FLC unabhängig von Gonadotropinen [81,111] und produzieren pränatal Testosteron. Bis zum Tag 7 der postnatalen Entwicklung sind FLC die einzigen Steroid produzierenden Zellen im Rattenhoden und aktivieren in dieser Zeit die Hypothalamus-Hypophysen-Hoden-Achse durch Testosteron [7,45]. Die ALC entwickeln sich hingegen erst postnatal in 3 Phasen aus mesenchymalen Stammzellen des Interstitiums und sind ab Tag 14 die dominierende Steroid bildende Zellgruppe im Hoden der Ratte [7,16,65,76]. Zuerst

entstehen aus diesen mesenchymalen Stammzellen Leydig-Vorläuferzellen, sogenannte Leydig-Progenitorzellen, anschließend differenzieren sich diese über unreife Leydigzellen zu ALC. Bei Nagern und Menschen sind im adulten Hoden FLC zeitlebens in konstanter Zahl vorhanden und es differenzieren außerdem Vorläuferzellen weiterhin zu ALC, die auch die Potenz zur Proliferation fortdauernd besitzen [6,95,102]. Während die weitere Entwicklung der ALC unter der Kontrolle von LH und Testosteron stattfindet [8,82,111], geben diese Faktoren nicht das Startsignal zur Differenzierung der ALC aus den mesenchymalen Stammzellen [102]. Dieses Startsignal zur Differenzierung der Leydig-Progenitorzellen ist derzeit unbekannt.

Neben LH und Testosteron steuern auch auto- bzw. parakrine Regulationsmechanismen die Entwicklung von Leydigzellen. Zum Beispiel beeinflussen eine Reihe von Wachstumsfaktoren, wie IGF-1 (Insulin-like growth factor 1), PDGF (Platelet-derived growth factor) oder TGF β (Transforming growth factor β), die Differenzierung von FLC und ALC [45,65].

Ob GABA vergleichbar seiner Bedeutung in der Entwicklung des Nervensystems auch bei der Steuerung der Differenzierung und Proliferation von Leydigzellen zur Geltung kommt, ist zur Zeit unbekannt. Jedoch zeigt die vorliegende Arbeit, dass GABA durch Aktivierung des GABA_A-Rezeptors, der auch die Proliferation induzierende Wirkung von GABA im sich entwickelnden ZNS vermittelt, die Proliferation der Leydigzellreihe TM3 stimuliert. Diese entdifferenzierten Zellen entsprechen durch den Grad ihrer basalen Proliferation am ehesten den sich entwickelnden FLC. Immunhistochemische Untersuchungen und GAD-Assays sowohl bei 5-6 Tage alten Ratten, als auch bei 14 Tage alten und erwachsenen Ratten zeigten, dass funktionelles GABA in Leydigzellen synthetisiert wird. Demnach sind FLC (5-6 Tage alte Ratten) und ALC in der Lage GABA zu produzieren und könnten die Proliferations- und Differenzierungsvorgänge der ALC in dieser wichtigen postnatalen präpubertären Entwicklungsphase steuern, da ALC auch GABA-Rezeptoren besitzen. Die Gruppe der 5-6 Tage alten Ratten wies in den GAD-Assays zwar eine geringere GAD-Aktivität verglichen mit der Gruppe der adulten Ratten auf, allerdings geht aus morphometrischen Untersuchungen [102] hervor, dass der Rattenhoden am Tag 6 der postnatalen Entwicklung nur ca. $60-65 \times 10^3$ FLC besitzt, während im erwachsenen Rattenhoden ca. $17-21 \times 10^6$ ALC vorhanden sind. Somit könnte von FLC synthetisiertes GABA ein Kandidat für das unbekanntes Startsignal der Entwicklung von ALC aus Vorläuferzellen sein.

Eine weitere Aufgabe für die Proliferation induzierende Wirkung von GABA auf Leydigzellen könnte in der Aufrechterhaltung der Population von ALC im erwachsenen, also postpubertären Hoden, bestehen. Die Anzahl der ALC bleibt bei erwachsenen Nagern und Menschen physiologisch durch Zellproliferation konstant [6,95,102]. Wie die Erkenntnisse dieser Arbeit zeigen, können ALC zum einem GABA synthetisieren, zum anderen besitzen sie GABA-Rezeptoren. Somit könnte GABA durch Aktivierung dieser Rezeptoren die Population von ALC durch auto- bzw. parakrine Regulation ihrer Proliferationsrate aufrechterhalten.

5.5 Signaltransduktion der GABA induzierten Proliferation von TM3 Zellen

Betrachtet man die möglichen Signaltransduktionswege der durch GABA induzierten Proliferation von TM3 Zellen bzw. Leydigzellen, so zeigen sich einige Gemeinsamkeiten zur Wirkung von GABA in der frühen Entwicklung des Nervensystems, aber auch zum Wirkmechanismus anderer das Wachstum stimulierender Faktoren in Leydigzellen. In der vorliegenden Arbeit stellte sich in den Proliferationsuntersuchungen an TM3 Zellen der proliferative Effekt von GABA auf TM3 Zellen auch bei Stimulation mit dem GABA_A-Agonisten Isoguvacin, jedoch nicht bei Stimulation mit dem GABA_B-Agonisten Baclofen ein. Der blockierende Effekt des GABA_A-Antagonisten Bicucullin auf die GABA induzierte Proliferation spricht ebenfalls dafür, dass GABA hierbei über den GABA_A-Rezeptor wirkt. Darüber hinaus wird die proliferative Wirkung von GABA auf Neurone durch einen für Bicucullin sensitiven GABA_A-Rezeptor übertragen [66,84,85]. Außerdem beschreiben mehrere Arbeiten, dass die Aktivierung des GABA_A-Rezeptors im jungen Nervensystem aufgrund einer höheren intrazellulären Chloridkonzentration nicht zu einer Hyperpolarisation der postsynaptischen Membran, sondern zu einer Depolarisation führen kann [66,85]. Die Depolarisation aktiviert spannungsabhängige Kalziumkanäle und führt somit zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$). Der proliferative Effekt von GABA wird anschließend über Kalzium abhängige, intrazelluläre Signaltransduktionswege vermittelt [15,41,66,85].

Über möglicherweise involvierte Komponenten des zugrunde liegenden weiteren intrazellulären Signaltransduktionsweg geben die Ergebnisse der cDNA-Arrays in der vorliegenden Arbeit erste Aufschlüsse. Einschränkend ist hier zu bemerken, dass es sich bei den cDNA-Array-Untersuchungen um Momentaufnahmen des

Signaltransduktionswegs handelt, da nur zum Zeitpunkt 90 min nach Stimulation untersucht wurde. Außerdem sind nur 23 Gene in den cDNA-Arrays untersucht worden, somit wurden sicherlich viele für den Signaltransduktionsweg wichtige Gene nicht erfasst. In diesen cDNA-Array-Untersuchungen wurde eine Erhöhung der Expression der beiden Transkriptionsfaktoren c-fos und hsf-1 bei TM3 Zellen nach der Stimulation mit Isoguvacin entdeckt. Sowohl das „early gene“ c-fos, als auch der „heat-shock-factor“ hsf-1 sind durch eine Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ aktivierbar und können in Zusammenhang mit Zellproliferations- und Zelldifferenzierungsvorgängen stehen [49,62,87,103]. Bei heranreifenden Rattenneuronen führt Stimulation mit GABA über Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ beispielsweise zur verstärkten Expression des Wachstumsfaktors BDNF und von c-fos [17]. In Bezug auf Leydigzellen ist ebenfalls bekannt, dass die Aktivierung von c-fos bei der LH-Rezeptor vermittelten Proliferation von Leydigzellen mitwirkt [46,98].

Eine weitere Gemeinsamkeit der GABAergen proliferativen Wirkung mit der LH-Rezeptor vermittelten Proliferationssteigerung von Leydigzellen liegt darin, dass GABA, wie die vorliegende Arbeit zeigt, genauso in der Lage ist den Proliferationsmarker PCNA [57] in TM3 Zellen zu erhöhen, wie dies für die Aktivierung des LH-Rezeptors durch humanes Choriongonadotropin (hCG) beschrieben ist [104]. Weiterhin ist auch ein Zusammenwirken von GABA mit Wachstumsfaktoren denkbar, vergleichbar der Situation im sich entwickelnden Nervensystem. Sind es im Nervensystem hauptsächlich BDNF und bFGF (basic fibroblast growth factor) die GABA_A-Rezeptor vermittelte Proliferation mitregulieren [17,70,84], so können Leydigzellen durch IGF-1, PDGF oder TGF β proliferativ beeinflusst werden [45,65].

Zusammenfassend könnte der GABA_A-Rezeptor vermittelte proliferative Effekt auf TM3 Zellen also entweder 1) direkt über eine Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ und anschließender Aktivierung Kalzium abhängiger intrazellulärer Signaltransduktionswege, oder 2) im Zusammenspiel mit einem LH-Rezeptor vermittelten Proliferationssignal oder 3) in Kombination mit einem lokal gebildeten Wachstumsfaktor zustande kommen.

5.6 Ausblick: GABA wird vom Neuro- zum „Zytotransmitter“

Bis vor wenigen Jahren wurden Substanzen wie Serotonin, Glutamat, Azetylcholin und GABA als klassische synaptische Neurotransmitter im zentralen oder peripheren Nervensystem aufgefasst. Viele neue Forschungsergebnisse zeichnen aber mittlerweile ein differenzierteres Bild der physiologischen Rolle dieser Überträgerstoffe. Zum einen werden Neurotransmitter auch von nicht-neuronalen Zellen in vielen peripheren Organen gebildet, zum anderen können sie neben ihrer Funktion als Überträgerstoff in einer Synapse auch als autokrine oder parakrine Faktoren wirken [42,72]. GABA wird beispielweise außerhalb des ZNS in Wachstumshormon produzierenden Zellen des Hypophysenvorderlappens [42,72], in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks [56] und in β -Zellen des Pankreas [4,23,43,94,97] gebildet. In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich gezeigt, dass GABA auch von interstitiellen Zellen im Hoden produziert wird und seine Wirkung auf auto- und parakrinem Weg entfaltet. GABA wird also von vielen unterschiedlichen Zellen synthetisiert und ist in der Lage ohne synaptische Kontakte Informationen zwischen Zellen auf lokaler Ebene zu übertragen. GABA wird dadurch sozusagen vom Neurotransmitter zum „Zytotransmitter“.

Fasst man GABA als „Zytotransmitter“ vieler nicht-neuronaler Organsysteme des Körpers auf, so könnte sich dieses Erkenntnis auf das Verständnis der Pathophysiologie vieler menschlicher Erkrankungen, sowie der Wirkmechanismen bzw. Nebenwirkungsmechanismen wichtiger Medikamente auswirken. Beispielsweise entfalten Benzodiazepine, Anästhetika oder Antiepileptika ihre pharmakologische Wirkung über neuronale GABA-Rezeptoren. Denkbar wäre, dass auch einige der unerwünschten Nebenwirkungen dieser Medikamente zum Teil durch Beeinflussung GABAerger Systeme in anderen Körperzellen zustande kommen. In bezug auf den männlichen Reproduktionstrakt gibt es vielleicht Verbindungen zwischen der durch Medikamente induzierten Impotenz bzw. Infertilität und GABAerger Wirkungen im Hoden. GABA könnte demnach in Zukunft als „Zytotransmitter“ eine ebenso große Bedeutung für die medizinische Forschung und Therapie erlangen, wie es als Neurotransmitter in den vergangenen Jahrzehnten schon erlangt hat.

6 Zusammenfassung

Im Hoden von Nagern (Ratte, Maus, Hamster) und Menschen konnten die GABA synthetisierenden Enzyme GAD65 und GAD67, der GABA speichernde Transporter VIAAT/VGAT und mehrere GABA-Rezeptoruntereinheiten von GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren nachgewiesen werden. Durch Immunhistochemie und RT-PCR Untersuchungen von interstitiellen Zellen, die durch Lasermikrodissektion aus Rattenhoden gewonnen wurden, wurde ferner gezeigt, dass sowohl die GABA-Quelle, als auch GABA-Rezeptoren in Leydigzellen lokalisiert sind. Dieses GABAerge System existiert im Rattenhoden in verschiedenen Phasen der postnatalen Entwicklung. So ist es bei fetalen Leydigzellen im 5-6 Tage alten Rattenhoden bereits vorhanden, ebenso wie bei adulten Leydigzellen im erwachsenen Rattenhoden.

Um Hinweise auf die Funktion von GABA zu erhalten wurden kultivierte TM3 Zellen untersucht. TM3 Zellen stammen von Mäuse-Leydigzellen ab und sind in der Lage enzymatisch aktives GAD, jedoch kein Testosteron zu synthetisieren. Die Untersuchungen zeigten, dass sie auf eine GABAerge Stimulation mit einem Anstieg ihrer Zellproliferation reagieren. Die proliferative Wirkung von GABA wurde dabei durch GABA_A-Rezeptoren übertragen, da einerseits die Proliferationssteigerung von TM3 Zellen auch mit dem GABA_A-Agonisten Isoguvacin erreicht wurde und andererseits durch den GABA_A-Antagonisten Bicucullin blockiert werden konnte. Stimulationen mit dem GABA_B-Agonisten Baclofen oder dem GABA_B-Antagonisten Phaclofen hatten hingegen keinen Einfluss auf die Proliferation von TM3 Zellen. In Western Blot Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Proliferationsmarker PCNA im Zeitverlauf der Stimulation mit Isoguvacin oder GABA in TM3 Zellen ansteigt, wobei auch dieser Effekt durch Bicucullin blockierbar war. Über mögliche Stationen des GABA_A-Rezeptor induzierten Signaltransduktionswegs in TM3 Zellen gab ein cDNA-Array erste Aufschlüsse, indem eine verstärkte Expression der Gene für c-fos und hsf-1 nachgewiesen werden konnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben ein bisher weitgehend unbekanntes lokales GABAerges System im Hoden bei Nagern und Menschen molekular identifiziert und sowohl die Synthese von GABA, als auch GABA-Rezeptoren in Leydigzellen lokalisiert. GABA stimuliert durch GABA_A-Rezeptoren die Proliferation von TM3 Leydigzellen. Übertragen auf den Hoden könnte dieses System somit einen auto- bzw. parakrinen Regulator der endokrinen Leydigzellen darstellen. Weitere

Funktionen von GABA, wie der Einfluss auf die Steroidsynthese, sind in der Literatur beschrieben. Die Erkenntnisse dieser Arbeit könnten daher auch von klinischer Bedeutung sein. Eine Vielzahl von Medikamenten, wie z. B. Benzodiazepine, Anästhetika oder Antiepileptika, entfalten ihre Wirkung über GABA-Rezeptoren, deren Existenz im Hoden bislang unbekannt war. Interessanterweise ist männliche Infertilität eine der häufigsten schwerwiegenden Nebenwirkungen vieler dieser Medikamente. Ein genaueres Verständnis des GABAergen Systems im Hoden würde es außerdem erlauben, die Funktion von Leydigzellen gezielt therapeutisch zu beeinflussen.

7 Literaturverzeichnis

- [1] **Aanesen,A., Fried,G., Andersson,E., Gottlieb,C.** Evidence for gamma-aminobutyric acid specific binding sites on human spermatozoa. *Hum.Reprod.* 10 (1995) 1885-1890
- [2] **Aanesen,A., Fried,G., Andersson,E., Gottlieb,C.** Carrier-mediated gamma-aminobutyric acid uptake in human spermatozoa indicating the presence of a high-affinity gamma-aminobutyric acid transport protein. *Biol.Reprod.* 54 (1996) 841-846
- [3] **Aanesen,A., Fried,G., Andersson,E., Gottlieb,C.** Progesterone stimulates GABA uptake in human spermatozoa. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 226 (1996) 88-93
- [4] **Adeghate,E., Ponery,A.S.** GABA in the endocrine pancreas: cellular localization and function in normal and diabetic rats. *Tissue Cell* 34 (2002) 1-6
- [5] **Akinci,M.K., Schofield,P.R.** Widespread expression of GABA(A) receptor subunits in peripheral tissues. *Neurosci.Res.* 35 (1999) 145-153
- [6] **Amat,P., Paniagua,R., Nistal,M., Martin,A.** Mitosis in adult human Leydig cells. *Cell Tissue Res.* 243 (1986) 219-221
- [7] **Ariyaratne,H.B., Chamindrani Mendis-Handagama,S.** Changes in the testis interstitium of Sprague Dawley rats from birth to sexual maturity. *Biol.Reprod.* 62 (2000) 680-690
- [8] **Baker,P.J., O'Shaughnessy,P.J.** Role of gonadotrophins in regulating numbers of Leydig and Sertoli cells during fetal and postnatal development in mice. *Reproduction.* 122 (2001) 227-234
- [9] **Bardin,C.W., Hardy,M.P., Catteral,J.F.** Reproductive Steroid Hormones: Generation, Degradation, Reception, and Action. In: *"Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology"*, Adashi,E.Y., Rock,J.A., Rosenwaks,Z. (Eds.), 1996, 505-526
- [10] **Barker,J.L., Behar,T., Li,Y.X., Liu,Q.Y., Ma,W., Maric,D., Maric,I., Schaffner,A.E., Serafini,R., Smith,S.V., Somogyi,R., Vautrin,J.Y., Wen,X.L., Xian,H.** GABAergic cells and signals in CNS development. *Perspect.Dev.Neurobiol.* 5 (1998) 305-322

- [11] **Behar,T.N., Schaffner,A.E., Scott,C.A., Greene,C.L., Barker,J.L.** GABA receptor antagonists modulate postmitotic cell migration in slice cultures of embryonic rat cortex. *Cereb.Cortex* 10 (2000) 899-909
- [12] **Behar,T.N., Schaffner,A.E., Scott,C.A., O'Connell,C., Barker,J.L.** Differential response of cortical plate and ventricular zone cells to GABA as a migration stimulus. *J.Neurosci.* 18 (1998) 6378-6387
- [13] **Behar,T.N., Smith,S.V., Kennedy,R.T., McKenzie,J.M., Maric,I., Barker,J.L.** GABA(B) receptors mediate motility signals for migrating embryonic cortical cells. *Cereb.Cortex* 11 (2001) 744-753
- [14] **Belhage,B., Hansen,G.H., Elster,L., Schousboe,A.** Effects of gamma-aminobutyric acid (GABA) on synaptogenesis and synaptic function. *Perspect.Dev.Neurobiol.* 5 (1998) 235-246
- [15] **Ben Ari,Y., Khazipov,R., Leinekugel,X., Caillard,O., Gaiarsa,J.L.** GABAA, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated 'menage a trois'. *Trends Neurosci.* 20 (1997) 523-529
- [16] **Benton,L., Shan,L.X., Hardy,M.P.** Differentiation of adult Leydig cells. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 53 (1995) 61-68
- [17] **Berninger,B., Marty,S., Zafra,F., da Penha,B.M., Thoenen,H., Lindholm,D.** GABAergic stimulation switches from enhancing to repressing BDNF expression in rat hippocampal neurons during maturation in vitro. *Development* 121 (1995) 2327-2335
- [18] **Borodinsky,L.N., Pesce,G., Pomata,P., Fiszman,M.L.** Neurosteroid modulation of GABAA receptors in the developing rat brain cortex. *Neurochem.Int.* 31 (1997) 313-317
- [19] **Brooks-Kayal,A.R., Shumate,M.D., Jin,H., Rikhter,T.Y., Kelly,M.E., Coulter,D.A.** gamma-Aminobutyric acid(A) receptor subunit expression predicts functional changes in hippocampal dentate granule cells during postnatal development. *J.Neurochem.* 77 (2001) 1266-1278
- [20] **Calogero,A.E., Burrello,N., Ferrara,E., Hall,J., Fishel,S., D'Agata,R.** Gamma-aminobutyric acid (GABA) A and B receptors mediate the stimulatory effects of GABA on the human sperm acrosome reaction: interaction with progesterone. *Fertil.Steril.* 71 (1999) 930-936
- [21] **Calogero,A.E., Hall,J., Fishel,S., Green,S., Hunter,A., D'Agata,R.** Effects of gamma-aminobutyric acid on human sperm motility and hyperactivation. *Mol.Hum.Reprod.* 2 (1996) 733-738

- [22] **Castelli,M.P., Ingianni,A., Stefanini,E., Gessa,G.L.** Distribution of GABA(B) receptor mRNAs in the rat brain and peripheral organs. *Life Sci.* 64 (1999) 1321-1328
- [23] **Chessler,S.D., Lernmark,A.** Alternative splicing of GAD67 results in the synthesis of a third form of glutamic-acid decarboxylase in human islets and other non-neural tissues. *J.Biol.Chem.* 275 (2000) 5188-5192
- [24] **Christgau,S., Schierbeck,H., Aanstoot,H.J., Aagaard,L., Begley,K., Kofod,H., Hejnaes,K., Baekkeskov,S.** Pancreatic beta cells express two autoantigenic forms of glutamic acid decarboxylase, a 65-kDa hydrophilic form and a 64-kDa amphiphilic form which can be both membrane-bound and soluble. *J.Biol.Chem.* 266 (1991) 21257-21264
- [25] **Commission on Life Sciences** *"Guide for the Care and Use of Laboratory Animals"* National Academy Press, Washington, D.C., 1996
- [26] **Cooke,H.J., Saunders,P.T.** Human genetics and disease: Mouse models of male infertility. *Nat.Rev.Genet.* 3 (2002) 790-801
- [27] **Do-Rego,J.L., Mensah-Nyagan,G.A., Beaujean,D., Vaudry,D., Sieghart,W., Luu-The,V., Pelletier,G., Vaudry,H.** gamma-Aminobutyric acid, acting through gamma-aminobutyric acid type A receptors, inhibits the biosynthesis of neurosteroids in the frog hypothalamus. *Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A.* 97 (2000) 13925-13930
- [28] **Erdo,S.L., Amenta,F.** Characterization and localization of high-affinity GABA uptake in slices of the rabbit oviduct. *Eur.J.Pharmacol.* 130 (1986) 287-294
- [29] **Erdo,S.L., Joo,F., Wolff,J.R.** Immunohistochemical localization of glutamate decarboxylase in the rat oviduct and ovary: further evidence for non-neural GABA systems. *Cell Tissue Res.* 255 (1989) 431-434
- [30] **Erdo,S.L., Lapis,E.** Presence of GABA receptors in rat oviduct. *Neurosci.Lett.* 33 (1982) 275-279
- [31] **Erdo,S.L., Wolff,J.R.** gamma-Aminobutyric acid outside the mammalian brain. *J.Neurochem.* 54 (1990) 363-372
- [32] **Espinosa,F., de la Vega-Beltran JL, Lopez-Gonzalez,I., Delgado,R., Labarca,P., Darszon,A.** Mouse sperm patch-clamp recordings reveal single Cl⁻ channels sensitive to niflumic acid, a blocker of the sperm acrosome reaction. *FEBS Lett.* 426 (1998) 47-51

- [33] **Faulkner-Jones,B.E., Cram,D.S., Kun,J., Harrison,L.C.** Localization and quantitation of expression of two glutamate decarboxylase genes in pancreatic beta-cells and other peripheral tissues of mouse and rat. *Endocrinology* 133 (1993) 2962-2972
- [34] **Fizman,M.L., Borodinsky,L.N., Neale,J.H.** GABA induces proliferation of immature cerebellar granule cells grown in vitro. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 115 (1999) 1-8
- [35] **Forray,M.I., Hidalgo,P., Diaz,F., Belmar,J.** Non-neuronal endogenous GABA efflux from the rat oviduct. *Life Sci.* 52 (1993) 811-818
- [36] **Fritschy,J.M., Paysan,J., Enna,A., Mohler,H.** Switch in the expression of rat GABAA-receptor subtypes during postnatal development: an immunohistochemical study. *J.Neurosci.* 14 (1994) 5302-5324
- [37] **Fritz,S., Kunz,L., Dimitrijevic,N., Grunert,R., Heiss,C., Mayerhofer,A.** Muscarinic receptors in human luteinized granulosa cells: activation blocks gap junctions and induces the transcription factor early growth response factor-1. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 87 (2002) 1362-1367
- [38] **Frungieri,M.B., Calandra,R.S., Lustig,L., Meineke,V., Köhn,F.M., Vogt,H.J., Mayerhofer,A.** Number, distribution pattern and identification of macrophages in the testes of infertile men. *Fertil.Steril.* 78 (2002) 298-306
- [39] **Frungieri,M.B., Gonzalez-Calvar,S.I., Calandra,R.S.** Influence of photoinhibition on GABA and glutamic acid levels, and on glutamate decarboxylase activity in the testis and epididymis of the golden hamster. *Int.J.Androl.* 19 (1996) 171-178
- [40] **Frungieri,M.B., Gonzalez-Calvar,S.I., Chandrashekar,V., Rao,J.N., Bartke,A., Calandra,R.S.** Testicular gamma-aminobutyric acid and circulating androgens in Syrian and Djungarian hamsters during sexual development. *Int.J.Androl.* 19 (1996) 164-170
- [41] **Fukura,H., Komiya,Y., Igarashi,M.** Signaling pathway downstream of GABAA receptor in the growth cone. *J.Neurochem.* 67 (1996) 1426-1434
- [42] **Gamel-Didelon,K., Corsi,C., Pepeu,G., Jung,H., Gratzl,M., Mayerhofer,A.** An autocrine role for pituitary GABA: activation of GABA-B receptors and regulation of growth hormone levels. *Neuroendocrinology* 76 (2002) 170-177

- [43] **Gilon,P., Bertrand,G., Loubatieres-Mariani,M.M., Remacle,C., Henquin,J.C.** The influence of gamma-aminobutyric acid on hormone release by the mouse and rat endocrine pancreas. *Endocrinology* 129 (1991) 2521-2529
- [44] **Grosse,J., Bulling,A., Brucker,C., Berg,U., Amsterdam,A., Mayerhofer,A., Gratzl,M.** Synaptosome-associated protein of 25 kilodaltons in oocytes and steroid-producing cells of rat and human ovary: molecular analysis and regulation by gonadotropins. *Biol.Reprod.* 63 (2000) 643-650
- [45] **Habert,R., Lejeune,H., Saez,J.M.** Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. *Mol.Cell Endocrinol.* 179 (2001) 47-74
- [46] **Hall,S.H., Berthelon,M.C., Avallet,O., Saez,J.M.** Regulation of c-fos, c-jun, jun-B, and c-myc messenger ribonucleic acids by gonadotropin and growth factors in cultured pig Leydig cell. *Endocrinology* 129 (1991) 1243-1249
- [47] **Haydar,T.F., Wang,F., Schwartz,M.L., Rakic,P.** Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. *J.Neurosci.* 20 (2000) 5764-5774
- [48] **He,X.B., Hu,J.H., Wu,Q., Yan,Y.C., Koide,S.S.** Identification of GABA(B) receptor in rat testis and sperm. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 283 (2001) 243-247
- [49] **Holmberg,C.I., Hietakangas,V., Mikhailov,A., Rantanen,J.O., Kallio,M., Meinander,A., Hellman,J., Morrice,N., MacKintosh,C., Morimoto,R.I., Eriksson,J.E., Sistonen,L.** Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1. *EMBO J.* 20 (2001) 3800-3810
- [50] **Hu,J.H., He,X.B., Wu,Q., Yan,Y.C., Koide,S.S.** Biphasic effect of GABA on rat sperm acrosome reaction: involvement of GABA(A) and GABA(B) receptors. *Arch.Androl* 48 (2002) 369-378
- [51] **Hu,J.H., He,X.B., Wu,Q., Yan,Y.C., Koide,S.S.** Subunit composition and function of GABAA receptors of rat spermatozoa. *Neurochem.Res.* 27 (2002) 195-199
- [52] **Hu,J.H., He,X.B., Yan,Y.C.** Identification of gamma-aminobutyric acid transporter (GAT1) on the rat sperm. *Cell Res.* 10 (2000) 51-58
- [53] **Hu,J.H., Yan,Y.C.** Identification of gamma1 subunit of GABA(A) receptor in rat testis. *Cell Res.* 12 (2002) 33-37

- [54] **Huntsman,M.M., Isackson,P.J., Jones,E.G.** Lamina-specific expression and activity-dependent regulation of seven GABAA receptor subunit mRNAs in monkey visual cortex. *J.Neurosci.* 14 (1994) 2236-2259
- [55] **Jorge,J.C., McIntyre,K.L., Henderson,L.P.** The function and the expression of forebrain GABA(A) receptors change with hormonal state in the adult mouse. *J.Neurobiol.* 50 (2002) 137-149
- [56] **Kataoka,Y., Gutman,Y., Guidotti,A., Panula,P., Wroblewski,J., Cosenza-Murphy,D., Wu,J.Y., Costa,E.** Intrinsic GABAergic system of adrenal chromaffin cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 81 (1984) 3218-3222
- [57] **Kelman,Z.** PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* 14 (1997) 629-640
- [58] **Krieger,N.R., Heller,J.S.** Localization of glutamic acid decarboxylase within laminae of the rat olfactory tubercle. *J.Neurochem.* 33 (1979) 299-302
- [59] **Kriegstein,A.R., Owens,D.F.** GABA may act as a self-limiting trophic factor at developing synapses. *Sci.STKE.* 95 (2001) PE1
- [60] **Kuroda,Y., Kaneko,S., Yoshimura,Y., Nozawa,S., Mikoshiba,K.** Influence of progesterone and GABAA receptor on calcium mobilization during human sperm acrosome reaction. *Arch.Androl.* 42 (1999) 185-191
- [61] **Lambert,J.J., Harney,S.C., Belelli,D., Peters,J.A.** Neurosteroid modulation of recombinant and synaptic GABAA receptors. *Int.Rev. Neurobiol.* 46 (2001) 177-205
- [62] **Lange,C.M., Bading,H.** The role of putative intragenic control elements in c-fos regulation by calcium and growth factor signalling pathways. *J.Neurochem.* 77 (2001) 1293-1300
- [63] **Laszlo,A., Villanyi,P., Zsolnai,B., Erdo,S.L.** Gamma-aminobutyric acid, its related enzymes and receptor-binding sites in the human ovary and fallopian tube. *Gynecol.Obstet.Invest* 28 (1989) 94-97
- [64] **Lauder,J.M., Liu,J., Devaud,L., Morrow,A.L.** GABA as a trophic factor for developing monoamine neurons. *Perspect.Dev.Neurobiol.* 5 (1998) 247-259
- [65] **Lejeune,H., Habert,R., Saez,J.M.** Origin, proliferation and differentiation of Leydig cells. *J.Mol.Endocrinol.* 20 (1998) 1-25

- [66] **LoTurco,J.J., Owens,D.F., Heath,M.J., Davis,M.B., Kriegstein,A.R.** GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* 15 (1995) 1287-1298
- [67] **Lux-Lantos,V., Becu-Villalobos,D., Bianchi,M., Rey-Roldan,E., Chamson-Reig,A., Pignataro,O., Libertun,C.** GABA(B) receptors in anterior pituitary cells. Mechanism of action coupled to endocrine effects. *Neuroendocrinology* 73 (2001) 334-343
- [68] **Maric,D., Liu,Q.Y., Maric,I., Chaudry,S., Chang,Y.H., Smith,S.V., Sieghart,W., Fritschy,J.M., Barker,J.L.** GABA expression dominates neuronal lineage progression in the embryonic rat neocortex and facilitates neurite outgrowth via GABA(A) autoreceptor/Cl⁻ channels. *J.Neurosci.* 21 (2001) 2343-2360
- [69] **Martin del Rio,R.** Gamma-aminobutyric acid system in rat oviduct. *J.Biol. Chem.* 256 (1981) 9816-9819
- [70] **Marty,S., Berninger,B., Carroll,P., Thoenen,H.** GABAergic stimulation regulates the phenotype of hippocampal interneurons through the regulation of brain-derived neurotrophic factor. *Neuron* 16 (1996) 565-570
- [71] **Mayerhofer,A., Frungieri,M.B., Fritz,S., Bulling,A., Jessberger,B., Vogt,H.J.** Evidence for catecholaminergic, neuronlike cells in the adult human testis: changes associated with testicular pathologies. *J.Androl.* 20 (1999) 341-347
- [72] **Mayerhofer,A., Hohne-Zell,B., Gamel-Didelon,K., Jung,H., Redecker,P., Grube,D., Urbanski,H.F., Gasnier,B., Fritschy,J.M., Gratzl,M.** Gamma-aminobutyric acid (GABA): a para- and/or autocrine hormone in the pituitary. *FASEB J.* 15 (2001) 1089-1091
- [73] **Mayerhofer,A., Russell,L.D., Grothe,C., Rudolf,M., Gratzl,M.** Presence and localization of a 30-kDa basic fibroblast growth factor-like protein in rodent testes. *Endocrinology* 129 (1991) 921-924
- [74] **Meizel,S.** Amino acid neurotransmitter receptor/chloride channels of mammalian sperm and the acrosome reaction. *Biol.Reprod.* 56 (1997) 569-574
- [75] **Mellon,S.H., Griffin,L.D., Compagnone,N.A.** Biosynthesis and action of neurosteroids. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 37 (2001) 3-12
- [76] **Mendis-Handagama,S.M., Ariyaratne,H.B.** Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol.Reprod.* 65 (2001) 660-671

- [77] **Mensah-Nyagan,A.G., Do-Rego,J.L., Beaujean,D., Luu-The,V., Pelletier, G., Vaudry,H.** Regulation of neurosteroid biosynthesis in the frog diencephalon by GABA and endozepines. *Horm.Behav.* 40 (2001) 218-225
- [78] **Michelsen,B.K., Petersen,J.S., Boel,E., Moldrup,A., Dyrberg,T., Madsen,O.D.** Cloning, characterization, and autoimmune recognition of rat islet glutamic acid decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88 (1991) 8754-8758
- [79] **Murashima,Y.L., Kato,T.** Distribution of gamma-aminobutyric acid and glutamate decarboxylase in the layers of rat oviduct. *J.Neurochem.* 46 (1986) 166-172
- [80] **Nguyen,L., Rigo,J.M., Rocher,V., Belachew,S., Malgrange,B., Register,B., Leprince,P., Moonen,G.** Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. *Cell Tissue Res.* 305 (2001) 187-202
- [81] **O'Shaughnessy,P.J., Baker,P., Sohnius,U., Haavisto,A.M., Charlton,H.M., Huhtaniemi,I.** Fetal development of Leydig cell activity in the mouse is independent of pituitary gonadotroph function. *Endocrinology* 139 (1998) 1141-1146
- [82] **O'Shaughnessy,P.J., Johnston,H., Willerton,L., Baker,P.J.** Failure of normal adult Leydig cell development in androgen-receptor-deficient mice. *J.Cell Sci.* 115 (2002) 3491-3496
- [83] **Orensanz,L.M., Fernandez,I., Martin,d.R., Storm-Mathisen,J.** Gamma-aminobutyric acid in the rat oviduct. *Adv.Biochem.Psychopharmacol.* 42 (1986) 265-274
- [84] **Owens,D.F., Kriegstein,A.R.** Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat.Rev.Neurosci.* 3 (2002) 715-727
- [85] **Owens,D.F., Liu,X., Kriegstein,A.R.** Changing properties of GABA(A) receptor-mediated signaling during early neocortical development. *J.Neurophysiol.* 82 (1999) 570-583
- [86] **Persson,H., Pelto-Huikko,M., Metsis,M., Soder,O., Brene,S., Skog,S., Hokfelt,T., Ritzen,E.M.** Expression of the neurotransmitter-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase in male germ cells. *Mol.Cell Biol.* 10 (1990) 4701-4711
- [87] **Pirkkala,L., Nykanen,P., Sistonen,L.** Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J.* 15 (2001) 1118-1131

- [88] **Prince,F.P.** The triphasic nature of Leydig cell development in humans, and comments on nomenclature. *J.Endocrinol.* 168 (2001) 213-216
- [89] **Ritta,M.N., Calamera,J.C., Bas,D.E.** Occurrence of GABA and GABA receptors in human spermatozoa. *Mol.Hum.Reprod.* 4 (1998) 769-773
- [90] **Ritta,M.N., Calandra,R.S.** Occurrence of GABA in rat testis and its effect on androgen production. *Adv.Biochem.Psychopharmacol.* 42 (1986) 291-297
- [91] **Ritta,M.N., Calandra,R.S.** Testicular interstitial cells as targets for peripheral benzodiazepines. *Neuroendocrinology.* 49 (1989) 262-266
- [92] **Ritta,M.N., Campos,M.B., Calandra,R.S.** Effect of GABA and benzodiazepines on testicular androgen production. *Life Sci.* 40 (1987) 791-798
- [93] **Ritta,M.N., Campos,M.B., Calandra,R.S.** Coexistence of gamma-aminobutyric acid type A and type B receptors in testicular interstitial cells. *J.Neurochem.* 56 (1991) 1236-1240
- [94] **Rorsman,P., Berggren,P.O., Bokvist,K., Ericson,H., Mohler,H., Ostenson,C.G., Smith,P.A.** Glucose-inhibition of glucagon secretion involves activation of GABAA-receptor chloride channels. *Nature* 341 (1989) 233-236
- [95] **Russell,L.D., de Franca,L.R., Hess,R., Cooke,P.** Characteristics of mitotic cells in developing and adult testes with observations on cell lineages. *Tissue Cell* 27 (1995) 105-128
- [96] **Saravia-Fernandez,F., Faveeuw,C., Blasquez-Bulant,C., Tappaz,M., Throsby,M., Pelletier,G., Vaudry,H., Dardenne,M., Homo-Delarche,F.** Localization of gamma-aminobutyric acid and glutamic acid decarboxylase in the pancreas of the nonobese diabetic mouse. *Endocrinology* 137 (1996) 3497-3506
- [97] **Satin,L.S., Kinard,T.A.** Neurotransmitters and their receptors in the islets of Langerhans of the pancreas: what messages do acetylcholine, glutamate, and GABA transmit? *Endocrine.* 8 (1998) 213-223
- [98] **Schultz,R., Kononen,J., Pelto-Huikko,M.** Induction of immediate early gene mRNAs and proteins by hCG in interstitial cells of rat testis. *J.Endocrinol.* 144 (1995) 417-424

- [99] **Schumacher,M., Akwa,Y., Guennoun,R., Robert,F., Labombarda,F., Desarnaud,F., Robel,P., De Nicola,A.F., Baulieu,E.E.** Steroid synthesis and metabolism in the nervous system: trophic and protective effects. *J.Neurocytol.* 29 (2000) 307-326
- [100] **Shi,Q.X., Roldan,E.R.** Evidence that a GABAA-like receptor is involved in progesterone-induced acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. *Biol.Reprod.* 52 (1995) 373-381
- [101] **Shi,Q.X., Yuan,Y.Y., Roldan,E.R.** gamma-Aminobutyric acid (GABA) induces the acrosome reaction in human spermatozoa. *Mol.Hum.Reprod.* 3 (1997) 677-683
- [102] **Siril Ariyaratne,H.B., Chamindrani Mendis-Handagama,S., Buchanan, H.D., Ian,M.J.** Studies on the onset of Leydig precursor cell differentiation in the prepubertal rat testis. *Biol.Reprod.* 63 (2000) 165-171
- [103] **Soncin,F., Asea,A., Zhang,X., Stevenson,M.A., Calderwood,S.K.** Role of calcium activated kinases and phosphatases in heat shock factor-1 activation. *Int.J.Mol.Med.* 6 (2000) 705-710
- [104] **Sriraman,V., Rao,V.S., Sairam,M.R., Rao,A.J.** Effect of deprivation of LH on Leydig cell proliferation: involvement of PCNA, cyclin D3 and IGF-1. *Mol.Cell Endocrinol.* 162 (2000) 113-120
- [105] **Tanaka,C.** gamma-Aminobutyric acid in peripheral tissues. *Life Sci.* 37 (1985) 2221-2235
- [106] **Tillakaratne,N.J., Erlander,M.G., Collard,M.W., Greif,K.F., Tobin,A.J.** Glutamate decarboxylases in nonneural cells of rat testis and oviduct: differential expression of GAD65 and GAD67. *J.Neurochem.* 58 (1992) 618-627
- [107] **Tillakaratne,N.J., Medina-Kauwe,L., Gibson,K.M.** gamma-Aminobutyric acid (GABA) metabolism in mammalian neural and nonneural tissues. *Comp.Biochem.Physiol.A.Physiol.* 112 (1995) 247-263
- [108] **Varju,P., Katarova,Z., Madarasz,E., Szabo,G.** GABA signalling during development: new data and old questions. *Cell Tissue Res.* 305 (2001) 239-246
- [109] **Waagepetersen,H.S., Sonnewald,U., Schousboe,A.** The GABA paradox: multiple roles as metabolite, neurotransmitter, and neurodifferentiative agent. *J.Neurochem.* 73 (1999) 1335-1342

-
- [110] **Wolff,J.R., Joo,F., Dames,W.** Plasticity in dendrites shown by continuous GABA administration in superior cervical ganglion of adult rat. *Nature* 274 (1978) 72-74
- [111] **Zhang,F.P., Poutanen,M., Wilbertz,J., Huhtaniemi,I.** Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. *Mol.Endocrinol.* 15 (2001) 172-183

Anhang

Eigene Veröffentlichungen

Zeitschriftenartikel

Geigerseder,C., Doepner,R., Thalhammer,A., Frungieri,M.B., Gamel-Didelon, K., Calandra,R.S., Köhn,F.M., Mayerhofer,A. Evidence for a GABAergic System in Rodent and Human Testis: Local GABA Production and GABA Receptors. *Neuroendocrinology* 77 (2003) 314-323.

Kongressbeiträge

Fritz,S., Geigerseder,C., Dissen,G.A., Ojeda,S.R., Mayerhofer,A. Muscarinic receptor gene expression in primate ovary and testis. 44.Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, München, Juni 2000. Abstract erschienen in *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 108 [Suppl.1] (2000) 175.

Geigerseder,C., Thalhammer,A., Mayerhofer,A. Testicular TM3 cells produce GABA and respond to GABA by increased cell proliferation. 18.Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg, September 2001. Abstract erschienen in *Annals of Anatomy* 184 [Suppl.] (2002) 214.

Geigerseder,C., Doepner,R.F.G., Fruingieri,M.B., Calandra,R.S., Gamel-Didelon,K., Köhn,F.M., Mayerhofer,A. A neuroendocrine system in the testis: Local γ -aminobutyric acid (GABA) production and testicular GABA receptors. 10th Meeting of the European Neuroendocrine Association, München, September 2002. Abstract erschienen in *10th Meeting of the European Neuroendocrine Association Programme & Abstracts* (2002) 121.

Geigerseder,C., Maly,S., Riede,M. Von der Wiederentdeckung der Selbstzwecklichkeit – Provokationen für das Bildungswesen durch eine Ethik der Bildung. Kongress „McKinsey – bildet“, Berlin, September 2002.

Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. Artur Mayerhofer danke ich sehr herzlich für die hervorragende und intensive Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit. Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. Johannes Ring danke ich für die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit gegenüber der TU München. Herrn Univ.-Prof. Dr. Manfred Gratzl danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für seine engagierte Unterstützung.

Herrn Dr. Viktor Meineke danke für den Zugang zu den Gerätschaften für die Lasermikrodissektion. Herrn Prof. Dr. Hermann-Josef Vogt und Herrn PD Dr. Frank-Michael Köhn danke ich für die Überlassung der humanen Hodenbiopsien.

Frau Dr. Martina Haasemann danke ich für die qualifizierte und freundschaftliche Betreuung im Graduiertenkolleg 333 der DFG.

Für weitere kritische Diskussionen und Durchsicht dieser Arbeit danke ich besonders Dr. Lars Kunz.

Für die gute Zusammenarbeit und eine freundliche Arbeitsatmosphäre danke ich außerdem Dr. Martin Albrecht, Dr. Andreas Bulling, Prof. Dr. Ricardo S. Calandra, Dr. Katia Didelon-Gamel, Dr. Nicola Dimitrijevic, Richard Doepner, Katrin End, Dr. Angela Finzel, Dr. Stefanie Fritz, Dr. Mónica B. Frungieri, Dr. Silvia Gonzalez-Calvar, Dr. Ágnes Ágoston, Pia Körner, Annette Krieger, Andreas Mauermayer, Klaus Metzeler, Karin Metzrath, Gerhard Prechtner, Romi Rämisch, Marlies Rauchfuß, Dr. Axel W. Reinhardt, Andrea Thalhammer, Gabriele Terfloth, Astrid Tiefenbacher, Univ.-Prof. Dr. Laurenz J. Wurzinger und Barbara Zschesche.