

Aus der Anatomischen Anstalt
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Leitung: Prof. Dr. Manfred Gratzl

Thema der Dissertation:
Molekulare Effekte von GABA in adulten - und TM3 Leydig-Zellen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Richard Fritz Georg Doepner
aus
Berlin
Jahr
2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. A.Mayerhofer

Prof. Dr. M. Meyer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Reincke

Prof. Dr. I. Golly

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 29.06.2006

γνῶθι σεαυτόν

-

Erkenne dich selbst

(überlieferte Inschrift am Eingang des Tempels des Apollon in Delphi)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	10
1.1 Die Leydig-Zelle.....	10
1.1.1 Lokalisation und Entwicklung	10
1.1.2 Regulation und Funktion.....	12
1.2 γ-Aminobuttersäure (GABA).....	13
1.2.1 Das GABAerge System: Metabolismus, Freisetzung, Rezeptoren.....	13
1.2.2 GABA als Neurotransmitter im ZNS	15
1.2.3 GABA in peripheren endokrinen Geweben.....	15
1.2.4 GABA im Hoden	16
1.3 Zielsetzung	17
2. Material und Methoden	18
2.1 Material	18
2.1.1 Gewebe und Zellen	18
2.1.1.1 TM3 Leydig-Zellen	18
2.1.1.2 Hoden	18
2.1.1.3 Adulte Leydig-Zellen	18
2.1.2 Antikörper	19
2.1.3 Oligonukleotid-Primer, Gendatenbank und Sequenzierung.....	20
2.1.4 Medien und Lösungen.....	22
2.1.5 Herstellerverzeichnis	24
2.2 Methoden	26
2.2.1 Zellkultur.....	26
2.2.1.1 Isolierung der adulten Leydig-Zellen.....	26
2.2.1.2 Kultur der isolierten adulten Leydig-Zellen.....	26
2.2.1.3 Kultur der TM3 Leydig-Zellen.....	27
2.2.1.4 Stimulationsbedingungen.....	27
2.2.2 Molekularbiologie	28
2.2.2.1 RNA Präparation.....	28
2.2.2.2 Reverse Transkription (RT) inklusive DNase Behandlung	28

2.2.2.3 Polymerase chain reaction (PCR).....	30
2.2.2.3 DNA-Agarose-Gelelektrophorese	32
2.2.2.4 cDNA-Array.....	33
2.2.2.5 cAMP-Assay	38
2.2.3 Proteinbiochemie.....	38
2.2.3.1 Protein Präparation	38
2.2.3.2 SDS-Page und Western Blotting.....	39
2.2.4 Immunfluoreszenz Untersuchungen.....	40
2.2.5 Immunhistochemie	41
2.2.6 Radioimmunoassay	42
2.2.7 Elektrophysiologie	43
2.2.7.1 Patch-Clamp	43
2.2.7.2 Ca ²⁺ -Messungen.....	43
2.2.7.3 Applikation der Stimulantien.....	44
2.2.7.4 Messungen des Membranpotentials	44
3. Resultate.....	45
3.1 GABA und GABA Rezeptoren in Leydig-Zellen.....	45
3.1.1 TM3 Leydig-Zellen besitzen ein GABAerges System.....	45
3.1.2 Adulte Leydig-Zellen besitzen ein GABAerges System.....	47
3.2 Molekulare Effekte von GABA in Leydig-Zellen	47
3.2.1 GABA und Isoguvacin induzieren egr-1 in Leydig-Zellen	47
3.2.2 GABA und Isoguvacin regulieren die MAP-Kinasen (ERK1/2)	49
3.2.3 GABA und die Second Messenger Ca ²⁺ und cAMP	50
3.2.3 Elektrophysiologische Untersuchungen und Messung des Membranpotentials	51
3.2.4 Regulation des LH-Rezeptors und Produktion von Testosteron.....	52
3.3 GABA und GABA Rezeptoren im sich entwickelnden Hoden.....	53
3.3.1 Das GABAerge System in d5, d20, d35 alten Mäusehoden.....	53
3.3.2 Egr- 1 Expression im postnatalen Hoden	56

4. Diskussion.....	58
4.1 Das GABAerge System in Leydig-Zellen	58
4.2 Funktion und molekulare Effekte von GABA in Leydig-Zellen	59
4.3 GABA im sich entwickelnden Hoden	63
4.4 Klinische Aspekte von GABA in Leydig-Zellen	65
5. Zusammenfassung	67
6. Literaturverzeichnis	68
7. Anhang.....	80

Abkürzungsverzeichnis

AChE	Acetylcholinesterase
ALZ	adulte Leydig-Zelle
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BMP4	Bone morphogenetic protein 4
C	Celsius
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Ca ²⁺	Kalzium
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
cpm	Counts per minute
d	dies
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethyl-pyrocarbonat
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
dpc	dies post conceptionem
3β-HSD	3 β-Hydroxysteroiddehydrogenase
EDTA	Ethylen-diamin-tetraessigsäure
11β-HSD	11β-Hydroxysteroiddehydrogenase
egr-1	Early growth response-factor 1
erk1/erk2	Extracellular signal-regulated protein kinase1/2(=MAPK)
FCS/FKS	Fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FLZ	fetale Leydig-Zelle
g	Fallbeschleunigung (9,81 m/s ²)
g	Gramm
GABA	γ-Aminobuttersäure
GABA-T	GABA Transaminase
GAD65/67	Glutamat Decarboxylase 65kDa/67kDa
GAT 1-4	GABA Transporter 1-4
h	hora (Stunde)
HEPES	N-2-hydroxypiperazin-N'-ethan-sulfonsäure
hCG	humanes Choriongonadotropin
HCl	Salzsäure
Hz	Hertz
IHC	Immunhistochemie
IGF-I	Insulin like growth factor – I
IgG	Immunglobulin G
ISO	Isoguvacin
IZ	Immunfluoreszenz
kDa	tausend Dalton
LDL	Low density lipoproteins
LH	Luteinisierendes Hormon
LZ	Leydig-Zelle
M	molar (mol/l)
MAPK	Mitogen activated protein kinase
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter

MMTV	Mouse mammary tumor virus
mRNA	messenger RNA
mV	Millivolt
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PAGE	Polyakrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF-A	Platelet derived growth factor – A
PFA	Paraformaldehyd
pMAPK	phospho MAPK
POX	Peroxidase
pp	post partum
PS	Pferdeserum
RIA	Radioimmunoassay
RLZ	reife Leydig-Zelle
RNA/RNS	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SSADH	Succinyl Semialdehyd Dehydrogenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
TGF β	Tumor growth factor β
Trp53	Transformation related protein 53
TTP	Thymidintriphosphat
U/min	Umdrehungen pro Minute
ULZ	unreife Leydig-Zelle
UV-Licht	Ultra-violettes Licht
V	Volt
V_R	Membranpotential
VIAAT	Vesicular inhibitory amino acid transporter
VLZ	Vorläufer Leydig-Zelle
WB	Western Blot
Wnt	Wingless-related MMTV integration site
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Die Leydig-Zelle

Die Leydig-Zelle wurde 1850 von Franz von Leydig im Interstitium des Säugetierhodens entdeckt [88]. Anfang des 20. Jahrhunderts wurde dann eine endokrine Aktivität dieser Zellen angenommen [19]. Es dauerte jedoch bis in die 60er Jahre des letzten Jahrhunderts, bis mit Hilfe isolierter Hodenkompartimente (Tubuli seminiferi und interstitielles Gewebe) gezeigt werden konnte, dass die Leydig-Zelle die Hauptquelle für testikuläre Androgene ist. Ende der 60er, Anfang der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts wurden dann die hormonellen Regelkreise zwischen Hypothalamus, Hypophyse und Hoden aufgezeigt und die prinzipiellen biosynthetischen und metabolischen Passwege der Steroidhormone in Leydig-Zellen beschrieben [36]. Im Folgenden wird die Leydig-Zelle näher dargestellt, dabei wird besonderes Augenmerk auf die Entwicklung der Leydig-Zelle und nachfolgend auf ihre physiologische Funktion und deren Regulationsmechanismen gelegt.

1.1.1 Lokalisation und Entwicklung

Die Entwicklung der Leydig-Zellen scheint in den meisten Säugetierordnungen ähnlich abzulaufen [101], die meisten gesicherten Daten sind jedoch durch Forschungen an Nagetieren, vor allem in Ratte und Maus, ermittelt worden. Deshalb und aufgrund der Tatsache, dass sich die vorliegende Arbeit mit den Leydig-Zellen der Maus befasst, wird im speziellen die Entwicklung und Differenzierung der Nagetier Leydig-Zellen dargestellt. Grundsätzlich sind zwei Entwicklungsreihen zu unterscheiden: 1. Die Entwicklung von fetalen Leydig-Zellen (FLZ) und 2. die Entwicklung von adulten Leydig-Zellen (ALZ).

Die fetale Leydig-Zellentwicklung der Nager geht von mesenchymalen Stammzellen aus [25]. Diese Zellen sind mesodermalen Ursprungs und wandern 10 -11 Tage post conceptionem (dpc) aus dem Mesonephros in das sich entwickelnde Interstitium des Hodens [23;104]. Aus diesen mesenchymalen Stammzellen entwickeln sich um den 12 dpc Vorläufer Leydig-Zellen (VLZ), die ab 13,5 dpc in der Maus und 15 dpc in der Ratte 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (3 β -HSD) exprimieren [63;104] und bald mit der Bildung von Testosteron beginnen. Das Startsignal für den Beginn der Differenzierung ist bis jetzt noch nicht identifiziert. Luteinisierendes Hormon (LH)

konnte jedoch als auslösender Stimulus ausgeschlossen werden [38]. Um den 15 dpc differenzieren sich die VLZ weiter zu fetalen Leydig-Zellen (FLZ). Nun beginnt die Population der FLZ in der Zahl zuzunehmen. Die Zellzahl verdoppelt sich jeweils von 16 bis 18,5 dpc und von 18,5 bis 21,5 dpc [80;105]. Diese Zellzahlzunahme wird nicht durch Proliferation der bereits differenzierten FLZ hervorgerufen, sondern ist durch weitere kontinuierliche Ausdifferenzierung mesenchymaler Stammzellen bedingt [115]. Fetale Leydig-Zellen bilden von 15 dpc bis zu ihrer funktionellen Rückbildung gegen Ende der Fetalperiode Testosteron und steuern so die Ausbildung eines männlichen Genitaltraktes. Wie eben beschrieben bilden sich die fetalen Leydig-Zellen um den Zeitpunkt der Geburt funktionell zurück, bleiben aber das ganze Leben lang im Hoden nachweisbar [60;62;64;74].

Um den 12. Tag post partum (pp) beginnt die Entwicklung der adulten Leydig-Zellen ebenfalls aus der Population von mesenchymalen Stammzellen des Hodeninterstitiums, welche während der Embryonalperiode in den Hoden gewandert sind [25]. Der erste Schritt in der Entwicklung zur ALZ ist die Transformation der mesenchymalen Stammzellen in adulte Vorläufer Leydig-Zellen (VLZ). Diese beiden Zelltypen sind morphologisch identisch, lediglich der biochemische Nachweis von Steroidhormon bildenden Enzymen und die Produktion von Androgenen durch die adulte VLZ macht diese Zellen von den mesenchymalen Stammzellen unterscheidbar [7;65;66;68]. Da LH-Rezeptoren erst von den adulten VLZ exprimiert werden, ist auch der erste Schritt in der ALZ Entwicklung LH unabhängig [69]. Der nächste Zelltyp in der Leydig-Zellreihe ist die „neu geformte adulte Leydig-Zelle“. Dieser Zelltyp unterscheidet sich von der vorherigen durch ihre runde Form im Gegensatz zur Spindelform der Stamm- und adulten Vorläuferzellen [33]. Nun entwickelt sich die unreife Leydig-Zelle (ULZ), welche ebenfalls eine runde Form aufweist, im Vergleich zum vorherigen Zelltyp jedoch größer ist und zytoplasmatische Fetttröpfchen enthält [7;158]. Des Weiteren sind die ULZ im Gegensatz zu den „neu geformten ALZ positiv für 11 β -HSD [7;102;119]. Der letzte Schritt in der Entwicklung der adulten Leydig-Zelle ist die Differenzierung der ULZ zu reifen Leydig-Zellen (RLZ). Die reife adulte Leydig-Zelle nimmt im Vergleich zur unreifen Leydig-Zelle wiederum an Größe zu [7]. Weitere Unterscheidungsmerkmale sind der Verlust der zytoplasmatischen Fetttröpfchen [75;103;128;158], Volumenvergrößerung des glatten endoplasmatischen Retikulums, höhere steroidogene Enzymaktivität und vermehrte Produktion von Testosteron [35]. Mit der Vollendung dieses Prozesses ist

die Pubertät erreicht. In **Abbildung 1.1** ist die Entwicklung der ALZ schematisch dargestellt.

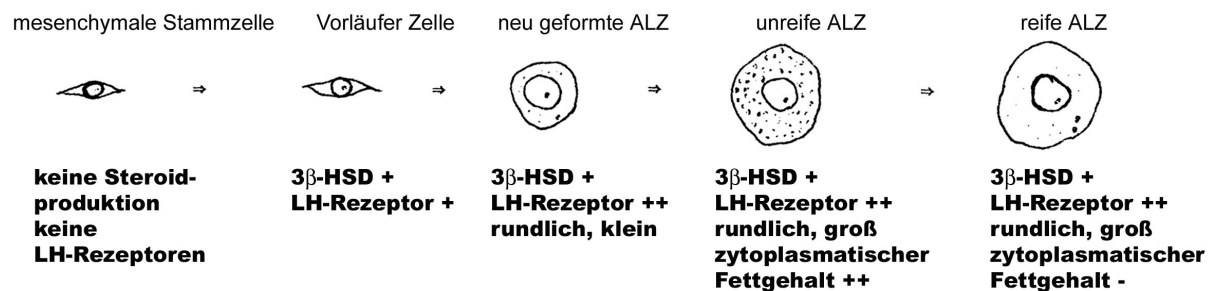


Abbildung 1.1 Schema der adulten Leydig-Zellentwicklung (modifiziert aus [101]).

Die präpubertäre und pubertäre Vervielfältigung der postnatalen Leydig-Zellen unterliegt zwei Mechanismen: der oben beschriebenen Entwicklung aus mesenchymalen Stammzellen und der mitotischen Teilung von neu geformten adulten Leydig-Zellen [29;32]. Nach Abschluss der Pubertät wird die Leydig-Zellpopulation durch Proliferation konstant gehalten [4;8;75;128].

Im Verlaufe der Differenzierung beider Zellreihen (fetale Leydig-Zellreihe, adulte Leydig-Zellreihe), wandern die Zellen von der peritubulären Lokalisation der mesenchymalen Stammzellen und der Vorläufer Leydig-Zellen ins zentrale Hodeninterstitium.

1.1.2 Regulation und Funktion

Wie schon in Kapitel 1.1.1 angedeutet reguliert die fetale Leydig-Zelle die Entwicklung des männlichen Genitaltraktes mittels Testosteron. Die adulte Leydig-Zelle steuert die Entwicklung der sekundären Geschlechtsmerkmale sowie die Spermatogenese. Beide Zellen produzieren Testosteron unter der Kontrolle der Adenohypophyse (Hypothalamus-Hypophysen-System) und dem von ihr gebildeten LH, wobei das von den Leydig-Zellen gebildete Testosteron auf der hypothalamischen und hypophysären Ebene die Freisetzung von LH hemmt (negatives Feedback). Neben der hypophysären Kontrolle der Leydig-Zellen scheinen noch andere, vorwiegend lokale, para-/autokrin wirkende Faktoren zu existieren, die die Leydig-Zellfunktion beeinflussen z.B. „insulin like growth factor – I“ (IGF-I), „tumor growth factor β “ (TGF β), „platelet derived growth factor – A“ (PDGF-A), Interleukin – I und viele Andere mehr. Diese Faktoren beeinflussen

unterschiedliche Funktionen und Zellaktionen, wie Steroidproduktion, Zelldifferenzierung und Proliferation [61]. In dieser Arbeit werden die molekularen Effekte eines weiteren lokalen Faktors auf Leydig-Zellen untersucht: Die Wirkung von γ -Aminobuttersäure (GABA), von der gezeigt wurde, dass sie die Androgenproduktion im Hoden anregt [124;125] und dass sie die Proliferation von TM3 Leydig-Zellen steigert [58]. Des Weiteren wird angenommen, dass GABA eine Funktion in der Entwicklung der Leydig-Zellen hat [58].

1.2 γ -Aminobuttersäure (GABA)

1.2.1 Das GABAerge System: Metabolismus, Freisetzung, Rezeptoren

GABA wird aus Glutamat durch die Glutamat Decarboxylase (GAD) gebildet. Von diesem Enzym sind vier Isoformen bekannt: GAD 25, GAD 44, GAD 65 und GAD 67 [142]. GAD 25 und GAD 44 sind Splicevarianten von GAD 67 [142]. GAD 65 hingegen wird von einem eigenen Gen kodiert [22;44]. GAD 25 ist die einzige Form des Isoenzym, das keine enzymatische Aktivität besitzt und dessen Funktion noch nicht geklärt werden konnte [142]. Die verschiedenen Isoformen von GAD unterscheiden sich in ihrem zeitlichen Erscheinen in der Entwicklung, im Vorkommen in unterschiedlichen Geweben, in der intrazellulären Lokalisation sowie in der enzymatischen Aktivität. GAD 25 und 44 scheinen vor allem in der Embryonal- und Perinatalperiode in Neuronen vorzukommen [142;147], während GAD 67 erst ab der Geburt nachweisbar ist und 4 Wochen pp das adulte Expressionsniveau erreicht [141;142]. GAD 65 tritt als letzte der Isoformen auf [138]. Wie oben beschrieben, sind nach der Geburt GAD 65 und GAD 67 die dominanten Isoformen im Gehirn. Sie unterscheiden sich nicht nur in ihrem zeitlich differierenden Auftreten, sondern auch in ihrer intrazellulären Lokalisation. So ist GAD 67 im Zytoplasma lokalisiert und scheint für die Produktion von nicht vesikulär sezerniertem GABA verantwortlich zu sein [45;121]. GAD 65 hingegen ist vorwiegend in den Nervenendigungen lokalisiert [45;78], dort an synaptische Vesikel gebunden [70] und für die Produktion von vesikulär sezerniertem GABA zuständig. Als Coenzym benötigen beide Formen Pyridoxalphosphat [94;95].

GABA kann, wie gerade beschrieben, durch zwei grundsätzlich verschiedene Mechanismen die Zelle verlassen: 1. durch geregelte Exozytose aus vesikulären Speichern oder 2. durch Sekretion aus nicht vesikulären zytoplasmatischen Speichern. Um GABA mit Hilfe von Vesikeln auszuschleusen wird es mittels eines Transportproteins (vesicular inhibitory amino acid transporter - VIAAT) in zytoplasmatische Vesikel aufgenommen und dort bis zur Exozytose gespeichert [56]. Nicht vesikuläre GABA Sekretion scheint besonders in der frühen Phase der neuronalen Entwicklung vorzukommen [149]. Sie wird von Membran gebundenen GABA Transportern (GAT 1-4) übernommen, von denen bekannt ist, dass sie GABA bidirektional transportieren können [109]. Die GAT Proteine sind somit auch für die Wiederaufnahme von GABA in die Zelle zuständig. Dieser Mechanismus sowie der enzymatische Abbau durch GABA Transaminase (GABA-T) beenden die extrazelluläre GABA Wirkung [59]. Durch den Abbau von GABA durch die Succinyl Semialdehyd Dehydrogenase (SSADH) zu Succinat kann GABA auch in den Zitronensäurezyklus eingeschleust und zur Energiegewinnung verwendet werden (so genannter GABA-Shunt) [12].

In der aktuellen Literatur werden drei unterschiedliche GABA Rezeptortypen unterschieden über die GABA seine Wirkung vermittelt: die ionotropen GABA_A und GABA_C Rezeptoren sowie der metabotrope GABA_B Rezeptor (zusammengefasst in [17]). Der GABA_A Rezeptor ist ein Cl⁻ Kanal, der aus fünf Untereinheiten gebildet wird. Diese fünf Untereinheiten können aus einem Pool von 16 verschiedenen Untereinheiten rekrutiert werden, die sich in 7 Familien zusammenfassen lassen: α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , θ , π [13]. Der GABA_C Rezeptor ist ebenfalls ein Cl⁻ Kanal, der jedoch aus fünf Untereinheiten einer einzigen Familie (ρ 1-3) gebildet wird [17].

	Agonist	Antagonist
GABA _A Rezeptor	Isoguvacin	Biccucullin
GABA _B Rezeptor	Baclofen	Phaclofen
GABA _C Rezeptor	CACA	TPMPA

Tabelle 1.1 Ausgewählte GABA_A, GABA_B und GABA_C Rezeptor Agonisten und Antagonisten.

Der GABA_B Rezeptor wird aus den zwei Untereinheiten R1 und R2 gebildet und gehört zu den G – Protein gekoppelten Rezeptoren. Diese Rezeptoren übertragen ein Signal auf intrazelluläre Second Messenger Systeme und beeinflussen so Enzymaktivitäten, Rezeptorfunktionen, Kanalöffnungszeiten und viele andere zelluläre Funktionen [20]. Für die drei Rezeptortypen existieren verschiedene mehr oder weniger spezifische Agonisten und Antagonisten (s. **Tabelle 1.1**).

1.2.2 GABA als Neurotransmitter im ZNS

GABA wurde erstmals Anfang der 50er Jahre des 20. Jahrhunderts im ZNS der Säugetiere entdeckt [10;11;127]. In den nächsten zwei Jahrzehnten wurde die Funktion von GABA als inhibitorischer Neurotransmitter in Wirbeltieren bewiesen [126]. GABA wird im Gehirn mittels Ca²⁺-abhängiger vesikulärer Exozytose freigesetzt und kann sowohl prä- als auch postsynaptisch über seine Rezeptoren zu einer Hemmung der Impulsübertragung/ -weiterleitung führen. Über GABA_A und GABA_C Rezeptoren führt GABA dabei üblicherweise zu Cl⁻ Einstrom in die Zellen und bewirkt so eine Zellmembranhyperpolarisation. GABA_B Rezeptoren bewirken präsynaptisch eine Reduktion des Ca²⁺-Stromes und somit eine Verminderung der Transmitterfreisetzung. Postsynaptisch führt eine GABA_B Rezeptoraktivierung zur Öffnung von Kaliumkanälen mit konsekutiver Hyperpolarisation der Zelle [16]. In den letzten Jahren wurden weitere Funktionen von GABA im ZNS offenbar. Es wurde gezeigt, dass GABA die Proliferation, Differenzierung und das Neuritenwachstum neuronaler Zellen beeinflusst (zusammengefasst in [117]). Hier scheint nicht vesikuläre GABA Sekretion über GAT Proteine wichtig zu sein [9]. Ein weiterer Unterschied in der Wirkungsweise von GABA im reifen Gehirn im Vergleich mit seiner Wirkung in der Entwicklung des ZNS ist, dass GABA in der Hirnentwicklung die Nervenzellen depolarisiert. Dieser Wechsel der elektrophysiologischen Eigenschaften der ionotropen GABA Rezeptoren wird mit der höheren intrazellulären Cl⁻ Konzentration in unreifen Nervenzellen erklärt [116].

1.2.3 GABA in peripheren endokrinen Geweben

In den letzten Jahrzehnten zeigte sich, dass GABA nicht nur eine Funktion als Neurotransmitter hat, sondern auch außerhalb des ZNS vorkommt. So wurde GABA und sein synthetisierendes Enzym GAD in einigen peripheren Organen wie Leber, Nebenniere, Niere, Pankreas etc. beschrieben. Dort regelt GABA unterschiedliche Zellfunktionen und Aktivitäten. GABA steuert beispielsweise in der Nebenniere die

Katecholaminfreisetzung und nimmt in der Bauchspeicheldrüse Einfluss auf den Insulin-, Somatostatin und Glucagontransport (einen Überblick gibt **Tabelle 1.2.**).

Gewebe	Funktion	Literatur
Lunge	Modulation des Luftwegtonus und Sekretion	[133]
Niere	Modulation des Ca ²⁺ und K ⁺ Transportes; Induktion von Vasokonstriktion der afferenten Arteriole	[41]
Nebenniere	Katecholaminfreisetzung	[5;82]
Dünndarm	Stimulation des Elektrolyttransportes	[91]
Bauchspeicheldrüse	Regulation des Insulin-, Somatostatin- und Glucagontransportes	[139]
Leber	Modifikation des hepatobiliären Wachstums und Entwicklung	[108]
Eierstock	Regulation des Blutflusses und der Hormonsekretion	[40]
Uterus	Modulation der Kontraktion	[122]
Hypophyse	Kontrolle der Hormonsekretion	[53;54;97;120]

Tabelle 1.2 Vorkommen und Funktion von GABA in peripheren Geweben. Modifiziert aus Watanabe M et al. [150].

1.2.4 GABA im Hoden

Die Anwesenheit eines GABAergen Systems (GABA Rezeptoren, das GABA synthetisierende Enzyme GAD, etc.) im Hoden wird seit einigen Jahren zunehmend klarer. Neben seinen Rezeptoren und Enzymsystemen konnte GABA auch direkt im Hoden nachgewiesen werden [43]. Im Hoden scheinen die Komponenten des GABAergen Systems vor allem in zwei Zellarten vorzukommen: in Spermien und in interstitiellen Leydig-Zellen. So wurde gezeigt, dass Spermien GABA Rezeptoren sowie das GABA Transportprotein 1 (GAT-1) besitzen und dass im weiblichen Eileiter gebildetes GABA [42;144] dort über die auf den Spermien vorhandenen Rezeptoren die Spermienmotilität sowie die Akrosomreaktion beeinflussen kann [26;27;46;71;72;84;100;131;132].

Hinweise auf das Vorkommen von GABA Rezeptoren in interstitiellen Zellen des Hodens ergaben sich durch die Entdeckung, dass GABA im Hoden die Testosteron Produktion stimulieren kann [124;125]. Kürzlich wurden erneut Anhaltspunkte für

GABAerge Systeme in Ratten-, Mäuse- und Menschenhoden geliefert [57] und GABA eine Rolle in der Proliferation von Leydig-Zellen beigemessen [58] (siehe auch **Abbildung 1.2**). In letzterem Fall scheint die GABA Wirkung über den GABA_A Rezeptor vermittelt zu werden. Der Signalweg ist jedoch unbekannt.

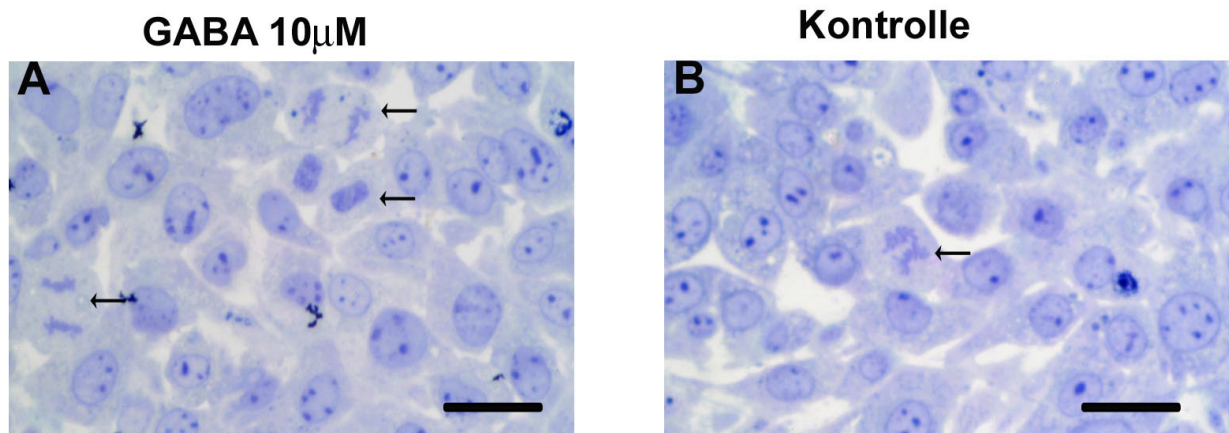


Abbildung 1.2 Die Abbildung zeigt eine immunhistochemische Färbung von TM3 Zellen nach GABA 10µM Behandlung (A) und ohne GABA Behandlung (Kontrolle) (B). Es zeigt sich, dass nach GABA Behandlung mehr Mitosen (markiert durch Pfeile) auftreten als in der Kontrolle. Balken=12µm (Quelle: Prof. Dr. A. Mayerhofer, Anatomisches Institut der Universität München).

1.3 Zielsetzung

Die Entwicklung und Funktion der Leydig-Zellen werden durch ein komplexes Zusammenspiel aus übergeordneten Regelkreisen (Hypothalamus-Hypophysen-Achse) und lokalen Faktoren gesteuert (s. Kapitel 1.1.1 und 1.1.2). Diese Arbeit hatte zum Ziel den Einfluss eines dieser lokalen Faktoren, γ -Aminobuttersäure, zu untersuchen. Hierzu sollte das GABAerge System in Leydig-Zellen der Maus im Detail analysiert werden. Des Weiteren sollte das Vorkommen von Komponenten des GABAergen Systems in der Hodenentwicklung untersucht werden und molekulare GABA Effekte sowie Signalwege aufgedeckt werden, die zu vermehrter Androgenproduktion, gesteigerter Leydig-Zellproliferation oder anderen noch unbekannt Funktionen von GABA in Leydig-Zellen, wie etwa der Initiierung von Differenzierungsprozessen in der Entwicklung adulter Leydig-Zellen, führen könnten.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Gewebe und Zellen

2.1.1.1 TM3 Leydig-Zellen

TM3 Zellen wurden 1980 von Jennie P. Mather aus Hoden von unreifen BALB/c Mäusen (d11-d13) isoliert und stammen von funktionell entdifferenzierten Leydig-Zellen ab [96]. TM3 Zellen zeichnen sich in vitro durch eine hohe Zellproliferationsrate aus, sind aber nach Injektion in lebende Organismen nicht tumorigen [96]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass GABA und der GABA_A Rezeptor Agonist Isoguvacin die Proliferation von TM3 Zellen steigern können [58].

2.1.1.2 Hoden

Die Hoden wurden aus 5 (n=3), 20 (n=3), 35 (n=3) Tage (d5, d20, d35) alten und adulten (n=30) Balb/c Mäusen präpariert. Die Tiere wurden gemäß den Tierhaltungsrichtlinien des National Institute of Health (NIH) am Instituto de Biología y Medicina Experimental in Buenos Aires, Argentinien oder an der Technischen Universität München gehalten und nach Äthernarkose durch Genickbruch oder Enthauptung getötet. Anschließend wurden die Hoden schnell entnommen und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C eingefroren.

2.1.1.3 Adulte Leydig-Zellen

Die Leydig-Zellen wurden aus adulten Balb/c Mäusehoden isoliert. Die Tiere wurden gemäß den Tierhaltungsrichtlinien des National Institute of Health (NIH) für die molekularbiologischen Untersuchungen am Instituto de Biología y Medicina Experimental in Buenos Aires, Argentinien und für die elektrophysiologischen Studien an der Technischen Universität München gehalten. Die Mäuse wurden nach Äthernarkose durch Genickbruch oder Enthauptung getötet. Anschließend wurden die Hoden schnell entnommen, in Medium 199 überführt und die LZ wie unter 2.2.1.1 beschrieben isoliert.

2.1.2 Antikörper

Alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper/Antiseren und ihr Hersteller sind in

Tabelle 2.1 und **2.2** aufgeführt:

Ziel	Antikörper (Hersteller)	WB	IZ	RIA	IHC
β -Actin	monoklonaler Mäuse IgG gegen β -Actin (Chemicon)	1:5000	-	-	-
EGR-1	polyklonales Kaninchen Serum gegen egr-1 (Santa Cruz)	1:500	-	-	1:500
GAD	polyklonales Kaninchen Serum gegen GAD65/67 (Chemicon)	1:5000	1:2000	-	-
MAPK	polyklonales Kaninchen Serum gegen p44/42 MAPK (Cell Signalling)	1:1000	-	-	-
pMAPK	monoklonaler Mäuse IgG gegen Phospho p44/42 MAPK (Cell Signalling)	1:1000	-	-	-
Testosteron	IgG gegen Testosteron - 7 α - butyrat – BSA (Medicorp Inc)	-	-	1:1400	-
VIAAT	polyklonales Kaninchen Serum gegen VIAAT (SySy GmbH)	-	1:1000	-	-

Tabelle 2.1 Liste der verwendeten 1. Antikörper/Antiseren und die jeweils verwendete Verdünnung in Western Blot (WB), Immunfluoreszenz (IZ), Radioimmunoassay (RIA) und Immunhistochemie (IHC).

Markierung	Antikörper (Hersteller)	WB	IZ	IHC
FITC	Monoklonaler Ziegen Antikörper gegen Kaninchen oder gegen Maus IgG (Dianova)	-	1:500	-
Biotin	Polyklonales Ziegen Antiserum gegen Kaninchen oder gegen Maus IgG (Dianova)	-	-	1:500
POX	Polyklonales Ziegen Serum gegen Kaninchen oder gegen Maus IgG (Dianova)	1:5000	-	-

Tabelle 2.2 Liste der verwendeten 2. Antikörper/Antiseren und die jeweils verwendete Verdünnung in Western Blot (WB), Immunfluoreszenz (IZ) und Immunhistochemie (IHC.)

2.1.3 Oligonukleotid-Primer, Gendatenbank und Sequenzierung

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotid-Primer und ihre spezifischen Genfragmente sind folgend aufgelistet (**Tabelle 2.3**). Es wurde beim Design der Primer darauf geachtet, dass sie intronüberspannend lokalisiert sind.

Genname	Primer (sense / antisense)	Länge (bp)	Genbank #
GABA _A α1	5'-ctacagcaaccagctataccc-3' 5'-gctctctgtttaaatcgtgg-3'	231	L08490
GABA _A α2	5'-aaggctccgtcatgatacag-3' 5'-gactaaccctaatacaggc-3'	281	L08491
GABA _A α3	5'-gacttgcttggtcatgttgggg-3' 5'-cagaggccctggagatgaagaaga-3'	418	NM_008067
GABA _A β1	5'-atgatgcatctgcagcca-3' 5'-tggagttcacgtcagtca-3'	540	NM_008069
GABA _A β2	5'-ctgacacctacttctga-3' 5'-gcatgtatgtctgcagga-3'	402	NM_008070
GABA _A β3	5'-agccaaggccaagaatgatcg-3' 5'-tgcttctgtctcccattgacc-3'	224	X15468
GABA _A γ1	5'-ttcttactgacagcaatgg-3' 5'-catgggaatcagagtagatcc-3'	191	X55272
GABA _A γ2	5'-gcaatggatcttctgctc-3' 5'-gtccattttggcaatgcg-3'	327	NM_008073
GABA _A γ3	5'-tgtcgaaagccaaccatcagg-3' 5'-gactgcactcctcatagcag-3'	251	X63324
GABA _B R1	5'-gtacgtctggtcctcat-3' 5'-agatcatccttgggtgctg-3'	350	NM_031028
GABA _B R2	5'-accatctcaggaaagact-3' 5'-cctccaaggatgataagg-3'	354	AJ011318
GABA _C ρ1	5'-gaagatctcctgcacctgtgg-3' 5'-ggtgtgatcctcatgctcac-3'	214	NM_008075
GABA _C ρ2	5'-ggatggaagctagagtgaatc-3' 5'-atccctaggaaaacactgacc-3'	272	NM_008076
GABA _C ρ3	5'-tggctgctatcatgacggtgag-3' 5'-cctcttcacacatatatacccc-3'	258	XM285181
GAD 65	5'-cttctccggatggtcatctc-3' 5'-agaggattctaaacttaaga-3'	463	NM_008078
GAD 67	5'-cttctccggatggtcatctc-3' 5'-acgagcaacatgctatggtct-3'	393	NM_008077
VIAAT	5'-cctgtacgaggagaacgaag-3' 5'-agcagactgaactggacac-3'	300	AF030253
Cyclophilin A	5'-tggcaagtccatctacgg-3' 5'-gagctacagaaggaatgg-3'	326	NM_008907
Egr-1	5'-acaagaaagcagacaaaagtg-3' 5'-gtcgctgtcatgtctgaaag-3'	309	M20157
LH Rezeptor	5'-ctctcacctatctccctgctc-3' 5'-tcttctcggcaaatcctg-3'	702	NM_013582

Tabelle 2.3 Liste aller verwendeter Primer inklusive der Größe des erwarteten PCR Fragments (bp) und Genbank Accession number (#).

Bei Primerpaaren, bei denen keine Informationen zur Exon-Intron-Struktur vorlagen, wurde die in diesen RT-PCR Experimenten eingesetzte RNA, mit der Intention genomische DNA - Verunreinigung zu erkennen, mit einer zusätzlichen Kontrolle der Vollständigkeit der DNase Behandlung, wie unter 2.2.2.2 beschrieben, überprüft.

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 Primerselect™, EditSeq™ und MegAlign™ (DNASTAR) erstellt. Alle PCR-Ergebnisse wurden durch Sequenzierung 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 PCR-Primern von einem kommerziellen Dienst (AGOWA) direkt sequenziert und ihre Übereinstimmung mit der jeweiligen Sequenz der Genbank verifiziert (MegAlign™, DNASTAR).

2.1.4 Medien und Lösungen

Medien:

F 12 DME (pH 7,2; Sigma) + 5% Pferdeserum (Biochrom) + 2,5 % FKS (FCS Gold, PAA)

Medium 199 (M199) (pH 7,2; Sigma)

Patch Clamp "intrazelluläres" Medium: 140 mM KCl; 2 mM ATP x 2Na; 2 mM MgCl₂; 2 mM EGTA, 10 mM HEPES; pH 7,2

Patch Clamp "extrazelluläres" Medium: 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1 mM MgCl₂; 1,5mM CaCl₂; 6 mM Glucose and 12 mM HEPES; pH 7.3

Ca²⁺ Messung extrazelluläres Medium: 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM CaCl₂; 1mM MgCl₂; 6 mM Glucose, 12 mM HEPES, pH 7,3

V_R – Messung extrazelluläres Medium: 140 mM NaCl; 3 mM KCl; 1 mM CaCl₂; 10 mM Hepes; 10 mM Glukose; pH 7,4

Lösungen:

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

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

DNA-Auftragspuffer (6 x): 0,25% (g/v) Bromphenolblau; 0,25% (g/v) Xylencyanol; 40% (g/v) Saccharose

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

KPBS (0,12 M; 0,5 l): 1,47 g KH₂PO₄ ; 8,59 g K₂HPO₄ ; 27 g NaCl ; H₂O; pH 7,4

LKPBS : 48,85 ml 0,02 M KPBS ; 1ml Ziegenserum ; 150 µl Triton X-100

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

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

Probenpuffer (1 x): 62,5 Tris; 2% (g/v) SDS; 10% (g/v) Saccharose; pH 6,8

RIA Puffer (1l): 5,7 g PO₄HNa₂; 4,12 g PO₄H₂Na; 0,5 g Natriumazid; 1 g Gelatine; 9 g NaCl; pH 7,4

Sammelgelpuffer (1 x): 0,5 M Tris; 0,4% (g/v) SDS; pH 6,8

SDS 10% (1 x; 0,1 l): 10 g Natriumdodecylsulfat

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

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

TBS-Tween (10 x; 1 l): 0,05% (g/v) Tween 20; 100 ml 10 x TBS

Transferpuffer (1 x): 192 Glycin; 25 Tris; 20% (v/v) Methanol

Trenngelpuffer (1 x): 1,5 M Tris; 0,4% (g/v) SDS; pH 8,8

2.1.5 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

Cayman Chemical, Ann Arbor, USA

Canberra Packard, Dreieich, Deutschland

DIANOVA, Hamburg, Deutschland

DNASTAR Inc., Madison, USA

DPC Biermann, Bad Nauheim, Deutschland

DYNEX Technologies, Denkendorf, Deutschland

Eppendorf–Netheler–Hinz GmbH, Köln, Deutschland

FisherChemicals, Loughborough Leics, England

Fujifilm Photo Film Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland

Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, Frankreich

GibcoBRL Life technologies GmbH, München, Deutschland

GraphPad Software Inc., San Diego, USA

Hamilton, Bonaduz, Schweiz

HEKA, Lambrecht, Deutschland

Heraeus Instruments GmbH, München, Deutschland

Heto-Holten A/S, Allerød, Dänemark

IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland

Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA

Leica Microsystems, Heidelberg, Germany

List, Darmstadt, Deutschland

Medicorp Inc, Montreal, Kanada

Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Microsoft Corporation, Redmond, USA
Mikrotek GmbH, Kiel, Deutschland
MJ Research, Watertown, USA
Molecular Probes, Eugene, USA
MPM-FFP, Zeiss Oberkochen, Deutschland
MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
NIMH, RSB National Institute of Mental Health, Bethesda, USA
NUNC, Wiesbaden, Deutschland
PAA Laboratories GmbH, Cölbe, 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
Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Sony Corporation, Tokio, Japan
Stratagene, Heidelberg, Deutschland
Superarray Inc., Bethesda, USA
SySy GmbH, Göttingen, Deutschland
Upstate biotechnology, Lake Placid, USA
Vector Laboratories, Burlingame, USA
Worthington Biochemical, Freehold, USA
Zeiss Jena GmbH, München, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Isolierung der adulten Leydig-Zellen

Die Leydig-Zellen wurden nach einem etablierten Verfahren isoliert [52]. Zunächst wurden die Hoden von Fettgewebe und Nebenhoden getrennt und die Kapsel entfernt. Jeweils 8 der so präparierten Hoden wurden dann zum Lösen des Hodengewebes mit 0,2 mg/ml Kollagenase (Worthington Biochemical) in 3 ml Medium 199 (pH 7,2; Sigma) für 10 min bei 34 °C inkubiert. Um die Kollagenasereaktion zu stoppen wurde 30 ml Medium 199 zugegeben und durch kreisende Bewegungen des Gefäßes das Interstitium von den Tubuli getrennt. Nun wurden die Ansätze 1 min ruhen gelassen. Anschließend wurde die Gewebesuspension durch ein Netz (Nitex 50) in ein neues Gefäß gefiltert, um die Tubuli endgültig von den interstitiellen Zellen zu trennen. Die so erhaltene Suspension interstitieller Zellen wurde nun 10 min bei 800 x *g* zentrifugiert und hinterher der Überstand verworfen. Die Zellen wurden dann in 1 ml Medium 199 aufgenommen, ein vorbereiteter Percollgradient (von unten nach oben: 3 ml 90% Percoll, 3 ml 40% Percoll) mit dem gesamten Volumen überschichtet und der Ansatz für 30 min bei 1200 x *g* zentrifugiert. Nach dieser Behandlung befanden sich die Leydig-Zellen in der 1,06 – 1,12 g/ml Dichtefraktion. Der Überstand wurde nun verworfen und dann die Leydig-Zellschicht abgetragen und in ein neues Gefäß überführt. Wenn es nötig war bis zu diesem Zeitpunkt mehrere Ansätze zu verwenden, wurden diese im Anschluss vereinigt. Die Zellen wurden nun im dreifachen Volumen mit Medium 199 aufgenommen und 5 Min bei 800 x *g* zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand verworfen, die Zellen in 2-3 ml Medium 199 resuspendiert. Die Zellzahl wurde nach Entnahme eines Aliquots und 5 minütiger Färbung mit 0,4% Trypanblau mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Im Schnitt wurden 125.000 Leydig-Zellen pro 8 Hoden isoliert.

2.2.1.2 Kultur der isolierten adulten Leydig-Zellen

Die isolierten ALZ wurden in Kulturschalen (Durchmesser: 35 mm oder 60 mm; NUNC/Sarstedt) in dem Medium M199 (pH 7,2; Sigma) bei 37 °C und 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert. Nach der Isolierung wurden die Zellen für höchstens 24 h

kultiviert und in der Regel nach einer Ruhephase von 3 h nach Aussaat für einen Stimulationsversuch oder RNA Präparation verwendet.

2.2.1.3 Kultur der TM3 Leydig-Zellen

Die TM3 Zellen wurden in Kulturschalen (Durchmesser: 35 mm oder 60 mm; NUNC/Sarstedt) in dem Medium F12-DME (pH 7,2; Sigma), 2,5% FKS (FCS Gold, PAA) und 5% PS (Biochrom) bei 37 °C und 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert. Die Dichte betrug ca. 5 x 10⁴ Zellen pro 60 mm Schale, 3 x 10⁴ Zellen pro 35 mm Schale. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage erneuert, wobei 5 ml Medium pro 60 mm Schale, 3 ml Medium pro 35 mm Schale zugegeben wurde. Konfluent wachsende Zellen wurden entweder neu ausgesät oder zu Versuchszwecken behandelt. Zur Aussaat wurden sie 5 min mit 0,5 ml Trypsin/EDTA bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Trypsinaktivität mit 5 ml F12-DME-Medium plus 2,5% FKS und 5% PS gestoppt und die Zellen in ein 10 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und 3 min bei 1000 U/min (Labofuge 400e, Heraeus) zentrifugiert. Das überstehende Medium wurde abgesaugt, die Zellen in frischem Medium F12-DME + 2,5% FKS + 5% PS aufgenommen und auf vorbereitete Zellschalen, gefüllt mit F12-DME + 2,5% FKS + 5% PS, verteilt.

2.2.1.4 Stimulationsbedingungen

Für molekularbiologische Untersuchungen wurden die TM3 Zellen 3 h vor der Stimulation in Medium mit geringerem Serumgehalt, F12-DME (pH 7,2; Sigma) + 1% FKS (FCS Gold, PAA) + 2% PS (Biochrom) bei 37 °C und 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert, um die Zellen in ihrem Zellzyklus zu synchronisieren. Dann wurden die Zellen je nach Experiment 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120 min in diesem Medium stimuliert. Die Stimulation wurde durch Absaugen des Mediums gestoppt und die Zellen ein Mal mit 1 x PBS gespült. Dann wurde entweder zur Proteingewinnung wie unter 2.2.3.1, oder zur RNA-Präparation wie unter 2.2.2.1 beschrieben verfahren. Isolierte adulte Leydig-Zellen wurden wie unter 2.2.1.2 beschrieben für die Stimulationsversuche vorbereitet, dann im selben Medium für 5, 10, 15, 30, 60, etc. min stimuliert. Anschließend wurde 1 ml Stimulationsmedium zur Testosteronmessung entnommen und die Zellen im restlichen Medium in ein Eppendorf Zentrifugationstube überführt und für 2 min bei 12.000 U/min (Biofuge primo R, Heraeus) zentrifugiert. Nun wurde das Medium verworfen und die Zellen

entweder sofort, wie unter 2.2.2.1 beschrieben, zur RNA Extraktion weiterverarbeitet oder bis zur endgültigen Verwendung bei -80 °C eingefroren.

2.2.2 Molekularbiologie

2.2.2.1 RNA Präparation

Zur Extraktion der gesamten zellulären RNA aus Hodengewebe der Maus sowie aus isolierten primären ALZ und von TM3 Zellen wurde der Präparations-Kit RNeasy (QIAGEN) verwendet. Gemäß dem Arbeitsprotokoll des Herstellers wurden alle Arbeitsschritte durchgeführt. Alle Zentrifugationsschritte wurden mit der Mikrozentrifuge Biofuge pico (Heraeus) bei Raumtemperatur durchgeführt. Schließlich wurde die RNA mit 30 oder 50 µl des vom Hersteller gelieferten RNase freien H₂O eluiert. Vor weiteren Arbeitsschritten wurde die Qualität der RNA durch Elektrophorese in einem Agarosegel (1% (g/v)) geprüft. Hierfür wurden die bei der DNA-Gelelektrophorese beschriebenen Chemikalien, Puffer und Geräte verwendet. Pro Spur wurde 1 µl der gewonnen RNA aufgetragen und mittels Ethidiumbromid (1 mg/ml) unter UV-Licht sichtbar gemacht. Bei intakter RNA verhält sich die Intensität von ribosomaler 28S zu 18S RNA etwa wie 2:1. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde mittels des Eppendorf Photometers mit einer 1:100 verdünnten Lösung bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Ein Verhältnis A₂₆₀:A₂₈₀ von weniger als 1,5 deutet auf eine Proteinverunreinigung, von mehr als 2,0 auf eine Phenolverunreinigung hin.

Aus A₂₆₀ können die Konzentrationen wie folgt berechnet werden:

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

2.2.2.2 Reverse Transkription (RT) inklusive DNase Behandlung

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 2.4** zeigt den Reaktionsansatz für ein Gesamtvolumen von 20 µl. Zunächst wurde das einer Menge von 200 ng RNA entsprechende Volumen mit DEPC-H₂O auf 11,8 µl aufgefüllt und anschließend nach Zugabe von RQ1 RNase free DNase, 10 x 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 und damit die DNase

inaktiviert. Daraufhin wurde auf 4 °C gekühlt und sofort 10 x 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.

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

Tabelle 2.4 Reaktionsansatz für eine Reverse Transkription.

In den Fällen, in denen die anschließende PCR mit nicht intronüberspannenden Primern durchgeführt wurde, wurde der Ansatz für die RT verdoppelt: d.h. es wurde das einer Menge von 400 ng RNA entsprechende Volumen mit DEPC-H₂O auf 23,6 µl aufgefüllt und nach Zugabe von 2 µl RQ1 RNase free DNase, 2 µl 10 x First strand Buffer und 0,4 µl RNase Block Ribonuclease Inhibitor ein DNase-Verdau bei 37 °C für 20 min durchgeführt. Nun wurde durch Zugabe von 2 µl Oligo dT15 und 2 µl EDTA die Reaktionslösung für 15 min auf 70 °C erhitzt und damit die DNase inaktiviert. Nach diesem Schritt, wurde die Hälfte des Volumens, also 16 µl RNA entnommen und dann bis zur Verwendung bei -20 °C eingefroren. Von dieser RNA wurde zur Kontrolle der Vollständigkeit der DNase Behandlung dann bei der anschließenden PCR eine entsprechende Menge anstatt der cDNA zugeführt und so eine genomische DNA Kontamination der RNA überprüft.

Mit dem verbliebenen Ansatz wurde wie oben beschrieben die RT fortgeführt.

2.2.2.3 Polymerase chain reaction (PCR)

Die PCR wurde mit dem Thermocycler PTC-200 (MJ Research) durchgeführt. Zur Untersuchung des GABAergen Systems von TM3 und adulten Leydig-Zellen wurde der Reaktionsansatz für eine PCR, wie in **Tabelle 2.5** dargestellt, verwendet, wobei alle Reagenzien von Promega bezogen wurden. Zuerst wurde ein Mix aus 5 µl 10 x Taq-Buffer, 3 µl 25 mM MgCl₂, 5 µl 2 mM dNTPs und 33,5 µl H₂O erstellt. Diesem Mix wurde dann jeweils 1 µl 50 µM Primer 5', 1 µl 50 µM Primer 3', sowie cDNA als Template in 1 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 40 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.

Reagenzien	Volumen (µl)
Bidest H ₂ O	33,5
10 x Taq-Buffer	5
MgCl ₂ (25 mM)	3
dNTPs (2 mM)	5
Primer 5' (50 µM)	1
Primer 3' (50 µM)	1
cDNA in H ₂ O	1
bei 94 °C Taq-Polymerase (20 IU/µl)	0,5
Gesamtvolumen	50 µl

Tabelle 2.5 Reaktionsansatz für eine PCR.

Um die jeweilige Menge von egr-1 cDNA in den unterschiedlich mit GABA stimulierten TM3 Proben miteinander vergleichen zu können und um eine Aussage über Unterschiede des Vorkommens von Komponenten des GABAergen Systems zu verschiedenen Zeiten in der Hodenentwicklung treffen zu können, wurde in diesen Fällen eine semiquantitative PCR durchgeführt [48;49]. Hierzu wurde ein Referenzgen (Cyclophilin A; α-Tubulin [130;151]) gewählt, von dem angenommen

werden kann, dass es sowohl bei jeder Stimulation und als auch zu jeder Zeit der Hodenentwicklung gleiche Expressionslevel aufweist.

Die semiquantitative PCR wurde folgendermaßen durchgeführt: zuerst wurden 2 Ansätze, einer für *egr-1* oder für die jeweils interessierende Komponente des GABAergen Systems und einer für das Referenzgen, hergestellt. Diese bestanden jeweils aus $n \times 5 \mu\text{l}$ 10 x Taq-Buffer, $n \times 3 \mu\text{l}$ 25 mM MgCl_2 , $n \times 5 \mu\text{l}$ 2 mM dNTPs, $n \times 33,5 \mu\text{l}$ H_2O , $n \times 1 \mu\text{l}$ 50 μM Primer 5', $n \times 1 \mu\text{l}$ 50 μM Primer 3' und $n \times 0,5 \mu\text{l}$ Taq-Polymerase (20 IU/ μl), wobei n die Anzahl an cDNA Proben war, die untersucht werden sollten, plus der Kontrolle (keine cDNA zugegeben / RNA nach DNase Behandlung zugegeben siehe Kapitel 2.2.2.2)(s. **Tabelle 2.6**). Diese Ansätze unterschieden sich also nur in den jeweils zugegebenen Primern. Dann wurden $n \times 49 \mu\text{l}$ jedes Ansatzes auf n PCR Tubes verteilt. Anschließend wurde $1 \mu\text{l}$ jeder der interessierenden n cDNA Proben in ein mit Ansatz 1 (*egr-1* oder Rezeptor Untereinheit) und in ein mit Ansatz 2 (Referenzgen) gefülltes PCR Tube zugegeben. Nun wurde die PCR mit 35 Zyklen wie oben beschrieben durchgeführt.

Reagenzien für Ansatz 1 + 2	Volumen (μl)
Bidest H_2O	$n \times 33,5$
10 x Taq-Buffer	$n \times 5$
MgCl_2 (25 mM)	$n \times 3$
dNTPs (2 mM)	$n \times 5$
Primer 5' (50 μM)	$n \times 1$
Primer 3' (50 μM)	$n \times 1$
Taq-Polymerase (20 IU/ μl)	$n \times 0,5$
Zwischenvolumen	$n \times 49 \mu\text{l}$
cDNA in H_2O	$1 \mu\text{l}$
Gesamtvolumen	$50 \mu\text{l}$

Tabelle 2.6 Reaktionsansätze für die semiquantitative PCR. Ansatz 1 und Ansatz 2 unterscheiden sich nur in den jeweilig zugegebenen Oligonukleotid-Primern. Das Zwischenvolumen wurde auf n PCR Tubes à $49 \mu\text{l}$ aufgeteilt und anschließend wurde zu jedem Tube $1 \mu\text{l}$ cDNA zugegeben. n = Anzahl der cDNA - Proben + Kontrolle. Einzelheiten siehe Text.

2.2.2.3 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Zur Visualisierung des durch PCR amplifizierten Fragments wurde der Ansatz mit DNA-Auftragspuffer versetzt und elektrophoretisch in einem 2% Agarose-Gel (SeaKemL, Biozym) mit 1 x 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 40 min bei 100 V. Die durch UV-Licht induzierte Fluoreszenz der mit Ethidiumbromid angereicherten DNA-Banden wurde anschließend mit einem Kamerasystem (ST50, Sony) detektiert und digitalisiert.

2.2.2.4 cDNA-Array

Für die cDNA – Array Studien wurden die Gen Arrays: Mouse Pathfinder –1 GEArray und der GEArray Q Series Mouse Signal Transduction PathwayFinder (Superarray inc., Bethesda, USA) benutzt. Die Array Experimente wurden gemäß den Handbüchern des Herstellers durchgeführt, dabei ist der Arbeitsablauf für beide Arrays gleich (s. **Abbildung 2.1**).

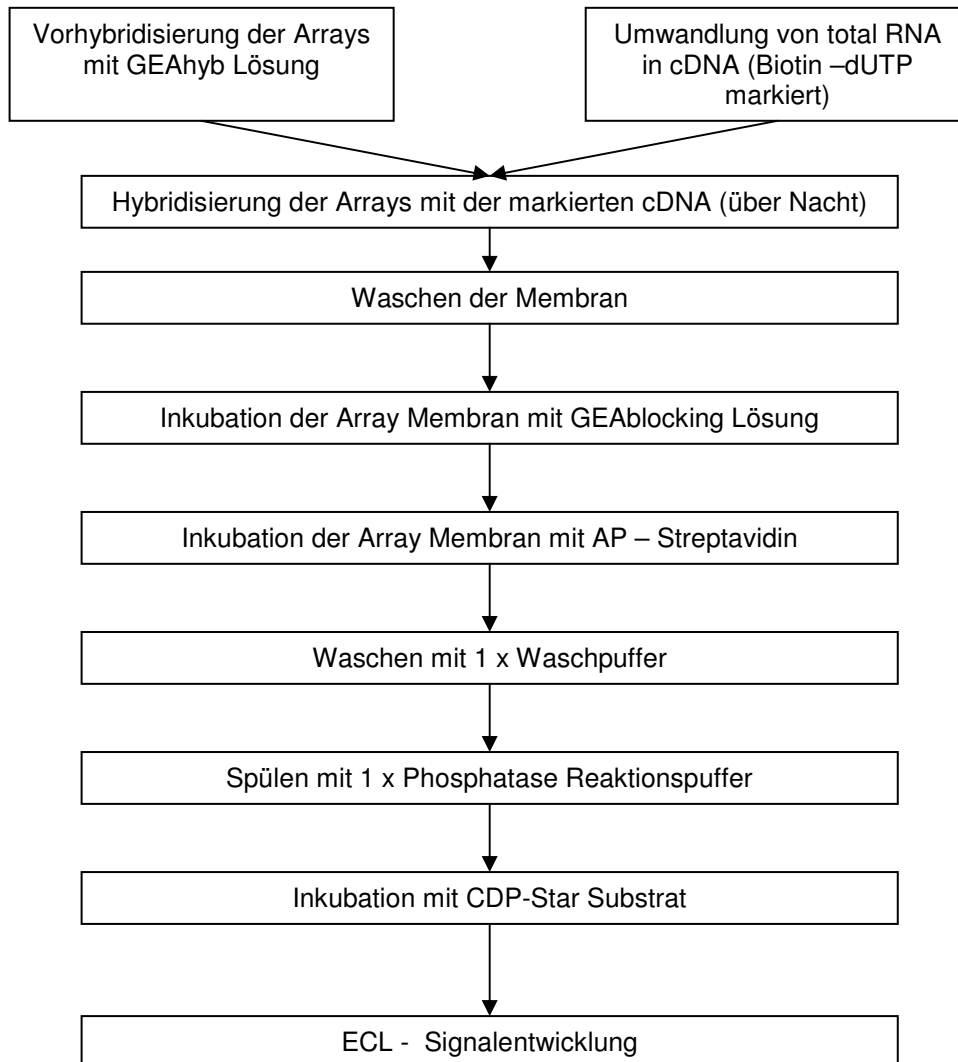


Abbildung 2.1 Schema der Arbeitsschritte bei der Durchführung der Array Experimente.

Zuerst wurde die RNA wie unter 2.2.2.1 beschrieben von GABA stimulierten und unstimulierten TM3 Leydig-Zellen präpariert und anschließend ein DNase -Verdau durchgeführt. Nun wurden 5 µg RNA (Mouse Pathfinder – 1 GEArray) oder 2,5 µg RNA (GEArray Q Series Mouse Signal Transduction PathwayFinder) in Anwesenheit von mit Biotin gekoppeltem UTP (als Ersatz für TTP) revers transkribiert.

Anschließend wurde jeweils eine Membran, mit der so markierten cDNA hybridisiert. Die Zusammensetzung der cDNA-Array Membranen mit der Anordnung der Markergene für die intrazelluläre Signaltransduktion und der Kontrollgene ist in der **Abbildung 2.2** und in den **Tabellen 2.7** und **2.8** für beide Arrays dargestellt. Auf beiden Membranen wurde dann Streptavidin gekoppelte alkalische Phosphatase an die biotinylierte und hybridisierte cDNA gebunden. Durch die Zugabe von CDP-Star-Reagenz wurde die 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 Signale dann entweder mit der Software Image 1.62 (NIH) oder mit dem Programm Scanalyze (Superarray Inc., Bethesda, USA) gemessen.

A						
1	1	2	2	3	3	24
4	4	5	5	6	6	24
7	7	8	8	9	9	25
10	10	11	11	12	12	25
13	13	14	14	15	15	26
16	16	17	17	18	18	26
19	19	20	20	21	21	26
22	22	23	23	26	26	26

B							
1	2	3	4	5	6	7	8
9	10	11	12	13	14	15	1 6
17	18	19	20	21	22	23	2 4
25	26	27	28	29	30	31	3 2
33	34	35	36	37	38	39	4 0
41	42	43	44	45	46	47	4 8
49	50	51	52	53	54	55	5 6
57	58	59	60	61	62	63	6 4
65	66	67	68	69	70	71	7 2
73	74	75	76	77	78	79	8 0
81	82	83	84	85	86	87	8 8
89	90	91	92	93	94	95	9 6
97	98	99	100	101	102	103	104
105	106	107	108	109	110	111	112

Abbildung 2.2 **A** Anordnung der Gene auf dem Mouse Pathfinder – 1 GEArray (Superarray); **B** Anordnung der Gene auf dem GEArray Q Series Mouse Signal Transduction PathwayFinder (Superarray).

Als Standard dienten die optischen Dichten der Banden von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) beim Mouse Pathfinder – 1 GEArray und von Cyclophilin A (ppia) beim GEArray Q Series Mouse Signal Transduction PathwayFinder.

#	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	P16Ink4a	L76150	CDK4 and CDK6 inhibitor p16ink4a
19	P19	U19597	Cyclin-dependent Kinase inhibitor p19
20	P21Waf1	U24173	Cyclin-dependent Kinase inhibitor p21Waf1
21	P27Kip1	U09968	Cyclin-dependent Kinase inhibitor p27Kip1
22	P53	K01700	Transformation related protein 53
23	P57Kip2	U22399	Cyclin-dependent Kinase inhibitor p57Kip2
24	pUC18	-	Bacterial plasmid
25	β -Actin	M12481	Cytoplasmatic β -Actin
26	GAPDH	M32599	Glyceraldehyd-3-phosphat dehydrogenase

Tabelle 2.7 Auflistung der Gene des Mouse Pathfinder - 1 GEArrays (Superarray).

36 Material und Methoden

Position	Unigene	Genbank #	Symbol	Beschreibung	Genname
1	Mm.27725	NM_007376	A2m	Alpha-2-macroglobulin	A2m
2	Mm.209903	NM_009715	Atf2	Activating transcription factor 2	ATF2
3	Mm.19904	NM_007527	Bax	Bcl2-associated X protein	Bax
4	Mm.347397	NM_009741	Bcl2	B-cell leukemia/lymphoma 2	Bcl-2
5	Mm.87857	NM_007536	Bcl2a1d	B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1d	Bfl-1
6	Mm.238213	NM_009743	Bcl2l1	Bcl2-like 1	Bcl-x
7	Mm.6898	NM_008670	Birc1a	Baculoviral IAP repeat-containing 1a	NAIP1
8	Mm.89961	NM_010872	Birc1b	Baculoviral IAP repeat-containing 1b	NAIP2
9	Mm.2026	NM_007464	Birc3	Baculoviral IAP repeat-containing 3	IAP1
10	Mm.335659	NM_007465	Birc2	Baculoviral IAP repeat-containing 2	IAP2
11	Mm.235230	NM_007553	Bmp2	Bone morphogenetic protein 2	BMP2
12	Mm.6813	NM_007554	Bmp4	Bone morphogenetic protein 4	BMP 4
13	Mm.244975	NM_009764	Brca1	Breast cancer 1	BRCA1
14	Mm.273049	NM_007631	Ccnd1	Cyclin D1	Cyclin D1
15	Mm.779	NM_007650	Cd5	CD5 antigen	CD5
16	Mm.111326	NM_016756	Cdk2	Cyclin-dependent kinase 2	Cdk 2L
17	Mm.195663	NM_007669	Cdkn1a	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	p21Waf1/p21cip
18	Mm.2958	NM_009875	Cdkn1b	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (P27)	p27Kip1
19	Mm.168789	NM_009876	Cdkn1c	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57)	p57Kip2
20	Mm.4733	NM_009877	Cdkn2a	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	p16ink4a
21	Mm.269426	NM_007670	Cdkn2b	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)	p15INK4b
22	Mm.1912	NM_007671	Cdkn2c	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)	p18
23	Mm.29020	NM_009878	Cdkn2d	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4)	p19
24	Mm.144448	NM_009880	Cdx1	Caudal type homeo box 1	Cdx1
25	Mm.347406	NM_009883	Cebpb	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	C/EBP beta
26	Mm.4922	NM_009969	Csf2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	GM-CSF
27	Mm.268737	NM_009972	Csnb	Casein beta	Beta-casein
28	Mm.231395	NM_009983	Ctsd	Cathepsin D	Cathepsin D
29	Mm.5199	NM_007810	Cyp19a1	Cytochrome P450, family 19, subfamily a, polypeptide 1	CYP19
30	Mm.8534	NM_007912	Egfr	Epidermal growth factor receptor	EGFR
31	Mm.181959	NM_007913	Egr1	Early growth response 1	Krox-24
32	Mm.4337	NM_007915	Ei24	Etoposide induced 2.4 mRNA	PIG8
33	Mm.2657	NM_010133	En1	Engrailed 1	Engrailed 1
34	Mm.236443	NM_007988	Fasn	Fatty acid synthase	fatty acid synthase
35	Mm.193099	NM_010233	Fn1	Fibronectin 1	Fn1
36	Mm.246513	NM_010234	Fos	FBJ osteosarcoma oncogene	c-fos
37	Mm.938	NM_010446	Foxa2	Forkhead box A2	HNF3B/forkhead box A2
38	Mm.1236	NM_007836	Gadd45a	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha	Gadd45
39	Mm.275654	NM_030678	Gys1	Glycogen synthase 1, muscle	Gys1
40	Mm.254493	NM_020259	Hhip	Hedgehog-interacting protein	Hip
41	Mm.255848	NM_013820	Hk2	Hexokinase 2	HK2
42	Mm.197	NM_010449	Hoxa1	Homeo box A1	Hoxa1
43	Mm.890	NM_008266	Hoxb1	Homeo box B1	Hoxb1
44	Mm.347444	NM_008296	Hsf1	Heat shock factor 1	Hsf1 (tcf5)
45	Mm.13849	NM_013560	Hspb1	Heat shock protein 1	Hsp25
46	Mm.251483	NM_023633	HSP90-Rik	RIKEN cDNA 2410016O06 gene, human HSP90 homolog	HSP90/CDw52
47	Mm.90364	NM_010493	Icam1	Intercellular adhesion molecule	ICAM-1
48	Mm.29254	NM_008343	Igfbp3	Insulin-like growth factor binding protein 3	Igfbp3
49	Mm.14190	NM_008366	Il2	Interleukin 2	IL-2
50	Mm.915	NM_008367	Il2ra	Interleukin 2 receptor, alpha chain	CD25
51	Mm.276360	NM_021283	Il4	Interleukin 4	IL-4
52	Mm.233802	NM_010557	Il4ra	Interleukin 4 receptor, alpha	IL-4R
53	Mm.105218	NM_008390	Irf1	Interferon regulatory factor 1	IRF-1
54	Mm.275071	NM_010591	Jun	Jun oncogene	c-JUN
55	Mm.1167	NM_008416	Junb	Jun-B oncogene	Jun-B
56	Mm.245297	NM_008455	Klkb1	Kallikrein B, plasma 1	Kallikrein 3
57	Mm.142722	NM_010639	Klk6	Kallikrein 6	Kallikrein 6
58	Mm.277072	NM_008493	Lep	Leptin	ob
59	Mm.87787	NM_010735	Lta	Lymphotoxin A	TNFB
60	Mm.22670	NM_010786	Mdm2	Transformed mouse 3T3 cell double minute 2	Mdm2

Position	Unigene	Genbank #	Symbol	Beschreibung	Gename
61	Mm.14126	NM_019471	Mmp10	Matrix metalloproteinase 10	Stromelysin 2
62	Mm.4825	NM_010810	Mmp7	Matrix metalloproteinase 7	MMP7
63	Mm.2444	NM_010849	Myc	Myelocytomatosis oncogene	c-myc
64	Mm.73682	NM_022995	Tmepai	Transmembrane, prostate androgen induced RNA	N4wbp4T/MEPAI
65	Mm.256765	NM_008689	Nfkb1	Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells 1, p105	NFKB1
66	Mm.170515	NM_010907	Nfkbia	Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	ikBa/Mad3
67	Mm.2893	NM_010927	Nos2	Nitric oxide synthase 2, inducible, macrophage	iNOS
68	Mm.34102	NM_013614	Odc	Ornithine decarboxylase, structural	Ornithine decarboxylase
69	Mm.12798	NM_008829	Pgr	Progesterone receptor	progesterone receptor
70	Mm.234258	NM_011101	Prkca	Protein kinase C, alpha	PKC alpha
71	Mm.287660	NM_011104	Prkce	Protein kinase C, epsilon	PKCE
72	Mm.138472	NM_008957	Ptch	Patched homolog	Patched
73	Mm.287037	NM_008958	Ptch2	Patched homolog 2	Patched 2
74	Mm.245395	NM_008960	Pten	Phosphatase and tensin homolog	PTEN
75	Mm.292547	NM_011198	Ptgs2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	Cox-2
76	Mm.302504	NM_011254	Rbp1	Retinol binding protein 1, cellular	CRBPI
77	Mm.12825	NM_009034	Rbp2	Retinol binding protein 2, cellular	CRBPII
78	Mm.290320	NM_011333	Ccl2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	Scya2
79	Mm.766	NM_008599	Cxcl9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	MIG/Scyb9
80	Mm.5245	NM_011345	Sele	Selectin, endothelial cell	E-selectin
81	Mm.3337	NM_011347	Selp	Selectin, platelet	P-selectin
82	Mm.10801	NM_009291	Stra6	Stimulated by retinoic acid gene 6	Stra6
83	Mm.5171	NM_009292	Stra8	Stimulated by retinoic acid gene 8	Stra8
84	Mm.1293	NM_013693	Tnf	Tumor necrosis factor	TNFa
85	Mm.193430	NM_020275	Tnfrsf10b	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	TRAIL-R/DR5
86	Mm.1626	NM_007987	Tnfrsf6	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6	Fas
87	Mm.3355	NM_010177	Tnfsf6	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 6	FasL
88	Mm.28683	NM_011638	Tfrc	Transferrin receptor	Tfrc/Trfr/Tfr1
89	Mm.248445	D63902	Trim25	Tripartite motif protein 25	EFP/Zfp147
90	Mm.222	NM_011640	Trp53	Transformation related protein 53	p53
91	Mm.76649	NM_011693	Vcam1	Vascular cell adhesion molecule 1	VCAM-1
92	Mm.10222	NM_018865	Wisp1	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	ELM1
93	Mm.13828	NM_016873	Wisp2	WNT1 inducible signaling pathway protein 2	WISP-2
94	Mm.1123	NM_021279	Wnt1	Wingless-related MMTV integration site 1	Wnt1
95	Mm.33653	NM_023653	Wnt2	Wingless-related MMTV integration site 2	Wnt2
96	Mm.307022	NM_019653	Wsb1	WD repeat and SOCS box-containing 1	WSB-1
97	N/A	L08752	PUC18	PUC18 Plasmid DNA	pUC18
98	N/A	L08752	PUC18	PUC18 Plasmid DNA	pUC18
99	N/A	L08752	PUC18	PUC18 Plasmid DNA	pUC18
100	Blank	Blank	Blank	Blank	0
101	Blank	Blank	Blank	Blank	0
102	Blank	Blank	Blank	Blank	0
103	Mm.333399	NM_008084	Gapd	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH
104	Mm.333399	NM_008084	Gapd	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH
105	Mm.5246	NM_008907	Ppia	Peptidylprolyl isomerase A	CyclophilinA
106	Mm.5246	NM_008907	Ppia	Peptidylprolyl isomerase A	CyclophilinA
107	Mm.5246	NM_008907	Ppia	Peptidylprolyl isomerase A	CyclophilinA
108	Mm.5246	NM_008907	Ppia	Peptidylprolyl isomerase A	CyclophilinA
109	Mm.180458	NM_009438	Rpl13a	Ribosomal protein L13a	RPL13A
110	Mm.180458	NM_009438	Rpl13a	Ribosomal protein L13a	RPL13A
111	Mm.297	NM_007393	Actb	Actin, beta, cytoplasmic	Beta-actin
112	Mm.297	NM_007393	Actb	Actin, beta, cytoplasmic	Beta-actin

Tabelle 2.8 Auflistung der Gene des GEArray Q Series Mouse Signal Transduction PathwayFinder (Superarray).

2.2.2.5 cAMP-Assay

Zur Messung der intrazellulären cAMP - Spiegel wurde ein kommerziell erhältlicher Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) verwendet. Die Arbeitsschritte wurden nach dem Protokoll für Zellmessungen (ohne Azetylierung) durchgeführt. Es wurden die cAMP – Spiegel von GABA (10 μ M) und Isoguvacin (10 μ M) stimulierten sowie unstimulierten TM3 Leydig-Zellen gemessen. Dafür wurden die Zellen nach Abnahme der Überstände für 20 min bei Raumtemperatur mit 0,1 M HCl Lösung inkubiert und anschließend mit einem Zellschaber (Sigma) von der Kulturoberfläche gelöst und in ein Eppendorf Röhrchen überführt. Nun wurden die Proben bei 3000 U/min für 10 min zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus), die Überstände in ein neues Eppendorf Röhrchen überführt und bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Als nächstes wurden die Proben mit EIATM Puffer verdünnt (Verdünnungsfaktor 2) und dann 50 μ l der verdünnten Proben und der 8 Standards (2,3 – 300 pmol/ml) unter Zugabe von jeweils 50 μ l Tracer und 50 μ l Antiserum auf die Messplatte aufgetragen. Dann wurde die Messplatte mit einer Folie bedeckt und für 18 h bei 4 °C gelagert. Anschließend wurden die Inkubationsschälchen entleert und 5 x mit 200 μ l Waschpuffer gespült. Nun wurde zu jedem Ansatz 200 μ l Ellmanns Reagenz (enthält das Substrat der AChE) zugegeben, die Platte wiederum abgedeckt und im Dunkeln inkubiert. Nach 60 min wurde dann die OD mit dem Mikroplate Reader (DYNEX) gemessen, aus den Messwerten der Standards die Standardkurve mit der Software Exel (Microsoft) erstellt und die cAMP – Spiegel der Proben berechnet.

2.2.3 Proteinbiochemie

2.2.3.1 Protein Präparation

Zur Proteingewinnung wurden die TM3 Zellen mit einem Zellschaber (Sigma) von der Zellschale gelöst, in 1 ml 1 x PBS in ein Eppendorf Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 4 °C mit 13000 U/min für 5 min (Biofuge fresco, Heraeus) zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde anschließend in Probenpuffer aufgenommen und dann mittels Ultraschallbehandlung (Ultra-Turrax T-25, IKA Labortechnik) homogenisiert. Der Proteingehalt der Proben wurde mittels einer Bicinchoninsäurereaktion (protein assay reagent, Pierce) ermittelt, in dem die Absorption eines Bicinchoninsäure-Kupfer-Komplexes bei 562 nm gemessen wurde. Zur Erstellung der Eichgeraden

wurden Albumin-Lösungen von 0-20 mg/ml in Probenpuffer verwendet. Die photometrische Messung erfolgte mit dem Spektrophotometer DU 640 (Beckman).

2.2.3.2 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 und durch 10% β -Mercaptoethanol sowie durch 5 min kochen bei 95 °C denaturiert. Die Zugabe von SDS 10% bewirkt, dass die Proteinmoleküle mehrfach negativ geladen werden. 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; 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), die mit Transferpuffer gefüllt wurde, bei 100 V für 60 min 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 40 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 und am folgenden Tag für 1,5 h bei Raumtemperatur. 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 Antigen - Antikörper Reaktion mit Hilfe von ECL-Reagenz (Amersham Life Science) 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 dann mit der Software Image 1.62 (NIH) gemessen.

In den Fällen, in denen Blots für egr-1 und β -Actin angefertigt wurden, wurden diese zuerst dem Antiserum gegen egr-1 und nachfolgend dem Antikörper gegen β -Actin ausgesetzt.

2.2.4 Immunfluoreszenz Untersuchungen

Für die Immunfluoreszenz-Untersuchungen wurden ca. 2000 TM3 Zellen auf laminierte Deckgläschen in dem Medium F12-DME (pH 7,2; Sigma), 2,5% FKS (FCS Gold, PAA) und 5% PS (Biochrom) transferiert und bei 37 °C und 5% CO₂-Atmosphäre für 0,5 – 1d kultiviert. Das Laminieren der Deckgläschen war nötig, da die TM3 Zellen auf der Glasoberfläche der Plättchen nicht zu genüge adhären wuchsen. Die sterilisierten Deckgläschen wurden hierzu mit einem Tropfen Lamininlösung (5 µg/ml, in sterilem H₂O) beschichtet. Dann wurden sie über Nacht im Kühlschrank gelagert, am nächsten Tag 3 x mit sterilem H₂O gespült und anschließend getrocknet. Nun wurden sie entweder sofort mit TM3 Zellen besät oder bis zur Verwendung in mit Parafilm umwickelten Kulturschalen bei 4 °C aufgehoben. Für die Stimulationsversuche wurden die Zellen nun wie in Kapitel 2.2.1.4 beschrieben behandelt. Dann wurden die Zellen 2 x mit serumfreiem F12-DME Medium gespült und anschließend mit 4% PFA 30 min fixiert. Nach zweimaligem Spülen mit 1 x PBS wurden die Zellen entweder sofort nach dem unten folgenden Protokoll weiterverarbeitet oder getrocknet, mit Parafilm umwickelt und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Arbeitsprotokoll:

- 3 x 5 min spülen mit 1 x PBS (pH 7,4)
- 3 x 10 min spülen mit KPBS (0,02 M)
- 1 x 10 min spülen mit LKPBS
- Über Nacht bei 4 °C inkubieren mit Primärantikörper gelöst in LKPBS
- 2 x 10 min spülen mit KPBS
- 1 x 10 min spülen mit LKPBS
- 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln mit FITC markiertem 2. Antikörper (Ziege gegen Kaninchen IgG oder Ziege gegen Maus IgG) 1: 500 inkubieren
- 3 x 10 min spülen mit KPBS (unter Lichtausschluss)
- 1 x 5 min spülen mit Aqua bidest
- Eindeckeln mit Antifade Kit (Molecular Probes)

Nun wurden die Präparate unter einem Mikroskop (Axiovert 135, Zeiss) mit Fluoreszenzausstattung betrachtet und mit einem integrierten Kamerasystem (456070, Zeiss) aufgenommen. Aus den Negativen wurden DIAs erstellt, welche schließlich eingescannt (LS 4500, Nikon) und digitalisiert wurden.

2.2.5 Immunhistochemie

Von dem in der Arbeitsgruppe vorhandenen 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 [24;50] in folgenden Arbeitsschritten durchgeführt:

Entparaffinisierung:

- Xylol 5 min (2x)
- 100% Isopropanol 4 min (2x)
- 90% Isopropanol 3 min (2x)
- 80% Isopropanol 3 min (2x)
- 70% Isopropanol 3 min (1x)
- H₂O 5 min
- Inkubation für 5-10 min in 0,01% (g/v) Trypsin/0,1% (g/v) CaCl₂ (pH 7,8) bei 37 °C
- 3 x 5 min waschen mit 10 mM PBS (pH 7,4)
- Blockierung der endogenen Peroxidase mit 0,06% (v/v) H₂O₂ und 1% (v/v) Methanol in PBS für 30 min bei Raumtemperatur
- 3 x 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 x 5 min waschen mit PBS
- Inkubation mit 2. Antikörper für 2 h bei Raumtemperatur unter schütteln
- 3 x 5 min waschen mit PBS
- Tris-HCl für 10 min
- Tris-HCl/DAB (Diaminobenzidin) mit 0,06% (v/v) H₂O₂ für 5 -10 min bei Raumtemperatur
- 10 min waschen mit Tris-HCl
- 3 x 5 min waschen mit PBS
 - Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 10 -15 s (fakultativ)
 - Bläuen unter fließendem Wasser für 3 min, abspülen mit H₂O
- Eindeckeln mit Entellan (Merck)

Anschließend wurden die Präparate unter einem Mikroskop (Axioplan, Zeiss) betrachtet und mit einer integrierten Digitalkamera (Fine Pix/s 2 pro, Fujifilm) aufgenommen und digitalisiert.

2.2.6 Radioimmunoassay

Die Testosteron Spiegel wurden in den Inkubationsmedien, der primären adulten Leydig-Zellen, mit Hilfe eines Radioimmunoassays mit einem spezifischen Antikörper, der gegen Testosteron - 7 α - butyrat – BSA (Medicorp Inc, Montreal, Kanada) gerichtet ist, bestimmt. [51;140]. Dieser Antikörper zeigt 35 % Kreuzreaktivität mit Dihydrotestosteron (DHT). Die Minimalkonzentration an Testosteron, die vom Assay noch detektiert werden kann beträgt 0,215 pmol/ml.

Zuerst wurde das, wie unter 2.2.1.4 beschrieben, erhaltene Inkubationsmedium für 10 min bei 5000 x *g* zentrifugiert und dann bei -20 °C bis zur Testosteronbestimmung gelagert.

Die Messung der Testosteronspiegel startete am Tag 1 mit der Pipettierung der Standards und der Vorbereitung der Proben. Hierzu wurden jeweils 100 μ l der 8 verschiedenen Standards (6,25 pg/100 μ l – 800 pg/100 μ l Testosteron) und verschiedene Volumina der Proben mit RIA - Puffer zu einem Endvolumen von 300 μ l aufgefüllt. Dann wurden 100 μ l Antikörper (Medicorp Inc, Montreal, Quebec, Kanada) mit 100 μ l H³-markiertem Testosteron (H³-Testosteron 7000 cpm/100 μ l) versetzt und anschließend zu jedem der Standards und Proben zugegeben. Nun wurden diese Ansätze über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde zur Trennung der Antigen-Antikörper-Komplexe vom freien Antigen den Serumproben 200 μ l einer Mischung aus 0,5 g Aktivkohle, 0,05 g Dextran und 100 ml RIA Puffer zugegeben und diese Ansätze für 10 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden diese Proben, wiederum bei 4 °C, für 10 min mit 5000 x *g* zentrifugiert, dann die Überstände entnommen und in einem neuen Röhrchen mit 200 μ l Dioxan vermischt. Nun wurde 2,5 ml des Szintilationscocktails OptiPhase HiSafe 2 (FisherChemicals, Loughborough Leics, England) hinzugefügt und die Aktivität des freien Antigens mit einem Geigerzähler bestimmt. Aus den Messwerten der Standards konnte dann die Menge an Testosteron in den Proben kalkuliert werden.

2.2.7 Elektrophysiologie

Anmerkung: Die Patch-Clamp-Messungen und die Ca^{2+} -Messungen wurden unter der Leitung von Herrn PD Dr. Karl Föhr durchgeführt.

Die Membranpotentialmessungen wurden unter der Leitung von Herrn Dr. Lars Kunz durchgeführt.

2.2.7.1 Patch-Clamp

Für die Patch-Clamp Experimente an TM3 und isolierten adulten Leydig-Zellen wurden diese auf laminierten Deckgläschen (s. dafür Kapitel 2.2.4), die in Kulturschalen platziert waren, kultiviert. Zu Beginn der Messungen wurde dann das jeweilige Medium aus den Zellschalen abgesaugt und die Zellen mit einem "extrazellulären" Medium überströmt. Das Medium wurde mit einer Rate von 4,5 ml/min kontinuierlich ausgetauscht. Die Membranleitfähigkeit wurde bei Raumtemperatur (23-25 °C) mit Hilfe der Whole-Cell Patch-Clamp Technik bestimmt. Die Ausstattung bestand aus einem EPC-9 Patch-Clamp Verstärker und der TIDA Software von HEKA (Lambrecht, Germany). Die Patchpipetten wurden aus Borosilikat Glas mit einem Pipettenwiderstand von 3-6 M Ω gezogen und mit einem "intrazellulären" Medium gefüllt. Um die Abdichtung der Pipette zu verbessern wurde sie kurz in Dimethyldichlorosilan 2%, verdünnt in Methylenchlorid, getaucht. Für die Messung der Membranströme wurde das Membranpotential auf -80 mV geklemmt.

2.2.7.2 Ca^{2+} -Messungen

Die Ca^{2+} -Messungen wurden wie in [47] beschrieben durchgeführt. Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen für 30 min bei 37 °C mit Fura-2/AM (2,5 μM , verdünnt in DMSO) in einer extrazellulären Lösung beladen. Vor den Messungen wurden die Zellen sorgfältig mit der farbstofffreien extrazellulären Lösung gewaschen.

Fluoreszenz Messungen wurden mit dem Zeiss Fast Fluorescence Photometry System (MPM-FFP, Zeiss Oberkochen, Deutschland) durchgeführt, welches mit einem umgekehrten Mikroskop (Axiovert 35) für Epifluoreszenz Messungen ausgerüstet ist. Die Erregungswellenlänge wurde, mit Hilfe geeigneter Interferenzfilter (Bandweite 10 nm), die, auf einem Filterrad montiert, abwechselnd in den Strahlengang gedreht wurden, mit 400 Hz zwischen 340 nm und 380 nm gewechselt. Dieses System erlaubte das emittierte Licht (505 - 530 nm) mit einer Zeitauflösung von 5 ms für ein Paar (340 nm; 380 nm) von Erregungswellenlängen

aufzuzeichnen. Die aufgezeichneten Daten wurden gemittelt und so eine zeitliche Endauflösung von 80 ms erhalten. Die intrazellulären Ca^{2+} -Level sind in den Graphen als Fluoreszenzverhältnisse (340/380nm), welche durch abwechselnde Erregung bei 340 und 380 nm erhalten wurden, aufgezeichnet.

2.2.7.3 Applikation der Stimulantien

Die Agenzien wurden mittels dem SPS-8 Superfusions System (List, Darmstadt, Deutschland) in unmittelbarer Nähe der Zellen zugegeben. Um die Anwesenheit des Agens in einem kleinen Volumen des Petrischälchens zu halten wurde eine Kombination von zwei Perfusionssystemen installiert: 1. eine "globale" Perfusion mit einem Zustrom von 4,5 ml/min und einem Ausfluss, der jede überschüssige Flüssigkeit entfernte und 2. eine "lokale" Perfusion, die einen kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom erzeugte, der das Agens in der gewünschten Konzentration enthielt. Der lokale Zufluss wurde 50 – 100 μm oberhalb und der lokale Ausfluss ungefähr 300 μm unterhalb des Messareals positioniert. Die Stimulantien wurden mit einer Kombination aus Schwerkraft und einem zusätzlichen Druck-Kontroll-System appliziert. Die so erhaltene Flussrate betrug ungefähr 1 ml/min. Der Zustrom aus den 8 zu Verfügung stehenden Spritzen, die mit dem lokalen Zufluss verbunden waren, wurde mit magnetischen Ventilen kontrolliert.

2.2.7.4 Messungen des Membranpotentials

Das Ruhemembranpotential (V_R) der TM3 Zellen wurde mit Hilfe der Fluoreszenz Potentialsonde DiBAC₄(3) (Molecular Probes, Eugene, OR, US), die sich abhängig von V_R über der Plasmamembran verteilt, aufgezeichnet [106;110]. DiBAC₄(3) ist eine der sensitivsten Potentialsonden (1 % Fluoreszenz Änderung pro mV), jedoch reagiert sie sehr langsam auf Potential Änderungen (ungefähr mit 30-60 Sekunden Verzögerung). Die intrazelluläre DiBAC₄(3) Fluoreszenz wurde in einer Messkammer, die auf einem TCS SP2 konfokalen Mikroskop (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) aufgebaut war, in Echtzeit aufgenommen. Die Potentialsonde wurde mit 488 nm erregt, die emittierte Fluoreszenz in einer Bandbreite zwischen 500 und 540 nm aufgezeichnet und die intrazelluläre Signalintensität quantifiziert. Vor der Messung wurden die Zellen mit einer 1 mM DiBAC₄(3) enthaltenden extrazellulären Lösung für 10 min inkubiert. Anschließend wurde GABA (100 μM) gelöst in der extrazellulären DiBAC₄(3) Lösung für bis zu 10 min mit einer feinen Stahl-nadel in unmittelbarer Nähe zu den Zellen appliziert.

3. Resultate

3.1 GABA und GABA Rezeptoren in Leydig-Zellen

3.1.1 TM3 Leydig-Zellen besitzen ein GABAerges System

RT-PCR Untersuchungen der TM3 Leydig-Zellen zeigten, dass die mRNA der GABA_A Rezeptor Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 3$ und $\gamma 1$, sowie der GABA_C Rezeptor Untereinheiten $\rho 1$ und $\rho 2$ in diesen Zellen anwesend sind. Die mRNAs der GABA_B Untereinheiten R1, R2 sowie der GABA_A Untereinheiten $\alpha 3$, $\beta 2$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ und der GABA_C Untereinheit $\rho 3$ konnten nicht nachgewiesen werden (s. auch **Tabelle 3.1** und **Abbildung 3.1**). Des Weiteren konnte mit Hilfe der RT - PCR der Nachweis erbracht werden, dass TM3 Zellen das vesikuläre Transportprotein (VIAAT) und das GABA synthetisierende Enzym GAD 67 besitzen.

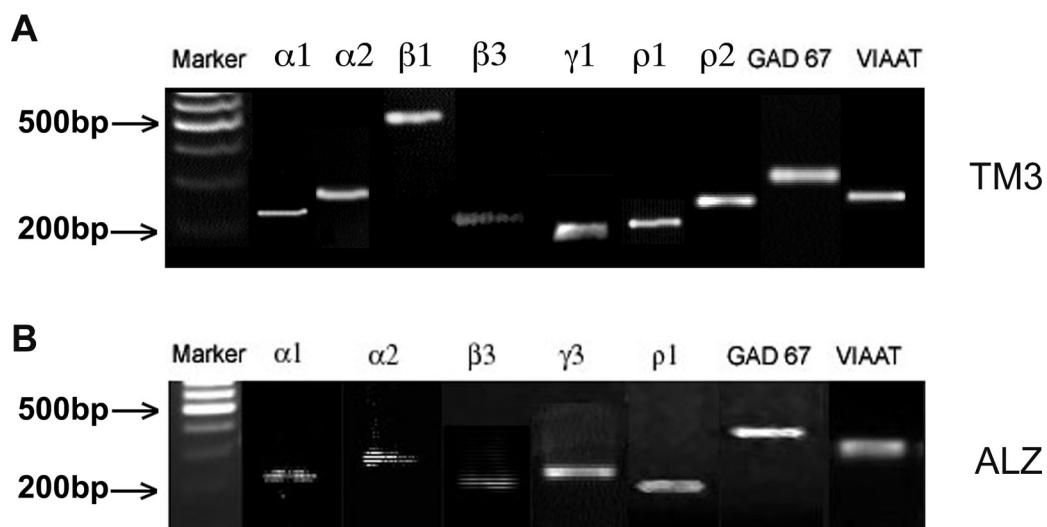


Abbildung 3.1 A Zusammenstellung der PCR Banden von Komponenten des GABAergen Systems, die in TM3 Zellen gefunden wurden (GABA_A Rezeptor Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 3$, $\gamma 1$; GABA_C Rezeptor Untereinheiten $\rho 1$ und $\rho 2$; GAD 67 und VIAAT)

B Zusammenstellung der PCR Banden von Komponenten des GABAergen Systems, die in ALZ gefunden wurden (GABA_A Rezeptor Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 3$, $\gamma 3$; GABA_C Rezeptor Untereinheit $\rho 1$; GAD 67 und VIAAT).

Im Falle von VIAAT und GAD 67 konnte nicht nur das Gentranskript sondern auch das Protein in der Zelle nachgewiesen werden. So zeigten Immunfluoreszenz Studien an TM3 Zellen ein VIAAT und GAD Signal, Western Blot Experimente mit Proteinextrakten aus TM3 Zellen und einem Antikörper der gegen GAD 65 und 67

gerichtet ist, spezifizierten letzteres als GAD 67 (**Abbildung 3.2**). GAD 65 konnte weder in RT – PCR noch in Western Blot Experimenten detektiert werden.

	GABA _A									GABA _B		GABA _C			GAD ₆₅	GAD ₆₇	VIAAT
	α1	α2	α3	β1	β2	β3	γ1	γ2	γ3	R1	R2	ρ1	ρ2	ρ3			
TM3	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
ALZ	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+

Table 3.1 Übersicht über die mittels RT-PCR ermittelte Anwesenheit des GABAergen Systems in TM3 und ALZ.

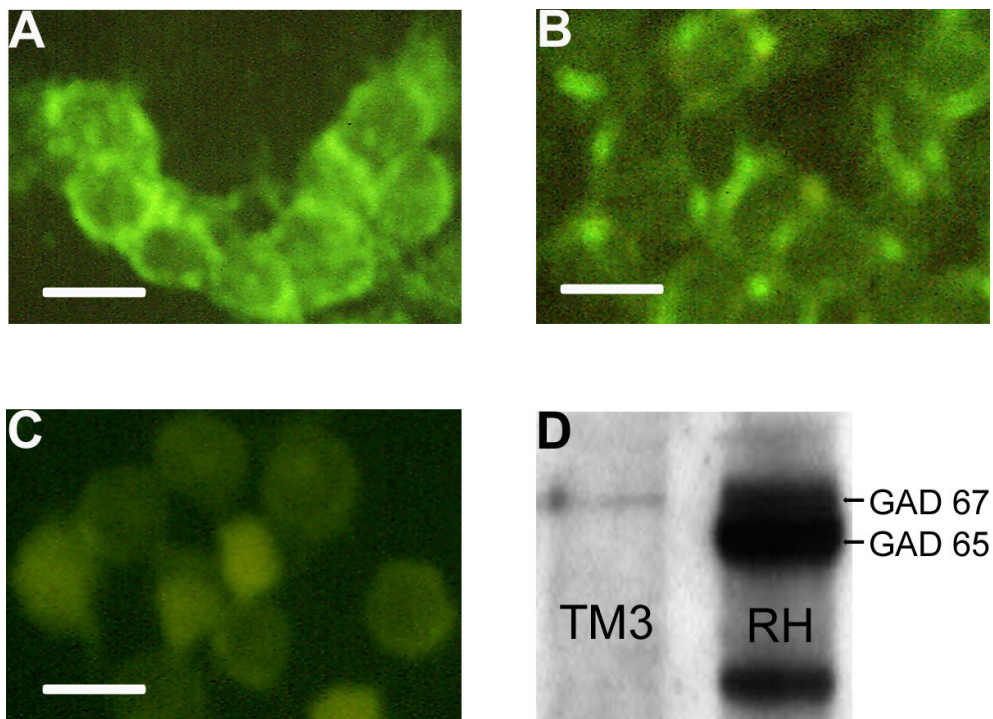


Abbildung 3.2 A-C Immunfluoreszenz Studien, die die Anwesenheit von VIAAT (A) und GAD (B) in TM3 Leydig-Zellen zeigen. Die Kontrolle (ohne 1. Antikörper (C)) zeigt kein spezifisches Signal. Balken = 15µm D Im Western Blot Experiment zeigt sich die Anwesenheit von GAD 67 in TM3 Leydig-Zellen. Zum Vergleich zeigt sich in Proteinextrakten aus Rattenshirn (RH) die Anwesenheit von GAD 65 und 67.

3.1.2 Adulte Leydig-Zellen besitzen ein GABAerges System

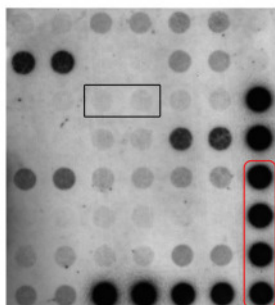
RT - PCR Studien an isolierten adulten Leydig-Zellen der Maus ergaben, dass die GABA_A Untereinheiten α 1, α 2, β 3 und γ 3 sowie die GABA_C Untereinheit ρ 1 in diesen Zellen exprimiert werden. Des Weiteren konnte mit Hilfe der PCR wie in TM3 Zellen VIAAT und GAD 67 nachgewiesen werden. GAD 65, die GABA_B Untereinheiten R1 und R2, die GABA_A Untereinheiten α 3, β 1, β 2, γ 1 und γ 2 sowie die GABA_C Untereinheiten ρ 2 und ρ 3 konnten nicht nachgewiesen werden (s. **Tabelle 3.1** und **Abbildung 3.1**).

3.2 Molekulare Effekte von GABA in Leydig-Zellen

3.2.1 GABA und Isoguvacin induzieren *egr-1* in Leydig-Zellen

Um Hinweise auf beteiligte Komponenten der GABA Signalkaskade zu erhalten, wurden cDNA - Array Versuche mit TM3 Zellen nach GABA und Isoguvacin

A Kontrolle



GABA 60'

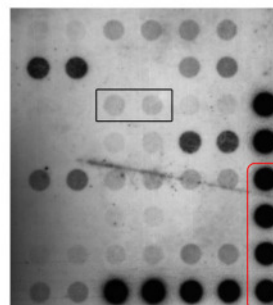
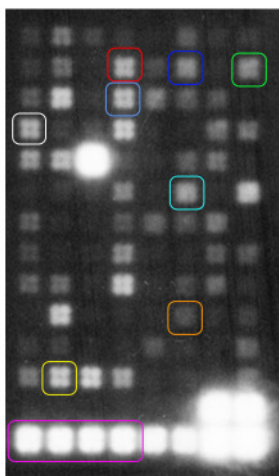
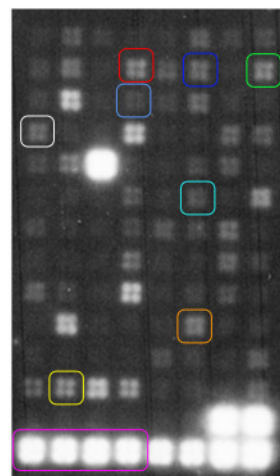


Abbildung 3.3 A Mouse pathfinder- 1 GEArray Membranen zeigen die mRNA Level unterschiedlicher Gene in TM3 Zellen ohne Stimulation (Kontrolle) und nach 60 min GABA (10 μ M) Behandlung (GABA 60'). Es zeigt sich, dass die mRNA Menge von *egr-1* nach GABA Behandlung vermehrt ist (Schwarz). Als Referenzgen diente GAPDH (rot).

B Kontrolle



Iso 120'



B GEArray Q Series Mouse Signal Transduction PathwayFinder Membranen zeigen die mRNA Level unterschiedlicher Gene in TM3 Zellen ohne Stimulation (Kontrolle) und nach 120 min Isoguvacin (10 μ M) Behandlung (Iso 120'). Es zeigt sich, dass die mRNA Menge der Gene für BMP4 (rot), Cyclin D1 (dunkelblau), cdk 2L (grün), cdkn2a (hellblau), cebpb (weiß) und HSP 90 (türkis), p53 (gelb), durch Isoguvacin vermindert werden und dass die mRNA Menge von Scya2 (orange) durch Isoguvacin vermehrt wird. Als Referenzgen diente Cyclophilin A (*ppia*) (violett).

Stimulation durchgeführt. Hier zeigte sich die Regulation einer Vielzahl von Genen im Vergleich mit der unstimulierten Kontrolle. So wurde in TM3 Zellen unter anderem die mRNA Menge des early growth response-factor 1 (egr-1) nach 60 min GABA Behandlung und von Scya2 nach 120 min Isoguvacin Behandlung vermehrt und die mRNA Menge von Cyclin D1, BMP4, cdk 2L, p53, cdkn2a cebpb und HSP 90 nach 120 min Isoguvacin Behandlung vermindert (s. **Abbildung 3.3**).

Da egr-1 an der Zellproliferation und Differenzierung beteiligt ist und TM3 Zellen unter GABA Behandlung proliferieren [58], fokussierten die weiteren Untersuchungen auf diesen pluripotenten Transkriptionsfaktor. RT-PCR Experimente bestätigten die egr-1 Induktion durch GABA in TM3 Zellen. Hier zeigte sich eine Zunahme der egr-1 mRNA Menge 5 – 10 und 30 min nach GABA Behandlung. Weitere RT-PCR Experimente ergaben Hinweise darauf, dass GABA in primären adulten Leydig-Zellen einen gleichartigen Effekt hat, denn hier steigerte sich der mRNA Gehalt nach 30 min GABA Behandlung ebenfalls (s. **Abb. 3.4**).

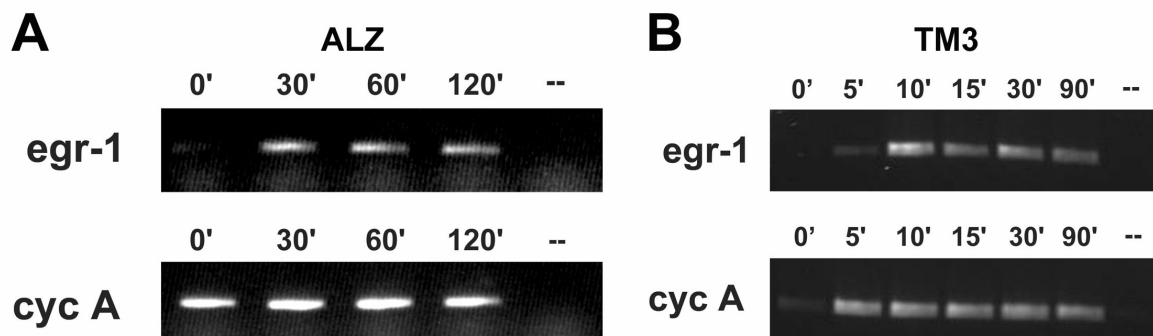


Abbildung 3.4 Mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR konnte gezeigt werden, dass GABA (10 μ M) die mRNA Level von egr-1 in primären adulten Leydig-Zellen ($n=3$) (**A**) und in TM3 Zellen ($n=3$) (**B**) zeitabhängig steigert, während die Expression von Cyclophilin A (cyc A) konstant bleibt. (--) Kontrolle (keine cDNA zugegeben). (') Minuten.

Western Blot Analysen an TM3 Zellen zeigten, dass auch die egr-1 Proteinmenge nach GABA/Isoguvacin Behandlung zeitabhängig ansteigt (s. **Abb. 3.5**). Hier steigerte sich die egr-1 Proteinmenge 15 – 45 min nach GABA Behandlung deutlich. Ähnliche Ergebnisse brachte die Behandlung der TM3 Zellen mit Isoguvacin. Es zeigte sich hier, dass die egr-1 Proteinmenge 15 – 30 min nach Behandlung am größten ist.

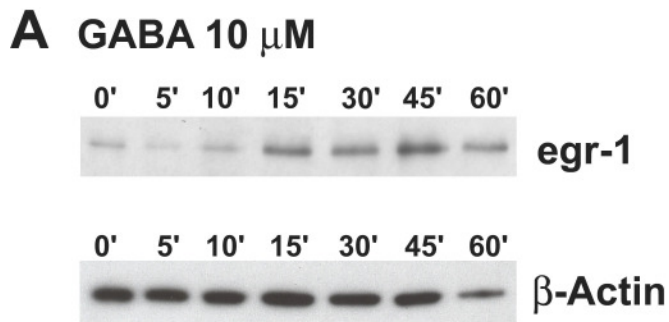
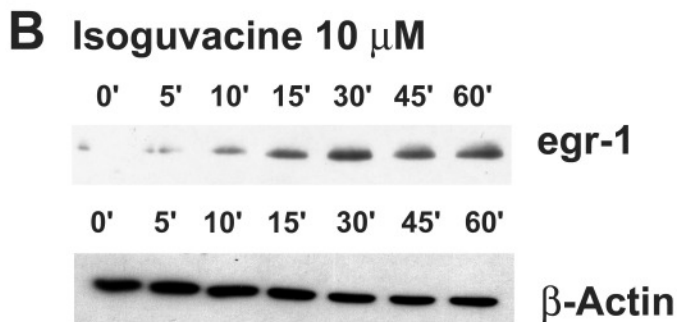


Abbildung 3.5 Western Blot Experimente mit TM3 Zellen zeigen die zeitabhängige Steigerung der egr-1 Proteinmenge von 0 – 60 Minuten (') nach 10 μ M GABA (n=3) (**A**) und 10 μ M Isoguvacin (n=2) (**B**) Behandlung während die Proteinmenge von β -Actin konstant bleibt (untere Banden in **A** und **B**).



3.2.2 GABA und Isoguvacin regulieren die MAP-Kinasen (ERK1/2)

Aufgrund der bekannten Rolle der MAPK (ERK 1/2) bei Zellproliferation und den in der Literatur beschriebenen Verbindungen der Signalwege von egr-1 und MAPK (ERK 1/2) [67], wurde auch eine Regulation dieser Enzyme via GABA_A Rezeptor Stimulation überprüft. Mit Hilfe von WB Experimenten konnte ein vermehrter Phosphorylierungsgrad von ERK 1/2 nach 15 min GABA und Isoguvacin Behandlung festgestellt werden (s **Abbildung 3.6**).

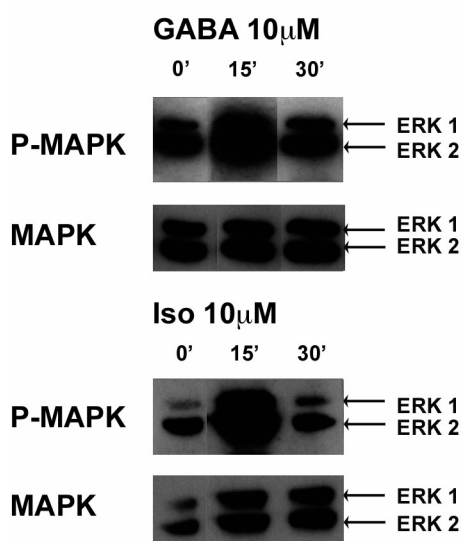


Abbildung 3.6 Western Blot Experimente zeigen eine deutliche Zunahme der Menge phosphorylierter ERK 1/2 (P-MAPK) in TM3 Zellen nach 15 min (') 10 μ M GABA (n=1; oben) oder Isoguvacin (n=1; unten) Behandlung. Zum Vergleich: die Menge an nicht phosphorylierten ERK 1/2 (MAPK) ändert sich nur unwesentlich.

Dieses Ergebnis spricht für eine Steuerung der Aktivität dieser Enzyme durch GABA und Isoguvacin über Phosphorylierung.

3.2.3 GABA und die Second Messenger Ca^{2+} und cAMP

Zur weiteren Analyse des GABA Signaltransduktionsweges wurden zwei Second Messenger Systeme untersucht, von denen in anderen Geweben gezeigt worden ist, dass sie GABA-Effekte vermitteln.

So führt GABA_A Rezeptor Stimulation in sich entwickelnden Neuronen zur Aktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle mit konsekutiver Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels [86;89;116;157]. Des Weiteren wurde berichtet, dass cAMP in Neuronen sowie in nicht neuronalen Zellen an dem Signaltransduktionsweg von GABA_A Rezeptoren beteiligt ist [14;123;155;156]. In TM3 und primären adulten Leydig-Zellen konnte jedoch keine Änderung der zytoplasmatischen Kalziumspiegel nach Stimulation mit 100 μM GABA festgestellt werden ($n=10$) (s. **Abbildung 3.7**). Auch Isoguvacin konnte in TM3 Zellen keine Ca^{2+} -Signale auslösen.

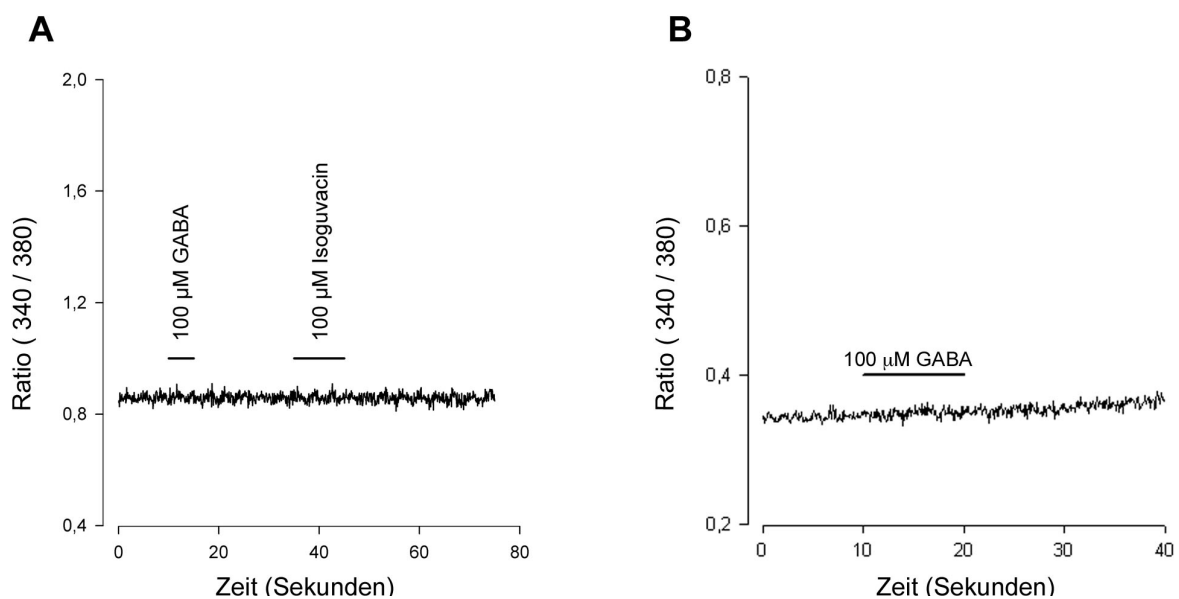
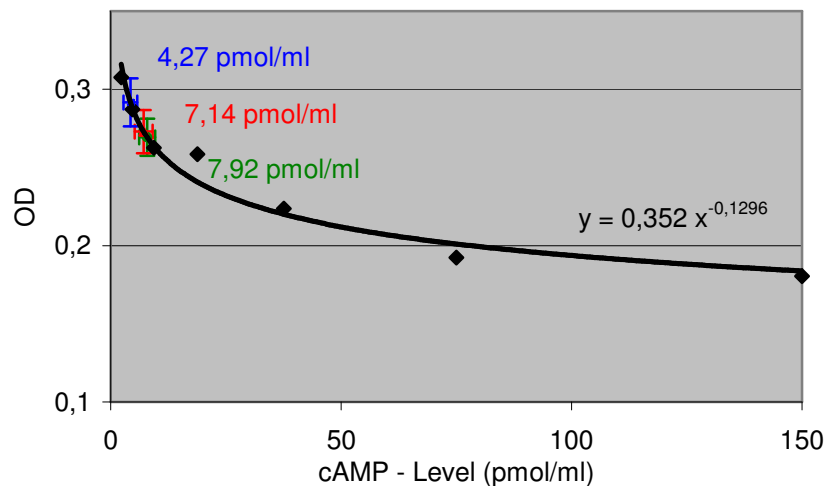


Abbildung 3.7 Die Graphen zeigen, dass weder in TM3 Zellen ($n=10$) (**A**) noch in primären adulten Leydig-Zellen ($n=10$) (**B**) nach GABA (100 μM) oder Isoguvacin (100 μM ; nur in TM3 getestet) Behandlung Änderungen des zytoplasmatischen Kalziumspiegels auftreten. Gezeigt wird jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus $n=10$ Messungen.

Die Untersuchung des cAMP Spiegels in TM3 Zellen nach GABA (10 μM ; 30 min) und Isoguvacin (10 μM ; 30 min) Behandlung ergab ebenfalls keinen Hinweis auf eine

Involvierung dieses Messengersystemes in den Signalweg. Die erhaltenen Werte lagen knapp über der Nachweisgrenze der Methode (Kontrolle (unstimuliert): 7,92 +/- 1,73 pmol/ml; GABA: 7,14 +/- 1,96 pmol/ml; Isoguvacin: 4,27 +/- 1,5 pmol/ml; siehe auch **Abbildung 3.8**) und zeigten keine signifikante Regulation durch GABA oder Isoguvacin Behandlung.

Abbildung 3.8 Der Graph zeigt die Darstellung der cAMP – Spiegel von GABA (10 μ M; 30 min) [7,14 +/- 1,96 pmol/ml] (n=6), Isoguvacin (10 μ M; 30 min) [4,27 +/- 1,5 pmol/ml] (n=6) und unstimulierten (Kontrolle) [7,92 +/- 1,73 pmol/ml] (n=6) TM3 Zellen. Es zeigt sich, das weder GABA noch Isoguvacin die cAMP – Spiegel signifikant regulieren.



Die schwarzen Punkte bezeichnen die Mittelwerte der OD der Standards, die Linie stellt die Näherungskurve (Formel: $y = 0,352 x^{-0,1296}$) der Standardkurve dar. Die y-Werte repräsentieren die Mittelwerte aus 6 Messwerten (OD). Mit Hilfe der Näherungsgleichung wurden die x-Werte (cAMP – Spiegel in pmol/ml) berechnet. Die y-Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte (OD) und die x-Fehlerbalken zeigen die mit Hilfe der Gaußschen Fehlerfortleitung berechneten Fehler der cAMP - Spiegel.

3.2.3 Elektrophysiologische Untersuchungen und Messung des Membranpotentials

Wie schon unter 1.2.1 beschrieben ist der typische GABA_A Rezeptor ein Cl⁻-Kanal, dessen Aktivierung je nach Elektrolytverhältnissen über der Zellmembran zu Cl⁻ Ein- oder Ausstrom führt. Die Ganz-Zell-Messungen an TM3 und isolierten adulten Leydig-Zellen ergaben jedoch keinen GABA_A Rezeptor Cl⁻-Strom (**Abbildung 3.9**) nach Stimulation mit 100 μ M GABA. Des Weiteren konnten auch mit Hilfe der Potentialsonde DiBAC₄(3) keine durch GABA hervorgerufenen Änderungen des Membranpotentials festgestellt werden (Ergebnis nicht gezeigt).

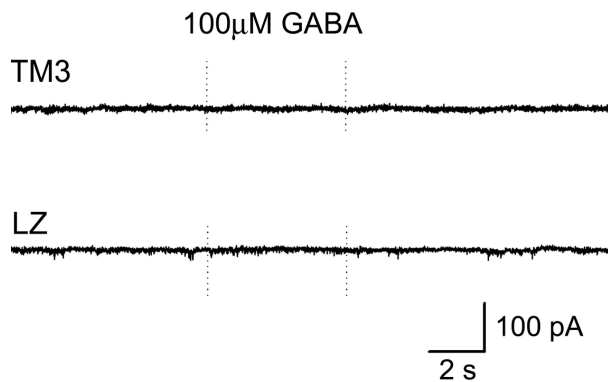


Abbildung 3.9 Ganz-Zell-Patch-Clamp Experimente zeigten weder in TM3 (obere Linie; $n=10$) noch in primären adulten Leydig-Zellen (untere Linie; $n=10$) einen GABA ($100 \mu\text{M}$) induzierten Strom. Haltepotential: -80mV .

3.2.4 Regulation des LH-Rezeptors und Produktion von Testosteron

Die Regulation von *egr-1* in TM3 und adulten Leydig-Zellen durch GABA_A Stimulation könnte verschiedene Gründe haben: eine Möglichkeit ist die Initiierung der Zellproliferation [58], eine weitere schon beschriebene Möglichkeit ist die Regulation der Testosteronproduktion [124;125]. In Studien mit primären adulten Leydig-Zellen zeigte sich, dass im Medium von mit GABA ($10 \mu\text{M}$; 9 h) stimulierten Leydig-Zellen ($n=10$) signifikant ($p=0,0045$; Student's t-Test) mehr Testosteron ($134,1 \pm 4,3 \text{ ng Testosteron}/1.000.000 \text{ Zellen}$) zu finden war als im Medium nicht stimulierter Leydig-Zellen ($n=10$; $114,8 \pm 6,1 \text{ ng}/1.000.000 \text{ Zellen}$) (s. **Abbildung 3.10**). TM3 Zellen zeigten weder nach GABA noch nach hCG (LH-Rezeptor Agonist) Behandlung eine signifikante Steigerung der Produktion von Steroiden (Progesteron= Vorläufer aller Sexualhormone) (Ergebnis nicht gezeigt).

Eine dritte Möglichkeit ist die Regulation des LH-Rezeptor Gens, denn es konnte gezeigt werden, dass *egr-1* ein potentieller Induktor des LH-Rezeptor Gens ist [154]. In TM3 Zellen konnte in mehreren RT-PCR Experimenten weder mit noch ohne GABA Behandlung die Expression des LH-Rezeptors nachgewiesen werden. Zusammen mit der nicht vorhandenen Produktion von Steroiden auch nach hCG Stimulation spricht dies dafür, dass TM3 Zellen keinen funktionstüchtigen LH-Rezeptor exprimieren. Dies zeigt, dass TM3 Zellen ungeeignet für LH-Rezeptor Expressionsstudien sind und hatte zur Folge, dass die LH-Rezeptor Expression nur an primären adulten Leydig-Zellen untersucht werden konnte.

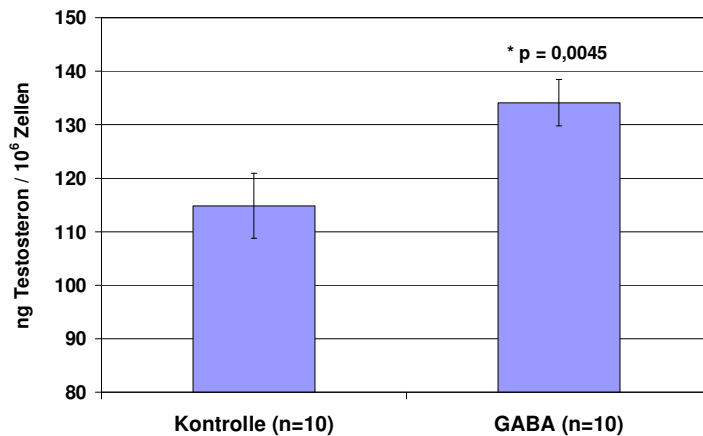


Abbildung 3.10

Testosteronproduktion von primären adulten Leydig-Zellen ohne (114,8 +/- 6,1 ng/1.000.000 Zellen; **Kontrolle**) und mit 9 h 10 μ M GABA (134,1 +/- 4,3 ng Testosteron/1.000.000 Zellen; **GABA**) Behandlung. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus n= 10 Experimenten. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes (SEM). $p=0,0045$; Student's t-Test.

Hier zeigten sich in einigen (4/10) RT-PCR Experimenten Hinweise dafür, dass 10 μ M GABA Stimulation einen Anstieg an LH-Rezeptor mRNA verursacht (**Abbildung 3.11**). In fünf (5/10) dieser RT-PCR Experimente konnte keine LH-Rezeptor Expression in den analysierten Zellen nachgewiesen werden und in einem (1/10) dieser Experimente fiel die mRNA Menge des LH-Rezeptors nach GABA Stimulation ab. Eine abschließende Beurteilung der Verhältnisse ist jedoch aufgrund der Ergebnisse derzeit nicht möglich.

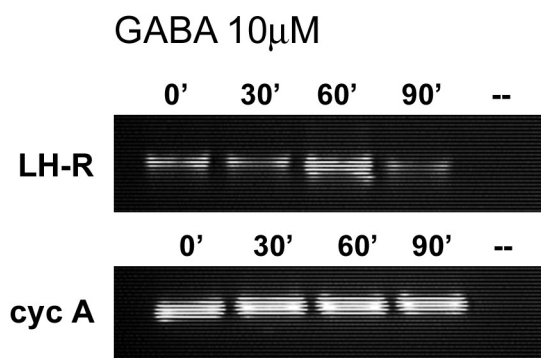


Abbildung 3.11 In primären adulten Leydig-Zellen zeigte sich in einigen (4/10) semiquantitativen RT-PCR Experimenten eine Zunahme der LH-Rezeptor mRNA. Hier ist ein repräsentatives Ergebnis dieser 4 Experimente dargestellt. Man kann sehen, dass die mRNA Level des LH-Rezeptors (LH-R) nach einer Stunde (60') GABA (10 μ M) Stimulation ansteigen. Die Expression von Cyclophilin A (cyc A) bleibt unverändert. (--) keine cDNA zugegeben (Kontrolle).

3.3 GABA und GABA Rezeptoren im sich entwickelnden Hoden

3.3.1 Das GABAerge System in d5, d20, d35 alten Mäusehoden

In Kapitel 2.1.1.1 wurde schon beschrieben, dass TM3 Zellen aus Hoden d11 - d13 alter Mäuse isoliert wurden. Unter dem Gesichtspunkt, dass GABA in dieser Zellreihe

die Proliferation fördert, ist die GABA Rezeptorausstattung der Leydig-Zellen in Hoden von postnatalen Mäusen interessant. So können die Anwesenheit eines GABAergen Systems und die nachweisbare Rezeptorausstattung und eventuell vorhandene Enzymsysteme eine gleichartige Regulierung dieser Zellen wahrscheinlich machen. Leider ist das zu erwartende Zellmaterial bei Isolierung von Leydig-Zellen aus sehr jungen Hoden gering, so dass Hoden Homogenate von Mäusen aus der postnatalen Periode zur Untersuchung herangezogen wurden. Bei RT – PCR Analysen von Hoden Homogenaten aus d5, d20, d35 alten Mäusen konnten einige Komponenten des GABAergen Systems entdeckt werden (s. **Tabelle 3.2**).

	d5	d20	d35
GABA _A α1	-	+	+
GABA _A α2	+++	++	+
GABA _A α3	-	-	-
GABA _A β1	+	+	+
GABA _A β2	+	+	+
GABA _A β3	+	++	+++
GABA _A γ1	-	-	-
GABA _A γ2	-	-	-
GABA _A γ3	+	++	+++
GABA _B R1	-	-	-
GABA _B R2	-	-	-
GABA _C ρ1	+	+	+
GABA _C ρ2	+	+	+
GABA _C ρ3	-	-	-
VIAAT	+	+	+
GAD 67	+	++	++
GAD 65	-	-	-

Tabelle 3.2 Übersicht über die mittels RT-PCR nachgewiesenen Komponenten des GABAergen Systems in Hoden von 5 (d5), 20 (d20) und 35 (d35) Tage alten Mäusen. Mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR war es möglich, relative Expressionslevel der Rezeptor Untereinheiten und von GAD und VIAAT zu ermitteln. Dabei wurden die Expressionslevel in jeder Altersstufe in 3 Hoden von unterschiedlichen Individuen untersucht und mit der α -Tubulin Expression verglichen. Hier zeigte sich, dass die Expression der GABA_A Untereinheiten α 1, β 3 und γ 3 im Verlaufe der Entwicklung zu- und die Expression der α 2 Untereinheit abnimmt (s. auch **Abbildung 3.11**) ebenso verhält es sich mit GAD 67. (+), (++) , (+++) relative Zunahme der Expression; (-) keine Expression nachweisbar.

Interessant dabei scheinen die GABA_A Untereinheiten α 1, α 2, β 3 und γ 3 zu sein, da sich deren Expressionsverhalten von d5 – d35 ändert (s. **Abbildung 3.12** und **Tabelle 3.2**). So scheint die Expression der GABA_A Untereinheiten α 1, β 3 und γ 3 im

Verlaufe der Entwicklung anzusteigen und die Expression der GABA_A Untereinheit $\alpha 2$ abzunehmen. Des Weiteren fällt auf, dass die Expression von GAD 67 ebenfalls im Verlaufe der Entwicklung ansteigt, während GAD 65 wie auch in TM3 und adulten Leydig-Zellen nicht exprimiert wird. Vergleicht man nun die Rezeptorausstattung von TM3 Zellen und postnatalen Mäusehoden so zeigt sich, dass die GABA_A Rezeptor Untereinheiten $\alpha 1$ (ab d20), $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 3$ sowie die GABA_C Untereinheiten $\rho 1$ und $\rho 2$ in beiden Geweben exprimiert werden.

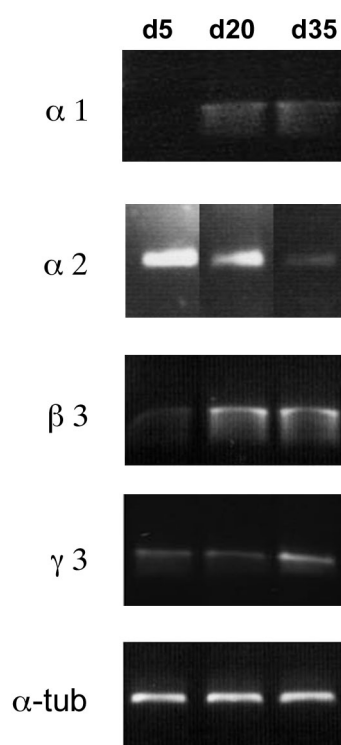


Abbildung 3.12 Semiquantitative RT-PCR zeigt jeweils von Tag 5 (d5) bis Tag 35 (d35) ansteigende Expressionslevel von $\alpha 1$, $\beta 3$ und $\gamma 3$ und absteigende Expressionslevel von $\alpha 2$ in Mäusehoden. Die Expression von α -Tubulin (α -tub) im Hoden bleibt in den verschiedenen Altersstufen konstant. Gezeigt wird jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchen, die in jeder Altersstufe in Hoden von unterschiedlichen Individuen (jeweils $n=3$) durchgeführt wurden.

Unterschiede in der Ausstattung der TM3 Zellen und der Hoden mit GABA_A Untereinheiten scheint es bei Angehörigen der γ -Familie zu geben. So wurde in den Hoden nur die $\gamma 3$ Untereinheit gefunden und in TM3 Zellen nur die $\gamma 1$ Untereinheit, auch fehlt in TM3 Zellen die GABA_A $\beta 2$ Untereinheit. Es muss bemerkt werden, dass der Nachweis dieser Komponenten in den Hoden Homogenaten nicht allein den Leydig-Zellen zugeschrieben werden darf, denn im Hoden kommen einige Zellarten vor, von denen man potentiell annehmen muss, oder von denen man, wie im Fall der Spermatozyten, definitiv weiß [72;100], dass sie ebenfalls Komponenten des GABAergen Systems exprimieren.

3.3.2 Egr- 1 Expression im postnatalen Hoden

Nachdem gezeigt wurde, dass GABA Rezeptoren und GAD 67 in der frühen postnatalen Periode im Mäusehoden vorkommen und die Zusammenstellung der Rezeptoren mit Untereinheiten ähnlich wie die der TM3 Zellen zu sein scheint, wurde nach funktionellen Gemeinsamkeiten zwischen der Zelllinie und den Hoden gesucht. In Kapitel 3.2.1 wird beschrieben, dass GABA den Transkriptionsfaktor *egr-1* induziert. Um *egr-1* als einen potentiellen Bestandteil des GABAergen Signalweges in postnatalen Hoden zu identifizieren, wurden immunhistochemische Färbungen von 6 Tage alten Rattenhoden für *egr-1* angefertigt. Dort zeigte sich eine deutliche Färbung interstitieller Zellen, die aufgrund ihrer Morphologie als fetale Leydig-Zellen oder als mesenchymale Vorläufer adulter Leydig-Zellen angesehen werden können (**Abbildung 3.13**).

Die damit bewiesene Anwesenheit von *egr-1* in Leydig-Zellen des postnatalen Hodens spricht für eine aktive Rolle des Transkriptionsfaktors in dieser Phase der Leydig-Zellentwicklung (s. auch Kapitel 1.1.1). Da diese Zellen - möglicherweise unter dem Einfluss von GABA - proliferieren [58] könnte es ein Hinweis darauf sein, dass *egr-1* in diesen Zellen Bestandteil der Signalkaskade ist durch die GABA die Leydig-Zellproliferation hervorruft. In adulten Hoden fand sich keine *egr-1* Färbung des Interstitiums (**Abbildung 3.13 (D)**).

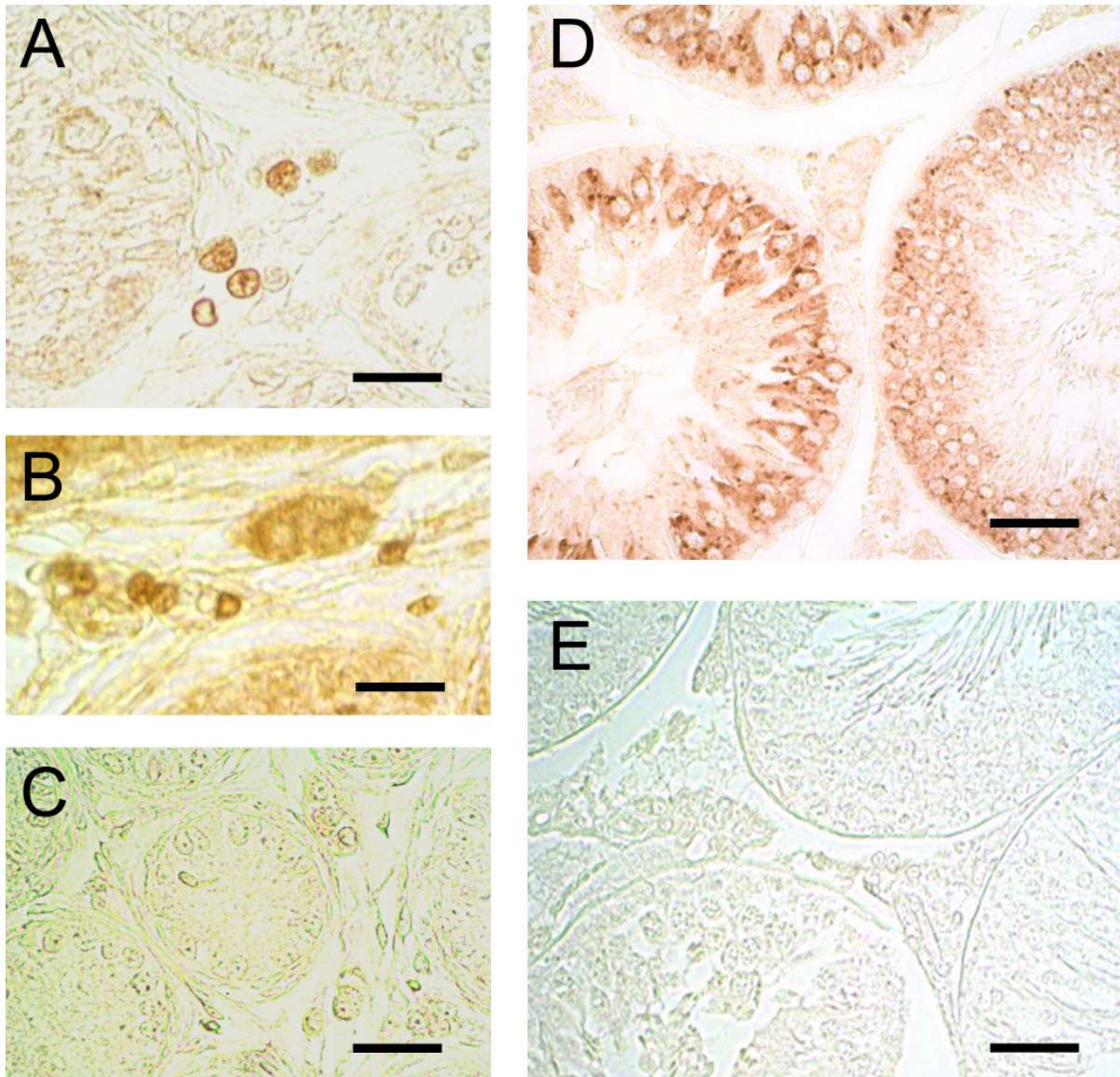


Abbildung 3.13 **A** Immunhistochemische Färbungen zeigen eine positive Kernfärbung für *egr-1* in interstitiellen Zellen im 6 Tage alten Rattenhoden. Diese Zellen repräsentieren wahrscheinlich adulte Vorläufer Leydig-Zellen. Balken: 15 μm
B Gruppen interstitieller Zellen im 6 Tage alten Rattenhoden, die sowohl zytoplasmatische als auch nukleäre Färbung für *egr-1* zeigen und wahrscheinlich fetale Leydig-Zellen repräsentieren. Balken: 15 μm
C Kontrollfärbung im 6 Tage alten Hoden. Hierzu wurde ein mit „*egr-1* blocking peptide“ vorinkubiertes Antiserum benutzt. Dies führte wie erwartet zu vollständigem Verlust des *egr-1* Signals und zeigt, dass in **A** und **B** ein spezifisches Signal gefunden wurde. Balken: 15 μm
D Die Immunhistochemischen Färbungen mit *egr-1* Antiserum in adulten Hoden zeigen kein interstitielles Signal. *Egr-1* Reaktivität ist, wie erwartet [145], auf das tubuläre Kompartiment begrenzt. Balken: 40 μm
E Kontrollfärbung in adulten Hoden mit voradsorbiertem *egr-1* Antiserum (s. **C**) resultiert in vollständigem Verlust des *egr-1* Signals. Balken: 40 μm

4. Diskussion

In den letzten Jahrzehnten wurde zunehmend erkannt, dass GABA, mittels seiner Rezeptoren, neben der klassischen Rolle als Neurotransmitter andere Funktionen im Körper der Säugetiere übernimmt (siehe auch Einleitung). Nachfolgend werden die Ergebnisse dieser Arbeit mit Resultaten früherer Untersuchungen über das Vorkommen und die Funktion von GABA im Hoden mit besonderer Gewichtung der Leydig Zellen diskutiert.

4.1 Das GABAerge System in Leydig-Zellen

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass TM3 und primäre adulte Leydig-Zellen das GABA synthetisierende Enzym GAD 67, das vesikuläre GABA Transportprotein VIAAT und diverse GABA_A sowie GABA_C Rezeptor Untereinheiten besitzen. Die GABA Rezeptor Untereinheiten konnten auf mRNA Ebene, GAD 67 und VIAAT - zumindest in TM3 Zellen - auch auf Protein Ebene nachgewiesen werden.

Der Nachweis von GAD 67 mRNA und Protein in Leydig-Zellen bestätigt frühere Berichte, dass GAD in TM3 Zellen und Hodengewebe enzymatisch aktiv ist [57]. Dieses Ergebnis zeigt, dass Leydig-Zellen nicht nur Ziel von GABA, sondern auch dessen Quelle im Hoden sind. Die Regulation der Leydig-Zellfunktionen durch GABA geschieht also in einer para-/autokrinen Weise.

Der Nachweis des vesikulären GABA-Transporters (VIAAT) in Leydig-Zellen deutet darauf hin, dass Leydig-Zellen fähig sind das von ihnen gebildete GABA in Vesikeln zu speichern und mittels Exozytose auszuschleusen.

Die Ausstattung mit Untereinheiten würde es erlauben in beiden Zelltypen (TM3 und ALZ) einen funktionsfähigen GABA_A und GABA_C Rezeptor zu bilden, denn GABA_A Rezeptoren im ZNS bestehen aus mindestens einer α , einer β und einer γ Untereinheit [87;92;135;148] und GABA_C Rezeptoren setzen sich aus einem oder mehreren der drei ρ Untereinheiten zusammen [13;114] (s. auch Kapitel 1.2.1). Aus jeder dieser Familien ist mindestens ein Mitglied in TM3 und primären adulten Leydig-Zellen auf mRNA Ebene nachweisbar. Die häufigsten Kombinationen eines GABA_A Rezeptors im ZNS sind dabei $2\alpha 2\beta 1\gamma$, $2\alpha 1\beta 2\gamma$ oder $1\alpha 2\beta 2\gamma$ [13;30;99;134]. Die GABA Bindungsstelle vermutet man in den N-terminalen Domänen der α und β Untereinheiten [6;137]. Die Ergebnisse dieser Arbeit, die den Nachweis der GABA_A Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 3$ und $\gamma 1$ in TM3 Zellen, sowie den Nachweis der GABA_A

Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 3$ und $\gamma 3$ in ALZ erbrachte, erlauben keine Rückschlüsse auf die genaue Rezeptorkonfiguration in diesen Zellen.

Über das Vorkommen, die Rezeptorzusammensetzung und die Funktion von GABA_C Rezeptoren außerhalb des ZNS ist wenig bekannt. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass die GABA_C Rezeptor Untereinheiten $\rho 1$ und $\rho 2$ in Leydig-Zellen anwesend sind, wobei eine physiologische Funktion nicht nachgewiesen werden konnte. Genau wie beim GABA_A Rezeptor sind Rückschlüsse auf die Zusammensetzung des GABA_C Rezeptors in Leydig-Zellen aus den erhaltenen Ergebnissen nicht möglich. Eine mögliche Erklärung für das synchrone Vorkommen von GABA_A und GABA_C Rezeptor Untereinheiten ist die gleichzeitige Anwesenheit dieser Rezeptoren in Leydig-Zellen. Auf diese Weise könnte GABA über beide Rezeptortypen eventuell unterschiedliche Zellfunktionen steuern. Eine andere Erklärungsmöglichkeit ist eine Kombination von GABA_A und GABA_C Rezeptor Untereinheiten, die zusammen einen „GABA_{A/C}-Mischrezeptor“ bilden. Eine solche Kombination von Untereinheiten ist kürzlich im Gehirn beschrieben worden. Diese Rezeptoren sind durch den GABA_C Agonisten CACA aktivierbar und lassen sich wie typische GABA_A Rezeptoren durch Bicucullin blockieren [107].

4.2 Funktion und molekulare Effekte von GABA in Leydig-Zellen

In den elektrophysiologischen Untersuchungen der TM3 und der primären adulten Leydig-Zellen konnten mit den verwendeten Methoden keine durch GABA Stimulation ausgelösten Cl⁻-Ströme gezeigt werden. Passend dazu konnten auch keine Änderungen des Membranpotentials in TM3 Zellen durch GABA beobachtet werden. Gleichfalls negativ fiel die Untersuchung der Beteiligung von typischen GABA regulierten Second Messenger Systemen aus (s. Kapitel 3.2.3). So konnten weder Modifikationen des cAMP - Spiegels noch Änderungen der zytoplasmatischen Ca²⁺ - Spiegel festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass GABA und der GABA_A Agonist Isoguvacin den Transkriptionsfaktor egr-1 in TM3 und adulten primären Leydig-Zellen induzieren und die MAP – Kinasen ERK 1/2 in TM3 Zellen durch Phosphorylierung aktivieren.

Die Erkenntnis, dass in den Leydig-Zellen keine typischen GABA_A oder GABA_C Rezeptor Ströme (um 600pA), wie aus Nervenzellen bekannt, gemessen werden

konnten ist in so fern überraschend, als dass, wie in Kapitel 4.1 beschrieben, die nötigen Rezeptor Untereinheiten exprimiert werden. Eine Möglichkeit der Erklärung ist, dass die vorhandenen GABA_A und GABA_C Rezeptor Untereinheiten in der Zellmembran zwar eine GABA Bindungsstelle bilden, sich aber nicht zu einem Ionenkanal zusammenfügen und das GABA Signal auf eine unbekannt Weise ins Zellinnere übertragen wird. Denkbar ist in diesem Zusammenhang auch ein GABA Rezeptor ähnlich dem in Kapitel 4.1 beschriebenen, der aus einer Kombination von GABA_A und GABA_C Untereinheiten zusammengestellt ist und untypische elektrophysiologische Eigenschaften besitzt.

Mit Blick auf diese Hypothese ist interessant, dass in der Entwicklung des ZNS der Maus in der ventrikulären Zone des Gehirns Neuronen vorkommen, die mit untypisch geringen Strömen von 4,4 +/- 1 pA auf Stimulation mit GABA reagieren [118]. Des Weiteren sind kleine Ströme um 1 pA in embryonalen Neuronen der Ratte gefunden worden, die durch Behandlung mit dem GABA_A Antagonisten Bicucullin zu unterdrücken waren [93]. In diesen Fällen wurde zwar ein GABA_A/GABA_C Rezeptor Hybrid nicht beschrieben, eine mögliche Erklärung für die gemessenen kleinen Ströme könnte es jedoch auch hier sein. Eine weitere mögliche Ursache dieser extrem kleinen Ströme ist eine niedrige Rezeptor Zahl auf der Oberfläche dieser Zellen [118]. In dieser Phase der Hirnentwicklung haben sich noch keine Synapsen gebildet, so dass die GABA Wirkung in den oben beschriebenen Fällen am ehesten auf eine para-/autokrine Weise übermittelt wird [77]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen keine Rückschlüsse auf die Rezeptordichte an der Zelloberfläche der Leydig-Zellen zu, jedoch ist hier ebenfalls eine para-/autokrine Regulation anzunehmen (s. auch Kapitel 4.1), die eine niedrige Rezeptordichte und damit Rezeptorzahl auf der Zelloberfläche der Leydig-Zellen wahrscheinlich macht. Sollten die para-/autokrin ausgelösten GABA Ströme in Leydig-Zellen ähnlich klein wie die während der Hirnentwicklung in Neuronen auftretenden sein, wären sie mit der verwendeten Methoden nicht nachweisbar. Je nach Dauer solcher Ströme könnte auch eine eventuelle Änderung des Membranpotentials sehr gering und kurzlebig sein, so dass diese ebenfalls mit der verwendeten Methode nicht detektierbar ist.

Trotz des fehlenden Nachweises von typischen Cl⁻-Strömen sind funktionsfähige GABA Rezeptoren in Leydig-Zellen vorhanden. GABA und der GABA_A Agonist Isoguvacin stimulieren zeitabhängig die Expression des Transkriptionsfaktors egr-1 in TM3 und in primären adulten Leydig-Zellen. Vor dem Hintergrund der Tatsache,

dass GABA und Isoguvacin die Proliferation von TM3 Zellen steigert [58], liegt die Vermutung nahe, dass *egr-1* Bestandteil des Signaltransduktionsweges ist, der zur Zellvermehrung oder Differenzierung der TM3 Zellen führt.

Die Beteiligung von GABA und *egr-1* bei der Proliferation von verschiedenen Zellen ist bekannt [117;143]. *Egr-1* wird von vielen Stimuli (u.a. Sp1, NFκB, SRE) induziert und dementsprechend durch unterschiedliche Signalwege gesteuert [143]. Auch seine Regulation durch Neurotransmitter und deren Antagonisten wurde beschrieben; zum Beispiel induzieren Glutamat und GABAerge Substanzen *egr-1* in unterschiedlichen neuronalen Zellen [129;146;152;153]. Die Vermutung, dass die GABA_A initiierte Leydig-Zellproliferation auch über *egr-1* vermittelt wird, wird ferner durch die Beobachtung gestützt, dass *egr-1*^{-/-} Knock Out Mäuse eine deutliche Reduktion an interstitiellen Leydig-Zellen im Vergleich zu normalen Mäusen zeigen [145]. Die erniedrigte Zellzahl könnte aufgrund fehlender *egr-1* vermittelter Proliferation erklärt werden. Da *egr-1* auch das Gen für den LH – Rezeptor regulieren kann [154], könnte die verminderte Leydig-Zellzahl in *egr-1*^{-/-} Knock Out Mäusen jedoch nicht nur durch das Fehlen der GABA_A Rezeptor vermittelten Proliferation bedingt sein, sondern auch durch einen Mangel an *egr-1* induzierten LH-Rezeptoren, über die LH ebenfalls die Leydig-Zellproliferation steigert [81;113] (siehe auch Kapitel 1.1.1; 1.1.2; 3.3; 4.3).

Egr-1 ist aber nicht nur in die Vorgänge der Mitose, Zelldifferenzierung und Zellentwicklung involviert, sondern ist auch an vielen anderen biologischen Prozessen in unterschiedlichen Zelltypen beteiligt [55]. In Bezug auf die Leydig-Zellen ist vor allem interessant, dass, wie schon beschrieben, *egr-1* das Gen für den LH – Rezeptor regulieren kann [154] und dass *egr-1*^{-/-} Knock out Mäuse steril sind [145]. Wie im Kapitel 3.2.4 beschrieben, konnte jedoch in primären adulten Leydig-Zellen eine Regulation des LH - Rezeptorgens durch GABA nicht definitiv nachgewiesen werden, obwohl in einigen Experimenten ein deutlicher LH – Rezeptor mRNA Anstieg nach GABA Behandlung zu verzeichnen war. Die Ursache für die uneinheitlichen Ergebnisse könnte eine starke Heterogenität der isolierten adulten Leydig-Zellen sein. Dieser Punkt müsste durch weitere Untersuchungen abgeklärt werden.

In den cDNA-Array Studien der TM3 Leydig-Zellen, die allerdings nur Momentaufnahmen darstellen, fanden sich weitere Gene, deren mRNA Spiegel durch GABA und Isoguvacin moduliert wurden. Es zeigte sich, dass der mRNA

Gehalt von Scya2, einem Zytokin Vorläufer und Bestandteil des LDL – Signalweges [3], 120 min nach Isoguvacin Behandlung in TM3 Zellen ansteigt. Auf der anderen Seite wurden die mRNA Spiegel von BMP4 (Hedgehog - Signalweg) [98], Cyclin D1 (Wnt - Signalweg) [136], cdk2L (Androgen Signalweg) [90], cdkn2a (TGF- β Signalweg) [85], cebpb (Insulin Signalweg) [111], p53 (Tumor Supressor Gen; Apoptose Signalweg) [37] und HSP 90 (Stress Signalweg) [83] 120 min nach Isoguvacin Behandlung in TM3 Zellen vermindert. Diese Gene wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit im weiteren Verlauf nicht näher auf ihr Verhalten nach GABA Stimulation untersucht oder mit anderen Methoden verifiziert, so dass eine abschließende Beurteilung der Relevanz der beschriebenen Modulationen der mRNA Menge in TM3 Zellen nicht getroffen werden kann.

In TM3 Zellen kommt es interessanter Weise neben der Induktion von egr-1 auch zu einer vermehrten Phosphorylierung der MAP – Kinasen ERK 1/2 nach GABA_A Stimulation. Da deren Aktivität über Phosphorylierung reguliert wird, spricht dieses Ergebnis für eine direkte Steuerung dieser beiden Kinasen durch GABA. Eine solche Regulation ist unter anderem von Obrietan et al. [112] in embryonalen Neuronen beschrieben worden, wo exitatorische GABA_A Rezeptor Aktivität über ERK 1/2 zum Anstieg von BDNF (brain-derived neurotrophic factor) führt. Des Weiteren wird der Neuritenauswuchs in Neuronen via ERK 1/2 durch eine GABA_A Rezeptor Aktivierung gesteuert [18;93]. Interessant ist, dass der zuletzt beschriebene Neuritenauswuchs sowie die Differenzierung von Neuronen über egr-1 via dem ERK 1/2 Signalweg vermittelt wird [67]. Weitere Verbindungen von egr-1 und ERK 1/2 in einen gemeinsamen Signalweg sind bekannt. So zeigten Kaufmann et al. [79], dass ERK 1/2 die Expression und die biologische Aktivität von egr-1 regulieren kann. Diese Beobachtungen legen eine Verknüpfung dieser beiden Faktoren in den Signalweg von GABA auch in Leydig-Zellen nahe, das genaue Zusammenspiel muss jedoch noch geklärt werden.

Wie beschrieben gibt es neben der Proliferation noch eine weitere Funktion von GABA im Hoden. Ritta et al. [124] fanden eine Steigerung der Androgenproduktion nach GABA Stimulation. Dieses Ergebnis konnte in dieser Arbeit durch GABA Behandlung primärer adulter Leydig-Zellen bestätigt werden. Im Überstand dieser Zellen fand sich 9h nach GABA Behandlung signifikant mehr Testosteron als im Überstand der unstimulierten Kontrollgruppe. Diese Steigerung der Androgenproduktion ist jedoch gering und es bleibt offen, ob GABA direkt die

Androgenproduktion steigert, zumal LH – Behandlung zu einem wesentlich höheren Anstieg der Testosteronproduktion in Leydig Zellen führt und so eine physiologische Relevanz der Steigerung der Androgenproduktion durch GABA angezweifelt werden kann. Vielleicht wirkt GABA vielmehr als trophischer Faktor, der die Funktionalität der Leydig Zellen über die Kultivierungszeit verbessert und auf diese Weise zu vermehrter Androgenproduktion beiträgt. Des Weiteren ist nicht klar, ob dieser Effekt über die *egr-1* Induktion oder die Phosphorylierung von ERK 1/2 vermittelt wird.

Sollte jedoch *egr-1* entweder essentieller Bestandteil des Signalweges der Steigerung der Androgenproduktion sein und/oder GABA die LH – Rezeptor Expression mittels *egr-1* regulieren, wären das zwei mögliche Gründe für die Infertilität der *egr-1*^{-/-} Knock Out Mäuse, denn zum einen ist LH der wichtigste Faktor in der Steuerung der Leydig-Zellfunktion und Differenzierung, zum anderen ist Testosteron essentiell für die Entwicklung der männlichen Zeugungsfähigkeit. Des Weiteren ist denkbar, dass die oben beschriebene Funktion von GABA als trophischer Faktor im Hoden in *egr-1*^{-/-} Knock Out Mäusen wegen des Fehlens von *egr-1* nicht vermittelt wird und so die Leydig-Zellfunktion eingeschränkt ist.

4.3 GABA im sich entwickelnden Hoden

In dieser Arbeit wird erstmals eine detaillierte Beschreibung GABAerger Komponenten im Hoden während der Postnatalperiode gegeben. Es zeigt sich, dass verschiedene Untereinheiten der GABA_A und GABA_C Rezeptoren schon postnatal ab d5 in Mäusehoden vorkommen. Ferner wird das GABA synthetisierende Enzym GAD 67 und das GABA Transportprotein VIAAT ab d5 im Hoden der Mäuse exprimiert. Von besonderem Interesse sind die GABA_A Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 3$ und $\gamma 3$, denn deren Expressionen scheinen sich im Verlaufe der Hodenentwicklung zu ändern und könnten somit für Änderungen der Funktion von GABA im Hoden verantwortlich sein. So wäre denkbar, dass GABA in der frühen Hodenentwicklung für die Proliferation der Leydig-Zellen zuständig ist [58] und in der Adoleszenz eine Steigerung der Androgenproduktion bewirkt [124] – oder umgekehrt. Natürlich kann man aus den RT – PCR Nachweisen der GABA Komponenten im Hoden nicht auf die zelluläre Lokalisation schließen, jedoch konnte in immunhistochemischen Experimenten mit Antikörpern gegen GABA_A Rezeptor Untereinheiten in jungen und adulten Rattenhoden gezeigt werden, dass diese GABA Komponenten in interstitiellen Zellen

vorkommen [57;58]. Geigerseder et al. [57] konnten auch die Anwesenheit der GABA_B Untereinheiten R1 und R2 in adulten Mäusehoden zeigen. Dieser Nachweis gelang in Hoden von d5 – d35 alten Mäusen nicht. Eine Erklärung für diese Diskrepanz könnte wiederum in einem Wechsel der physiologischen Funktion von GABA und seinen Rezeptoren im Hoden liegen.

Vergleicht man die Anwesenheit von Komponenten des GABAergen Systems zwischen TM3 und primären adulten Leydig-Zellen auf der einen Seite und den Hodengeweben der verschiedenen Entwicklungsphasen auf der anderen Seite, fallen diskrete Expressionsunterschiede auf. So zeigt der Vergleich von TM3 Zellen und d20 Mäusehoden, mit deren Entwicklungsstand die TM3 Zellen am ehesten vergleichbar sind (s. Kapitel 2.1.1.1), dass sowohl im Hoden als auch in TM3 Zellen die GABA_A Untereinheiten α 1, α 2, β 1, β 3, die GABA_C Untereinheiten ρ 1, ρ 2 sowie GAD 67 und VIAAT anzutreffen sind. Unterschiede finden sich lediglich in der Ausstattung mit den GABA_A Untereinheiten β 2 und γ 3, welche nur im Hodengewebe nachzuweisen sind und mit der GABA_A Untereinheit γ 1, welche nur in TM3 Zellen exprimiert wird. Die primären adulten Leydig-Zellen sind naturgemäß am ehesten mit der Situation der ältesten Hoden in der Entwicklungsreihe zu vergleichen. Hier zeigt sich, dass sowohl in den ALZ als auch in d35 Mäusehoden die GABA_A Untereinheiten α 1, α 2, β 3, γ 3, die GABA_C Untereinheit ρ 1 sowie GAD 67 und VIAAT detektiert werden konnten. Divergierende Nachweise finden sich für die GABA_A Untereinheiten β 1, β 2 und die GABA_C Untereinheit ρ 2, die jeweils nur in d35 Mäusehoden nachweisbar sind. Eine Erklärung für die jeweiligen Expressionsunterschiede könnte im Falle der TM3 Zellen sein, dass diese Zelllinie sich im Laufe ihrer Kultivierung verändert hat. Unterschiede in der Ausstattung der ALZ und der d35 Hoden könnten in einer physiologischen Änderung der GABA Rezeptorzusammensetzung im Verlauf der weiteren Entwicklung liegen, aber auch durch die Isolierung und Kultivierung der Zellen verursacht sein. Nicht zuletzt muss aber noch einmal darauf hingewiesen werden, dass die nachgewiesenen Komponenten des GABAergen Systems in den Mäusehoden durchaus auch von anderen Zelltypen des Hodens stammen können.

In immunhistochemischen Färbungen 5 Tage alter Rattenhoden zeigte sich, dass *egr-1* sowohl in zytoplasmatischer als auch in nukleärer Lokalisation in interstitiellen Zellen vorkommt. Dieses Ergebnis spricht für eine aktive Rolle des Transkriptionsfaktors in dieser Phase der Hodenentwicklung und ist bei einer

weiteren Zusammenschau der Tatsachen, dass 1. diese Zellen proliferieren [58], dass 2. in dieser Phase der Entwicklung GABA Rezeptoren im Hoden anwesend sind, dass 3. die durch GABA hervorgerufene TM3 Proliferation vermutlich über *egr-1* vermittelt wird, und dass 4. TM3 Zellen ein Modell für postnatale Leydig-Zellen sind, ein weiteres Indiz dafür, dass GABA *egr-1* vermittelt die Proliferation der LZ des postnatalen Hodens stimuliert. Eine weitere Funktion von GABA in der frühen Hodenentwicklung könnte, ähnlich wie im Gehirn, eine Beeinflussung der Zelldifferenzierung sein. Eventuell ist es sogar das bisher unbekannte initiale Startsignal in der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu den Vorläufer Leydig-Zellen (s. Kapitel 1.1.1).

In adulten Hodenschnitten konnte kein *egr-1* in interstitiellen Zellen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis steht zunächst im Gegensatz zu dem Ergebnis, dass GABA auch in isolierten adulten Leydig-Zellen *egr-1* induzieren kann. Die Tatsache, dass adulte Leydig-Zellen nur noch sporadisch proliferieren, könnte jedoch diese Diskrepanz der *egr-1* Expression im adulten Hoden und in isolierten adulten Leydig-Zellen, unter der Annahme, dass *egr-1* in adulten Leydig-Zellen die Proliferation vermittelt, erklären. Denn das könnte bedeuten, dass in den verwendeten Hodenschnitten zur Zeit der Präparation keine Leydig-Zellproliferation stattfand. Daneben ist wahrscheinlich, dass die primären adulten Leydig-Zellen nach Isolation und Kultur andere Reaktionen und Eigenschaften als Leydig-Zellen *in vivo* aufweisen.

4.4 Klinische Aspekte von GABA in Leydig-Zellen

Das Vorkommen des GABAergen Systems in Leydig-Zellen macht die Beteiligung seiner Komponenten an der Entstehung von Hodenfunktionsstörungen möglich. Ein Hinweis in diese Richtung liefern Hu et al., sie konnten zeigen, dass transgene Mäuse, die das GABA Transportprotein 1 (GAT 1), eine Komponente des GABAergen Systems, die in dieser Arbeit nicht untersucht wurde und die notwendig für nicht vesikuläre Freisetzung und Wiederaufnahme von GABA ist, überexprimieren, in ihrer Reproduktion beeinträchtigt sind [73]. In diesen Mäusen ist die Leydig-Zellmorphologie verändert und die Serum Testosteronspiegel sind vermindert [73]. Diese Veränderungen sind ein Zeichen dafür, dass die unphysiologische Expression des GABA Transportproteins die Leydig-Zellen und ihre

Funktion beeinträchtigen kann. Die Tatsache, dass GAD und andere Komponenten des GABAergen Systems auch im menschlichen Hoden vorkommen [57], lässt die Vermutung zu, dass auch im menschlichen Organismus Hodenpathologien mit GABA und seinen Rezeptoren pathogenetisch verknüpft sind. So ist denkbar, dass Impotenz und Infertilität, Nebenwirkung von Pharmazeutika, wie Benzodiazepine, Anästhetika und Antiepileptika, über deren Wechselwirkungen mit GABA Rezeptoren in Leydig-Zellen indirekt oder direkt vermittelt werden. Über dies hinaus könnten auch Fehler oder Veränderungen der Zusammensetzung von GABA Rezeptoren direkt für Störungen verantwortlich sein. Solch ein Zusammenhang ist im Falle der Schizophrenie, der Angststörungen und der Epilepsie – wenngleich nicht im Hoden - schon beschrieben worden [2;15;21;31]. Ein weiterer pathogenetischer Faktor könnten GAD Antikörper sein. GAD Autoantikörper sind bei Erkrankungen des ZNS und des endokrinen Systems von Bedeutung. Sie treten bei der juvenilen neuronalen Zeroid-Lipofuszinose [28], beim Stiff-Person Syndrom [34;39] und beim Autoimmunen Polyendokrinen Syndrom Typ 1 (APS1), zu dessen Manifestationen unter anderem der insulinabhängige Diabetes Mellitus (IDDM) gehört [1] auf. Ob bei diesen Krankheiten auch Hodenfunktionsstörungen auftreten ist nicht bekannt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die oben beschriebenen Zusammenhänge von GABA und Krankheitsmanifestationen auch im Hoden pathogenetische Bedeutung haben könnten. Es erscheint möglich, dass Komponenten des GABAergen Systems bei einem Teil idiopathischer Infertilitäten, welche beim Menschen 50 % aller Infertilitäten ausmachen [76], zumindest als Kofaktor relevant sind. Neben dem GAT 1 Protein sollten in diesem Zusammenhang, wie es in anderen endokrinen Krankheitsbildern der Fall ist (s. oben), vor allem GAD Antikörper als potentiell pathophysiologisch bedeutend angesehen und untersucht werden. Des Weiteren ist natürlich auch der Einfluss der unterschiedlichen im Hoden vorkommenden GABA Rezeptoren und deren Wechselwirkungen mit Pharmazeutika auf die Entstehung der Infertilität hin zu analysieren.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde das GABAerge System in Leydig-Zellen detailliert analysiert. Mehrere GABA_A und GABA_C Rezeptor Untereinheiten sowie das GABA synthetisierende Enzym GAD 67 und der vesikuläre GABA Transporter VIAAT konnten mit RT – PCR, Western Blot und Immunfluoreszenz-Experimenten in TM3, Leydig-Tumorzellen, und primären adulten Leydig-Zellen nachgewiesen werden. Es gelang molekulare Signaltransduktionswege von GABA aufzudecken: Gen Array, Western Blot und semiquantitative RT – PCR Experimente zeigten, dass GABA und der GABA_A Rezeptor Agonist Isoguvacin den Transkriptionsfaktor egr-1 in TM3 und adulten Leydig-Zellen induzieren. Western Blot Experimente lassen schließen, dass GABA vermittelt über GABA_A Rezeptoren die MAP – Kinasen ERK 1/2 in TM3 Zellen phosphoryliert und somit in den enzymatisch aktiven Zustand überführt. In primären adulten Leydig-Zellen konnte weiterhin gezeigt werden, dass GABA die Testosteron Produktion steigert. Elektrophysiologische Untersuchungen der TM3 und der primären adulten Leydig-Zellen zeigten schließlich, dass das initiale GABA Signal nicht über einen für GABA_A Rezeptor typischen Cl⁻-Strom vermittelt wird.

Die RT – PCR Analyse von postnatalen Mäusehoden ergab ebenfalls, dass GAD 67, VIAAT und mehreren GABA_A und GABA_C Rezeptor Untereinheiten in dieser Entwicklungsphase des Hodens anwesend sind und lieferten ferner Hinweise dafür, dass sich insbesondere die Expression der Rezeptor Untereinheiten in der postnatalen Periode im Hoden ändert. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass proliferierende interstitielle Zellen im postnatalen Rattenhoden immunopositiv für egr-1 sind. Somit ist eine physiologische Funktion von egr-1 in dieser Phase der Leydig-Zellentwicklung plausibel.

Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit können folgende Hypothesen aufgestellt werden:

1. GABA steuert die Proliferation in TM3 und Leydig-Zellen des postnatalen Hodens über Induktion von egr-1 und Aktivierung von ERK 1/2.
2. GABA fördert je nach Differenzierungsgrad die Testosteronproduktion und/oder die Proliferation von Leydig Zellen über Induktion von egr-1.

6. Literaturverzeichnis

1. Ahonen P, Myllarniemi S, Sipila I, Perheentupa J (1990) Clinical variation of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) in a series of 68 patients. *N Engl J Med* 322: 1829-1836
2. Akbarian S, Huntsman MM, Kim JJ, Tafazzoli A, Potkin SG, Bunney WE, Jr., Jones EG (1995) GABAA receptor subunit gene expression in human prefrontal cortex: comparison of schizophrenics and controls. *Cereb Cortex* 5: 550-560
3. Allen S, Khan S, Al Mohanna F, Batten P, Yacoub M (1998) Native low density lipoprotein-induced calcium transients trigger VCAM-1 and E-selectin expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 101: 1064-1075
4. Amat P, Paniagua R, Nistal M, Martin A (1986) Mitosis in adult human Leydig cells. *Cell Tissue Res* 243: 219-221
5. Amenta F, Collier WL, Erdo SL, Giuliani S, Maggi CA, Meli A (1988) GABAA receptor sites modulating catecholamine secretion in the rat adrenal gland: evidence from 3H-muscimol autoradiography and in vivo functional studies. *Pharmacology* 37: 394-402
6. Amin J, Weiss DS (1993) GABAA receptor needs two homologous domains of the beta-subunit for activation by GABA but not by pentobarbital. *Nature* 366: 565-569
7. Ariyaratne HB, Chamindrani Mendis-Handagama S (2000) Changes in the testis interstitium of Sprague Dawley rats from birth to sexual maturity. *Biol Reprod* 62: 680-690
8. Ariyaratne S, Kim I, Mills N, Mason I, Mendis-Handagama C (2003) Effects of ethane dimethane sulfonate on the functional structure of the adult rat testis. *Arch Androl* 49: 313-326
9. Attwell D, Barbour B, Szatkowski M (1993) Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron* 11: 401-407
10. AWAPARA J (1950) Occurrence of free gamma-aminobutyric acid in brain and its formation from L-glutamic acid. *Tex Rep Biol Med* 8: 443-447
11. AWAPARA J, LANDUA AJ, FUERST R, SEALE B (1950) Free gamma-aminobutyric acid in brain. *J Biol Chem* 187: 35-39
12. Balazs R, Machiyama Y, Hammond BJ, Julian T, Richter D (1970) The operation of the gamma-aminobutyrate bypath of the tricarboxylic acid cycle in brain tissue in vitro. *Biochem J* 116: 445-461
13. Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ (1998) International Union of

Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* 50: 291-313

14. Beltran-Parrazal L, Noris G, Clapp C, Martinez dIE (2001) GABA inhibition of immortalized gonadotropin-releasing hormone neuronal excitability involves GABA(A) receptors negatively coupled to cyclic adenosine monophosphate formation. *Endocrine* 14: 189-195
15. Billinton A, Baird VH, Thom M, Duncan JS, Upton N, Bowery NG (2001) GABA(B(1)) mRNA expression in hippocampal sclerosis associated with human temporal lobe epilepsy. *Brain Res Mol Brain Res* 86: 84-89
16. Bormann J (1988) Electrophysiology of GABAA and GABAB receptor subtypes. *Trends Neurosci* 11: 112-116
17. Bormann J (2000) The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 21: 16-19
18. Borodinsky LN, O'Leary D, Neale JH, Vicini S, Coso OA, Fiszman ML (2003) GABA-induced neurite outgrowth of cerebellar granule cells is mediated by GABA(A) receptor activation, calcium influx and CaMKII and erk1/2 pathways. *J Neurochem* 84: 1411-1420
19. Bouin P, Ancel P (1903) Recherches sur les cellules interstitielles du testicule de mammifère. *Arch Zool Exp Gen* 1: 437-523
20. Bowery NG, Enna SJ (2000) gamma-aminobutyric acid(B) receptors: first of the functional metabotropic heterodimers. *J Pharmacol Exp Ther* 292: 2-7
21. Brooks-Kayal AR, Shumate MD, Jin H, Rikhter TY, Coulter DA (1998) Selective changes in single cell GABA(A) receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy. *Nat Med* 4: 1166-1172
22. Bu DF, Erlander MG, Hitz BC, Tillakaratne NJ, Kaufman DL, Wagner-McPherson CB, Evans GA, Tobin AJ (1992) Two human glutamate decarboxylases, 65-kDa GAD and 67-kDa GAD, are each encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 2115-2119
23. Buehr M, Gu S, McLaren A (1993) Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. *Development* 117: 273-281
24. Bulling A, Berg FD, Berg U, Duffy DM, Stouffer RL, Ojeda SR, Gratzl M, Mayerhofer A (2000) Identification of an ovarian voltage-activated Na⁺-channel type: hints to involvement in luteolysis. *Mol Endocrinol* 14: 1064-1074
25. Byskov AG (1986) Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiol Rev* 66: 71-117
26. Calogero AE, Burrello N, Ferrara E, Hall J, Fishel S, D'Agata R (1999) 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: 930-936

27. Calogero AE, Hall J, Fishel S, Green S, Hunter A, D'Agata R (1996) Effects of gamma-aminobutyric acid on human sperm motility and hyperactivation. *Mol Hum Reprod* 2: 733-738
28. Chattopadhyay S, Ito M, Cooper JD, Brooks AI, Curran TM, Powers JM, Pearce DA (2002) An autoantibody inhibitory to glutamic acid decarboxylase in the neurodegenerative disorder Batten disease. *Hum Mol Genet* 11: 1421-1431
29. Christensen LW, Clemens LG (1975) Blockade of testosterone-induced mounting behavior in the male rat with intracranial application of the aromatization inhibitor, androst-1,4,6,-triene-3,17-dione. *Endocrinology* 97: 1545-1551
30. Costa E (1998) From GABAA receptor diversity emerges a unified vision of GABAergic inhibition. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:321-50.: 321-350
31. Crestani F, Lorez M, Baer K, Essrich C, Benke D, Laurent JP, Belzung C, Fritschy JM, Luscher B, Mohler H (1999) Decreased GABAA-receptor clustering results in enhanced anxiety and a bias for threat cues. *Nat Neurosci* 2: 833-839
32. de Kretser DM (1994) Clinical male infertility. I. Prevalence of and progress in understanding male infertility. *Reprod Fertil Dev* 6: 3-8
33. Dierichs R, Wrobel KH, Schilling E (1973) [Light and electron microscopic studies on the porcine testicular interstitial cells during postnatal development (author's transl)]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 143: 207-227
34. Dinkel K, Meinck HM, Jury KM, Karges W, Richter W (1998) Inhibition of gamma-aminobutyric acid synthesis by glutamic acid decarboxylase autoantibodies in stiff-man syndrome. *Ann Neurol* 44: 194-201
35. Eckstein B, Borut A, Cohen S (1987) Production of testosterone from progesterone by rat testicular microsomes without release of the intermediates 17 alpha-hydroxyprogesterone and androstenedione. *Eur J Biochem* 166: 425-429
36. Eik-Nes KB (2005) Biosynthesis and secretion of testicular steroids. In: Greep RO, Astwood EB, Halminton DW, Geiger S (eds) *Handbook of Physiology*. American Physiological Society, Washington DC, pp 95-115
37. el Deiry WS (1998) Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol* 8: 345-357
38. El Gehani F, Zhang FP, Pakarinen P, Rannikko A, Huhtaniemi I (1998) Gonadotropin-independent regulation of steroidogenesis in the fetal rat testis. *Biol Reprod* 58: 116-123
39. Ellis TM, Atkinson MA (1996) The clinical significance of an autoimmune response against glutamic acid decarboxylase. *Nat Med* 2: 148-153

40. Erdo S, Varga B, Horvath E (1985) Effect of local GABA administration on rat ovarian blood flow, and on progesterone and estradiol secretion. *Eur J Pharmacol* 111: 397-400
41. Erdo SL (1990) Baclofen binding sites in rat kidney. *Eur J Pharmacol* 184: 305-309
42. Erdo SL, Joo F, Wolff JR (1989) Immunohistochemical localization of glutamate decarboxylase in the rat oviduct and ovary: further evidence for non-neural GABA systems. *Cell Tissue Res* 255: 431-434
43. Erdo SL, Nemet L, Szporny L (1983) The occurrence of GABA in vas deferens, prostate, epididymis, seminal vesicle and testicle of the rat. *Acta Biol Hung* 34: 435-437
44. Erlander MG, Tobin AJ (1991) The structural and functional heterogeneity of glutamic acid decarboxylase: a review. *Neurochem Res* 16: 215-226
45. Esclapez M, Tillakaratne NJ, Kaufman DL, Tobin AJ, Houser CR (1994) Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms. *J Neurosci* 14: 1834-1855
46. Espinosa F, de la Vega-Beltran JL, Lopez-Gonzalez I, Delgado R, Labarca P, Darszon A (1998) Mouse sperm patch-clamp recordings reveal single Cl⁻ channels sensitive to niflumic acid, a blocker of the sperm acrosome reaction. *FEBS Lett* 426: 47-51
47. Fohr KJ, Mayerhofer A, Sterzik K, Rudolf M, Rosenbusch B, Gratzl M (1993) Concerted action of human chorionic gonadotropin and norepinephrine on intracellular-free calcium in human granulosa-lutein cells: evidence for the presence of a functional alpha-adrenergic receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 367-373
48. Fritz S, Fohr KJ, Boddien S, Berg U, Brucker C, Mayerhofer A (1999) Functional and molecular characterization of a muscarinic receptor type and evidence for expression of choline-acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter in human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 1744-1750
49. Fritz S, Kunz L, Dimitrijevic N, Grunert R, Heiss C, Mayerhofer A (2002) 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: 1362-1367
50. Fritz S, Wessler I, Breitling R, Rossmannith W, Ojeda SR, Dissen GA, Amsterdam A, Mayerhofer A (2001) Expression of muscarinic receptor types in the primate ovary and evidence for nonneuronal acetylcholine synthesis. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 349-354
51. Frungieri MB, Gonzalez-Calvar SI, Rubio M, Ozu M, Lustig L, Calandra RS (1999) Serotonin in golden hamster testes: testicular levels,

- immunolocalization and role during sexual development and photoperiodic regression-recrudescence transition. *Neuroendocrinology* 69: 299-308
52. Frungieri MB, Weidinger S, Meineke V, Kohn FM, Mayerhofer A (2002) Proliferative action of mast-cell tryptase is mediated by PAR2, COX2, prostaglandins, and PPARgamma : Possible relevance to human fibrotic disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15072-15077
53. Gamel-Didelon K, Corsi C, Pepeu G, Jung H, Gratzl M, Mayerhofer A (2002) An autocrine role for pituitary GABA: activation of GABA-B receptors and regulation of growth hormone levels. *Neuroendocrinology* 76: 170-177
54. Gamel-Didelon K, Kunz L, Fohr KJ, Gratzl M, Mayerhofer A (2003) Molecular and physiological evidence for functional gamma-aminobutyric acid (GABA)-C receptors in growth hormone-secreting cells. *J Biol Chem* 278: 20192-20195
55. Gashler A, Sukhatme VP (1995) Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 50:191-224.: 191-224
56. Gasnier B (2000) The loading of neurotransmitters into synaptic vesicles. *Biochimie* 82: 327-337
57. Geigerseder C, Doepner R, Thalhammer A, Frungieri MB, Gamel-Didelon K, Calandra RS, Kohn FM, Mayerhofer A (2003) Evidence for a GABAergic system in rodent and human testis: local GABA production and GABA receptors. *Neuroendocrinology* 77: 314-323
58. Geigerseder C, Doepner RF, Thalhammer A, Krieger A, Mayerhofer A (2004) Stimulation of TM3 Leydig cell proliferation via GABA(A) receptors: a new role for testicular GABA. *Reprod Biol Endocrinol* 2: 13
59. Guastella J, Nelson N, Nelson H, Czyzyk L, Keynan S, Miedel MC, Davidson N, Lester HA, Kanner BI (1990) Cloning and expression of a rat brain GABA transporter. *Science* 249: 1303-1306
60. Habert R (1993) In vivo acute testicular testosterone response to injection of luteinizing hormone in the rat fetus. *Acta Endocrinol (Copenh)* 128: 268-273
61. Habert R, Lejeune H, Saez JM (2001) Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* %20;179: 47-74
62. Habert R, Picon R (1982) Control of testicular steroidogenesis in foetal rat: effect of decapitation on testosterone and plasma luteinizing hormone-like activity. *Acta Endocrinol (Copenh)* 99: 466-473
63. Habert R, Picon R (1984) Testosterone, dihydrotestosterone and estradiol-17 beta levels in maternal and fetal plasma and in fetal testes in the rat. *J Steroid Biochem* 21: 193-198
64. Habert R, Rouiller-Fabre V, Lecerf L, Levacher C, Saez JM (1992) Developmental changes in testosterone production by the rat testis in vitro during late fetal life. *Arch Androl* 29: 191-197

65. Haider SG, Passia D, Overmeyer G (1986) Studies on the fetal and postnatal development of rat Leydig cells employing 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity. *Acta Histochem Suppl* 32:197-202.: 197-202
66. Haider SG, Servos G (1998) Ultracytochemistry of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in Leydig cell precursors and vascular endothelial cells of the postnatal rat testis. *Anat Embryol (Berl)* 198: 101-110
67. Harada T, Morooka T, Ogawa S, Nishida E (2001) ERK induces p35, a neuron-specific activator of Cdk5, through induction of Egr1. *Nat Cell Biol* 3: 453-459
68. Hardy MP, Kelce WR, Klinefelter GR, Ewing LL (1990) Differentiation of Leydig cell precursors in vitro: a role for androgen. *Endocrinology* 127: 488-490
69. Hardy MP, Zirkin BR, Ewing LL (1989) Kinetic studies on the development of the adult population of Leydig cells in testes of the pubertal rat. *Endocrinology* 124: 762-770
70. Hsu CC, Davis KM, Jin H, Foos T, Floor E, Chen W, Tyburski JB, Yang CY, Schloss JV, Wu JY (2000) Association of L-glutamic acid decarboxylase to the 70-kDa heat shock protein as a potential anchoring mechanism to synaptic vesicles. *J Biol Chem* 275: 20822-20828
71. Hu JH, He XB, Yan YC (2000) Identification of gamma-aminobutyric acid transporter (GAT1) on the rat sperm. *Cell Res* 10: 51-58
72. Hu JH, Yan YC (2002) Identification of gamma1 subunit of GABA(A) receptor in rat testis. *Cell Res* 12: 33-37
73. Hu JH, Zhang JF, Ma YH, Jiang J, Yang N, Li XB, Yu Chi ZG, Fei J, Guo LH (2004) Impaired reproduction in transgenic mice overexpressing Gamma-aminobutyric acid transporter I (GAT1). *Cell Res* 14: 54-59
74. Huhtaniemi I, Pelliniemi LJ (1992) Fetal Leydig cells: cellular origin, morphology, life span, and special functional features. *Proc Soc Exp Biol Med* 201: 125-140
75. Huhtaniemi I, Pelliniemi LJ (1992) Fetal Leydig cells: cellular origin, morphology, life span, and special functional features. *Proc Soc Exp Biol Med* 201: 125-140
76. Iammarrone E, Balet R, Lower AM, Gillott C, Grudzinskas JG (2003) Male infertility. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 17: 211-229
77. Jelitai M, Anderova M, Marko K, Kekesi K, Koncz P, Sykova E, Madarasz E (2004) Role of gamma-aminobutyric acid in early neuronal development: studies with an embryonic neuroectodermal stem cell clone. *J Neurosci Res* 76: 801-811

78. Kaufman DL, Houser CR, Tobin AJ (1991) Two forms of the gamma-aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions. *J Neurochem* 56: 720-723
79. Kaufmann K, Bach K, Thiel G (2001) The extracellular signal-regulated protein kinases Erk1/Erk2 stimulate expression and biological activity of the transcriptional regulator Egr-1. *Biol Chem* 382: 1077-1081
80. Kerr JB, Knell CM (1988) The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis. *Development* 103: 535-544
81. Kerr JB, Sharpe RM (1985) Follicle-stimulating hormone induction of Leydig cell maturation. *Endocrinology* 116: 2592-2604
82. Kitayama S, Morita K, Dohi T, Tsujimoto A (1990) GABAA receptor-mediated increase of cytosolic Ca²⁺ in isolated bovine adrenal chromaffin cells. *Biochim Biophys Acta* 1053: 189-194
83. Kovacs KJ (1998) c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem Int* 33: 287-297
84. Kuroda Y, Kaneko S, Yoshimura Y, Nozawa S, Mikoshiba K (1999) Influence of progesterone and GABAA receptor on calcium mobilization during human sperm acrosome reaction. *Arch Androl* 42: 185-191
85. Landesman Y, Bringold F, Milne DD, Meek DW (1997) Modifications of p53 protein and accumulation of p21 and gadd45 mRNA in TGF-beta 1 growth inhibited cells. *Cell Signal* 9: 291-298
86. Leinekugel X, Tseeb V, Ben Ari Y, Bregestovski P (1995) Synaptic GABAA activation induces Ca²⁺ rise in pyramidal cells and interneurons from rat neonatal hippocampal slices. *J Physiol* 487: 319-329
87. Levitan ES, Schofield PR, Burt DR, Rhee LM, Wisden W, Kohler M, Fujita N, Rodriguez HF, Stephenson A, Darlison MG, . (1988) Structural and functional basis for GABAA receptor heterogeneity. *Nature* 335: 76-79
88. Leydig F (1850) Zur Anatomie der Männlichen Geschlechtsorgane und Anldrüsen der Säugethier. *Z Wiss Zool* 2: 1-8
89. Lin MH, Takahashi MP, Takahashi Y, Tsumoto T (1994) Intracellular calcium increase induced by GABA in visual cortex of fetal and neonatal rats and its disappearance with development. *Neurosci Res* 20: 85-94
90. Lindzey J, Kumar MV, Grossman M, Young C, Tindall DJ (1994) Molecular mechanisms of androgen action. *Vitam Horm* 49:383-432.: 383-432
91. MacNaughton WK, Pineau BC, Krantis A (1996) gamma-Aminobutyric acid stimulates electrolyte transport in the guinea pig ileum in vitro. *Gastroenterology* 110: 498-507

92. Malherbe P, Sigel E, Baur R, Persohn E, Richards JG, Mohler H (1990) Functional characteristics and sites of gene expression of the alpha 1, beta 1, gamma 2-isoform of the rat GABAA receptor. *J Neurosci* 10: 2330-2337
93. Maric D, Liu QY, Maric I, Chaudry S, Chang YH, Smith SV, Sieghart W, Fritschy JM, Barker JL (2001) GABA expression dominates neuronal lineage progression in the embryonic rat neocortex and facilitates neurite outgrowth via GABA(A) autoreceptor/Cl⁻ channels. *J Neurosci* 21: 2343-2360
94. Martin DL, Martin SB, Wu SJ, Espina N (1991) Cofactor interactions and the regulation of glutamate decarboxylase activity. *Neurochem Res* 16: 243-249
95. Martin DL, Martin SB, Wu SJ, Espina N (1991) Regulatory properties of brain glutamate decarboxylase (GAD): the apoenzyme of GAD is present principally as the smaller of two molecular forms of GAD in brain. *J Neurosci* 11: 2725-2731
96. Mather JP (1980) Establishment and characterization of two distinct mouse testicular epithelial cell lines. *Biol Reprod* 23: 243-252
97. Mayerhofer A, Hohne-Zell B, Gamel-Didelon K, Jung H, Redecker P, Grube D, Urbanski HF, Gasnier B, Fritschy JM, Gratzl M (2001) Gamma-aminobutyric acid (GABA): a para- and/or autocrine hormone in the pituitary. *FASEB J* 15: 1089-1091
98. McMahon AP (2000) More surprises in the Hedgehog signaling pathway. *Cell* 100: 185-188
99. Mehta AK, Ticku MK (1999) An update on GABAA receptors. *Brain Res Brain Res Rev* 29: 196-217
100. Meizel S (1997) Amino acid neurotransmitter receptor/chloride channels of mammalian sperm and the acrosome reaction. *Biol Reprod* 56: 569-574
101. Mendis-Handagama SM, Ariyaratne HB (2001) Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol Reprod* 65: 660-671
102. Mendis-Handagama SM, Ariyaratne HB, Teunissen van Manen KR, Haupt RL (1998) Differentiation of adult Leydig cells in the neonatal rat testis is arrested by hypothyroidism. *Biol Reprod* 59: 351-357
103. Mendis-Handagama SM, Risbridger GP, de Kretser DM (1987) Morphometric analysis of the components of the neonatal and the adult rat testis interstitium. *Int J Androl* 10: 525-534
104. Merchant-Larios H, Moreno-Mendoza N, Buehr M (1993) The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *Int J Dev Biol* 37: 407-415
105. Migrenne S, Pairault C, Racine C, Livera G, Geloso A, Habert R (2001) Luteinizing hormone-dependent activity and luteinizing hormone-independent differentiation of rat fetal Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 172: 193-202

106. Miller NR, Johnson MA, Paul SR, Girkin CA, Perry JD, Endres M, Krauss GL (1999) Visual dysfunction in patients receiving vigabatrin: clinical and electrophysiologic findings. *Neurology* 53: 2082-2087
107. Milligan CJ, Buckley NJ, Garret M, Deuchars J, Deuchars SA (2004) Evidence for inhibition mediated by coassembly of GABAA and GABAC receptor subunits in native central neurons. *J Neurosci* 24: 7241-7250
108. Minuk GY, Gauthier T, Gaharie A, Murphy LJ (1991) The effect of GABA on serum and hepatic polyamine concentrations after partial hepatectomy in rats. *Hepatology* 14: 685-689
109. Nelson MT, Blaustein MP (1982) GABA efflux from synaptosomes: effects of membrane potential, and external GABA and cations. *J Membr Biol* 69: 213-223
110. Nelson R, Schaffner AE, Li YX, Walton MK (1999) Distribution of GABA(C)-like responses among acutely dissociated rat retinal neurons. *Vis Neurosci* 16: 179-190
111. O'Brien RM, Granner DK (1996) Regulation of gene expression by insulin. *Physiol Rev* 76: 1109-1161
112. Obrietan K, Gao XB, Van Den Pol AN (2002) Excitatory actions of GABA increase BDNF expression via a MAPK-CREB-dependent mechanism--a positive feedback circuit in developing neurons. *J Neurophysiol* 88: 1005-1015
113. Odell WD, Swerdloff RS (1976) Etiologies of sexual maturation: a model system based on the sexually maturing rat. *Recent Prog Horm Res* 32:245-88.: 245-288
114. Ogurusu T, Shingai R (1996) Cloning of a putative gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor subunit rho 3 cDNA. *Biochim Biophys Acta* 1305: 15-18
115. Orth JM (1982) Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anat Rec* 203: 485-492
116. Owens DF, Boyce LH, Davis MB, Kriegstein AR (1996) Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. *J Neurosci* 16: 6414-6423
117. Owens DF, Kriegstein AR (2002) Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci* 3: 715-727
118. Owens DF, Liu X, Kriegstein AR (1999) Changing properties of GABA(A) receptor-mediated signaling during early neocortical development. *J Neurophysiol* 82: 570-583
119. Phillips DM, Lakshmi V, Monder C (1989) Corticosteroid 11 beta-dehydrogenase in rat testis. *Endocrinology* 125: 209-216

120. Racagni G, Apud JA, Masotto C, Rovescalli AC, Cocchi D, Locatelli V, Muller EE (1986) The hypothalamo-pituitary GABAergic regulation of prolactin release in the rat. *Adv Biochem Psychopharmacol* 42:103-17.: 103-117
121. Reetz A, Solimena M, Matteoli M, Folli F, Takei K, De Camilli P (1991) GABA and pancreatic beta-cells: colocalization of glutamic acid decarboxylase (GAD) and GABA with synaptic-like microvesicles suggests their role in GABA storage and secretion. *EMBO J* 10: 1275-1284
122. Riesz M, Erdo SL (1985) GABAB receptors in the rabbit uterus may mediate contractile responses. *Eur J Pharmacol* 119: 199-204
123. Ritta MN, Bas DE, Tartaglione CM (2004) In vitro effect of gamma-aminobutyric acid on bovine spermatozoa capacitation. *Mol Reprod Dev* 67: 478-486
124. Ritta MN, Calandra RS (1986) Occurrence of GABA in rat testis and its effect on androgen production. *Adv Biochem Psychopharmacol* 42:291-7.: 291-297
125. Ritta MN, Campos MB, Calandra RS (1987) Effect of GABA and benzodiazepines on testicular androgen production. *Life Sci* 40: 791-798
126. ROBERTS E (1986) What do GABA neurons really do? They make possible variability generation in relation to demand. *Exp Neurol* 93: 279-290
127. ROBERTS E, FRANKEL S (1950) gamma-Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J Biol Chem* 187: 55-63
128. Russell LD, de Franca LR, Hess R, Cooke P (1995) Characteristics of mitotic cells in developing and adult testes with observations on cell lineages. *Tissue Cell* 27: 105-128
129. Saffen DW, Cole AJ, Worley PF, Christy BA, Ryder K, Baraban JM (1988) Convulsant-induced increase in transcription factor messenger RNAs in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 7795-7799
130. Schmid H, Cohen CD, Henger A, Irrgang S, Schlondorff D, Kretzler M (2003) Validation of endogenous controls for gene expression analysis in microdissected human renal biopsies. *Kidney Int* 64: 356-360
131. Shi QX, Roldan ER (1995) Evidence that a GABAA-like receptor is involved in progesterone-induced acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 52: 373-381
132. Shi QX, Yuan YY, Roldan ER (1997) gamma-Aminobutyric acid (GABA) induces the acrosome reaction in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 3: 677-683
133. Shirakawa J, Taniyama K, Tanaka C (1987) gamma-Aminobutyric acid-induced modulation of acetylcholine release from the guinea pig lung. *J Pharmacol Exp Ther* 243: 364-369

134. Sieghart W (1995) Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Pharmacol Rev* 47: 181-234
135. Sigel E, Baur R, Trube G, Mohler H, Malherbe P (1990) The effect of subunit composition of rat brain GABAA receptors on channel function. *Neuron* 5: 703-711
136. Smalley MJ, Dale TC (1999) Wnt signalling in mammalian development and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 18: 215-230
137. Smith GB, Olsen RW (1995) Functional domains of GABAA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 16: 162-168
138. Somogyi R, Wen X, Ma W, Barker JL (1995) Developmental kinetics of GAD family mRNAs parallel neurogenesis in the rat spinal cord. *J Neurosci* 15: 2575-2591
139. Sorenson RL, Garry DG, Brelje TC (1991) Structural and functional considerations of GABA in islets of Langerhans. Beta-cells and nerves. *Diabetes* 40: 1365-1374
140. Suescun MO, Gonzalez SI, Chiauzzi VA, Calandra RS (1985) Effects of induced hypoprolactinemia on testicular function during gonadal maturation in the rat. *J Androl* 6: 77-82
141. Szabo G, Kartarova Z, Hoertnagl B, Somogyi R, Sperk G (2000) Differential regulation of adult and embryonic glutamate decarboxylases in rat dentate granule cells after kainate-induced limbic seizures. *Neuroscience* 100: 287-295
142. Szabo G, Katarova Z, Greenspan R (1994) Distinct protein forms are produced from alternatively spliced bicistronic glutamic acid decarboxylase mRNAs during development. *Mol Cell Biol* 14: 7535-7545
143. Thiel G, Cibelli G (2002) Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. *J Cell Physiol* 193: 287-292
144. Tillakaratne NJ, Erlander MG, Collard MW, Greif KF, Tobin AJ (1992) Glutamate decarboxylases in nonneural cells of rat testis and oviduct: differential expression of GAD65 and GAD67. *J Neurochem* 58: 618-627
145. Topilko P, Schneider-Maunoury S, Levi G, Trembleau A, Gourdji D, Driancourt MA, Rao CV, Charnay P (1998) Multiple pituitary and ovarian defects in Krox-24 (NGFI-A, Egr-1)-targeted mice. *Mol Endocrinol* 12: 107-122
146. Vaccarino FM, Hayward MD, Nestler EJ, Duman RS, Tallman JF (1992) Differential induction of immediate early genes by excitatory amino acid receptor types in primary cultures of cortical and striatal neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 12: 233-241
147. Varju P, Katarova Z, Madarasz E, Szabo G (2001) GABA signalling during development: new data and old questions. *Cell Tissue Res* 305: 239-246

148. Verdoorn TA, Draguhn A, Ymer S, Seeburg PH, Sakmann B (1990) Functional properties of recombinant rat GABAA receptors depend upon subunit composition. *Neuron* 4: 919-928
149. Verhage M, Maia AS, Plomp JJ, Brussaard AB, Heeroma JH, Vermeer H, Toonen RF, Hammer RE, van den Berg TK, Missler M, Geuze HJ, Sudhof TC (2000) Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science* 287: 864-869
150. Watanabe M, Maemura K, Kanbara K, Tamayama T, Hayasaki H (2002) GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int Rev Cytol* 213:1-47.: 1-47
151. Weisser M, Haferlach T, Schoch C, Hiddemann W, Schnittger S (2004) The use of housekeeping genes for real-time PCR-based quantification of fusion gene transcripts in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 18: 1551-1553
152. Worley PF, Cole AJ, Murphy TH, Christy BA, Nakabeppu Y, Baraban JM (1990) Synaptic regulation of immediate-early genes in brain. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 55:213-23.: 213-223
153. Worley PF, Cole AJ, Saffen DW, Baraban JM (1990) Regulation of immediate early genes in brain: role of NMDA receptor activation. *Prog Brain Res* 86:277-85.: 277-285
154. Yoshino M, Mizutani T, Yamada K, Tsuchiya M, Minegishi T, Yazawa T, Kawata H, Sekiguchi T, Kajitani T, Miyamoto K (2002) Early growth response gene-1 regulates the expression of the rat luteinizing hormone receptor gene. *Biol Reprod* 66: 1813-1819
155. Yu TP, Lester HA, Davidson N (2003) Requirement of a critical period of GABAergic receptor blockade for induction of a cAMP-mediated long-term depression at CA3-CA1 synapses. *Synapse* 49: 12-19
156. Yu TP, McKinney S, Lester HA, Davidson N (2001) Gamma-aminobutyric acid type A receptors modulate cAMP-mediated long-term potentiation and long-term depression at monosynaptic CA3-CA1 synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5264-5269
157. Yuste R, Katz LC (1991) Control of postsynaptic Ca²⁺ influx in developing neocortex by excitatory and inhibitory neurotransmitters. *Neuron* 6: 333-344
158. Zirkin BR, Ewing LL (1987) Leydig cell differentiation during maturation of the rat testis: a stereological study of cell number and ultrastructure. *Anat Rec* 219: 157-163

7. Anhang

7.1 Danksagung

Herrn Univ. - Prof. Dr. Artur Mayerhofer danke ich sowohl für die freundliche Überlassung des Themas, als auch für die hervorragende, intensive Betreuung und Begutachtung der Arbeit. Herrn Univ. – Prof. Dr. Manfred Gratzl danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die engagierte Betreuung im GRK 333.

Herrn PD Dr. Karl Föhr danke ich für die Betreuung bei den Patch-Clamp Experimenten und die Unterstützung bei den Messungen der Ca^{2+} - Signale.

Herrn Dr. Lars Kunz danke ich für die Betreuung bei den Messungen des Membranpotentials, für die sorgsame Durchsicht dieser Arbeit und für viele Anregungen und Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Ricardo Calandra, Frau Dr. Silvia Gonzalez-Calvar und Frau Dr. Mónica Frungieri danke ich für die Betreuung bei der Isolation der adulten primären Leydig-Zellen und bei den Testosteronmessungen. Außerdem danke ich Ihnen für die freundliche Unterstützung während meines Aufenthaltes in Buenos Aires.

Frau Dr. Katia Gamel-Didelon danke ich für Ihre kompetente Einführung in die molekularbiologischen Methoden. Mit Ihrer offenen und herzlichen Art war sie mir in vielen Fragestellungen eine große Hilfe.

Frau Dr. Martina Haasemann und Frau Dr. Karen Schmidt-Bäse danke ich für die Betreuung im GRK 333.

Für die gute Zusammenarbeit und das freundliche Arbeitsklima danke ich Dr. Ágnes Ágoston, Dr. Martin Albrecht, Dr. Martin Breckner, Dr. Nicola Dimitrijevic, Katrin End, Dr. Angela Finzel, Dr. Christof Geigerseder, Pia Körner, Annette Krieger, Andreas Mauermayer, Klaus Metzeler, Karin Metzrath, Gerhard Prechtner, Romi Rämsch, Marlies Rauchfuß, Dr. Axel W. Reinhardt, Johanna Richter, Gabriele Terfloth, Astrid Tiefenbacher und Barbara Zschiesche.

Für ihre umfassende Unterstützung danke ich meiner Familie und im Besonderen meinen Eltern.

Meiner Frau Brigitte danke ich für ihre allgegenwärtige, bedingungslose Liebe.

7.2 Lebenslauf

Zur Person:

Richard Fritz Georg Doepner, geboren am 08.04.1975 in Berlin-Lichterfelde

Familienstand: verheiratet, 1 Kind

Eltern:

Thomas Doepner, geboren am 16.01.1944; Beruf: Facharzt für Gynäkologie

Ute Doepner, geb. Schmidt, geboren am 16.06.1946; Beruf: Fachärztin für

Psychotherapeutische Medizin

Geschwister:

Charlotte, Philipp und Johanna

Schule:

1981 - 1994 Grundschule Ochtersum, Hildesheim
 Grundschule Vahrendorf, Vahrendorf
 Friedrich-Ebert-Gymnasium, Hamburg-Harburg
 Görres-Gymnasium, Koblenz

08.06.94 Abiturprüfung am Görres-Gymnasium

Zivildienst:

1995 - 1996 Individuelle Schwerstbehinderten Betreuung (ISB) bei „Der Kreis Club Behinderter und ihrer Freunde“ in Koblenz

Studium:

SS 96 – SS 98 Biologiestudium an der Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz

13.11.97 Vordiplomprüfung Biologie

WS 98/99 – WS 99/00 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität, Gießen

13.03.00 Ärztliche Vorprüfung

SS 00 – WS 04/05 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München

29.11.04 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

06.12.04 Approbation als Arzt

Berufstätigkeit:

seit 01.04.05 Assistenzarzt Chirurgische Abteilung Bethesda Krankenhaus, Stuttgart