

**Eisenstoffwechsel im Maushoden. Die Bedeutung von
IRP2 (*Iron Regulatory Protein 2*) für die testikuläre
Eisenhomöostase in der Maus.**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biochem. **Britta Marohn**
geboren am 04.05.1979 in Bramsche

2013

Referent: Prof. Dr. Jörg Schmidtke
Institut für Humangenetik der Medizinischen Hochschule Hannover

Korreferent: Prof. Dr. Jürgen Alves
Institut für Biophysikalische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover

Drittprüfer: Prof. Dr. Hans-Jörg Jacobsen
Institut für Pflanzengenetik der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Tag der Promotion: 19.06.2013

Erklärung zur Dissertation:

Hierdurch erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel: "Eisenstoffwechsel im Maushoden. Die Bedeutung von IRP2 für die testikuläre Eisenhomöostase in der Maus." selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistungen hernagezogenen Institutionen vollständig angegeben habe. Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet.

Britta Marohn

Für MaPa

und Olli

INHALTSVERZEICHNIS

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	4
<i>Danksagung</i>	9
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	10
<i>Zusammenfassung</i>	13
<i>Summary</i>	15
1 EINLEITUNG	17
1.1 Eisen – ein essentielles Spurenelement und ein toxisches Schwermetall	17
1.2 Eisenhomöostase	17
1.2.1 Intestinale Eisenaufnahme	19
1.2.2 Aufnahme von Transferrin-gebundenem Eisen in andere Körperzellen	20
1.2.3 Der Eisentransporter DMT1.....	21
1.2.4 Zelluläre Eisenspeicherung in Ferritin	21
1.2.5 Der Eisenexporter Ferroportin	22
1.3 Regulation des Eisenmetabolismus	23
1.3.1 Die Regulation der zellulären Eisenhomöostase	23
1.4 Eisenregulatorische Proteine: IRP1 und IRP2	25
1.4.1 Die verwendeten Mausmodelle.....	26
1.4.1.1 <i>Irp1 knock out</i> Mäuse.....	27
1.4.1.2 <i>Irp2 knock out</i> Mäuse.....	27
1.5 Aufbau und Funktion des Hodens und des Nebenhodens	28
1.5.1 Die Spermatogenese der Maus.....	30
1.5.2 Reifung und Speicherung der Spermien im Nebenhoden	31
1.5.3 Aufbau und Motilität der Spermien	32
1.5.4 Zytologische Modifikationen während der Spermatogenese: Änderungen der Mitochondrienmorphologie	35
1.6 Ziele dieser Arbeit	37
2 MATERIAL	39
2.1 Allgemeine Chemikalien	39

2.2	Enzyme	40
2.3	Antikörper	40
2.4	Gebrauchsfertige Kits	41
2.5	Oligonukleotide (Primer)	41
2.6	Verbrauchsmaterialien	42
2.7	Geräte	42
2.8	Bakterien	43
2.9	Mauslinien	44
2.10	Referenzsequenzen (Genbank-Accession-Nummern)	44
3	METHODEN	45
3.1	Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren	45
3.1.1	Isolierung von genomischer DNA aus Geweben	45
3.1.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben	45
3.1.3	Minipräparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	46
3.1.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	47
3.2	Agarosegel-Elektrophorese	47
3.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	49
3.4	Reverse Transkription (RT-PCR)	50
3.5	Klonierungstechniken	51
3.5.1	Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA.....	51
3.5.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	52
3.5.3	Dephosphorylierung linearisierter Klonierungsvektoren	52
3.5.4	Ligation von DNA-Fragmenten	53
3.5.5	TOPO TA Klonierung von PCR-Produkten.....	53
3.5.6	Transformation in chemisch kompetente XL-1 Blue	54
3.6	Sequenzierung	54
3.7	ATPase-Assay	55
3.7.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford.....	56
3.8	Fixierung und Einbettung von Organen	56
3.9	Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Gewebeschnitten	57
3.10	In situ Hybridisierung auf Paraffinschnitten (SISH)	58

3.10.1	Sondensynthese	59
3.10.1.1	Hybridisierung, Antikörperbindung und Visualisierung	59
3.11	Immunhistochemische Färbung mit Antikörpern	62
3.12	TUNEL-Assay	64
3.13	Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern	65
3.14	Spermienanalysen.....	67
3.14.1	Isolierung der Spermien mit der <i>swim out</i> -Methode.....	67
3.14.2	Computerunterstützte Spermienanalyse (CASA)	67
3.14.3	Bestimmung der Spermienzahlen	68
3.14.4	Fixierung der Spermien für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	68
3.14.5	Morphologische Analyse der Spermien mittels TEM.....	68
3.14.5.1	Quantifizierung der mitochondrialen Profile mittels TEM	69
3.15	Zucht und Haltung von Labormäusen	70
3.15.1	Eisenmangelbedingungen	71
3.15.2	Generierung von <i>Irp1^{+/-};Irp2^{-/-}</i> -Mäusen.....	71
3.16	Blutentnahme und Bestimmung des Hämatokritwertes.....	71
3.17	Statistische Analysen.....	72
3.18	Kollaborationen	72
4	ERGEBNISSE.....	74
4.1	Die Expression von <i>Irp1</i> und <i>Irp2</i> im Maushoden.....	74
4.1.1	Expressionsanalyse von <i>Irp1</i> und <i>Irp2</i> mittels RT-PCR-Analysen.....	75
4.1.2	IRP2 wird ausschließlich in Spermatisden des Stadiums 8 exprimiert.....	76
4.2	Die Rolle von IRP2 in der Spermatogenese	78
4.2.1	Histologische Analyse der Hoden IRP2-defizienter Mäuse	78
4.2.2	Das Proliferationsverhalten testikulärer Keimzellen IRP2-defizienter Mäuse.....	79
4.2.3	Quantitative Analyse der Apoptoserate der testikulären Keimzellen von <i>Irp2^{-/-}</i> -Mäusen.....	81
4.2.3.1	Apoptosedetektion mittels aktivierter Caspase-3	81
4.2.3.2	Apoptosedetektion mit dem TUNEL-Assay	82
4.3	Fertilitätsanalysen von IRP1- und IRP2-defizienten Mäusen.....	83
4.4	Spermienanalysen von Mäusen mit IRP2-Defizienz	84
4.4.1	Die Spermienquantität IRP2-defizienter Männchen	85
4.4.2	Spermien von <i>Irp2^{-/-}</i> -Männchen sind hyperaktiviert	85
4.5	Die testikuläre Expression der IRP2-Zielproteine: DMT1, Ferritin und Ferroportin .	88
4.5.1	DMT1 wird in Sertolizellen und elongierten Spermatisden exprimiert.....	88

4.5.2	Ferritin wird in Sertolizellen, Spermato gonien und primären Spermatozyten exprimiert	89
4.5.3	Ferroportin wird im Hoden in peritubulären Myoidzellen exprimiert	90
4.6	Der Einfluss von Eisenmangel auf die Spermatogenese IRP2-defizienter Mäuse.....	92
4.6.1	Die Bestimmung des Hämatokritwertes zur Verifizierung des Eisenmangels	92
4.6.2	Die Eisenmangeldiät zeigt keine Auswirkungen auf die Histologie der Hoden	94
4.6.3	Die Auswirkung des Eisenmangels auf die Proliferation testikulärer Keimzellen.....	95
4.7	Der Einfluss von Eisenmangel auf die testikuläre Expression von IRP2-Zielproteinen	97
4.8	Die Analyse der Spermien von <i>Irp2</i>^{-/-}-Männchen unter Eisenmangelbedingungen	99
4.8.1	Eisenmangel korreliert mit erhöhten Spermienzahlen	99
4.8.2	Die Auswirkungen des Eisenmangels auf die Motilität der Spermien	101
4.8.2.1	Vergleich der Spermienmotilitäten nach dreiwöchiger Eisenmangeldiät.....	102
4.8.2.2	Eisenmangel bewirkt eine Hyperaktivierung der Spermien von C57BL/6J- und eine Reduktion der Spermengeschwindigkeit von <i>Irp2</i> ^{-/-} -Männchen	104
4.9	IRP2-Defizienz in Kombination mit Eisenmangel vermindern die Fertilität	109
4.10	Die morphologische Analyse der Spermien	110
4.10.1	IRP2-Defizienz in Kombination mit Eisenmangel resultiert in verstärkter Vakuolisierung der Mitochondrien	111
4.11	Der ATP-Gehalt der Spermien war trotz Eisenmangeldiät nicht beeinträchtigt.....	112
5	<i>DISKUSSION</i>.....	114
5.1	Zusammenstellung und Interpretation der Ergebnisse	114
5.2	Expressionsanalysen.....	116
5.2.1	Wahl der Sonden für die <i>Irp</i> -SISH.....	117
5.2.2	Die testikuläre Expression von IRP2	118
5.2.3	Die testikuläre Expression von IRP2-regulierten Zielproteinen	119
5.2.4	Spielt IRP2 eine Rolle im testikulären Eisenzyklus?	123
5.3	Spermienanalysen.....	124
5.3.1	Sind proliferative und/oder apoptotische Effekte die Ursache für die erhöhten Spermienzahlen?	124
5.3.2	Gegenüberstellung der beiden Methoden zur Apoptosedetektion: IHC mit aktivierter Caspase-3 und TUNEL-Assay	126
5.4	Motilitätsanalysen	127
5.4.1	Beitrag der mitochondrialen Atmungskette zur ATP-Synthese für die Motilität.....	128
5.5	Fertilitätsanalysen	130
5.6	Ausblick.....	131
6	<i>Literaturverzeichnis</i>	133

7	<i>Anhang</i>	147
7.1	Zusätzliche Daten	147
7.1.1	Darstellung der Einzelkanäle zu den gezeigten IF-Bildern	147
7.1.2	Negativ-Kontrollen zu den IF-Färbungen	150
7.1.3	Negativ-Kontrolle zu den IHC-Färbungen	151
7.1.4	Übersicht der verwendeten Einstellungen für die Motilitätsanalysen (Mouse 2)	151
7.2	Posterpräsentationen	152
7.3	Vorträge	153
7.4	Veröffentlichungen	153

DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. Jörg Schmidtke für die Möglichkeit, meine Dissertation in seinem Institut anfertigen zu dürfen und für seine Diskussionsbereitschaft und konstruktiven Ratschläge.

Bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Alves und bei Herrn Prof. Dr. Hans-Jörg Jacobsen möchte ich mich für die Übernahme des Korreferats bzw. des Prüfungsvorsitzes bedanken.

Ich bedanke mich recht herzlich bei Frau Dr. Stephanie Schubert für die Überlassung dieses interessanten Themas, ihre ständige Unterstützung, Hilfsbereitschaft und Diskussionsbereitschaft. Auch sehr dankbar bin ich für ihre motivierenden Ratschläge während der "Durststrecken" und für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Frau Christina Gerkens war mir eine unentbehrliche Hilfe bei den Genotypisierungen und den IHC-Färbungen, vielen lieben Dank für die gute Zusammenarbeit. Auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Ich möchte Dr. Esther Meyron-Holtz und Yael Leichtmann-Bardoogo für die gute Zusammenarbeit und anregenden Diskussionen danken.

Bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Engel möchte ich mich für die Möglichkeit, die Spermienanalysen in seinem Institut anzufertigen, bedanken. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Pawel Grzmil, der bei technischen Problemen sofort zur Stelle war, die statistischen Analysen angefertigt hat und nie müde wurde, mir diesbezüglich sämtliche Fragen geduldig zu beantworten.

Für die Unterstützung bei der Messung der Hämatokritwerte möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Andre Bleich (ZTL, MHH) und besonders bei Anna Smoczek bedanken.

Herrn Prof. Dr. Andreas Meinhardt danke ich für die Möglichkeit, die Transmissionselektronenmikroskopie in seinem Institut anfertigen zu dürfen und für seine Unterstützung während der Vorbereitungen und Auswertungen.

Ich möchte mich bei meinen Freunden Dr. Cornelia Ulbrich, Dr. Anja Glinschert und Dr. Anna Alessi für viele ermunternde Worte und die vielen schönen zusammen verbrachten Stunden bedanken. Bei Dr. Anna Foik möchte ich mich für ihre Unterstützung bei der SISH, für ihre sportliche Motivation bedanken und dafür, dass sie einen Teil ihrer Freizeit zum Korrekturlesen geopfert hat. Für das "Freizeitopfer" Korrekturlesen sowie seiner ständigen Diskussionsbereitschaft, aber auch viele schöne private Unternehmungen möchte ich mich bei Dr. Michael Stauber bedanken. Mein Dank gilt auch all meinen hier namentlich nicht aufgeführten Freunden für eine wunderbare gemeinsame Zeit.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern und meinem Freund für die andauernde Motivation und Unterstützung sowie für viel entgegengebrachtes Verständnis.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro-
ALH	<i>amplitude of lateral head displacement</i>
AP	alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BCF	<i>beat cross frequency</i>
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CASA	computerunterstützte Spermienanalyse
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propan sulfonat
cm	Zentimeter
Co	Kobalt
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cu	Kupfer
d	Tag
d. h.	das heisst
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMT1	<i>divalent metal transporter 1</i>
DNA	<i>desoxyribonucleinacid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	und andere
EtOH	Ethanol
FA	Formaldehyd
Fe	Eisen
FPN	Ferroportin
Ft	Ferritin
FtMt	mitochondriales Ferritin
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Hz	Hertz
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IRE	<i>iron responsive element</i>
IRP	<i>iron regulatory protein</i>
IVF	<i>in vitro</i> Fertilisation
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KH ₂ HPO ₄	Kalium-di-hydrogenphosphat
l	Liter
M	Molar
m	Milli- / Meter
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
mind.	mindestens
Mio.	Millionen
Mn	Mangan
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	Nano-
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
Ni	Nickel
p	Piko-
Pb	Blei
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
RNA	<i>ribonucleinacid</i> , Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription mit anschließender PCR
s	Sekunde
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i>
SSC	<i>saline sodium citrate</i>
STR	<i>straightness</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tf	Transferrin
TfR	Transferrinrezeptor
Tris	Trishydroxyethylamin
tRNA	Transfer RNA

U	<i>unit</i>
u. a.	und andere / unter anderen
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
V	Volt; Volumen
v/v	Volumenprozent pro Volumen
VAP	<i>velocity average path</i>
VCL	<i>velocity curved line</i>
vgl.	vergleiche
VSL	<i>velocity straight line</i>
w/v	Gewichtsprozent pro Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-b-D-galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel
Zn	Zink

ZUSAMMENFASSUNG

Eisen ist ein essentielles Spurenelement, allerdings kann sich sowohl ein Eisenmangel als auch ein Eisenüberschuss toxisch auf den Organismus auswirken. Deshalb ist eine strenge Regulationskontrolle der Eisenhomöostase von immenser Bedeutung. Die zelluläre Eisenhomöostase wird posttranskriptionell durch die eisensensitiven Proteine, *Iron Regulatory Protein 1* (IRP1) und *Iron Regulatory Protein 2* (IRP2), reguliert. Die IRPs sind mRNA-Bindungsproteine, die an *Iron Responsive Elements* (IREs) in den Transkripten von am Eisenmetabolismus beteiligten Proteinen wie TfR1, DMT1, Ferritin und Ferroportin binden und dadurch die zelluläre Eisenaufnahme und -speicherung regulieren. Bei intrazellulärem Eisenmangel bindet IRP2 an die IREs und reguliert die intrazelluläre Eisenhomöostase, indem es die Eisenaufnahme in die Zellen steigert und zugleich die Eisenspeicherung und den -verbrauch vermindert.

Die testikuläre Eisenhomöostase ist weitgehend ungeklärt. Während der Spermatogenese besteht für die sich differenzierenden Keimzellen aufgrund der hohen mitotischen und meiotischen Aktivität sowie der Mitochondriogenese ein hoher Eisenbedarf. Die Blut-Hoden-Schranke schützt das Keimepithel vor äußeren Einflüssen und unterbindet dabei, dass Eisen aus dem Blutstrom rekrutiert wird. Die testikuläre Expression von IRP2-regulierten Zielproteinen und die verminderte Fertilität von *Irp2*^{-/-}- und Infertilität von *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäusen deuten darauf hin, dass die IRPs (vor allem IRP2) an der Regulation der testikulären Eisenhomöostase beteiligt sind. In dieser Arbeit sollte die Rolle von IRP2 für die testikuläre Eisenhomöostase und der Einfluss einer IRP2-Defizienz auf die Spermatogenese mit Hilfe von *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäusen analysiert werden.

Nach detaillierter histologischer Analyse war die Spermatogenese von *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Männchen im Vergleich zum Wildtyp nicht beeinträchtigt. Allerdings zeigten Spermien von *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäusen einen erhöhten Anteil von vakuolisierten Mitochondrien im Vergleich zum Wildtyp. Dieser auf die Spermien beschränkte Phänotyp führte zu keiner reduzierten Fertilität. Auch die testikuläre Expression der IRP2-regulierten Proteine DMT1, Ferritin und Ferroportin war bei IRP2-Defizienz nicht beeinflusst. *Irp2*-Transkripte wurden innerhalb des adulten Maushodens spezifisch in Spermiden des Stadiums 8 der Spermatogenesestadien VII-VIII detektiert. Interessanterweise verlagerte sich die testikuläre Expression von *Irp2* im *Irp1*^{-/-}-Maushoden auf Spermiden des Stadiums 8 der Spermatogenesestadien IV-VIII. Quantitative Spermienanalysen und Spermienmotilitätsanalysen ergaben, dass *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp deutlich höhere epididymale Spermienzahlen aufwiesen, und dass die Spermien von *Irp2*^{-/-}-Männchen vorzeitig hyperaktiviert waren.

Für die weitere Analyse wurde diätetisch ein Eisenmangel bei Wildtyp, *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Männchen induziert. Sowohl beim Wildtyp als auch bei *Irp2*^{-/-}-Mäusen führte der Eisenmangel zu einer Erhöhung der Spermienzahl und zu einer verstärkten Vakuolisierung der Mitochondrien innerhalb der Spermien. Während die Wildtypspermien unter Eisenmangelbedingungen hyperaktiviert waren, waren die Spermengeschwindigkeiten von *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäusen nach Eisenmangeldiät signifikant reduziert. Fertilitätsanalysen von *Irp2*^{-/-}-Männchen, die mit der Eisenmangeldiät gefüttert wurden, zeigten, dass die eingeschränkte Spermienmotilität eine verminderte Fertilität zur Folge hat. Erste Untersuchungen haben gezeigt, dass die beeinträchtigte Spermienmotilität von *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäusen nicht durch einen reduzierten ATP-Gehalt der Spermien bedingt ist.

Schlagworte: IRP2, Spermatogenese, Spermienmotilität

SUMMARY

Iron is an essential micronutrient; both lack and excess of iron can harm the organism. Therefore a tight control of iron homeostasis is critical. Cellular iron homeostasis is regulated posttranscriptionally by the iron-sensitive proteins, Iron Regulatory Protein 1 and 2 (IRP1 and IRP2). IRPs are mRNA-binding proteins that bind iron responsive elements (IREs) of transcripts involved in iron metabolism (e.g. TfR1, DMT1, Ferritin, Ferroportin) and, thereby, regulate cellular entry and storage of iron. Iron shortage in a cell causes IRPs to bind to IREs in order to modulate intracellular iron homeostasis by increasing intake and reducing storage and consumption of iron.

The mechanism of testicular iron homeostasis remains largely unknown. During spermatogenesis differentiating germ cells have a high demand for iron due to elevated mitotic and meiotic activity and mitochondriogenesis. The blood-testis barrier, however, protects the germ epithelium from external influences and prevents recruitment of iron from the blood. Testicular expression of IRP2-regulated proteins as well as a reduced fertility of *Irp2*^{-/-}-males and infertility of *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-males indicate a function of IRPs (particularly IRP2) in testicular iron homeostasis. This study aimed at examining this function as well as the effect of genetic IRP2-deficiency on spermatogenesis making use of *Irp2*^{-/-}- and *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-mice.

Detailed histological analyses showed that spermatogenesis of *Irp2*^{-/-}- and *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-males was indistinguishable from that of wildtype. However, *Irp2*^{-/-}- and *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-sperm cells displayed a higher rate of vacuolised mitochondria as compared to wildtype sperm. This phenotype was restricted to sperm cells and did not lead to a reduction in fertility. Also, testicular expression of IRP2-regulated proteins DMT1, Ferritin and Ferroportin was not altered in IRP2 null mice. *Irp2* transcripts were detected specifically in step 8-spermatids of spermatogenic cycle stages VII-VIII in adult mouse testes. Interestingly, in *Irp1*^{-/-}-testes this expression in step 8-spermatids was expanded to stages IV-VIII of the spermatogenic cycle. Quantitative analyses of sperm cell numbers and motility demonstrated that *Irp2*^{-/-}- and *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-males exhibited higher numbers of epididymal sperm cells than wildtype and that *Irp2*^{-/-}-sperm were prematurely hyperactivated.

In further experiments, wildtype, *Irp2*^{-/-}- and *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-males were put on a low iron diet in order to induce or intensify iron deficiency. Both in wildtype and *Irp2*^{-/-}-mice, dietary iron deficiency led to increased sperm numbers and rates of mitochondrial vacuolisation in sperm. While - under iron starvation - wildtype sperm were hyperactivated, *Irp2*^{-/-}- and *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-sperm showed significantly decreased velocities. Fertility analyses of *Irp2*^{-/-}-males on a low iron diet revealed that the observed

reduction in sperm motility impaired fertility. Preliminary data suggested that compromised sperm motility in *Irp2*^{-/-} and *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-} mice did not correlate with reduced ATP levels in sperm cells.

Keywords: IRP2, spermatogenesis, sperm motility

1 EINLEITUNG

1.1 Eisen – ein essentielles Spurenelement und ein toxisches Schwermetall

Bereits 3000 v. Chr. wurde in China vermutet, dass die Einnahme von Eisen (Fe) Anämie-ähnlichen Symptomen vorbeugen kann (Eisenstein, 2000). Heute sind sowohl durch Eisenmangel als auch durch Eisenüberschuss bedingte physiologische Erkrankungen bekannt. Durch die Beteiligung von Eisen in der Energieproduktion und dem Sauerstofftransport kann Eisenmangel zu vermindertem Zellwachstum, Hypoxie, neurodegenerativen Erkrankungen und letztendlich zum Tode führen (Beard, 2003; MacKenzie *et al.*, 2008). Hingegen wird Eisenüberladung und die daraus resultierende Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS, *reactive oxygen species*) mit Krebs, Herz-, Pankreas- und Leberversagen assoziiert (Weinberg, 1996; Eisenstein, 2000).

Das Übergangsmetall Eisen kann über Redoxreaktionen Elektronen übertragen, wobei eine ständige Umwandlung zwischen zweiwertigem (Fe^{2+}) und dreiwertigem Eisen (Fe^{3+}) erfolgt (Papanikolaou und Pantopoulos, 2005). Aufgrund dieses Redoxpotentials spielt Eisen in Vertebraten eine wichtige Rolle in vielen physiologischen Prozessen und ist somit ein essentielles Spurenelement. Eisen ist Bestandteil von Sauerstoff-transportierenden Hämproteinen wie dem Hämoglobin und Myoglobin (Wilson und Reeder, 2008). Des Weiteren sind eisenhaltige Enzyme an der DNA-Synthese, an Signaltransduktionen, an Reaktionen des xenobiotischen Metabolismus und anderen Stoffwechselzyklen beteiligt (Eisenstein, 2000). Sein Redoxpotential ist aber gleichzeitig auch für seine Toxizität verantwortlich. Zytoplasmatisches Eisen liegt überwiegend als Fe^{2+} vor und ist instabil, d. h. es kann sehr leicht oxidiert werden. Dabei können ROS entstehen, die Lipide, Proteine sowie DNA u. a. Zellkomponenten oxidieren und dadurch zerstören (Papanikolaou und Pantopoulos, 2005).

1.2 Eisenhomöostase

Der Mensch benötigt ca. 25 mg Eisen pro Tag für die Erythropoese und andere Vitalprozesse. Ein Erwachsener nimmt pro Tag ca. 15-20 mg Eisen über die Nahrung auf, von denen jedoch nur 1-2 mg/d intestinal absorbiert werden (Hentze *et al.*, 2004, 2010). Damit keine negative Bilanz zwischen Eisenaufnahme und -bedarf entsteht, interagieren Zellen mit hohem Eisenbedarf wie die Erythrozytenvorläufer mit körpereigenen Eisenspeichern wie z. B. Leber, Milz, Muskeln und

Knochenmark (De Domenico *et al.*, 2008). Nach der Absorption von an Häm gebundenem Eisen und Fe^{3+} im Zwölffingerdarm wird es an Transferrin gebunden und so im Blutstrom zirkulierend im Körper verteilt (siehe Abbildung 1).

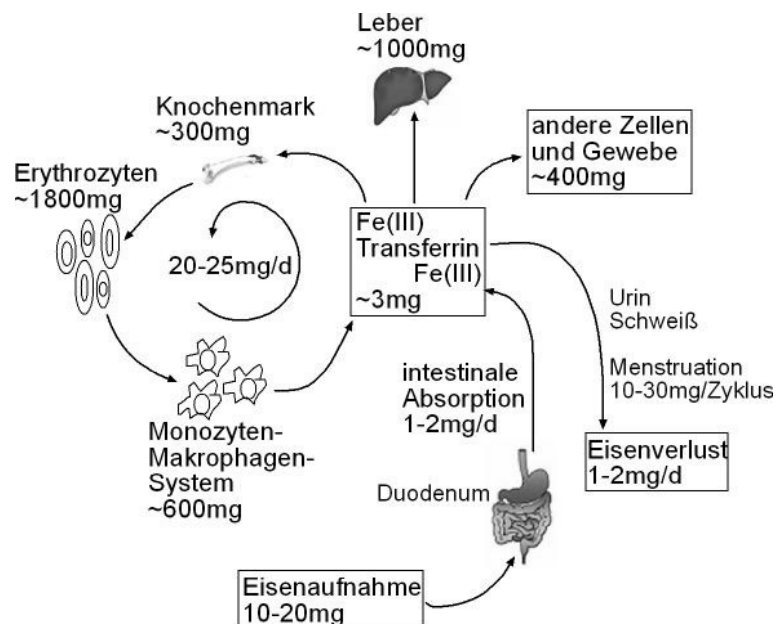


Abbildung 1: Schematische Übersicht der Eisenmenge, die ein gesunder Mensch aufnimmt, verwendet, speichert und ausscheidet. Bei einer ausgewogenen Ernährung werden ca. 1-2 mg/d Eisen absorbiert, an Transferrin gebunden und über das Blut zu den Organen transportiert, damit es dort gespeichert werden kann (modifiziert nach Hentze *et al.*, 2004).

Die roten Blutkörperchen bilden den größten Eisenpool. Gealterte Erythrozyten werden von Makrophagen phagozytiert. Je nach Bedarf speichern diese das so zurückgewonnene Eisen oder entlassen es wieder in den Blutstrom. Ein geringer Anteil Eisen (1-2 mg/d) wird mit dem Urin, im Schweiß, bei Frauen während der Menstruation / Schwangerschaft oder in Form von Enterozyten und Hautzellen ausgeschieden (Hentze *et al.*, 2004, 2010; siehe Abbildung 1).

Mit der pflanzlichen Nahrung aufgenommenes Eisen liegt hauptsächlich in seiner dreiwertigen Form (Fe^{3+}) vor und besitzt im Gegensatz zu Fe^{2+} und zum Häm-Eisen aus tierischen Nahrungsmitteln unter physiologischen Bedingungen eine geringe Löslichkeit, da Fe^{3+} zu unlöslichem $\text{Fe}(\text{OH})_3$ hydrolysiert (McKie *et al.*, 2001). Die spezifische Bindung von Eisen an Proteine führt folglich zu einer verbesserten Löslichkeit, dient der Prävention der Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) und gewährleistet eine angemessene Regulation des Eisenstoffwechsels. In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen Schritte der Eisenaufnahme sowie die daran beteiligten Proteine, die in dieser Arbeit analysiert wurden, näher erläutert.

1.2.1 Intestinale Eisenaufnahme

Das mit der Nahrung aufgenommene Eisen (Fe) liegt überwiegend als Häm-Eisen und Fe^{3+} vor. Bei der intestinalen Eisenabsorption, die hauptsächlich im Duodenum (Zwölffingerdarm) erfolgt, müssen an Häm gebundenes Eisen und anorganische Fe^{2+} - und Fe^{3+} -Ionen die apikale und basolaterale Membran der Enterozyten passieren, um ins Blutplasma zu gelangen. Häm-Eisen wird unabhängig von Fe^{2+} und Fe^{3+} über spezifische Transportproteine in die Zelle geschleust. Der detaillierte Mechanismus ist derzeit noch unbekannt (Shayeghi *et al.*, 2005). Das anorganische Fe^{3+} muss für den Eintritt in die Enterozyten zunächst durch die membranassoziierte Ferrireduktase DCYTB (duodenales Cytochrom B; alternativer Name: CYBRD1) zu Fe^{2+} reduziert werden (Latunde-Dada *et al.*, 2008; Wyman *et al.*, 2008). Da *Dcytb knock out* Mäuse keine Störungen im Eisenstoffwechsel aufweisen, sind im Duodenum wahrscheinlich weitere, redundant wirkende Ferrireduktasen aktiv (Gunshin *et al.*, 2005a). Der Transport von Fe^{2+} durch die apikale Membran der Enterozyten des Duodenums wird durch den divalenten Metallionentransporter 1 (DMT1, alternative Namen: SLC11A2, NRAMP2) vermittelt (Fleming *et al.*, 1997). Im Zytosol der Enterozyten kann Eisen entweder in Ferritin gespeichert oder über den basolateralen Eisentransporter Ferroportin (FPN1, alternative Namen: MTP1, SLC40A1, IREG1) aus den Zellen hinausgeschleust werden (McKie *et al.*, 2000). Ferroportin kolokalisiert in Enterozyten mit Hephaestin, einer Oxidase, die Fe^{2+} zu Fe^{3+} oxidiert. Diese Eisenkonvertierung ist notwendig, damit Eisen im Blutplasma an Transferrin (Tf) gebunden werden kann (Han und Kim, 2007; siehe Abbildung 2).

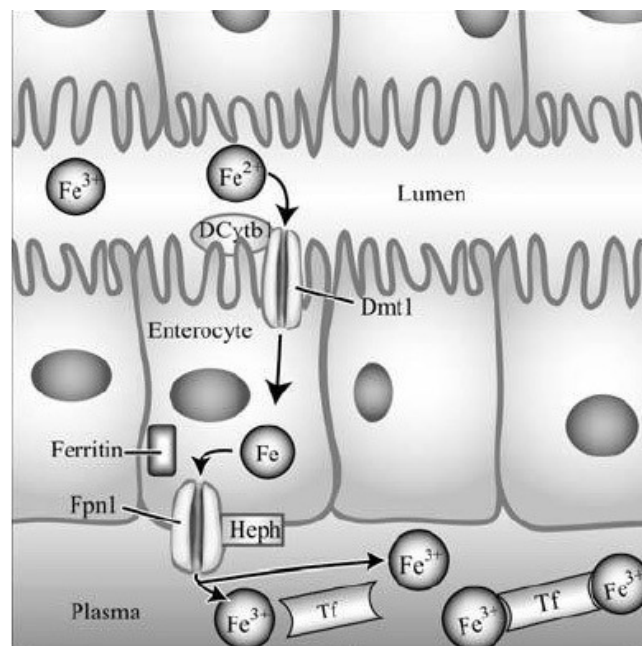


Abbildung 2: Intestinale Eisenabsorption. Der Eisentransport durch die Enterozyten ins Blut erfolgt mittels DMT1 und über FPN1. Reduktasen und Oxidasen sorgen dafür, dass Eisen in der dafür benötigten Oxidationsstufe vorliegt (modifiziert nach MacKenzie *et al.*, 2008).

An Transferrin gebundenes Eisen kann durch Bindung an den Transferrinrezeptor 1 über rezeptorvermittelte Endozytose von den Körperzellen aufgenommen werden.

Hephaestin (Heph) ist ein auf den Intestinaltrakt beschränktes, membranständiges Homolog von Caeruloplasmin. Caeruloplasmin ist eine Kupferoxidase, die nicht im Intestinaltrakt angesiedelt ist, dafür aber in anderen Organen wie z. B. der Leber, dem Gehirn und der Lunge exprimiert wird und von Hepatozyten sezerniert im Blutserum vorkommt (Harris *et al.*, 1999; Vulpe *et al.*, 1999).

1.2.2 Aufnahme von Transferrin-gebundenem Eisen in andere Körperzellen

Bei Vertebraten wird Fe^{3+} zum Transport im Plasma und anderen Körperflüssigkeiten an das chelatbildende Glykoprotein Transferrin gebunden. Transferrin (Tf) wird in der Leber, der Retina, im Gehirn und in den Hoden synthetisiert und in die umgebenden Körperflüssigkeiten wie z. B. Blut und Lymphe sezerniert (De Domenico *et al.*, 2008). Mit Eisen beladenes Transferrin (Tf-Fe^{3+}) zirkuliert mit dem Blutstrom durch den gesamten Körper. Dabei sind die beiden Fe^{3+} -Bindungsstellen des Transferrins im Plasma nur zu ca. 30% mit Eisen gesättigt, so dass der überwiegende Anteil des Plasmatransferrins nur ein oder gar kein Fe^{3+} (apo-Tf) gebunden hat. Die Aufnahme in die Zellen wird durch rezeptorvermittelte Endozytose durch den Transferrinrezeptor 1 (TfR1) vermittelt (Alvarez *et al.*, 1990; siehe Abbildung 3).

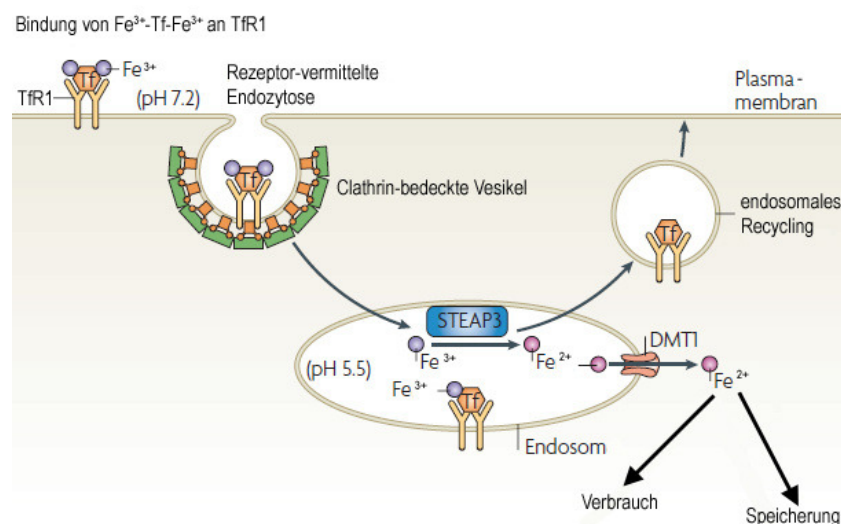


Abbildung 3: Eisenaufnahme über das Tf-TfR1-System über Rezeptorvermittelte Endozytose (modifiziert nach De Domenico *et al.*, 2008).

Infolge der Veränderung des pH-Wertes in den Endosomen (pH 5,5) löst sich die Bindung von Transferrin und Fe^{3+} (Dautry-Varsat *et al.*, 1983). Fe^{3+} wird über die Ferrireduktase STEAP3 zu Fe^{2+} reduziert (Ohgami *et al.*, 2005) und mittels DMT1 aus den Endosomen ins Zytosol transportiert (Fleming *et al.*, 1998). Der Komplex aus apo-Tf und TfR1 kehrt über Exozytose zur Zelloberfläche

zurück und der dort herrschende physiologische pH-Wert führt zu einer Freisetzung von apo-Tf von seinem Rezeptor (Klausner *et al.*, 1983; siehe Abbildung 3).

Bisher sind zwei Arten von Transferrinrezeptoren bekannt, die durch zwei verschiedene autosomale Gene codiert werden, TfR1 und TfR2. Transferrinrezeptoren sind durch Disulfidbrücken verknüpfte homodimere Membranproteine des Typs II (Kawabata *et al.*, 1999; Aisen, 2004). Während TfR1 ubiquitär exprimiert wird (R'zik *et al.*, 2001), ist die Expression von TfR2 ausschließlich auf die Leber und Erythrozyten beschränkt (Deaglio *et al.*, 2002). Die Funktion von TfR2 ist bisher noch weitgehend ungeklärt, allerdings entwickeln Patienten mit Mutationen im *TFR2*-Gen (und *TfR2 knock out* Mäuse) eine Hämochromatose des Typs III (Camaschella *et al.*, 2000a; Fleming *et al.*, 2002). Eine *TfR1*-Defizienz wirkt bei der Maus embryonal letal (Levy *et al.*, 1999).

1.2.3 Der Eisentransporter DMT1

Ursprünglich wurde DMT1 von Fleming *et al.* (1997) in einem Mausmodell für Eisenmangel, der so genannten *mk (mutant microcytic anemia)*-Maus, identifiziert. DMT1 gehört zur Proteinfamilie der Ionenpermeasen NRAMP (*natural resistance-associated macrophage*). Es handelt sich um ein Glykoprotein, das zwölf Transmembrandomänen besitzt und Ionenkanäle bildet (Gruenheid *et al.*, 1995). Unter normalen physiologischen Bedingungen wird DMT1 relativ schwach im Darm exprimiert, bei Eisenmangel hingegen ist die DMT1-Expression im Darm verstärkt (Canonne-Hergaux *et al.*, 1999). Darüber hinaus wird DMT1 unter normalen physiologischen Bedingungen in nahezu allen Körperzellen exprimiert, stärker vor allem in Geweben mit hohem Eisenbedarf wie dem zentralen Nervensystem oder Erythrozytenvorläufern (Anderson und Vulpe, 2009). DMT1 bindet neben Fe^{2+} weitere Metallionen, wie Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} und Mn^{2+} (Gunshin *et al.*, 1997). Während DMT1 sowohl für die intestinale als auch für die Eisenaufnahme in andere Körperzellen essentiell ist, spielt es keine Rolle im plazentaren Eisentransport von Mutter zu Fötus. *Dmt1 knock out* Mäuse sind aufgrund der Beeinträchtigung der intestinalen Eisenaufnahme stark anämisch (Gunshin *et al.*, 2005b). In der Literatur sind bisher keine krankheitsassoziierten Mutationen im humanen *DMT1*-Gen beschrieben.

1.2.4 Zelluläre Eisenspeicherung in Ferritin

Ferritin ist ein intrazellulärer Eisenspeicher. Zytoplasmatisches Ferritin ist ein Heteropolymer bestehend aus 24 Untereinheiten des L-Typs und des H-Typs, die von zwei verschiedenen autosomalen Genen, dem *FTL1 (Ferritin Light chain 1)*- und dem *FTH1 (Ferritin Heavy chain 1)*-Gen codiert werden (Hentze *et al.*, 1986; Santoro *et al.*, 1986). Die Zusammensetzung des Heteropolymers variiert dabei in verschiedenen Organen (Levi *et al.*, 1992). Während in der Leber

und der Milz die L-Kette beim Heteropolymer von zytoplasmatischen Ferritin überwiegt, dominiert im Herzen die H-Kette (Harrison und Arosio, 1996). Die H-Kette besitzt Ferrooxidase-Aktivität und wandelt Fe^{2+} für die Speicherung in Fe^{3+} um (Lawson *et al.*, 1989). Die allgemeine Speicherkapazität von Ferritin umfasst bis zu 4500 Eisenatome (Fischbach und Anderegg, 1965). Der größte Teil des Ferritins ist intrazellulär im Zytoplasma, im Zellkern und in den Mitochondrien lokalisiert. Nukleäres Ferritin besteht hauptsächlich aus H-Ketten, fungiert ebenfalls als Eisenspeicher und schützt den Nukleus vor reaktiven Sauerstoffradikalen (Cai *et al.*, 1998; Arosio und Levi, 2002). Mitochondriales Ferritin (FtMt) ist ein Homopolymer, das von einem intronlosen *FTMT*-Gen codiert wird. FtMt verfügt wie die H-Kette von Ferritin über eine Ferrooxidase-Aktivität. Im Gegensatz zur H- und L-Kette wird mitochondriales Ferritin nicht ubiquitär, sondern spezifisch im Hoden, Herzen, Pankreas und der Niere exprimiert (Levi *et al.*, 2001). Nur ein kleiner Teil des Ferritins liegt als Serum-Ferritin extrazellulär vor. Serum-Ferritin besteht überwiegend aus L-Ketten, ist teilweise glykosyliert und eisenärmer (Harrison und Arosio, 1996). Die Bestimmung der Ferritinkonzentration im Serum wird als klinischer Parameter zur Messung der intrazellulären Eisenspeicherung verwendet.

Mobilisiert wird gespeichertes Eisen durch den proteasomalen (Reinheckel *et al.*, 1998; Mehlhase *et al.*, 2005) und lysosomalen (Ollinger und Roberg, 1997; Larson *et al.*, 2004) Abbau von Ferritin. Auch die Überexpression des Eisenexporters Ferroportin führt zu verstärktem Ferritinabbau und damit zu einer Mobilisierung von gespeichertem Eisen (De Domenico *et al.*, 2006). Die Synthese der H- und L-Ferritinuntereinheiten wird durch IRPs (*Iron Regulatory Proteins*) reguliert, die an die IREs (*Iron Responsive Elements*) der 5'-untranslatierten Region der H- und L-Ferritin mRNAs binden. Mutationen im 5'-IRE des *FTLI*-Gens verursachen beim Menschen das autosomal dominant vererbliche Hyperferritinämie-Katarakt-Syndrom (Camaschella *et al.*, 2000b) und eine erst im erwachsenen Alter auftretende autosomal dominant vererbliche Neurodegeneration wird durch eine C-terminal mutierte L-Kette hervorgerufen (Cozzi *et al.*, 2010). Untersuchungen an *Fth1* (H-Ferritin) *knock out* Mäusen haben gezeigt, dass beide Ferritinuntereinheiten sich funktionell nicht substituieren können. So sterben *Fth1*^{-/-}-Embryonen zwischen dem 3,5 bis 9,5 Tag der Embryogenese (Ferreira *et al.*, 2000).

1.2.5 Der Eisenexporter Ferroportin

Ferroportin (FPN) ist ein Transmembranprotein, das die Zellmembran zwölfmal durchspannt. Bisher ist noch umstritten, ob Ferroportin als Monomer oder Dimer fungiert (Rice *et al.*, 2009). Es wird auf der Oberfläche annähernd aller Zellen exprimiert und ist für den plazentaren Eisentransfer auf den sich entwickelnden Fötus essentiell (Le und Richardson, 2002). Ferroportin ist derzeit der einzig bekannte Eisenexporter, der in Zusammenarbeit mit einer Oxidase, Eisen aus den Zellen in den Blutstrom befördern kann (McKie *et al.*, 2000). Eine FPN1-Defizienz wirkt in konventionellen *knock out*

Mäusen embryonal letal. Konditionelle *Fpn1*^{-/-}-Mäuse hingegen akkumulieren Eisen in Enterozyten, Makrophagen und Hepatozyten (Donovan *et al.*, 2005). Auch beim Menschen sind einige Mutationen im *FPN1*-Gen bekannt, die zu zellulärer Eisenakkumulation bei gleichzeitiger systemischer Anämie führen (Montosi *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2005).

1.3 Regulation des Eisenmetabolismus

Weil sich sowohl eine zu niedrige, als auch eine zu hohe Eisenkonzentration als lebensbedrohlich erweisen kann, bedarf es einer strengen Regulation des Eisenmetabolismus. Bei der Regulation der systemischen Eisenhomöostase spielt das Peptidhormon Heparin als Negativregulator des Eisentransportsystems eine zentrale Rolle. Heparin kontrolliert den zellulären Eisenexport und somit die Plasmaeisenkonzentration durch direkte Bindung an Ferroportin, die eine gemeinsame lysosomale Degradierung auslöst. Durch den Abbau von Ferroportin wird der Export von Eisen aus Enterozyten des Darms (siehe 1.2.1) und anderen Zellen wie z. B. den Hepatozyten als Haupteisenspeicher oder den Eisen-recycelnden Makrophagen blockiert und damit der Eisennachschub sowie dessen Mobilisierung reprimiert (Nemeth *et al.*, 2004; Nemeth und Ganz, 2006). Die Regulation der zellulären Eisenhomöostase wird durch das IRE/IRP-System gewährleistet, die im Folgenden erläutert wird.

1.3.1 Die Regulation der zellulären Eisenhomöostase

Die Regulation der zellulären Eisenhomöostase erfolgt posttranskriptionell über die beiden RNA-bindenden, eisenregulatorischen Proteine, IRP1 und IRP2 (*Iron Regulatory Protein 1 und 2*, IRPs). IRP1 (synonym als ACO1 bezeichnet) und IRP2 (alternativer Name: IREB2) binden bei intrazellulärem Eisenmangel an bestimmte Sequenzmotive, den so genannten IREs (*Iron Responsive Elements*), von Transkripten am Eisenstoffwechsel beteiligter Gene (Klausner *et al.*, 1993). Konventionelle IREs bilden als Sekundärstruktur eine Haarnadelschleife aus, die aus einem sequenzvariablen doppelsträngigen Stamm besteht, der in der Mitte aufgrund eines ungepaarten Cytosins eine Aussparung hat. Die Stränge sind durch eine 6 bp langen Schleife mit der Consensussequenz 5'-CAGUGN-3' verbunden (Hentze *et al.*, 1988). Alternative IREs besitzen eine zusätzliche Basenaussparung im doppelsträngigen Stamm der Haarnadelschleife (z. B. HIF-2 α , DMT1; Hentze *et al.*, 2010). Liegen die IREs in der 5'-untranslatierten Region (UTR) der mRNA, wird durch Bindung der IRPs die Translation inhibiert. Wenn sich die IREs in der 3'-UTR befinden, führt die IRP-Bindung als Schutz vor Degradierung zur Stabilisierung der mRNA und somit zur Translation (siehe Abbildung 4).

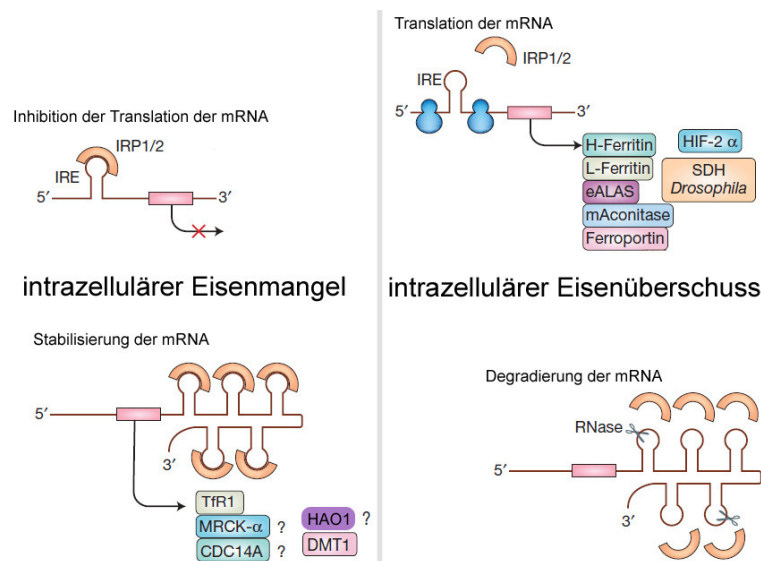


Abbildung 4: Regulation des zellulären Eisenmetabolismus durch IRPs. Je nach Eisenkonzentration und Lage der IREs in der UTR beeinflusst die Bindung der IRPs die Translation und den Abbau der Zieltranskripte. eALAS: erythroide δ -Aminolävulinsäuresynthetase; mAconitase: mitochondriale Aconitase; HIF-2 α : Hypoxie-induzierbarer Faktor 2 α ; SDH: Succinatdehydrogenase; TfR1: Transferrinrezeptor 1; MRCK- α : *myotonic dystrophy-related CDC42 binding protein kinase α* (Synonym: CDC42BP α); CDC14A: *cell division cycle 14 homologue A*; HAO1: *hydroxyacid oxidase* (Glykolat-Oxidase); DMT1: *divalent metal transporter 1* (modifiziert nach Cairo und Recalcati, 2007).

Die Transkripte der L- und H-Ketten von Ferritin (Aziz und Munro, 1987), von Ferroportin (McKie *et al.*, 2000), der erythroiden δ -Aminolävulinsäuresynthetase (eALAS), einem Schlüsselenzym bei der Häm-Synthese (Melefors *et al.*, 1993), der mitochondrialen Aconitase (ACO2), ein am Citratzyklus beteiligtes Enzym (Galy *et al.*, 2008) und des an der intrazellulären Sauerstoffregulation beteiligten Hypoxie-induzierbaren Faktors HIF-2 α (Sanchez *et al.*, 2007) besitzen ein IRE in der 5'-UTR, so dass ihre Translation bei geringer Eisenkonzentration durch die Bindung der IRPs reprimiert wird (Cairo und Recalcati, 2007). Das mitochondriale Ferritintranskript hat keine IREs und wird entsprechend nicht über IRPs reguliert (Levi *et al.*, 2001). Das *TfR1*-Transkript besitzt fünf IREs in der 3'-UTR und wird über eine IRP-Bindung stabilisiert (Müllner *et al.*, 1989). Von den vier bislang bekannten *DMT1*-Transkripten zeigt nur eine Variante – durch eine alternative 3'-Prozessierung – ein IRE in der 3'-UTR (Fleming *et al.*, 1998). Diese IRE-Variante ist bei Mäusen das im Duodenum vorherrschende *Dmt1*-Transkript (Galy *et al.*, 2008). Weitere Transkripte mit IREs in der 3'-UTR sind das von *cdc14A* (Zellzyklus, Sanchez *et al.*, 2006), das der Glykolat-Oxidase (*Hao1*, Kohler *et al.*, 1999) und das der Proteinkinase *cdc42bp α* (Cmejla *et al.*, 2006), deren IRE/IRP-Interaktion konnte jedoch bisher *in vivo* noch nicht nachgewiesen werden.

Bei ausreichendem Eisenangebot und bei Eisenüberladung löst sich IRP von den IREs der *TfR1*-, *DMT1*-, Ferroportin-, Ferritin-, *Aco2*-, *eAlas*- und HIF-2 α -Transkripte. Dies hat eine Destabilisierung und folglich eine Degradierung der *TfR1* und *DMT1*-Transkripte zur Folge, so dass eine weitere Eisenaufnahme blockiert wird. Durch die verstärkte Translation von Ferritin wird überschüssiges Eisen vermehrt intrazellulär gespeichert und durch die verstärkte Ferroportintranslation wird überschüssiges Eisen vermehrt aus den Zellen herausbefördert. Durch die verstärkte Expression von Eisen-verbrauchenden Enzymen bzw. Faktoren wie ACO2, eALAS und HIF-2 α wird überschüssiges Eisen verbraucht (siehe Abbildung 4, rechte Hälfte). Dagegen kommt es bei intrazellulärem Eisenmangel durch eine Bindung der IRPs an die IREs in der 3'-UTR zu einer Stabilisierung der *TfR1*- und *DMT1*-Transkripte, was eine Steigerung der Eisenaufnahme zur Folge hat. Parallel wird durch die Bindung der IRPs an die IREs im 5'-Bereich der Transkripte von Ferritin, Ferroportin, *Aco2*, *eAlas* und HIF-2 α die Translation verhindert, wodurch weniger Eisen in den Zellen gespeichert, von den Zellen verbraucht und aus den Zellen heraustransportiert wird (Cairo und Recalcati, 2007; siehe Abbildung 4, linke Hälfte).

Wird die Regulation der zellulären Eisenhomöostase über das IRE/IRP-System durch Abwesenheit von *Irp2* in genetisch veränderten Mausmodellen unterbunden, werden sowohl die L- als auch die H-Kette von Ferritin in sämtlichen Organen einschließlich der Hoden hochreguliert (LaVaute *et al.*, 2001; Meyron-Holtz *et al.*, 2004a; Ferring-Appel *et al.*, 2009; Leichtmann-Bardoogo *et al.*, 2012). Die Abwesenheit beider IRPs im Darm in konditionellen *Irp1*^{-/-};*Irp2*^{-/-}-Mäusen führt zu einer erhöhten Ferroportin- und m-Aconitaseexpression (Galy *et al.*, 2008). Eine verminderte Expression des TfR1 wird bei *Irp2*-Defizienz in vielen Organen wie dem Darm, der Leber, Milz, Knochenmark und dem Gehirn nachgewiesen (LaVaute *et al.*, 2001; Meyron-Holtz *et al.*, 2004a; Cooperman *et al.*, 2005; Ferring-Appel *et al.*, 2009). DMT1 wird in Abwesenheit beider IRPs im Darm ebenfalls vermindert exprimiert (Galy *et al.*, 2008).

1.4 Eisenregulatorische Proteine: IRP1 und IRP2

IRP1 homologe Gene wurden bislang im Genom von einigen Insekten wie *Drosophila melanogaster*, Nematoden wie *Chaenorhabditis elegans*, dem Zebrafisch und in Säugetieren identifiziert, während *IRP2* orthologe Gene bisher nur bei Säugern nachgewiesen wurden (Recalcati *et al.*, 2010). Die von ihnen ubiquitär exprimierten zytosolischen mRNA-Bindungsproteine IRP1 und IRP2 fungieren in Säugerzellen als "zytosolische Eisensensoren". Das Expressionslevel von IRP1 ist in vielen Zellen und Organen stärker als das von IRP2. Deshalb wurde zunächst angenommen, dass IRP1 als Hauptregulator der posttranskriptionellen Eisenregulation auf zellulärer Ebene fungiert (Patino und Walden, 1992; Henderson *et al.*, 1993; La Vaute *et al.*, 2001). Meyron-Holtz *et al.* (2004a) konnten

jedoch *in vivo* bei der Maus zeigen, dass IRP2 als Hauptregulator der intrazellulären Eisenhomöostase wirkt, während IRP1 eher eine untergeordnete Rolle spielt. Die IRPs gehören zur Aconitase-Genfamilie (Rouault *et al.*, 1991), allerdings agiert nur IRP1 durch den Besitz von vier Eisenschwefelclustern als funktionelle zytosolische Aconitase, die Citrat in Isocitrat umwandelt. Im Gegensatz dazu hat IRP2 im Verlaufe der Evolution offenbar seine Aconitasefunktion verloren (Guo *et al.*, 1994). Während unter normalen physiologischen Bedingungen IRP1 hauptsächlich in seiner Aconitaseform (holo-IRP1) vorliegt, disassemblieren bei geringer Eisenkonzentration die Eisenschwefelcluster, was zur Folge hat, dass IRP1 (apo-IRP1) verstärkt an IREs bindet (Haile *et al.*, 1992). Folglich könnten IRP1 und IRP2 *in vivo* unter bestimmten Bedingungen redundante Funktionen bei der Regulation der intrazellulären Eisenhomöostase übernehmen (La Vaute *et al.*, 2001; Meyron-Holtz *et al.*, 2004a; Galy *et al.*, 2008). Bei hoher Eisenkonzentration führt eine Interaktion von FBXL5 (*F-box and Leucine-rich repeat Protein 5*) mit IRP2 zu dessen Ubiquitinierung und folgender proteasomaler Degradierung (Salahudeen *et al.*, 2009; Vashisht *et al.*, 2009; Moroishi *et al.*, 2011). Geringe Sauerstoffkonzentrationen, wie sie auch unter physiologischen Bedingungen vorliegen, fördern die Aconitasefunktion von IRP1, während IRP2 stabilisiert wird (Meyron-Holtz *et al.*, 2004b). Da sich eine Defizienz beider IRPs (*Irp1*^{-/-};*Irp2*^{-/-}) bei der Maus embryonal letal auswirkt (Smith *et al.*, 2006; Galy *et al.*, 2008) und ein auf den Darm beschränkter konditioneller muriner *knout out* beider *Irp*-Gene zu einer erhöhten Sterblichkeit führt (Galy *et al.*, 2008), scheint die Regulation der intestinalen Eisenabsorption über das IRE/IRP-System für den Organismus essentiell zu sein.

1.4.1 Die verwendeten Mausmodelle

Im Rahmen dieser Arbeit wurden *Irp1* und *Irp2* *knock out* Mäuse eingesetzt, um die Bedeutung von IRP2 für die Spermatogenese und die testikuläre Eisenhomöostase zu analysieren. Beide *Irp*-Mausmodelle wurden bereits in Zusammenhang mit Störungen bzw. Misregulationen des Eisenstoffwechsels in der intestinalen Eisenabsorption, in der Erythropoese, in einigen Organen wie Leber, Milz, Knochenmark, Niere, aber vor allem im neuronalen System beschrieben (Meyron-Holtz *et al.*, 2004a; Smith *et al.*, 2004; Cooperman *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005; Magaki *et al.*, 2007; Ghosh *et al.*, 2008; Jeong *et al.*, 2011). *Irp2*^{-/-}-Mäuse sind anämisch, akkumulieren Eisen in der Darmschleimhaut, in der Leber und dem zentralen Nervensystem und zeigen eine Misregulation der IRP2-regulierten Proteine, wie Ferritin, Tfr1, Ferroportin und DMT1. Ab einem Alter von ca. sechs Monaten manifestiert sich eine progressive Neurodegeneration einhergehend mit Störungen der Bewegungskoordination und Tremor (LaVaute *et al.*, 2001; Meyron-Holtz *et al.*, 2004a). Dagegen sind *Irp1*^{-/-}-Mäuse phänotypisch unauffällig (Meyron-Holtz *et al.*, 2004a). Zusätzlich wurden Mäuse generiert, die heterozygot für *Irp1* und gleichzeitig homozygot für *Irp2* waren, da homozygote

Doppelmutanten von *Irp1* und *Irp2* vor der Implantation der Embryonen in der Uterusschleimhaut absterben (Smith *et al.*, 2006). *Irp1^{+/-};Irp2^{-/-}*-Mäuse entsprechen einem stärker ausgeprägten *Irp2^{-/-}*-Phänotyp. So wird die progressive Neurodegeneration postnatal bereits ab vier Monaten ausgebildet (Smith *et al.*, 2004; Cooperman *et al.*, 2005).

1.4.1.1 *Irp1* knock out Mäuse

In diesem Mausmodell wurde die Funktion von IRP1 vollständig durch die Integration eines Neomycinresistenzgens mittels homologer Rekombination in Exon 13 des *Irp1*-Gens zerstört (siehe Abbildung 5). In *Irp1^{-/-}*-Mäusen konnte mittels Western Blot-Analysen kein IRP1 mehr nachgewiesen werden. Das bedeutet einen kompletten Verlust der Aconitasefunktionen als auch der IRE-Bindungsaktivität von IRP1 (Meyron-Holtz *et al.*, 2004a).

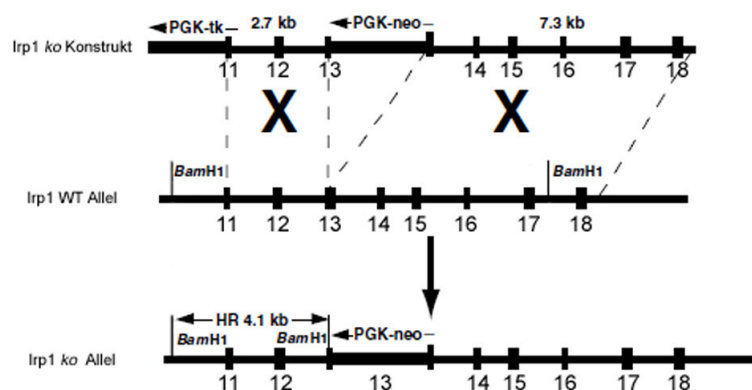


Abbildung 5: Strategie zur Inaktivierung des *Irp1*-Gens der Maus. Die Darstellung zeigt schematisch das Ergebnis der homologen Rekombination (X) zur Integration des Neomycinresistenzgens in Exon 13. Oben ist der *Targeting*-Vektor dargestellt, in der Mitte befindet sich ein Ausschnitt des Wildtypallels (Exon 11-18, als schwarze Kästchen) und unten ist das rekombinante Allel mit dem integrierten Neomycinresistenzgen abgebildet (modifiziert nach Meyron-Holtz *et al.*, 2004a).

1.4.1.2 *Irp2* knock out Mäuse

Für die Generierung von *Irp2^{-/-}*-Mäusen wurden die Exons 3 und 4 teilweise durch ein Neomycinresistenzgen, das durch homologe Rekombination integriert wurde, ersetzt (siehe Abbildung 6). In diesem Mausmodell sind keine *Irp2*-Transkripte mehr detektierbar. Somit besteht ein kompletter Verlust der IRP2-Aktivität (LaVaute *et al.*, 2001).

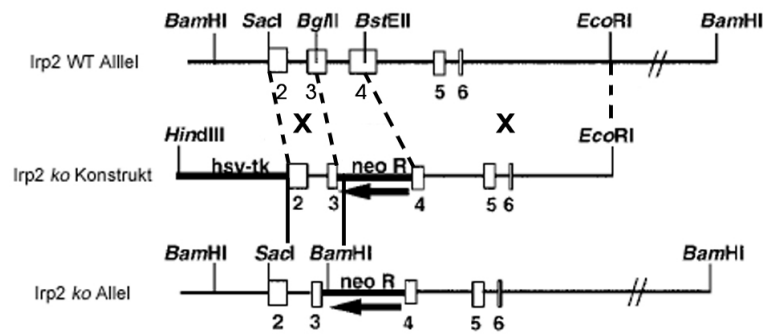


Abbildung 6: Strategie zur Inaktivierung des *Irp2*-Gens in der Maus. Durch die Integration des Neomycinresistenzgens mittels homologer Rekombination (X) wurden Exon 3 und 4 (jeweils als Kästchen angedeutet) teilweise deletiert. Oben ist ein Ausschnitt des Wildtypallels dargestellt, in der Mitte das *Targeting*-Konstrukt und unten wird das rekombinante *Irp2*-Allel gezeigt (modifiziert nach LaVaute *et al.*, 2001).

1.5 Aufbau und Funktion des Hodens und des Nebenhodens

Der Hoden (*Testis*) ist ein paariges Organ und wird von einer undehnbaren Bindegewebskapsel, der *Tunica albuginea*, umgeben. Ein Hoden beinhaltet eine Vielzahl von Hodenläppchen, die *Lobuli testis*, die voneinander durch bindegewebige Scheidewände, die *Septula testis*, begrenzt sind. In den *Lobuli testis* befinden sich stark gewundene Samenkanälchen, die *Tubuli seminiferi*, die in das *Rete testis*, einem komplexen Kanalsystem, münden. Das *Rete testis* ist über die *Ductuli efferentes* mit dem Nebenhoden (*Epididymis*) und damit mit den ableitenden Samenwegen (*Vas deferentia*) verbunden (siehe Abbildung 7).

Das Tubulussystem des Hodens ist durch die *Lamina propria*, einer Basalmembran aus einer Kollagenfaserschicht und peritubulären Myoidzellen vom Interstitium – also den Raum zwischen den *Tubuli seminiferi* – getrennt. Das Interstitium besteht neben Bindegewebe, Blut- und Lymphgefäßen aus Leydigzellen und immunreaktiven Zellen wie dendritische Zellen, Mastzellen und Makrophagen. Das Keimepithel der *Tubuli seminiferi* besteht aus Keim- und Sertolizellen. Die Sertolizellen durchziehen das gesamte Keimepithel bis zum Lumen und umgeben mit ihren charakteristischen zytoplasmatischen Fortsätzen die Keimzellen (Herms *et al.*, 2010). Sie besitzen eine Stützfunktion für die Keimzellen und versorgen diese mit den benötigten Nährstoffen und Hormonen. Außerdem phagozytieren die Sertolizellen degenerierte Keimzellen und Residualkörper, die bei der Spermienbildung entstehen (Beardsley und O'Donnell, 2003). Die zytoplasmatischen Zellfortsätze der Sertolizellen sind über *tight junctions* mit benachbarten Sertolizellen verbunden und bilden so die Blut-Hoden-Schranke. Durch die Blut-Hoden-Schranke wird das Keimepithel in ein basales und ein adluminales Kompartiment unterteilt (Dym und Fawcett, 1970; Pelletier und Byers, 1992). Im basalen Kompartiment befinden sich Spermatogonien und preleptotäne Spermatozyten (Lie *et al.*, 2009),

während im adluminalen Bereich weiter ausdifferenzierte Keimzellen angesiedelt sind. Die Blut-Hoden-Schranke ist für die meisten Partikel und Moleküle einschließlich Eiweiße undurchlässig und schützt so das reproduktive System vor Pathogenen, Mutagenen und der körpereigenen Immunabwehr sowie Metabolit- und Elektrolytungleichgewichten (Cheng und Mruk, 2009).

Die vom Hoden ausgehenden *Ductuli efferentes* setzen sich im Nebenhoden in einer einzelnen stark gewundenen Röhre einer Länge von einem Meter in der Maus (Takano *et al.*, 1981) und drei bis sechs Metern beim Menschen fort (von Lanz und Neuhauser, 1964). Der Nebenhoden kann anatomisch in vier Regionen gegliedert werden: dem initialen Segment, dem Nebenhodenkopf (*Caput epididymis*), dem Nebenhodenkörper (*Corpus epididymis*) und dem Nebenhodenschwanz (*Cauda epididymis*; (siehe Abbildung 7). Diese Bereiche können in Abhängigkeit von den dort ansässigen Zelltypen und in Abhängigkeit von der Spezies in weitere Bereiche unterteilt werden (Abe *et al.*, 1984; Robaire *et al.*, 2006). Die epididymalen Epithelzellen bilden so wie die Sertolizellen im Hoden über *tight junctions* eine Blut-Nebenhoden-Schranke aus, so dass die Spermien vor einem unkontrollierten Stoffaustausch geschützt sind. Die Blut-Nebenhoden-Schranke ist jedoch nicht so undurchlässig wie die Blut-Hoden-Schranke (Hinton und Palladino, 1995; Cyr *et al.*, 2007).

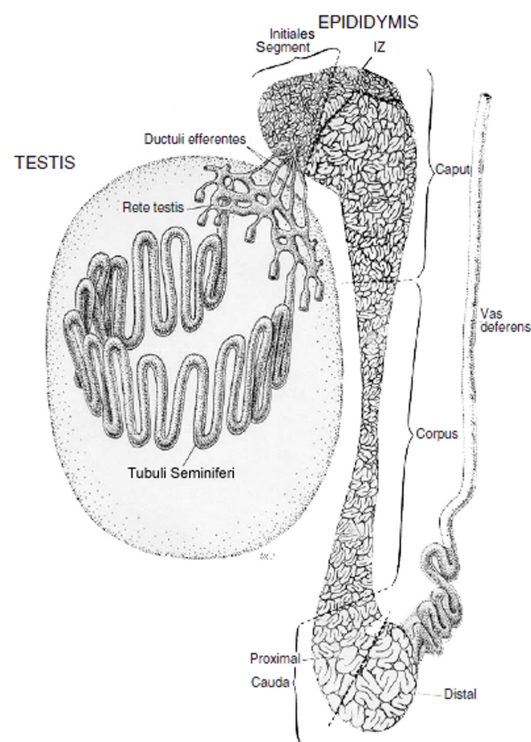


Abbildung 7: Schematischer Aufbau des männlichen Reproduktionssystems: Der Hoden enthält die *Tubuli seminiferi*, das *Rete testis* und die *Ductuli efferentes*. Der Nebenhoden (*Epididymis*) kann in folgende Segmente gegliedert werden: initiales Segment, intermediäre Zone (IZ), *Caput*, *Corpus*, proximale und distale *Cauda* und *Vas deferens* (modifiziert nach Robaire und Hermo, 1988).

Der Hoden fungiert als Bildungsorgan für die Spermien (Spermatogenese) und dient u. a. der Testosteron- und Dihydrotestosteronsynthese in den interstitiellen Leydigzellen (Christensen, 1975). Der Nebenhoden dient der Konzentrierung, dem Transport, der endgültigen Reifung und der Speicherung der Spermien (Orgebin-Crist, 1967, 1969; Bedford, 1975; Turner, 1995). Die Spermatogenese sowie die Funktionen des Nebenhodens werden im Folgenden genauer erörtert.

1.5.1 Die Spermatogenese der Maus

Die Spermatogenese findet im Keimepithel der *Tubuli seminiferi* statt und dauert bei der Maus ca. 35 Tage. Sie ist ein kontinuierlicher Prozess, der in Wellen abläuft, so dass die reiferen Keimzellen sich weiter von der Basalmembran entfernen. Durch die räumlich und zeitlich organisierten Prozesse der Spermatogenese entstehen im Keimepithel der *Tubuli seminiferi* wiederkehrende Muster verschiedener Keimzellpopulationen, die als Stadien des Spermatogenesezyklus bezeichnet werden. Bei der Maus existieren zwölf solcher Spermatogenesestadien (durch römische Ziffern gekennzeichnet) und 16 Spermatidenstadien (durch arabische Ziffern gekennzeichnet; Oakberg 1956, 1957). Die Spermatogenese bei verschiedenen Säugetieren verläuft sehr ähnlich und unterscheidet sich hauptsächlich in der Anzahl der Spermatogenesestadien (Russel *et al.*, 1990). Ein Spermatogenesezyklus lässt sich funktionell in drei verschiedene Phasen einteilen (siehe Abbildung 8):

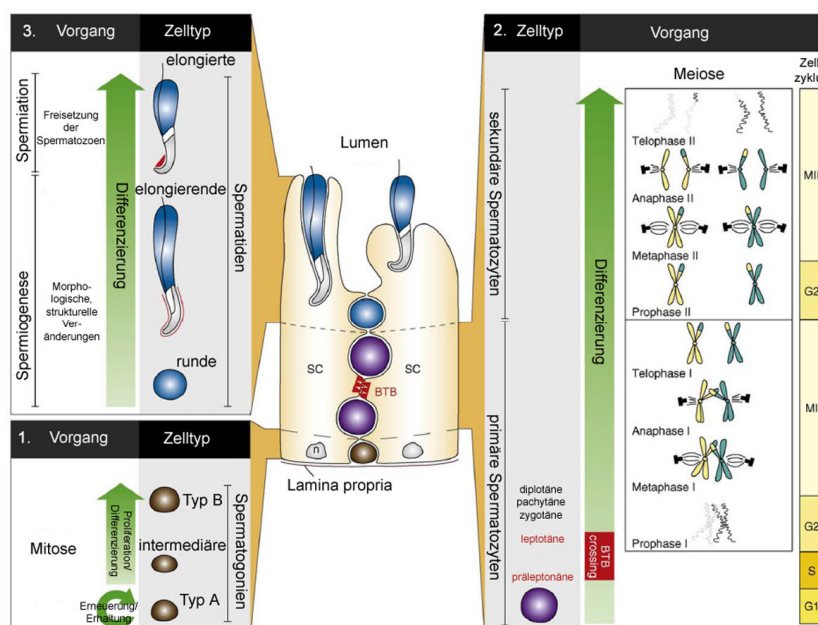


Abbildung 8: Die Phasen der Spermatogenese. Im mittleren Bereich ist ein schematischer Ausschnitt eines *Tubulus seminiferus* mit zwei Sertolizellen (SC; n: Sertolizellkerne) und sechs Keimzellen verschiedener Stadien dargestellt. Die Blut-Hoden-Schranke (BTB) unterteilt das Keimepithel in ein basales (unten) und adluminales (oben) Kompartiment. Die erste Phase der Spermatogenese beginnt an der Basalmembran (*Lamina propria*) mit den Teilungs- und Differenzierungsprozessen der Spermatogonien (1.). Darauf folgen die beiden meiotischen Reifeteilungen der Spermatozyten (2.), in deren Verlauf die preleptotänen/leptotänen

Spermatozyten die Blut-Hoden-Schranke passieren. Im letzten Schritt (3.) werden die runden Spermatiden morphologisch zu testikulären Spermatozoen umgestaltet (Spermiogenese) und ins Lumen entlassen (Spermiation; modifiziert nach Lie *et al.*, 2009).

1. Die mitotische Proliferationsphase und Differenzierung der Spermatogonien,
2. die Meiose mit der ersten und zweiten Reifeteilung, in der das genetische Material der primären Spermatozyten rekombiniert und halbiert wird,
3. die Spermiogenese, in der die runden Spermatiden morphologisch zu elongierten Spermatiden umgestaltet werden.

Es existieren drei verschiedene undifferenzierte proliferative Typ A-Spermatogonien, nämlich eine Stammzellpopulation ($A_s = \text{single}$) sowie undifferenzierte Spermatogonien ($A_{pr} = \text{paired}$ und $A_{al} = \text{aligned}$) und sich differenzierende proliferative Spermatogonien, die über mehrere mitotische Teilungen (A_1, A_2, A_3, A_4 , intermediäre Spermatogonien) letztlich Typ B-Spermatogonien generieren (Huckins, 1971a, b, c). Die mitotische Proliferations- und Differenzierungsphase der Spermatogonien vollzieht sich im basalen Kompartiment des Keimepithels. Der letzte Schritt der proliferativen Phase resultiert in jeweils zwei preleptotäne Spermatozyten, die in die Prophase der Meiose I eintreten. Nachfolgend durchlaufen die primären Spermatozyten mit zunehmender Entfernung von dem basalen Kompartiment das leptotäne, zygotäne, pachytäne und diplotäne Stadium der Prophase I (Russel, 1977). An die relative lang andauernde Prophase I schließen sich Metaphase, Anaphase und Telophase an, wodurch die erste meiotische Teilung abgeschlossen wird. Die daraus hervorgegangenen sekundären Spermatozyten sind kurzlebig und generieren über die zweite meiotische Teilung (Meiose II) jeweils vier haploide runde Spermatiden. Während dieser Prozesse stehen alle Keimzellen durch zytoplasmatische Brücken miteinander in Kontakt, so dass die Synchronisation der Spermatogenese garantiert ist (Dym und Fawcett, 1971; Huckins und Oakberg, 1978; Weber und Russel, 1987). In der letzten Phase erfolgt die Bildung der Spermien (Spermiogenese) durch komplexe morphologische Veränderungen. Diese Differenzierungsvorgänge beinhalten die Elongation und Kondensation des Zellkerns, die Entwicklung des Akrosoms, die Ausbildung des Flagellums und die Abstoßung großer Zytoplasmateile, die so genannten Residualkörper, die von den Sertolizellen phagozytiert werden. Die Spermatogenese endet, wenn die testikulären Spermatozoen aus dem Verband des Keimepithels durch peristaltische Kontraktionen der Tubuluswände in das Lumen abgegeben werden (Russel *et al.*, 1990).

1.5.2 Reifung und Speicherung der Spermien im Nebenhoden

Vom Hodenlumen aus werden die Spermien zusammen mit den testikulären Sekreten in den Nebenhoden transportiert. Für die epididymale Reifung der testikulären Spermatozoen wird beim Menschen nur 2-6 Tage benötigt (Amann und Howards, 1980). Zudem ist der humane Nebenhoden anders als bei den meisten Säugetieren aufgebaut. Er besteht hauptsächlich aus einem Kopfsegment

(Yeung *et al.*, 1991), während das Schwanzsegment und somit die Speicherstätte der Spermien fehlt (Bedford, 1994).

Die testikulären Spermatozoen der meisten Säugetiere sind weder befruchtungsfähig noch motil (Young, 1929, 1931; Blandau und Rumery, 1964). Diese Fähigkeiten erlangen sie durch eine Reihe von Modifikationen im Verlaufe ihrer Passage durch den Nebenhoden (Bedford 1975; Orgebin-Crist, 1967, 1969; Lakoski *et al.*, 1988), die bei den meisten Säugetieren 10-13 Tage dauert (Robaire und Hermo, 1988). Der Transport der Spermien durch den Nebenhoden geschieht passiv und erfolgt durch peristaltische Kontraktionen des Nebenhodenepithels (Robaire und Hermo, 1988) und durch einen wachsenden hydrostatischen Gradienten vom Hoden bis zum Nebenhodenschwanz (Johnson und Howards, 1975). Während ihrer Reifung erfahren die Spermatozoen neben verschiedenen morphologischen Veränderungen (Robaire *et al.*, 2006) und biochemischen Modifikationen (Sullivan *et al.*, 2007) auch Motilitätsveränderungen. Erst wenn die Spermatozoen den Nebenhodenschwanz erreicht haben, sind sie befruchtungsfähig und besitzen eine progressive Motilität (Orgebin-Crist, 1969; Robaire und Hermo, 1988).

Im distalen Segment des Nebenhodenschwanzes können die reifen Spermatozoen über einen längeren Zeitraum gespeichert werden (Setchell *et al.*, 1993; Robaire *et al.*, 2006). Das luminale Milieu des Nebenhodenschwanzes sorgt dafür, dass die Spermien während der Speicherung lebensfähig bleiben. Durch die dort herrschende niedrigere Temperatur (Brooks, 1973) wird der Stoffwechsel der Spermien auf ein Drittel bis zu ein Fünftel reduziert (Jones und Murdoch, 1996). Die Speicherung der Spermien im Nebenhoden gewährleistet eine kontinuierlich ablaufende Spermatogenese und garantiert auch bei erhöhter Ejakulatfrequenz, dass immer reife Spermien vorhanden sind (Jones, 1999). Bei einer Ejakulation werden Spermien verschiedener Generationen aus dem Nebenhodenschwanz befördert (Orgebin-Crist, 1965). So reagieren die Spermatozoen eines Ejakulats nicht synchron, sondern variieren zeitlich bei der Kapazitation und Akrosomreaktion (Jones, 1999). Dies trägt zu einer erhöhten Befruchtungswahrscheinlichkeit bei. Bei längerer sexueller Inaktivität wird der Nebenhodenspeicher geleert, indem die Spermien mit dem Urin ausgeschieden werden (Lino *et al.*, 1967; Tischner, 1971; Barrat und Crooke, 1988). Defekte Spermien werden gezielt durch den programmierten Zelltod degradiert (Sutovsky *et al.*, 1999, 2001) und in geringem Umfang auch von epididymalen Epithelzellen phagozytiert (Amann und Lambiase, 1974; Holtz und Smidt, 1976).

1.5.3 Aufbau und Motilität der Spermien

Das Spermatozoon besteht aus einem Kopf und einem Schwanz (Flagellum). Die gesamte Zelloberfläche wird von der Plasmamembran bedeckt. Der Kopf ist fast komplett mit dem Zellkern ausgefüllt, weiter anterior liegt zudem das Akrosom, das die hydrolysierenden Enzyme enthält, um die *Zona pellucida* der Eizelle zu durchdringen (Austin, 1967). Das Flagellum kann in drei Regionen

gegliedert werden (siehe Abbildung 9): Mittelstück (Mitochondrienscheide, A), Hauptstück (Mantelfasern, B) und Endstück (C). Zudem gibt es noch die Halsregion, die Kopf und Schwanz miteinander verbindet und die proximale und distale Zentriole enthält. Aus der distalen Zentriole formt sich im Mittelstück das zentrale Axonema (Fawcett, 1975; Hermo *et al.*, 2010). Das zentrale Axonema durchzieht das komplette Flagellum und besteht aus der für Geißeln charakteristischen 9x2+2-Mikrotubulstruktur (siehe Abbildung 9A und B). Dabei sind neun Doppeltubuli – jeweils bestehend aus α - und β -Tubulin – kreisförmig um zwei zentrale Mikrotubuli angeordnet und über Radialspeichen verbunden. An den α -Tubulinen befinden sich die Dyneinarme, die unter ATP-Verbrauch die benachbarten Doppelmikrotubuli gegeneinander verschieben, so dass eine Gleitbewegung entsteht, die zur Schlagbewegung des Flagellums und damit zur Bewegung des Spermiums führt (Gibbons und Rowe, 1965; Fawcett 1975; Brokaw, 1991). Die Mikrotubuli sind von neun äußeren Längsfasern umschlossen.

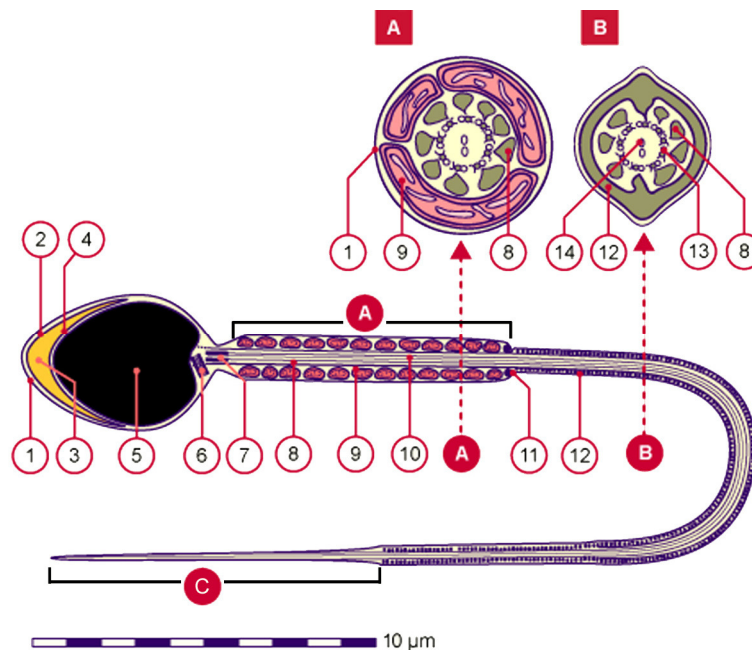


Abbildung 9: Schematischer Aufbau eines Spermatozoons. Längsschnitt durch ein Spermatozoon (unten): Mittelstück (A), Hauptteil (B) und Endstück (C); 1: Plasmamembran, 2: äußere akrosomale Membran, 3: Akrosom, 4: innere akrosomale Membran, 5: Zellkern 6: proximales Zentriol in der Halsregion 7: distales Zentriol der Halsregion, 8: dichte äußere Längsfasern (neun im Mittelstück A und sieben im Hauptteil B), 9: Mitochondrien, 10: Axonema, 11: Annulus, 12: Mantelfasern. Oben in der Abbildung sind Querschnitte durch das Mittelstück (A) und den Hauptteil (B), wobei die 9x2+2 Mikrotubulstruktur zu erkennen ist. 13: insgesamt neun periphere Doppeltubuli aus runden α - und c-förmigen β -Tubulinen, 14: zwei zentrale Einzeltubuli (modifiziert nach www.embryology.ch/allemand/cgametogen/popupgametogen/03spermato/spermatomehr.html).

Das Mittelstück enthält neben dem Axonema auch die Mitochondrien zur ATP-Herstellung für die Flagellenschläge (Storey und Kayne, 1980; Yeung *et al.*, 1996), die ringförmig um die neun äußeren Längsfasern angeordnet sind. Der Hauptteil besteht aus dem Axonema und den sieben äußeren Längsfasern, die in diesem Teil von einer Mantelfaserscheide umgeben werden. Die Mantelfaserscheide enthält an der Glykolyse beteiligte Enzyme, die zusätzlich zur Energieproduktion für die Spermienbewegung beitragen (Travis *et al.*, 2001; Narisawa *et al.*, 2002; Miki *et al.*, 2004; Krisfalusi *et al.*, 2006). Das Endstück besteht nur noch aus dem Axonema.

Während der Passage durch den Nebenhoden akquirieren die Spermien auch ihre Fähigkeit zur Motilität, wobei ihr Bewegungsmuster heranreift. Sobald die Spermien bei der Ejakulation aus dem Nebenhodenschwanz entlassen werden, beginnen sie zu schwimmen, d. h. sie sind aktiviert. Aktivierte Spermien zeigen einen symmetrischen sinusartigen Flagellenschlag mit relativ niedriger konstanter Amplitude, woraus eine lineare, progressive Fortbewegung resultiert (Suarez, 2008). Aufgrund dieser Motilität können die Spermien durch den weiblichen Reproduktionstrakt zum Eileiter schwimmen. Im Eileiter verändert sich infolge der Kapazitation (Erreichen der kompletten Fertilisationsfähigkeit) ihr Bewegungsmuster. Die Amplitude der Flagellenschläge wird erhöht und unregelmäßig; diese Spermienmotilität wird als Hyperaktivierung bezeichnet. Hyperaktivierung führt zu zirkulären Schwimmbahnen und damit zu einer weniger progressiven Bewegung (Cooper, 1984; Suarez und Osman, 1987; Ishijima *et al.*, 2002; Suarez, 2008). Diese energetisch aufwendigere Motilität (Burkman, 1984; Ho und Suarez, 2003) verhindert, dass die Spermien in den Krypten der Epithelzellen des Eileiters versinken (Demott und Suarez, 1992). Eine Hyperaktivierung der Spermien erhöht auch die Wahrscheinlichkeit einer Befruchtung, da hyperaktivierte Spermien eher eine Eizelle treffen (Katz *et al.*, 1978) und leichter die Kumuluszellen und die *Zona pellucida* zu durchdringen vermögen (Suarez *et al.*, 1991; Stauss *et al.*, 1995).

Es gibt computerunterstützte Spermienanalyseprogramme (CASA) zur Erfassung der Motilität vieler Spermien gleichzeitig. Dabei wird die Spermienbewegung durch vereinfachte kinetische Parameter beschrieben (siehe Abbildung 10).

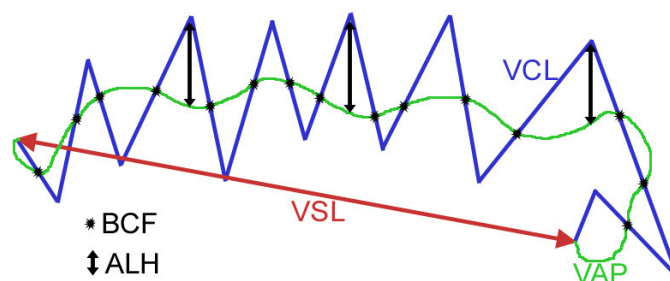


Abbildung 10: Kinetische Parameter der Spermienmotilität. VAP: velocity average path; VSL: velocity straight line; VCL: velocity curved line; BCF: beat cross frequency; ALH: amplitude of lateral head displacement.

Zur Erfassung der linearen progressiven Bewegung dienen dabei die Weggeschwindigkeit VAP (*velocity average path*) und die progressive Geschwindigkeit VSL (*velocity straight line*), wobei entlang der Schwimmbahn ausgehend vom Start- und Endpunkt (VSL) bei der VAP die lateralen Bewegungen des Spermienkopfes eliminiert werden (Tessler und Olds-Clarke, 1985). Die Bahngeschwindigkeit oder kurvenlineare Geschwindigkeit VCL (*velocity curved line*) berücksichtigt weniger linear-progressive Schwimmbahnen der Spermien. Sie ist abhängig von der flagellaren Schlagfrequenz BCF (*beat cross frequency*) und der Schlagamplitude. Die Amplitude des seitlichen Kopfausschlages ALH (*amplitude of lateral head displacement*) ist dabei die indirekte Messung der Größe der flagellaren Schlagamplitude, da sich je nach Schlagkraft des Schwanzes auch der Spermienkopf entsprechend zu Seite neigt (Suarez, 2008).

1.5.4 Zytologische Modifikationen während der Spermatogenese: Änderungen der Mitochondrienmorphologie

Die Mitochondrien sind die Produktionsstätten von ATP durch respiratorische Oxidation (Atmungskette). Sie sind von einer äußeren und inneren Membran umschlossen. Die innere Membran verläuft als innere Grenzmembran parallel zur äußeren Membran und bildet gleichzeitig Falten ins Innere des Mitochondriums, die *Cristae mitochondriales*, wodurch die Membranoberfläche der Mitochondrien erheblich vergrößert wird. Auf der inneren Membran befinden sich die Enzyme der Atmungskette. Der Raum zwischen äußerer und innerer Membran wird als Intermembranraum, der von der inneren Membran begrenzte Raum mit den Cristae als Matrix bezeichnet (Palade, 1953; Sjostrand, 1953).

Die Mitochondrien von Spermatozoen unterscheiden sich von somatischen in zweierlei Hinsicht: Sie sind innerhalb des Spermatozoons ausschließlich auf das Mittelstück beschränkt, in dem sie eng miteinander assoziiert vorliegen (Ursini *et al.*, 1999) und besitzen spermienspezifische Isoformen von Enzymen (Blanco und Zinkham, 1963; Goldberg, 1963, *et al.*, 1977; Hess *et al.*, 1993; Burgos *et al.*, 1995; Travis *et al.*, 1998; Hüttemann *et al.*, 2003).

Während der Spermatogenese unterliegen die Mitochondrien einigen morphologischen Modifikationen, sie verändern ihre zelluläre Lokalisation und ihre Anzahl pro Keimzelle steigt. Morphologisch werden die orthodoxen Mitochondrien (siehe Abbildung 11A) schrittweise über kondensierte (siehe Abbildung 11B) und intermediäre Formen zu einer untypisch kondensierten Form umgestaltet (Hackenbrock, 1966, 1968; De Martino *et al.*, 1979). Orthodoxe Mitochondrien testikulärer Keimzellen erscheinen elektronenmikroskopisch eiförmig mit lamellenförmigen Cristae und besitzen ein ausgedehntes Matrixvolumen, wohingegen kondensierte Mitochondrien ausgedehnte Intermembranräume und eine geschrumpfte Matrix aufweisen, was – visuell betrachtet – einem Vakuolisierungs-ähnlichen Erscheinungsbild entspricht (de Kretser *et al.*, 1998). Die intermediären

Mitochondrien stellen ein Zwischenstadium aus beiden Morphologieformen dar, ähneln aber mehr dem orthodoxen Typ. Diese morphologischen Änderungen können durch eine verminderte oxidative Respiration, hervorgerufen durch einen Abfall der Sauerstoffkonzentration, durch einen Anstieg der intrazellulären ADP-Konzentration oder durch Inhibition der Glykolyse, ausgelöst werden (Meinhardt *et al.*, 1999).

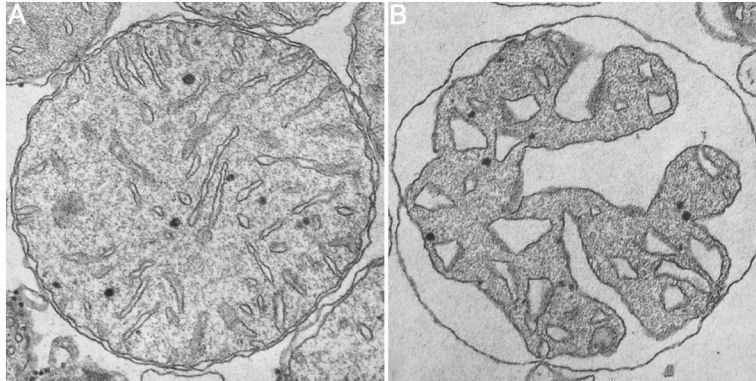


Abbildung 11: Mitochondriale Konformationen aus Rattenleber isolierter Mitochondrien. Für die native orthodoxe Konformation (A) ist eine ordentliche Faltung der inneren Cristaemembran sowie ein ausgedehntes Matrixvolumen charakteristisch, während die kondensierte Konformation (B) unregelmäßig ausgebildete Cristae und ein geringes Matrixvolumen mit einem großen Intermembranraum zeigt (modifiziert nach Hackenbrock, 1968).

Typ A-Spermatogonien besitzen orthodoxe Mitochondrien. Bereits in Typ B-Spermatogonien beginnt sich die Mitochondrienstruktur zu verändern. Im Verlaufe der fortschreitenden Differenzierung nehmen die Mitochondrien nach und nach ihre kondensierte Form ein. In frühen pachytänen Spermatozyten liegt die Überzahl der Mitochondrien in der kondensierten Konformation vor. Die Mitochondrien sind nun um die äussere Kernmembran angeordnet, elongieren und sind sehr teilungsaktiv. Diese Phase gilt auch als aktives funktionelles Stadium (De Martino *et al.*, 1974, 1979). In späten pachytänen Spermatozyten liegen die Mitochondrien dann überwiegend in Gruppen zusammen im Zytoplasma verteilt. Diese mitochondrialen Aggregate bestehen aus runden Mitochondrien und ihre Matrix wird durch die Ausdehnung des Intermembranraums an die äußere Membran gedrückt. Dieses letzte Stadium der Mitochondrienverdichtung wird als kondensierte Form bezeichnet (De Martino *et al.*, 1979). Der funktionelle Status dieser Mitochondrienform ist jedoch unklar. Aufgrund der Lokalisation der Zellen im adluminalen Kompartiment wird durch die Blut-Hoden-Schranke verhindert, dass diese mit energiereichen Substraten (z. B. Glukose) aus dem Blutstrom versorgt werden. Stattdessen erhalten sie energieärmere Substrate (z. B. Laktat) von den Sertolizellen, die weniger Energie liefern. Erwartungsgemäß würde dies zu einer Erniedrigung der mitochondrialen Respiration und damit letztendlich zu einer reduzierten ATP-Syntheserate führen (Meinhardt *et al.*, 1999). Mitochondrien, die aus pachytänen Spermatozyten isoliert wurden, besaßen jedoch unter normalen Sauerstoffbedingungen und bei hohen ADP-Konzentrationen eine hohe ATP-

Syntheserate. Folglich kann eine normale oxidative Phosphorylierung auch mit weniger energiereichen Substraten ablaufen (De Martino *et al.*, 1979).

In den weiteren Keimzellstadien (diplotäne primäre und sekundäre Spermatozyten) sind die meisten der kondensierten Mitochondrien wieder vereinzelt im Zytoplasma nahe der Plasmamembran anzutreffen, einige elongierte Mitochondrien befinden sich tiefer im Inneren der Zellen und sind weiterhin teilungsaktiv. Während der Spermiogenese beginnt sich in Spermatiden der Stadien 8-10 die kondensierte Konformation zu verändern. Die Cristae erscheinen halbmondförmig und die Matrix dehnt sich etwas aus (intermediäre Konformation). Einige dieser Mitochondrien wandern zum Flagellum, während andere sich gruppieren und in den abgeschnürten Residualkörpern zurückbleiben. Im Flagellum reduziert sich der Intermembranraum weiter, die Cristae dehnen sich wieder ins Innere aus und formen schließlich ein dicht gepacktes konzentrisches System aus Membran und Matrix (untypisch kondensierte Form). Gleichzeitig elongieren und fusionieren die Mitochondrien und bilden eine spiralenförmige Hülle um das Flagellum. Dort stehen sie in engem Kontakt mit den äußeren Längsfasern (De Martino *et al.*, 1979).

1.6 Ziele dieser Arbeit

Während der Spermatogenese besteht für die sich entwickelnden Keimzellen aufgrund ihrer hohen Teilungs- und Differenzierungsaktivität ein relativ hoher Eisenbedarf. Zusätzlich ist Eisen für die Funktionsfähigkeit der Mitochondrien und somit für die Spermienmotilität unerlässlich. Außerdem wird dem testikulären Eisenpool mit jedem Ejakulat Eisen entzogen. Gerade in den 80-er Jahren wurde der Transport von Eisen durch die Blut-Hoden-Schranke und der Einfluss des Transferrin-Transferrinrezeptor 1-Systems intensiver erforscht (Skinner und Griswold, 1980; Huggenvik *et al.*, 1984; Morales und Clermont, 1986; Morales *et al.*, 1987). Obwohl mittlerweile weitere am testikulären Eisenstoffwechsel beteiligte Komponenten identifiziert wurden (DMT1: Griffin *et al.*, 2005; FtMt: Santambrogio *et al.*, 2007; Leichtmann-Bardogoo *et al.*, 2012), ist die Regulation der testikulären Eisenhomöostase und der Eisentransport durch die Blut-Hoden-Schranke auch heute noch weitgehend unklar.

Die abundante Expression von IRP2 im Maushoden (Meyron-Holtz *et al.*, 2004a) und die testikuläre Lokalisation von IRP2-regulierten Zielproteinen deuten darauf hin, dass das IRP/IRE-System an der Regulation der testikulären Eisenhomöostase beteiligt sein könnte. Eine erste, vorläufige Fertilitätsanalyse durch unsere Kollaborationspartner (Dr. E.G. Meyron-Holtz; persönliche Mitteilung) in diesem drittmittelgeförderten Projekt zeigte eine signifikant erniedrigte Wurfzahl bei *Irp2*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. Untersuchungen von Smith *et al.* (2006) haben zusätzlich gezeigt, dass *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäuse infertil sind und ein partieller *rescue* der Fertilität auftritt, wenn *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-

Mäuse mit einer speziellen Eisenüberschussdiät gefüttert werden. Diese Daten weisen auf eine mögliche Funktion des IRP2/IRE-Systems bei der Fertilität und bei der Spermatogenese hin.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die putative Funktion von IRP2 auf die männliche Keimzellentwicklung und die testikuläre Eisenhomöostase im adulten Maushoden zu untersuchen. Zu diesem Zweck sollten die Hoden von *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu C57BL/6J-Mäusen (Wildtyp) eingehender auf Veränderungen in der Spermatogenese untersucht und die Spermien morphologisch und funktionell näher charakterisiert werden. Darüber hinaus sollte eine detaillierte Analyse der testikulären *Irp2*-Transkripte erfolgen und die Auswirkungen einer IRP2-Defizienz auf die testikuläre Expression der IRP2-regulierten Proteine (DMT1, Ferritin, Ferroportin) analysiert werden. Diese Studien sollten sowohl an normal ernährten, als auch an Eisenmangel-ernährten Mäusen durchgeführt werden.

2 MATERIAL

2.1 Allgemeine Chemikalien

1kb DNA Leiter Plus	Invitrogen, Carlsbad, USA
Agarose	Gibco BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Ampicillin-Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bacto-Hefe-Extrakt	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Blocking Reagent	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
BM Purple	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
CHAPS	AppliChem, Darmstadt
Chloroform	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
DEPC	AppliChem, Darmstadt
dNTPs	Carl Roth, Karlsruhe
DRAQ5 TM	Cell Signaling Technology (NEB), Frankfurt
Dulbecco's PBS	Biochrom, Berlin
EDTA	Merck, Darmstadt
Eosin	Merck, Darmstadt
Essigsäure	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Ethanol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formamid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
GelRed TM	Biotrend, Köln
Glukose	Merck, Darmstadt
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycerin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Heparin-Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HEPES	AppliChem, Darmstadt
HPLC-H ₂ O (Wasser)	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
IPTG	Biomol, Hamburg
IVF-Medium	Origio, Berlin
Kaisers Glyceringelatine	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kernechtrot	Merck, Darmstadt

Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
Mineralöl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natrumlactat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Orange G	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Paraformaldehyd	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Penicillin / Streptomycin	Gibco BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Phenol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Pikrinsäure	Riedel-de Haen, Seelze
Prolong Gold Antifade Reagent	Cell Signaling Technology (NEB), Frankfurt
SDS	USB, Staufen
Shandon Xylene Substitute	Thermo Scientific, Karlsruhe
Shandon Xylene Substitute Mountant	Thermo Scientific, Karlsruhe
Tris	Merck, Darmstadt
Triton-X-100	Serva, Heidelberg
Tween-20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
X-Gal	Promega, Madison, USA
Xylol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
yeast tRNA	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Ziegenserum	Vector Laboratories, Burlingame, Kanada

Sonstige verwendete Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) oder AppliChem (Darmstadt) bezogen.

2.2 Enzyme

RNAse freie DNase I	Qiagen, Hilden
<i>EcoRI</i> , <i>HindIII</i>	NEB, Frankfurt
ExoSAP	USB, Staufen
Proteinase K	Merck, Darmstadt
rAPid alkaline Phosphatase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
T4-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden

2.3 Antikörper

aktivierte Caspase-3 (Blocking Peptid)	Cell Signaling Technology (NEB), Frankfurt
Alexa Fluor® 555 Conjugate	Cell Signaling Technology (NEB), Frankfurt
Anti-aktivierte Caspase-3	Cell Signaling Technology (NEB), Frankfurt
Anti-DIG-alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Anti-DMT1;	Esther G. Meyron-Holtz, Haifa, Israel (Leichtmann-Bardoogo <i>et al.</i> , 2012)
Anti-Ferroportin	

Anti-Ki67	Thermo Scientific, Karlsruhe
Anti-L-Ferritin	Esther G. Meyron-Holtz, Haifa, Israel (Leichtmann-Bardoogo <i>et al.</i> , 2012)

2.4 Gebrauchsfertige Kits

ApopTag [®] plus Peroxidase <i>In Situ</i> Apoptosis Detection Kit	Millipore, Schwalbach
ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
BigDye [®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DyeEx [®] 2.0 Spin Kit	Qiagen, Hilden
First-strand cDNA Synthesis Kit	Amersham Biosciences, Freiburg
NucleoSpin [®] Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren
Peroxidase Substrate DAB Kit	Vector Laboratories, Burlingame, Kanada
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy [®] Midi-Kit	Qiagen, Hilden
TOPO TA Cloning [®] Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA
Vectastain [®] ABC Kit Elite Rabbit IgG	Vector Laboratories, Burlingame, Kanada

2.5 Oligonukleotide (Primer)

Bezeichnung	Sequenz	Richtung	T _{PCR}
A3_for	5'- ACG TGT CCT GTT TGC CCT TGT ATC -3'	forward	58°C, 52°C
A5_rev	5'- TCT GTA AAG AGT GGT CCA CTG TGA G -3'	reverse	58°C, 52°C
A6_rev	5'- CAG CCT CTG TTC CAC ATA CAC TTC -3'	reverse	58°C, 52°C
Irp1_1368_for	5'- GAC ACC TCT CAA GAC CCA GA -3'	forward	55°C / S
Irp1_1560_for	5'- CCG CAA GAC GTT CCT CTA TAG -3'	forward	60°C
Irp1_1837_rev	5'- CAG GTT CAG GAA GGG GTC CA -3'	reverse	55°C / S
Irp1_2177_rev	5'- GAC GGG GCT GCT AAG GCA TT -3'	reverse	60°C
Irp1_608_for	5'- CGC GAT GCT GTG AAG AAG TTG -3'	forward	55°C / S
Irp1_UTR_for	5'- CTG CAC TGT GAG CGT TTT TCA G -3'	forward	58°C
Irp1_UTR_rev	5'- TCA TTG GGT CTA GCA CCA AGT -3'	reverse	58°C
Irp2_1450_for	5'- GCA TCT GTC AGT GGT CCA AA -3'	forward	55°C / S
Irp2_1947_for	5'- TGG AAA CAA ACA TTT CGA AGG -3'	forward	55°C / S
Irp2_521_for	5'- CAG TGG ACC ACT CTT TAC AGA T -3'	forward	55°C / S
Irp2_820_rev	5'- AGC TCC TGA GCT CCA CTT GAA -3'	reverse	58°C
Irp2_846_for	5'- GAA TGT GGC AGT CAT CCC G -3'	forward	55°C / S
Irp2_for	5'- GCG ATG GAC TCC CCA AGT GC -3'	forward	58°C
Irp2_UTR_for	5'- CGC AGG GAT AAT ATG GTC TCC -3'	forward	59°C
Irp2_UTR_rev	5'- GCT TTG AAG TTA CGA GTC ATG AA -3'	reverse	59°C
mGAPDH_for	5'- GAA GCT TGT CAT CAA CGG GAA GCC C -3'	forward	57°C

Bezeichnung	Sequenz	Richtung	T _{PCR}
mGAPDH_rev	5'- GCA TCG AAG GTG GAA GAG TGG GAG T -3'	reverse	57°C
PCR-T7_for	5'- CTG CGC AAC TGT TGG G -3'	forward	50°C
pGEM-T-B1_rev	5'- AGG CGG CCG CGA ATT CAC -3'	reverse	50°C
pGEM-T-B2_rev	5'- CCA GGC TTT ACA CTT TAT GCT TCC -3'	reverse	55°C
pGEM-T-F1_for	5'- ACG TCG CAT GCT CCC G -3'	forward	55°C
SC3_rev	5'- AGC TCA TTC CTC CAC TCA TG -3'	reverse	58°C, 53°C
SC4_for	5'- GCA TGC ATC CAT TGT CTC TG -3'	forward	58°C, 53°C
SC5_rev	5'- ACA GAC ACA GAT GCC AGA GG -3'	reverse	58°C, 53°C

S kennzeichnet Primer die ausschließlich zu Sequenzierungszwecken eingesetzt wurden.

2.6 Verbrauchsmaterialien

Einmalhandschuhe	Hartmann AG, Heidenheim
Einmalspritzen	Greiner, Frickenhausen
Objektträgerkästen	Carl Roth, Karlsruhe
Deckgläschen	Menzel GmbH und KoKG, Braunschweig
Einbettkassetten	Carl Roth, Karlsruhe
Einmalpipetten	Greiner, Frickenhausen
Falcon-Röhrchen	Sarstedt, Nürnbrecht
Faltenfilter	Macherey-Nagel, Düren
Gewebekulturschalen	Greiner, Frickenhausen
Hämatokritröhrchen	Sarstedt, Nürnbrecht
Objektträger	Menzel GmbH und KoKG, Braunschweig
Parafilm	American National can, Greenwich, USA
Petrischalen	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen	Braun, Melsungen
Polypropylenröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Präparierbesteck	Jürgens Hannover
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
	Sarstedt, Nürnbrecht
Küvette (UVette)	Eppendorf, Hamburg

2.7 Geräte

3130x Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt
Ausgießstation AP 280-3	Microm, Heidelberg
Autoklav	Jürgens, Hannover
BioPhotometer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bioprofil-Videosystem (Geldokumentation)	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Brutschränke	Haraeus Instruments, Harnau

Cleanbench	Heraeus Sepatech, Osterode
Einbettautomat Hypercenter XP	Thermo Scientific, Karlsruhe
Eppendorfszentrifuge (5424)	Eppendorf, Hamburg
Feinwaage	Satorius AG, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop	Leica, Mannheim
Horizon 58/11.14/20.25 (Elektrophoresegerät)	Gibco BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Hybridisierungsöfen Typ 430	Bachhofer, Reutlingen
Intelligent Heating Block	Biometra, Göttingen
Kamera CU5 (Geldokumentation)	Polaroid, Enschede
Kamera DFC 300 Fx (Fluoreszenzmikroskop)	Leica, Mannheim
Lichtmikroskop	Zeiss, Jena
LSM510Meta Mikroskop	Zeiss, Jena
Mikro-Hämatokrit-Reader	Hawksley und Sons, England
Mikropipetten	Gilson, Middleton, USA
Mikrowelle	Sharp Electronics, Hamburg
Miniprotean II (Elektrophoresegerät)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Neubauer-Zählkammer	Brand GmbH + CoKG, Wertheim
Plattenszentrifuge (5810R)	Eppendorf, Hamburg
Röhrchenszentrifuge (5430R)	Eppendorf, Hamburg
Schüttelinkubatoren	Jürgens, Hannover
Sterilbank	Heraeus Sepatech, Osterode
T3 Kombi, T3000, T Personal	Biometra, Göttingen
TBI Thermoblock	Biometra, Göttingen
Thermomixer 4536	Eppendorf, Hamburg
Ultra-Turrax	Janke und Kunkel, Staufen
UV-Werk Tisch UVIS 254 nm 366 nm	Desaga, Heidelberg
Vortex Genie Mixer	Janke und Kunkel, Staufen
Waage	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel

2.8 Bakterien

Bezeichnung	Stamm	Genotyp	Hersteller
<i>Escherichia coli</i>	XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10(Tet^r)</i>]	Stratagene, Waldbronn
<i>Escherichia coli</i>	TOP 10 F'	F' { <i>lacI^q, Tn10(Tet^r)</i> } <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>	Invitrogen, Carlsbad, USA

2.9 Mauslinien

	Bezeichnung	Mutationskategorie
<i>Ireb2</i> ^{tm1Roua} (C57BL/6J)	<i>Irp2</i> (LaVaute <i>et al.</i> , 2001)	<i>knock out</i>
<i>Acol</i> ^{tm1Roua} (C57BL/6J)	<i>Irp1</i> (Meyron-Holtz <i>et al.</i> , 2004a)	<i>knock out</i>
C57BL/6J		Wildtyp

Die C57BL/6-Maus wurde 1921 von C.C. Little entwickelt und 1948 bzw. 1981 bei The Jackson Laboratory bzw. Charles River Laboratories eingeführt.

Die *knock out* Mauslinien *Ireb2*^{tm1Roua} und *Acol*^{tm1Roua} wurden dem Institut für Humangenetik mit der freundlichen Genehmigung T. Roualts (Bethesda, Maryland USA) von Dr. Esther Meyron-Holtz (Laboratory for Molecular Nutrition, Faculty of Biotechnology and Food Engineering, Technion, Haifa, Israel) zur Verfügung gestellt.

2.10 Referenzsequenzen (Genbank-Accession-Nummern)

Irp2: (NM_22655.3), genomisch (ENSMUSG00000032293)

Irp1 (NM_007386.2), genomisch (OTTMUSG00000006559)

3 METHODEN

3.1 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

3.1.1 Isolierung von genomischer DNA aus Geweben

Die Isolierung genomischer DNA zur Genotypisierung der *knock out* Mäuse erfolgte nach der Methode von Hogan *et al.* (1994). Zunächst wurde das Gewebe (ca. 0,1-0,3 g Ohrgewebe zur Genotypisierung lebender oder ca. 0,5 cm Schwanz zur Genotypisierung toter Mäuse) mit 500 μ l Lysis-Puffer und 25 μ l Proteinase K (10 μ g/ μ l) versetzt und über Nacht bei 55°C inkubiert.

Tabelle 1: Puffer und Lösungen zur Isolierung genomischer DNA

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Lysis-Puffer	50 mM	Tris-HCl, pH 8
	100 mM	EDTA
	0,5% (w/v)	SDS
		pH auf 8,0 einstellen

Am folgenden Tag wurde ein Volumenanteil äquilibriertes Phenol (pH 8,0) hinzugesetzt, das Gemisch geschüttelt und zur Trennung der Phasen 10 min bei 13000 rpm und bei 4°C zentrifugiert. Die DNA-enthaltende wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend ein Volumenanteil Chloroform hinzugefügt. Die Probe wurde wieder geschüttelt und abermals für 10 min bei 13000 rpm und bei 4°C zentrifugiert. Nach erneutem Überführen des wässrigen Überstandes wurde die darin enthaltene DNA mit 1/15 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 6,0) und 2,5 Volumenanteilen reinsten Ethanols bei RT gefällt. Nach wiederholter Zentrifugation wurde der wässrige Überstand entfernt und das DNA-Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde für ca. 5 min bei 37°C getrocknet und in HPLC-H₂O resuspendiert (40 μ l für Ohren und 100 μ l für Schwanzbiopsien).

3.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben (Hoden und Niere) erfolgte mit dem RNeasy® Midi Kit von Qiagen. Hierzu wurden ca. 100 mg bei -80°C tiefgefrorenes Gewebe

eingesetzt. Zunächst wurde das Gewebe jeweils mit 2 ml RLT-Puffer und mit 20 µl β-Mercaptoethanol versetzt und anschließend für 45 s homogenisiert. Dann wurde das Homogenat zur längeren Aufbewahrung bei -80°C eingefroren; die weitere Verarbeitung erfolgte nach dem Auftauen der Proben bei 37°C. Die Durchführung der RNA-Isolation erfolgte strikt nach dem vom Hersteller mitgelieferten Protokoll. Die Gesamt-RNA wurde in 150 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

Zur Qualitätskontrolle der isolierten RNA wurden 5 µl der RNA-Lösung auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei sollten sowohl die Bande der deutlich intensiveren 28S-rRNA als auch der 18S-rRNA sichtbar sein.

3.1.3 Minipräparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zunächst wurden einzelne rekombinante Bakterienkolonien in 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Selektionszusatz (siehe Tabelle 3) angeimpft und über Nacht im Thermoschüttler bei 225 rpm und 37°C inkubiert.

Tabelle 2: Medium und Agarplatten (*nur bei Platten)

Bezeichnung	Zusammensetzung	
	1% (w/v)	Bacto-Trypton
LB (<i>lysogeny broth</i> nach Bertani, 1951)	0,5% (w/v)	Hefe-Extrakt
	1% (w/v)	NaCl
	1,5% (w/v)*	Agar*

Je nach Selektionsbedarf wurden dem Medium Antibiotika hinzugesetzt:

Tabelle 3: verwendete Zusätze für LB-Medien

Zusatz	Stocklösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml	50 µg/ml
IPTG	200 mg/ml	20 µg/ml
Kanamycin	100 mg/ml	50 µg/ml
X-Gal	50 mg/ml	80 µg/ml

Am folgenden Tag wurde ein Aliquot von 800 µl abgenommen, mit 200 µl Glycerin versetzt und zur Aufbewahrung bei -80°C eingefroren. Aus der restlichen Bakterienflüssigkultur erfolgte die Isolierung von Plasmid-DNA mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen. Dabei wurde strikt nach dem vom Hersteller mitgelieferten Protokoll vorgegangen.

3.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Bei der photometrischen Konzentrationsbestimmung wird die Absorption von Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem Spektralphotometer gemessen. Denn sowohl DNA als auch RNA zeigen bei dieser Wellenlänge wegen der aromatischen Ringe ihrer Basen das Absorptionsmaximum. Bei Verwendung einer speziellen UV-Küvette (UVette[®]) mit einem Lichtweg von 1 cm entspricht der gemessene Extinktionswert (OD: optische Dichte) einer Lösung von 50 (40) µg/ml doppelsträngiger DNA (einzelnsträngiger RNA) genau 1. Mit dem Verdünnungsfaktor Vf ergibt sich daraus folgende Bestimmungsformel für die DNA (RNA)-Konzentration:

$$\Delta E_{260-320} \times 50 \text{ (40) } \mu\text{g/ml} \times \text{Vf} = \mu\text{g DNA (RNA)/ml}$$

Gleichzeitig kann die Qualität der vorliegenden Nukleinsäuren durch die Bestimmung folgender Wellenlängen abgeschätzt werden:

230 nm (Absorption von Salzen und Kohlenhydraten)

260 nm (Absorptionsmaximum der Basen von Nukleinsäuren)

280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen)

320 nm (Basislinie des Absorptionsspektrums von Nukleinsäuren).

Ist der Extinktionsquotient aus 260/280 nm > 1,7 und der aus 260/230 nm < 2,0 kann von einer 70-95%igen Reinheit der DNA ausgegangen werden.

Die Messungen der Proben wurden in einer Verdünnung von 1:50 vorgenommen.

3.2 Agarosegel-Elektrophorese

Die größenabhängige Trennung von Makromolekülen mittels Gelelektrophorese basiert auf dem elektrokinetischen Phänomen, dass geladene Partikel aufgrund elektrostatischer Kräfte bewegt werden. Es besteht eine inverse logarithmische Abhängigkeit zwischen der Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente und ihrem Molekulargewicht (Knippers, 1990). Weiterhin beeinflussen zusätzlich die Ladungsdichte und Konformation des Makromoleküls, die Größe des elektrischen Feldes, die Dichte der Gelmatrix und die gewählten Pufferbedingungen das Wanderungsverhalten. Als Trennmateriale dient Agarose, ein Polymer, das alternierend aus D-Galaktose und 3,6-Anhydro-L-Galaktose aufgebaut ist. Durch Variation der Polymerkonzentration kann die Porengröße der Gelmatrix verändert werden, wodurch der Trennbereich für unterschiedliche Fragmentlängen optimiert werden kann.

Tabelle 4: Trennbereiche bei verschiedenen Konzentrationen

Agarosegelkonzentration in %	Trennbereich linearer DNA [kb]
0,3	5 - 60
0,6	1 - 20
0,7	0,8 - 10
0,9	0,5 - 7
1,2	0,4 - 6
1,5	0,2 - 4
2	0,1 - 0,3

Die Identifizierung aufgetrennter DNA-Fragmente erfolgte durch den Zusatz von Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid; EtBr) oder GelRedTM, organischen Farbstoffen, die in die DNA interkalieren. Bei Anregung durch UV-Licht kann die Fluoreszenz des interkalierten Farbstoffs visualisiert und dokumentiert werden.

Tabelle 5: Puffer und Lösungen für die Gelelektrophorese

Bezeichnung	Zusammensetzung	
5x DNA-Ladepuffer	50% (w/v)	Glycerin
	0,25% (w/v)	Orange G
50x TAE-Puffer	2 M	Tris-HCl
	5,71% (v/v)	Eisessig
	0,05 M	EDTA
10x TBE-Puffer	0,9 M	Tris-HCl
	0,9 M	Borsäure
	0,02 M	EDTA

Ansatz: Die entsprechende Menge Agarose (w/v) wurde durch Aufkochen in 1× TBE- oder 1× TAE-Puffer gelöst und anschließend wieder etwas abkühlen gelassen. Je nach erwarteter Fragmentgröße wurden entweder 20-40 µl 0,1 µg/ml EtBr (für größere Fragmente) oder 3 µl GelRedTM (für Fragmente bis zu 800 bp) hinzugefügt, vermischt und in die Gießvorrichtung der Gelkammer gegossen. Nach Verfestigung der Agarose wurden jeweils 7 µl des PCR-Ansatzes mit Glycerin-haltigen Ladepuffer (3 µl) gemischt und luftblasenfrei in die Geltaschen pipettiert. Zur Größenbestimmung der DNA-Banden wurde ein Längenstandard (z. B. 1 kb-Leiter 0,1 µg/µl pro Geltasche), der ebenfalls mit Ladepuffer versetzt wurde, aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei konstanter Spannung (80 V für Minigelkammern bzw. 120 V für Maxigelkammern (5 V/cm, RT)) in Flachbett-Gelkammern durchgeführt.

3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) nach Mullis *et al.* (1986) können DNA-Sequenzen *in vitro* exponentiell amplifiziert werden. So genannte Primer, Oligonukleotide bestehend aus ca. 15-30 Nukleotiden, markieren durch die Bindung an eine spezifische Sequenz den Start- und den Endpunkt des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Die Amplifikation erfolgt durch eine hitze-stabile DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase) aus dem Archaeobakterium *Thermus aquaticus*. Die exponentielle Vervielfältigung dieser Kettenreaktion wird durch ein zyklisches Temperaturprofil aus Denaturierung, Annealing (Primeranlagerung) und Elongation (Primerverlängerung) durch die *Taq*-Polymerase erreicht. Dabei dienen neu synthetisierte DNA-Stränge in folgenden Zyklen als Matrize für die weitere DNA-Synthese. Die Annealingtemperatur ist abhängig von der Basenzusammensetzung der verwendeten Primer und kann zwischen verschiedenen Primerpaaren variieren.

Die Reaktion wurde in einem PCR-Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt:

Initiale Denaturierung:	3-5 min	94-96°C	
Denaturierung:	30-60 s	94-96°C	} 25-40x
Annealing:	30-60 s	55°C ± 6°C	
Elongation:	30-180 s	72°C	
finale Elongation:	10 min	72°C	
(Kühlung:	∞	8°C)	

Ein 30 µl-PCR-Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

3 µl	10x PCR-Puffer inkl. 15 mM MgCl ₂
3 µl	80 mM dNTP-Mischung (pro dNTP 20 mM)
1 µl	10 pmol/µl Primer (forward)
1 µl	10 pmol/µl Primer (reverse)
0,2 µl	1 U <i>Taq</i> DNA Polymerase
1 µl	DNA-Template (100 ng genomisch; 1:500 verdünnte Plasmid-DNA)
20,8 µl	HPLC-H ₂ O

Pro PCR wurde jeweils ein Mastermix für alle DNA-Proben und einem Leerwert pipettiert.

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten PCR-Programme; Primersequenzen siehe 2.5

PCR	Primer	Bedingungen			
Genotypisierung von <i>Irp2 knock</i> <i>out</i> Mäusen (Smith <i>et al.</i> , 2006)	A3_for	Denaturierung	94°C	5 min	
		Denaturierung	94°C	30 s	
	A5_rev	Annealing	58°C	30 s	5x
		Elongation	72°C	30 s	
	A6_rev	Denaturierung	94°C	30 s	25x
		Annealing	52°C	30 s	
Elongation	72°C	60 s			
Elongation	72°C	5 min			
Genotypisierung von <i>Irp1 knock</i> <i>out</i> Mäusen	SC4_for	Denaturierung	94°C	5 min	
		Denaturierung	94°C	30 s	
	SC3_rev	Annealing	58°C	60 s	5x
		Elongation	72°C	60 s	
	SC5_rev	Denaturierung	94°C	30 s	25x
		Annealing	53°C	30 s	
Elongation	72°C	60 s			
Elongation	72°C	5 min			
Amplifikation der <i>Irp2-full length-</i> cDNA	Irp2_UTR_for	Denaturierung	95°C	5 min	
		Denaturierung	95°C	60 s	
	Irp2_UTR_rev	Annealing	59°C	90 s	35x
		Elongation	72°C	3 min	
	Elongation	72°C	10 min		
Amplifikation der <i>Irp1-full length-</i> cDNA	Irp1_UTR_for	Denaturierung	95°C	5 min	
		Denaturierung	95°C	60 s	
	Irp1_UTR_rev	Annealing	58°C	90 s	35x
		Elongation	72°C	3 min	
	Elongation	72°C	10 min		
<i>mgapdh</i> (Karwacki <i>et al.</i> , 2006)	mgapdh_for	Denaturierung	95°C	5 min	
		Denaturierung	95°C	60 s	
	mgapdh_rev	Annealing	57°C	60 s	35x
		Elongation	72°C	45 s	
	Elongation	72°C	10 min		
Generierung der <i>Irp2</i> -Sonde	Irp2_for	Denaturierung	94°C	5 min	
		Denaturierung	94°C	60 s	
	Irp2_820_rev	Annealing	58°C	60 s	30x
		Elongation	72°C	60 s	
	Elongation	72°C	10 min		
Generierung der <i>Irp1</i> -Sonde	Irp1_1560_for	Denaturierung	94°C	5 min	
		Denaturierung	94°C	60 s	
	Irp1_2177_rev	Annealing	60°C	45 s	30x
		Elongation	72°C	60 s	
	Elongation	72°C	10 min		
PCR für die Sondensynthese (SP6)	pGEM-T-F1_for	Denaturierung	96 C	3 min	
		Denaturierung	96°C	30 s	
	pGEM-T-B2_rev	Annealing	55°C	30 s	40x
		Elongation	72°C	30 s	
	Elongation	72°C	10 min		
PCR für die Sondensynthese (T7)	PCR-T7_for	Denaturierung	96 C	3 min	
		Denaturierung	96°C	30 s	
	pGEM-T-B1_rev	Annealing	50°C	30 s	40x
		Elongation	72°C	30 s	
	Elongation	72°C	10 min		

3.4 Reverse Transkription (RT-PCR)

Mit Hilfe des Enzyms, Reverse Transkriptase kann mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden, wobei die resultierende cDNA in gleichem Verhältnis wie die mRNA vorliegt.

1-5 µg Gesamt-RNA wurden nach einer zehnmütigen Denaturierung bei 65°C und einer kurzen Inkubation auf Eis revers transkribiert. Die reverse Transkription wurde mit dem First-Strand cDNA Synthesis Kit unter Verwendung des mitgelieferten *Not I*-d(T)₁₈ Primers strikt nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Nach dem Umschreiben der mRNA in die cDNA-Einzelstränge wurden mittels PCR die *Irp2*- bzw. *Irp1-full length*-Transkripte und/oder die Fragmente für die Sonden (siehe Tabelle 6) amplifiziert. Der 15 µl Ansatz für die reverse Transkription wurde nach folgendem Schema pipettiert und anschließend für zwei Stunden bei 37°C inkubiert.

8 µl	RNA-Lösung (1-5 µg)
1 µl	DTT
1 µl	<i>Not I</i> -d(T) ₁₈ Primer (1:25)
5 µl	Bulk-Mix

Es wurde ein Mastermix für alle RNA-Proben angesetzt. Die resultierende cDNA wurde direkt als Template (1-2 µl) für die PCR-Analysen eingesetzt.

3.5 Klonierungstechniken

3.5.1 Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA

Typ-II-Restriktionsendonukleasen erkennen und schneiden bestimmte palindromische DNA-Sequenzen. Die meisten Enzyme haben eine Inkubationstemperatur von 37°C, es gibt jedoch auch einige Ausnahmen. Restriktionsansatz, Temperatur, Inkubationszeit, Enzymmenge und Pufferbedingungen wurden nach den mitgelieferten Protokollen der jeweiligen Firma gewählt.

TA-klonierte PCR-Produkte (siehe 3.5.5) wurden mittels Restriktionsanalyse auf ihre vollständige Größe überprüft. Der Ansatz (20 µl) eines solchen Kontrollverdaus setzte sich folgendermaßen zusammen, jeweils als Mastermix für alle Proben pipettiert:

3 µl	DNA-Lösung (Miniprep)
2 µl	10x Reaktionspuffer (je nach Enzym)
2 µl	10x BSA (je nach Bedarf des Enzyms)
0.5 µl	Enzym (1 U/ml)
12.5 µl	HPLC-H ₂ O (bzw. 14.5 µl ohne BSA)

Für gegebenenfalls folgende weitere Klonierungen von DNA-Fragmenten in den pGEM[®]T-Easy-Vektor (Promega) wurden (z. B. für die Generierung der Sonden für die SISH) ca. 1 µg des Vektors und ca. 5 µg des Inserts in folgendem Ansatz verdaut:

X µl DNA-Lösung (1-5 µg)
2 µl 10x Reaktionspuffer (je nach Enzym)
2 µl 10x BSA (je nach Bedarf des Enzyms)
2 µl Enzym (10 U/ml)
mit HPLC-H₂O auf 20 µl auffüllen

Die Restriktionsfragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, das gewünschte DNA-Fragment aus dem Gel ausgeschnitten und mittels NucleoSpin[®] Gel and PCR clean up Kit (Macherey und Nagel) isoliert.

3.5.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Gelextraktion von DNA-Fragmenten wurde mit dem NucleoSpin[®] Gel and PCR clean up Kit von der Firma Macherey-Nagel durchgeführt. Dazu wurde das jeweilige DNA-Fragment auf einem UV-Tisch bei 366 nm visualisiert und aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Die zur Auflösung des Gels eingesetzte Puffermenge richtete sich nach dem Gewicht des Gelstücks. Die DNA-enhaltende Lösung wurde strikt anhand der mitgelieferten Anweisung über eine Säule isoliert. Anschließend wurde die DNA mit 25-40 µl HPLC-H₂O eluiert. Zur Überprüfung der Konzentration und des Reinheitsgrades der DNA-Fragmente folgte eine analytische Gelelektrophorese.

3.5.3 Dephosphorylierung linearisierter Klonierungsvektoren

Zur Verhinderung der Religation eines linearisierten Klonierungsvektors nach dem Restriktionsverdau wurde der Vektor mittels alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (rAPid alkaline Phosphatase, Roche) dephosphoryliert. Der Restriktionsansatz oder das durch Gelextraktion aufgereinigte DNA-Fragment wurde mit 1/10 des Volumens rAPid 10x Puffer und 1 µl rAPid versetzt und anschließend für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 5 min bei 75°C hitzeinaktiviert.

3.5.4 *Ligation von DNA-Fragmenten*

Die Ligation ist die Verknüpfung zweier Enden von DNA-Fragmenten mittels einer Ligase aus dem Phagen T4 (T4-Ligase, Fermentas). Bei Ligasereaktionen mit überhängenden (*sticky*) Enden wurden beim vorangehenden Restriktionsverdau die Enzyme möglichst so gewählt, dass komplementäre Enden entstehen, da die Ligation glatter (*blunt*) Enden zu beträchtlichen Einbußen in der Ausbeute führen kann. Die Ligation des Vektors erfolgte mit den durch Gelextraktion aufgereinigten DNA-Fragmenten. Die für die Ligation erforderliche DNA-Menge des Inserts (z) wurde nach folgender Formel berechnet (a_i : Größe des Inserts; b_v : Größe des Vektors):

$$\frac{25 \text{ ng Vektor} \times a_i \text{ kb (Insert)}}{b_v \text{ kb (Vektor)}} \times 3 = z \text{ ng Insert}$$

Ein 20 μ l Ligationsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

25 ng linearisierter Vektor (4-6 μ l)
 z ng Insert
 2 μ l 10x Ligasepuffer
 1 μ l T4 DNA-Ligase (1 U)
 mit HPLC-H₂O auf 20 μ l auffüllen

Es wurde über Nacht bei 16°C ligiert und es wurde eine entsprechende Religationskontrolle nur mit Vektor aber ohne Insert mitgeführt.

3.5.5 *TOPO TA Klonierung von PCR-Produkten*

Das Topo TA Cloning[®] Kit von Invitrogen ermöglicht die direkte Klonierung von PCR-Produkten in einen Vektor. Die bei der PCR-Amplifikation verwendete *Taq*-Polymerase besitzt eine von der Vorlage unabhängige Transferase-Aktivität, d. h. sie fügt zusätzlich ein einzelnes Desoxyadenosin an die 3'-Enden der PCR-Produkte an. Der im Kit mitgelieferte Vektor (pCR[®]2.1-TOPO[®]) ist linearisiert und weist zudem an den 3'-Enden einen entsprechenden Desoxythymिनrest auf. Dies ermöglicht eine schnelle Ligation mit dem PCR-Produkt, die über die Topoisomerase I des *Vaccinia* Virus vermittelt wird. Die Klonierung des PCR-Produktes in den Vektor wurde strikt nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Es wurde folgender Ligationsansatz pipettiert:

4 µl	PCR-Fragment
0,5 µl	pCR [®] 2.1-TOPO [®] -Vektor
1 µl	Salzlösung (1:4 verdünnt)
0,5 µl	H ₂ O

Nach fünfminütiger Inkubation bei RT wurden 2 µl des Ansatzes für die Transformation (3.5.6) verwendet.

3.5.6 Transformation in chemisch kompetente XL-1 Blue

Als Transformation wird das gezielte Einbringen von nicht viraler DNA in kompetente Bakterienzellen bezeichnet. Die einfachste Methode ist der so genannte Hitzeschock. Hierzu wurden die Bakterien mit Calcium- oder Rubidiumchlorid behandelt, damit zwischen der negativ geladenen DNA und der negativ geladenen Zellwand weniger abstoßende Kräfte herrschen. Der Hitzeschock (42°C für 45s) führt zur Bildung von Poren in der Membran, durch die die Plasmide in die Bakterienzellen gelangen. Die Transformation der XL-1 Blue Bakterienzellen von Stratagene wurde strikt nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.6 Sequenzierung

PCR-gestützte Sequenzierungen erfolgten durch Anwendung der von Sanger *et al.* (1977) entwickelten Kettenabbruchmethode mit dem BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Vor der Sequenzierung wurden die PCR-Produkte enzymatisch mittels EXO-SAP (USB) aufgereinigt. Hierbei handelt es sich um ein Gemisch aus Exonuklease I, die bei 37°C einzelsträngige DNA abbaut, und alkalischer Phosphatase aus Garnelen, die bei 80°C übriggebliebene dNTPs hydrolysiert. Ein einfacher Aufreinigungsansatz beinhaltete 5 µl PCR-Produkt und 2 µl EXO-SAP. Er wurde für 25 min bei 37°C und anschließend für 30 min bei 80°C inkubiert. Anschließend wurde das aufgereinigte PCR-Produkt mit 10 µl HPLC-H₂O verdünnt und nach einer gründlichen Mischung der Reaktionsansatz für die Sequenzierungs-PCR auf Eis pipettiert:

1 µl	Plasmid-DNA oder 5 µl PCR-Produkt
1 µl	Big Dye Mix
2 µl	Sequenzierungspuffer
1,6 µl	Primer (5 pmol/µl)
auf 10 µl mit HPLC-H ₂ O auffüllen	

Die Amplifikation des zu sequenzierenden Fragments geschah nach folgendem PCR-Programm:

3 min	95°C	
20 s	95°C	} 26x
30 s	50°C	
4 min	60°C	
∞	8°C	

Dem Reaktionsansatz wurden anschließend 10 µl HPLC-H₂O hinzugefügt und die Aufreinigung erfolgte über DyeEx-Säulchen (DyeEx[®] 2.0, Qiagen) strikt nach den Angaben des Herstellers. Die Proben wurden je mit 15 µl HPLC-H₂O eluiert und auf eine 96-well Platte, in der bereits 15 µl Formamid (Applied Biosystemes) pro well vorgelegt wurden, transferiert. Das Auslesen der Sequenz erfolgte mit dem 3130x Genetic Analyzer (Applied Biosystemes).

3.7 ATPase-Assay

Zur Bestimmung des ATP-Gehaltes der Spermien fand das ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II von Roche Verwendung. Bei der Durchführung wurden die Anweisungen des Herstellers strikt befolgt. Bei Anwesenheit von Sauerstoff und ATP wird Luziferin durch das Enzym Luziferase oxidiert. Im Verlauf dieser Reaktion wird Energie in Form von Licht abgegeben. Dabei ist die Lichtemission direkt proportional zum ATP-Gehalt der Spermien. Nach Präparation der Nebenhodenschwänze wurden diese mit einer Schere zerkleinert und in 50 µl 20 mM PBS/0,1% TritonX-100 lysiert. Anschließend wurde das 9-fache Volumen heißer 100 mM Tris-HCl/4 mM EDTA-Lösung pH 8 hinzugefügt und für 2 min im Wasserbad bei 100°C erhitzt. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min bei 20000 rpm) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Davon wurden 50 µl-Triplikate auf eine 96-well Luminometerplatte pipettiert und 50 µl Luziferase-Reagenz hinzugefügt. Im Multi-Detektions-Reader (Synergy 2, BioTek) wurden die Proben für 1 min gemischt, anschließend 1 min inkubiert und dann gemessen. Als Negativkontrolle wurde eine Probe ohne Gewebe bzw. Spermien mitgeführt.

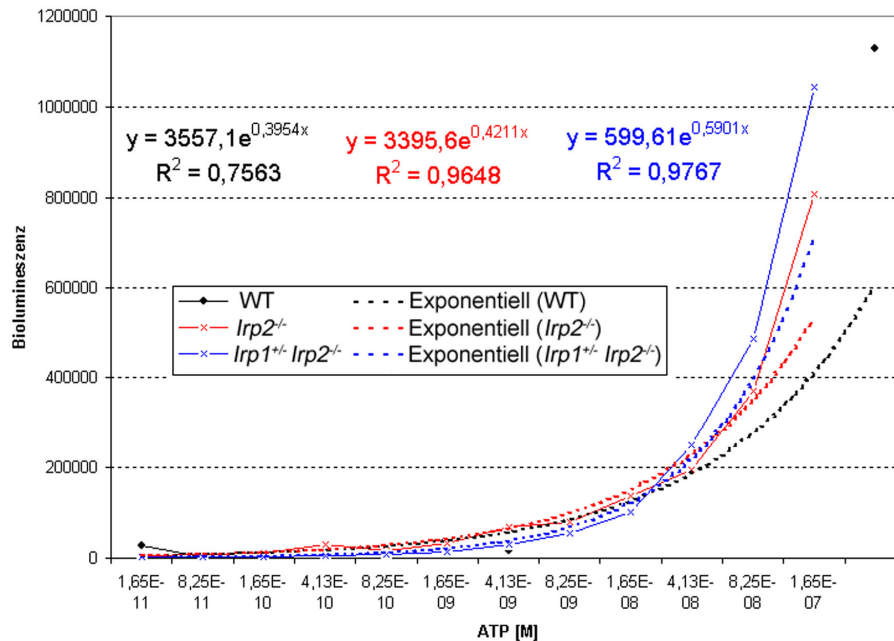


Abbildung 12: ATP-Eichgeraden der einzelnen Messungen zur Ermittlung der ATP-Konzentration

Zur Bestimmung der ATP-Konzentration wurde für jede Messung eine ATP-Eichgerade in einem Konzentrationsbereich von 10^{-4} bis 10^{-8} mg/ml - verdünnt in 100 mM Tris-HCl/4 mM EDTA, pH 8 - erstellt (siehe Abbildung 12). Von den Proben wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Die finale ATP-Konzentration wurde pro mg Protein berechnet.

3.7.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Spermien wurde das Bradford-Reagenz (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent) mit HPLC-H₂O 1:5 verdünnt und anschließend filtriert. Der Überstand (aus 3.7) wurde 1:2 mit HPLC-H₂O verdünnt und in Triplikaten von je 10 µl in eine 96-well Platte vorgelegt. Hierzu wurden je 10 µl der Bradford-Lösung pipettiert, für 10 min bei RT inkubiert und dann im Multi-Detektions-Reader (Synergy 2, BioTek) bei 595 nm gemessen. Eine Eichgerade wurde mit BSA in einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis 1,5 mg/ml erstellt.

3.8 Fixierung und Einbettung von Organen

Nach der Präparation der Organe wurden diese direkt in das entsprechende Fixativ (Bouin'sche Lösung oder 4% PFA) gegeben und, abhängig von der Größe des Organs, ein bis zwei Tage bei RT fixiert.

Tabelle 7: verwendete Fixative und dafür benötigte Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Bouin'sche Lösung	15 Teile	gesättigte Pikrinsäure
	5 Teile	37%ige Formaldehydlösung
	1 Teil	Eisessig
10x PBS	140 mM	NaCl
	27 mM	KCl
	90 mM	Na ₂ HPO ₄
	15 mM	KH ₂ HPO ₄
4% PFA	4% (w/v)	Paraformaldehyd mit einigen Tropfen 10 M NaOH in 1x PBS unter Erwärmen lösen, pH 6-7 mit HCl einstellen

Nach dem Fixieren wurden die Organe in 70%-iges Ethanol überführt. Anschließend wurden mit der Bouin'sche Lösung fixierte Organe mehrmals mit 80%-igem Ethanol, das mit einigen Tropfen (sechs Tropfen auf 500 ml) Ammoniak versetzt wurde, gewaschen und nach Entfernung der gelben Pikrinsäure in beschriftete Einbettkassetten platziert.

Die Paraffineinbettung wurde im Institut für Pathologie mit Hilfe eines Hypercenter XP-Einbettautomats (Thermo Scientific) durchgeführt. Nach erfolgter Einbettung wurde das Präparat in einer AP 280-3-Ausgießstation (Micron) mit Hilfe einer Gießvorrichtung zu Paraffinblöcken ausgegossen, in die jeweils die beschriftete Einbettkassetten-schale eingelassen wurde. Dies diente dem späteren Einspannen in das Rotationsmikrotom (Micron) zur Anfertigung der Schnitte. Auf einer Kühlplatte der Ausgießstation bei -20°C wurde das Paraffinblöckchen mit dem enthaltenem Präparat ausgehärtet. Vor dem Schneiden der Blöcke wurden diese für einige Stunden oder über Nacht bei -20°C vorgekühlt.

3.9 Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Gewebeschnitten

Zur Übersicht der Zellstrukturen wurden Paraffinschnitte von 2 µm Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt. Hämatoxylin färbt Zellkerne blau, während zytoplasmatische Bereiche durch Eosin rötlich gefärbt werden.

Tabelle 8: Lösungen für die HE-Färbung

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Eosin	0,2% (v/v)	2% (w/v) Eosinlösung
	10% (v/v)	Ethanol
	2 Tropfen	Eisessig
Mayers Hämalaun	1:10	mit dH ₂ O verdünnen, vor Gebrauch filtrieren

Die HE-Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Vorgang:

1. Entparaffinisierung des Gewebes
2. Schrittweise Rehydrierung der Präparate (absteigende Alkoholreihe)
3. Anfärben der Zellkerne
4. Bläuen
5. Gegenfärbung
6. Schrittweises Dehydrieren der Präparate (aufsteigende Alkoholreihe)
7. vollständige Dehydrierung
8. Eindeckeln

Bedingungen:

- 3 x 5 min Xylol, RT
- je 5 min 100%, 90%, 80%, 70% EtOH, RT
- 2 x 5 min dH₂O, RT
- 7-10 min Mayers Hämalaunlösung, RT
- 10 min mit fließendem Leitungswasser wässern
- 2 min Eosin, RT
- kurz eintauchen in dH₂O, 70%, 80%, 90% EtOH, RT
- 2 x 2 min 100% EtOH, RT
- 3 x 2 min HistoClear, RT
- 1-2 Tropfen Histomount direkt auf das Präparat geben, möglichst luftblasenfrei mit Deckgläsern eindecken

3.10 *In situ* Hybridisierung auf Paraffinschnitten (SISH)

Die SISH wurde zum Nachweis der mRNA beider *Irps* direkt am Expressionsort durchgeführt. Es wurden Digoxigenin (DIG)-markierte Antisense-RNA-Sonden für *Irp1* bzw. *Irp2* verwendet, die spezifisch mit der entsprechenden mRNA hybridisieren. An dem resultierenden mRNA-Komplex bindet ein mit einer alkalischen Phosphatase (AP) gekoppelter Antikörper (Anti-DIG), dessen AP das zugefügte Substrat BM Purple hydrolysiert, wodurch eine blaue bis violette Färbung entsteht. Als Negativkontrollen dienten jeweils die zugehörigen Sense-RNA-Sonden. Die Schnittdicke der PFA-fixierten Paraffinpräparate betrug 8 µm.

3.10.1 Sondensynthese

Für die in dieser Arbeit verwendete Irp2 SIII #16- bzw. Irp1 SIII #7-Sonde wurden jeweils Bereiche, die die Exons eins bis sechs (719 bp) bzw. elf bis 16 (649 bp) umfassten, mittels PCR (siehe Tabelle 6 Programm: Generierung der Sonde) aus den *full length*-cDNA-Klonen amplifiziert, und letztendlich in den pGEM[®]T-Easy-Vektor, der Bindungsstellen für DNA-abhängige RNA-Polymerasen besitzt, kloniert (siehe 3.5). Die für die *in vitro* Transkription verwendeten Templates wurden wiederum je nach Orientierung des Inserts in pGEM[®]T-Easy über die entsprechende PCR (siehe Tabelle 6 Programm: Sondensynthese) amplifiziert. Anschließend erfolgte die *in vitro* Transkription mit Hilfe des DIG RNA Labeling Kits (SP6/T7) von Roche durch die SP6- und die T7-RNA-Polymerasen zur Generierung der Antisense- als auch der Sense-Sonden nach den Angaben des Herstellers. Nach der Transkription wurde die RNA durch Ethanol-Präzipitation aufgereinigt. Dabei ist es wichtig, dass ab diesem Schritt für alle verwendeten Lösungen/Verdünnungen anstelle von HPLC-H₂O DEPC-H₂O verwendet wird. Zunächst wurde das Volumen der Transkriptionsansätze durch die Zugabe von jeweils 100 µl DEPC-H₂O vergrößert. Zur Fällung der RNA wurden die Ansätze jeweils mit 1 µl tRNA als Fällungshilfe, mit 1/10 Volumen 7,5 M Ammoniumacetat sowie mit dem zweifachen Volumen reinsten Ethanols versetzt und für 30 min bei -20°C inkubiert. Die präzipitierte RNA wurde für 10 min bei 13000 rpm und 4°C pelletiert und anschließend mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Resuspendiert wurde die präzipitierte RNA in 50% Formamidlösung (FA).

Tabelle 9: verwendete Lösungen für die Sondensynthese

Bezeichnung	Zusammensetzung
DEPC-H ₂ O	0,01% DEPC in HPLC-H ₂ O verdünnen über Nacht bei RT inkubieren, autoklavieren

3.10.1.1 Hybridisierung, Antikörperbindung und Visualisierung

Das Protokoll der *in situ* Hybridisierung lässt sich in drei Teile gliedern: Als erstes erfolgte die Hybridisierung mit der RNA-Sonde. Im nächsten Schritt wurde die Sonde mit Hilfe von Antikörpern detektiert und im letzten Schritt durch eine enzymatische Reaktion sichtbar gemacht. Alle Lösungen die bis einschließlich der Hybridisierung verwendet wurden, wurden mit DEPC-H₂O angesetzt.

Tabelle 10: Lösungen bzw. Puffer für die SISH

Bezeichnung	Zusammensetzung	
B-Block-Lösung	2%	Blocking Reagent (Roche)*: Wasserbad auf 65°C erhitzen, BR portioniert unter Rühren zugeben
	1%	NaOH
	10%	Ziegen Serum
	0,1%	Tween-20 in 1x PBS
Hyb-Mix	50% (v/v)	Formamid
	5x	20x SSC
	1%	Blocking Reagent* (s. o.)
	5 mM	0,5 M EDTA
	0,1%	Tween-20
	0,1%	10% CHAPS
	0,1 mg/ml	Heparinlösung (50 mg/ml)
	1 mg/ml	tRNA (yeast, 10 mg/ml)
NTM	100 mM	Tris-HCl, pH9,5
	100 mM	NaCl
	50 mM	MgCl ₂
	0,05%	Tween-20
10x PBS/DEPC-H ₂ O	140 mM	NaCl
	26 mM	KCl
	40 mM	Na ₂ HPO ₄
	14,5 mM	KH ₂ PO ₄
PBS-T	1x	PBS
	0,1%	Tween-20
20x SSC/DEPC-H ₂ O	3 M	NaCl
	0,3 M	Natriumcitrat, pH 7 mit HCl einstellen

Alle verwendeten Reaktionsgefäße aus Glas wurden vor der Benutzung für die SISH autoklaviert. Für die Inkubationen in der Feuchtkammer wurden je nach Präparatgröße 30-80 µl der angegebenen Lösungen direkt auf das Präparat gegeben. Das Protokoll zur Durchführung der SISH ist im Folgenden dargestellt.

Vorgang:

1. Entparaffinisierung des Gewebes
2. Schrittweise Rehydrierung der Präparate

Bedingungen:

- 3x 10 min Xylol, RT
- 2x 2 min 100% EtOH

<u>Vorgang:</u>	<u>Bedingungen:</u>
(absteigende Alkoholreihe)	je 2 min 96%, 90%, 70%, 50% EtOH/PBS, RT 2x 5 min PBS, RT
3. Andauen der Präparate	10 min Proteinase K (10 µg/ml) in PBS, 37°C
4. Abstoppen der Proteinase K-Aktivität	5 min 0,2% (w/v) Glycin in PBS, RT 2x 5 min PBS, RT
5. Nachfixierung	20 min 4% PFA-PBS mit 0,2% Glutaraldehyd, RT 5 min PBS, RT
6a. Prähybridisierung	1 h, mit Hyb-Mix bei 70°C in lichtundurchlässiger Feuchtkammer, getränkt mit 50% FA und 2x SSC
6b. Denaturierung der RNA-Sonden	RNA-Sonden (mind. 1 µg/ml i. e. 5-10 µl) in Hyb-Mix, 5 min, 100°C, danach auf Eis stellen
7. Hybridisierung	über Nacht, RNA-Sonden mit Hyb-Mix bei 70°C in lichtundurchlässiger Feuchtkammer, getränkt mit 50% FA und 2x SSC
8. Abwaschen ungebundener RNA-Sonden	2x mit 2x SSC spülen 2x 35 min 50% FA 2x SSC, 65°C 3x 10 min PBS-T
9a. Abblocken unspezifischer Bindungsstellen	30 min in B-Block-Lösung, in lichtundurchlässiger Feuchtkammer, H ₂ O getränkt, RT
9b. Vorinkubation des Antikörpers (Anti-DIG-alkalische Phosphatase)	30 min 1:5000 in B-Block-Lösung, RT
10. Antikörperbindung	Inkubation für 2 h (bzw. über Nacht bei 4°C) bei RT mit der Lösung aus 9b.
11. Waschen und Umpufferung	3x 5 min PBS-T 2x 5 min NTM
12. Farbreaktion Dieser Schritt kann je nach Sonde einige Stunden bis einige Tage dauern (bei 4°C, RT oder 37°C).	1-2 Tropfen BM Purple pro Präparat hinzugeben, lichtundurchlässiger Feuchtkammer, H ₂ O getränkt, zwischendurch mikroskopische Kontrolle Färbedauer für die hier verwendeten Sonden: 2,5 d bei RT
13. Abstoppen der Farbreaktion	mit PBS spülen

<u>Vorgang:</u>	<u>Bedingungen:</u>
	1 h in 4% PFA, RT
	2x 5 min PBS
14. Kerngegenfärbung	5 min Kernechtrot, RT
	3x 5 min PBS
15. Eindeckeln mit Kaisers Glyceringelatine	2-3 Tropfen direkt auf das Präparat geben, möglichst luftblasenfrei mit Deckgläschen eindecken

3.11 Immunhistochemische Färbung mit Antikörpern

Für die immunhistochemischen Analysen verschiedener Antigene wurden Bouin's fixierte Paraffinpräparate einer Schnittdicke von 3 µm verwendet, die mit der Peroxidase-Antiperoxidase-ABC-Färbung nach Hsu *et al.* (1981a und b) mittels spezifischer Antikörper gefärbt wurden. Hierzu wurde das Vectastain Elite ABC Kit (Vector Laboratories) verwendet, welches Ziegenserum, den biotinylierten Sekundärantikörper und das ABC-Gemisch enthielt. Als Substrat für die Peroxidase dient 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) in H₂O, das mit einer bräunlichen bis schwarz-grauen Färbung reagiert. Für die Herstellung des DAB-Substrates wurde das Vectastain DAB Substrat Kit (Vector Laboratories) benutzt. Während der Durchführung wurde sich strikt an die vom Hersteller mitgelieferten Protokolle gehalten. Die Lösungen, mit denen das Präparat in der Feuchtkammer inkubiert, wurden direkt auf das Präparat pipettiert (30-80 µl). Im Folgenden wurde das Protokoll für die Apoptosedetektion mittels aktivierter Caspase-3 (Verdünnung 1:80), für die Detektion der Proliferation durch Ki67 (Verdünnung 1:100), sowie die immunhistochemische Detektion von DMT1, Ferritin (affinitätsaufgereinigter Antikörper aus Kaninchen gegen DMT1 und L-Ferritin, Verdünnung 1:400) und Ferroportin (affinitätsaufgereinigter anti-Ferroportin-Antikörper (MAP24) aus Kaninchen, Verdünnung 1:200) zusammengefasst. Als Negativkontrolle für die Caspase-3-Immunfärbung wurde das Caspase-3-Antiserum eine Stunde vor Zugabe auf das Präparat mit aktiviertem Caspase-3-Protein geblockt. Als Negativkontrolle für die anderen Antikörper wurde die Zugabe des Primärantikörpers ausgelassen. Die immunhistochemische Antikörperfärbung wurde folgendermaßen durchgeführt:

<u>Vorgang:</u>	<u>Bedingungen:</u>
1. Entparaffinisierung des Gewebes	3x 5 min Xylol, RT
2. Wechsel ins alkoholische Milieu	2x 5 min Isopropanol, RT
3. Schrittweise Rehydrierung der Präparate (absteigende Alkoholreihe)	je 5 min 96%, 90%, 70%, 50% EtOH, RT 3x 5 min dH ₂ O, RT

<u>Vorgang:</u>	<u>Bedingungen:</u>
	1x 5 min PBS, RT
4. Antigendemaskierung	Erhitzen in der Mikrowelle in 10 mM Natriumcitrat-Puffer (pH 6) für 6-7 min bei 900 Watt und danach bei 450 Watt ca. 6-7 min, anschließend auf RT abkühlen lassen
5. Waschen	3x 5 min dH ₂ O, RT
6. Inhibierung endogener Peroxidasen	10 min in 1% H ₂ O ₂ (v/v) in dH ₂ O bei RT
7. Waschen	3x 5 min dH ₂ O, RT
	1x 5 min PBS, RT
8. Abblocken unspezifischer Bindungsstellen	1 h in 6% bzw. 10%* (v/v) Ziegen Serum PBS 1% bzw. 0,1%* BSA (w/v) in lichtundurchlässiger Feuchtkammer bei RT
9a. Absättigung des Caspase-3-Primärantikörpers durch Caspase-3-Peptidbindung	1 h Anti-aktivierte Caspase-3 (1:80 (v/v)) mit blocking Peptid (1:10 (v/v)) in 6% (v/v) Ziegen Serum PBS 1% BSA (w/v) auf Eis vor der Zugabe auf das Präparat inkubieren
9b. Antikörperbindung	über Nacht Inkubation des jeweiligen Primärantikörpers in 6% bzw. 10%* (v/v) Ziegen Serum PBS 1% bzw. 0,1%* BSA (w/v) bzw. Caspase-3-Blocking-Lösung (aus 9a.) in lichtundurchlässiger Feuchtkammer bei 4°
10. Waschen	3x 5 min PBS, RT
11. Bindung des biotinylierten Sekundärantikörpers	30 min 1:250 (v/v) Kaninchen-IgG-Antikörper in PBS, lichtundurchlässiger Feuchtkammer, RT
12. Waschen	3x 5 min PBS, RT
13. ABC-Komplexbildung	30 min 1:250 Mischung aus Reagenz A (Avidin) und Reagenz B (biotinylierte Peroxidase) in PBS, lichtundurchlässiger Feuchtkammer, RT (Mischung von Reagenz A und B soll 30 min auf Eis vorinkubieren)
14. Waschen	3x 5 min PBS, RT
15. Enzymatische Färbung	30-80 µl DAB Substrat-Lösung pro Präparat; Farbentwicklung erfolgte bei RT für maximal 3 min unter mikroskopischer Kontrolle
16. Abstoppen der Farbreaktion	in dH ₂ O, RT

Vorgang:

17. Kerngegenfärbung
18. Bläuen
15. Eindeckeln mit Kaisers Glyceringelatine

Bedingungen:

- 7-10 min Mayers Hämalaun 1:10 in dH₂O
- 10 min mit fließendem Leitungswasser wässern
- 2-3 Tropfen direkt auf das Präparat geben, möglichst luftblasenfrei mit Deckgläschen eindecken

Die mit * gekennzeichneten Angaben beziehen sich hierbei auf die Verwendung des DMT1-, L-Ferritin- und Ferroportin-Antikörpers.

3.12 TUNEL-Assay

Als zusätzliche Methode zur Apoptosedetektion wurde der TUNEL-Assay (*terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) -mediated deoxyuridinetriphosphate (dUTP) nick end labeling*) angewendet. Bei diesem Assay werden einzel- oder doppelsträngige DNA-Strangbrüche, die als eines der Endprodukte der Apoptosekaskade anfallen, markiert. Dabei binden Digoxigenin (DIG)-gekoppelte Nukleotidtriphosphate und ungelabelte Nukleotidtriphosphate an freie 3'-OH-Enden der DNA-Bruchstücke, katalysiert durch die Terminale Deoxynucleotidyl-Transferase (TdT). Die DIG-markierten Nukleotide werden anschließend in einem weiteren Schritt von einem Peroxidase-gekoppelten DIG-Antikörper gebunden und die Peroxidase setzt in einer enzymatischen Reaktion das zugefügte DAB-Substrat um, so dass es zu einer permanenten Färbung apoptotischer Zellen kommt. Für die TUNEL-Methode wurden Paraffinschnitte Bouin's-fixierter Gewebe einer Schnittdicke von 3 µm verwendet. Die Durchführung erfolgte mit dem ApopTag[®] plus Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit (Millipore) strikt nach den Anweisungen des Herstellers. Die Negativkontrolle wurde ohne Zugabe des TdT-Reagenzes durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten die im Kit mitgelieferten Schnitte von Rattenbrustdrüsenewebe. Die einzelnen Schritte des Protokolls sind im Folgenden dargestellt.

Vorgang:

1. Entparaffinisierung des Gewebes
2. Schrittweise Rehydrierung der Präparate (absteigende Alkoholreihe)
3. Andauen der Präparate
4. Waschen
5. Inhibierung endogener Peroxidasen

Bedingungen:

- 3x 5 min Xylol, RT
- 2x 5 min 100% EtOH
- je 3 min 95%, 80%, 70% EtOH, RT
- 1x 5 min PBS, RT
- 15 min Proteinase K (20 µg/ml) in PBS, RT
- 2x 3 min dH₂O, RT
- 5 min in 3% H₂O₂ (v/v) in dH₂O bei RT

6. Waschen	2x 5 min PBS, RT
7. Äquilibrieren	mind. 10 s 75 µl pro Präparat <i>Equilibration Buffer</i> , RT
8. TdT-Enzym-Reaktion	<i>Working Strength TdT-Enzyme</i> 1:3 in <i>Reaction Buffer</i> verdünnen 1 h 25-50 µl pro Präparat in lichtundurchlässiger Feuchtkammer bei 37°C
9. Abstoppen der Reaktion	<i>Working Strength Stop/Wash Buffer</i> 1:34 mit dH ₂ O verdünnen Schnitte für ca. 15 s in der Lösung bewegen, anschließend 10 min bei RT inkubieren
10. Waschen	3x 2 min PBS, RT
11. Bindung des DIG-Peroxidase-Antikörpers	30 min 25-50 µl Anti-DIG-Konjugat in lichtundurchlässiger Feuchtkammer, RT
12. Waschen	3x 5 min PBS, RT
13. Enzymatische Farbreaktion	<i>Working Strength Peroxidase Substrate</i> 1:50 in <i>DAB Dilution Buffer</i> verdünnen 25-50 µl pro Präparat; Farbentwicklung erfolgte bei RT für maximal 3 min unter mikroskopischer Kontrolle
14. Abstoppen der Farbreaktion	in dH ₂ O 3x 2min dH ₂ O
15. Kerngegenfärbung	7-10 min Mayers Hämalaun 1:10 in dH ₂ O
16. Bläuen	10 min mit fließendem Leitungswasser wässern
17. Eindeckeln mit Kaisers Glyceringelatine	2-3 Tropfen direkt auf das Präparat geben, möglichst Luftblasenfrei mit Deckgläschen eindecken

3.13 Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern

Bei der indirekten Fluoreszenzmarkierung bindet der Primärantikörper kovalent sein spezifisches Antigen und kann anschließend durch die Zugabe eines fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers, der spezifisch die Immunglobuline einer bestimmten Spezies erkennt (und zwar die in der der Primärantikörpers hergestellt wurde), detektiert werden. Als fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper diente anti-Kaninchen IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment (Alexa Fluor[®] 555 Konjugat)

von Invitrogen. Für die indirekte Fluoreszenzfärbung wurden sowohl Bouin's- als auch PFA-fixierte in Paraffin eingebettete Gewebe einer Schnittdicke von 3-5 µm verwendet. Die indirekte Fluoreszenzfärbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

<u>Vorgang:</u>	<u>Bedingungen:</u>
1. Entparaffinisierung des Gewebes	3x 7 min Xylol, RT
2. Schrittweise Rehydrierung der Präparate (absteigende Alkoholreihe)	2x 5 min 100%EtOH, RT je 3 min 90%, 80%, 70%, 50% EtOH, RT 3x 5 min dH ₂ O, RT
3. Antigendemaskierung	Erhitzen in der Mikrowelle in 10 mM Natriumcitrat-Puffer (pH 6) für 6-7 min bei 900 Watt und danach bei 450 Watt ca. 6-7 min, anschließend auf RT abkühlen lassen
4. Waschen	3x 5 min dH ₂ O, RT 1x 5 min PBS, RT
5. Abblocken unspezifischer Bindungsstellen	1 h in 10% (v/v) Ziegen Serum PBS 0,1% BSA (w/v) in lichtundurchlässiger Feuchtkammer bei RT
6. Antikörperbindung	über Nacht Inkubation des jeweiligen Primärantikörpers (Anti-DMT1 und Anti-L- Ferritin 1:400, Anti-Ferroportin 1:200 (v/v)) in 10% (v/v) Ziegen Serum PBS 0,1% BSA (w/v) in lichtundurchlässiger Feuchtkammer bei 4°C
7. Waschen	3x 5 min PBS, RT
8. Bindung des fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers	2 h 1:1000 (v/v) Alexa [®] 555 in PBS 0.1 BSA (w/v) in lichtundurchlässiger Feuchtkammer bei RT
9. Waschen	3x 5 min PBS, RT
10. Kernfärbung mittels Fluoreszenzfarbstoff	5 min für PFA- bzw. 1 h für Bouin's fixierte Gewebeschnitte DRAQ5 [®] 1:5000 in lichtundurchlässiger Feuchtkammer bei RT
11. Waschen	3x 5 min PBS, RT
12. Eindeckeln mit Prolong Gold Antifade Reagent	10-15 µl pro Präparat möglichst luftblasenfrei mit Deckgläschen eindecken, bei 4°C trocknen lassen und anschließend mit Nagellack abdichten

3.14 Spermienanalysen

3.14.1 Isolierung der Spermien mit der swim out-Methode

Zur Isolierung motiler Spermien wurden beide Nebenhodenschwänze präpariert. Diese wurden in Petrischalen mit 400 µl IVF-Medium (für die Motilitätsanalysen) bzw. Arbeitslösung (für die Transmissionselektronenmikroskopie, TEM) überführt und mehrfach eingestochen. Es erfolgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ für 1,5 h (Motilitätsanalysen) bzw. 45 min (TEM), die es den Spermien ermöglichte, eigenständig aus den Nebenhoden zu schwimmen (*swim out*-Methode). Anschließend wurde die Motilität gemessen und die Spermienzahl bestimmt bzw. die Spermien für die TEM fixiert.

Tabelle 11: Lösungen zur Isolierung der Spermien für die TEM

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Arbeitslösung	0,25 mM	Natriumpyruvat
	44 mM	Natriumlactat
	25 mM	NaHCO ₃
	5 mM	Glukose
	20 mM	HEPES
	3 mg/ml	BSA
	100 U/ml	Penicillin
	100 µg/ml	Streptomycin in BWW-Medium
BWW (Biggers-Whitten und Whittingham)- Medium (Biggers <i>et al.</i> , 1971)	95 mM	NaCl
	4,8 mM	KCl
	1,7 mM	CaCl ₂
	1,2 mM	KH ₂ PO ₄
	1,2 mM	MgSO ₄

3.14.2 Computerunterstützte Spermienanalyse (CASA)

Die computerunterstützte Motilitätsanalyse der isolierten Spermienproben wurde mit dem CEROS-CASA (*computer assisted sperm analysis*)-System (Version 12) von Hamilton Thorne Biosciences bestehend aus einem Computer, einem Phasenkontrastmikroskop (Olympus), einem Kamerasystem mit Bilddigitalisierer und einer beheizbaren Zählkammerhalterung (MiniTherm stage warmer), durchgeführt. Es wurden folgende Parameter gemessen: VAP (*average path velocity*), VSL (*straight line velocity*), VCL (*curvilinear velocity*), ALH (*amplitude of lateral head displacement*), BCF (*beat*

cross frequency) und STR (*straightness*). Zur Durchführung der Messung wurden jeweils 13 µl der Spermienlösung in eine Zählkammer (Hamilton Thorne) pipettiert und in der auf 37°C vorgewärmten Halterung am Mikroskop befestigt. Alle Messungen wurden mit den voreingestellten Parametern des Programms "Mouse 2" (siehe 7.1.4) vorgenommen.

3.14.3 Bestimmung der Spermienzahlen

Je nach Konzentration der Spermienlösung (siehe Abschnitt 3.14.1) wurde diese 1:10 bzw. 1:100 mit PBS-Lösung verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer unter einem Lichtmikroskop gezählt. Für jede Probe wurden acht große Quadrate ausgezählt. Die Gesamtzahl der Spermien wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Spermiengesamtzahl} = \frac{\text{Zählzahl}}{8} * 10000 * Vf * V[\text{ml}]$$

Dabei ist Vf der zum Zählen verwendete Verdünnungsfaktor der Lösung und V das Volumen der Ausgangslösung.

3.14.4 Fixierung der Spermien für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die nach der *swim out*-Methode isolierten Spermien wurden pelletiert (12 min, 800 rpm, RT) und anschließend über Nacht bei 4°C fixiert.

Tabelle 12: verwendetes Fixativ für die TEM

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Fixativ	150 mM	HEPES
	1,5%	Glutaraldehyd
	1,5%	PFA

Am folgenden Tag wurden die Spermienproben zweimal mit 150 mM HEPES gewaschen, in ca. 300 µl 150 mM HEPES resuspendiert und für die TEM-Analysen zu Herrn Prof. Meinhardt (Institut für Anatomie und Zellbiologie, Justus Liebig Universität) nach Gießen verschickt.

3.14.5 Morphologische Analyse der Spermien mittels TEM

Die weitere Probenvorbereitung wurde in Gießen von dem technischen Angestellten, Herrn Kripp, vorgenommen: Es erfolgte eine Nachfixierung mit 1% Osmiumtetroxid-Lösung. Osmiumtetroxid

vernetzt ungesättigte Doppelbindungen und führt so zu einer Stabilisierung der Probe und einer Kontrastverstärkung. Um aus den fixierten Präparaten Ultradünnschnitte anzufertigen, wurden diese zunächst in einer aufsteigenden Methanolreihe entwässert und anschließend in Epon-Harz eingebettet. Bei der Anfertigung der Ultradünnschnitte nahm ein mit Wasser gefüllter Trog im Messerblock die fertigen Schnitte auf der Wasseroberfläche auf. Von dort wurden die Ultradünnschnitte dann auf die Objektträger überführt. Als Objektträger dienten so genannte Netzträger (Grids) aus Kupfer. Diese besitzen einen Durchmesser von 2-3 mm und eine definierte Anzahl von Gitterlinien, die in Maschen angegeben werden, also den Gitterlinien pro inch. Je höher die Maschenzahl, desto dichter liegen die Linien. Die verwendete Gitterlinienzahl wird abhängig von den betrachteten Proben gewählt. Die Netzträger wurden vor dem Aufbringen der Proben mit einer 20-30 nm dicken Folie beschichtet. Vor der elektronenmikroskopischen Analyse wurde die Probenoberfläche im Vakuum für 15 min bedampft, wodurch eine Kontrastverstärkung erzeugt wurde. Als Materialien hierfür können Platin, Kohlenstoff und Wolfram verwendet werden.

Die morphologische Auswertung der verschiedenen Spermienproben erfolgte am Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss EM 902; siehe Abbildung 13) in Gießen mit freundlicher Unterstützung von Prof. Meinhardt und der technischen Assistenz von Herrn Kripp.

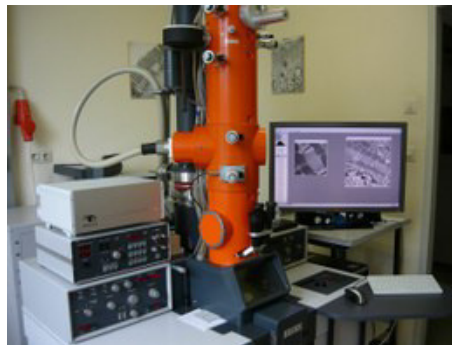


Abbildung 13: Transmissionselektronenmikroskop Zeiss EM 902

3.14.5.1 Quantifizierung der mitochondrialen Profile mittels TEM

Es wurden jeweils mindestens vier Längsschnitte (abhängig von der Größe des Längsschnittes; siehe Abbildung 14) von Spermischwänzen pro Genotyp und Gruppe (Kontrolle und Mäuse mit sechs Wochen Eisenmangel) bei 12000-facher Vergrößerung fotografiert. Anschließend wurden die mitochondrialen Profile gezählt und dabei in folgende Gruppen eingeteilt: normal, schwach bis mittelstark und stark vakuolisiert. Von diesen wurde dann der prozentuale Anteil im Verhältnis zur Gesamtzahl der mitochondrialen Profile ermittelt.

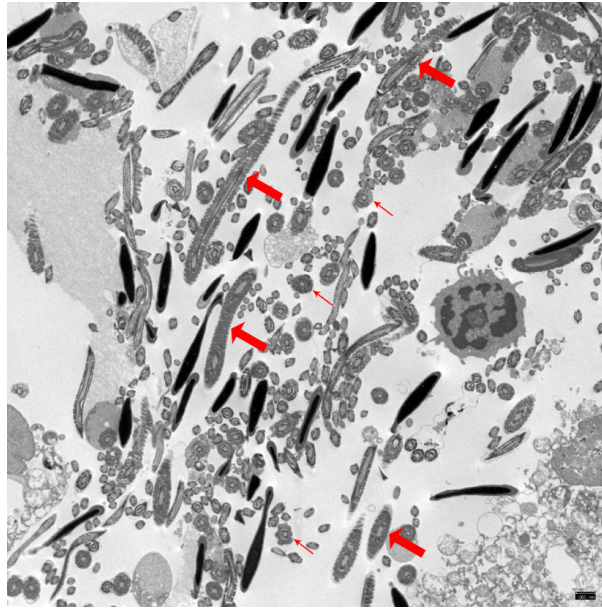


Abbildung 14: Übersicht einer TEM-Aufnahme einer Spermienprobe. 800x vergrößert; fette Pfeile deuten auf längs und dünne auf quer angeschnittene Mittelstücke der Spermien. Die Spermienmittelstücke enthalten die dicht und ringförmig an den äußeren Ringfasern angelagerten Mitochondrien. Ein einzelnes solch ringförmiges Gebilde wird als mitochondriales Profil bezeichnet.

3.15 Zucht und Haltung von Labormäusen

Die Haltungs- und Behandlungsbedingungen der Versuchstiere entsprachen dem Deutschen Tierschutzgesetz und den Internationalen *Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals*. Bei der zuständigen Behörde wurden alle vorgenommenen Prozeduren an den Versuchstieren beantragt und zuvor genehmigt. Verwendete Wildtypmäuse des Stammes C57BL/6J wurden von Charles River (JAX[®] Maus-Stocknummer: 000664) bezogen. Die Haltung der C57BL/6J-, der *knock out* Mäuse der Linien *Ireb2*^{tm1Roua} (*Irp2*) und *Acol*^{tm1Roua} (*Irp1*) erfolgte im Zentralen Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover in Gruppen von je zwei bis fünf Mäusen pro Käfig in einem Raum mit kontrolliertem, zwölfstündigem Hell-Dunkel-Rhythmus, 21±1°C Raumtemperatur und freiem Zugang zu Wasser und pelletierter Zuchtdiät (Altromin). Für die DNA-Extraktion zu Genotypisierungszwecken der Mäuse wurde etwas Ohrgewebe entnommen. Zur Organentnahme wurden die Tiere durch das Inhalationsnarkotikum Isofluran (Baxter, Unterschleißheim) und anschließend Genickbruch getötet.

3.15.1 Eisenmangelbedingungen

Im Rahmen der genehmigten Fütterungsexperimente (Tierversuchsantrag #33.9-42502-04-09/1784) mit der Eisenmangeldiät (Altromin, #C1038 5,155 mg/kg vs. "normal" 165 mg/kg Eisen) wurden die Nachkommen ab einem Alter von ca. zwei Wochen bereits im Käfig der Elterntiere vor dem Absetzen mit dem speziellen Diätfutter versorgt und nach dem Absetzen von der Mutter die männlichen Nachkommen weiterhin mit der Eisenmangeldiät über einen Zeitraum von drei, sechs und neun Wochen gefüttert. Während dieser Zeit wurden die Männchen mit autoklaviertem Millipore-H₂O getränkt. Für die Fertilitätsanalysen wurde zu ca. sechs Wochen gefütterten Männchen für fünf Tage jeweils ein normal gefüttertes Weibchen gesetzt. Anschließend wurden die Weibchen von den Männchen wieder separiert und eine Schwangerschaft abgewartet.

3.15.2 Generierung von *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäusen

Zunächst wurden homozygote *Irp1*- und *Irp2*-Mäuse miteinander verpaart, anschließend wurden *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{+/-}-Männchen und Weibchen zur Generierung von *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{+/-}-Mäusen verwendet. Aus Verpaarungen von Mäusen des Genotyps *Irp1*^{-/-};*Irp2*^{+/-} mit *Irp2*^{-/-}-Mäusen resultierten schließlich die in den Experimenten verwendeten *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäuse. Diese Tiere hatten aufgrund der starken Ausprägung des neuronalen Phänotyps eine Lebenserwartung von ca. sechs Monaten (eigene Beobachtungen). Zur Fertilitätsüberprüfung wurden *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäuse entweder mit C57BL/6J oder Tieren desselben Genotyps verpaart.

3.16 Blutentnahme und Bestimmung des Hämatokritwertes

Der Hämatokritwert gibt den prozentualen Anteil von Blutzellen (hauptsächlich rote Blutkörperchen) im Blutvolumen an. Zur Bestimmung des Hämatokritwertes der Mäuse wurde der retrobulbäre Venenplexus einen Tag vor der geplanten Gewebeentnahme punktiert. Hierzu wurden spezielle dafür vorgesehene Hämatokritröhrchen verwendet. Nach der Blutentnahme wurden diese mit Kitt verschlossen. Anschließend wurden die Röhrchen für 10 min bei RT und bei 13000rpm zentrifugiert. Durch die Zentrifugation werden die schwereren Blutzellen vom Plasma getrennt. Die Röhrchen wurden dann in einen Mikro-Hämatokrit-Reader gelegt und die Phasentrennungslinie von der Skala abgelesen.

3.17 Statistische Analysen

Statistische Analysen für die immunhistochemischen Auswertungen, Vergleiche der Spermienzahlen, der Fertilitätsanalysen, der ATP-Gehalte der Spermien und die Analyse der mitochondrialen Profile der verschiedenen Mauslinien wurden im Institut für Biometrie mit dem Programm SPSS für Windows (*Statistical Package for the Social Sciences*) durchgeführt. Als statistische Tests wurden der erweiterte t-Test, der LSD (Least Significant Difference)-Test nach Fisher und die Bonferroni-Korrektur, der Mann-Whitney-U-Test und der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Unterschiede der Daten wurden als signifikant beurteilt, wenn die ermittelten p-Werte kleiner als 0,05 waren. Als hochsignifikant wurden Unterschiede bewertet, deren p-Werte kleiner als 0,001 waren. Die statistischen Motilitätsanalysen wurden im Institut für Humangenetik Göttingen von Herrn Dr. Pawel Grzmil mit folgenden statistischen Tests durchgeführt: ANOVA, Kolmogorov-Smirnov-Test, Mann-Whitney-U-Test und Kruskal-Wallis-Test. Hierbei galten Unterschiede als signifikant, wenn die resultierenden p-Werte kleiner als 0,001 waren.

3.18 Kollaborationen

Diese Arbeit ist ein Teilprojekt eines durch das Niedersächsische Ministerium für Wissenschaft und Kultur und der Deutschen Technion-Gesellschaft e.V. gemeinschaftlich geförderten Projektes, das in Kollaboration mit dem Laboratory for Molecular Nutrition, Faculty of Biotechnology and Food Engineering, Technion, Haifa, Israel unter Leitung von Frau Dr. Esther G. Meyron-Holtz durchgeführt wurde. Diese stellte die *knock out* Mauslinien sowie einige Antikörper (Anti-DMT1, Anti-L-Ferritin, Anti-Ferroportin) für die Analysen zur Verfügung.

Die Klassifizierung testikulärer Zelltypen als Resultate der IF- und IHC-Färbungen sowie der SISH wurde von Herrn Prof. Meinhardt, aus der Arbeitsgruppe Reproduktionsmedizin des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Justus Liebig Universität Gießen durchgeführt. Die weiterführende Fixierung, Einbettung und die Fertigung der Ultradünnschnitte der Spermienproben für die morphologische Analyse mittels Transmissionselektronenmikroskopie wurde dort in der Arbeitsgruppe Elektronenmikroskopie durch Herrn Wolfgang Kripp vorgenommen. Die anschließende Auswertung wurde vor Ort mit der freundlichen Unterstützung von Herrn Prof. Meinhardt und Herrn Kripp von mir selbständig durchgeführt. Dabei half mir Herr Kripp bei der Bedienung des Transmissionselektronenmikroskops und Prof. Meinhardt wies mich in das Gebiet der Spermienmorphologie ein.

Die Motilitätsanalysen wurden von mir selbständig, nach Einarbeitung durch Janine Ullrich, im Institut für Humangenetik der Georg August Universität Göttingen in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Engel durchgeführt. Herr Dr. Pawel Grzmil war dort stets Ansprechpartner bei technischen Problemen und erledigte die statistischen Analysen der Messwerte.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Bleich des Zentralen Tierlabors der MHH wurde der Hämatokritwert bestimmt. Bei der Punktion des retrobulbären Venenplexus erhielt ich die freundliche Unterstützung von Anna Smoczek, die mich ebenfalls in diese Methode eingeführt hat. Frau Smoczek stellte zusätzlich das autoklavierte Millipore-H₂O zum Tränken der mit der Eisenmangeldiät gefütterten Mäuse zur Verfügung.

4 ERGEBNISSE

Der Expressionsnachweis von *Irp2*-Transkripten im Maushoden (Meyron-Holtz *et al.*, 2004a) und der Nachweis einer dramatischen Fertilitätsreduktion bei Verpaarungen von homozygoten *Irp2 knock out* Mäusen (Dr. E.G. Meyron-Holtz; persönliche Mitteilung) und *Irp1^{+/-};Irp2^{-/-}*-Mäusen (Smith *et al.*, 2006) lassen vermuten, dass das IRP/IRE-System – und vor allem IRP2 – eine Schlüsselrolle bei der Eisenhomöostase im Hoden der Maus spielt. Zur Analyse der testikulären IRP1- und IRP2-Expression wurden zuerst die testikulären *Irp1*- und *Irp2*-Transkripte mittels RT-PCR-Analysen untersucht und die testikulären *Irp2* exprimierenden Zelltypen mittels RNA *in situ* Hybridisierung identifiziert. Um zu untersuchen, welche phänotypischen Auswirkungen eine IRP2-Defizienz im Maushoden hat und wie sich ein IRP2-Verlust auf die testikuläre Eisenhomöostase auswirkt, wurden *Irp2^{-/-}*- und *Irp1^{+/-};Irp2^{-/-}*-Mäuse generiert und ein möglicher Einfluss der IRP2-Defizienz auf die Fertilität, Spermatogenese und auf die testikuläre Expression der IRP2-regulierten Proteine (DMT1, Ferritin und Ferroportin) im Vergleich zum Wildtyp analysiert. Weiterhin wurden männliche *Irp2^{-/-}*-, *Irp1^{+/-};Irp2^{-/-}* und C57BL/6J-Mäuse mit einer speziellen Eisenmangeldiät gefüttert, um so mögliche phänotypische Auswirkungen eines induzierten Eisenmangels im Wildtyp- und IRP2-defizienten Maushoden zu untersuchen. Die Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt. *Irp2 knock out* Mäuse wurden zuvor noch nicht in Bezug auf die Spermatogenese und/oder die testikuläre Eisenhomöostase analysiert.

4.1 Die Expression von *Irp1* und *Irp2* im Maushoden

Sowohl IRP1 als auch IRP2 werden in der Maus in allen bislang getesteten Organen exprimiert. Das detaillierte Expressionsmuster und Spleißverhalten von *Irp1* und *Irp2* im Hoden ist bisher noch unbekannt und wurde mittels RT-PCR-Analysen von Gesamt-RNA aus Maushoden analysiert (siehe 3.1.2 und 3.4). Da für eine immunhistochemische Expressionsanalyse der IRP-Proteine keine Antikörper verfügbar waren, wurde das testikuläre murine Transkriptionsmuster von *Irp1* und *Irp2* mittels RNA *in situ* Hybridisierung untersucht (siehe 3.10).

4.1.1 Expressionsanalyse von *Irp1* und *Irp2* mittels RT-PCR-Analysen

Aus der Gesamt-RNA aus Hoden und Niere (als abundant exprimierte Positivkontrolle, vgl. Meyron-Holtz *et al.*, 2004a; Zhang *et al.*, 2007) einer adulten Wildtypmaus wurden mittels RT-PCR jeweils *full length*-Transkripte für *Irp1* (2759 bp) und *Irp2* (2961 bp) amplifiziert und anschließend sequenziert (siehe Abbildung 15A). Zur Qualitäts- und Quantitätskontrolle der eingesetzten Gesamt-RNAs wurde parallel ein spezifisches murines *Gapdh*-Transkript von 655 bp amplifiziert (siehe Abbildung 15B).

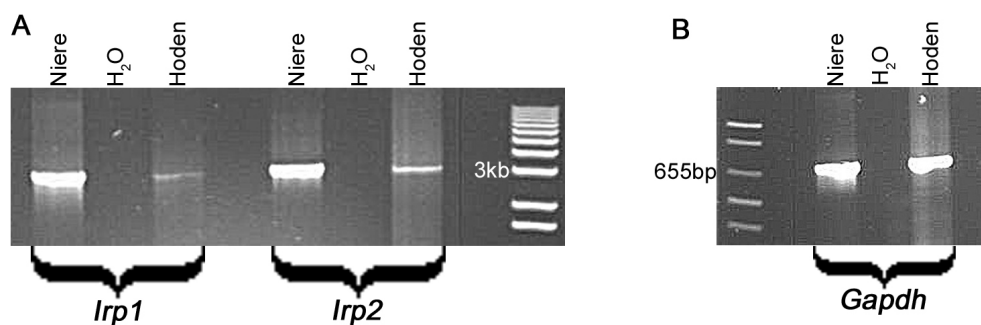


Abbildung 15: RT-PCR-Analyse der Expression von *Irp1* und *Irp2* im Maushoden. A, RT-PCR-Analysen mit den Primerpaaren *Irp1*_UTR_for bzw. *Irp2*_UTR_for und *Irp1*_UTR_rev bzw. *Irp2*_UTR_rev aus Gesamt-RNA eines adulten WT-Hodens im Vergleich zur Niere und B, als Kontrolle *Gapdh*-RT-PCR mit den Primern mGAPDH_for und mGAPDH_rev. In der äußerst rechten bzw. linken Spur ist ein DNA-Längenstandard aufgetragen, bei dem die 3 kb- bzw. 655 bp-Bande beschriftet sind. H₂O: Negativkontrolle mit Wasser statt RNA. Die *Irp*-cDNA-Produkte wurden zusätzlich sequenz-verifiziert.

Aufgrund der schwachen Expression von *Irp1* im Hoden war eine direkte Sequenzierung des *Irp1*-*full length*-cDNA-PCR-Produktes nicht möglich. Zur Sequenzverifizierung und Analyse des testikulären *Irp1*-Spleißverhaltens wurde das *full length*-cDNA-Produkt von *Irp1* deshalb zusätzlich in zwei Teilen, mit den Primerpaaren *Irp1*_UTR_for, *Irp1*_1837_rev (Exons 1-13, ca. 1,6 kb) und *Irp1*_1560_for, *Irp1*_UTR_rev (Exons 11-21, ca. 1,5 kb), amplifiziert und anschließend direkt sequenziert. Beim Sequenzvergleich der amplifizierten *Irp1*- und *Irp2*-cDNA-Produkte zeigte sich, dass beide *Irps* im Maushoden exprimiert und nach dem Maus-spezifischen Muster gespleißt werden (*Irp1*: NM_007386.2; *Irp2*: NM_022655.3). Die Expressionsstärke beider *Irp*-Transkripte fiel im Hoden schwächer aus als in der Niere. Beim Vergleich der Intensitätsstärken der amplifizierten *Irp*-Banden wurde *Irp1* im Hoden schwächer als *Irp2* exprimiert. Zusätzlich wurden Hoden eines *Kit*^{W^v}/*Kit*^{W^v}-Männchens analysiert, in denen jedoch keines der beiden *Irp*-Transkripte nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

4.1.2 *IRP2* wird ausschließlich in Spermatischen des Stadiums 8 exprimiert

Über RNA *in situ* Hybridisierung auf Schnitten (SISH) wurde die Topologie der *Irp1*- und *Irp2*-Expression im adulten Maushoden untersucht (siehe Abbildung 16 und Abbildung 17). Zur Durchführung der SISH wurden für beide *Irp*-Transkripte spezifische Antisense- und Sense-RNA-Sonden [*Irp2* SIII #16 (719 bp); *Irp1* SIII #7 (650 bp)] generiert, die aus *Irp1*- und *Irp2*-full length-Klonen amplifiziert wurden und die Exons eins bis sechs für *Irp2*, bzw. elf bis 16 für *Irp1* umfassten (siehe 3.10.1).

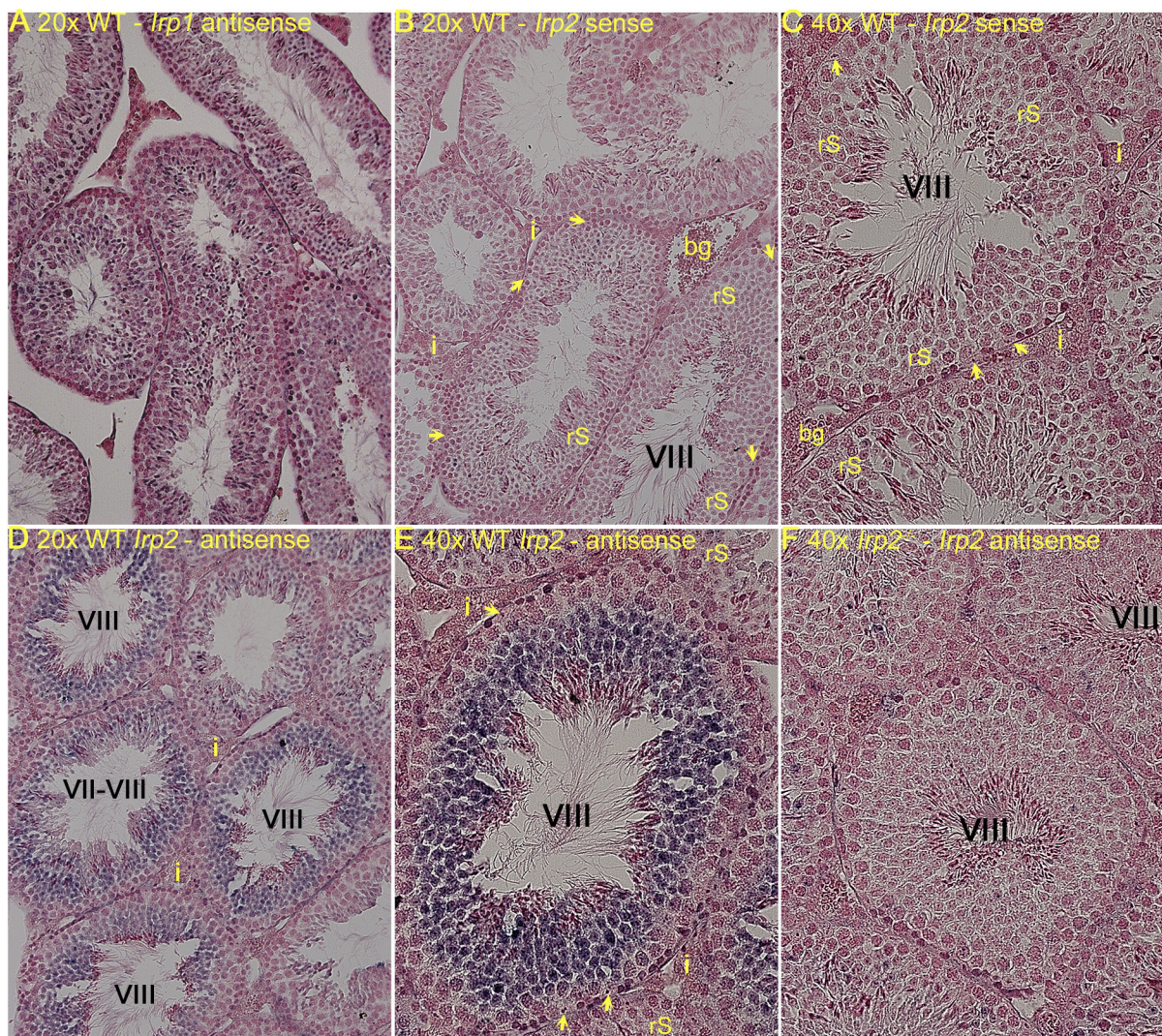


Abbildung 16: SISH-Analyse der Transkription von *Irp2* und *Irp1* im WT-Hoden. A, Die *Irp1*-Antisense-Sonde führte zu keinem Transkriptnachweis. Als Kontrolle wurde neben der *Irp2*-Antisense-Sonde (asIrp2 SIII #16) auf Hodenschnitten von *Irp2*^{-/-}-Männchen (F) die entsprechende Sense-RNA-Sonde (sIrp2 SIII #16) verwendet (B, C). Die verwendete Sonde, der Genotyp des gefärbten Gewebes und die gezeigte Vergrößerung (20x oder 40x) sind auf den einzelnen Fotos am oberen linken Rand in gelb angegeben. Die Farbentwicklung wurde in allen gezeigten Präparaten parallel und jeweils gleich lange durchgeführt. Die Zellkerne wurden mit Kernechtrot gefärbt. i: Interstitium, bg: Blutgefäße, rS: runde Spermatischen; gelbe Pfeile deuten auf Sertolizellen; römische Ziffern innerhalb der Tubuli geben das Spermatogenesestadium an.

Während die *Irp2*-Antisense-Sonde (asIrp2 SIII #16) reproduzierbar in Spermatiden des Stadiums 8 der Spermatogenesestadien VII und VIII hybridisierte (siehe Abbildung 16D und E; Abbildung 17C-F), gelang mit der eingesetzten *Irp1*-Antisense-Sonde (asIrp1 SIII #7) kein *Irp1*-Transkriptnachweis (siehe exemplarisch Abbildung 16A). Spermatiden des Stadiums 8 erscheinen kreisförmig (runde Spermatiden) und können sich in beginnender Elongation befinden (spätes Spermatogenesestadium VIII). Als Kontrollen wurden – parallel zur *Irp2*-Antisense-RNA-Sonde auf *Irp2*^{-/-}-Maus Hodenschnitten (siehe Abbildung 16F) – die *Irp2*-Sense-RNA-Sonde auf Wildtyp- (siehe Abbildung 16B und C) und *Irp1*^{-/-} (siehe Abbildung 17A und B) Hodenschnitten verwendet.

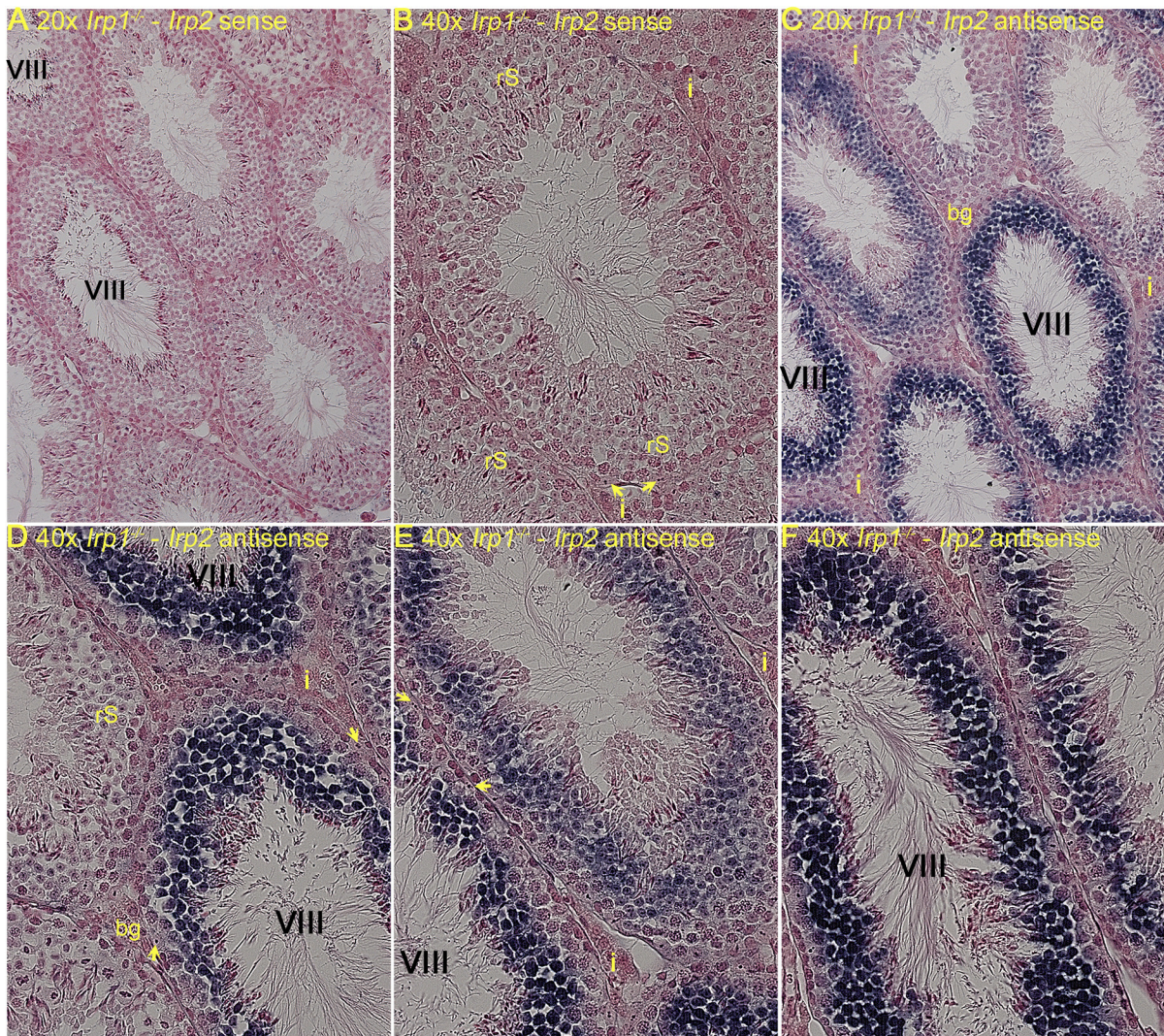


Abbildung 17: Analyse der *Irp2*-Transkripte in den Hoden von *Irp1*^{-/-}-Männchen. Neben der *Irp2*-Antisense-Sonde (asIrp2 SIII #16, C-F) wurde als Kontrolle die entsprechende Sense-RNA-Sonde (sIrp2 SIII #16, A und B) verwendet. Die verwendete Sonde, der Genotyp des gefärbten Gewebes und die gezeigte Vergrößerung (20x oder 40x) sind auf den einzelnen Fotos in gelb angegeben. Die Färbungen können direkt miteinander verglichen werden (paralleler Ansatz, gleiche Färbezeiten). Die Zellkerne wurden mit Kernechtrot gefärbt. i: Interstitium, bg: Blutgefäße, rS: runde Spermatiden; gelbe Pfeile deuten auf Sertolizellen und römische Ziffern innerhalb der Tubuli geben das Spermatogenesestadium an.

Die histologische Begutachtung und Einordnung der gefärbten Zelltypen erfolgte mikroskopisch direkt anhand der Präparate durch Herrn Prof. Meinhardt (Institut für Anatomie und Zellbiologie, Justus Liebig Universität Gießen). Das *Irp2*-Transkript wurde im C57BL/6J-Hoden ausschließlich in Spermatischen des Stadiums 8 der Spermatogenesezyklusstadien VII - VIII nachgewiesen (siehe Abbildung 16D und E). Bei *Irp1*-Defizienz wird *Irp2* ebenfalls nur in den runden und sich beginnenden elongierenden Spermatischen des Stadiums 8 exprimiert (siehe Abbildung 17), allerdings tritt die Expression bereits in früheren Spermatogenesestadien - ca. ab dem Stadium IV (siehe Abbildung 17C und E) - auf und erstreckt sich bis zum Stadium VIII (siehe Abbildung 17C, D und F). Im Gegensatz zum Wildtyp wurde *Irp2* bei *Irp1*-Defizienz innerhalb des Maushodens in Stadium VIII stärker exprimiert (vgl. Abbildung 17D und F mit Abbildung 16E). Somatische tubuläre testikuläre (wie Sertoli- und peritubuläre myoide Zellen) und interstitielle Zellen (wie Makrophagen, Leydig- und myoide Zellen der Gefäßwände) zeigten keinen *Irp2*-Expressionsnachweis mittels SISH-Analyse.

4.2 Die Rolle von IRP2 in der Spermatogenese

4.2.1 Histologische Analyse der Hoden IRP2-defizienter Mäuse

Als Einstieg in die funktionelle Analyse von IRP2 im Maushoden wurden IRP2-defiziente Hoden morphologisch und histologisch untersucht. Dabei wurden beide Hoden von adulten *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-} (zwei bis fünf Monate, n = 9), *Irp2*^{-/-} (zwei bis elf Monate, n = 31) und gleichaltrigen C57BL/6J-Mäusen (n = 31) histologisch analysiert (siehe Abbildung 18).

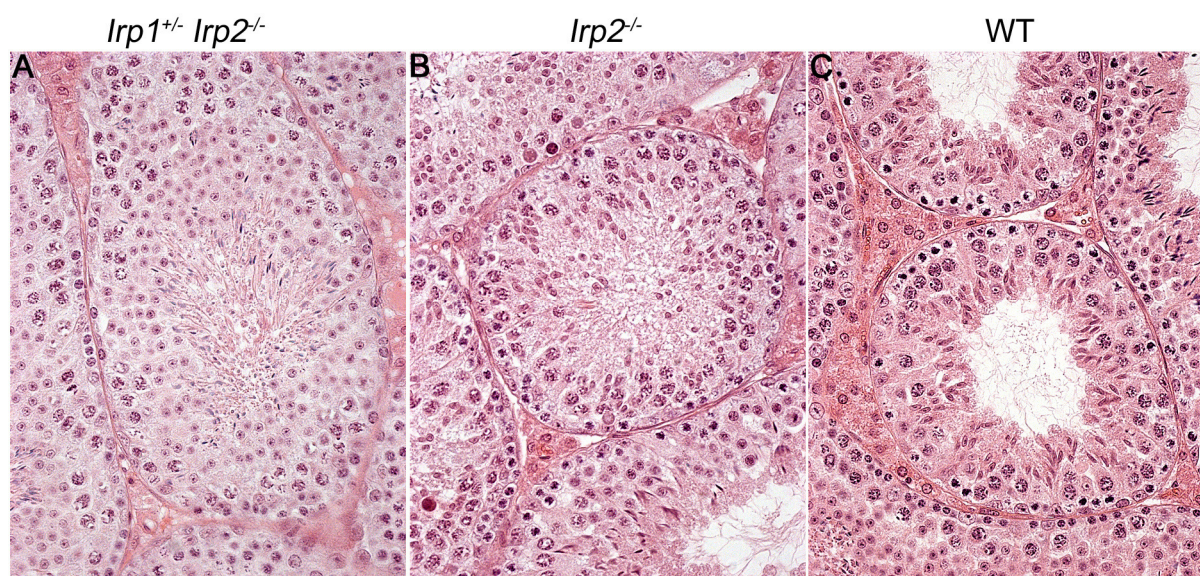


Abbildung 18: Histologie der Hoden vier Monate alter *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}, *Irp2*^{-/-} und WT-Männchen. HE-gefärbte Hodenschnitte einer *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-} (A), einer *Irp2*^{-/-} (B) und einer WT-Maus (C) im Vergleich (40-fach vergrößert). Anzahl der analysierten Individuen: *Irp2*^{-/-} und WT je n = 31 (n = 9 im Alter von zwei Monaten, drei

bis fünf Monaten $n = 17$ bzw. elf Monaten $n = 5$), und $Irp1^{+/-};Irp2^{-/-}$ aufgrund der kürzeren Lebensdauer von ca. sechs Monaten (eigene Beobachtungen) $n = 9$ im Alter von zwei bis fünf Monaten.

Die mikroskopische Begutachtung der Hodenhistologie ließ eine gute bis sehr gute Spermatogenese einschließlich Spermio-genese bei $Irp1^{+/-};Irp2^{-/-}$ (siehe Abbildung 18A), $Irp2^{-/-}$ (siehe Abbildung 18B) und Wildtypmännchen (siehe Abbildung 18C), erkennen. Ein Verlust der IRP2-Aktivität führte auch bei gleichzeitiger Verringerung der IRP1-Menge zu keinen histologischen und morphologischen Veränderungen des Hodens.

4.2.2 Das Proliferationsverhalten testikulärer Keimzellen IRP2-defizienter Mäuse

Des Weiteren wurde überprüft, ob die Abwesenheit von IRP2 im Hoden die Anzahl der Zellteilungen und/oder die Apoptoserate (siehe 4.2.3) der testikulären Keimzellen verändert. Die Proliferationsrate der testikulären Keimzellen wurde immunhistochemisch mittels Antikörperfärbung mit Anti-Ki67 quantitativ analysiert (siehe 3.11). Es wurde der relative Anteil der *Tubuli seminiferi* mit mindestens einer Ki67-immungefärbten Zelle in beiden Hoden von jeweils sieben zwei Monate alten C57BL/6J-, $Irp2^{-/-}$ - und fünf zwei Monate alten $Irp1^{+/-};Irp2^{-/-}$ -Mäusen (siehe Abbildung 19) und der relative Anteil von Ki67-immungefärbten Zellen in beiden Hoden von vier ($n = 9$) und elf ($n = 5$) Monate alten Wildtyp- und $Irp2^{-/-}$ -Männchen (siehe Abbildung 20) quantifiziert (Auswertung modifiziert nach Lee *et al.*, 1997). Für jedes analysierte Tier wurden insgesamt zwei verschiedene Schnittebenen pro Hoden untersucht.

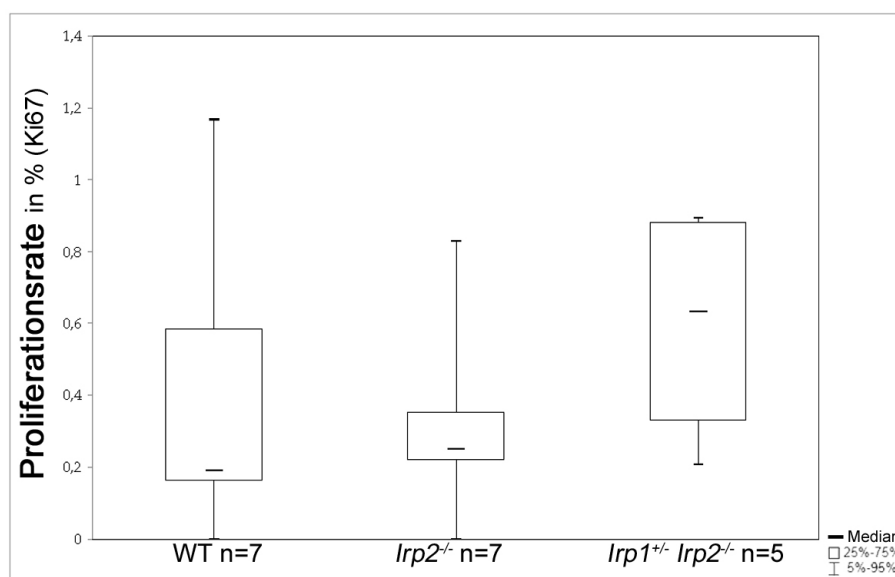


Abbildung 19: Die testikuläre keimzellspezifische Proliferationsrate von zwei Monate alten $Irp2^{-/-}$ - und $Irp1^{+/-};Irp2^{-/-}$ -Männchen im Vergleich zum WT. Es wurden je zwei Ebenen beider Hoden von n Individuen immunhistochemisch mit Ki67-Antikörper analysiert und die Hodenkanälchen mit mindestens einer positiven

Zelle in Relation zur Gesamttubulizahl gesetzt. Die resultierenden Proliferationsraten werden in Boxplots inklusive Median (Querstrich im Balken), 25. - 75. Perzentil-Intervall (Balken) und der minimalen und maximalen Streuung (Federbalken) dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant (Kruskal-Wallis-Test, $p > 0,05$).

Bei der Analyse der zwei Monate alten Tiere unterschied sich das Proliferationsverhalten der testikulären Keimzellen der drei unterschiedlichen Genotypen nicht signifikant voneinander ($p = 0,4102$; siehe Abbildung 19). Beim Vergleich der zwei Monate alten Mäuse zeigten *Irp1^{+/-};Irp2^{-/-}*-Männchen die höchste Proliferationsrate.

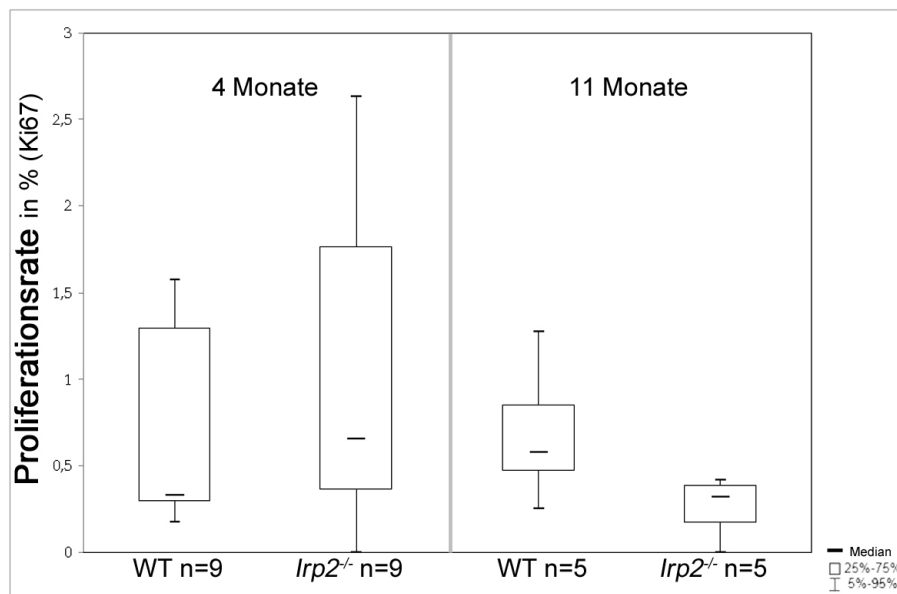


Abbildung 20: Proliferationsanalyse von älteren (vier und elf Monate) *Irp2^{-/-}*-Mäusen im Vergleich zum WT. Es wurden jeweils beide Hoden von Mäusen verschiedener Altersstadien – vier und elf Monate mit n Individuen – in je zwei unterschiedlichen Ebenen mittels Ki67-Immunfärbung untersucht. Dargestellt werden die relativen Anteile der *Tubuli seminiferi*, die mindestens eine Ki67-positive Zelle enthalten, bezogen auf die Gesamttubulizahl in Boxplots inklusive Median (Querstrich im Balken), das 25. - 75. Perzentil-Intervall (Balken) und die minimale und maximale Streuung als Federbalken). Die Unterschiede waren nicht signifikant (Zweistichproben-t-Test, $p > 0,05$).

Auch zeigten die Hoden der vier und elf Monate alten Männchen weder beim Vergleich der beiden Altersgruppen innerhalb eines Genotyps ($p_{WT} = 0,9169$; $p_{Irp2} = 0,0976$) noch beim Vergleich beider Genotypen innerhalb der einzelnen Altersgruppen ($p_{4Mo} = 0,4323$; $p_{11Mo} = 0,0584$) einen statistisch signifikanten Unterschied der Proliferationsraten der testikulären Keimzellen (siehe Abbildung 20). Tendenziell waren die Proliferationsraten von zwei Monate alten und vier Monate alten *Irp2^{-/-}*-Mäusen trotz fehlender Signifikanz etwas höher als die des Wildtyps. Interessanterweise war der p-Wert beim Vergleich der elf Monate alten C57BL/6J- und *Irp2^{-/-}*-Mäuse grenzwertig nicht signifikant. So war hier der relative Anteil der *Tubuli seminiferi* mit Ki67-immungefärbten Zellen bei *Irp2^{-/-}*-Männchen im Vergleich zum Wildtyp aber im Durchschnitt niedriger ausgefallen. Dieses Ergebnis ist gerade

deswegen bemerkenswert, weil sich der beschriebene neuronale *Irp2*^{-/-}-Phänotyp erst ab einem Alter von ca. sechs Monaten auszuprägen beginnt.

4.2.3 *Quantitative Analyse der Apoptoserate der testikulären Keimzellen von Irp2*^{-/-}*-Mäusen*

Die Analyse der Apoptose erfolgte für die bereits in der Proliferationsanalyse (siehe Abbildung 21A) verwendeten vier und elf Monate alten Kohorten mittels Immunfärbung mit einem aktivierten Caspase-3-Antikörper (siehe Abbildung 21B) und/oder mittels der TUNEL-Methode (siehe Abbildung 21C). Es wurde wie bereits in Abschnitt 4.2.2 beschrieben, der relative Anteil Tubuli mit apoptotischen Keimzellen ermittelt.

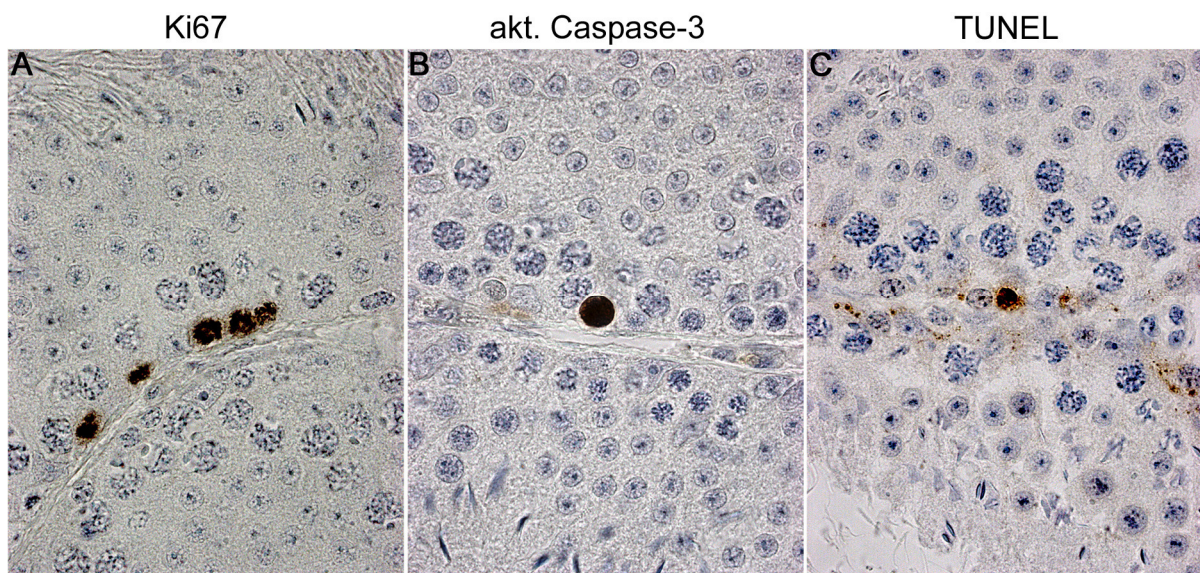


Abbildung 21: Immunhistochemische Analysen zur quantitativen Bestimmung der Proliferations- und Apoptoserate. Gezeigt wird jeweils ein Beispiel einer Antikörperfärbung eines Hodenschnittes einer adulten *Irp2*^{-/-}-Maus mit Anti-Maus Ki67 zum Nachweis proliferierender Zellen (A), mit Anti-Maus aktivierte Caspase-3 zur Detektion apoptotischer Zellen (B) und einer TUNEL-Färbung (C), ebenfalls zum Nachweis apoptotischer Zellen. Die Abbildungen wurden in 100-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hämalaun.

4.2.3.1 *Apoptosedetektion mittels aktivierter Caspase-3*

Von den vier Monate alten *Irp2*^{-/-}- und C57BL/6J-Männchen wurde mittels aktivierter Caspase-3-Antikörpers immunhistochemisch jeweils nur eine Schnittebene beider Hoden analysiert, während von den elf Monate alten Mäusen jeweils zwei Hodenebenen untersucht wurden (siehe 3.11).

In keinem der beiden untersuchten Altersstadien wurde über aktivierte Caspase-3-Immundetektion beim Vergleich der beiden Genotypen ein statistisch signifikanter Unterschied ($p_{4M_0} = 0,874$; $p_{11M_0} = 0,322$) in der keimzellspezifischen Apoptoserate zwischen *Irp2*^{-/-}- und C57BL/6J-Männchen

gezeigt (siehe Abbildung 22). Auch beim Vergleich der beiden Altersstadien wurde kein signifikanter Unterschied in den Apoptoseraten von Wildtyp- und *Irp2*^{-/-}-Männchen detektiert ($p_{WT} = 0,9077$; $p_{Irp2} = 0,5404$).

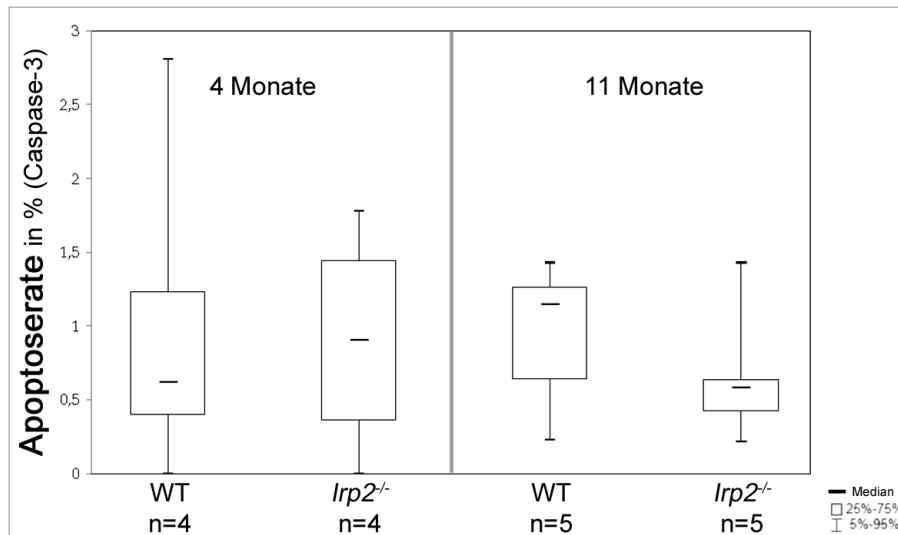


Abbildung 22: Analyse der mittels aktivierte Caspase-3-Antikörpers detektierten apoptotischen testikulären Keimzellen von *Irp2*^{-/-}-Männchen verglichen mit dem WT. Es wurden zwei Altersstadien – jeweils n Individuen im Alter von vier und elf Monaten – immunhistochemisch untersucht. Von der vier Monate alten Kohorte wurde jeweils eine und von der elf Monate alten jeweils zwei Schnittebenen analysiert. Die Apoptoseraten in % sind in Boxplots mit Median (Querstrich im Balken), dem 25. - 75. Perzentil-Intervall (Balken) und der minimalen und maximalen Streuung (Federbalken) dargestellt. Es resultieren keine signifikanten Unterschiede (Zweistichproben-t-Test, $p > 0,05$).

Als Negativkontrolle wurde der Antikörper vor der Zugabe auf das Präparat spezifisch mit Peptid geblockt. Die bei fast jeder Analyse mitgeführte geblockte Kontrolle zeigte keine spezifischen Färbungen (Daten nicht gezeigt), was bedeutet, dass die analysierten aktivierten Caspase-3-Färbungen spezifisch waren und nur apoptotische testikuläre Keimzellen in der Quantifizierung berücksichtigt wurden.

4.2.3.2 Apoptosedetektion mit dem TUNEL-Assay

Für die Apoptosedetektion mittels TUNEL-Assays (siehe 3.12) wurden von je fünf elf Monate alten C57BL/6J- und *Irp2*^{-/-}-Mäusen jeweils zwei Ebenen beider Hoden untersucht. Das Ergebnis der TUNEL-Färbung steht in Einklang mit dem der aktivierten Caspase-3-Immundetektion. So bestand kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,081$) in der Apoptoserate bei elf Monate alten *Irp2*^{-/-}- und Wildtypmännchen. Allerdings zeigten die *Irp2*^{-/-}-Mäuse einen Trend zu einer verminderten Apoptoserate im Vergleich zum Wildtyp (siehe Abbildung 23).

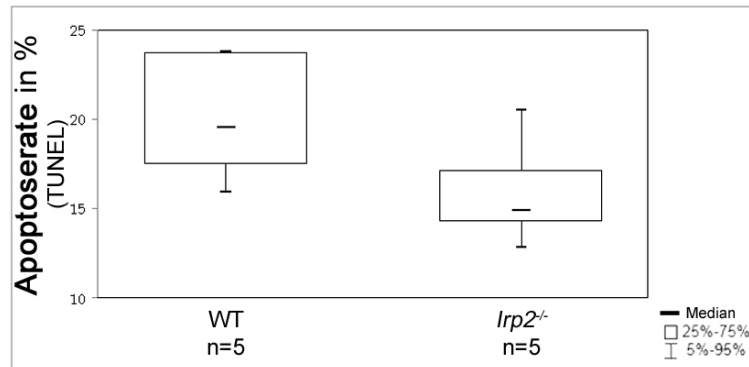


Abbildung 23: Die testikuläre keimzellspezifische Apoptoserate von *Irp2*^{-/-}- und WT-Männchen mit der TUNEL-Methode. Es wurden jeweils zwei Schnittebenen beider Hoden von n elf Monate alten Individuen untersucht. Gezeigt werden die relativen Anteile der *Tubuli seminiferi* mit mindestens einer TUNEL-positiven Zelle bezogen auf die Gesamttubulizahl als Boxplots mit Median (Querstrich im Balken), 25. - 75. Perzentil-Intervall (Balken) und der minimalen und maximalen Streuung als Federbalken. Die Unterschiede waren nicht signifikant (Zweistichproben-t-Test, $p > 0,05$).

Zusammenfassend differierten die testikulären Keimzellen von *Irp2*^{-/-}- und Wildtypmännchen nicht signifikant in ihren keimzellspezifischen Proliferations- und Apoptoseraten. IRP2 scheint daher keinen entscheidenden Einfluss auf die testikuläre Proliferation oder Apoptose zu nehmen.

4.3 Fertilitätsanalysen von IRP1- und IRP2-defizienten Mäusen

Ausgehend von der Annahme, dass IRP2-defiziente Männchen eine beeinträchtigte Fertilität besitzen (für *Irp2*^{-/-}: Dr. E.G. Meyron-Holtz; persönliche Mitteilung; für *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}: Smith *et al.*, 2006), wurden die Wurfzahlen von *Irp1*^{-/-}, *Irp2*^{-/-}, *Irp1*^{-/-};*Irp2*^{+/-}, *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-} und C57BL/6J-Mäusen miteinander verglichen (siehe Tabelle 13). Das Geschlechterverhältnis der Nachkommen der verschiedenen Gruppen lag erwartungsgemäß bei annähernd 50% Männchen und Weibchen. Es bestanden mit Ausnahme der *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Verpaarungen keine signifikanten Unterschiede bei den durchschnittlichen Wurfgrößen der analysierten Genotypen. Zuchtpaare des Genotyps *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-} zeigten im Vergleich zu anderen Genotypen eine signifikant erniedrigte durchschnittliche Wurfgröße ($p = 0,015$; siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Fertilitätsanalysen von Zuchtpaaren mit unterschiedlichen *Irp1*- und *Irp2*-Genotypen. Dargestellt ist die durchschnittliche Wurfgröße pro Wurfzahl als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) \pm Standardabweichung (s) von (n) untersuchten Zuchtpaaren, sowie die Gesamtzahl der Nachkommen und der Würfe (Kruskal-Wallis-Test: $p < 0,05$ signifikant ^(*)). Bei Verpaarungen mit *Irp1*^{+/+};*Irp2*^{-/-}-Individuen wurde kein Geschlechterverhältnis ermittelt (n. d. = nicht durchgeführt).

Genotyp der Zuchtpaare (n)	durchschnittliche Wurfgröße $\bar{x} \pm s$	Anzahl der Nachkommen	Geschlechterverhältnis in % ♂/♀	Wurfzahl
WT ♀, ♂ (18)	5,9 \pm 2,6	411	48,17 / 51,83	70
<i>Irp1</i> ^{-/-} ♀, ♂ (10)	5,5 \pm 2,2	224	52,05 / 47,95	41
<i>Irp2</i> ^{-/-} ♀, ♂ (21)	5,4 \pm 2,5	558	49,89 / 50,11	103
<i>Irp2</i> ^{-/-} ♀ x <i>Irp1</i> ^{-/-} ; <i>Irp2</i> ^{+/+} ♂ (12)	5,4 \pm 2,4	211	50,70 / 49,30	39
WT ♀ x <i>Irp1</i> ^{+/+} ; <i>Irp2</i> ^{-/-} ♂ (8)	6,7 \pm 1,9	60	n. d.	9
<i>Irp1</i> ^{+/+} ; <i>Irp2</i> ^{-/-} ♀, ♂ (7)	3,2 \pm 2,0 ^(*)	41	n. d.	13

Verpaarungen von *Irp1*^{+/+};*Irp2*^{-/-}-Männchen mit C57BL/6J-Weibchen resultierten allerdings in durchschnittlich höheren Wurfzahlen und Verpaarungen von *Irp1*^{+/+};*Irp2*^{-/-}-Weibchen mit C57BL/6J-Männchen in durchschnittlichen Wurfzahlen (durchschnittliche Wurfgröße 5,3 \pm 1,4; n = 2 mit 13 Würfen, Daten nicht gezeigt), die dem Wildtyp entsprachen (siehe Tabelle 13). Folglich kann eine Beeinträchtigung der Fertilität durch IRP2-Defizienz ausgeschlossen und auch nicht auf *Irp1*^{+/+};*Irp2*^{-/-}-Weibchen zurückgeführt werden. Eine mögliche Erklärung der signifikant reduzierten durchschnittlichen Wurfgröße aus *Irp1*^{+/+};*Irp2*^{-/-}-Zuchtpaaren könnte in einer verminderten Überlebensrate der Nachkommen liegen. Tatsächlich wurde bereits gezeigt, dass *Irp1*^{-/-};*Irp2*^{-/-}-Embryonen, die hier mit einer Wahrscheinlichkeit von 25 % nur bei *Irp1*^{+/+};*Irp2*^{-/-}-Verpaarungen untereinander auftraten, noch vor der Implantation in die Uterusschleimhaut absterben (Smith *et al.*, 2006) und daher nicht in der Statistik auftauchten.

4.4 Spermienanalysen von Mäusen mit IRP2-Defizienz

Zur weiteren Analyse eines Einflusses einer IRP2-Defizienz auf die Spermiogenese wurde die Spermienzahl und Spermienmotilität von *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/+};*Irp2*^{-/-}-Männchen im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Dazu wurden die Spermatozoen aus dem Nebenhodenschwanz (*Cauda epididymis*) nach der swim out-Methode isoliert (siehe 3.14.1).

4.4.1 Die Spermienquantität IRP2-defizienter Männchen

Die aus beiden Nebenhodenschwänzen isolierten Spermien von zwei bis fünf Monate alten *Irp2*^{-/-}, *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-} und C57BL/6J-Mäusen wurden nach entsprechender Verdünnung (1:10 und 1:100 in Abhängigkeit der Konzentration) in der Neubauerzählkammer gezählt (siehe 3.14.3) und die Spermienzahlen ermittelt (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Analyse der Spermienzahlen von WT-, *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäusen. Die Anzahl der Spermien ist als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) \pm Standardabweichung (s) in Millionen von (n) untersuchten Individuen angegeben. Die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant (Kruskal-Wallis-Test, $p > 0,05$).

Genotyp	Spermienzahlen (10^6) $\bar{x} \pm s$	Zahl der Individuen (n)
WT	5,76 \pm 4,498	29
<i>Irp2</i> ^{-/-}	7,052 \pm 3,907	22
<i>Irp1</i> ^{+/-} ; <i>Irp2</i> ^{-/-}	9,341 \pm 4,696	8

Es existierte kein signifikanter Unterschied ($p = 0,062$) in den durchschnittlichen Spermienzahlen von *Irp2*^{-/-}, *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-} und Wildtypmännchen. Allerdings stieg die durchschnittliche Spermienzahl von *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Tieren im Vergleich zum Wildtyp graduell an.

4.4.2 Spermien von *Irp2*^{-/-}-Männchen sind hyperaktiviert

Spermien haben ein spezifisches (Vorwärts-) Bewegungsmuster, das durch die im Folgenden beschriebenen Geschwindigkeitsparameter (VAP, VSL, VCL) und Bewegungscharakteristika (ALH; BCF; STR) beschrieben werden kann (siehe auch Einleitung, Abbildung 10). VAP, VSL und VCL sind Geschwindigkeiten (Einheit $\mu\text{m/s}$), die über unterschiedliche, von Spermatozoen zurückgelegte Strecken pro Zeiteinheit errechnet werden: Die Weggeschwindigkeit VAP gibt den durchschnittlich gemittelten Weg an, für die Errechnung der progressiven Geschwindigkeit VSL hingegen wird die direkte Verbindung zwischen Anfangs- und Endpunkt des Gesamtweges berücksichtigt und die Bahngeschwindigkeit VCL wird über den tatsächlich zurückgelegten Weg des Spermiums ermittelt. Die Amplitude des seitlichen Kopfausschlags ALH ist die seitliche Auslenkung des Spermienkopfes in μm von der gemittelten Bahn. Die Schlagfrequenz BCF berechnet sich aus der durchschnittlichen Anzahl der Kreuzungspunkte der totalen Distanz (über die die VCL bestimmt wird) und dem durchschnittlichen Weg (VAP) pro Zeiteinheit und wird in Hertz gemessen. Die Geradlinigkeit STR gibt die Progressivität der Bewegung an und wird durch den Quotienten VSL/VAP errechnet.

Die aus den Nebenhodenschwänzen isolierten Spermien wurden mit einem computerunterstützten Spermienanalyseprogramm gemessen (siehe 3.14.2). Die Mittelwerte mit den entsprechenden

Standardabweichungen für die einzelnen Motilitätsparameter der zu vergleichenden Gruppen (WT, *Irp2^{-/-}* und *Irp1^{+/-};Irp2^{-/-}*) sind in Tabelle 15 zusammengestellt. Von jedem Genotyp wurden N Spermien von n Individuen analysiert.

Tabelle 15: Spermienmotilitätsanalysen von adulten WT-, *Irp2^{-/-}* und *Irp1^{+/-};Irp2^{-/-}*-Männchen. Die Geschwindigkeitsparameter (VAP, VSL, VCL), die seitliche Amplitude des Kopfausschlags (ALH), die Schlagfrequenz (BCF) und die Geradlinigkeit (STR) der Spermien sind als arithmetische Mittelwerte (\bar{x}) \pm Standardabweichung (s) von n untersuchten Individuen und N analysierten Spermien dargestellt (Kruskal-Wallis-Test: $p < 0,001$ signifikant (*) vgl. mit WT). VAP: Weggeschwindigkeit, VSL: progressive Geschwindigkeit, VCL: Bahngeschwindigkeit, ALH: seitliche Amplitude des Kopfausschlags, BCF: Schlagfrequenz, STR: Geradlinigkeit.

	WT n = 21; N = 19947 in $\bar{x} \pm s$	<i>Irp2^{-/-}</i> n = 19; N = 20699 in $\bar{x} \pm s$	<i>Irp1^{+/-};Irp2^{-/-}</i> n = 7; N = 15040 in $\bar{x} \pm s$
VAP in $\mu\text{m/s}$	52,32 \pm 35,42	59,93 \pm 37,28 (*)	46,61 \pm 35,83 (*)
VSL in $\mu\text{m/s}$	32,67 \pm 29,31	36,60 \pm 30,97 (*)	28,44 \pm 28,33 (*)
VCL in $\mu\text{m/s}$	99,05 \pm 61,26	114,21 \pm 64,13 (*)	89,73 \pm 62,53 (*)
ALH in μm	5,68 \pm 3,73	6,62 \pm 3,90 (*)	5,33 \pm 3,84 (*)
BCF in Hz	33,73 \pm 13,48	33,71 \pm 13,43	35,67 \pm 13,87 (*)
STR in %	61,39 \pm 23,58	59,18 \pm 23,12 (*)	60,20 \pm 23,56 (*)

Fast alle Parameter (mit Ausnahme der BCF bei *Irp2^{-/-}*-Männchen) von Mäusen mit IRP2-Defizienz unterschieden sich statistisch signifikant von denen der C57BL/6J-Kontrollen. Während die Geschwindigkeitsparameter (VAP, VSL, VCL) und die seitliche Amplitude des Kopfausschlags (ALH) der *Irp2^{-/-}*-Spermien im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht waren, wiesen *Irp1^{+/-};Irp2^{-/-}*-Spermien bei diesen Parametern sowohl gegenüber dem Wildtyp als auch gegenüber den *Irp2^{-/-}*-Spermien eine signifikante Erniedrigung auf (siehe Abbildung 24A - D). Die Geradlinigkeit (STR) war in beiden IRP2-defizienten Gruppen (*Irp2^{-/-}* und *Irp1^{+/-};Irp2^{-/-}*) im Vergleich zu den Wildtypkontrollen signifikant erniedrigt (siehe Abbildung 24F). *Irp1^{+/-};Irp2^{-/-}*-Spermien zeigten gegenüber dem Wildtyp und den *Irp2^{-/-}*-Männchen eine signifikant erhöhte Schlagfrequenz (BCF; siehe Abbildung 24E).

Die Spermien von *Irp2^{-/-}*-Männchen waren verglichen mit dem Wildtyp hyperaktiviert. Kennzeichnend für ein solches Bewegungsmuster ist ein schnelleres Schwimmen durch kräftigere Flagellenschläge in Kombination mit einer stärkeren seitlichen Amplitude des Kopfausschlages (ALH). So schwimmen die *Irp2^{-/-}*-Spermien im Vergleich zum Wildtyp diffuser (kreisförmiger; ALH und v. a. VCL erhöht) und weniger progressiv (STR vermindert; Aoki *et al.*, 1994). Spermien von *Irp1^{+/-};Irp2^{-/-}*-Männchen zeigten keine Hyperaktivierung und waren insgesamt langsamer. Dass die zusätzliche *Irp1-*

Haploinsuffizienz die Richtung der Abweichung vom Wildtyp bestimmt, war unerwartet und wird später diskutiert.

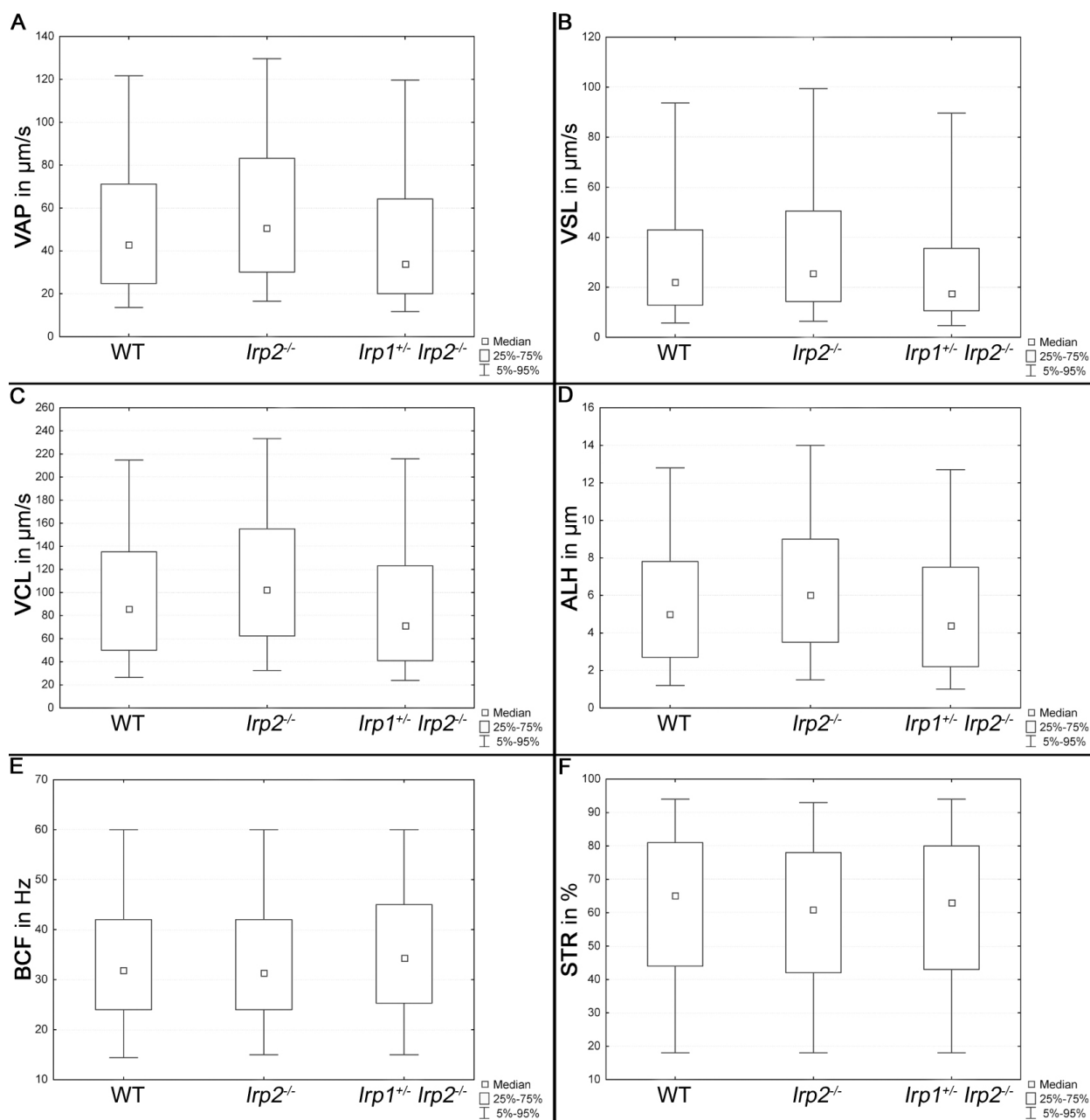


Abbildung 24: Graphische Übersicht der einzelnen Spermienmotilitätsparameter von WT-, *lrp2*^{-/-}- und *lrp1*^{+/-};*lrp2*^{-/-}-Männchen. Weggeschwindigkeit (A), die progressive (B) und die Bahngeschwindigkeit (C), die Amplitude des seitlichen Spermienkopfausschlags (D), die Schlagfrequenz (E) und die Geradlinigkeit der Spermien (F), jeweils als Boxplots angegeben mit Median (kleines Kästchen im Balken), 25.-75. Perzentil-Intervall (Balken) und die minimale und maximale Streuung als Federbalken. Die zugehörigen Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 15 dargestellt.

4.5 Die testikuläre Expression der IRP2-Zielproteine: DMT1, Ferritin und Ferroportin

Um zu untersuchen, wie sich ein IRP2-Verlust auf die testikuläre Expression der IRP2-regulierten Proteine, Ferritin, Ferroportin und DMT1 und damit auf die testikuläre Eisenhomöostase auswirkt, wurden Lokalisationsanalysen mittels Immunfluoreszenz (siehe 3.11) und Immunhistochemie (siehe 3.13) mit spezifischen Antikörpern gegen DMT1, Ferritin und Ferroportin bei *Irp1^{+/-};Irp2^{-/-}*, *Irp2^{-/-}*- und C57BL/6J-Mäusen durchgeführt. Für die Analyse der testikulären Expression des Transferrinrezeptors 1 war kein geeigneter muriner Antikörper verfügbar. Da kein Peptid für die verwendeten Antikörper zum Blocken zur Verfügung stand, wurde als Negativkontrolle bei einem Serienschnitt die Inkubation mit dem primären Antikörper ausgelassen (siehe Anhang 7.1.2 bzw. 7.1.3). Im Folgenden werden für die Immunfluoreszenzfärbungen nur die überlagerten Farbkanäle (*merge*) gezeigt, die Aufnahmen der Einzelkanäle befinden sich im Anhang (siehe 7.1.1).

4.5.1 *DMT1 wird in Sertolizellen und elongierten Spermatischen exprimiert*

DMT1 wurde in den Hoden von *Irp1^{+/-};Irp2^{-/-}*, *Irp2^{-/-}*- und C57BL/6J-Mäusen im Zytosol von Sertolizellen (siehe Abbildung 25A - D, als streifenartiges Muster zu erkennen) und in elongierten Spermatischen (siehe Abbildung 25A - F) lokalisiert. Außerdem wurde DMT1 in Zellen des testikulären Interstitiums (siehe Abbildung 25B, D, F) exprimiert. Die Topologie der testikulären Expression von DMT1 variierte nicht zwischen *Irp1^{+/-};Irp2^{-/-}*, *Irp2^{-/-}*- und Wildtypmäusen.

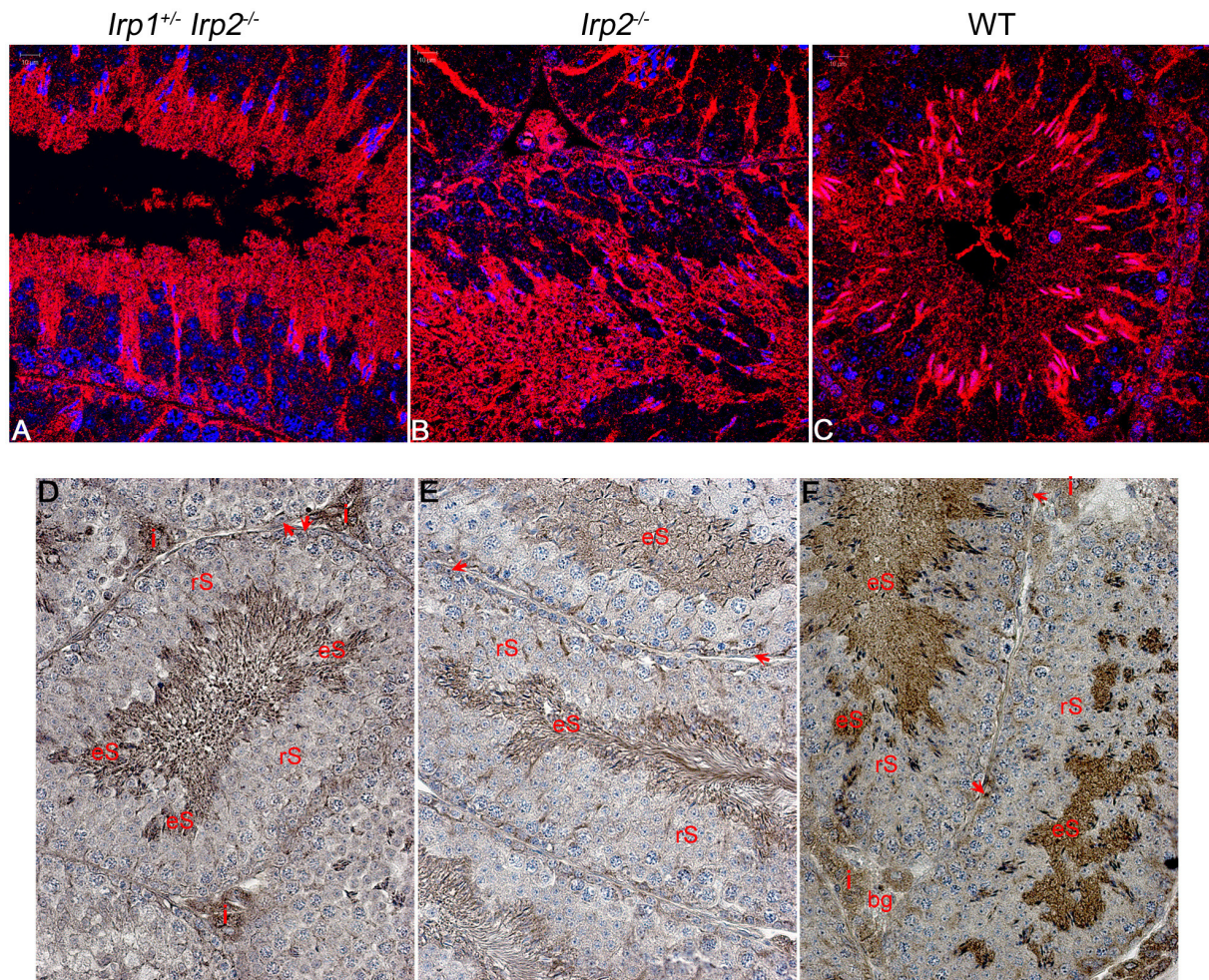


Abbildung 25: Die Lokalisation von DMT1 visualisiert mittels indirekter IF (A - C) und IHC (D - F) in den Hoden von *Irp1^{+/+};Irp2^{-/-}* (A, D), *Irp2^{-/-}* (B, E) und WT-Mäusen (C, F). Die Kerne wurden mit DRAQ5 (A - C, 63x) bzw. Hämalaun (D - F, 40x) gefärbt. i: Interstitium; rS: runde Spermatiden; eS: elongierte Spermatiden; Pfeile deuten auf Sertolizellen.

4.5.2 *Ferritin wird in Sertolizellen, Spermatogonien und primären Spermatozyten exprimiert*

Ferritin wurde in *Irp1^{+/+};Irp2^{-/-}* (siehe Abbildung 26A und D), *Irp2^{-/-}* (siehe Abbildung 26B und E) und C57BL/6J-Hoden (siehe Abbildung 26C und F) in Spermatogonien, primären Spermatozyten und Sertolizellen exprimiert. Es wurde ausschließlich zytosolisches Ferritin detektiert. Im testikulären interstitiellen Kompartiment waren auch Leydigzellen Ferritin-immunreaktiv (siehe Abbildung 26). Die Topologie des testikulären Expressionsmusters von Ferritin variierte nicht zwischen *Irp1^{+/+};Irp2^{-/-}*, *Irp2^{-/-}* und Wildtypmäusen. Rein visuell erschien bei den Immunfluoreszenzanalysen die Ferritinexpression in Sertolizellen von *Irp1^{+/+};Irp2^{-/-}* und *Irp2^{-/-}*-Männchen gegenüber dem Wildtyp verstärkt (siehe Abbildung 26 vgl. A und B vs. C).

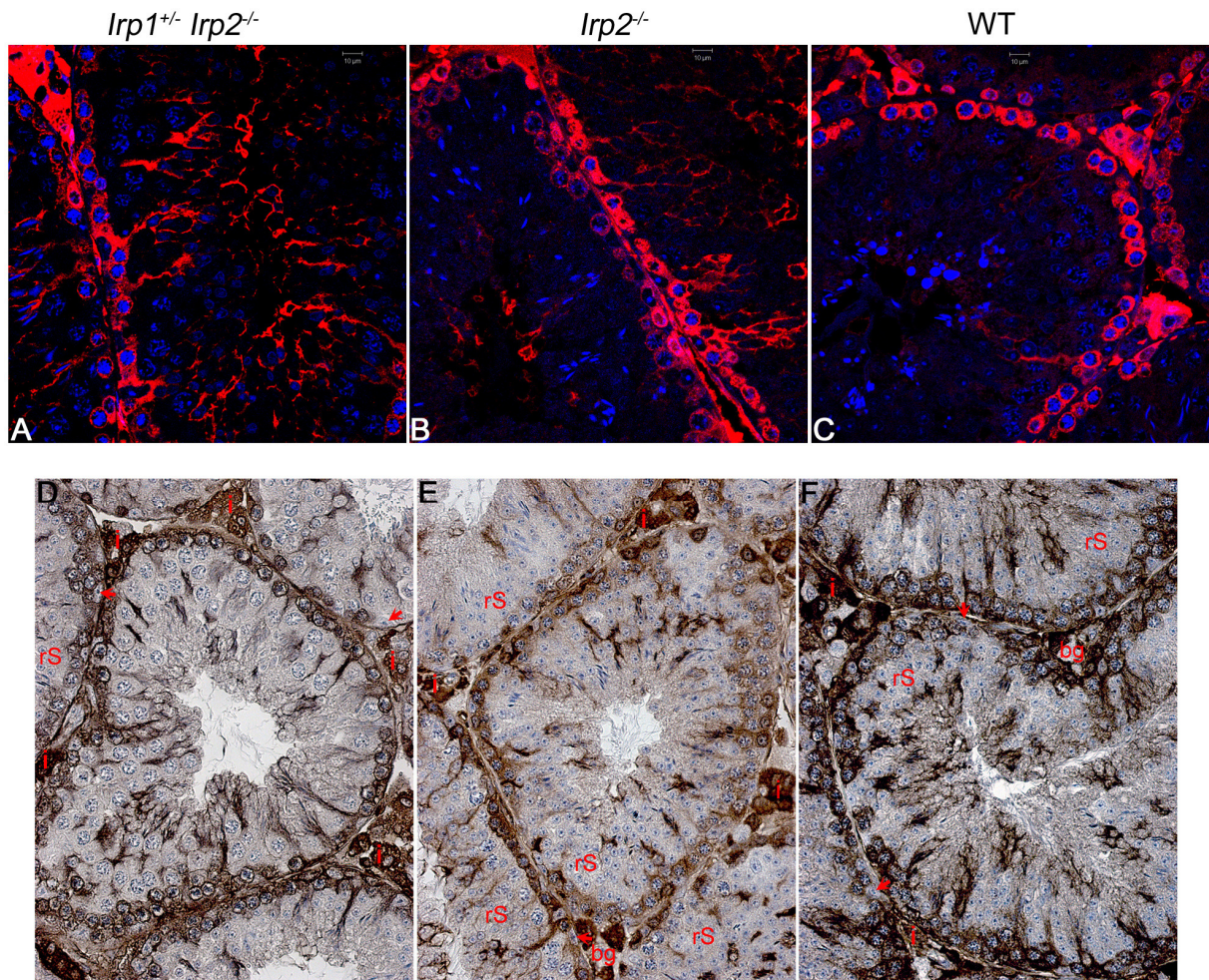


Abbildung 26: Expressionsanalyse von zytosolischem L-Ferritin mittels IF (A - C) und immunhistochemischer Antikörperfärbung (D - F) in den Hoden von *Irp1^{+/-};Irp2^{-/-}* (A, D), *Irp2^{-/-}* (B, E) und WT-Mäusen (C, F). DraG5 (A - C) und Hämalaun (D - F) dienen als Kernfarbstoff. Die Aufnahmen der IF-Bilder mittels LSM sind 63-fach und die der ABC-Peroxidase-Immundefärbung 40-fach vergrößert. i: Interstitium; rS: runde Spermatiden; Pfeile deuten auf Sertolizellen.

4.5.3 *Ferroportin wird im Hoden in peritubulären Myoidzellen exprimiert*

Ferroportin wurde in den Hoden von *Irp1^{+/-};Irp2^{-/-}* (siehe Abbildung 27A und D), *Irp2^{-/-}* (siehe Abbildung 27B und E) und C57BL/6J-Männchen (siehe Abbildung 27C und F) ausschließlich in peritubulären myoiden Zellen und den glatten Muskelzellen der testikulären Blutgefäße (siehe Abbildung 27B, E, F) exprimiert. Die Hoden der drei analysierten Genotypen zeigten ein übereinstimmendes Ferroportinexpressionsmuster.

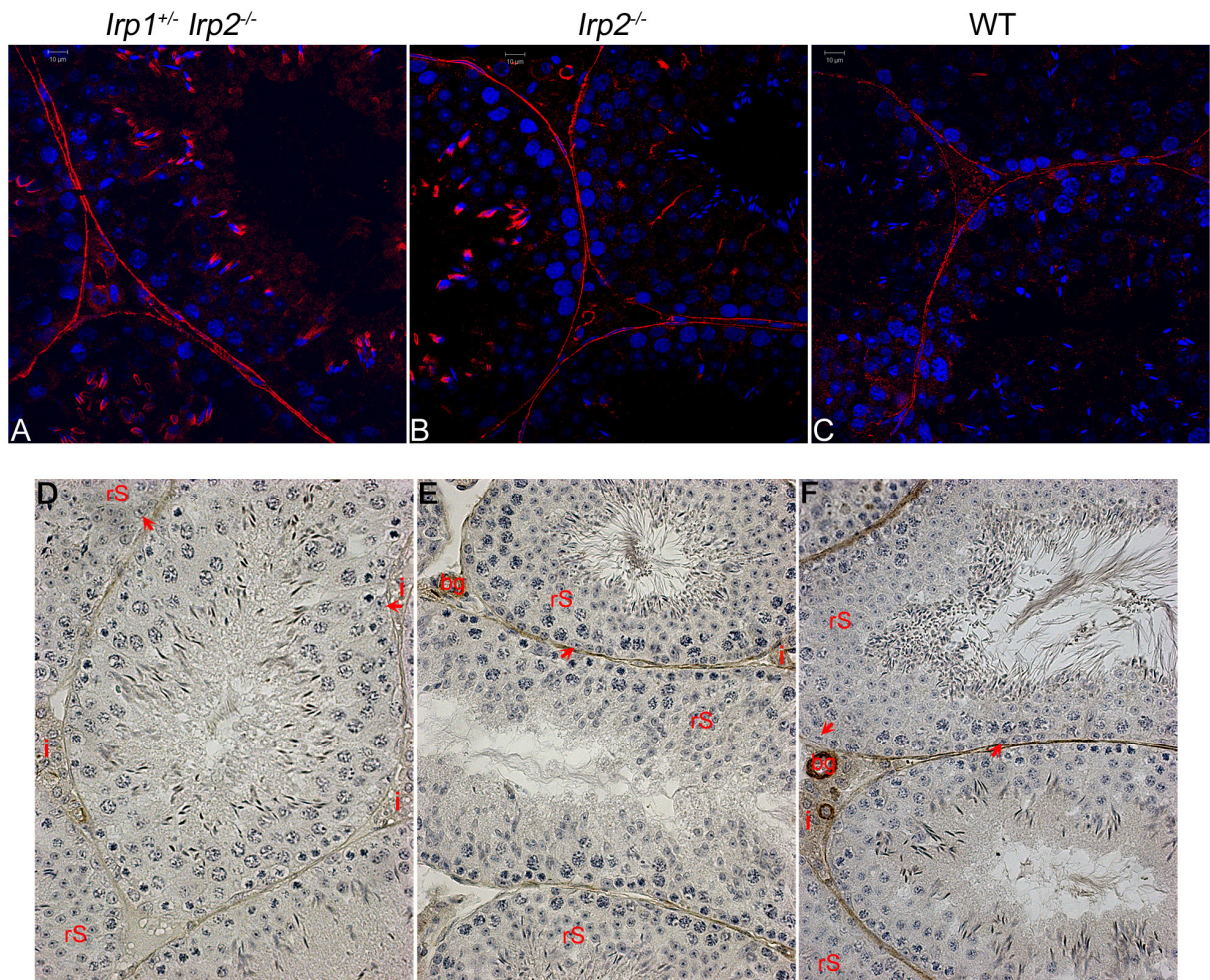


Abbildung 27: Die Expression von Ferroportin in den Hoden IRP2-defizienter (A, D *Irfp1^{+/+};Irfp2^{-/-}*- und B, E *Irfp2^{-/-}*-) Mäuse im Vergleich zum WT (C, F). Der Nachweis von Ferroportin erfolgte mittels indirekter IF-Färbung, dabei wurden die Zellkerne mit Draq5 gefärbt, (A - C, 63x) und über immunohistochemische ABC-Peroxidase-Antikörperfärbung. Hierbei wurden die Zellkerne mit Hämalaun gefärbt (D - F, 40x). i: Interstitium; rS: runde Spermatiden; bg: Blutgefäße; Pfeile deuten auf Sertolizellen.

Zusammenfassend betrachtet wurde beim topologischen Vergleich von IRP2-reguliertem DMT1, Ferritin und Ferroportin in den Hoden von *Irfp1^{+/+};Irfp2^{-/-}*-, *Irfp2^{-/-}*- und C57BL/6J-Mäusen keine topologisch abweichenden Expressionsmuster detektiert. Interessanterweise wurde keines der untersuchten IRP2-regulierten Proteine in Spermatiden des Stadiums 8 exprimiert (wie IRP2). Obwohl Griffin *et al.* (2005) eine Expression von DMT1 im Rattenhoden in runden Spermatiden beschrieben haben, konnte auch für DMT1 keine Koexpression mit IRP2 in runden Spermatiden in dieser Arbeit nachgewiesen werden.

4.6 Der Einfluss von Eisenmangel auf die Spermatogenese IRP2-defizienter Mäuse

Ein IRP2-Verlust scheint, die Quantität und Qualität der Spermien zu beeinflussen (siehe 4.4). Die Abwesenheit von IRP2 bedeutet einen Verlust der Ferritin- und Transferrinrezeptor 1 (TfR1)-Regulation, so dass Ferritin unkontrolliert translatiert und TfR1 vermehrt degradiert wird (LaVaute *et al.*, 2001; Meyron-Holtz *et al.*, 2004a). Durch die Herabregulation des TfR1 gelangt weniger Eisen in die Zellen, das anschließend verstärkt in Ferritin gespeichert wird. Folglich kann spekuliert werden, dass den IRP2-defizienten Zellen weniger Eisen zum Gebrauch zur Verfügung steht, also ein intrazellulärer Eisenmangel herrscht. Dieser intrazelluläre Eisenmangel in IRP2-defizienten Mäusen sollte durch das Verabreichen einer speziellen Eisenmangeldiät weiter verstärkt werden, um so einen möglichen testikulären Phänotyp von *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-} Mäusen und einen potentiellen Einfluss eines systemischen und intrazellulären Eisenmangels auf die Spermatogenese zu analysieren und die Ursachen für die quantitativen und qualitativen Veränderungen der Spermien aufzuklären. Zu diesem Zweck wurden sowohl *Irp2*^{-/-}- als auch C57BL/6J-Mäuse direkt nach dem Absetzen von der Mutter jeweils für drei, sechs und neun Wochen mit einer Eisenmangeldiät gefüttert (siehe 3.15.1; im Folgenden als xWoFe↓ bezeichnet, wobei x für die Anzahl der Wochen steht). *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Männchen wurden nur für drei Wochen mit Eisenmangelfutter substituiert. Parallel wurden diese Tiere auch mit entionisiertem Wasser versorgt, um externe Eisenquellen auszuschließen. Um eine Reversibilität möglicher Effekte zu untersuchen, wurden männliche *Irp2*^{-/-}- und Wildtypmäuse zunächst sechs Wochen lang mit dem speziellem Eisenmangelfutter versorgt und anschließend auf Standardfutter für jeweils drei und sechs Wochen vor der Gewebeentnahme umgestellt (im Folgenden als xWoR oder *rescue* benannt).

4.6.1 Die Bestimmung des Hämatokritwertes zur Verifizierung des Eisenmangels

Der Nachweis eines Eisenmangels bzw. einer Anämie nach verabreichter Eisenmangeldiät erfolgte über die Bestimmung der Hämatokritwerte von mit Eisenmangeldiät und mit Standardfutter gefütterten Wildtyp-, *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Männchen (siehe 3.16). Anämie gehört zu einer der phänotypischen Ausprägungen von *Irp2* knock out Mäusen und signifikant erniedrigte Hämatokritwerte wurden in der Literatur für *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäuse bereits beschrieben (Cooperman *et al.*, 2005; Moroishi *et al.*, 2011). Dieser Befund konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden (siehe Tabelle 16): Die Hämatokritwerte der *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Männchen waren unter Standardbedingungen signifikant niedriger ausgefallen als beim Wildtyp. Zwischen mit Standardfutter gefütterten *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäusen bestand kein signifikanter Unterschied. Nach verabreichter Eisenmangeldiät waren die Hämatokritwerte von *Irp2*^{-/-}-, *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}- und

C57BL/6J-Männchen signifikant im Vergleich zu den mit Standardfutter gefütterten Kontrollen erniedrigt (siehe Tabelle 16).

Tabelle 16: Hämatokritwerte von WT-, *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Männchen, die für drei, sechs und neun Wochen mit einer Eisenmangeldiät gefüttert wurden und solchen, die nach sechs Wochen Eisenmangeldiät wieder für jeweils drei und sechs Wochen Standardfutter erhielten. Als Kontrollen dienten normal gefütterte Männchen desselben Genotyps im Alter von 7-16 Wochen. Die Werte sind in % als arithmetische Mittelwerte (s) ± Standardabweichung (s) von n untersuchten Tieren angegeben (Kruskal-Wallis-Test: p < 0,05 signifikant (*) und p < 0,001 hoch signifikant (**)). *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Männchen wurden nur für drei Wochen mit Eisenmangelfutter versorgt (Htw: Hämatokritwert; xWoFe↓: Eisenmangeldiät-dauer; n. d.: nicht durchgeführt).

Gruppe	WT		<i>Irp2</i> ^{-/-}		<i>Irp1</i> ^{+/-} ; <i>Irp2</i> ^{-/-}	
	Htw x ± s	n	Htw x ± s	n	Htw x ± s	n
Kontrolle	50,05 ± 1,61	20	45,00 ± 2,73 (*)	16	41,00 ± 4,41 (*)	8
3WoFe↓	30,09 ± 2,74 (**)	11	27,58 ± 3,53 (**)	12	21,10 ± 4,31 (**)	10
6WoFe↓	43,36 ± 4,84 (*)	11	23,27 ± 3,07 (**)	11	n. d.	
9WoFe↓	43,23 ± 4,34 (*)	13	27,13 ± 4,66 (**)	15	n. d.	
3WoR	48,80 ± 2,04	10	43,20 ± 3,29 (*)	10	n. d.	
6WoR	48,92 ± 1,56	12	43,33 ± 2,25 (*)	6	n.d.	

Bereits nach dreiwöchiger Eisenmangeldiät waren die Hämatokritwerte von C57BL/6J-, *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Männchen im Vergleich zu ihren Kontrollen hoch signifikant erniedrigt. Eine andauernde Eisenmangeldiät führte zu keiner weiteren Reduktion der Hämatokritwerte. Nach sechs und neun Wochen Eisenmangeldiät waren die Hämatokritwerte des Wildtyps verglichen mit der Kontrolle nur noch um ca. 13% signifikant verringert. *Irp2*^{-/-}-Männchen wiesen auch nach sechs und neun Wochen Eisenmangeldiät hoch signifikant verminderte Hämatokritwerte auf. Der Vergleich der Hämatokritwerte von Individuen mit unterschiedlicher Diät-dauer führte weder innerhalb der Wildtyp- noch innerhalb der *Irp2*^{-/-}-Gruppe zu signifikanten Unterschieden (siehe Abbildung 28).

Beim Vergleich der dreiwöchigen Eisenmangeldiäten waren die Hämatokritwerte der *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäuse gegenüber dem Wildtyp hoch signifikant und gegenüber den *Irp2*^{-/-}-Individuen signifikant erniedrigt. Die Unterschiede zwischen der Wildtyp- und *Irp2*^{-/-}-Gruppe waren nach drei Wochen Eisenmangeldiät nicht signifikant. Nach sechs Wochen Fütterung mit der speziellen Diät war der Hämatokritwert von *Irp2*^{-/-}-Mäusen hoch signifikant und nach neun Wochen signifikant reduziert im Vergleich zu gleichbehandelten C57BL/6J (siehe Abbildung 28).

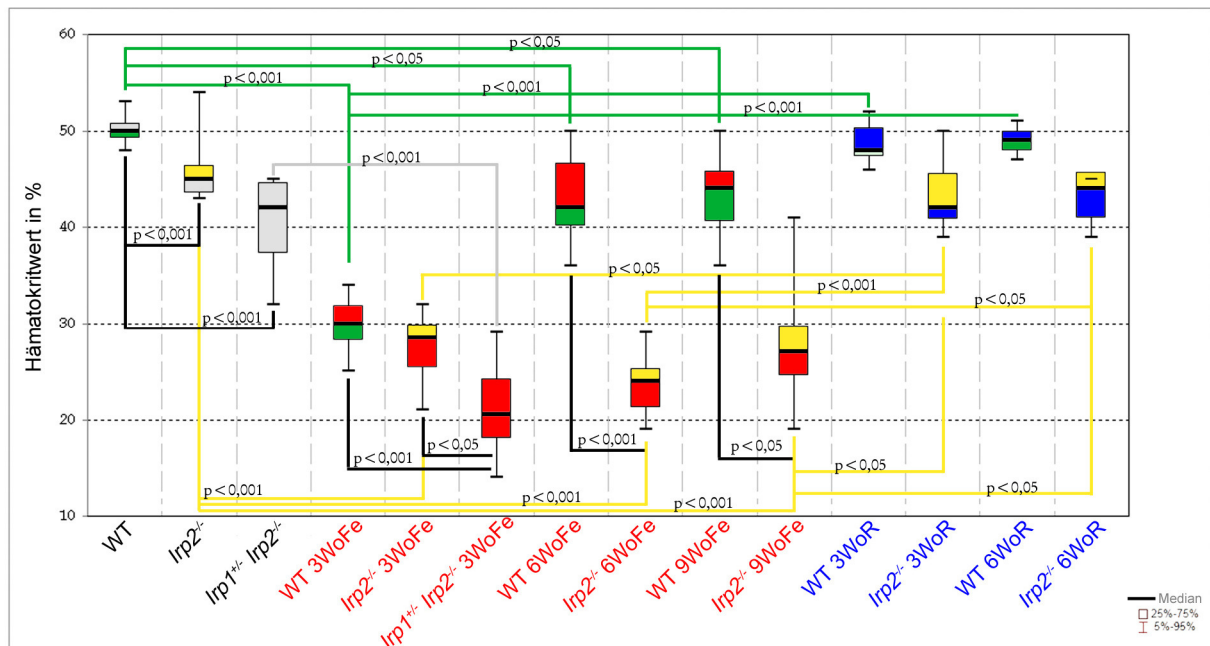


Abbildung 28: Graphische Übersicht der Hämatokritwerte der Kontrollen (Standardfutter) in grauen, der Eisenmangeldiätgruppen in roten und der *rescue*-Gruppen in blauen Boxplots mit Median (Querstrich im Balken), 25. - 75. Perzentil-Intervall (Balken) und minimaler und maximaler Streuung (Federbalken). Zur Unterscheidung der Genotypen wurden die Balken, die den Werten von WT-Männchen entsprechen, im unteren Bereich grün und die von *Irp2*^{-/-}-Mäusen im oberen Bereich gelb dargestellt. Signifikante Unterschiede sind durch Linien über den Boxplots gekennzeichnet (in schwarz vgl. zwischen verschiedenen Genotypen, in grün vgl. WT untereinander, in gelb vgl. *Irp2*^{-/-} untereinander, in grau vgl. *Irp1*^{+/-}; *Irp2*^{-/-} untereinander). Mittelwerte und Standardabweichungen können in Tabelle 16 abgelesen werden.

Zusammenfassend führte die Verabreichung der Eisenmangeldiät bereits nach drei Wochen zu einer signifikanten Hämatokritwertreduktion, die bis zum Ende der Diät (nach neun Wochen) bestehen blieb. Wurde den Tieren nach sechswöchiger Eisenmangeldiät wieder für drei bzw. sechs Wochen Standardfutter verabreicht, erreichten die Hämatokritwerte von Wildtyp- als auch *Irp2*^{-/-}-Mäusen annähernd den Hämatokritlevel der Kontrollen (siehe Tabelle 16 und Abbildung 28). Folglich war die Induktion des systemischen Eisenmangels reversibel.

4.6.2 Die Eisenmangeldiät zeigt keine Auswirkungen auf die Histologie der Hoden

Um zu prüfen, ob der systemische Eisenmangel Einfluss auf die Spermatogenese von *Irp1*^{+/-}; *Irp2*^{-/-}-, *Irp2*^{-/-}- und C57BL/6J-Mäusen nimmt, wurde die Histologie der Hoden von insgesamt 35 C57BL/6J- (elf Tiere mit 3WoFe↓, elf Tiere mit 6WoFe↓, 13 Tiere mit 9WoFe↓), 43 *Irp2*^{-/-}- (zwölf Mäuse mit 3WoFe↓, 16 Mäuse mit 6WoFe↓, 15 Mäuse mit 9WoFe↓) und zehn *Irp1*^{+/-}; *Irp2*^{-/-}-Männchen mit 3WoFe↓ mikroskopisch analysiert. Parallel wurden auch Hoden von je 16 Wildtyp- und *Irp2*^{-/-}-Mäusen histologisch untersucht, die nach sechs Wochen Eisenmangeldiät für drei (n = 10) bzw. sechs Wochen (n = 6) wieder auf Standardfutter umgestellt wurden.

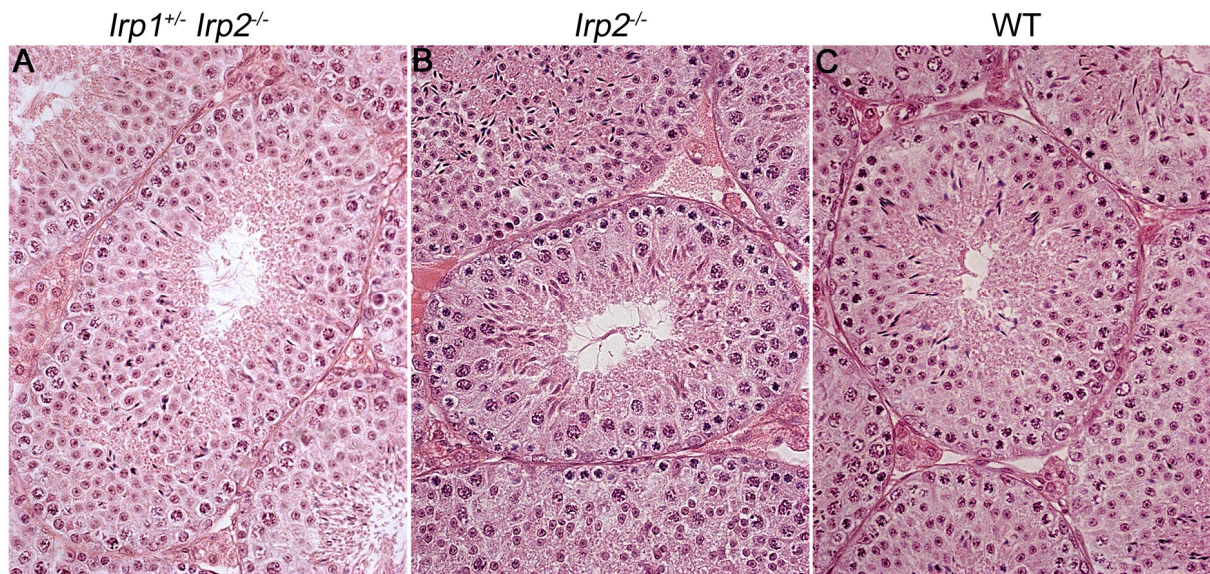


Abbildung 29: HE-gefärbte Hodenschnitte von *Irp1^{+/+};Irp2^{-/-}* (A), *Irp2^{-/-}* (B) und WT-Mäusen (C), die drei Wochen mit einer Eisenmangeldiät gefüttert wurden. Die histologischen Übersichten sind 40-fach vergrößert.

Beim Vergleich der Hoden zeigten männliche *Irp1^{+/+};Irp2^{-/-}* (siehe Abbildung 29A), *Irp2^{-/-}* (siehe Abbildung 29B) und Wildtypmäuse (siehe Abbildung 29C) auch nach drei-, sechs- oder neunwöchiger Eisenmangeldiät und nach sechs Wochen Eisenmangeldiät und anschließender Umstellung für drei bzw. sechs Wochen auf Standardfutter eine gute bis sehr gute Spermatogenese, die durchaus dem Bild der Kontrollen entsprach (vgl. 4.2.1, Abbildung 18). Der durch die Eisenmangeldiät hervorgerufene (bzw. in *Irp2^{-/-}*- und *Irp1^{+/+};Irp2^{-/-}*-Individuen verstärkte) Eisenmangel wirkte sich offensichtlich nicht auf die Spermatogenese und/oder Spermio-genese von Wildtyp-, *Irp2^{-/-}*- und *Irp1^{+/+};Irp2^{-/-}*-Mäusen aus.

4.6.3 Die Auswirkung des Eisenmangels auf die Proliferation testikulärer Keimzellen

Mittels immunhistochemischer Antikörperfärbung mit Anti-Ki67 wurden die testikulären keimzellspezifischen Proliferationsraten von jeweils fünf Wildtyp- und *Irp2^{-/-}*-Mäusen mit drei- und neunwöchiger Eisenmangeldiät mit den entsprechenden gleichaltrigen Kontrollen quantitativ verglichen. Ebenfalls wurden *Irp1^{+/+};Irp2^{-/-}*-Männchen nach dreiwöchigem Eisenmangel mit zwei Monate alten Kontrollen verglichen. Die Fütterung einer dreiwöchigen Eisenmangeldiät wirkte sich tendenziell stimulierend auf die testikuläre keimzellspezifische relative Proliferationsrate von Wildtyp- ($p_{WT} = 0,0964$) und *Irp2^{-/-}*-Mäusen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen aus. Dieser Unterschied war aber nur bei *Irp2^{-/-}*-Männchen statistisch signifikant. Dagegen war die Proliferationsrate bei *Irp1^{+/+};Irp2^{-/-}*-Männchen nach dreiwöchigem Eisenmangel leicht vermindert ($p_{Irp1^{+/+};Irp2^{-/-}} = 0,4974$; siehe Abbildung 30).

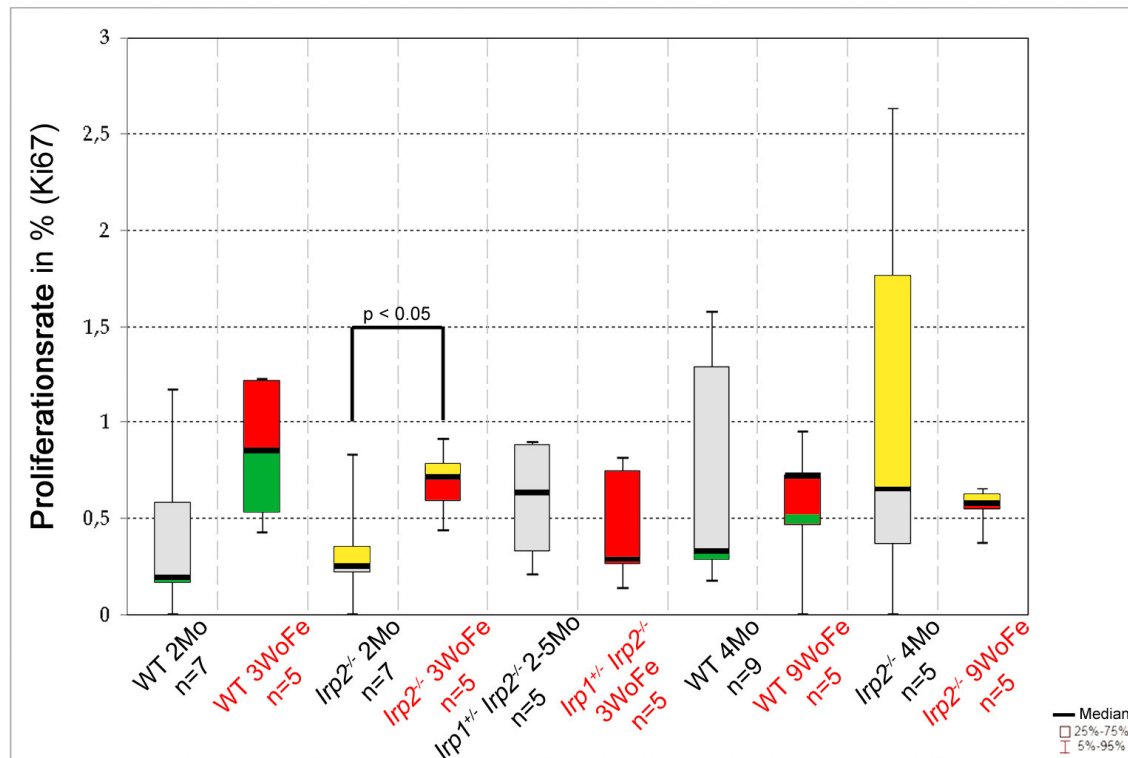


Abbildung 30: Analyse der Proliferationsrate unter Eisenmangelbedingungen mittels Ki67-Antikörperfärbung. Von WT- und *Irp2*^{-/-}-Mäusen nach drei und neun Wochen Eisenmangeldiät sowie *Irp1*^{+/+};*Irp2*^{-/-}-Mäusen nach drei Wochen Eisenmangeldiät und den entsprechenden Kontrollen wurden jeweils von beiden Hoden zwei unterschiedliche Ebenen untersucht. Dargestellt werden die relativen Anteile der *Tubuli seminiferi*, die mindestens eine Ki67-positive Zelle enthalten, bezogen auf die Gesamtzahl der Tubuli, in Boxplots (mit Median (Querstrich im Balken), 25. - 75. Perzentil-Intervall (Balken) und minimaler und maximaler Streuung (Federbalken); Zweistichproben-t-Test: $p < 0,05$ signifikant). Die Kontrollen (Standardfutter) sind durch graue und die mit Eisenmangeldiät gefütterten Individuen durch rote Balken gekennzeichnet, dabei sind die der WT-Mäuse im unteren Bereich grün und die der *Irp2*^{-/-}-Mäuse im oberen Bereich gelb markiert.

Nach neun Wochen Eisenmangeldiät zeigten C57BL/6J- und *Irp2*^{-/-}-Männchen keine signifikanten Unterschiede in dem relativen Anteil der Ki67-immungefärbten *Tubuli seminiferi* verglichen mit den entsprechenden Kontrollen ($p_{WT} = 0,6234$; $p_{Irp2} = 0,3013$). Zwischen den einzelnen Genotypen bestanden innerhalb einer Gruppe, d. h. unter Eisenmangelbedingungen oder Kontrolle, keine statistisch signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 30; vgl. auch 4.2.2).

Zusammenfassend betrachtet übte der durch das Futter induzierte systemische Eisenmangel nach drei Wochen einen stimulierenden Einfluss auf die testikuläre keimzellspezifische Proliferationsrate von Wildtyp- und *Irp2*^{-/-}-Mäusen aus. Die zusätzliche *Irp1*-Haploinsuffizienz hingegen bewirkte eine leichte Verminderung der Proliferationsrate testikulärer Keimzellen.

4.7 Der Einfluss von Eisenmangel auf die testikuläre Expression von IRP2-Zielproteinen

Mit Hilfe indirekter Immunfluoreszenz- (siehe 3.13) und immunhistochemischer Antikörperfärbung mittels ABC-Peroxidase (siehe 3.11) wurde untersucht, ob der induzierte Eisenmangel bei C57BL6J-, *Irp2*^{-/-}-Männchen und Mäusen des *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Genotyps die testikuläre Expression der IRP2-regulierten Zielproteine DMT1, Ferritin und Ferroportin beeinflusst. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzaufnahmen sind in Abbildung 31 und die der Immunhistochemie in Abbildung 32 exemplarisch zusammengestellt. Es existierten keinerlei topologische Expressionsunterschiede in Abhängigkeit von der Diätdauer und/oder des jeweiligen Genotyps.

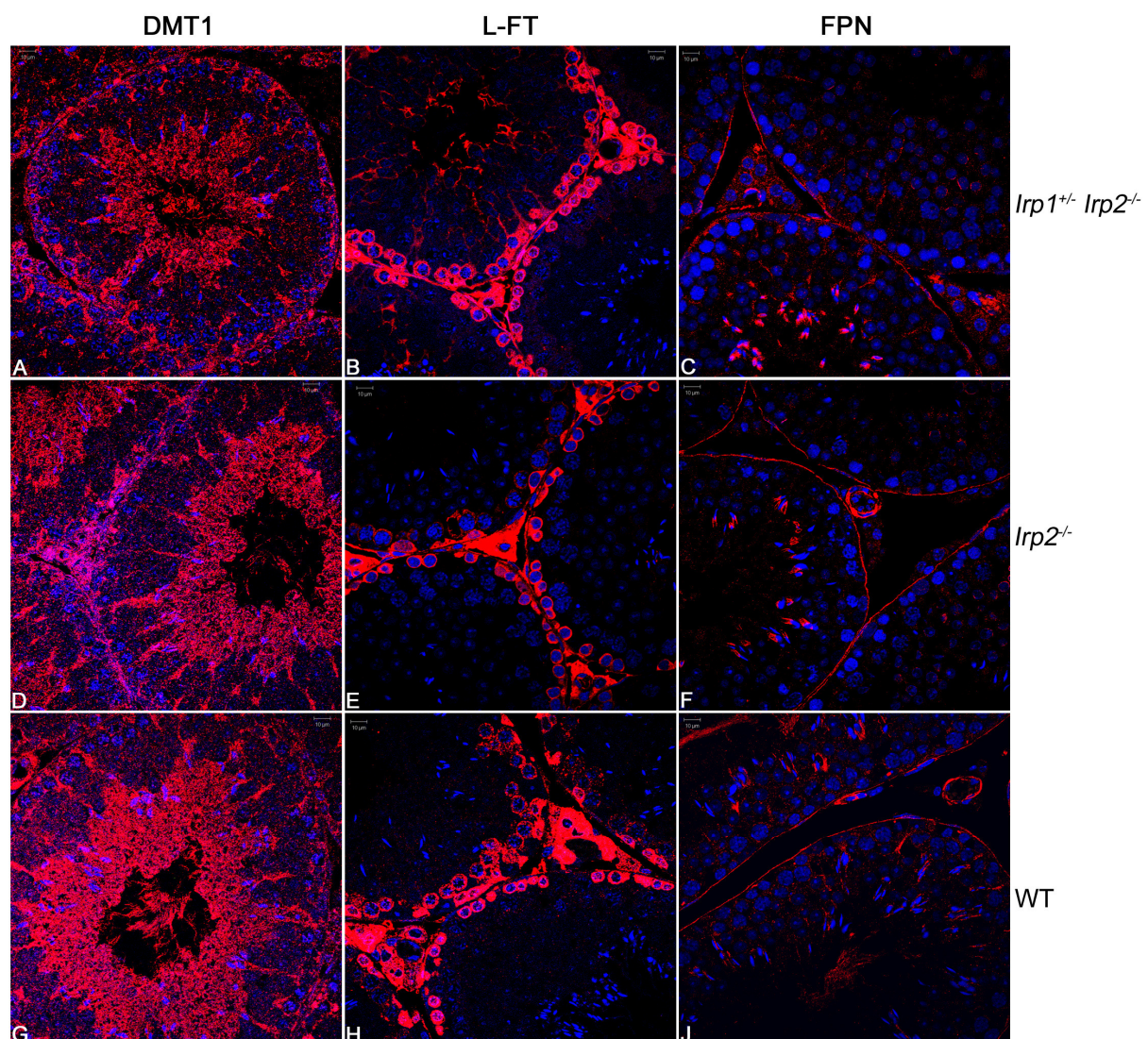


Abbildung 31: Immunfluoreszenz und LSM von IRP2-regulierten Proteinen. Antikörperfärbung mit DMT1 (A, D, G), L-Ferritin (B, E, H) und Ferroportin (C, F, J) auf Hodenschnitten mit Eisenmangeldiät gefütterten *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}- (A - C; 3WoFe↓), *Irp2*^{-/-}- (D 9WoFe↓, E und F 6WoFe↓) und WT-Mäusen (G - J; 9WoFe↓). Die Kerne wurden mit DRAQ5 gefärbt. Die Fotos wurden mit dem 63-fachen Objektiv aufgenommen (L-FT: L-Ferritin; FPN: Ferroportin).

Die DMT1-exprimierenden Zelltypen blieben durch den futterinduzierten Eisenmangel unbeeinflusst. Der Eisentransporter DMT1 wurde in Sertolizellen, elongierten Spermatiden und in Zellen des testikulären Interstitiums exprimiert (siehe Abbildung 31 und Abbildung 32, je A, D, G; vgl. auch 4.5.1, Abbildung 25 ohne Eisenmangeldiät).

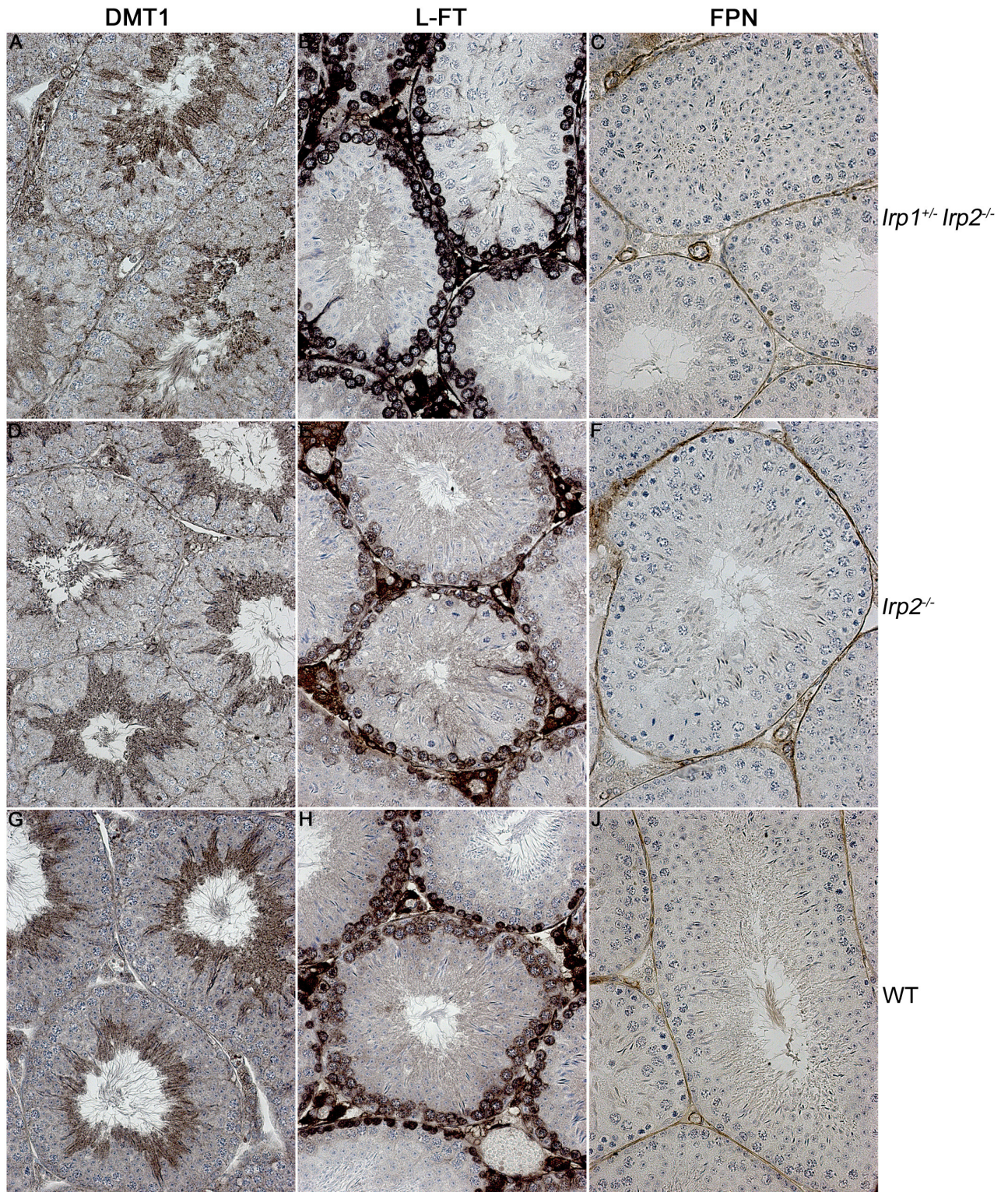


Abbildung 32: Expressionsanalyse unter Eisenmangelbedingungen von IRP2-regulierten Proteinen in den Hoden von *Irp1^{+/+};Irp2^{-/-}* (A - C; 3WoFe↓), neun Wochen mit Eisenmangeldiät gefütterten *Irp2^{-/-}* (D - F) und WT

WT-Mäusen (G - J) mittels IHC mit Antikörpern gegen DMT1 (A, D, G, 40x), L-Ferritin (B, E, H, 40x) und Ferroportin (C, F, J, 40x). L-FT: L-Ferritin; FPN: Ferroportin.

Peritubuläre Myoidzellen und glatte Muskelzellen, die die Wände von Blutgefäßen auskleiden, zeigten eine positive Immunfärbung für Ferroportin (siehe Abbildung 31 und Abbildung 32 je C, F, J) und damit keine Unterschiede zu den mit Standardfutter versorgten Kontrollen (vgl. 4.5.3, Abbildung 27). Der durch das Futter induzierte Eisenmangel schien sich nur auf das Expressionslevel von Ferritin auszuwirken. Im Vergleich zu den mit Standardfutter gefütterten Kontrollen erschien die Expression von Ferritin in Sertolizellen (streifenartiges Muster) unter Eisenmangelbedingungen bei C57BL/6J-Mäusen stark (siehe Abbildung 32H; vgl. mit 4.5.2, Abbildung 26F) und bei *Irp2*^{-/-} (siehe Abbildung 32E; vgl. mit 4.5.2, Abbildung 26E) und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäusen (siehe Abbildung 32B; vgl. mit 4.5.2, Abbildung 26D) mäßig vermindert.

4.8 Die Analyse der Spermien von *Irp2*^{-/-}-Männchen unter Eisenmangelbedingungen

Eisen ist ein essentieller Kofaktor für die meisten Enzyme der Atmungskette (Eisenstein, 2000) und damit wichtig für die Produktion von ATP, welches für die Motilität der Spermien nötig ist. Deshalb wurde überprüft, ob der durch das Eisenmangelfutter induzierte systemische Eisenmangel die Beweglichkeit und Anzahl der Spermien beeinflusst. Hierzu wurden von C57BL/6J-, *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäusen, die drei Wochen mit der Eisenmangeldiät versorgt wurden, die Spermienanzahl quantifiziert (siehe 4.8.1) und die Spermienmotilität analysiert (siehe 4.8.2.1). Zusätzlich wurde die Quantität und Motilität der Spermien von Wildtyp- und *Irp2*^{-/-}-Männchen untersucht, denen sechs und neun Wochen eine Eisenmangeldiät verabreicht wurde. Als Kontrollen wurden gleichaltrige Mäuse der entsprechenden Genotypen, die mit Standardfutter versorgt wurden, mitgeführt.

4.8.1 Eisenmangel korreliert mit erhöhten Spermienzahlen

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Spermienzahlen von n analysierten Männchen pro Gruppe sind in Tabelle 17 dargestellt. Erwartungsgemäß zeigten *IRP2*-defiziente Männchen unter Standardbedingungen eine (nicht signifikant) erhöhte Spermienzahl im Vergleich zu Wildtypmännchen (siehe auch 4.4.1). Beim Vergleich der Spermienzahlen von Mäusen unter Eisenmangelbedingungen der unterschiedlichen Genotypen (WT, *Irp2*^{-/-} und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}) waren nur geringe Unterschiede detektierbar (siehe Tabelle 17, dritte bis fünfte Reihe). Ganz im Gegensatz zur Standardsituation zeigten die C57BL/6J-Männchen unter Eisenmangelbedingungen tendenziell erhöhte Spermienzahlen im Vergleich zu gleichbehandelten *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Männchen.

Tabelle 17: Überblick der Spermienzahlen von WT-, *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Männchen im Verlaufe der Eisenmangeldiät. Die Spermienzahlen sind als arithmetischer Mittelwert (x) ± Standardabweichung (s) in Millionen von (n) untersuchten Individuen angegeben (Kruskal-Wallis-Test: p < 0,05 signifikant (*); Zweistichproben-t-Test für *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Gruppen untereinander p < 0,001 hoch signifikant (**); n.d.: nicht durchgeführt). Die Gruppen „7-8 Wo alt“ und „9-16 Wo alt“ entsprechen zusammengefasst den Tieren aus Tabelle 14. Das Alter der einzelnen Gruppen ist in der Tabelle in Klammern angegeben. Wo: Wochen; xWoFe↓: Eisenmangeldiätdauer.

Gruppe	WT		<i>Irp2</i> ^{-/-}		<i>Irp1</i> ^{+/-} ; <i>Irp2</i> ^{-/-}	
	Spermienzahlen (10 ⁶) x ± s	n	Spermienzahlen (10 ⁶) x ± s	n	Spermienzahlen (10 ⁶) x ± s	n
7-8 Wo alt	2,493 ± 1,752	11	4,334 ± 3,475	10	9,341 ± 4,696 (2-5 Monate alt)	8
9-16 Wo alt	7,764 ± 4,513 (*)	18	9,318 ± 2,634	12		
3WoFe↓ (7-8 Wo alt)	3,144 ± 1,633	11	2,623 ± 1,556	11	2,640 ± 1,707 (**)	10
6WoFe↓ (9-10 Wo alt)	7,945 ± 3,441 (*)	14	6,170 ± 3,789 (*)	16	n.d.	
9WoFe↓ (12-13 Wo alt)	14,115 ± 4,838	13	13,023 ± 6,241 (*)	15	n.d.	
3WoR (12-13 Wo alt)	18,078 ± 7,168 (*)	10	11,636 ± 3,429	10	n.d.	
6WoR (15-16 Wo alt)	15,525 ± 3,354	10	14,908 ± 4,827 (*)	6	n.d.	

Beim Wildtyp waren die Spermienzahlen nach drei und sechs Wochen Eisenmangeldiät im Vergleich zu den gleichaltrigen Kontrollen kaum verändert, während sich nach neunwöchiger Eisenmangeldiät die Spermienzahlen annähernd verdoppelten verglichen mit den Kontrollen (9-16 Wo alt) und der 6WoFe↓-Gruppe (von 7,8 Mio. bzw. 7,9 Mio auf 14,1 Mio.). Nach der Umstellung von sechswöchiger Eisenmangeldiät auf normales Futter stiegen die Spermienzahlen weiter rapide an (auf 18,1 Mio. bzw. 15,5 Mio.; siehe WT-Spalte in Tabelle 17). Dieser Unterschied war nach dreiwöchigem *rescue* gegenüber der entsprechenden Kontrollgruppe (9-16 Wo) und der 6WoFe↓-Gruppe statistisch signifikant (siehe Abbildung 33).

Bei *Irp2*^{-/-}-Mäusen reduzierte sich die Spermienzahl nach drei- und sechswöchiger Eisendiät verglichen mit den gleichaltrigen Kontrollen ca. um das 1,5-fache. Nach neun Wochen Eisenmangeldiät stiegen die Spermienzahlen rapide an (auf 13 Mio.) Auch nach sechswöchiger Eisenmangeldiät und anschließender Umstellung auf Standardfutter blieben die Spermienzahlen bei *Irp2*^{-/-}-Mäusen auf hohem Niveau (11,6 Mio. bzw. 14,9 Mio.; siehe *Irp2*^{-/-}-Spalte in Tabelle 17). Die Spermienzahlen waren in der 6WoFe↓-Gruppe im Vergleich zur 9WoFe↓- und 6WoR-Gruppe statistisch signifikant erniedrigt (siehe Abbildung 33).

Irp1^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Männchen zeigten nach dreiwöchigem Eisenmangel hoch signifikant verminderte Spermienzahlen gegenüber den entsprechenden Kontrollen (ca. um das 3,5-fache; siehe *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Spalte in Tabelle 17 und Abbildung 33).

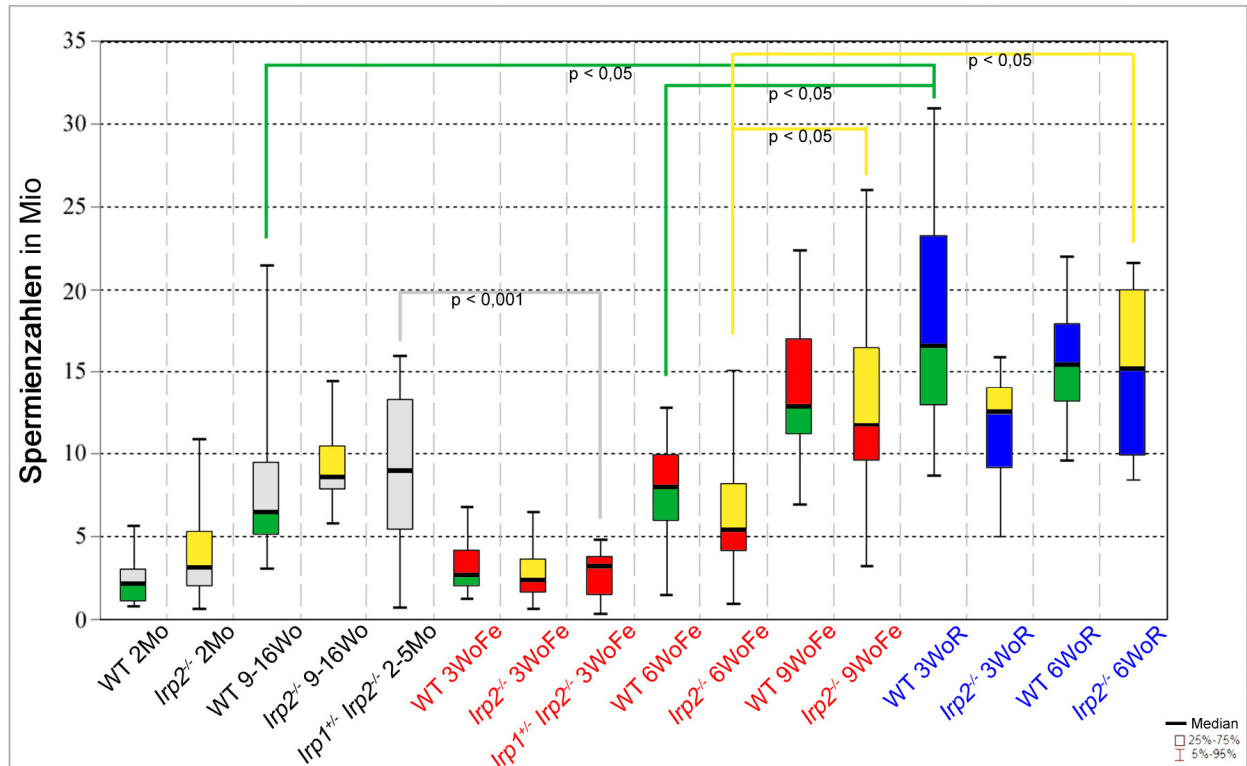


Abbildung 33: Graphische Übersicht der Spermienzahlen von WT- und IRP2-defizienten Männchen unter Eisenmangelbedingungen. Die unter Standardbedingungen gehaltenen Kontrollen sind in grau (mit grün für WT bzw. gelb für *Irp2*^{-/-}), die durch Eisenmangeldiät beeinflussten Gruppen in rot und die Gruppen, die nach sechs Wochen verabreichter Eisenmangeldiät für drei bzw. sechs Wochen wieder Standardfutter erhielten in blau abgebildet. Die Spermienzahlen werden als Boxplots mit Median (Querstrich im Balken), 25.-75. Perzentil-Intervall und minimaler und maximaler Streuung (Federbalken) in Millionen dargestellt (Kruskal-Wallis-Test: $p < 0,05$ signifikant). Mittelwerte, Standardabweichung und Individuenanzahlen sind in Tabelle 17 zusammengestellt.

Zusammenfassend betrachtet schien sich ein länger anhaltender Eisenmangel bei *Irp2*^{-/-} und C57BL/6J-Mäusen fördernd auf die Spermienquantität auszuwirken.

4.8.2 Die Auswirkungen des Eisenmangels auf die Motilität der Spermien

Für die Charakterisierung der Bewegungsmuster isolierter Spermien wurden die in 4.4.2 vorgestellten Geschwindigkeitsparameter, nämlich die Weggeschwindigkeit (VAP), die progressive Geschwindigkeit (VSL) und die Bahngeschwindigkeit (VCL), sowie die Amplitude des seitlichen Kopfausschlages (ALH), die Schlagfrequenz (BCF) und die Geradlinigkeit (STR) ermittelt (siehe 3.14.2). Zunächst wurde die Motilität der Spermien von *Irp1*^{+/-}; *Irp2*^{-/-} und *Irp2*^{-/-}-Männchen mit denen von C57BL/6J, die drei Wochen mit einer Eisenmangeldiät gefüttert wurden, verglichen (siehe 4.8.2.1). Anschließend werden das Motilitätsverhalten der Spermien von C57BL/6J-Männchen und dann das von *Irp2*^{-/-}-Männchen unter den verschiedenen Bedingungen präsentiert (siehe 4.8.2.2).

4.8.2.1 Vergleich der Spermienmotilitäten nach dreiwöchiger Eisenmangeldiät

Die arithmetischen Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen der einzelnen Spermienmotilitätsparameter von Wildtyp-, *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Männchen nach dreiwöchiger Eisenmangeldiät sind in Tabelle 18 zusammengestellt. Von jedem Genotyp wurden N Spermien von n Individuen analysiert.

Tabelle 18: Motilitätsanalysen nach dreiwöchiger Eisenmangeldiät von WT-, *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Männchen. Die Geschwindigkeitsparameter (VAP, VSL, VCL), die Amplitude des seitlichen Kopfausschlags (ALH), die Schlagfrequenz (BCF) und die Geradlinigkeit (STR) der Spermien sind als arithmetische Mittelwerte (\bar{x}) \pm Standardabweichung (s) von (n) untersuchten Individuen und (N) analysierten Spermien dargestellt (Kruskal-Wallis-Test: $p < 0,001$ signifikant (*)). VAP: Weggeschwindigkeit, VSL: progressive Geschwindigkeit, VCL: Bahngeschwindigkeit, ALH: seitliche Amplitude des Kopfausschlags, BCF: Schlagfrequenz, STR: Geradlinigkeit.

3WoFe↓	WT n = 6; N = 4507 in $\bar{x} \pm s$	<i>Irp2</i> ^{-/-} n = 6; N = 2368 in $\bar{x} \pm s$	<i>Irp1</i> ^{+/-} ; <i>Irp2</i> ^{-/-} n = 7; N = 3717 in $\bar{x} \pm s$
VAP in $\mu\text{m/s}$	56,35 \pm 38,59	39,95 \pm 32,25 (*)	41,69 \pm 34,34 (*)
VSL in $\mu\text{m/s}$	35,30 \pm 31,48	24,97 \pm 24,18 (*)	25,56 \pm 25,16 (*)
VCL in $\mu\text{m/s}$	109,74 \pm 69,53	77,42 \pm 60,67 (*)	79,38 \pm 61,23 (*)
ALH in μm	6,18 \pm 3,96	4,53 \pm 3,85 (*)	4,69 \pm 3,86 (*)
BCF in Hz	34,60 \pm 13,18	35,00 \pm 13,70	36,89 \pm 13,89 (*)
STR in %	61,29 \pm 23,09	64,43 \pm 24,40 (*)	63,62 \pm 25,22 (*)

Bei *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Männchen waren im Vergleich zum Wildtyp nach dreiwöchiger Eisenmangeldiät alle Geschwindigkeitsparameter (VAP, VSL, VCL) und die Amplitude des seitlichen Spermienkopfausschlags (ALH) statistisch signifikant erniedrigt (siehe Abbildung 34A - D), während die Schlagfrequenz (BCF) und die Geradlinigkeit (STR) in den beiden IRP2-defizienten Mausgruppen im Vergleich zum Wildtyp erhöht waren (siehe Tabelle 18, BCF signifikant bei *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-} und STR signifikant in beiden Gruppen; siehe Abbildung 34E - F). Beim Vergleich beider IRP2-defizienter Kohorten wirkte sich die Eisenmangeldiät interessanterweise drastischer auf die Spermienmotilität von *Irp2*^{-/-}-Männchen im Vergleich zu *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäusen aus. Die Motilitätsparameter von *Irp2*^{-/-}-Männchen und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Männchen unterschieden sich mit Ausnahme der Schlagfrequenz (BCF) nicht signifikant voneinander (siehe Abbildung 34).

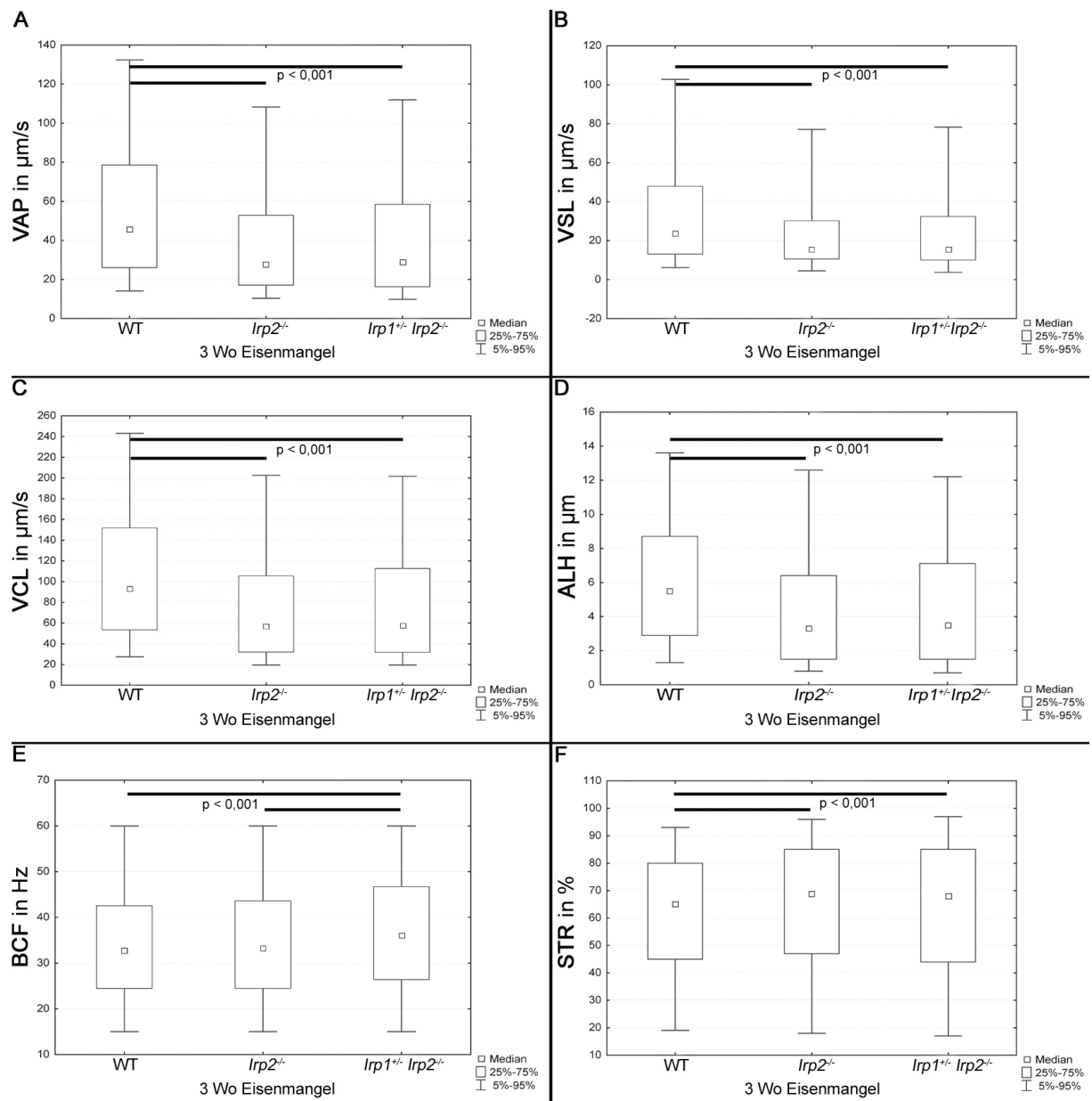


Abbildung 34: Graphische Übersicht der einzelnen Motilitätsparameter der analysierten Spermien von WT-, *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Männchen nach dreiwöchiger Eisenmangeldiät. Dargestellt werden die Weg- (A), die progressive (B) und die Bahngeschwindigkeit (C), die Amplitude des seitlichen Kopfausschlags (D), die Schlagfrequenz (E) und die Geradlinigkeit (F) der Spermien als Boxplots mit Median (kleines Kästchen im Balken), 25.-75. Perzentil-Intervall (Balken) und die minimale und maximale Streuung (Federbalken); Kruskal-Wallis-Test: $p < 0,001$ signifikant. Die Signifikanzen sind in den Diagrammen als schwarze Linie oberhalb der Boxplots angedeutet. Mittelwerte mit Standardabweichungen werden in Tabelle 18 gezeigt.

In Tabelle 19 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Spermienmotilitätsparameter von *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Männchen, die mit Standardfutter und für drei Wochen mit einer Eisenmangeldiät gefüttert wurden, gegenübergestellt.

Tabelle 19: Gegenüberstellung der Spermienmotilitätsparameter von *Irp1^{+/-};Irp2^{-/-}*-Männchen, die mit Standardfutter und für drei Wochen mit einer Eisenmangeldiät versorgt wurden. Die arithmetischen Mittelwerte (\bar{x}) \pm Standardabweichung (s) von (n) untersuchten Individuen und (N) analysierten Spermien der einzelnen Parameter (VAP: Weggeschwindigkeit, VSL: progressive Geschwindigkeit, VCL: Bahngeschwindigkeit, ALH: seitliche Amplitude des Spermienkopfausschlags, BCF: Schlagfrequenz, STR: Geradlinigkeit) sind dargestellt (Kruskal-Wallis-Test: $p < 0,001$ signifikant (*)) vgl. mit Standard).

	<i>Irp1^{+/-};Irp2^{-/-}</i>	
	Standard n = 7; N = 15040 in $\bar{x} \pm s$	3WoFe↓ n = 7; N = 3717 in $\bar{x} \pm s$
VAP in $\mu\text{m/s}$	46,61 \pm 35,83	41,69 \pm 34,34 (*)
VSL in $\mu\text{m/s}$	28,44 \pm 28,33	25,56 \pm 25,16 (*)
VCL in $\mu\text{m/s}$	89,73 \pm 62,53	79,38 \pm 61,23 (*)
ALH in μm	5,33 \pm 3,84	4,69 \pm 3,86 (*)
BCF in Hz	35,67 \pm 13,87	36,89 \pm 13,89 (*)
STR in %	60,20 \pm 23,56	63,62 \pm 25,22 (*)

Die Geschwindigkeitsparameter (VAP; VSL; VCL) sowie die Amplitude der seitlichen Spermienkopfauslenkung (ALH) waren bei mit der Eisendiät gefütterten Individuen signifikant erniedrigt, die Schlagfrequenz (BCF) und Geradlinigkeit (STR) signifikant erhöht. Bei Eisenmangel schwammen die Spermien von *Irp1^{+/-};Irp2^{-/-}*-Mäusen langsamer, geradliniger und die Flagellenschläge waren weniger kräftig (vgl. auch 4.4.2).

4.8.2.2 *Eisenmangel bewirkt eine Hyperaktivierung der Spermien von C57BL/6J- und eine Reduktion der Spermengeschwindigkeit von *Irp2^{-/-}*-Männchen*

Die einzelnen Motilitätsparameter der isolierten Spermien von Wildtyp- und *Irp2^{-/-}*-Mäusen die jeweils für drei, sechs und neun Wochen eine Eisenmangeldiät erhielten bzw. nach sechs Wochen Eisenmangeldiät wieder auf Standardfutter umgestellt wurden, ist hier als vollständiges Datenset mit den arithmetischen Mittelwerten und entsprechenden Standardabweichungen in Tabelle 20 zusammengefasst.

Die Spermengeschwindigkeiten sowie die Amplitude der seitlichen Kopfauslenkung (ALH) von *Irp2^{-/-}*-Männchen unter Eisenmangelbedingungen waren verglichen mit denen des Wildtyps drastisch reduziert, während die Schlagfrequenz (BCF) und Geradlinigkeit (STR) erhöht waren. Die Spermien von Wildtyp- und *Irp2^{-/-}*-Mäusen reagieren auf den systemischen Eisenmangel offensichtlich auf

unterschiedliche Weise und werden deshalb nachfolgend einzeln erörtert (siehe Tabelle 20; vgl. auch 4.4.2).

Tabelle 20: Spermienmotilitätsparameter von WT- und *Irp2*^{-/-}-Männchen unter verschiedenen Nahrungsbedingungen, dargestellt als arithmetische Mittelwerte (x) ± Standardabweichung (s) von (n) untersuchten Individuen und (N) analysierten Spermien (Kruskal-Wallis-Test: p < 0,001 signifikant (*) vgl. entsprechende Kontrolle). Oberer Teil: Geschwindigkeitsparameter (VAP: Weggeschwindigkeit, VSL: progressive Geschwindigkeit, VCL: Bahngeschwindigkeit), unterer Teil: Bewegungscharakteristika (ALH: seitliche Amplitude des Spermienkopfausschlags, BCF: Schlagfrequenz, STR: Geradlinigkeit). Die Kontrollen beinhalten 7-16 Wochen alte Männchen.

	WT				<i>Irp2</i> ^{-/-}			
	x ± s			n; N	x ± s			n; N
	VAP in µm/s	VSL in µm/s	VCL in µm/s		VAP in µm/s	VSL in µm/s	VCL in µm/s	
Kontrolle	52,32 ± 35,42	32,67 ± 29,31	99,05 ± 61,26	n = 19; N = 19947	59,93 ± 37,28	36,60 ± 30,97 (*)	114,21 ± 64,13	n = 19; N = 20699
3WoFe↓	56,36 ± 38,59 (*)	35,30 ± 31,48 (*)	109,74 ± 69,53 (*)	n = 6; N = 4507	39,95 ± 32,25 (*)	24,97 ± 24,17 (*)	77,42 ± 60,67 (*)	n = 6; N = 2368
6WoFe↓	63,54 ± 41,84 (*)	39,22 ± 33,73 (*)	121,41 ± 74,42 (*)	n = 5; N = 5361	41,37 ± 35,82 (*)	26,05 ± 26,90 (*)	77,56 ± 63,96 (*)	n = 5; N = 2497
9WoFe↓	60,52 ± 38,28 (*)	36,87 ± 32,36 (*)	114,94 ± 64,01 (*)	n = 9; N = 25522	51,12 ± 34,67 (*)	31,17 ± 28,69 (*)	95,06 ± 56,99 (*)	n = 9; N = 16199
3WoR	54,78 ± 39,88	34,63 ± 33,15	107,66 ± 72,38 (*)	n = 5; N = 6303	55,36 ± 37,81 (*)	32,53 ± 30,05 (*)	107,94 ± 68,35 (*)	n = 5; N = 8138
6WoR	47,13 ± 33,83 (*)	30,17 ± 27,14 (*)	85,62 ± 56,89 (*)	n = 6; N = 2092	38,46 ± 30,36 (*)	21,85 ± 21,94 (*)	73,22 ± 53,48 (*)	n = 4; N = 3070

	WT				<i>Irp2</i> ^{-/-}			
	x ± s			n; N	x ± s			n; N
	ALH in µm	BCF in Hz	STR in %		ALH in µm	BCF in Hz	STR in %	
Kontrolle	5,68 ± 3,73	33,73 ± 13,48	61,3 ± 23,58	n = 19; N = 19947	6,62 ± 3,90	33,71 ± 13,43	59,18 ± 23,12	n = 19; N = 20699
3WoFe↓	6,18 ± 3,95 (*)	34,60 ± 13,18 (*)	61,29 ± 23,09	n = 6; N = 4507	4,53 ± 3,85 (*)	35,00 ± 13,70 (*)	64,43 ± 24,40 (*)	n = 6; N = 2368
6WoFe↓	6,74 ± 4,25 (*)	34,35 ± 13,11 (*)	61,44 ± 24,19	n = 5; N = 5361	4,57 ± 3,94 (*)	35,66 ± 14,02 (*)	65,50 ± 24,16 (*)	n = 5; N = 2497
9WoFe↓	6,63 ± 3,91 (*)	34,76 ± 13,65 (*)	57,97 ± 23,39 (*)	n = 9; N = 25522	5,69 ± 3,76 (*)	34,01 ± 13,89	58,87 ± 23,38	n = 9; N = 16199
3WoR	6,10 ± 4,05 (*)	37,11 ± 13,44 (*)	61,81 ± 24,68	n = 5; N = 6303	6,26 ± 4,05 (*)	36,37 ± 14,24 (*)	57,66 ± 24,54	n = 5; N = 8138
6WoR	4,94 ± 3,62 (*)	32,81 ± 13,26	63,61 ± 23,02 (*)	n = 6; N = 2092	4,52 ± 3,58 (*)	36,97 ± 14,3 (*)	58,01 ± 24,41	n = 4; N = 3070

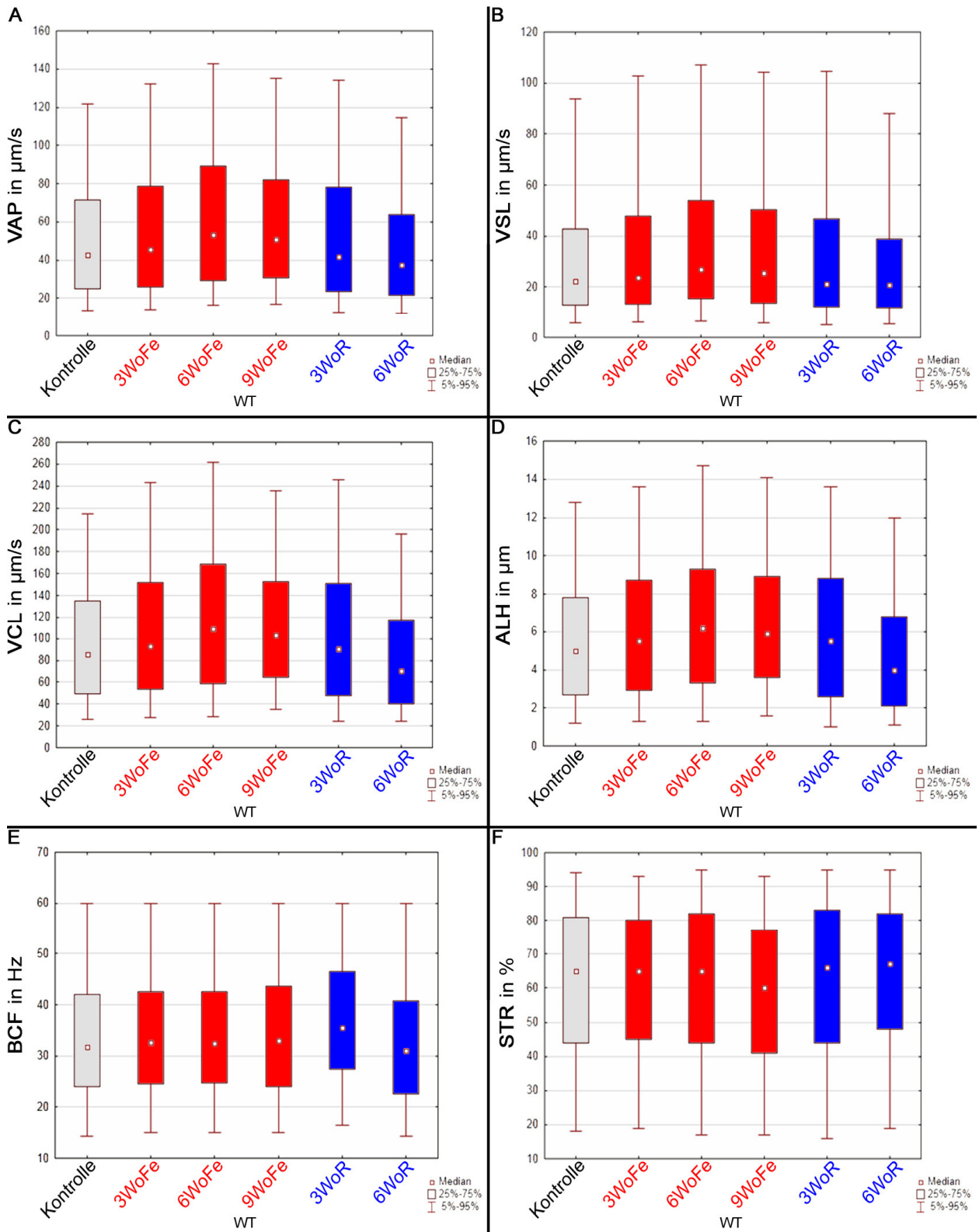


Abbildung 35: Spermienmotilitätsparameter von WT-Männchen unter verschiedenen Eisenbedingungen. Die Daten sind als Boxplots mit Median (kleines Kästchen im Balken), 25.-75. Perzentil-Intervall (Balken) und die minimale und maximale Streuung als Federbalken dargestellt. Die grauen Balken repräsentieren die Kontrollen, die roten die Eisenmangelgruppen und die blauen die Gruppen, die nach sechswöchiger Eisenmangeldiät für drei und sechs Wochen auf Standardfutter umgestellt wurden. A, Weggeschwindigkeit B, progressive Geschwindigkeit C, Bahngeschwindigkeit D, seitliche Amplitude des Spermienkopfausschlags E, Schlagfrequenz und F, Geradlinigkeit.

Einfluss des Eisenmangels auf das Motilitätsverhalten von C57BL/6J-Spermien

Im Vergleich zur normal-ernährten Kontrolle waren die Spermigeschwindigkeitsparameter (VAP, VSL, VCL), die Amplitude des seitlichen Kopfausschlags (ALH) und die Schlagfrequenz (BCF) von Wildtypmäusen nach drei, sechs und neun Wochen Eisenmangeldiät statistisch signifikant erhöht (siehe linke Hälfte von Tabelle 20 und Abbildung 35A - E), während die Geradlinigkeit (STR) der Spermienbewegung außer nach neun Wochen Eisenmangeldiät (dann signifikant erniedrigt) annähernd konstant war (siehe Abbildung 35F). Für die Geschwindigkeitsparameter (VAP, VSL, VCL) und der seitlichen Kopfausschlagsamplitude (ALH) wurden bei C57BL/6J-Spermien die höchsten Werte nach sechswöchiger Eisenmangeldiät erreicht.

Von den Ergebnissen der Motilitätsanalyse der *rescue*-Gruppen (3WoR und 6WoR) wurde erwartet, dass diese ungefähr denen der Kontrolle entsprächen. Nach dreiwöchigem *rescue* näherten sich die Werte wieder den Kontrollwerten an, die Bahngeschwindigkeit (VCL), der seitliche Spermienkopfausschlag (ALH) und die Schlagfrequenz (BCF) waren jedoch immer noch signifikant erhöht (siehe linke Hälfte von Tabelle 20 und Abbildung 34C, D, E). Nach sechs Wochen *rescue* waren mit Ausnahme der Geradlinigkeit (STR), die signifikant erhöht war, alle Motilitätsparameter statistisch signifikant (außer BCF) niedriger ausgefallen als bei den Kontrollen (siehe linke Hälfte von Tabelle 20 und Abbildung 35A - F). Damit war der durch die Eisenmangeldiät verursachte Spermienmotilitätseffekt beim Wildtyp durchaus reversibel.

Auswirkungen der Eisenmangeldiät auf das Spermienmotilitätsverhalten von *Irp2*^{-/-}-Männchen

Die Geschwindigkeitsparameter (VAP, VSL, VCL) sowie die Amplitude des seitlichen Spermienkopfausschlags (ALH) von *Irp2*^{-/-}-Männchen, die für drei, sechs und neun Wochen mit einer Eisendiät gefüttert wurden, waren im Vergleich zur normal-gefütterten *Irp2*^{-/-}-Kontrolle statistisch signifikant reduziert (siehe rechte Hälfte von Tabelle 20 und Abbildung 36A - D). Nach dreiwöchigem Eisenmangel war der reduktive Effekt am stärksten ausgeprägt. Die Schlagfrequenz (BCF) und die Geradlinigkeit (STR) von *Irp2*^{-/-}-Spermien waren nach drei und sechs Wochen Eisenmangeldiät signifikant erhöht (siehe rechte Hälfte von Tabelle 20 und Abbildung 36E, F).

Nach dreiwöchigem *rescue* näherten sich die Werte der Motilitätsparameter wieder den Kontrollwerten, die Geschwindigkeitsparameter (VAP, VSL, VCL) und die Amplitude des seitlichen Spermienkopfausschlags (ALH) waren jedoch immer noch signifikant vermindert (siehe rechte Hälfte von Tabelle 20 und Abbildung 36A - D) und die Schlagfrequenz (BCF) war signifikant erhöht (siehe rechte Hälfte von Tabelle 20 und Abbildung 36E). Allerdings kam es nach sechs Wochen *rescue* zu einem signifikanten Einbruch der Motilitätsparameter VAP, VSL, VCL und ALH (siehe rechte Hälfte von Tabelle 20 und Abbildung 36A - D) und einer signifikant erhöhten Schlagfrequenz (BCF) (siehe rechte Hälfte von Tabelle 20 und Abbildung 36E).

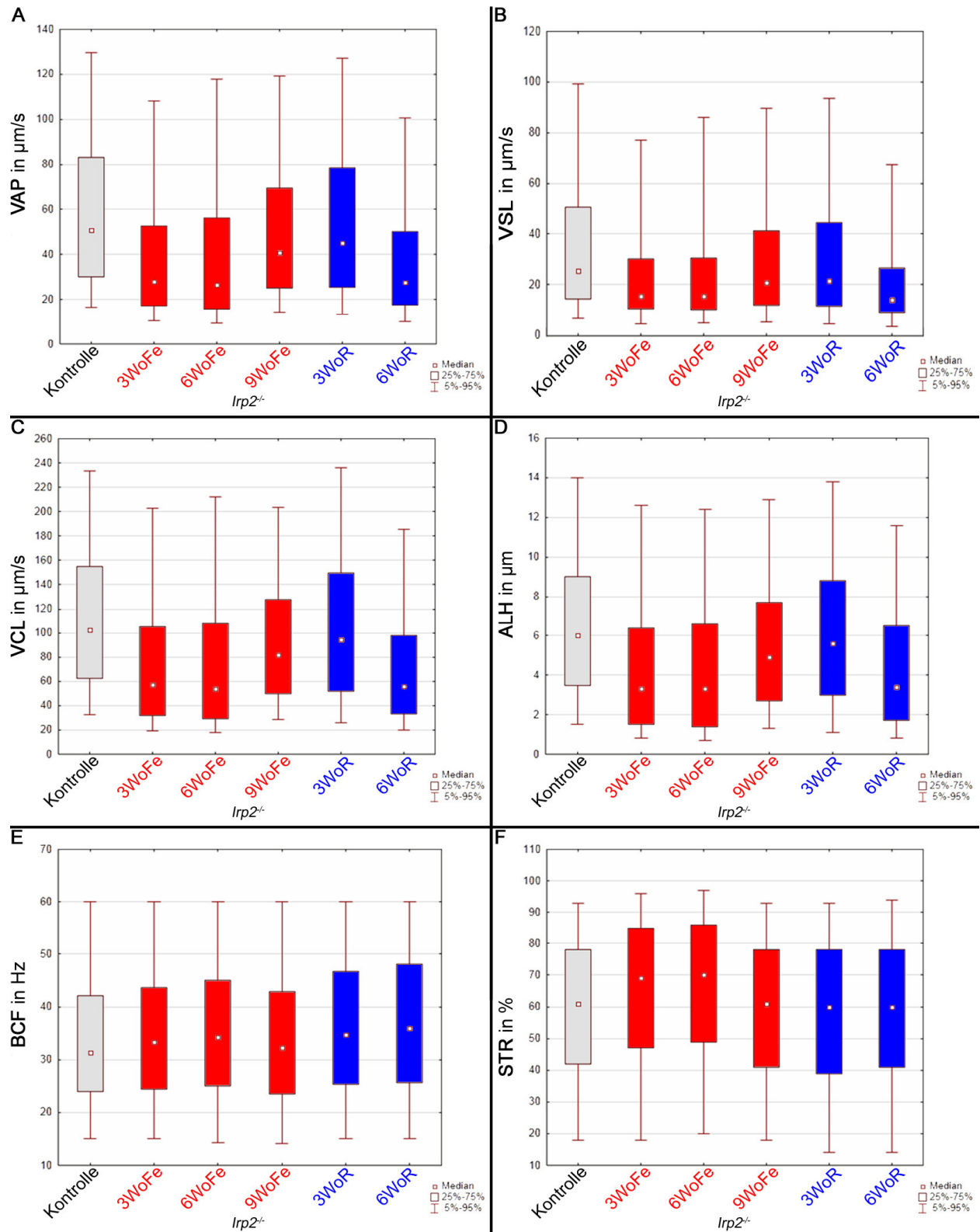


Abbildung 36: Spermienmotilitätsparameter von *Irp2^{-/-}*-Männchen unter den verschiedenen Fütterungsbedingungen. A, Weggeschwindigkeit B, progressive Geschwindigkeit C, Bahngeschwindigkeit D, Amplitude des seitlichen Spermienkopfausschlags E, Schlagfrequenz und F, Linearität. Die Daten werden als Boxplots mit Median (kleines Kästchen im Balken), 25.-75. Perzentil-Intervall (Balken) und die minimale und maximale Streuung als Federbalken präsentiert; in grau die Kontrollen, in rot Eisenmangelgruppen und in blau die *rescue* -Gruppen.

Zusammenfassend betrachtet bewirkte ein Eisenmangel in den Spermien von C57BL/6J-Männchen eine Veränderung des Bewegungsprofils in Richtung Hyperaktivierung (signifikant erhöhte VCL und ALH bei 3WoFe↓, 6WoFe↓ und 9WoFe↓, in Kombination mit einer signifikanten Reduktion der STR nach 9WoFe↓), einem für *Irp2*^{-/-}-Spermien typischen Bewegungsmuster (vgl. auch 4.4.2 ohne Eisenmangeldiät). Die Spermien von *Irp2*^{-/-}-Männchen nach Eisenmangeldiät zeigten kein hyperaktiviertes Bewegungsprofil mehr, sondern schwammen wesentlich langsamer und geradliniger. Ein ähnliches Bewegungsprofil zeigten auch die Spermien von *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäusen nach dreiwöchiger Eisenmangeldiät, wobei sich der Eisenmangel drastischer auf die Spermienmotilität von *Irp2*^{-/-}- als von *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Männchen (vgl. auch 4.8.2.1) im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen unter Standardbedingungen auswirkte.

4.9 IRP2-Defizienz in Kombination mit Eisenmangel vermindern die Fertilität

Aufgrund der drastischen Veränderung der Spermienmotilität von *Irp2*^{-/-}-Männchen unter Eisenmangelbedingungen wurden Fertilitätsanalysen durchgeführt. Sowohl C57BL/6J- als auch *Irp2*^{-/-}-Männchen wurden während einer sechswöchigen Eisenmangeldiät in der letzten Diätwoche für fünf Tage mit normal gefütterten Weibchen gleichen Genotyps verpaart. Von elf homozygoten *Irp2*-Verpaarungen generierten nur zwei Würfe, während von sieben Wildtypverpaarungen sechs fertil waren. Die ermittelte durchschnittliche Nachkommenzahl pro Zuchtpaar war bei *Irp2*^{-/-}-Verpaarungen mit Männchen auf Eisenmangeldiät verglichen mit dem Wildtyp signifikant vermindert (siehe Tabelle 21). Von den beiden fertilen *Irp2*^{-/-}-Männchen generierte das eine zwei und das andere sieben Nachkommen.

Tabelle 21: Analyse der Fertilität von WT- und *Irp2*^{-/-}-Männchen unter Eisenmangelbedingungen. Die durchschnittlichen Nachkommenzahlen pro Zuchtpaar sind als arithmetische Mittelwerte (\bar{x}) ± Standardabweichung (s) dargestellt. Die Zahl in der Klammer ist die Nachkommenanzahl. Die Unterschiede sind statistisch signifikant (Zweistichproben-t-Test: $p < 0,05$ (*) signifikant).

Genotyp der Zuchtpaare	Anzahl der Verpaarungen	Anzahl der Würfe	durchschnittliche Nachkommenzahl pro Zuchtpaar $\bar{x} \pm s$
WT	7	6 (29)	4,14 ± 3,08
<i>Irp2</i> ^{-/-}	11	2 (9)	0,82 ± 2,14 (*)

4.10 Die morphologische Analyse der Spermien

Um zu überprüfen, ob die drastische Reduktion der Spermengeschwindigkeiten bei *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-}; *Irp2*^{-/-}-Mäusen nach Eisenmangeldiät durch strukturelle Abnormalitäten der Spermien bzw. des Flagellums bedingt ist, wurde die Morphologie der Spermatozoen von C57BL/6J-, *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-}; *Irp2*^{-/-}-Mäusen und von C57BL/6J- und *Irp2*^{-/-}-Männchen mit sechswöchigem Eisenmangel elektronenmikroskopisch in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Meinhardt des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Universität Gießen analysiert (siehe 3.14.4 - 3.14.5).

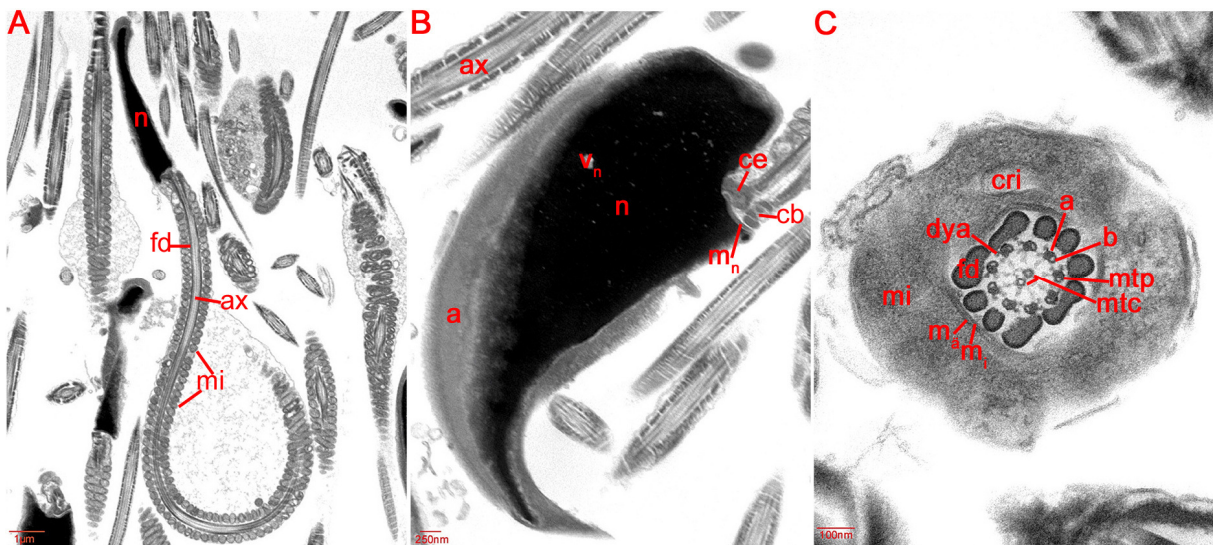


Abbildung 37: Elektronenmikroskopische Analyse der Spermienmorphologie. A, Ausschnitt einer Übersicht eines Spermienlängsschnittes. B, Ausschnitt eines Spermienkopfes (längs). C, Querschnitt eines Spermienmittelstücks. n: Nucleus; fd: *Fibra Densa* (äußere Längsfasern); ax: Axonema; mi: Mitochondrien (mitochondriale Profile); a: Akrosom; v_n: Kernvakuole; ce: Zentriolen; cb: Streifenkörper (*Corpusculum basale*); m_n: Kernmembran; m_a: äußere und m_i: innere Mitochondrienmembran; cri: Cristae der Mitochondrien; dya: Dyneinarme; a: α-Tubulin und b: β-Tubulin eines äußeren Mikrotubuluspaars; mtp: *Mikrotubuli peripherici* (insgesamt 9x2, aus a und b bestehend); mtc: zwei *Mikrotubuli centrales*.

Zwischen den analysierten Gruppen (WT, WT6WoFe↓, *Irp2*^{-/-}, *Irp2*^{-/-}6WoFe↓ und *Irp1*^{+/-}; *Irp2*^{-/-}) existierten keine Abnormalitäten in der Spermienultrastruktur (siehe exemplarisch Abbildung 37). Allerdings fiel bei der elektronenmikroskopischen Begutachtung auf, dass die Mitochondrien einiger Gruppen eine verstärkte Vakuolisierung aufwiesen (siehe Abbildung 38).

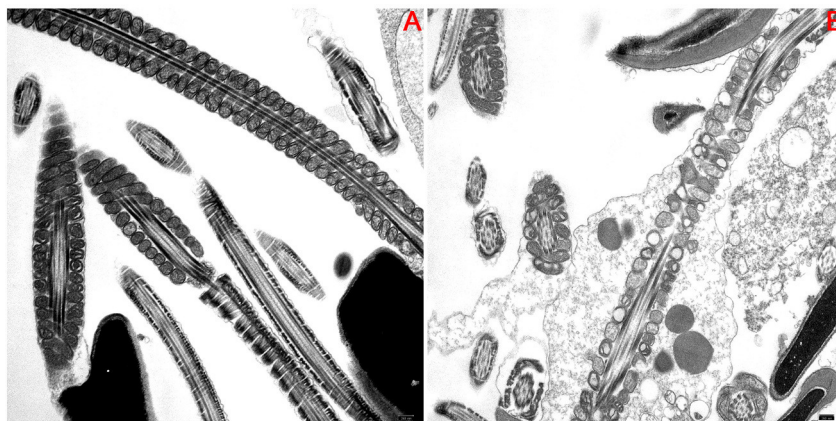


Abbildung 38: Längsschnitte von Spermatozoen zur Quantifizierung mitochondrialer Profile. Die Mitochondrien sind im Mittelstück des Spermatozoons dicht und ringförmig an die äußeren Ringfasern angelagert. Ein einzelnes ringförmiges Gebilde entspricht dabei einem mitochondrialen Profil. A, normale mitochondriale Profile von WT-Spermien. B, zum Teil stark vakuolierte mitochondriale Profile von *Irp2*^{-/-}-Spermien. Die Bilder wurden in 12000-facher Vergrößerung aufgenommen und quantifiziert.

4.10.1 *IRP2-Defizienz in Kombination mit Eisenmangel resultiert in verstärkter Vakuolisierung der Mitochondrien*

Im weiteren Verlauf wurden die mitochondrialen Profile der Spermienanschnitte von C57BL/6J-, *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäusen und von Wildtyp- und *Irp2*^{-/-}-Männchen nach sechswöchiger Eisenmangeldiät quantifiziert. Dabei wurden drei mitochondriale Profiltypen unterschieden: normal, mittelstark vakuoliert und stark vakuoliert. Die Anzahl der vakuolierten Profile wurde jeweils in Relation zur Gesamtzahl der ausgezählten mitochondrialen Profile gesetzt (siehe Tabelle 22).

Tabelle 22: Quantifizierung vakuolisierter mitochondrialer Profile von WT-, *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Männchen (Kontrolle und nach sechs Wochen Eisenmangeldiät). Dargestellt sind die Mittelwerte (x) ± Standardabweichung (s) von n analysierten Individuen und N quantifizierten mitochondrialen Profilen. Die Unterschiede sind statistisch signifikant (*), wenn p < 0,05 (Kruskal-Wallis-Test). Die Kontrollen wurden mit Standardfutter gefüttert.

Gruppe	prozentualer Anteil vakuolisierter mitochondrialer Profile x ± s		n; N
		davon stark vakuoliert	
WT	20,92 ± 9,07	2,99 ± 1,58	n = 3; N = 2030
WT 6WoFe↓	38,51 ± 22,18	2,53 ± 1,75	n = 3; N = 2906
<i>Irp2</i> ^{-/-}	34,31 ± 10,19	6,49 ± 2,14	n = 3; N = 2023
<i>Irp2</i> ^{-/-} 6WoFe↓	58,87 ± 1,68 (*)	12,67 ± 2,29 (*)	n = 2; N = 1794
<i>Irp1</i> ^{+/-} ; <i>Irp2</i> ^{-/-}	50,35 ± 9,33 (*)	5,82 ± 4,29	n = 3; N = 1011

Sowohl Wildtypmännchen, die sechs Wochen mit einer Eisenmangeldiät gefüttert wurden, als auch *Irp2*^{-/-}-Männchen wiesen im Vergleich zu C57BL/6J-Mäusen unter Standardbedingungen einen

leichten (nicht signifikanten) Anstieg der vakuolisierten Profile auf. Besonders ausgeprägt war dieser Effekt bei *Irp2*^{-/-}-Männchen nach sechswöchigem Eisenmangel und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäusen, bei denen ca. 50% der mitochondrialen Profile vakuolisiert vorlagen (siehe Tabelle 22). Der prozentuale Anteil der vakuolisierten mitochondrialen Profile der Spermien von *Irp2*^{-/-}-Mäusen nach sechswöchiger Eisenmangeldiät war im Vergleich zu den mit Standardfutter gefütterten Wildtyp- und *Irp2*^{-/-}-Gruppen sowie zum gleichbehandelten Wildtyp (WT 6WoFe↓) signifikant erhöht. Ebenfalls einen statistisch signifikanten Unterschied ergab der Vergleich von *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}- mit normal gefütterten C57BL/6J-Mäusen (siehe Abbildung 39).

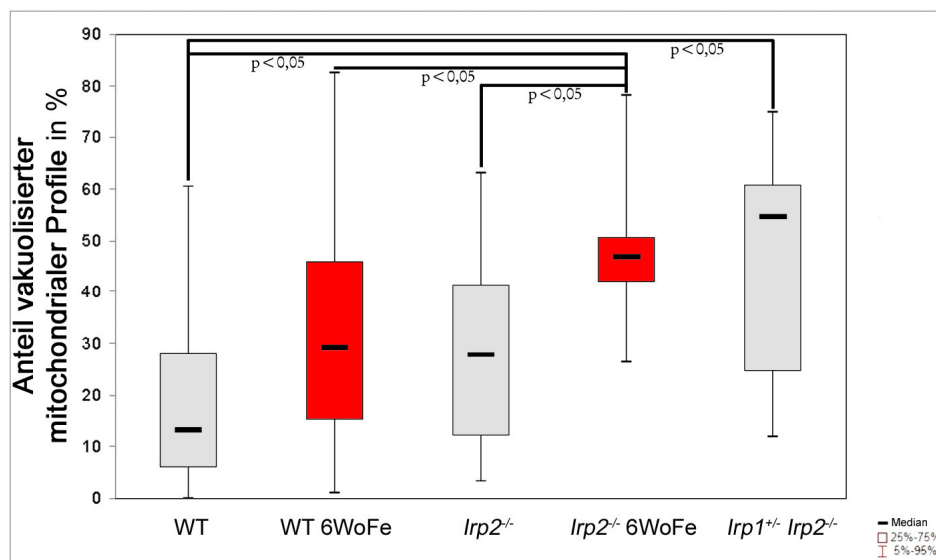


Abbildung 39: Graphische Übersicht der vakuolisierten mitochondrialen Profile von WT-, *Irp2*^{-/-} und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Männchen (Kontrolle und sechs Wochen Eisenmangel) in %. Die Daten der Kontrollen werden in grau, die der Eisenmangelgruppen in rot als Boxplots mit Median (kleines Kästchen im Balken), 25.-75. Perzentil-Intervall (Balken) und der minimalen und maximalen Streuung (Federbalken) präsentiert. Signifikanzen sind durch Querbalken gekennzeichnet, Mittelwerte mit Standardabweichungen befinden sich in Tabelle 22.

Zusammenfassend bedingt IRP2-Defizienz in den Mitochondrien der Spermien eine verstärkte Vakuolisierung. Dieser Effekt kann durch eine Eisenmangeldiät oder eine verminderte IRP1-Aktivität noch weiter verstärkt werden.

4.11 Der ATP-Gehalt der Spermien war trotz Eisenmangeldiät nicht beeinträchtigt

Eine mögliche Ursache für das drastisch veränderte Spermienmotilitätsverhalten und die verminderte Fertilität von *Irp2*^{-/-}-Männchen, denen eine Eisenmangeldiät verabreicht wurde, könnte ATP-Mangel sein. Sowohl die oxidative Phosphorylierung als auch die Glykolyse dienen der ATP-Generation für

die Spermienbewegung (Ford, 2006; Turner, 2006) und viele an der ATP-Produktion beteiligten Enzyme der oxidativen Phosphorylierung enthalten Eisen-Schwefel-Cluster als Kofaktoren für die Katalyse (Eisenstein, 2000). Daher ist es denkbar, dass aufgrund des Eisenmangels weniger chemische Energie in Form von ATP produziert werden kann. Die Messung des ATP-Gehalts der Spermien aus den Nebenhodenschwänzen erfolgte mit dem ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II (siehe 3.7). Der ATP-Gehalt wurde auf ein mg Protein berechnet. Hierzu wurde von den Spermienproben die Proteinkonzentration mittels Bradford-Assays bestimmt (siehe 3.7.1). Die Mittelwerte und Standardabweichungen der ATP-Konzentration pro mg Protein sind in Tabelle 23 zusammengefasst.

Tabelle 23: ATP-Konzentration der Spermien pro mg Protein von drei Monate alten C57BL/6J- und *Irp2*^{-/-}-Mäusen unter Standardbedingungen und nach sechswöchiger Eisenmangeldiät und von drei Monate alten *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Männchen. Dargestellt sind die Mittelwerte (x) ± Standardabweichung (s) von n analysierten Individuen. Die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant (Kruskal-Wallis-Test, p > 0,05). Die Kontrollen erhielten keine Eisenmangeldiät, sondern Standardfutter.

Gruppe	WT ATP [mM] pro mg Protein x ± s (n)	<i>Irp2</i> ^{-/-} ATP [mM] pro mg Protein x ± s (n)	<i>Irp1</i> ^{+/-} ; <i>Irp2</i> ^{-/-} ATP [mM] pro mg Protein x ± s (n)
Kontrolle	18,87 ± 1,70 (4)	13,84 ± 3,21 (6)	17,08 ± 4,74 (4)
6WoFe↓	14,24 ± 2,46 (4)	15,96 ± 5,14 (6)	n.d.

Die ATP-Mengen der Spermien der analysierten Gruppen divergierten statistisch nicht signifikant voneinander (p = 0,1422). Dennoch wiesen die Spermien von C57BL/6J-Kontrollen die höchste ATP-Konzentration auf. Unerwarteter Weise zeigten die Spermien von *Irp2*^{-/-}-Mäusen unter Eisenmangel eine durchschnittlich höhere ATP-Konzentration als die *Irp2*^{-/-}-Kontrollen. Auffälligerweise war der ATP-Gehalt von Wildtypmäusen nach sechswöchiger Eisenmangeldiät und *Irp2*^{-/-}-Männchen unter Standardbedingungen, die beide hyperaktivierte Bewegungsprofile zeigten, im Vergleich zu normal ernährten C57BL/6J-Kontrollen und *Irp2*^{-/-}-Mäusen unter Eisenmangel, die nur aktivierte Spermienprofile aufwiesen, niedriger ausgefallen (siehe Tabelle 23; vgl. auch 4.8.2).

Die drastische Reduktion der Spermengeschwindigkeit von *Irp2*^{-/-}-Mäusen unter Eisenmangel kann folglich nicht durch einen verminderten ATP-Gehalt der Spermien bedingt sein, sondern muss andere Ursachen haben.

5 DISKUSSION

5.1 Zusammenstellung und Interpretation der Ergebnisse

Mit Hilfe des *Ireb2^{tm1Roua}*(*Irp2*)-Mausmodells sollte die Rolle von IRP2 in der testikulären Eisenhomöostase und in der Spermatogenese untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden wegen der redundanten IRE-Bindungsfunktion der beiden IRP-Proteine zusätzlich *Irp1^{+/-};Irp2^{-/-}*-Mäuse generiert. Ausgehend von der Hypothese, dass IRP2-defiziente Mäuse aufgrund der Misregulation der intrazellulären Eisenhomöostase in den bisher analysierten Geweben einen intrazellulären Eisenmangel aufweisen, sollte dieser Effekt durch eine Fütterung der Mäuse mit einer speziellen Eisenmangeldiät verstärkt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit werden im Folgenden kurz zusammengefasst und anschließend diskutiert.

Mittels RT-PCR-Analysen konnte gezeigt werden, dass *Irp2* im Wildtypen abundant, *Irp1* dagegen nur sehr schwach exprimiert wird und beide *Irp*-Transkripte nach dem Maus-spezifischen Muster gespleißt werden (siehe 4.1.1). Durch eine detaillierte Analyse der testikulären Expression von *Irp2* mit Hilfe der RNA *in situ* Hybridisierung auf Hodenschnitten (SISH) konnte ein sehr distinktes Expressionsmuster ausschließlich in Spermatozyten des Stadiums 8 der Spermatogenesestadien VII-VIII nachgewiesen werden, welches bei *Irp1*-Defizienz auf die Stadien IV-V bis VIII ausgedehnt war (siehe 4.1.2). Da keines der untersuchten IRP2-regulierten Proteine, wie DMT1, Ferritin und Ferroportin in Spermatozyten des Stadiums 8 exprimiert wurde, kann eine direkte Koexpression mit IRP2 ausgeschlossen werden. Ferner hatte weder der komplette Verlust von *Irp2* noch der eines zusätzlichen *Irp1*-Allels oder die Kombination mit einer Eisenmangeldiät einen Einfluss auf die testikuläre Topologie der IRP2-regulierten Proteine DMT1, Ferritin und Ferroportin (siehe 4.5 und 4.7). Dennoch deuten diese Daten darauf hin, dass IRP2 in Sertolizellen des Maushodens die Expression von Ferritin, das in verschiedenen Geweben IRP2-abhängig reguliert wird (LaVaute *et al.*, 2001; Galy *et al.*, 2008; Ferring-Appel *et al.*, 2009), kontrolliert. Der Expressionslevel von Ferritin in Sertolizellen erschien bei IRP2-Defizienz gegenüber dem Wildtyp verstärkt (siehe 4.5.2) und unter Eisenmangelbedingungen in allen analysierten Genotypen verglichen mit den normal gefütterten Kontrollen vermindert (siehe 4.7).

Die Spermatogenese war weder bei IRP2-Defizienz noch durch den zusätzlichen Verlust eines *Irp1*-Allels nach histologischer Begutachtung signifikant im Vergleich zum Wildtyp beeinträchtigt (siehe 4.2.1 und 4.6.2). So variierten *Irp2^{-/-}*-Mäuse verglichen mit Wildtypmäusen nicht signifikant in ihren testikulären keimzellspezifischen Proliferations- und Apoptoseraten (siehe 4.2.2 und 4.2.3). Sowohl

Irp1^{-/-}- und *Irp2*^{-/-}- als auch *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Männchen waren normal fertil (siehe 4.3) und die Spermien funktionsfähig (siehe 4.10). *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Spermien wiesen im Vergleich zum Wildtyp jedoch einen auf die Spermienultrastruktur (siehe 4.10.1), -quantität (siehe 4.4.1 und 4.8.1) und -motilität (siehe 4.4.2 und 4.8.2) beschränkten Phänotyp auf, der die Fertilität unter normalen Bedingungen nicht beeinflusst (siehe 4.3), doch bei einem durch Eisenmangelfutter induzierten systemischen Eisenmangel bei *Irp2*^{-/-}-Männchen eine reduzierte Fertilität zur Folge hat (siehe 4.9).

Zusammenfassend scheint IRP2 an der Regulation der testikulären Eisenhomöostase nicht essentiell beteiligt zu sein und für die Spermatogenese unter Normalbedingungen keine gravierende Rolle zu spielen. Jedoch konnte die Hypothese, dass bei einer IRP2-Defizienz ein chronischer intrazellulärer Eisenmangel herrscht, durch diese Studie bestätigt werden. Die Bestätigung dieser Hypothese resultiert vor allem aus dem Vergleich der Hämatokritwerte von *Irp2*^{-/-}- und Wildtypmäusen unter Standardbedingungen und einem Vergleich von normal gefütterten *Irp2*^{-/-}- und C57BL/6J-Männchen, die eine Eisenmangeldiät erhielten. Wildtypmäuse, die bis zu neun Wochen unter Eisenmangelbedingungen gehalten wurden, zeigten ähnlich erniedrigte Hämatokritwerte wie *Irp2*^{-/-}-Mäuse, denen Standardfutter verabreicht wurde. *Irp2*^{-/-}-Mäuse, die *per se* schon signifikant erniedrigte Hämatokritwerte aufwiesen, zeigten nach bis zu neunwöchiger Eisenmangelfutterexposition eine weitere hoch signifikante Reduktion der Hämatokritwerte im Vergleich zu normal gefütterten Kontrollen und gegenüber den mit Eisenmangelfutter behandelten Wildtypmäusen (siehe 4.6.1). Der intrazelluläre Eisenmangel bei *Irp2*^{-/-}-Mäusen könnte durch eine verminderte TfR1-Expression und eine verstärkte Ferritinexpression bedingt sein (LaVaute *et al.*, 2001; Meyron-Holtz *et al.*, 2004a; Cooperman *et al.*, 2005), so dass weniger Eisen in die Zellen gelangt und in den Zellen vorhandenes Eisen verstärkt in Ferritin gespeichert vorliegt und damit nicht mehr verfügbar ist.

Unter normalen Futterbedingungen waren die Spermienzahlen von *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäusen gegenüber dem Wildtyp erhöht (siehe 4.4.1). Unter Eisenmangelbedingungen stiegen nach neun Wochen die Spermienzahlen von C57BL/6J- und *Irp2*^{-/-}-Männchen rapide an (siehe 4.8.1). Die Spermien von *Irp2*^{-/-}-Mäusen waren unter Standardbedingungen im Vergleich zu C57BL/6J hyperaktiviert (siehe 4.4.2) und unter Eisenmangel signifikant in ihrer Geschwindigkeit erniedrigt. Dagegen bildeten Wildtypmännchen nach Fütterung mit der Eisenmangeldiät hyperaktivierte Spermien aus (siehe 4.8.2.2). *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Spermien zeigten im Vergleich zum Wildtyp einen vermehrten Anteil vakuolisierter Mitochondrien. Unter Eisenmangelbedingungen stieg der Anteil der vakuolisierten mitochondrialen Profile bei *Irp2*^{-/-}- und C57BL/6J-Spermien im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen an. Der prozentuale Anteil vakuolisierter mitochondrialer Profile von mit Standardfutter gefütterten *Irp2*^{-/-}-Mäusen und von Wildtypmännchen, die mit sechswöchiger Eisenmangeldiät gefüttert wurden, war dabei relativ ähnlich (siehe 4.10.1).

Zusammengefasst ergeben sich daraus die folgenden Gemeinsamkeiten zwischen Wildtypmännchen nach verabreichter Eisenmangeldiät und normal gefütterten *Irp2*^{-/-}-Kontrollen:

- erniedrigte Hämatokritwerte (siehe 4.6.1)
- erhöhte Spermienzahlen (siehe 4.4.1 und 4.8.1)
- hyperaktivierte, anstatt aktivierte Spermien (siehe 4.4.2 und 4.8.2.2)
- gehäuftes Auftreten vakuolisierter mitochondrialer Profile (siehe 4.10.1)

So zeigen *Irp2*^{-/-}-Mäuse einen auf die Spermien bezogenen Eisenmangel-Phänotyp, der vermutlich keine direkte Folge der IRP2-Defizienz, sondern eher ein sekundärer Effekt des Eisenmangels ist. Bei einer Verstärkung des Eisenmangels als Folge einer Eisenmangeldiät bewirkt die drastisch verlangsamte Motilität und der erhöhte Grad der mitochondrialen Vakuolisierung der Spermien von *Irp2*^{-/-}-Mäusen eine stark verminderte Fertilität.

5.2 Expressionsanalysen

Die Expression der IRPs wurde bisher im Hoden und Nebenhoden noch nicht detaillierter analysiert. So existieren bislang ausschließlich Expressionsnachweise im Hoden und Nebenhoden der Maus mittels RNA *in situ* Hybridisierung (SISH). Während beide IRPs im Hoden exprimiert werden, wobei die Expression von IRP2 im Hoden stärker ausfällt als die von IRP1, konnten nur *Irp1*-Transkripte im murinen Nebenhoden nachgewiesen werden (siehe Abbildung 40; Meyron-Holtz *et al.*, 2004a). Die IRP1 und IRP2 exprimierenden testikulären und epididymalen Zelltypen sind bislang nicht bekannt.

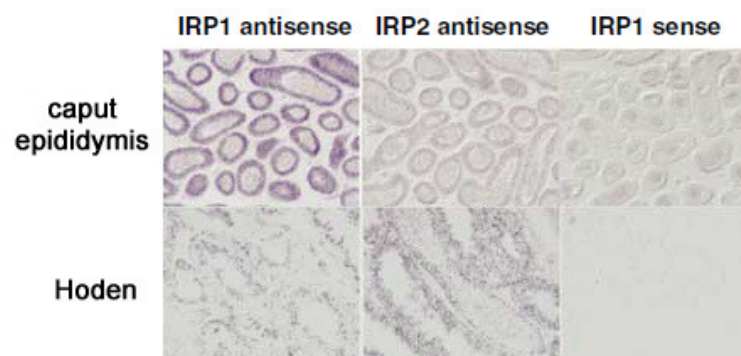


Abbildung 40: Expressionsanalyse von *Irp1* (erste Spalte) und *Irp2* (zweite Spalte) mittels SISH im Nebenhodenkopf (oben) und im Hoden (unten). Als Kontrolle wurde eine Sense-Sonde von *Irp1* verwendet (aus Meyron-Holtz *et al.*, 2004a).

Als Sonden dienten in der Studie von Meyron-Holtz und Mitarbeitern (2004a) jeweils *full length*-Transkripte von *Irp1* bzw. *Irp2*, die vor der Hybridisierung alkalisch in ca. 500 bp große Fragmente hydrolysiert wurden. Es wurden in dieser Studie nur für *Irp1* Abbildungen von der Hybridisierung mit den entsprechenden *Irp1*-Sense-Sonden präsentiert (siehe Abbildung 40). Folglich ist unklar,

inwiefern die dargestellten testikulären Hybridisierungsmuster für die gewählten *Irp2*-Antisense Sonden spezifisch sind.

Da in der vorliegenden Arbeit weder die von Meyron-Holtz *et al.* (2004a) für Western Blot-Analysen verwendeten IRP-Antikörper noch kommerziell erworbene IRP1- und IRP2-Antikörper (Alpha Diagnostic International) für eine immunhistochemische Expressionsanalyse im murinen Hoden erfolgreich etabliert werden konnten, wurde das testikuläre Expressionsmuster von IRP1 und IRP2 detaillierter mittels SISH-Analyse untersucht. Hierfür wurden spezifische mRNA-Sonden für *Irp1* und *Irp2* generiert.

5.2.1 Wahl der Sonden für die *Irp*-SISH

Bei den IRPs handelt es sich um homologe Proteine, die in vielen Spezies stark konserviert sind. IRP2 besitzt im Vergleich zu IRP1 N-terminal eine 73 Aminosäuren große Insertion (NP_073146.2 [Position p.Ile139-p.Pro211]; NM_22655.3 [Position c.418-c.636]), dafür fehlt IRP2 ein ca. 35 Aminosäuren großer Bereich, der relativ mittig in der Aminosäuresequenz von IRP1 liegt (NP_031412.2 [Position p.Asn535-p.Phe570]; NM_007386.2 [Position c.1605-c.1709]; Rouault *et al.*, 1990). Der 73 Aminosäure große N-terminale Bereich von IRP2 ist bei normalen Eisenkonzentrationen für die Degradierung von IRP2 verantwortlich ist (Iwai *et al.*, 1995). Mittlerweile konnte demonstriert werden, dass auch der C-Terminus für den Abbau von IRP2 durch das Proteasom relevant ist (Wang *et al.*, 2008). Die *Irp2*-spezifische SISH-Sonde enthielt den für IRP2 typischen 5'-Bereich (*Irp2* SIII #16, Exon 1-6, insgesamt 719 bp) mit der 73 Aminosäuren großen Insertion, während die *Irp1*-spezifische Sonde den für IRP1 spezifischen mittleren cDNA-Bereich beinhaltete (*Irp1* SIII #7, Exon 11-16, insgesamt 649 bp; siehe 3.10.1). Ein Sequenzvergleich der für die Sonden jeweils ausgewählten Bereiche gegen das Mausgenom mit Hilfe des NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) Blast-Tools bestätigte die Spezifität für das jeweilige *Irp*-Transkript und ergab keine weiteren Übereinstimmungen im murinen Genom. Alternativ prozessierte *Irp1*- und *Irp2*-Transkripte sind bislang bei der Maus nicht bekannt (Ensembl ENSMUST00000034843, ENSMUST00000102973).

Eine parallel als Negativkontrolle eingesetzte Sense-Sonde sowohl für *Irp1* als auch für *Irp2* ergab keine unspezifische Hintergrundfärbung (siehe 4.1.2). Folglich spiegeln die erhobenen testikulären Hybridisierungsmuster der *Irp1*- und *Irp2*-Antisense-Sonden die Expression des jeweiligen *full length*-Transkripts spezifisch wider.

5.2.2 Die testikuläre Expression von IRP2

Neben der SISH wurden zusätzlich RT-PCR-Analysen durchgeführt, um das Spleißverhalten der testikulären *Irp1*- und *Irp2*-Transkripte näher zu analysieren. Es wurden für *Irp1*- und *Irp2*-*full length*-Transkripte amplifiziert, die nach dem bekannten Maus-spezifischen Muster gespleißt wurden. Die RT-PCR-Analysen deuten auf eine sehr schwache IRP1- und eine starke IRP2-Expression im Hoden hin (siehe 4.1.1). Dieses Resultat ist in Übereinstimmung mit den von Meyron-Holtz *et al.* (2004a) im Hoden präsentierten Daten, die bei der RNA *in situ* Hybridisierung auf Mausgewebsschnitten eine stärkere Expression von IRP2 im Vergleich zu IRP1 gezeigt haben. Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit mittels SISH im Hoden keine *Irp1*-mRNA detektiert (siehe 4.1.2). Denkbar wäre, dass der testikuläre *Irp1*-Transkriptionslevel unter der Detektionsgrenze der SISH-Methode liegt. Meyron-Holtz *et al.* (2004a) hatten bei ihren Analysen *full length*-Transkripte von *Irp1* bzw. *Irp2* für die RNA *in situ* Hybridisierung eingesetzt. Weil die *full length*-Transkripte von *Irp1* und *Irp2* einen relativ hohen Homologiegrad zeigen (57% identische bzw. 75% ähnliche Aminosäuren; Rouault *et al.*, 1990, Nukleotididentität 66%; NCBI Blast) ist es fraglich inwiefern die dargestellten Hybridisierungsmuster wirklich spezifisch für IRP1 und IRP2 sind. Zur weiteren Verifizierung der IRP1 exprimierenden testikulären Zelltypen sollten parallel weitere *Irp1*-Sonden für eine SISH-Analyse generiert und eingesetzt werden, die z. B. auch den N-terminalen Bereich von IRP1 (Exons 2-6) umfassen.

Sowohl mittels RT-PCR-Analysen als auch mit der SISH-Methode wurde in dieser Arbeit eine abundante Expression von IRP2 im Maushoden nachgewiesen (siehe 4.1). Das *Irp2*-Transkript wird sehr distinkt in Spermatiden des Stadiums 8 (runde Spermatiden und Spermatiden in beginnender Elongation) der Spermatogenesestadien VII-VIII exprimiert (Oakberg, 1956; 1957). Bei Abwesenheit von IRP1 verschiebt sich das testikuläre Expressionsmuster von *Irp2* auf frühere Spermatogenesestadien (bereits ab IV-V). Auch wird IRP2 bei einer IRP1-Defizienz in Spermatiden des Stadiums 8 des Spermatogenesestadiums VIII stärker als beim Wildtyp exprimiert (siehe 4.1.2). Eine verstärkte Expression von IRP2 in *Irp1*^{-/-}-Mäusen wurde bereits für das Kleinhirn und die Milz gezeigt (Meyron-Holtz *et al.*, 2004a). Dieses abweichende Expressionsmuster deutet auf eine funktionelle Redundanz bezüglich der IRE-Bindungsaktivität beider Proteine im Maushoden hin. Darüber hinaus spricht dieses Ergebnis dafür, dass *Irp1* tatsächlich im Hoden exprimiert wird, was aber in dieser Arbeit nur durch die offenbar sensitivere RT-PCR-Methode, nicht aber mittels SISH gezeigt werden konnte.

Im Rahmen der RT-PCR-Analysen (siehe 4.1.1) wurden zusätzlich Hoden eines *Kit*^{W-v}/*Kit*^{W-v}-Männchens analysiert (Daten nicht gezeigt). *Kit*^{W-v}/*Kit*^{W-v}-Mäuse sind homozygot für die Punktmutation *Kit*^{W-v} im Tyrosinkinaserzeptorgen *c-Kit*, die auf Proteinebene zu einer beeinträchtigten Rezeptoraktivität führt. Daraus resultierend enthalten die KIT-defizienten Hoden fast keine Keimzellen. Keines der *Irp*-Transkripte wird im Hoden von *Kit*^{W-v}/*Kit*^{W-v}-Mäusen exprimiert. Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten der SISH-Daten überein, da die Spermatogenese der

Kit^{W-v}/Kit^{W-v}-Mäuse prämeiotisch sehr früh arretiert und *Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Hoden, wenn überhaupt, nur undifferenzierte Typ A-Spermatogonien, neben Sertolizellen und interstitielle Zellen wie z. B. Leydig- und immunreaktive Zellen beinhalten (Little und Cloudman, 1937; Fekete *et al.*, 1941).

Im Rahmen der SISH-Analysen der Hoden wurden auch Bereiche des Nebenhodenkopfes gefärbt, jedoch wurden weder für *Irp1* noch für *Irp2* epididymale Transkripte nachgewiesen. Diese Beobachtungen stehen für IRP2 mit denen von Meyron-Holtz *et al.* (2004a) in Einklang. Für IRP1 besteht allerdings ein Widerspruch zu den von Meyron-Holtz *et al.* (2004a) erhobenen Daten. Folglich sollte der fehlende Expressionsnachweis von IRP1 im Nebenhodenkopf (*Caput epididymis*) der Maus durch weiterführende Expressionsanalysen mittels SISH-, RT-PCR- und/oder Western-Blot-Analysen verifiziert werden.

5.2.3 Die testikuläre Expression von IRP2-regulierten Zielproteinen

Das testikuläre Expressionsmuster der IRP2-regulierten Proteine DMT1, Ferritin und Ferroportin, wurde bereits ausführlich in *Irp2^{-/-}*- und Wildtypmäusen von Leichtmann-Bardogoo *et al.* (2012) analysiert. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig die testikuläre Expression von DMT1 bei *Irp2^{-/-}*-Mäusen (siehe 4.5.1) und von DMT1, Ferritin und Ferroportin in *Irp1^{+/-};Irp2^{-/-}*-Männchen und *Irp2^{-/-}*- und C57BL/6J-Mäusen nach drei-, sechs- und neunwöchiger Eisenmangeldiät untersucht (siehe 4.5 und 4.7). Ausgehend von der Annahme, dass IRP2 auch im Hoden an der Regulation der dort exprimierten Zielproteine beteiligt ist, wurde erwartet, dass sich die Expression der analysierten Proteine durch Abwesenheit von IRP2 und/oder unter Eisenmangelbedingungen verändert. Es existierten jedoch keine topologischen Expressionsunterschiede in der testikulären DMT1-, Ferritin- und Ferroportin-Expression bei IRP2-defizienten Mäusen (*Irp2^{-/-}* und *Irp1^{+/-};Irp2^{-/-}*) im Vergleich zum Wildtyp unter Normal- und Eisenmangelbedingungen (siehe 4.5 und 4.7). Allerdings deuten die in dieser Arbeit erhobenen Expressionsdaten von IRP2-Zieltranskripten in Übereinstimmung mit der Literatur darauf, dass das Ferritinlevel bei IRP2-Defizienz in Sertolizellen verstärkt ist (siehe 4.5.2; vgl. Leichtmann-Bardogoo *et al.*, 2012). Dagegen erschien die Expression von Ferritin in Sertolizellen von *Irp2^{-/-}*- und *Irp1^{+/-};Irp2^{-/-}*-Mäusen unter Eisenmangelbedingungen vermindert (siehe 4.7).

Die testikuläre Expression von DMT1 wurde zuvor bereits von Griffin *et al.* (2005) im adulten Rattenhoden und von Leichtmann-Bardogoo *et al.* (2012) im adulten Maushoden detailliert analysiert. DMT1 wird im Ratten- und Maushoden in primären Spermatozyten, in elongierten Spermatiden und Sertolizellen exprimiert, wobei der DMT1-Expressionslevel in primären Spermatozyten bei der Maus vergleichsweise geringer ausfällt (Griffin *et al.*, 2005; Leichtmann-Bardogoo *et al.*, 2012). Bereits 2002 wurde von Jabado *et al.* gezeigt, dass DMT1 auf der Membran von Phagosomen einer murinen Sertolizelllinie exprimiert wird. So wurde vermutet, dass DMT1 am testikulären Eisentransport

beteiligt ist (Jabado *et al.*, 2002). Elongierende Spermatozyten verlieren einen Teil ihres Zytoplasmas und die darin enthaltenen Komponenten, wie Mitochondrien und Proteine (z. B. Ferritin) als Residualkörper. Diese werden von den Sertolizellen phagozytiert und das enthaltene Eisen könnte aus den Phagosomen mittels DMT1 in das Zytoplasma der Sertolizellen transportiert werden (Leichtmann-Bardogoo *et al.*, 2012). DMT1 wurde in dieser Arbeit im adulten C57BL/6J-Hoden und in den Hoden von *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäusen in elongierten Spermatozyten und Sertolizellen detektiert (siehe 4.5.1 und 4.7). In primären Spermatozyten wurde DMT1 hingegen über immunhistochemische Färbungen und Immunfluoreszenzfärbungen nicht detektiert. Die relativ schwache DMT1-Expression in frühen Spermatozyten wurde von Leichtmann-Bardogoo und Mitarbeitern (2012) über Kolokalisationsanalysen von DMT1 mit dem murinen Transferrinrezeptor 1 identifiziert. Folglich kann nicht ganz ausgeschlossen werden, dass auch primäre Spermatozyten DMT1-positiv sind, und die schwache DMT1-Expression in primären Spermatozyten quantitativ nicht ausreichend war, um über immunhistochemische Färbungen (siehe 3.11) und Immunfluoreszenzfärbungen (siehe 3.13) in dieser Studie detektiert zu werden.

Die Expression von zytoplasmatischem Ferritin im Maushoden wurde von Santambrogio *et al.* (2007) und von Leichtmann-Bardogoo *et al.* (2012) analysiert. Ferritin wird in Übereinstimmung mit den von Santambrogio *et al.* (2007) und Leichtmann-Bardogoo *et al.* (2012) erhobenen Daten sehr stark in interstitiellen Leydigzellen, in Spermatozyten, primären Spermatozyten und Sertolizellen im Hoden von Wildtyp-, *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäusen exprimiert (siehe 4.5.2 und 4.7). Bei der Expressionsanalyse mittels Immunfluoreszenz (siehe 4.5.2, Abbildung 26A-C) schien das Expressionslevel von Ferritin in Sertolizellen von IRP2-defizienten Männchen (*Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäusen) gegenüber dem Wildtyp unter Standardbedingungen verstärkt zu sein. Eine verstärkte testikuläre Ferritinexpression in *Irp2*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp wurde von Leichtmann-Bardogoo und Mitarbeitern (2012) mittels Western Blot-Analyse verifiziert. Ferritin wurde in dieser Arbeit ausschließlich mit einem Antikörper gegen das Peptid der L-Kette detektiert. Es besteht jedoch kein Unterschied in der Topologie der testikulären Expression von L- und H-Ferritin (Leichtmann-Bardogoo *et al.*, 2012).

Mit Hilfe quantitativer Analysen der zytoplasmatischen Ferritinlevel im Maushoden wurde demonstriert, dass der Ferritinexpressionslevel vom basalen zum adluminalen Kompartiment in Sertolizellen und Keimzellen der *Tubuli seminiferi* stark abnimmt (www.public.wsu.edu/~griswold/microarray/; in Sertolizellen: Leichtmann-Bardogoo *et al.*, 2012). Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass Spermatozyten und primäre Spermatozyten eisenhaltiges Ferritin von den Sertolizellen erhalten, die wiederum das Eisen von den elongierten Spermatozyten durch Phagozytose der Residualkörper recyceln haben (Leichtmann-Bardogoo *et al.*, 2012). Weiterhin deuten die Expressionsanalysen aufgrund der

starken Ferritinexpression im Interstitium darauf hin, dass das meiste Eisen im Hoden dort gespeichert wird.

Anders als alle anderen bisher analysierten am Eisenstoffwechsel beteiligten Proteine, einschließlich DMT1, Ferritin, Transferrin und TfR1, wurde Ferroportin im Hoden ausschließlich außerhalb der *Tubuli seminiferi*, in den peritubulären Myoidzellen und in Blutgefäßwänden exprimiert (siehe 4.5.3 und 4.7). Die Expression von Ferroportin ist übereinstimmend mit den von Leichtmann-Bardoogo *et al.* (2012) erhobenen Daten.

Auch die Expression des Transferrinrezeptors 1 (TfR1) wurde im Maushoden eingehender von Leichtmann-Bardogoo *et al.* (2012) analysiert. Der TfR1 wird im Maushoden in interstitiellen Leydigzellen und in Sertolizellen, Spermatogonien und leptotänen, zygotänen und pachytänen primären Spermatozyten exprimiert. In primären Spermatozyten wird der TfR1 mit Ferritin und DMT1 koexprimiert. Diese Kolokalisationen wurden als Hinweis auf eine mögliche Rolle des TfR1 bei der Eisenaufnahme aus dem Interstitium gewertet. Über den TfR1 aufgenommenes Eisen könnte anschließend in Ferritin gespeichert werden (Leichtmann-Bardoogo *et al.*, 2012).

Eine immunhistochemische Färbung oder Immunfluoreszenzanalyse für den TfR1 (mouse anti-human transferrin receptor 1, Zymed) von Maushodenschnitten konnte während dieser Arbeit nicht erfolgreich etabliert werden. Gründe dafür könnten das für die Hoden gewählte Bouin-Fixativ sein, und/oder die Tatsache, dass der derzeit verfügbare Antikörper in der Maus generiert wurde und spezifisch für das humane Peptid ist. Deshalb bindet der Antikörper wahrscheinlich mit geringerer Affinität an den murinen TfR1, obwohl das TfR1-Protein in vielen Spezies, wie auch beim Menschen und der Maus mit 76% identischen Aminosäuren hoch konserviert ist (www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Compara_Ortholog?g=ENSG00000072274;r=3:195754054-195809060). Auch eine Fixierung der Testes in 4%-iger Paraformaldehydlösung (PFA) führte zu keinen besseren Resultaten. Die extrem schwach aufgetretene Expression des TfR1 auf Bouin's fixierten Hodenschnitten in interstitiellen Zellen, Spermatogonien, primären Spermatozyten und Sertolizellen (Daten nicht präsentiert) stimmte jedoch mit den Resultaten von Leichtmann-Bardoogo *et al.* (2012) überein.

Aufgrund testikulärer Expressionsanalysen von DMT1, Ferritin, Ferroportin, Transferrin und TfR1 an verschiedenen Mausmodellen – repräsentativ für Eisenüberladung (*Hfe*-Defizienz) und Eisenmangel (*Irp2*-Defizienz) – postulierten Leichtmann-Bardogoo *et al.* (2012) einen weitgehend autonomen internen Eisenzyklus innerhalb der *Tubuli seminiferi* (siehe Abbildung 41). HFE (Hämochromatose-Protein, Abkürzung für **H**igh **I**ron **F**e) ist ein Regulator der Eisenaufnahme in die Zellen. Mutationen im humanen *HFE*-Gen verursachen die Eisenspeicherkrankheit, hereditäre Hämochromatose, und führen zu erniedrigten Hepcidinkonzentrationen und einer systemischen Eisenüberladung (Ajioka *et al.*, 2002).

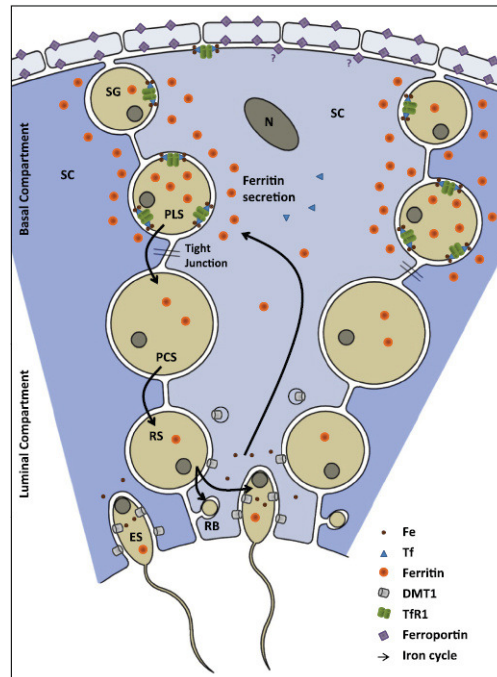


Abbildung 41: Modell des testikulären Eisentransports. Der schematische Ausschnitt eines *Tubuli seminiferi* zeigt drei Sertolizellen (SC, N: Sertolizellkern) und zehn Keimzellen verschiedener Stadien sowie die Protein- und Eisenverteilung (siehe Legende im Bild), SG: Spermatogonien, PLS: präleptotäne Spermatozyten PCS: pachytäne Spermatozyten, RS: runde Spermatisden, ES: elongierte Spermatisden, RB: Residualkörper (*residual bodies*; aus Leichtmann-Bardoogo *et al.*, 2012).

Mit dem Abschnüren der Residualkörper während der Spermatisdenelongation wird das darin enthaltene Eisen über DMT1 in das Zytosol der Sertolizellen transportiert, wo es in Ferritin gespeichert wird. Eisenhaltiges Ferritin wird in die basolaterale Domäne der Sertolizellen transferiert, von wo Ferritin über einen bislang unbekanntes Mechanismus in Spermatogonien und primäre Spermatozyten gelangt. Denkbar wäre eine Ferritinaufnahme über rezeptorvermittelte Endozytose, die durch den Ferritinrezeptor Scara-5 vermittelt wird (Li *et al.*, 2009). Während der Meiose passiert das mit Eisen beladene Ferritin in primären Spermatozyten auch die Blut-Hoden-Schranke. Aufgrund der meiotischen Teilungsaktivität und der Mitochondrienvermehrung während der Meiose wird Eisen verbraucht und damit einhergehend nimmt die Ferritinkonzentration zum Lumen hin ab. Nachschub von außen erhalten die tubulären Zellen über rezeptorvermittelte Endozytose über das Tf-TfR1-System (siehe Abbildung 41; Leichtmann-Bardoogo *et al.*, 2012). Transferrin (Tf) wird sowohl interstitiell als auch innerhalb der *Tubuli seminiferi* wie der Transferrinrezeptor 1 (TfR1) in primären Spermatozyten und Sertolizellen nahe der Basalmembran exprimiert (Morales und Clermont, 1986; Leichtmann-Bardoogo *et al.*, 2012). Ferroportin spielt wahrscheinlich eine Rolle beim Eisenexport aus

den Tubuli und aus dem Interstitium ins Blut, d. h. es kann überschüssiges Eisen aus den Tubuli heraus zurück ins Blut befördern (Leichtmann-Bardoogo *et al.*, 2012).

Die Ferritinexpression in Sertolizellen war unter Eisenmangelbedingungen bei *Irp1^{+/-};Irp2^{-/-}*, *Irp2^{-/-}*, und Wildtypmäusen vermindert (siehe 4.7). Der Eisenmangel könnte dazu führen, dass in Ferritin gespeichertes Eisen durch den Abbau von Ferritin mobilisiert wird und deshalb weniger Ferritin in den Sertolizellen vorhanden ist. Dies lässt sich mit dem von Leichtmann-Bardoogo *et al.* (2012) postulierten Modell in Einklang bringen: Aus den Residualkörpern recyceltes Eisen wird bei Eisenmangel schneller aufgebraucht und kann dann nicht mehr über Ferritin aus den Sertolizellen an Spermatogonien und primäre Spermatozyten weitergegeben werden. Stattdessen könnte Eisen über das Tf-TfR1-System aus dem Interstitium, das große Eisenreserven enthält, rekrutiert werden. Die Herabregulation von Ferritin in Sertolizellen bei Eisenmangel wurde in dieser Arbeit nur qualitativ gezeigt und sollte mit einer quantitativen Methode wie z. B. Western Blot-, Northern Blot-Analysen, über ELISA oder qPCR verifiziert werden.

5.2.4 Spielt IRP2 eine Rolle im testikulären Eisenzyklus?

Keines der am Eisenstoffwechsel beteiligten (Transferrin) und IRP2-regulierten Proteine (DMT1, Ferritin, Ferroportin, TfR1) werden wie IRP2 in runden bzw. sich beginnenden elongierenden Spermatiden des Stadiums 8 detektiert (vgl. Leichtmann-Bardoogo *et al.*, 2012). Daraus könnte zum einen gefolgert werden, dass eine fehlende Koexpression auch eine fehlende Interaktion mit IRP2-regulierten Proteinen impliziert und IRP2 somit offensichtlich keine bedeutende Rolle in der testikulären Eisenhomöostase innehat. Zum anderen wurde durch die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse (siehe 4.5 und 4.7) und die Untersuchungen von Leichtmann-Bardoogo *et al.* (2012) gezeigt, dass die Ferritinexpression im Maushoden bei Abwesenheit von IRP2 hochreguliert wird, was für eine IRP2-abhängige Regulation der testikulären Ferritinexpression spricht. Es ist daher denkbar, dass IRP2 auf die Ferritinexpression in Sertolizellen einwirkt. Mittels SISH wurden *Irp2*-Transkripte in runden und sich beginnenden elongierenden Spermatiden nachgewiesen (siehe 4.1.2), die im nächsten Differenzierungsschritt vollständig elongieren und dabei ihr Zytoplasma in Form der Residualkörper abschnüren, die dann von Sertolizellen phagozytiert werden (Russel *et al.*, 1990). Mit den Residualkörpern könnten auch *Irp2*-Transkripte in die Sertolizellen gelangen. Ein Transfer von funktionsfähiger mRNA über Endosomen von einer Zelle in eine andere wurde in der Literatur bereits für murine und humane Mastzellen beschrieben (Valadi *et al.*, 2007; Eldh *et al.*, 2010). Folglich könnte die Regulation der testikulären Eisenhomöostase über das IRE/IRP-System in den Sertolizellen erfolgen. Ob auch DMT1 oder TfR1, die beide ebenfalls in Sertolizellen exprimiert werden, in *Irp2^{-/-}*- und *Irp1^{+/-};Irp2^{-/-}*-Männchen im Hoden misreguliert werden, ist bisher noch nicht bekannt und sollte

durch weiterführende quantitative Expressionanalysen untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurden keine Unterschiede in der testikulären DMT1-Expression von *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp und/oder im Vergleich zu mit Eisenmangelfutter substituierten Männchen gezeigt (siehe 4.5.1 und 4.7). Für Ferroportin wurde im Maushoden bereits eine Hpcidinal als auch eine IRP2-unabhängige Expression gezeigt (Leichtmann-Bardoogo *et al.*, 2012). Deshalb besteht die Möglichkeit, dass die Regulation der testikulären Eisenhomöostase einem bisher unbekanntem Mechanismus unterliegt, in dem IRP2 keine fundamentale Bedeutung zukommt.

5.3 Spermienanalysen

In der vorliegenden Arbeit wurden in IRP2-defizienten Mäusen (*Irp2*^{-/-} und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}), wenn auch nicht signifikant, dennoch im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöhte durchschnittliche Spermienzahlen nachgewiesen (siehe 4.4.1). Erhöhte durchschnittliche Spermienzahlen wurden ebenfalls in C57BL/6J-Männchen, die für drei sechs und neun Wochen und *Irp2*^{-/-}-Mäusen, die für neun Wochen mit einer Eisenmangeldiät gefüttert wurden im Vergleich zu den jeweils normal ernährten Kontrollen ermittelt (siehe 4.8.1). Ob die erhöhten Spermienzahlen durch eine erhöhte testikuläre keimzellspezifische Proliferationsrate und/oder eine erniedrigte Apoptoserate bedingt sind, wird im Folgenden diskutiert.

5.3.1 Sind proliferative und/oder apoptotische Effekte die Ursache für die erhöhten Spermienzahlen?

Beim Vergleich der Spermienzahlen der untersuchten Genotypen (WT, *Irp2*^{-/-} und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}) hatten *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Männchen die meisten Spermien (siehe 4.4.1). Diese zeigten auch die größte Proliferationsrate. Eine leichte Erhöhung der keimzellspezifischen Proliferationsrate war ebenfalls bei vier Monate alten *Irp2*^{-/-}-Männchen gegenüber dem Wildtyp zu verzeichnen (siehe 4.2.2). Demzufolge könnte eine erhöhte Proliferationsrate der testikulären Keimzellen für die Erhöhung der Spermienzahlen verantwortlich sein. Werden die Hämatokritwerte als Indikator eines Eisenmangels herangezogen, so scheint sich Eisenmangel proliferationsfördernd auf die testikulären Keimzellen auszuwirken. Die Hämatokritwerte von *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäusen waren gegenüber dem Wildtyp signifikant erniedrigt (siehe 4.6.1).

Diese Hypothese steht in Übereinstimmung mit den Resultaten der Proliferationsanalysen von Individuen, die mit der Eisenmangeldiät gefüttert wurden. Nach dreiwöchigem Eisenmangel war die keimzellspezifische Proliferationsrate sowohl beim Wildtyp als auch bei *Irp2*^{-/-}-Männchen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen unter Standardbedingungen (signifikant bei *Irp2*^{-/-}) erhöht

(siehe 4.6.3). Die korrespondierenden Spermienzahlen (3WoFe↓) waren beim Wildtyp leicht erhöht, während sie bei *Irp2*^{-/-}-Männchen reduziert waren (siehe 4.8.1). Die beobachtete Erhöhung der Proliferationsrate der testikulären Keimzellen nach drei Wochen Eisenmangeldiät (siehe 4.6.3) kann sich jedoch aufgrund der Dauer eines Spermatogensezyklusses (35 Tage; Oakberg, 1956; 1957) und der Reifung der Spermien im Nebenhoden (10-13 Tage; Robaire und Hermo, 1988) erst später auf die Spermienzahlen auswirken. Dementsprechend zeigten beide Gruppen (WT und *Irp2*^{-/-}) nach neun Wochen Eisenmangel drastisch erhöhte Spermienzahlen. Das zeitverzögerte Auftreten eines starken Anstiegs der Spermienzahlen aufgrund vermehrter Proliferation der testikulären Keimzellen könnte auch bei den *rescue*-Gruppen zu den hohen Spermienzahlen beitragen (siehe 4.8.1). Zusammen zeigen diese Daten, dass sich Eisenmangel offensichtlich stimulierend auf die Proliferation testikulärer Keimzellen auswirkt. Eine erhöhte Proliferation als Reaktion auf Eisenmangel wurde ebenfalls für Enterozyten der Ratte beschrieben (Cunha *et al.*, 2008).

Die extrem hohen Spermienzahlen von Wildtyp- und *Irp2*^{-/-}-Mäusen, die nach sechswöchiger Eisenmangeldiät wieder auf Standardfutter umgestellt wurden (siehe 4.8.1), könnten noch weitere Ursachen haben: Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Speicherkapazität und der Größe des Nebenhodens (Jones, 1999). Die in dieser Arbeit analysierten älteren Tiere (ab vier Monate) waren im Vergleich zu den jüngeren (zwei Monate) größer, so dass auch die Organe (wie z. B. Hoden, Nebenhoden) vergleichsweise größer waren, d. h. mehr Spermien in den Hoden produziert und mehr im Nebenhodenschwanz gespeichert werden konnten. Zusätzlich befanden sich die analysierten Tiere in einem sexuellen Arrest (sexuelle Inaktivität), so dass die Spermiovorräte nicht geschöpft wurden, während gleichzeitig weiterhin kontinuierlich Spermien nachproduziert wurden. Ein drastischer Anstieg der Spermienzahlen im Speicher während eines sexuellen Arrests wurde für viele Spezies beobachtet (Amann, 1981) und stimmt mit den hier gemachten Beobachtungen in der Maus überein.

Die Proliferationsrate der *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Männchen war nach dreiwöchiger Eisenmangeldiät nicht erhöht (siehe 4.6.3) und die Spermienzahlen von *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäusen unter Eisenmangelbedingungen waren im Vergleich zu normal gefütterten *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Kontrolltieren hoch signifikant erniedrigt (siehe 4.8.1). Aufgrund der starken phänotypischen Beeinträchtigung und der damit einhergehenden früheren Sterblichkeit dieser Tiere nach ca. sechs Monaten (Standardfutter) konnten keine längeren Eisenmangelerperimente durchgeführt werden.

Denkbar wäre, dass die erhöhte Spermienzahl von *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäusen auch das Resultat eines apoptoseprotektiven Effekts auf die testikulären Keimzellen ist. Die testikuläre keimzellspezifische Apoptoserate mittels aktivierter Caspase-3-Immunfärbung wurde bei vier Monate alten Individuen (WT, *Irp2*^{-/-}) in nur einer Schnittebene analysiert (siehe 4.2.3.1). Weitere Analysen mittels TUNEL-Assays und/oder aktivierten Caspase-3-Antikörpers in einem größeren Stichprobenumfang sollten folgen, um der Frage nachzugehen, ob auch eine verminderte testikuläre

Apoptoserate bei *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäusen (Standardfutter) und bei C57BL/6J- und *Irp2*^{-/-}-Männchen unter Eisenmangelbedingungen zu den erhöhten Spermienzahlen beiträgt.

Bei elf Monate alten Mäusen waren sowohl die keimzellspezifische Proliferations- als auch die Apoptoserate bei *Irp2*^{-/-}-Männchen gegenüber dem Wildtyp leicht vermindert (siehe 4.2.2 und 4.2.3). Um eine Aussage über Auswirkungen auf die Spermienzahlen zu treffen, sollten in weiterführenden Analysen die Spermienzahlen und testikulären Proliferations- und Apoptoseraten von Individuen dieses Alters in einem größeren Stichprobenumfang ermittelt werden.

5.3.2 Gegenüberstellung der beiden Methoden zur Apoptosedetektion: IHC mit aktivierter Caspase-3 und TUNEL-Assay

Für die testikuläre Apoptosedetektion elf Monate alter Individuen wurden zwei verschiedene Methoden angewendet: immunhistochemische Detektion über einen spezifischen Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 (siehe 4.2.3.1) und die TUNEL-Methode (siehe 4.2.3.2). Mit der TUNEL-Methode wird im Allgemeinen eine höhere Apoptoserate als mit dem Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 detektiert (Duan *et al.*, 2003; Hussein, 2005). Dieser Unterschied kann dadurch erklärt werden, dass mittels Caspase-3-Antikörper nur die apoptotischen Zellen nachgewiesen werden, die den programmierten Zelltod über die Caspase-Signalkaskade eingehen, während die TUNEL-Methode neben der Caspase-Apoptosekaskade auch weitere Apoptosewege unter Beteiligung anderer Proteasen als Caspasen wie Cathepsine, Calpaine und Serinproteasen einbezieht (Kim und Wright, 1997; Shiraishi *et al.*, 2000; Wang, 2000; Umemoto *et al.*, 2001; Somwaru *et al.*, 2004; Hayashi *et al.*, 2006). Beim TUNEL-Assay werden die freien 3'-OH-Enden fragmentierter DNA detektiert, wobei nicht zwischen Doppelsträngen und Einzelsträngen unterschieden wird und somit auch nekrotische Zellen detektiert werden (Gavrieli *et al.*, 1992; Grasl-Kraupp *et al.*, 1995). Fälschlicherweise werden mit dieser Methode gelegentlich auch lebende Zellen als apoptotisch angezeigt, was auf Konformationsänderungen in der DNA-Struktur während der Transkription zurückgeführt wird (Kockx *et al.*, 1998). In vorangegangenen Arbeiten konnte jedoch gezeigt werden, dass die beiden gewählten Apoptosedetektionsmethoden gut miteinander korrelieren, obwohl sie unterschiedlich große Werte ergeben, d. h. ein systematischer Fehler vorliegt (Duan *et al.*, 2003; Hussein, 2005; Schöner, 2009). Auch in dieser Arbeit widersprechen sich die Resultate der Apoptosedetektion mittels Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 und der TUNEL-Methode nicht und führten zum gleichen Resultat: Die über beide Detektionsmethoden ermittelten testikulären keimzellspezifischen Apoptoserate der elf Monate alten *Irp2*^{-/-}-Männchen waren im Vergleich zum Wildtyp leicht erniedrigt (siehe 4.2.3).

5.4 Motilitätsanalysen

Neben einer Erhöhung der Spermienzahlen wirkte sich ein Eisenmangel offensichtlich auch auf das Motilitätsverhalten der Spermien aus: Die Spermien von *Irp2*^{-/-}-Mäusen unter Standardbedingungen (siehe 4.4.2) und Wildtypmäusen unter Eisenmangelbedingungen waren hyperaktiviert (siehe 4.8.2.2) und *Irp2*^{-/-}-Männchen unter Standardbedingungen und Wildtypmännchen unter Eisenmangelbedingungen zeigten sehr ähnliche Hämatokritwerte (siehe 4.6.1), die als Indikator des Eisenmangels herangezogen werden können. So kann die Hyperaktivierung der Spermien als Reaktion auf den Eisenmangel gedeutet werden. Der kausale Zusammenhang zwischen Eisenmangel und Hyperaktivierung zeigt sich besonders gut daran, dass die durch den induzierten Eisenmangel hervorgerufenen Motilitätseffekte durch die Umstellung auf Standardfutter reversibel waren (siehe 4.8.2.2). Ein entsprechender Zusammenhang zwischen Eisenmangel und hyperaktivierten Spermien wurde bislang in der Literatur noch nicht beschrieben.

Spermien von *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Männchen (Standardfutter) zeigten hingegen keine Hyperaktivierung (siehe 4.4.2), obwohl die Mäuse nachweislich anämisch waren, da ihre Hämatokritwerte unter Normalbedingungen noch niedriger ausfielen als bei *Irp2*^{-/-}-Mäusen (siehe 4.6.1). In der vorliegenden Arbeit wurden keine Spermienmotilitätsanalysen von Männchen durchgeführt, die nur homozygot für *Irp1* waren, so kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch IRP1 die Spermienmotilität beeinflusst. Eine dreiwöchige Eisenmangeldiät wirkte sich bei *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}- und *Irp2*^{-/-}-Männchen im Vergleich zu den mit Standardfutter gefütterten Kontrollen gleichen Genotyps drastisch auf das Motilitätsverhalten der Spermien aus, was sich v. a. in einer starken Geschwindigkeitsreduktion der Eisenmangelspermien äußerte (siehe 4.8.2). Nach neunwöchiger Eisenmangeldiät waren die Geschwindigkeitsparameter von *Irp2*^{-/-}-Männchen jedoch wieder etwas erhöht (siehe 4.8.2.2). Dieser Effekt könnte durch eine zeitaufwendige Mobilisierung von Eisen aus Speicherorganen (z. B. der Leber) bedingt sein. Dieser Kompensationsmechanismus führt allerdings zu keinen erhöhten Hämatokritwerten, was die obige Hypothese in Frage stellt.

Hyperaktivierte Spermien verbrauchen mehr Energie als aktivierte Spermien (Burkman, 1984; Ho und Suarez, 2003). In Übereinstimmung mit dem erhöhten Energieverbrauch von hyperaktivierten Spermien war der ATP-Gehalt der hyperaktivierten Spermien von normal gefütterten *Irp2*^{-/-}-Mäusen und Wildtypmännchen unter Eisenmangelbedingungen niedriger ausgefallen, als bei den Gruppen die keine Hyperaktivierung aufwiesen (normal gefütterte Wildtypmäuse und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Männchen, *Irp2*^{-/-}-Mäuse nach sechswöchiger Eisenmangeldiät). Tatsächlich existierten jedoch keine signifikanten Unterschiede im ATP-Gehalt der Spermien von C57BL/6J- und *Irp2*^{-/-}-Männchen unter Standardbedingungen im Vergleich zu den mit Eisenmangelfutter substituierten Gruppen (siehe 4.11). Die Analyse des ATP-Gehalts der Spermien ergab ferner, dass auch die vergleichsweise verminderte Geschwindigkeit der Spermien von *Irp2*^{-/-}-Mäusen nach sechswöchiger Eisenmangeldiät und von mit Standardfutter gefütterten *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Männchen nicht auf einen verminderten ATP-Gehalt

zurückgeführt werden können. Es stellt sich nun die Frage, ob der induzierte Eisenmangel nicht ausgeprägt genug war, um die ATP-Syntheserate negativ zu beeinflussen oder ob ATP über einen alternativen eisenunabhängigen Stoffwechselweg generiert werden konnte.

Bei der Bestimmung des ATP-Gehaltes der Spermien wurden diese vor der Messung nicht aus dem Nebenhoden isoliert, sondern mit diesem lysiert (siehe 3.7). Daher ist nicht auszuschließen, dass auch die Zellen des Nebenhodengewebes zum ATP-Gehalt der Spermien beigetragen haben und deshalb eventuelle Unterschiede im ATP-Gehalt der Spermien kompensiert wurden. In weiterführenden Untersuchungen zum ATP-Gehalt der Spermien könnten diese alternativ nach der *swim out*-Methode (siehe 3.14.1) isoliert und anschließend lysiert werden, so dass der Gehalt von epididymalen Zellen bei der ATP-Messung vernachlässigt werden kann.

5.4.1 Beitrag der mitochondrialen Atmungskette zur ATP-Synthese für die Motilität

Während der Spermatogenese erfahren die Mitochondrien strukturelle Veränderungen (siehe 1.5.4). Die verschiedenen Mitochondrienformen konnten jedoch bisher *in vivo* nicht mit ihrer funktionellen Aktivität korreliert werden (Meinhardt *et al.*, 1999). Die *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Spermien zeigten einen erhöhten Anteil von stark vakuolisierten Mitochondrien (siehe 4.10.1), die der kondensierten und intermediären Form entsprachen (de Kretser *et al.*, 1998). Bei der Auszählung wurden je nach Ausprägung der Vakuolisierung die Profiltypen normal, mittelstark und stark vakuolisiert unterschieden. In der vorliegenden Arbeit wurden kondensierte Mitochondrien als stark vakuolisiert klassifiziert und intermediäre Mitochondrien als mittelstark vakuolisiert eingestuft. Nicht vakuolisierte mitochondriale Profile zeigten die für elongierte Spermatisden charakteristischen untypisch kondensierten Mitochondrien, deren *Cristae* sich konzentrisch ins Innere ausgedehnt hatten (De Martino *et al.*, 1979). Je ausgeprägter der Eisenmangel (vgl. Hämatokritwerte 4.6.1), desto höher war bei den Spermien der Anteil der vakuolisierten Profile (siehe 4.10.1). Eine ähnliche phänotypische Erscheinung der vakuolisierten Mitochondrienmorphologie wurde von Jeong *et al.* (2011) für die Axone der weißen Substanz von *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäusen beschrieben. Die Autoren haben auch gezeigt, dass stark vakuolisierte Mitochondrien von *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäusen eine verminderte respiratorische Aktivität der eisenschwefelhaltigen Komplexe der Atmungskette im Vergleich zum Wildtyp besitzen (Jeong *et al.*, 2011). Ob solch ein Aktivitätsverlust auch für die stärker vakuolisierten Mitochondrien von *Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Spermien und Spermien der Wildtyp- und *Irp2*^{-/-}-Mäuse nach Eisenmangeldiät zutreffend ist, sollte in weiterführenden Analysen untersucht werden.

In der kondensierten bzw. vakuolisierten Form der Mitochondrien besitzen die *Cristae* eine kleinere Oberfläche im Vergleich zum untypisch kondensierten Typ. Diese kleinere Oberfläche kann weniger

Enzymkomplexe der Atmungskette beherbergen, so dass zu erwarten wäre, dass in den betroffenen Mitochondrien der Spermien von *Irp2*^{-/-}, *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-} und Eisenmangelmäusen weniger Energie über die Atmungskette generiert werden kann. Zusätzlich könnte gefolgert werden, dass die nicht vollständige Umgestaltung der Mitochondrien von der orthodoxen zur untypisch kondensierten Form während der Spermatogenese von *Irp2*^{-/-}, *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-} und Eisenmangelmäusen als eine direkte Folge des Eisenmangels angesehen werden kann. Sollten bei Eisenmangel weniger eisenhaltige Enzyme der Atmungskette synthetisiert werden, wäre es denkbar, dass keine weiteren mitochondrialen Umstrukturierungen in testikulären Keimzellen mit Eisenmangel mehr stattfinden, weil bei der kondensierten Mitochondrienform der Platz an der Innenmembran für die gebildeten Atmungskettenenzyme ausreicht.

Sollte jedoch tatsächlich ein Aktivitätsverlust der Mitochondrien vorliegen, wirft das die Frage auf, warum der ATP-Gehalt der Spermien von *Irp2*^{-/-}, *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-} Männchen und von Mäusen, die mit der Eisenmangeldiät gefüttert wurden, nicht signifikant vermindert ist. In den bisherigen Analysen der ATP-Konzentration der Spermien wurden von einigen Gruppen (WT n=4, *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-} n=4) nur wenige Individuen analysiert (siehe 4.11), so dass in weiterführenden Analysen die Stichprobenzahlen erhöht werden sollte, um dieses Ergebnis zu verifizieren.

In der Literatur ist bisher umstritten, ob die mitochondriale Atmungskette oder die Glykolyse als Hauptenergielieferant für die Spermienmotilität fungiert (Ford, 2006; Turner, 2006). Obwohl die mitochondriale Respiration pro Glukosemolekül deutlich mehr ATP als die Glykolyse liefert, können Spermien verschiedener Spezies zur ATP-Generation in Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt und vorhandenen metabolischen Substraten wie z. B. Glukose, Mannose, Fructose, Sorbitol, Glycerol, Pyruvat, Laktat, β -Hydroxybutyrat, Citrat und Pyrophosphat verschiedene Stoffwechselprozesse wie z. B. die Glukoneogenese und den Pentosephosphatweg effektiv für die Energiebereitstellung nutzen (Murdoch und White, 1968; Storey und Kayne, 1980; Hoshi *et al.*, 1991; Jones *et al.*, 1992; Rigau *et al.*, 2001; Williams und Ford, 2001; Mukai und Okuno, 2004; Cao *et al.*, 2009; Goodson *et al.*, 2012; Yi *et al.*, 2012). Die Hypothese, dass die Glykolyse – vor allem bei Maus und Mensch – eine wichtigere Rolle bei der ATP-Synthese für die Spermienbewegung spielt und einen Ausfall der Atmungskette kompensieren kann, findet zunehmend experimentelle Unterstützung (Williams und Ford 2001; Mukai und Okuno, 2004; Hereng *et al.*, 2011). Ein Funktionsverlust der Glykolyse wird mit immotilen Spermien und Infertilität assoziiert (Miki *et al.*, 2004; Odet *et al.*, 2008; Danshina *et al.*, 2010). Eine Kompensation einer potentiell eingeschränkten Aktivität der mitochondrialen Atmungskette durch die Glykolyse kann erklären, weshalb keine gravierenden signifikanten Unterschiede im ATP-Gehalt der Spermien von *Irp2*^{-/-}, *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-} und C57BL/6J-Mäusen unter Standardbedingungen und *Irp2*^{-/-} und Wildtypmännchen nach Eisenmangeldiät detektiert wurden (siehe 4.11).

Darüber hinaus gilt die Glykolyse bei der Maus als notwendig für den Vorgang der Kapazitation und der Hyperaktivierung der Spermien während der Passage durch den Eileiter (Hoppe, 1976; Fraser und Quinn, 1981; Rogers und Perreault, 1990; Hoshi *et al.*, 1991; Urner und Sakkas, 1996; Eddy *et al.*, 2003; Goodson *et al.*, 2012). Sollte die mitochondriale Respiration in hyperaktivierten Spermien von mit Standardfutter gefütterten *Irp2*^{-/-}-Männchen und Wildtypmäusen unter Eisenmangelbedingungen vermindert sein, könnte die für die Motilität erforderliche Energie über die Glykolyse generiert werden. Folglich könnte die Hyperaktivierung der Spermien bei mildem Eisenmangel (WT mit Eisenmangeldiät, siehe 4.8.2.2 und *Irp2*^{-/-} mit Standardfutter siehe 4.4.2; vgl. Hämatokritwerte 4.6.1) ein Effekt der Energiebereitstellung über die Glykolyse sein. Bei einem verstärktem Eisenmangel, wie er bei *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäusen unter Standard- und Eisenmangelfütterungsbedingungen und bei *Irp2*^{-/-}-Männchen während der Eisenmangeldiät aufgetreten ist, ist es denkbar, dass die für die Hyperaktivierung notwendigen hohen ATP-Mengen nicht mehr nur über die Glykolyse generiert werden können, wodurch das Bewegungsprofil der Spermien von Hyperaktivierung in ein aktiviertes Bewegungsprofil einhergehend mit einer drastischen Geschwindigkeitsreduktion der Spermien verschoben wird (siehe 4.8.2). Folglich wäre die beobachtete extreme Fertilitätsreduktion von mit Eisenmangelfutter substituierten *Irp2*^{-/-}-Männchen, eine Folge der fehlenden Hyperaktivierung der Spermien im Eileiter (siehe 4.9). Um diese These zu prüfen, sollten Motilitätsanalysen der Spermien von *Irp2*^{-/-}-Männchen unter Eisenmangelbedingungen im Vergleich zum gleichbehandelten Wildtyp durchgeführt werden, die nach erfolgter Verpaarung aus dem Ovidukt der Weibchen isoliert wurden.

5.5 Fertilitätsanalysen

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *Irp2*^{-/-}-Männchen, die mit einer Eisenmangeldiät gefüttert wurden, eine stark eingeschränkte Fertilität im Vergleich zu den mit Eisenmangelfutter substituierten männlichen C57BL/6J-Mäusen besitzen. Von elf gesetzten *Irp2*^{-/-}-Verpaarungen generierten nur zwei Zuchtpaare jeweils einen Wurf mit zwei und sieben Nachkommen, während von sieben gesetzten Wildtyp-Verpaarungen sechs unter Eisenmangel stehende Männchen fertil waren (siehe 4.9).

Der Brunstzyklus der Labormaus ist ganzjährig polyöstrisch und die Zyklusdauer beträgt 4-5 Tage (Heinecke, 1989). Die für sechs Wochen mit der Eisendiät gefütterten C57BL/6J- und *Irp2*^{-/-}-Männchen wurden jeweils für fünf Tage mit einem Weibchen gleichen Genotyps verpaart (siehe 3.15.1), so dass davon ausgegangen werden kann, dass während der Verpaarungszeit sich jedes Weibchen durchschnittlich einmal im Östrus befand und damit empfängnisbereit war. Dennoch könnten die Fertilitätsanalysen unter Eisenmangelbedingungen zur weiteren Validierung mit einer Vaginalpfropf (VP) -kontrolle wiederholt werden, da die VP-Kontrolle zudem garantieren würde, dass eine Paarung tatsächlich stattgefunden hat.

Die beobachtete reduzierte Fertilität von *Irp2*^{-/-}-Männchen nach verabreichter sechswöchiger Eisenmangeldiät (siehe 4.9) kann auf die signifikant beeinträchtigte Spermienmotilität im Vergleich zu *Irp2*^{-/-}-Kontrollen und gleichbehandelten Wildtypmännchen (WT6WoFe↓; siehe 4.8.2) zurückgeführt werden. Da nicht alle *Irp2*^{-/-}-Individuen infertil waren, könnte gefolgert werden, dass nicht alle Spermien einzelner Individuen stark durch den Eisenmangel beeinträchtigt sind, sondern auch normal motile Spermien präsent sind, die zur Befruchtung fähig sind.

Unter normalen Fütterungsbedingungen war die Fertilität weder bei *Irp2*^{-/-}- noch bei *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäusen beeinträchtigt (siehe 4.3). Damit wurde die Aussage von Smith *et al.* (2006), dass *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäuse untereinander keine Nachkommen generieren können, widerlegt. Bei den Analysen von Smith *et al.* (2006) konnten reine *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Verpaarungen nur dann vereinzelt einige wenige Nachkommen generieren, wenn sie mit einer speziellen Eisenüberschussdiät gefüttert wurden. Die von Smith *et al.* (2006) verwendeten *knock out*-Linien waren identisch mit den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Tiermodellen. Folglich kann der Fertilitätsunterschied nicht auf die Verwendung alternativer *knock out*-Mausmodelle und/oder auf Unterschiede im genetischen Hintergrund der verwendeten Mausstämme zurückgeführt werden. In der Studie von Smith *et al.* (2006) wurden keine Angaben über den Eisengehalt des verwendeten Standard- und Eisenüberschussfutters publiziert. Da trotz Eisenüberschussbedingungen auch die Zahl der Nachkommen von Verpaarungen zwischen *Irp1*^{-/-};*Irp2*^{+/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Individuen bzw. zwischen *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}- und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{+/-}-Mäusen stark vermindert war, besteht die Möglichkeit, dass zu geringe Eisenkonzentrationen in dem von Smith *et al.* (2006) verabreichten Futter im Vergleich zu dem in dieser Arbeit verwendeten Standardfutter (siehe 3.15.1) als Erklärung der Fertilitätsunterschiede von *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Verpaarungen herangeführt werden können.

5.6 Ausblick

Zusammenfassend war die Spermatogenese (siehe 4.2 und 4.6.2) und Fertilität (siehe 4.3) von *Irp2*^{-/-} und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Männchen im Vergleich zum Wildtyp nicht beeinträchtigt. Allerdings zeigten Spermien von *Irp2*^{-/-} und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp einen erhöhten Anteil von vakuolisierten mitochondrialen Profilen (siehe 4.10.1). Quantitative Spermienanalysen und Spermienmotilitätsanalysen ergaben, dass *Irp2*^{-/-} und *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}- Mäuse im Vergleich zum Wildtyp deutlich höhere epididymale Spermienzahlen aufwiesen, und dass die Spermien von *Irp2*^{-/-}-Männchen vorzeitig hyperaktiviert waren (siehe 4.4). Unter Eisenmangeldiät entwickelten Wildtyp als auch *Irp2*^{-/-}-Mäuse einen auf die Spermien beschränkten Eisenmangelphänotyp, der sich in einer erhöhten Spermienzahl (siehe 4.8.1) und einem erhöhten Anteil von vakuolisierten Mitochondrien (siehe 4.10.1) widerspiegelte. Während die Wildtypspermien unter Eisenmangel hyperaktiviert waren, war

das Motilitätsverhalten von *Irp2*^{-/-} und *Irp1*^{+/-}; *Irp2*^{-/-}-Spermien unter Eisenmangel signifikant reduziert (siehe 4.8.2). Diese eingeschränkte Spermienmotilität von *Irp2*^{-/-}-Männchen hatte eine stark verminderte Fertilität zur Folge (siehe 4.9). Es stellt sich nun die Frage ob eine Kombination aus IRP2-Defizienz und einem systemischen Eisenmangel auch beim Menschen eine männliche Infertilität bedingen kann. Bisher wurde allerdings noch keine Assoziation von Mutationen im humanen *IRP2*-Gen in Zusammenhang mit männlicher Infertilität beschrieben. Um diese Hypothese zu testen, müssten infertile Männer mit Eisenmangel und Asthenozoospermie auf pathogene Mutationen im *IRP2*-Gen hin analysiert werden.

Sollte diese Hypothese, dass Mutationen im humanen *IRP2*-Gen in Kombination mit Eisenmangel auch beim Mann zu Fertilitätsproblemen führen, sich bestätigen lassen, wäre denkbar, dass sich diese Fertilitätsstörungen durch die Einnahme von Eisenpräparaten therapieren lassen und betroffene Paare ihren Kinderwunsch verwirklichen könnten.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Abe K, Takano H, Ito T. Microvasculature of the mouse epididymis, with special reference to fenestrated capillaries localized in the initial segment. *Anat. Rec.* 1984;209(2):209–218.

Aisen P. Transferrin receptor 1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004;36(11):2137–2143.

Ajioka RS, Levy JE, Andrews NC, Kushner JP. Regulation of iron absorption in Hfe mutant mice. *Blood.* 2002;100(4):1465–1469.

Alvarez E, Gironès N, Davis RJ. A point mutation in the cytoplasmic domain of the transferrin receptor inhibits endocytosis. *Biochem. J.* 1990;267(1):31–35.

Amann RP. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *J. Androl.* 1981;2:37–58

Amann RP, Howards SS. Daily spermatozoal production and epididymal spermatozoal reserves of the human male. *J. Urol.* 1980;124(2):211–215.

Amann RP, Lambiase JT Jr. The male rabbit. VII. Studies on resorption of (3H) thymidine-labeled spermatozoa in the epididymis. *Fertil. Steril.* 1974;25(3):271–275.

Anderson GJ, Vulpe CD. Mammalian iron transport. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009;66(20):3241–3261.

Aoki F, Ishida K, Okuno M, Kohmoto K. Analysis of flagellar bending in hyperactivated hamster and mouse spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1994;101(2):397–403.

Arosio P, Levi S. Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. *Free Radic. Biol. Med.* 2002;33(4):457–463.

Austin CR. Capacitation of spermatozoa. *Int. J. Fertil.* 1967;12(1 Pt 1):25–31.

Aziz N, Munro HN. Iron regulates ferritin mRNA translation through a segment of its 5' untranslated region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1987;84(23):8478–8482.

Barrat CLR, Crooke ID. Sperm loss in the urine of sexually rested men. *Int. J. Androl.* 1988;11:201–207.

Beard J. Iron deficiency alters brain development and functioning. *J. Nutr.* 2003;133(5 Suppl 1):1468S–72S.

Beardsley A, O'Donnell L. Characterization of normal spermiation and spermiation failure induced by hormone suppression in adult rats. *Biol. Reprod.* 2003;68(4):1299–1307.

Bedford JM. Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis. In: Hamilton DW, Greep RO (eds.) *Handbook of Physiology.* 1975; Section 7 (Endocrinology), Volume 5 (Male Reproductive System). American Physiological Society (Washington, D.C.); pp. 303–317.

Bedford JM. The status and the state of the human epididymis. *Hum. Reprod.* 1994;9(11):2187–2199.

Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1951;62(3):293–300.

Biggers JD, Whitten WK, Whittingham DG. The culture of mouse embryos in vitro. In “*Methods in Mammalian Embryology.*”(JC Daniel, Jr., ed.) Freeman and Co., San Francisco; pp. 86–116, Table 6-5;1971.

- Blanco A, Zinkham WH. Lactate Dehydrogenases in Human Testes. *Science*. 1963;139(3555):601–602.
- Blandau RJ, Rumery RE. The relationship of swimming movements of epididymal spermatozoa to their fertilizing capacity. *Fertil. Steril*. 1964;15:571–579.
- Brokaw CJ. Microtubule sliding in swimming sperm flagella: direct and indirect measurements on sea urchin and tunicate spermatozoa. *J. Cell Biol*. 1991;114(6):1201–1215.
- Brooks DE. Epididymal and testicular temperature in the unrestrained conscious rat. *J. Reprod. Fertil*. 1973;35(1):157–160.
- Burgos C, Maldonado C, Gerez de Burgos NM, Aoki A, Blanco A. Intracellular localization of the testicular and sperm-specific lactate dehydrogenase isozyme C4 in mice. *Biol. Reprod*. 1995;53(1):84–92.
- Burkman LJ. Characterization of hyperactivated motility by human spermatozoa during capacitation: comparison of fertile and oligozoospermic sperm populations. *Arch. Androl*. 1984;13(2-3):153–165.
- Cai CX, Birk DE, Linsenmayer TF. Nuclear ferritin protects DNA from UV damage in corneal epithelial cells. *Mol. Biol. Cell*. 1998;9(5):1037–1051.
- Cairo G, Recalcati S. Iron-regulatory proteins: molecular biology and pathophysiological implications. *Expert Rev Mol Med*. 2007;9(33):1–13.
- Camaschella C, Roetto A, Cali A, De Gobbi M, Garozzo G, Carella M, Majorano N, Totaro A, Gasparini P. The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nat. Genet*. 2000a;25(1):14–15.
- Camaschella C, Zecchina G, Lockitch G, Roetto A, Campanella A, Arosio P, Levi S. A new mutation (G51C) in the iron-responsive element (IRE) of L-ferritin associated with hyperferritinaemia-cataract syndrome decreases the binding affinity of the mutated IRE for iron-regulatory proteins. *Br. J. Haematol*. 2000b;108(3):480–482.
- Canonne-Hergaux F, Gruenheid S, Ponka P, Gros P. Cellular and subcellular localization of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron. *Blood*. 1999;93(12):4406–4417.
- Cao W, Aghajanian HK, Haig-Ladewig LA, Gerton GL. Sorbitol can fuel mouse sperm motility and protein tyrosine phosphorylation via sorbitol dehydrogenase. *Biol. Reprod*. 2009;80(1):124–133.
- Cheng CY, Mruk DD. An intracellular trafficking pathway in the seminiferous epithelium regulating spermatogenesis: a biochemical and molecular perspective. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*. 2009;44(5):245–263.
- Christensen AK. Leydig cells. In: Hamilton DW, Greep RO (eds.), *Handbook of Physiology*, 1975; Section 7 (Endocrinology), Volume 5 (Male Reproductive System). American Physiological Society (Washington, D.C.); pp. 57-94.
- Cmejla R, Petrak J, Cmejlova J. A novel iron responsive element in the 3'UTR of human MRCKalpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2006;341(1):158–166.
- Cooper TG. The onset and maintenance of hyperactivated motility of spermatozoa from the mouse. *Gamete Research*. 1984;9(1):55–74.
- Cooperman SS, Meyron-Holtz EG, Olivierre-Wilson H, Ghosh MC, McConnell JP, Rouault TA. Microcytic anemia, erythropoietic protoporphyria, and neurodegeneration in mice with targeted deletion of iron-regulatory protein 2. *Blood*. 2005;106(3):1084–1091.
- Cozzi A, Rovelli E, Frizzale G, Campanella A, Amendola M, Arosio P, Levi S. Oxidative stress and cell death in cells expressing L-ferritin variants causing neuroferritinopathy. *Neurobiol. Dis*. 2010;37(1):77–85.
- Cunha GC-P, van Ravenzwaay B, Mellert W, Kaufmann W. Iron deficiency causes duodenum mucosal hyperplasia in male Wistar rats. *Toxicol. Lett*. 2008;177(3):156–167.

- Cyr DG, Gregory M, Dubé E, Dufresne J, Chan PT, Hermo L. Orchestration of occludins, claudins, catenins and cadherins as players involved in maintenance of the blood-epididymal barrier in animals and humans. *Asian J. Androl.* 2007;9(4):463–475.
- Danshina PV, Geyer CB, Dai Q, Goulding EH, Willis WD, Kitto GB, McCarrey JR, Eddy EM, O'Brien DA. Phosphoglycerate kinase 2 (PGK2) is essential for sperm function and male fertility in mice. *Biol. Reprod.* 2010;82(1):136–145.
- Dautry-Varsat A, Ciechanover A, Lodish HF. pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1983;80(8):2258–2262.
- de Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. Spermatogenesis. *Hum. Reprod.* 1998;13 Suppl 1:1–8.
- De Domenico I, McVey Ward D, Kaplan J. Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008;9(1):72–81.
- De Domenico I, Vaughn MB, Li L, Bagley D, Musci G, Ward DM, Kaplan J. Ferroportin-mediated mobilization of ferritin iron precedes ferritin degradation by the proteasome. *EMBO J.* 2006;25(22):5396–5404.
- De Martino C, Floridi A, Marcante ML, Malorni W, Scorza Barcellona P, Bellocchi M, Silvestrini B. Morphological, histochemical and biochemical studies on germ cell mitochondria of normal rats. *Cell Tissue Res.* 1979;196(1):1–22.
- De Martino C, Stefanini M, Floridi A, Marcante ML, Agrestini A, Morelli M. Morphological and functional modifications of mitochondrion in the rat germ cells. *J. Submicrosc. Cytol.* 1974;6: 115–116.
- Deaglio S, Capobianco A, Calì A, Bellora F, Alberti F, Righi L, Sapino A, Camaschella C, Malavasi F. Structural, functional, and tissue distribution analysis of human transferrin receptor-2 by murine monoclonal antibodies and a polyclonal antiserum. *Blood.* 2002;100(10):3782–3789.
- Demott RP, Suarez SS. Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biol. Reprod.* 1992;46(5):779–785.
- Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Pinkus GS, Zon LI, Robine S, Andrews NC. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab.* 2005;1(3):191–200.
- Duan WR, Garner DS, Williams SD, Funckes-Shippy CL, Spath IS, Blomme EA. Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts. *J. Pathol.* 2003;199(2):221–228.
- Dym M, Fawcett DW. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol. Reprod.* 1970;3(3):308–326.
- Dym M, Fawcett DW. Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis. *Biol. Reprod.* 1971;4(2):195–215.
- Eddy EM, Toshimori K, O'Brien DA. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc. Res. Tech.* 2003;61(1):103–115.
- Eisenstein RS. Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 2000;20:627–662.
- Eldh M, Ekström K, Valadi H, Sjöstrand M, Olsson B, Jernås M, Lötvall J. Exosomes communicate protective messages during oxidative stress; possible role of exosomal shuttle RNA. *PLoS ONE.* 2010;5(12):e15353.
- Fawcett DW. The mammalian spermatozoon. *Dev. Biol.* 1975;44(2):394–436.

- Fekete E, Little CC, Cloudman AM. Some Effects of the Gene W(Dominant Spotting) in Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1941;27(2):114–117.
- Ferreira C, Bucchini D, Martin ME, Levi S, Arosio P, Grandchamp B, Beaumont C. Early embryonic lethality of H ferritin gene deletion in mice. *J. Biol. Chem.* 2000;275(5):3021–3024.
- Ferring-Appel D, Hentze MW, Galy B. Cell-autonomous and systemic context-dependent functions of iron regulatory protein 2 in mammalian iron metabolism. *Blood.* 2009;113(3):679–687.
- Fischbach FA, Anderegg JW. An x-ray scattering study of ferritin and apoferritin. *J. Mol. Biol.* 1965;14(2):458–473.
- Fleming MD, Romano MA, Su MA, Garrick LM, Garrick MD, Andrews NC. Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998;95(3):1148–1153.
- Fleming MD, Trenor CC 3rd, Su MA, Foernzler D, Beier DR, Dietrich WF, Andrews NC. Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat. Genet.* 1997;16(4):383–386.
- Fleming RE, Ahmann JR, Migas MC, Waheed A, Koeffler HP, Kawabata H, Britton RS, Bacon BR, Sly WS. Targeted mutagenesis of the murine transferrin receptor-2 gene produces hemochromatosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002;99(16):10653–10658.
- Ford WCL. Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? *Hum. Reprod. Update.* 2006;12(3):269–274.
- Fraser LR, Quinn PJ. A glycolytic product is obligatory for initiation of the sperm acrosome reaction and whiplash motility required for fertilization in the mouse. *J. Reprod. Fertil.* 1981;61(1):25–35.
- Galy B, Ferring-Appel D, Kaden S, Gröne H-J, Hentze MW. Iron regulatory proteins are essential for intestinal function and control key iron absorption molecules in the duodenum. *Cell Metab.* 2008;7(1):79–85.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 1992;119(3):493–501.
- Ghosh MC, Tong W-H, Zhang D, Ollivierre-Wilson H, Singh A, Krishna MC, Mitchell JB, Rouault TA. Tempol-mediated activation of latent iron regulatory protein activity prevents symptoms of neurodegenerative disease in IRP2 knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008;105(33):12028–12033.
- Gibbons IR, Rowe AJ. Dynein: A Protein with Adenosine Triphosphatase Activity from Cilia. *Science.* 1965;149(3682):424–426.
- Goldberg E. Lactic and Malic Dehydrogenases in Human Spermatozoa. *Science.* 1963;139(3555):602–603.
- Goldberg E, Sberna D, Wheat TE, Urbanski GJ, Margoliash E. Cytochrome c: immunofluorescent localization of the testis-specific form. *Science.* 1977;196(4293):1010–1012.
- Goodson SG, Qiu Y, Sutton KA, Xie G, Jia W, O'Brien DA. Metabolic substrates exhibit differential effects on functional parameters of mouse sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 2012;87(3):75.
- Grasl-Kraupp B, Ruttikay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology.* 1995;21(5):1465–1468.
- Griffin KP, Ward DT, Liu W, Stewart G, Morris ID, Smith CP. Differential expression of divalent metal transporter DMT1 (Slc11a2) in the spermatogenic epithelium of the developing and adult rat testis. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 2005;288(1):C176–184.

- Gruenheid S, Cellier M, Vidal S, Gros P. Identification and characterization of a second mouse Nramp gene. *Genomics*. 1995;25(2):514–525.
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*. 1997;388(6641):482–488.
- Gunshin H, Fujiwara Y, Custodio AO, Drenzo C, Robine S, Andrews NC. Slc11a2 is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver. *J. Clin. Invest.* 2005b;115(5):1258–1266.
- Gunshin H, Starr CN, Drenzo C, Fleming MD, Jin J, Greer EL, Sellers VM, Galica SM, Andrews NC. Cybrd1 (duodenal cytochrome b) is not necessary for dietary iron absorption in mice. *Blood*. 2005a;106(8):2879–2883.
- Guo B, Yu Y, Leibold EA. Iron regulates cytoplasmic levels of a novel iron-responsive element-binding protein without aconitase activity. *J. Biol. Chem.* 1994;269(39):24252–24260.
- Hackenbrock CR. Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *J. Cell Biol.* 1966;30(2):269–297.
- Hackenbrock CR. Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. II. Electron transport-linked ultrastructural transformations in mitochondria. *J. Cell Biol.* 1968;37(2):345–369.
- Haile DJ, Rouault TA, Harford JB, Kennedy MC, Blondin GA, Beinert H, Klausner RD. Cellular regulation of the iron-responsive element binding protein: disassembly of the cubane iron-sulfur cluster results in high-affinity RNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992;89(24):11735–11739.
- Han O, Kim E-Y. Colocalization of ferroportin-1 with hephaestin on the basolateral membrane of human intestinal absorptive cells. *J. Cell. Biochem.* 2007;101(4):1000–1010.
- Harris ZL, Durley AP, Man TK, Gitlin JD. Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999;96(19):10812–10817.
- Harrison PM, Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim. Biophys. Acta*. 1996;1275(3):161–203.
- Hayashi T, Yoshida S, Yoshinaga A, Ohno R, Ishii N, Yamada T. HtrA2 is up-regulated in the rat testis after experimental cryptorchidism. *Int. J. Urol.* 2006;13(2):157–164.
- Heinecke H. *Angewandte Versuchstierkunde*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1989.
- Henderson BR, Seiser C, Kühn LC. Characterization of a second RNA-binding protein in rodents with specificity for iron-responsive elements. *J. Biol. Chem.* 1993;268(36):27327–27334.
- Hentze MW, Caughman SW, Casey JL, Koeller DM, Rouault TA, Harford JB, Klausner RD. A model for the structure and functions of iron-responsive elements. *Gene*. 1988;72(1-2):201–208.
- Hentze MW, Keim S, Papadopoulos P, O'Brien S, Modi W, Drysdale J, Leonard WJ, Harford JB, Klausner RD. Cloning, characterization, expression, and chromosomal localization of a human ferritin heavy-chain gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1986;83(19):7226–7230.
- Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell*. 2004;117(3):285–297.
- Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell*. 2010;142(1):24–38.
- Hereng TH, Elgstøen KBP, Cederkvist FH, Eide L, Jahnsen T, Skålhegg BS, Rosendal KR. Exogenous pyruvate accelerates glycolysis and promotes capacitation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 2011;26(12):3249–3263.

Hermo L, Pelletier R-M, Cyr DG, Smith CE. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. *Microsc. Res. Tech.* 2010;73(4):241–278.

Hess RA, Miller LA, Kirby JD, Margoliash E, Goldberg E. Immunoelectron microscopic localization of testicular and somatic cytochromes c in the seminiferous epithelium of the rat. *Biol. Reprod.* 1993;48(6):1299–1308.

Hinton BT, Palladino MA. Epididymal epithelium: its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment. *Microsc. Res. Tech.* 1995;30(1):67–81.

Ho H-C, Suarez SS. Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biol. Reprod.* 2003;68(5):1590–1596.

Hogan B, Costantini F, Lacy E. Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Press*, Gold Spring Harbor, New York; 1994.

Holtz W, Smidt D. The fertilizing capacity of epididymal spermatozoa in the pig. *J. Reprod. Fertil.* 1976;46(1):227–229.

Hoppe PC. Glucose requirement for mouse sperm capacitation in vitro. *Biol. Reprod.* 1976;15(1):39–45.

Hoshi K, Tsukikawa S, Sato A. Importance of Ca²⁺, K⁺ and glucose in the medium for sperm penetration through the human zona pellucida. *Tohoku J. Exp. Med.* 1991;165(2):99–104.

Hsu SM, Raine L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 1981;29(11):1349–1353.

Hsu SM, Raine L, Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am. J. Clin. Pathol.* 1981;75(6):816–821.

<http://www.embryology.ch/allemand/cgametogen/popupgametogen/03spermato/spermatomehr.html>

<http://www.ensembl.org>

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<http://www.public.wsu.edu/~griswold/microarray/>

Huckins C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. *Anat. Rec.* 1971a;169(3):533–557.

Huckins C. Cell cycle properties of differentiating spermatogonia in adult Sprague-Dawley rats. *Cell Tissue Kinet.* 1971b;4(2):139–154.

Huckins C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. 3. Evidence for a long-cycling population. *Cell Tissue Kinet.* 1971c;4(4):335–349.

Huckins C, Oakberg EF. Morphological and quantitative analysis of spermatogonia in mouse testes using whole mounted seminiferous tubules, I. The normal testes. *Anat. Rec.* 1978;192(4):519–528.

Huggenvik J, Sylvester SR, Griswold MD. Control of transferrin mRNA synthesis in Sertoli cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1984;438:1–7.

Hussein K. Untersuchungen zur Funktion von humanem TSPY an einer transgenen kryptorchiden *hTSPY⁺/Insl3^{-/-}*-Mauslinie. Dissertation 2005, Medizinische Hochschule Hannover.

Hüttemann M, Jaradat S, Grossman LI. Cytochrome c oxidase of mammals contains a testes-specific isoform of subunit VIb--the counterpart to testes-specific cytochrome c? *Mol. Reprod. Dev.* 2003;66(1):8–16.

- Ishijima S, Baba SA, Mohri H, Suarez SS. Quantitative analysis of flagellar movement in hyperactivated and acrosome-reacted golden hamster spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 2002;61(3):376–384.
- Iwai K, Klausner RD, Rouault TA. Requirements for iron-regulated degradation of the RNA binding protein, iron regulatory protein 2. *EMBO J.* 1995;14(21):5350–5357.
- Jabado N, Canonne-Hergaux F, Gruenheid S, Picard V, Gros P. Iron transporter Nramp2/DMT-1 is associated with the membrane of phagosomes in macrophages and Sertoli cells. *Blood.* 2002;100(7):2617–2622.
- Jeong SY, Crooks DR, Wilson-Ollivierre H, Ghosh MC, Sougrat R, Lee J, Cooperman S, Mitchell JB, Beaumont C, Rouault TA. Iron insufficiency compromises motor neurons and their mitochondrial function in Irp2-null mice. *PLoS ONE.* 2011;6(10):e25404.
- Johnson AL, Howards SS. Intratubular hydrostatic pressure in testis and epididymis before and after vasectomy. *Am. J. Physiol.* 1975;228(2):556–564.
- Jones AR, Chantrill LA, Cokinakis A. Metabolism of glycerol by mature boar spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1992;94(1):129–134.
- Jones RC. To store or mature spermatozoa? The primary role of the epididymis. *Int. J. Androl.* 1999;22(2):57–67.
- Jones RC, Murdoch RN. Regulation of the motility and metabolism of spermatozoa for storage in the epididymis of eutherian and marsupial mammals. *Reprod. Fertil. Dev.* 1996;8(4):553–568.
- Karwacki V, Kovac J, Mauceri G, Backhaus A, Föhse L, Schmidtke J, Schubert S. Tspy is nonfunctional in the Mongolian gerbil but functional in the Syrian hamster. *Genomics.* 2006;88(1):65–73.
- Katz DF, Yanagimachi R, Dresdner RD. Movement characteristics and power output of guinea-pig and hamster spermatozoa in relation to activation. *J. Reprod. Fertil.* 1978;52(1):167–172.
- Kawabata H, Yang R, Hiramata T, Vuong PT, Kawano S, Gombart AF, Koeffler HP. Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J. Biol. Chem.* 1999;274(30):20826–20832.
- Kim GH, Wright WW. A comparison of the effects of testicular maturation and aging on the stage-specific expression of CP-2/cathepsin L messenger ribonucleic acid by Sertoli cells of the Brown Norway rat. *Biol. Reprod.* 1997;57(6):1467–1477.
- Kirton KT, Desjardins C, Hafs HD. Distribution of sperm in male rabbits after various ejaculation frequencies. *Anat. Rec.* 1967;158(3):287–292.
- Klausner RD, Ashwell G, van Renswoude J, Harford JB, Bridges KR. Binding of apotransferrin to K562 cells: explanation of the transferrin cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1983;80(8):2263–2266.
- Klausner RD, Rouault TA, Harford JB. Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism. *Cell.* 1993;72(1):19–28.
- Knippers R. Molekulare Genetik. Thieme Verlag, Stuttgart; 5. Auflage, 1990.
- Kockx MM, Muhring J, Knaapen MW, de Meyer GR. RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis. *Am. J. Pathol.* 1998;152(4):885–888.
- Kohler SA, Menotti E, Kühn LC. Molecular cloning of mouse glycolate oxidase. High evolutionary conservation and presence of an iron-responsive element-like sequence in the mRNA. *J. Biol. Chem.* 1999;274(4):2401–2407.
- Krisfalusi M, Miki K, Magyar PL, O'Brien DA. Multiple glycolytic enzymes are tightly bound to the fibrous sheath of mouse spermatozoa. *Biol. Reprod.* 2006;75(2):270–278.

- Lakoski KA, Carron CP, Cabot CL, Saling PM. Epididymal maturation and the acrosome reaction in mouse sperm: response to zona pellucida develops coincident with modification of M42 antigen. *Biol. Reprod.* 1988;38(1):221–233.
- Larson JA, Howie HL, So M. Neisseria meningitidis accelerates ferritin degradation in host epithelial cells to yield an essential iron source. *Mol. Microbiol.* 2004;53(3):807–820.
- Latunde-Dada GO, Simpson RJ, McKie AT. Duodenal cytochrome B expression stimulates iron uptake by human intestinal epithelial cells. *J. Nutr.* 2008;138(6):991–995.
- LaVaute T, Smith S, Cooperman S, Iwai K, Land W, Meyron-Holtz E, Drake SK, Miller G, Abu-Asab M, Tsokos M, Switzer R 3rd, Grinberg A, Love P, Tresser N, Rouault TA. Targeted deletion of the gene encoding iron regulatory protein-2 causes misregulation of iron metabolism and neurodegenerative disease in mice. *Nat. Genet.* 2001;27(2):209–214.
- Lawson DM, Treffry A, Artymiuk PJ, Harrison PM, Yewdall SJ, Luzzago A, Cesareni G, Levi S, Arosio P. Identification of the ferroxidase centre in ferritin. *FEBS Lett.* 1989;254(1-2):207–210.
- Le NTV, Richardson DR. Ferroportin1: a new iron export molecule? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2002;34(2):103–108.
- Lee J, Richburg JH, Younkin SC, Boekelheide K. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology.* 1997;138(5):2081–2088.
- Leichtmann-Bardoogo Y, Cohen LA, Weiss A, Marohn B, Schubert S, Meinhardt A, Meyron-Holtz EG. Compartmentalization and regulation of iron metabolism proteins protect male germ cells from iron overload. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2012;302(12):E1519–1530.
- Levi S, Corsi B, Bosisio M, Invernizzi R, Volz A, Sanford D, Arosio P, Drysdale J. A human mitochondrial ferritin encoded by an intronless gene. *J. Biol. Chem.* 2001;276(27):24437–24440.
- Levi S, Yewdall SJ, Harrison PM, Santambrogio P, Cozzi A, Rovida E, Albertini A, Arosio P. Evidence of H- and L-chains have co-operative roles in the iron-uptake mechanism of human ferritin. *Biochem. J.* 1992;288 (Pt 2):591–596.
- Levy JE, Jin O, Fujiwara Y, Kuo F, Andrews NC. Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system. *Nat. Genet.* 1999;21(4):396–399.
- Li JY, Paragas N, Ned RM, Qiu A, Viltard M, Leete T, Drexler IR, Chen X, Sanna-Cherchi S, Mohammed F, Williams D, Lin CS, Schmidt-Ott KM, Andrews NC, Barasch J. Scara5 is a ferritin receptor mediating non-transferrin iron delivery. *Dev. Cell.* 2009;16(1):35–46.
- Lie PPY, Cheng CY, Mruk DD. Coordinating cellular events during spermatogenesis: a biochemical model. *Trends Biochem. Sci.* 2009;34(7):366–373.
- Lino BF, Braden AW, Turnbull KE. Fate of unejaculated spermatozoa. *Nature.* 1967;213(5076):594–595.
- Little CC, Cloudman AM. The Occurrence of a Dominant Spotting Mutation in the House Mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1937;23(10):535–537.
- Liu W, Shimomura S, Imanishi H, Iwamoto Y, Ikeda N, Saito M, Ohno M, Hara N, Yamamoto T, Nakamura H, Hada T. Hemochromatosis with mutation of the ferroportin 1 (IREG1) gene. *Intern. Med.* 2005;44(4):285–289.
- MacKenzie EL, Iwasaki K, Tsuji Y. Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid. Redox Signal.* 2008;10(6):997–1030.
- Magaki S, Mueller C, Yellon SM, Fox J, Kim J, Snissarenko E, Chin V, Ghosh MC, Kirsch WM. Regional dissection and determination of loosely bound and non-heme iron in the developing mouse brain. *Brain Res.* 2007;1158:144–150.

- McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sager G, Mudaly E, Mudaly M, Richardson C, Barlow D, Bomford A, Peters TJ, Raja KB, Shirali S, Hediger MA, Farzaneh F, Simpson RJ. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science*. 2001;291(5509):1755–1759.
- McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, Miret S, Bomford A, Peters TJ, Farzaneh F, Hediger MA, Hentze MW, Simpson RJ. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol. Cell*. 2000;5(2):299–309.
- Mehlhase J, Sandig G, Pantopoulos K, Grune T. Oxidation-induced ferritin turnover in microglial cells: role of proteasome. *Free Radic. Biol. Med.* 2005;38(2):276–285.
- Meinhardt A, Wilhelm B, Seitz J. Expression of mitochondrial marker proteins during spermatogenesis. *Hum. Reprod. Update*. 1999;5(2):108–119.
- Melefors O, Goossen B, Johansson HE, Stripecke R, Gray NK, Hentze MW. Translational control of 5-aminolevulinate synthase mRNA by iron-responsive elements in erythroid cells. *J. Biol. Chem.* 1993;268(8):5974–5978.
- Meyron-Holtz EG, Ghosh MC, Iwai K, LaVaute T, Brazzolotto X, Berger UV, Land W, Ollivierre-Wilson H, Grinberg A, Love P, Rouault TA. Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis. *EMBO J.* 2004a;23(2):386–395.
- Meyron-Holtz EG, Ghosh MC, Rouault TA. Mammalian tissue oxygen levels modulate iron-regulatory protein activities in vivo. *Science*. 2004b;306(5704):2087–2090.
- Miki K, Qu W, Goulding EH, Willis WD, Bunch DO, Strader LF, Perreault SD, Eddy EM, O'Brien DA. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004;101(47):16501–16506.
- Montosi G, Donovan A, Totaro A, Garuti C, Pignatti E, Cassanelli S, Trenor CC, Gasparini P, Andrews NC, Pietrangelo A. Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SLC11A3) gene. *J. Clin. Invest.* 2001;108(4):619–623.
- Morales C, Clermont Y. Receptor-mediated endocytosis of transferrin by Sertoli cells of the rat. *Biol. Reprod.* 1986;35(2):393–405.
- Morales C, Sylvester SR, Griswold MD. Transport of iron and transferrin synthesis by the seminiferous epithelium of the rat in vivo. *Biol. Reprod.* 1987;37(4):995–1005.
- Moroishi T, Nishiyama M, Takeda Y, Iwai K, Nakayama KI. The FBXL5-IRP2 axis is integral to control of iron metabolism in vivo. *Cell Metab.* 2011;14(3):339–351.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1986;51 Pt 1:263–273.
- Mukai C, Okuno M. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biol. Reprod.* 2004;71(2):540–547.
- Müllner EW, Neupert B, Kühn LC. A specific mRNA binding factor regulates the iron-dependent stability of cytoplasmic transferrin receptor mRNA. *Cell*. 1989;58(2):373–382.
- Murdoch RN, White IG. The influence of the female genital tract on the metabolism of rabbit spermatozoa. II. Effect of storage with glucose, lactate, bicarbonate, and female genital tract fluids. *Aust. J. Biol. Sci.* 1968;21(5):973–980.
- Narisawa S, Hecht NB, Goldberg E, Boatright KM, Reed JC, Millán JL. Testis-specific cytochrome c-null mice produce functional sperm but undergo early testicular atrophy. *Mol. Cell. Biol.* 2002;22(15):5554–5562.
- Nemeth E, Ganz T. Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annu. Rev. Nutr.* 2006;26:323–342.

- Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J. Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004;306(5704):2090–2093.
- Oakberg EF. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Am. J. Anat.* 1956;99(3):507–516.
- Oakberg EF. Duration of spermatogenesis in the mouse. *Nature*. 1957;180(4595):1137–1138.
- Odet F, Duan C, Willis WD, Goulding EH, Kung A, Eddy EM, Goldberg E. Expression of the gene for mouse lactate dehydrogenase C (Ldhc) is required for male fertility. *Biol. Reprod.* 2008;79(1):26–34.
- Ohgami RS, Campagna DR, Greer EL, Antiochos B, McDonald A, Chen J, Sharp JJ, Fujiwara Y, Barker JE, Fleming MD. Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat. Genet.* 2005;37(11):1264–1269.
- Ollinger K, Roberg K. Nutrient deprivation of cultured rat hepatocytes increases the desferrioxamine-available iron pool and augments the sensitivity to hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 1997;272(38):23707–23711.
- Orgebin-Crist MC. Passage of spermatozoa labelled with thymidine-3-H through the ductus epididymidis of the rabbit. *J. Reprod. Fertil.* 1965;10(2):241–251.
- Orgebin-Crist MC. Sperm maturation in rabbit epididymis. *Nature*. 1967;216(5117):816–818.
- Orgebin-Crist MC. Studies on the function of the epididymis. *Biol. Reprod.* 1969;1:Suppl 1:155–175.
- Palade GE. An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J. Histochem. Cytochem.* 1953;1(4):188–211.
- Papanikolaou G, Pantopoulos K. Iron metabolism and toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005;202(2):199–211.
- Patino MM, Walden WE. Cloning of a functional cDNA for the rabbit ferritin mRNA repressor protein. Demonstration of a tissue-specific pattern of expression. *J. Biol. Chem.* 1992;267(26):19011–19016.
- Pelletier RM, Byers SW. The blood-testis barrier and Sertoli cell junctions: structural considerations. *Microsc. Res. Tech.* 1992;20(1):3–33.
- Recalcati S, Minotti G, Cairo G. Iron regulatory proteins: from molecular mechanisms to drug development. *Antioxid. Redox Signal.* 2010;13(10):1593–1616.
- Reinheckel T, Sitte N, Ullrich O, Kuckelkorn U, Davies KJ, Grune T. Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress. *Biochem. J.* 1998;335 (Pt 3):637–642.
- Rice AE, Mendez MJ, Hokanson CA, Rees DC, Björkman PJ. Investigation of the biophysical and cell biological properties of ferroportin, a multipass integral membrane protein iron exporter. *J. Mol. Biol.* 2009;386(3):717–732.
- Rigau T, Farré M, Ballester J, Mogas T, Peña A, Rodríguez-Gil JE. Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology*. 2001;56(5):801–815.
- Robaire B, and Hermo, L (1988). Efferent ducts, epididymis and vas deferens: structure, functions and their regulation. In *The Physiology of Reproduction* (E. Knobil and J. Neill, Eds.), pp. 999-1080. Raven Press, New York
- Robaire B, Hinton BT, Orgebin-Crist MC (2006) The epididymis, In Knobil E, Neill J, eds. *Physiology of Reproduction*. New York, Elsevier, 1071-1148
- Rogers BJ, Perreault SD. Importance of glycolysable substrates for in vitro capacitation of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 1990;43(6):1064–1069.

- Rouault TA, Stout CD, Kaptain S, Harford JB, Klausner RD. Structural relationship between an iron-regulated RNA-binding protein (IRE-BP) and aconitase: functional implications. *Cell*. 1991;64(5):881–883.
- Rouault TA, Tang CK, Kaptain S, Burgess WH, Haile DJ, Samaniego F, McBride OW, Harford JB, Klausner RD. Cloning of the cDNA encoding an RNA regulatory protein--the human iron-responsive element-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990;87(20):7958–7962.
- Russel LD, Ettl RA, Sinha Hikim, AP, Clegg ED. Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater, Florida: Cache River Press; 1990
- Russell L. Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. *Am. J. Anat.* 1977;148(3):313–328.
- R'zik S, Loo M, Beguin Y. Reticulocyte transferrin receptor (TfR) expression and contribution to soluble TfR levels. *Haematologica*. 2001;86(3):244–251.
- Salahudeen AA, Thompson JW, Ruiz JC, Ma HW, Kinch LN, Li Q, Grishin NV, Bruick RK. An E3 ligase possessing an iron-responsive hemerythrin domain is a regulator of iron homeostasis. *Science*. 2009;326(5953):722–726.
- Sanchez M, Galy B, Dandekar T, Bengert P, Vainshtein Y, Stolte J, Muckenthaler MU, Hentze MW. Iron regulation and the cell cycle: identification of an iron-responsive element in the 3'-untranslated region of human cell division cycle 14A mRNA by a refined microarray-based screening strategy. *J. Biol. Chem.* 2006;281(32):22865–22874.
- Sanchez M, Galy B, Muckenthaler MU, Hentze MW. Iron-regulatory proteins limit hypoxia-inducible factor-2alpha expression in iron deficiency. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007;14(5):420–426.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1977;74(12):5463–5467.
- Santambrogio P, Biasiotto G, Sanvito F, Olivieri S, Arosio P, Levi S. Mitochondrial ferritin expression in adult mouse tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 2007;55(11):1129–1137.
- Santoro C, Marone M, Ferrone M, Costanzo F, Colombo M, Minganti C, Cortese R, Silengo L. Cloning of the gene coding for human L apoferritin. *Nucleic Acids Res.* 1986;14(7):2863–2876.
- Schöner A. Expression und Funktion des humanen TSPY während der Keimzellentwicklung und gonadalen Tumorgenese – Untersuchungen an einem transgenen Mausmodell. Dissertation 2009, Medizinische Hochschule Hannover.
- Setchell BP, Sánchez-Partida LG, Chairussyuhur A. Epididymal constituents and related substances in the storage of spermatozoa: a review. *Reprod. Fertil. Dev.* 1993;5(6):601–612.
- Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, Khan Y, Warley A, McCann FE, Hider RC, Frazer DM, Anderson GJ, Vulpe CD, Simpson RJ, McKie ATa. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell*. 2005;122(5):789–801.
- Shiraishi K, Naito K, Yoshida K. Inhibition of calpain but not caspase protects the testis against injury after experimental testicular torsion of rat. *Biol. Reprod.* 2000;63(5):1538–1548.
- Sjostrand FS. Electron microscopy of mitochondria and cytoplasmic double membranes. *Nature*. 1953;171(4340):30–32.
- Skinner MK, Griswold MD. Sertoli cells synthesize and secrete transferrin-like protein. *J. Biol. Chem.* 1980;255(20):9523–9525.

Smith SR, Cooperman S, Lavaute T, Tresser N, Ghosh M, Meyron-Holtz E, Land W, Ollivierre H, Jortner B, Switzer R 3rd, Messing A, Rouault TA. Severity of neurodegeneration correlates with compromise of iron metabolism in mice with iron regulatory protein deficiencies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004;1012:65–83.

Smith SR, Ghosh MC, Ollivierre-Wilson H, Hang Tong W, Rouault TA. Complete loss of iron regulatory proteins 1 and 2 prevents viability of murine zygotes beyond the blastocyst stage of embryonic development. *Blood Cells Mol. Dis.* 2006;36(2):283–287.

Somwaru L, Li S, Doglio L, Goldberg E, Zirkin BR. Heat-induced apoptosis of mouse meiotic cells is suppressed by ectopic expression of testis-specific calpastatin. *J. Androl.* 2004;25(4):506–513.

Stauss CR, Votta TJ, Suarez SS. Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. *Biol. Reprod.* 1995;53(6):1280–1285.

Storey BT, Kayne FJ. Properties of pyruvate kinase and flagellar ATPase in rabbit spermatozoa: relation to metabolic strategy of the sperm cell. *J. Exp. Zool.* 1980;211(3):361–367.

Suarez SS, Katz DF, Owen DH, Andrew JB, Powell RL. Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. *Biol. Reprod.* 1991;44(2):375–381.

Suarez SS. Control of hyperactivation in sperm. *Hum. Reprod. Update.* 2008;14(6):647–657.

Suarez SS, Osman RA. Initiation of hyperactivated flagellar bending in mouse sperm within the female reproductive tract. *Biol. Reprod.* 1987;36(5):1191–1198.

Sullivan R, Frenette G, Girouard J. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J. Androl.* 2007;9(4):483–491.

Sutovsky P, Moreno R, Ramalho-Santos J, Dominko T, Thompson WE, Schatten G. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. *J. Cell. Sci.* 2001;114(Pt 9):1665–1675.

Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature.* 1999;402(6760):371–372.

Takano H, Abe K, Ito T. [Changes in the mouse epididymis after ligation of the ductuli efferentes or proximal epididymal duct: qualitative and quantitative histological studies (author's transl)]. *Kaibogaku Zasshi.* 1981;56(2):79–90.

Tessler S, Olds-Clarke P. Linear and nonlinear mouse sperm motility patterns. A quantitative classification. *J. Androl.* 1985;6(1):35–44.

Tischner M. Transport of unejaculated spermatozoa through the pelvic part of the urogenital tract in the ram. *J. Reprod. Fertil.* 1971;24(2):271–274.

Travis AJ, Foster JA, Rosenbaum NA, Visconti PE, Gerton GL, Kopf GS, Moss SB. Targeting of a germ cell-specific type 1 hexokinase lacking a porin-binding domain to the mitochondria as well as to the head and fibrous sheath of murine spermatozoa. *Mol. Biol. Cell.* 1998;9(2):263–276.

Travis AJ, Jorgez CJ, Merdiushev T, Jones BH, Dess DM, Diaz-Cueto L, Storey BT, Kopf GS, Moss SB. Functional relationships between capacitation-dependent cell signaling and compartmentalized metabolic pathways in murine spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 2001;276(10):7630–7636.

Turner RM. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod. Fertil. Dev.* 2006;18(1-2):25–38.

Turner TT. On the epididymis and its role in the development of the fertile ejaculate. *J. Androl.* 1995;16(4):292–298.

- Umemoto Y, Ozaki Y, Sasaki S, Tatsura H, Kubota H, Kubota Y, Sasaki M, Kohri K. Involvement of calpain for apoptosis in dysfunction of the unaffected testis in rats with experimental testicular torsion. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2001;45(4):239–245.
- Urner F, Sakkas D. Glucose participates in sperm-oocyte fusion in the mouse. *Biol. Reprod.* 1996;55(4):917–922.
- Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, Flohé L. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science.* 1999;285(5432):1393–1396.
- Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 2007;9(6):654–659.
- Vashisht AA, Zumbrennen KB, Huang X, Powers DN, Durazo A, Sun D, Bhaskaran N, Persson A, Uhlen M, Sangfelt O, Spruck C, Leibold EA, Wohlschlegel JA. Control of iron homeostasis by an iron-regulated ubiquitin ligase. *Science.* 2009;326(5953):718–721.
- von Lanz, Neuhauser G. [Morphometric analysis of the human epididymis]. *Z Anat Entwicklungsgesch.* 1964;124:126–152.
- Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N, Gitschier J, Anderson GJ. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat. Genet.* 1999;21(2):195–199.
- Wang J, Chen G, Lee J, Pantopoulos K. Iron-dependent degradation of IRP2 requires its C-terminal region and IRP structural integrity. *BMC Mol. Biol.* 2008;9:15.
- Wang KK. Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci.* 2000;23(1):20–26.
- Weber JE, Russell LD. A study of intercellular bridges during spermatogenesis in the rat. *Am. J. Anat.* 1987;180(1):1–24.
- Weinberg ED. The role of iron in cancer. *Eur. J. Cancer Prev.* 1996;5(1):19–36.
- Williams AC, Ford WC. The role of glucose in supporting motility and capacitation in human spermatozoa. *J. Androl.* 2001;22(4):680–695.
- Wilson MT, Reeder BJ. Oxygen-binding haem proteins. *Exp. Physiol.* 2008;93(1):128–132.
- Wyman S, Simpson RJ, McKie AT, Sharp PA. Dcytb (Cybrd1) functions as both a ferric and a cupric reductase in vitro. *FEBS Lett.* 2008;582(13):1901–1906.
- Yeung CH, Cooper TG, Bergmann M, Schulze H. Organization of tubules in the human caput epididymidis and the ultrastructure of their epithelia. *Am. J. Anat.* 1991;191(3):261–279.
- Yeung CH, Majumder GC, Rolf C, Behre HM, Cooper TG. The role of phosphocreatine kinase in the motility of human spermatozoa supported by different metabolic substrates. *Mol. Hum. Reprod.* 1996;2(8):591–596.
- Yi Y-J, Sutovsky M, Kennedy C, Sutovsky P. Identification of the Inorganic Pyrophosphate Metabolizing, ATP Substituting Pathway in Mammalian Spermatozoa Lobaccaro J-MA, hrsg. *PLoS ONE.* 2012;7(4):e34524.
- Young WC. A study of the function of the epididymis. I. Is the attainment of full spermatozoon maturity attributable to some specific action of the epididymal secretion? *Journal of Morphology.* 1929;47(2):479–495.
- Young WC. A study of the function of the epididymis. III. Functional changes undergone by spermatozoa during their passage through the epididymis and vas deferens in the guinea pig. *J Exp Biol.* 1931;8; pp. 151–62.
- Zhang D, Meyron-Holtz E, Rouault TA. Renal iron metabolism: transferrin iron delivery and the role of iron regulatory proteins. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2007;18(2):401–406.

Zhang P, Land W, Lee S, Juliani J, Lefman J, Smith SR, Germain D, Kessel M, Leapman R, Rouault TA, Subramaniam S. Electron tomography of degenerating neurons in mice with abnormal regulation of iron metabolism. *J. Struct. Biol.* 2005;150(2):144–153.

7 ANHANG

7.1 Zusätzliche Daten

7.1.1 Darstellung der Einzelkanäle zu den gezeigten IF-Bildern

Ansicht der Einzelkanäle der unter 4.5 (Normalbedingungen) gezeigten Fluoreszenzbilder nach Anregung der Farbstoffe bei entsprechender Wellenlänge.

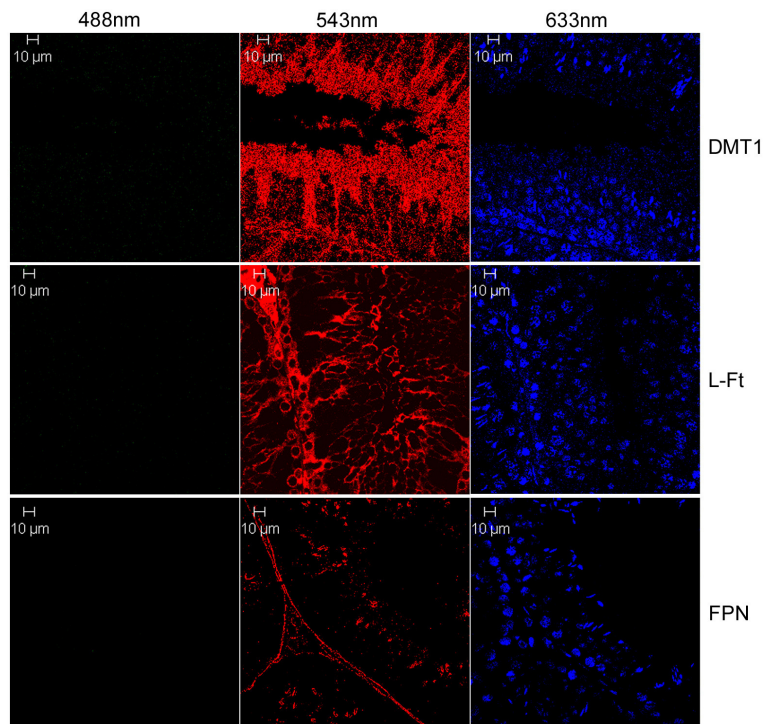


Abbildung 42: Darstellung der Einzelkanäle von DMT1 (vgl. Abbildung 25A), Ferritin (L-Ft; vgl. Abbildung 26A) und Ferroportin (FPN; vgl. Abbildung 27A) IF-Färbungen auf *Irp1^{+/+}Irp2^{-/-}*-Hodenschnitten.

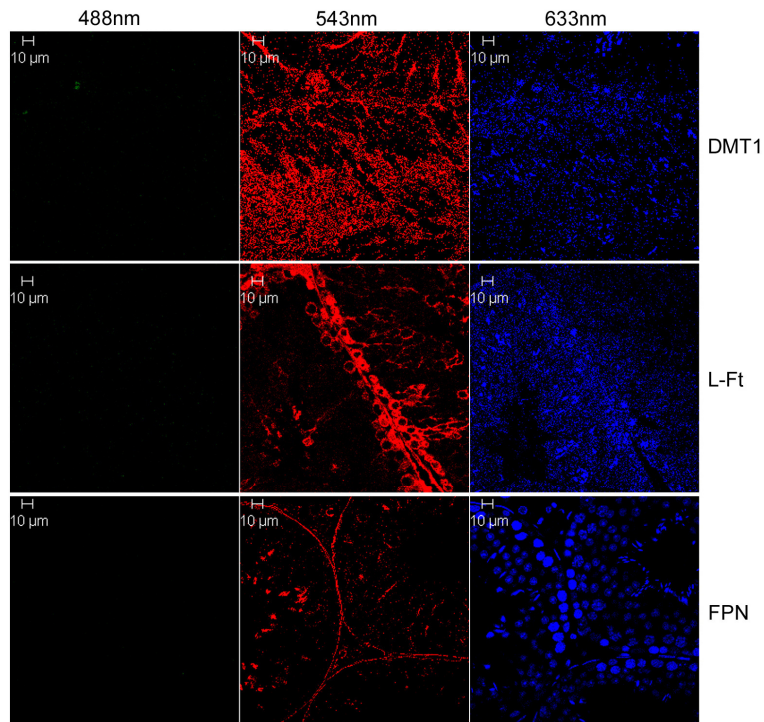


Abbildung 43: Darstellung der Einzelkanäle von DMT1 (vgl. Abbildung 25B), Ferritin (L-Ft; vgl. Abbildung 26B) und Ferroportin (FPN; vgl. Abbildung 27B) IF-Färbungen auf *Irf2*^{-/-}-Hodenschnitten.

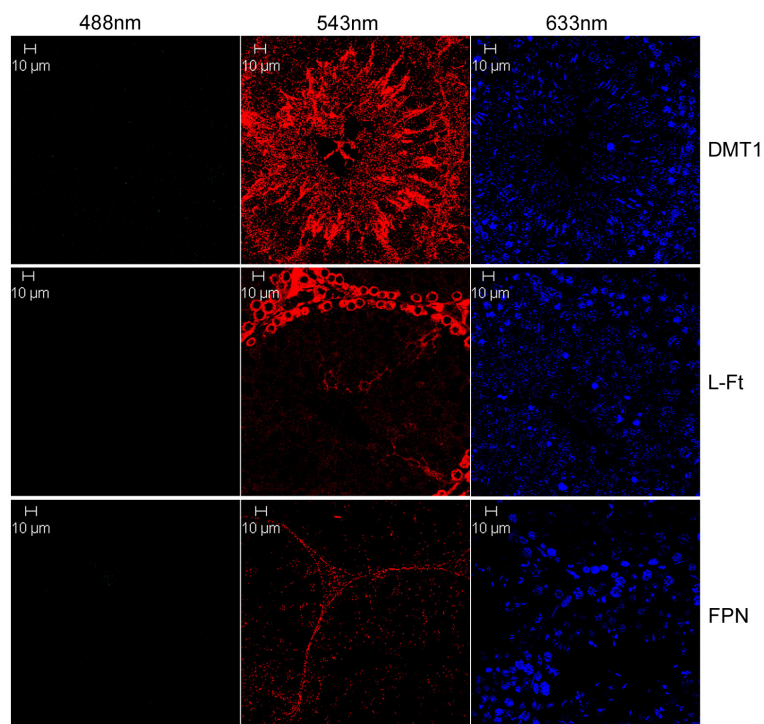


Abbildung 44: Darstellung der Einzelkanäle von DMT1 (vgl. Abbildung 25C), Ferritin (L-Ft; vgl. Abbildung 26C) und Ferroportin (FPN; vgl. Abbildung 27C) IF-Färbungen auf WT-Hodenschnitten.

Ansicht der Einzelkanäle der unter 4.7 (Eisenmangelbedingungen) gezeigten Fluoreszenzbilder nach Anregung der Farbstoffe bei entsprechender Wellenlänge.

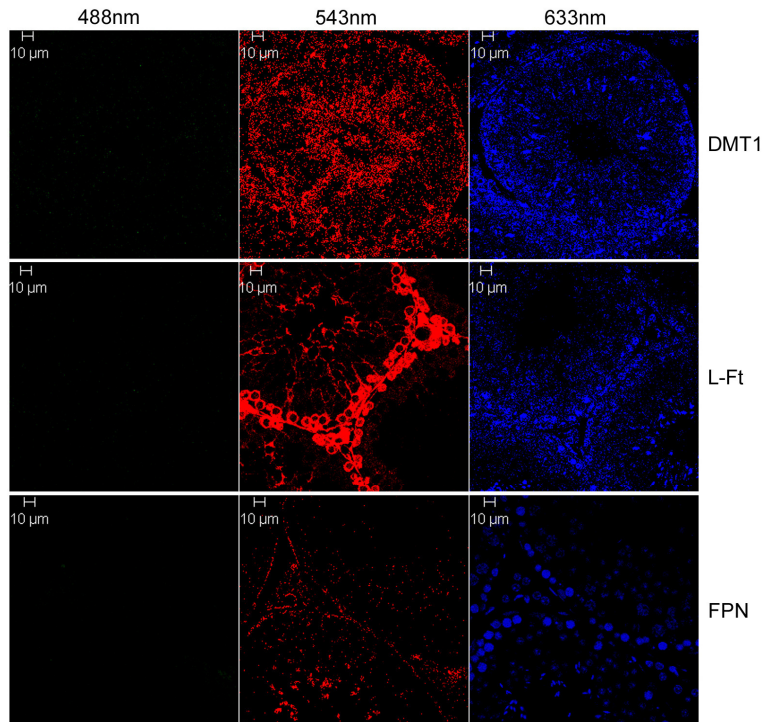


Abbildung 45: Darstellung der Einzelkanäle von DMT1 (vgl. Abbildung 31A), Ferritin (L-Ft; vgl. Abbildung 31B) und Ferroportin (FPN; vgl. Abbildung 31C) IF-Färbungen auf *Irp^{+/+}Irp^{-/-}*-Hodenschnitten (Eisenmangel).

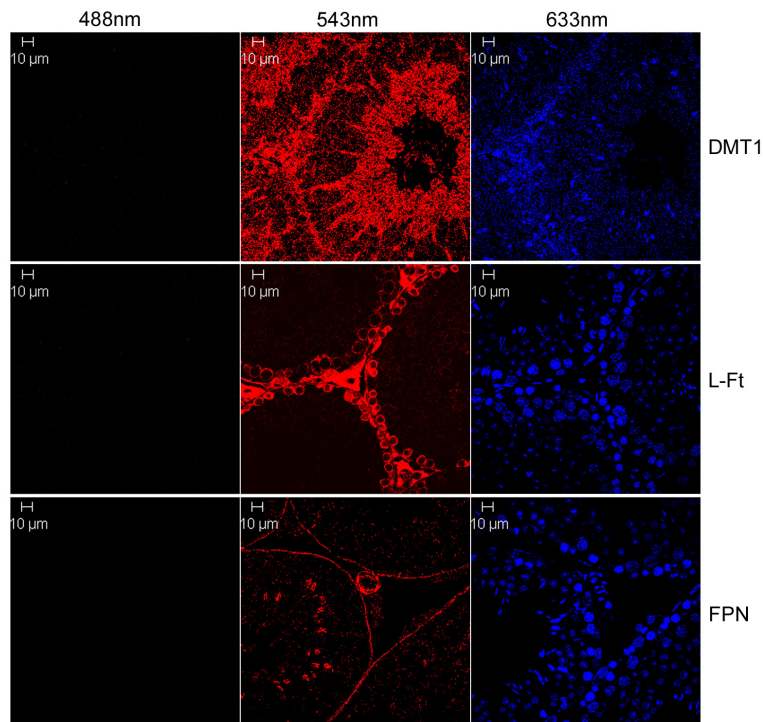


Abbildung 46: Darstellung der Einzelkanäle von DMT1 (vgl. Abbildung 31D), Ferritin (L-Ft; vgl. Abbildung 31E) und Ferroportin

(FPN; vgl. Abbildung 31F) IF-Färbungen auf *Irp*^{-/-}-Hodenschnitten (Eisenmangel).

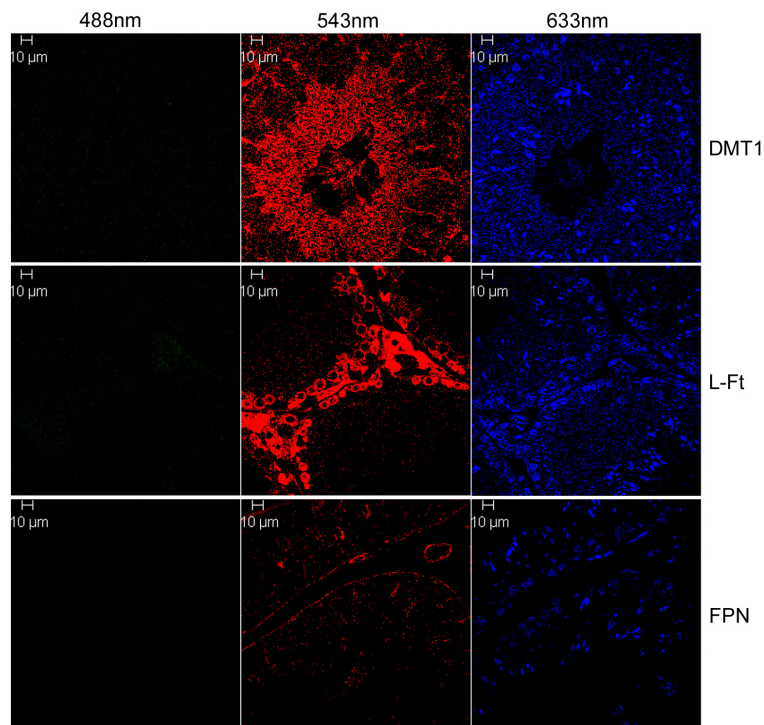


Abbildung 47: Darstellung der Einzelkanäle von DMT1 (vgl. Abbildung 31G), Ferritin (L-Ft; vgl. Abbildung 31H) und Ferroportin (FPN; vgl. Abbildung 31J) IF-Färbungen auf **WT-Hodenschnitten** (Eisenmangel).

7.1.2 *Negativ-Kontrollen zu den IF-Färbungen*

Mitgeführte Kontrollen (d. h. ohne Primärantikörper) der IF-Färbungen (siehe 4.5 und 4.7).

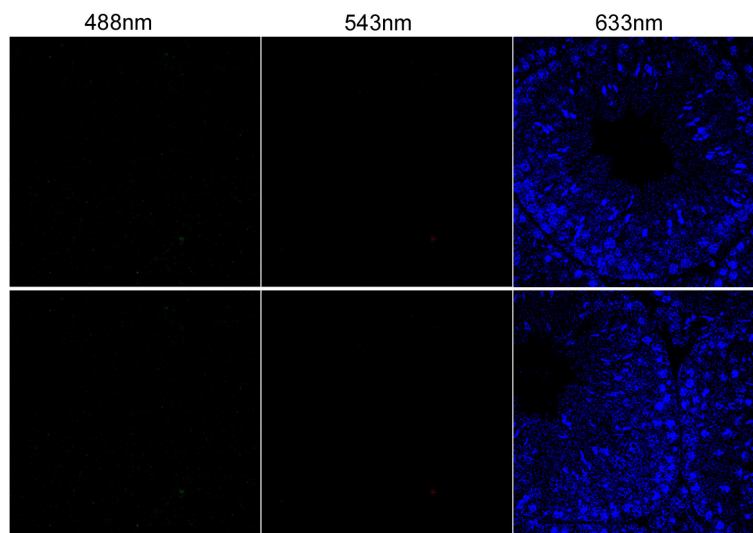


Abbildung 48: Kontrollen (oben: *Irp1*^{+/-};*Irp2*^{-/-}, "normal"; unten: *Irp2*^{-/-} 9WoFe↓) der IF-Färbungen, bei denen keine Inkubation mit

dem Primärantikörper erfolgte. Es waren keine unspezifischen Bindungen des Sekundärantikörpers zu erkennen.

7.1.3 *Negativ-Kontrolle zu den IHC-Färbungen*

Mitgeführte Kontrollen (d. h. ohne Primärantikörper) der IHC-Färbungen (siehe 4.5 und 4.7).

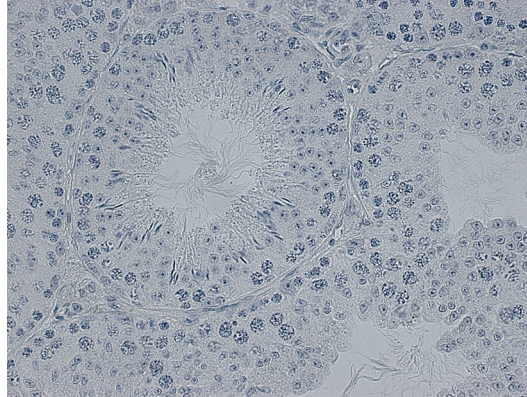


Abbildung 49: Kontrolle (WT, normal) der IF-Färbungen, bei denen keine Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte. Es waren keine unspezifischen Bindungen des Sekundärantikörpers zu erkennen.

7.1.4 *Übersicht der verwendeten Einstellungen für die Motilitätsanalysen (Mouse 2)*

Parameter	Einstellung
Frames per sond	60
Number of Frames	30
Minimum Contrast	30
Minimum size	4
Default Cell Size	13
Default cell Intensity	75
Default Cell Contrast	ja
VAP	50
STR	50
Slow Cells	static
VAP Cut off	10
VSL Cut off	0
Min. Intensity Gate	0.1
Max. Intensity Gate	1.52

Min. Size Gate	0.13
Max. Size Gate	2.43
Min Elongation Gate	5
Max. Elongation Gate	100
Standard Objective	10x
Field Type	dark
Chamber Depth μm	10
Temperature $^{\circ}\text{C}$	37

7.2 Posterpräsentationen

EIC Meeting

Numegen, Niederlande 16. – 17. September 2010

Mechanisms and regulation of iron transport across the blood testis barrier

Y. Bardoogo-Leichtmann, B. Marohn and E. Meyron-Holtz

GfH Tagung

Regensburg, Deutschland 16. -18. März 2011

Mechanisms and control of iron transport through the blood testis barrier. The role of iron regulatory protein 2 in testicular iron homeostasis

B. Marohn, J. Ulrich, P. Grzmil, Y. Bardoogo-Leichtmann, E. G. Meyron-Holtz, J. Schmidtke and S. Schubert

Fourth Congress of the International BioIron Society (IBIS)

Vancouver, BC, Canada 22. - 26. Mai 2011

An internal iron cycle in the seminiferous tubule of the testis

Y. Bardoogo-Leichtmann, B. Marohn, S. Schubert and E. G. Meyron-Holtz

ESHG Conference

Nürnberg, Deutschland 23. – 26. Juni 2012

Iron Deficiency and Targeted Deletion of Iron Regulatory Protein 2 Affect Sperm Motility and Male Fertility

B. Marohn, P. Grzmil, E. G. Meyron-Holtz, J. Schmidtke and S. Schubert

EIC Meeting

Rennes, Frankreich 29. – 31. August 2012

Compartmentalization and Regulation of Iron Metabolism Proteins Protect Male Germ Cells from Iron Overload

Y. Bardoogo-Leichtmann, B. Marohn, L. A. Cohen, A. Meinhardt, S. Schubert, E. G. Meyron-Holtz

7.3 Vorträge

Niedersächsisches Humangenetiker Treffen
Göttingen, Deutschland 12. November 2011

Die Bedeutung von IRP2 (iron regulatory protein 2) für die testikuläre Eisenhomöostase. Untersuchungen am Mausmodell

7.4 Veröffentlichungen

Schöner A, Adham I, Mauceri G, Marohn B, Vaske B, Schmidtke J, Schubert S. Partial rescue of the KIT-deficient testicular phenotype in Kit^{W-v}/Kit^{W-v} Tg(TSPY) mice. *Biol. Reprod.* 2010;83(1):20–26.

Leichtmann-Bardoogo Y, Cohen LA, Weiss A, Marohn B, Schubert S, Meinhardt A, Meyron-Holtz EG. Compartmentalization and regulation of iron metabolism proteins protect male germ cells from iron overload. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2012;302(12):E1519–1530.