Original Article

돼지 정소상체에서 ZO-1, Claudin 1 및 Claudin 4의 발현 양상

박윤재, 김봉기*

공주대학교 동물자원학과

The Expression and Localization of ZO-1, Claudin 1, and Claudin 4 in the Pig Epididymis

Yun-Jae Park and Bongki Kim*

Department of Animal Resources Science, Kongju National University, Yesan 32439, Korea

Received September 6, 2019
Revised September 17, 2019
Accepted September 23, 2019

*Correspondence

Bongki Kim
E-mail: bkkim@kongju.ac.kr

ORCID

<https://orcid.org/0000-0002-5229-7294>

ABSTRACT Tight junctions are constituents of the blood-epididymis barrier that play roles in regulating the unidirectional transcellular transport of ions, water, and solutes to maintain optimal conditions for sperm maturation and storage. Claudin 1 (Cldn1) and 4 (Cldn4) are known as tight junction proteins and are expressed in the basolateral membranes as well as tight junctions in the epididymis of rodents. Here, we examined the expression and localization of Cldn1 and 4 to determine the function of these proteins in the pig epididymis. Cldn1 was highly expressed in the basolateral membrane of epithelial cells in the caput and corpus regions of the epididymis. In the cauda region, however, Cldn1 labeling was significantly decreased in the basolateral membrane of epithelial cells. In contrast, labeling indicated that Cldn4 was expressed in the basolateral membrane in the cauda region of the epididymis and was present at punctate reactive sites in the caput and corpus regions. However, in no region of the epididymis did we detect colocalization of Cldn1 and 4 with labeled ZO-1, the distribution of which is restricted to the tight junctions. Our results indicate that Cldn1 and 4 were region-specifically expressed in the pig epididymis but not present in the tight junctions of epididymal epithelium. In addition, reciprocal regulation in specific regions of the epididymis between Cldn1 and 4 may play an important role in generating an optimal luminal environment for sperm maturation and storage in the pig epididymis.

Keywords: blood-epididymis barrier, Claudin, epididymis, tight junction

서론

정소상체는 매우 구불구불한 관상 기관으로 해부학적으로 두부

(caput), 체부(corpus), 미부(cauda)로 구분되며, 정자의 저장, 운반, 성숙 및 보호에 중요한 역할을 한다(Kim 등, 2013). 이러한 정소상체의 주요 기능을 수행하기 위해서는 정소상체관 내부의

적절한 미세 환경의 유지가 필수적이다. 이들 미세 환경은 정소상체 상피세포들 사이의 상호작용과 혈액-정소상체관 벽(blood-epididymis barrier: BEB)의 형성에 의해 조절 및 유지된다고 보고되었다(Turner, 1991; Robaire와 Hermo, 1998; Levy와 Robaire, 1999; Shum 등, 2011). 특히 BEB는 정소상체관 내부의 알맞은 환경 조성 및 유지에 중요한 역할을 위하여 특이적으로 작용하며, 외래 인자 유입을 차단하여 관 내부 환경을 유지하는 물리적 장벽 기능, 특정 분자와 이온 등의 투과성을 조절하는 삼투압 장벽 기능, 자가면역 반응으로부터 정자를 보호하는 면역 장벽 기능을 함으로써 정소상체의 주요 기능인 정자의 성숙, 보호, 운반, 저장에 필수적으로 작용함이 보고되었다(Cyr 등, 1995; Beagley 등, 1998; Mital 등, 2011).

BEB는 정소상체 상피세포 사이의 정점 부분에서 위치한다고 알려져 있으며(Hoffer와 Hinton, 1984; Agarwal와 Hoffer, 1989), 여러 밀착 이음(tight junctions: TJs)과 부착 이음(adherence junctions: AJs)으로 구성되어 있다. TJs는 표면 막단백질로 알려진 zonula occludens (ZO)와 막 관통성 단백질로 알려진 claudins (Cldns) 등으로 구성됨이 보고되었다(Gregory 등, 2001). 가장 대표적인 TJs 단백질로 알려진 ZO는 상피 세포의 정점에서 장벽 역할을 하며, 그중 첫 번째로 확인된 ZO-1은 막 관통성 단백질과 세포골격단백질인 액틴을 연결하는 기능을 한다(Stevenson 등, 1986; Agarwal와 HOFFER, 1989). 이어서 확인된 ZO-2 및 ZO-3는 각각 ZO-1과 결합하여 상호작용을 함으로써 TJs 형성에 중요하게 작용을 한다(Haskins 등, 1998). 또한, 최근 연구에 따르면 항상성 유지를 위하여 마우스 정소상체에서 ZO-2와 ZO-3가 서로 상보적인 역할을 함이 보고되었다(Kim과 Breton, 2016). 또한 막 관통성 단백질로 알려진 Cldns는 포유동물에서 27개의 종류가 확인되었으며, 주로 이온 및 물과 같은 물

질의 세포 간 투과 및 투과 장벽과 같은 중요한 기능이 다양한 장기 조직에서 보고됐다(Markov 등, 2015). 특히, Cldn1, 3 그리고 4의 발현은 마우스, 랫트 및 사람 정소상체의 TJs에서뿐만 아니라, 세포와 세포 사이 막인 기저측막(basolateral membrane; BLM)과 상피 세포 아래 경계면에 있는 막인 기저막(basement membrane; BM)에서 발현됨이 보고되었으며, 이들 Cldns 단백질의 발현은 종 특이적(species-specific) 그리고 조직 특이적(tissue-specific) 발현 양상이 보임이 많은 연구에 의해서 확인되었다(Gregory 등, 2001; Gregory와 Cyr, 2006; Cyr 등, 2007; Dubé 등, 2007; Shum 등, 2008; Kim과 Breton, 2016). 이러한 BEB을 구성하는 TJs 단백질은 여러 요인에 의해 조절되는데, Gregory 등(2001)에 의하면 랫트의 정소상체에서 Cldn1은 정소유래인자와 안드로겐에 의해 발현이 조절되며, Kim과 Breton (2016)에 의하면 세포외신호조절(ERK: extracellular signal-regulated kinase) 메커니즘이 Cldns, occludin, 그리고 ZOs과 같은 TJs 단백질의 발현을 조절한다고 보고하였다. 또한 돼지에서 항안드로겐 물질인 flutamide 처리 시 정소상체와 전립선에서 AJs 단백질인 E-cadherin과 β -catenin의 발현이 변화된다고 보고되었다(Gorowska 등, 2014).

BEB는 정소상체 관 내부의 미세 환경의 유지와 정자 보호와 같은 여러 기능을 하며, 여러 요소에 의해 조절돼 정소상체에서의 정자의 성숙 및 저장 등에 영향을 줄 수 있다. 하지만 정소상체에서의 이들 BEB를 구성하는 단백질의 종류 및 기능에 관하여 매우 적은 연구가 수행되었으며, 특히 돼지 정소상체의 BEB 형성 및 기능에 관한 연구 보고가 전혀 없다. 그러므로 본 연구의 목적은 정소상체 내부 미세 환경조절 및 유지에 중요한 TJs 단백질로 알려진 ZO-1, Cldn-1 그리고 -4의 발현을 공초점 현미경으로 조사하여 이들의 발현 양상을 명확하게 확인함으로써 돼지 정소상체에

Fig. 1. Immunolocalization of ZO-1 (green), Cldn1, and 4 (red) in the adult epididymis. (A) A pig epididymis section labeled with anti-ZO-1. Tight junctions were observed at the apical regions between epithelial cells (yellow arrowhead). (B) A pig epididymis section labeled with anti-Cldn1. Expression of Cldn1 was observed at basolateral (white arrows) and basement membranes (white arrowheads). (C) A pig epididymis section labeled with anti-Cldn4. Expression of Cldn4 was observed at basolateral (white arrows) and basement membranes (white arrowheads). (D-F) Negative controls included staining with secondary antibody only and showed no staining of ZO-1, Cldn1, and Cldn4 in the epididymis. Nuclei are labeled with DAPI (blue). P, principal cells; B, basal cells; L, lumen; S, spermatozoa. Bars = 50 μ m.

서의 TJs의 역할 규명을 위한 기본 정보를 제공하기 위함이다.

재료 및 방법

공시축

본 연구에 사용된 성돈 정소상체 시료는 정상적인 능력을 가지고 있는 랜드레이스와 대요크셔 교잡종 3마리에서 채취하였다. 시료 채취 절차 및 모든 실험 과정은 국립축산과학원의 동물실험윤리위원회에 의해 승인 및 검토되었다(승인 No. NIAS2019-117).

조직 표본

정소상체 시료는 PBS (phosphate buffered saline)에 용해된 4% paraformaldehyde를 가지고 실온에서 약 24시간 동안 고정하였으며, 12시간마다 신선한 고정액으로 교체해 주었다. 고정된 시료는 PBS로 20분씩 3번 세척했고, 사용되기 전까지 4°C 냉장고에 보관하였다. 준비된 시료는 PBS에 용해된 30% sucrose에 2-3일 동안 탈수하였다. 탈수가 완료된 시료를 OCT compound (Tissue-Tek; Sakura Finetek, Torrance, CA, USA)에 포매(embedding)하여 동결 블록으로 제작하였다. 제작된 동결 블록

은 Leica 3050 cryostat (Leica Microsystems, Bannockburn, IL, USA)을 사용하여 10 μ m, 16 μ m 두께로 절편하고 Fisher Superfrost/Plus microscope 슬라이드(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)에 부착하여 -20°C에서 보관하였다.

면역형광염색

동결 절편 된 슬라이드글라스는 PBS로 10분간 수세 후 항원 회복(antigen retrieval)을 위하여 10 mM Tris/1 mM EDTA buffer (pH 9.0)를 사용하여 전자레인지에서 2분씩 3번 약 5분의 간격을 두고 진행되었다. 항원 회복 과정이 끝난 슬라이드글라스는 충분히 실온에서 식힌 후 비특이적인 반응을 줄이기 위하여 1% BSA (in PBS) 용액에 실온에서 1시간 동안 놓였다. Rabbit polyclonal Cldn1, 그리고 4 항체(Thermo Fisher, Waltham, MA, USA)와 mouse monoclonal ZO-1 항체(Thermo Fisher, Waltham, MA, USA)가 1차 항체로 사용되었고, 2차 항체로는 Cy3 conjugated donkey anti rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories)와 Alexa 488 conjugated donkey anti mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories)가 사용되었다. 본 실험에서 사용된 모든 항체는 Dako antibody

Fig. 2. Double immunostaining for Cldn1 (red) and ZO-1 (green, yellow arrowhead) in the pig epididymis. Expression of Cldn1 was mainly observed at the basolateral membrane (white arrows) and basement membrane (white arrowheads) in the caput (A, A'), corpus (B, B') and cauda (C, C'). Nuclei are labeled with DAPI (blue). P, principal cells; B, basal cells; L, lumen; S, spermatozoa. Bars = 50 μ m. A 3D reconstruction of TJs double labeled for ZO-1 (yellow arrowheads) and Cldn1 (white arrows). No colocalization of Cldn1 and ZO-1 was detected in the entire epididymis (D). A Significant decrease in Cldn1 expression was observed at the cauda regions of the epididymis (E). Data are represented as means $\pm$ SEM. * p < 0.01.

diluent (Dako, Carpinteria, CA, USA)에 희석돼 사용되었으며, DAPI가 함유된 Vectashield medium (Vector Labs, Burlingame, CA)을 처리 후 커버 슬라이드를 씌웠다. 공초점 현미경 이미지는 Zeiss confocal microscopy (LSM800)를 이용하여 Z-series를 4.8 μm 범위를 0.3 μm 간격으로 촬영하였다. 이미지 분석은 Zen blue software와 Adobe Photoshop을 이용하였다.

형광 발현 정량 및 통계분석

형광 발현 정량 이미지는 Zeiss confocal microscopy (LSM800)을 이용하여 10X 배율로 4.8 μm 범위를 0.3 μm 간격으로 촬영한 이미지를 Image J (<http://imagej.nih.gov/ij>, version 1.46, National Institutes of Health, MD, USA) software를 통해 발현량이 측정되었으며, 그룹 간의 비교는 general linear model (GLM)을 사용한 후 Tukey simultaneous test를 이용하여 검정하였다. 모든 결과는 평균값 $\pm$ 표준오차(SEM)으로 나타내었다. 유의 확률이 0.05보다 작을 경우($p < 0.05$) 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결 과

돼지 정소상체에서 ZO-1과 Cldn1, 그리고 Cldn4 항체의 발현 확인

ZO-1과 Cldn1, 그리고 Cldn4는 마우스 정소상체 조직에서의 발현이 확인되었으나, 아직 돼지 정소상체에서의 발현에 관한 보고는 없었다. 그러므로 돼지 정소상체에서 항체가 정상적으로 발현하는지를 확인하였다. ZO-1은 정소상체 상피세포 사이 정점에서 발현이 관찰되었고(Fig. 1A), Cldn1은 기저측막과 기저막에서 발현이 관찰되었다(Fig. 1B). Cldn4는 Cldn1보다는 현저히 낮은 발현은 확인되지만 발현 위치는 Cldn1과 동일한 기저측막과 기저막에서 발현이 관찰되었다(Fig. 1C). 음성대조군을 위하여 1차 항체 처리는 생략되었고 그 외에 모든 실험 방법은 동일하게 수행되었다(Fig. 1D-F). 이 연구결과를 기반으로 돼지 정소상체 각 부위(두부, 체부, 미부)에서의 ZO-1, Cldn1 그리고 Cldn4의 발현 양상을 조사하였다.

돼지 정소상체 부위별 Cldn1의 발현 양상

Cldn1의 발현 위치를 명확하게 확인하기 위하여 TJs 마커로 널

Fig. 3. Double immunostaining for Cldn4 (red) and ZO-1 (green, yellow arrowheads) in the pig epididymis. Cldn4 was punctate along the basolateral membranes in the caput (A, A'; white arrowhead) and corpus (B, B'; white arrowhead) regions of the epididymis. Nuclei are labeled with DAPI (blue). P, principal cells; B, basal cells; L, lumen; S, spermatozoa. Bars = 50 μm . A 3D reconstruction of TJs double labeled for ZO-1 (yellow arrowhead) and Cldn4 (white arrows). No colocalization of Cldn1 and ZO-1 was detected in the entire epididymis (D). A Significant increase in Cldn4 expression was observed at the cauda regions compared to caput and corpus regions of the epididymis (E). Data are represented as means $\pm$ SEM. * $p < 0.01$.

리 사용되는 ZO-1 항체와 Cldn1 항체는 동시에 염색되었다. 정소상체는 두부(A, A'), 체부(B, B'), 그리고 미부(C, C') 세 부분으로 나누어져 염색이 수행되었다. 정소상체 모든 부위에서 ZO-1은 오직 상피세포 정점의 세포들 사이에 발현이 확인되었고(Fig. 2A'-C'; yellow arrowheads), Cldn1은 기저측막(Fig. 2A'-C'; white arrowheads)과 기저막(Fig. 2A'-C'; white arrows)에서 관찰되었다. ZO-1과 Cldn1 사이의 중첩 발현은 모든 부위에서 나타나지 않았다(Fig. 2A-D). 이 결과로부터 Cldn1은 돼지 정소상체의 TJs에서 발현되지 않음을 확인하였다. Cldn1의 발현 농도는 두부와 미부에서 체부보다는 현저히 높게 발현되었다(Fig. 2E).

돼지 정소상체 부위별 Cldn4의 발현 양상

Cldn4의 발현은 두부(A, A') 및 체부(B, B')에서는 주로 세포와 세포 사이의 기저측막에 반점 모양을 가진 발현이 관찰되었고(Fig. 3A'-B'; white arrows), 반면 미부(C, C')에서는 기저측막(Fig. 3C'; white arrowheads)과 기저막(Fig. 3C'; white arrows)에서 Cldn1과 유사한 발현 양상이 확인되었다(Fig. 3C, C'). Cldn4 발현도 Cldn1과 동일하게 ZO-1과의 중첩 발현은 관찰되지 않았다(Fig. 3D). 이는 돼지 정소상체에서는 Cldn4는 TJ

단백질이 아님을 나타낸다. Cldn4의 발현 농도는 Cldn1의 발현과는 다르게 미부에서 현저히 높은 농도를 가지고 발현되었다(Fig. 3E).

고 찰

알맞은 TJs 발현은 세포 구조의 유지, 물과 이온 투과성 조절, 그리고 면역 시스템으로부터 분리 등에 중요한 역할을 하는 BEB 형성에 필수적으로 작용을 한다. BEB는 혈관과 정소상체 내부와의 장벽의 역할을 함으로써 정소상체 내부의 환경을 정자 성숙 및 저장에 알맞은 상태로 조절 유지할 수가 있다. 하지만, 이들 특별한 환경을 만드는 TJs 단백질의 발현 양상 및 기능에 대한 정보는 매우 드물게 알려져 있다. 특히, 돼지 정소상체에서의 TJs 단백질 발현에 관한 연구는 전무하다. 우리는 본 연구에서 TJs 단백질로 중요하게 보고된 ZO-1, Cldn1, 그리고 Cldn4의 발현 양상을 돼지 정소상체에서 처음으로 확인하였다. ZO-1은 가장 널리 알려진 TJs 단백질의 하나로서 신장, 간, 폐, 소장, 뇌 등 다양한 조직에서 발현됨이 마우스 및 사람에서 보고되었다(Anderson 등, 1989; Hwang 등, 2013). 본 연구에서 우리는 ZO-1이 돼지 정소상체 상피세포의 첨체 부분인 TJs에서 특이적으로 발현됨을 확인

Fig. 4. Schematic diagram of the expression and localization of ZO-1, Cldn1 and 4 in the pig epididymis. ZO1 is localized at apical regions between epithelial cells. No colocalization of Cldn1 or 4 with ZO-1 is observed from all regions of the epididymis. Reciprocal expression of Cldn1 and Cldn4 by regions of the pig epididymis.

할 수가 있었다. 이는 TJs이 정소상체 상피세포 침체 부분에서 발현되어 정자가 위치하는 정소상체관 내부와 상피세포간의 직접적인 물질 이동 차단에 중요한 역할을 할 것으로 예상된다. 이 결과는 마우스 및 랫트의 정소상체에서 ZO-1가 상피세포의 침체 부분에서 특이적으로 발현됨과 유사한 결과를 나타낸다. 또한, 상피세포 침체 부분에서의 ZO-1의 발현은 혈관을 통한 면역 물질과 정자 사이의 면역학적 장벽을 만들어 줌으로써 면역세포에 의한 정자의 자가면역반응을 예방하는 작용에 직접적으로 관여함을 예측할 수 있다. 추가적으로, 우리는 TJs 단백질로 알려진 Cldn1 및 4 단백질이 돼지 정소상체의 TJs 부위에서는 발현이 되지 않으며 오직 기저측막 및 기저막에서만 존재함을 확인하였다. 이 결과는 마우스에서 Cldn1이 기저측막 및 기저막뿐만 아니라 TJs에서 강력하게 발현되는 결과와는 상반된 결과를 나타낸다. 마우스 정소상체에서는 ZO-1과 Cldn1 및 4와의 상호협력 작용이 BEB형성에 중요하게 작용을 하여 정소상체의 내부 환경을 유지 및 조절에 관여하는 반면 돼지 정소상체에서의 이들 Cldn1 및 4 단백질은 BEB 형성보다는 세포와 세포 사이의 부착에 중요한 역할을 함이 제시된다. 기저측막에 발현되는 Cldn1과 4는 정소상체 상피세포의 하나인 주세포 사이의 접착에 중요함을 나타내며 기저막에서의 발현은 기저세포와 주세포 사이의 접착에 깊게 관여함을 나타낸다. 돼지에서 Cldn1은 두부와 체부에서 강한 발현을 보이고 미부에서는 현저하게 약한 발현을 보이는 반면, Cldn4는 두부 및 체부에 비하여 미부에서 높은 발현을 확인할 수가 있었다. 이 발현 양상은 돼지 정소상체에서 Cldn1, 4가 서로 상보적인 작용을 통하여 정소상체 내부의 환경을 조절하는 것으로 추측된다. 다양한 Cldns 단백질은 종 특이적(species-specific) 그리고 부위 특이적(region-specific)인 발현을 통한 다양한 기능을 가지고 있음을 제시한다. 예를 들어, 랫트와 사람의 정소상체에서는 Cldn1이 돼지와 유사하게 정소상체 두부 및 체부에서 높게 발현되는 반면 미부에서 약하게 발현된다는 보고가 있다(Gregory 등, 2001; Dubeé 등, 2007). 반면, 랫트 정소상체에서 Cldn4는 TJs에서만 발현이 발견되었으며, 돼지와 반대로 두부에서 미부로 갈수록 발현이 약해지는 결과가 보고됐다(Gregory와 Cyr, 2006). 또한, Dubé 등(2007)에 의하면 사람 정소상체에서 Cldn8은 두부와 미부의 TJs에서 주로 발현되어 물질 이동에 깊이 관여하는 반면 체부에서는 기저측막에 발현하여 세포와 세포 사이의 부착에 관여한다고 보고하였다. 이와 같이, 이들 다양한 Cldns 단백질들은 여러 조직에서 다양한 발현 양상을 가지고 각기 다른 역할을 함을 알 수가 있다.

결론적으로 돼지 정소상체에서 Cldn1, 4는 설치류에서의 보고와는 다르게 TJs에서 발현이 되지 않으며, 이것으로 보아 Cldn1, 4는 주로 세포 부착과 세포투과성을 조절하는 것으로 판단되며 ZO-1과 직접적인 상호 관계는 없는 것으로 고려된다. Cldn1은 두부, 체부에서 강하게 발현되고 미부에서 약하게 발현되며, Cldn4는 두부, 체부의 세포막에서 약한 발현이 관찰되고, 미부는 두부, 체부보다 상대적으로 강하게 발현된다. 이것으로 보아 돼지

정소상체에서 Cldn1과 4는 서로 상보적으로 작용하여 정소상체관 내부의 환경의 항상성 유지에 관여함으로써 정자의 성숙 및 저장에 중요한 환경을 조성하는데 필수적인 역할을 할 것으로 추측된다(Fig. 4). 하지만, 돼지 정소상체에서의 다른 유형의 Cldns 단백질과 ZOs 단백질의 상호작용에 의한 BEB 형성 메커니즘의 가능성을 완전히 배제할 수는 없다. 그러므로 다른 추가적인 Cldns 단백질들의 돼지 정소상체에서의 발현 양상에 대한 연구는 정소상체 내부 환경 조절의 기능을 밝히기 위해 반드시 요구된다.

CONFLICTS OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

ACKNOWLEDGEMENTS

본 실험을 위하여 샘플을 제공한 국립축산과학원 양돈과에 감사드립니다. 또한, 본 연구는 2017년도 공주대학교 학술연구지원사업의 연구지원에 의해 수행되었습니다.

ORCID

Yun-Jae Park: <https://orcid.org/0000-0002-2619-7505>

Bongki Kim: <https://orcid.org/0000-0002-5229-7294>

REFERENCES

- Agarwal A and Hoffer AP. 1989. Ultrastructural studies on the development of the blood-epididymis barrier in immature rats. *Journal of Andrology* 10:419-497.
- Anderson JM, Van Itallie CM, Peterson MD, Stevenson BR, Carew EA, Mooseker MS. 1989. ZO-1 mRNA and protein expression during tight junction assembly in Caco-2 cells. *Journal of Cell Biology* 109:1047-1056.
- Beagley KW, Wu ZL, Pomeroy M, Jones RC. 1998. Immune responses in the epididymis: implications for immunosuppression. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 53:235-245.
- Cyr DG, Gregory M, Dubé E, Dufresne J, Chan PTK, Hermo L. 2007. Orchestration of occludins, claudins, catenins and adherins as players involved in maintenance of the blood-epididymal barrier in animals and humans. *Asian Journal of Andrology* 9:463-475.
- Cyr DG, Robaire B, Hermo L. 1995. Structure and turnover of junctional complexes between principal cells of the rat epididymis. *Microscopy Research and Technique* 30:54-66.
- Dubé E, Chan PTK, Hermo L, and Cyr DG. 2007. Gene expression profiling and its relevance to the blood-epididymal barrier in the human epididymis. *Biology of Reproduction*

- 76:1034-1044.
- Gorowska E, Zarzycka M, Chojnacka K, Bilinska B and Hejmej A. 2014. Postnatal exposure to flutamide affects CDH1 and CTNNB1 gene expression in adult pig epididymis and prostate and alters metabolism of testosterone. *Andrology* 2:186-197.
- Gregory M and Cyr DG. 2006. Identification of multiple claudins in the rat epididymis. *Molecular Reproduction and Development* 73:580-588.
- Gregory M, Dufresne J, Hermo L, and Cyr DG. 2001. Claudin-1 Is not restricted to tight junctions in the rat epididymis. *Endocrinology* 142:854-863.
- Haskins J, Gu L, Wittchen ES, Hibbard J, Stevenson BR. 1998. ZO-3, a Novel Member of the MAGUK Protein Family Found at the Tight Junction, Interacts with ZO-1 and Occludin. *Journal of Cell Biology* 141:199-208.
- Hoffer AP, Hinton BT. 1984. Morphological evidence for a blood-epididymis barrier and the effects of gossypol on its integrity. *Biology of Reproduction* 30:991-1004.
- Hwang I, An BS, Yang H, Kang HS, Jung EM, Jeung EB. 2013. Tissue-specific expression of occludin, zona occludens-1, and junction adhesion molecule A in the duodenum, ileum, colon, kidney, liver, lung, brain, and skeletal muscle of C57BL mice. *Journal of Physiology and Pharmacology* 64:11-18.
- Kim B and Breton S. 2016. The MAPK/ERK-Signaling pathway regulates the expression and distribution of tight junction proteins in the mouse proximal epididymis. *Biology of Reproduction* 94:1-12.
- Kim K, Lee J, Lee J, Kim E, Han K, Park K, Kim M. 2013. Effects of Incubation and Thawing Temperature on Frozen-thawed Stallion Epididymal Spermatozoa. *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology* 28:297-302.
- Levy S and Robaire B. 1999. segment-specific changes with age in the expression of junctional proteins and the permeability of the blood-epididymis barrier in rats. *Biology of Reproduction* 60:1392-1401.
- Markov AG, Aschenbach JR, Amasheh S. 2015. Claudin clusters as determinants of epithelial barrier function. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life* 67:29-35.
- Mital P, Hinton BT, and Dufour JM. 2011. The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *Biology of Reproduction* 84:851-858.
- Robaire B, Hermo L. 1988. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions, and their regulation. *The Physiology of Reproduction* New York: Raven Press 999-1080.
- Shum WWC, Ruan YC, Silva ND, Breton S. 2011. Establishment of cell-cell cross talk in the epididymis: control of luminal acidification. *Journal of Andrology* 32:576-586.
- Shum WWC, Silva ND, McKee C, Smith PJS, Brown D, and Breton S. 2008. Transepithelial projections from basal cells are luminal sensors in pseudostratified epithelia. *Cell* 135:1108-1117.
- Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. 1986. Identification of ZO-1: A high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *The Journal of Cell Biology* 103:755-766.
- Turner TT. 1991. Spermatozoa are exposed to a complex micro-environment as they traverse the epididymis. *Annals of The New York Academy of Sciences* 637:364-383.
- Van Italli CM, Fanning AS, and Anderson JM. 2003. Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 285:F1078-F1084.