

Aus dem

Med. Zentrum für Operative Medizin, Klinik für Urologie und Kinderurologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Hofmann

Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

---

**Etablierung eines in vitro-Systems  
zur Analyse der Differenzierung und Apoptose  
immaturer testikulärer Keimzellen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Leslie Laible  
geboren in Mannheim-Neckarau

Marburg, 2007



Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
am: 20.12.2007

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

**Dekan:** Prof. Dr. Matthias Rothmund

**Referent:** PD Dr. Lutz Konrad

**Korreferent:** Prof. Dr. Walter Krause



# Inhaltsverzeichnis

---

<b>ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>IV</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 DIE SPERMATOGENESE</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Entwicklung der Spermien .....	1
1.1.2 Postnatale Entwicklung des Rattenhodens .....	2
1.1.3 Stadien der Spermatogenese.....	3
1.1.4 Stadienspezifische Markerproteine.....	4
<b>1.2 HORMONELLE REGULATION DER SPERMATOGENESE</b> .....	<b>4</b>
1.2.1 Hypothalamisch-hypophysärer Regelkreis.....	4
1.2.2 Modelle zur Untersuchung der Rolle von Testosteron und FSH in vivo .....	5
1.2.3 Testosteron (T) ist essentiell für die Spermatogenese.....	6
1.2.4 Follikel Stimulierendes Hormon (FSH) bestimmt die Kapazität der Spermatogenese .....	8
1.2.5 Synergismus von Testosteron und FSH .....	8
<b>1.3 KEIMZELLKULTUR UND IN VITRO-SPERMATOGENESE</b> .....	<b>9</b>
<b>1.4 APOPTOSE</b> .....	<b>12</b>
1.4.1 Bedeutung der Apoptose .....	12
1.4.2 Molekulare Mechanismen der Apoptose.....	12
1.4.3 Apoptose von Keimzellen .....	14
<b>1.5 TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA</b> .....	<b>16</b>
<b>1.6 KLINISCHE RELEVANZ DER IN VITRO-SPERMATOGENESE</b> .....	<b>19</b>
<b>1.7 ZIELSETZUNG</b> .....	<b>21</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1 MATERIAL</b> .....	<b>22</b>
2.1.1 Gewebe .....	22
2.1.2 Geräte.....	22
2.1.3 Chemikalien / Lösungen.....	23
<b>2.2 METHODEN</b> .....	<b>24</b>
2.2.1 Arbeiten mit Organ- und Zellkultur.....	24
2.2.1.1 <i>Allgemeines zum Arbeiten mit Organ- und Zellkultur</i> .....	24
2.2.1.2 <i>Modelle zur Kultivierung testikulärer Zellen</i> .....	24

2.2.1.3	<i>Isolierung primärer Zellen aus Hodengewebe</i> .....	25
2.2.1.4	<i>Vitalitätsfärbung und Zellzählung</i> .....	26
2.2.1.5	<i>Anreicherung von Sertoli-Zellen</i> .....	27
2.2.1.6	<i>Anreicherung von Keimzellen</i> .....	27
2.2.1.7	<i>Zellkultur mit Extrazellulärmatrix (ECM)</i> .....	29
2.2.1.8	<i>Einbettung der Tubulusfragmente und Zellaggregate</i> .....	29
2.2.2	<b>Aufbau der Zellkulturversuche mit primären Keimzellen</b> .....	30
2.2.2.1	<i>Untersuchung der TGF-<math>\beta</math>-induzierten Apoptose</i> .....	30
2.2.2.2	<i>Untersuchung der Differenzierung</i> .....	32
2.2.3	<b>Kultivierung immortalisierter Zellen</b> .....	34
2.2.4	<b>Histologische Methoden</b> .....	35
2.2.4.1	<i>Herstellung der Paraffinschnitte</i> .....	35
2.2.4.2	<i>Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE-Färbung)</i> .....	35
2.2.4.3	<i>Immunhistochemie</i> .....	36
2.2.5	<b>Molekularbiologische Methoden</b> .....	39
2.2.5.1	<i>RNA-Isolierung und Konzentrationsbestimmung</i> .....	39
2.2.5.2	<i>Reverse Transkription</i> .....	40
2.2.5.3	<i>Polymerase Kettenreaktion</i> .....	41
2.2.5.4	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i> .....	43
2.2.6	<b>Messung der Caspase-3 Aktivität</b> .....	44
2.2.7	<b>Messung der Proteinkonzentration</b> .....	45
2.2.8	<b>Messung der Konzentration des Makrophagen stimulierenden Proteins</b> ....	45
2.2.9	<b>Auswertungen</b> .....	47
2.2.9.1	<i>Zellzählung an immunhistochemischen Präparaten</i> .....	47
2.2.9.2	<i>Statistische Auswertung</i> .....	47
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>48</b>
<b>3.1</b>	<b>MARKERPROTEINE TESTIKULÄRER ZELLEN</b> .....	<b>48</b>
3.1.1	Peritubulärzellen.....	48
3.1.2	Sertoli-Zellen .....	49
3.1.3	Keimzellen.....	51
3.1.3	Tabellarische Zusammenfassung.....	54
<b>3.2</b>	<b>ETABLIERUNG DES ZELLKULTURSYSTEMS PRIMÄRER TESTIKULÄRER ZELLEN</b> .....	<b>55</b>
3.2.1	Isolierung der Tubulusfragmente und Einzelzellen.....	55
3.2.2	Histologie primärer testikulärer Zellen in vitro; Bildung von Clustern und Cords .....	57
3.2.3	HE- und immunhistochemische Färbung der Cords und Tubulusfragmente	58
<b>3.3</b>	<b>DIFFERENZIERUNG PRIMÄRER TESTIKULÄRER ZELLEN IN VITRO</b> .....	<b>63</b>
3.3.1	Untersuchung der Differenzierung in der Organkultur .....	63
3.3.2	Untersuchung der Differenzierung in der Zellkultur .....	67
3.3.2.1	<i>In vitro-Differenzierung mit FSH und Testosteron</i> .....	67

3.3.2.2	<i>In vitro-Differenzierung mit FSH alleine</i> .....	70
3.3.2.3	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse zur in vitro-Differenzierung</i> .....	71
<b>3.4</b>	<b>APOPTOSE PRIMÄRER TESTIKULÄRER ZELLEN IN VITRO</b> .....	<b>73</b>
3.4.1	Untersuchung TGF- $\beta$ 2-induzierter Keimzellapoptose in der Organkultur ..	73
3.4.2	Untersuchung der TGF- $\beta$ 1- und TGF- $\beta$ 2- induzierten Keimzellapoptose in der Zellkultur .....	76
3.4.2.1	<i>Caspase-3 Aktivität</i> .....	77
3.4.2.2	<i>Makrophagen stimulierendes Protein</i> .....	79
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>81</b>
<b>4.1</b>	<b>IN VITRO DIFFERENZIERUNG IMMATURER TESTIKULÄRER KEIMZELLEN</b> .....	<b>81</b>
4.1.1	Optimierung der Versuchsbedingungen .....	83
4.1.1.1	<i>Versuchstiere und Kulturbedingungen</i> .....	83
4.1.1.2	<i>Medium und Zusätze</i> .....	83
4.1.2	Kultur von Tubulusfragmenten .....	84
4.1.2.1	<i>Gewinnung der Tubulusfragmente</i> .....	85
4.1.2.2	<i>Überleben der Keimzellen in Tubulusfragmenten</i> .....	85
4.1.2.3	<i>Differenzierung der Keimzellen in Tubulusfragmenten</i> .....	86
4.1.2.4	<i>Zeitachse der Differenzierung in vitro</i> .....	88
4.1.3	Organkultur .....	89
4.1.3.1	<i>Überleben der Keimzellen in der Organkultur</i> .....	89
4.1.3.2	<i>Differenzierung der Keimzellen in der Organkultur</i> .....	90
4.1.4	Kultur dissoziierter Zellen .....	91
<b>4.2</b>	<b>APOPTOSE IMMATURER TESTIKULÄRER ZELLEN UNTER EINFLUSS VON TGF-<math>\beta</math></b> .....	<b>93</b>
4.2.1	Stellung der Caspasen .....	94
4.2.2	Makrophagen stimulierendes Protein (MSP) .....	95
4.2.3	Bedeutung der Apoptose im immaturren Hoden .....	95
4.2.4	Signalweg der TGF- $\beta$ vermittelten Apoptose .....	96
4.2.5	Vergleich der Kultursysteme zur Untersuchung der TGF- $\beta$ -induzierten Keimzellapoptose .....	96
4.2.5.1	<i>Organkultur</i> .....	96
4.2.5.2	<i>Zellkultur</i> .....	97
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>98</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>100</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>114</b>

## Abkürzungen

A.dest.	Destilliertes Wasser
AK	Antikörper
AMH = MIS	Anti Müller Hormon
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor-1
AR	Androgen Rezeptor
ARKO	Androgen Rezeptor Knock out
AS	Aminosäure
ASMA	Anti-smooth muscle actin
AT	Annealing Temperatur
bFGF	Basic Fibroblast growth factor
BMP	Bone morphogenetic protein
bp	Base pairs
BrdU	5'-Bromo-2'-desoxyuridin
BSA	Bovines Serum Albumin
ca.	Circa
cDNA	Copy DNA
Ctrl	Kontrolle
d	dies / Tag
DAB	Diamino-benzidin
DEVD-pNA	N-Acetyl-Aspartat-Glutamat-Valin-Aspartat-p-Nitroanilid
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DANN	Desoxyribonucleicacid
dNTP	Desoxynucleotid Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extrazellulärmatrix
EDTA	Ethylendiamin-tetra-acetat
ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbent acid
FKS	Fötale Kälberserum
FORKO	FSH-Rezeptor-Knock out
FSH	Follikel stimulierendes Hormon

GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GC	Gonocyten
gDNA	Genomische DANN
GnRH	Gonadotropin releasing Hormon
x	Mehrfaches der Schwerkraft g
h	hours / Stunden
HE	Hämatoxylin Eosin
HeLa	Helen Lancey
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonsäure)
hpg	hypogonadal
HRP	Horseradish Peroxidase
ICSI	Intracytoplasmatische Spermieninjektion
IE	Internationale Einheiten
IL-4	Interleukin 4
IVF	In vitro Fertilisation
LAP	Latency associated peptide
LC	Leydig Zellen
LH	Luteinisierendes Hormon
LIF	Lukemia inhibiting factor
Lsg.	Lösung
LuRKO	LH Rezeptor Knock out
max	Maximal
min	Minuten
mind	Mindestens
MIS = AMH	Mullerian inhibiting Substance
mRNA	Messenger RNA
MSP	Makrophagen stimulierendes Protein
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Versuchsdurchführungen
Ø	Durchmesser
OD	Optische Dichte
PA	Peptidantagonist
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Peritubulärzellen

PCR	Polymerase chain reaction
PGC	Primordiale Gonocyten
Prm	Protamin
RNA	Ribonucleicacid
RNasin	RNase-Inhibitor
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SC	Sertolizelle
SCARKO	Sertolizell spezifischer Androgen Rezeptor knock out
SCF	Stem cell factor
SCF-R	Stem cell factor Rezeptor
SD	Standard deviation / Standardabweichung
SDS	sodium dodecylsulfate
SEM	Standard error of the mean
sog.	Sogenanntes/er/e
Spc	Spermatocyten
Spd	Spermatiden
Spg	Spermatogonien
Spz	Spermatozoen
T	Testosteron
Taq	Thermus aquaticus
TBE-Puffer	Tris Borat EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris EDTA-Puffer
tg-FSH	Transgenes FSH
TGF- $\beta$	Transforming growth factor - $\beta$
TP	Transition protein
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
T $\beta$ R	Transforming growth factor - $\beta$ Rezeptor

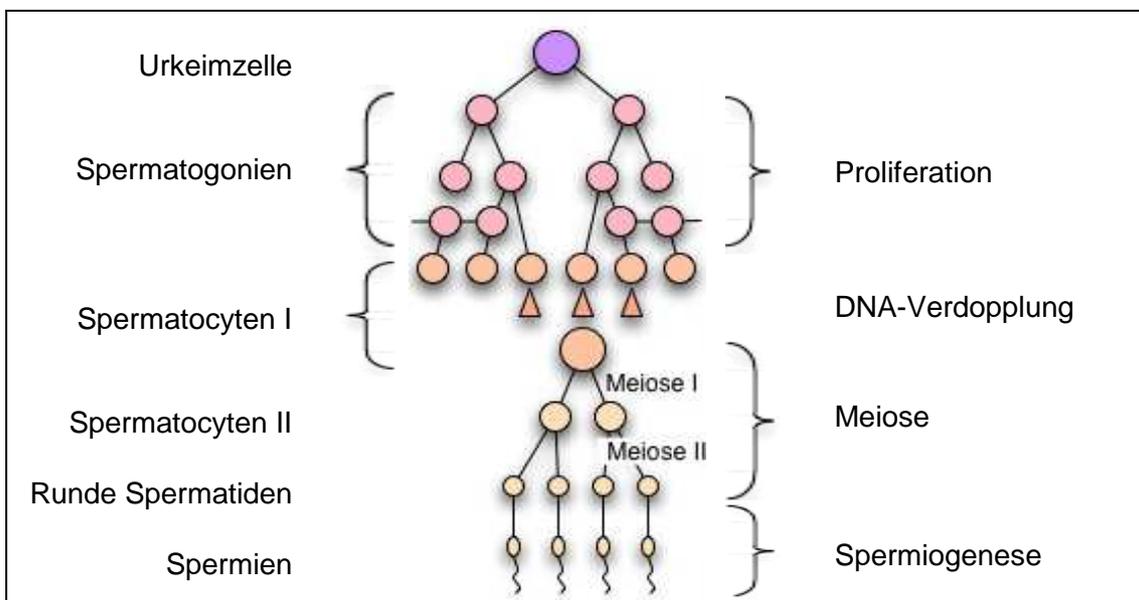
# 1 Einleitung

---

## 1.1 DIE SPERMATOGENESE

### 1.1.1 Entwicklung der Spermien

Die Spermatogenese ist definiert als der Prozess, bei dem sich primäre männliche Keimzellen zu haploiden Samenzellen entwickeln (Leblond & Clermont, 1952). Formal wird sie in drei Phasen eingeteilt: Am Beginn steht die Proliferation der Stammzellen, darauf folgt die Spermatogenese mit der Meiose und abschließend die Spermio-genese mit der Ausreifung zu Spermatozoen (Abb. 1).



**Abb. 1:** Die Spermatogenese verläuft in 3 Abschnitten: 1. Proliferation der Spermatogonien, 2. Meiose, 3. Spermio-genese

In der ersten Phase durchlaufen die Typ-A-Spermatogonien mitotische Teilungen, bevor aus ihnen Intermediär- und B-Spermatogonien hervorgehen (Monesi, 1962, 1965). Die B-Spermatogonien differenzieren sich mit Beginn der Pubertät zu primären Spermatocyten (Spermatocyt I), welche in die Spermatogenese eintreten. Die Spermatogenese besteht aus der Meiose I, der Reduktionsteilung, wobei der Chromosomensatz haploid wird, und der Meiose II, einer mitotischen Teilung. Zunächst wird der DNA-Gehalt der Spermatocyten I verdoppelt ( $4n$ ), wodurch diese nun die größten Zellen des Keimepithels sind. Ihre Kerne zeigen die typischen Konfigurationen der Chromosomen in den verschiedenen Stadien der Prophase der Meiose I (Leptotän,

Zygotän, Pachytän, Diplotän, Diakinese). In den Zygotän-Spermatocyten liegen die homologen Chromosomen im synaptonemalen Komplex gepaart vor, wobei es im Pachytän-Stadium durch „crossing over“ zur Rekombination der Erbinformation kommt. Nach Durchlaufen des Diplotän-Stadiums ist die erste Reifeteilung mit der Entstehung von zwei sekundären Spermatocyten (Spermatocyten II) abgeschlossen ( $2n$ ). Diese Zellen sind deutlich kleiner und weniger häufig zu identifizieren, da die Interphase sehr kurz ist. Die zweite meiotische Reifeteilung führt über eine Trennung der Chromatiden zu runden Spermatiden ( $1n$ ).

In der dritten Phase der Keimzellentwicklung, der Spermiogenese, entstehen aus den runden Spermatiden durch Chromatinkondensation und Elongation reife Spermatozoen (de Kretser & Kerr, 1988; Russell et al., 1990).

### **1.1.2 Postnatale Entwicklung des Rattenhodens**

Der neonatale Rattenhoden enthält Keimstränge mit embryonalen Keimzellen, den Gonocyten und den Vorläufern der Sertoli-Zellen. Vom 3. bis zum 7. Lebenstag entstehen erste A-, Intermediär- und B-Spermatogonien. Ab dem 9. Tag kommen dann die ersten Spermatocyten I hinzu und ab dem 15. postnatalen Tag werden die ersten Stadien der Meiose sichtbar (Clermont & Perey, 1957; Russell, 1993). Somit ist der postnatale Tag 15 als Anfang der Pubertät anzusehen, da diese definitionsgemäß mit dem erstmaligen Eintritt der Keimzellen in die Spermatogenese beginnt. Eine frühpubertäre Ratte ist somit etwa 15 Tage alt, eine pubertäre etwa 20 Tage und eine spätpubertäre etwa 35 Tage. Um den 45. Lebenstag erreicht eine Ratte die Geschlechtsreife, da zu diesem Zeitpunkt die ersten Spermien im Lumen vorhanden sind (De Kretser & Kerr, 1988; Russell, 1993).

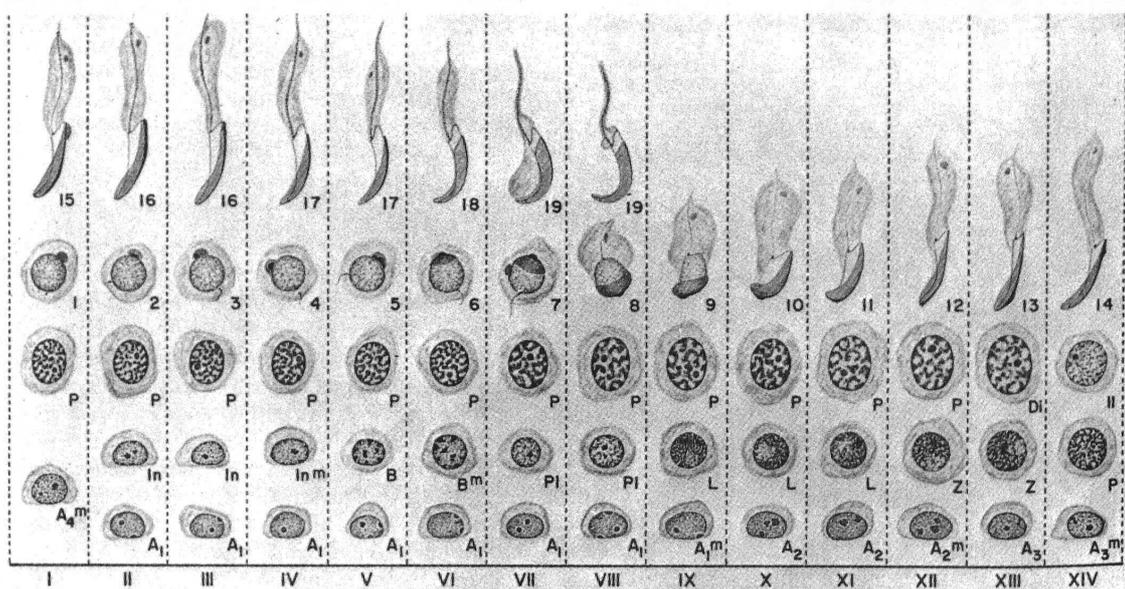
Die Aufbau der Zonulae occludentes zwischen den Sertoli-Zellen beginnt ab dem 14. Lebenstag und führt zur Ausbildung der Blut-Hoden-Schranke, womit die Proliferationsaktivität der Sertoli-Zellen abgeschlossen ist (Steinberger & Steinberger, 1971; Orth, 1982; Russell, 1993). Das Keimepithel enthält ab dem 18. Tag zwei Generationen von Keimzellen (Clermont & Perey, 1957), so dass bei 20 Tage alten Ratten in nahezu allen Tubuli seminiferi pachytäne Spermatocyten zu sehen sind.

Während des gesamten spermatogenetischen Prozesses sind die Keimzellen auf den Zellkontakt mit den Sertoli-Zellen, sowie auf von ihnen sezernierte Faktoren angewiesen (Marziali et al., 1993; Griswold, 1998), da die Rezeptoren für FSH und Testosteron, auf Sertoli-Zellen, jedoch nicht auf Keimzellen exprimiert sind (vgl. 1.2.3).

Dass Keimzellen ohne Sertoli-Zellen nicht existieren können, zeigten Mruk et al. (2006), indem sie spezifisch die Adhäsion zwischen Sertoli-Zellen und Spermatiden auflösten. Dies führte zur Degeneration der Spermatiden und somit zur Infertilität.

### 1.1.3 Stadien der Spermatogenese

Die drei Entwicklungsphasen (Proliferation der Spermatogonien, Meiose, Spermio-genese) sind in den Tubuli seminiferi in charakteristischer Weise gruppiert, den sogenannten Stadien der Spermatogenese (Abb. 2). In Längsrichtung des Keimepithels sind die Stadien regelmäßig hintereinander angeordnet und kennzeichnen auf diese Weise die „spermatogenetische Welle“ (Perey et al., 1961). Der Zeitraum zwischen dem Wiederauftreten des gleichen Stadiums wird als Zyklus des Keimepithels betrachtet. Jedes Stadium hat eine speziesspezifische konstante Dauer, so dass bei der Ratte der komplette Zyklus 12 Tage dauert. Er umfasst 14 Stadien, die sequenziell angeordnet sind, was bedeutet, dass auf Stadium XIV wieder das Stadium I folgt. Der gesamte spermatogenetische Prozess dauert bei der Ratte 56,4 Tage (Leblond & Clermont, 1952; Weinbauer & Wessels, 1999).



**Abb. 2:** Zelluläre Zusammensetzung der 14 Stadien des Differenzierungszyklus am Keimepithel der Ratte. Jede Säule ist mit einer römischen Ziffer gekennzeichnet und stellt die zellulären Bestandteile dar, die an einer bestimmten Stelle im Querschnitt eines Tubulus identifizierbar sind. **A:** A-Spermatogonien; **In:** Intermediär-Spermatogonien; **B:** B-Spermatogonien; **PI:** ruhende Preleptotän-Spermatocyten; **L:** aktive Preleptotän-Spermatocyten; **Z:** Zygotän-Spermatocyten; **P:** Pachytän-Spermatocyten; **Di:** Diplotän-Spermatocyten; **II:** Spermatocyten II. Ordnung; arabische Ziffern bezeichnen Spermatiden in verschiedenen Differenzierungsabschnitten der Spermatogenese. Die Definition der Stadien erfolgt nach Leblond & Clermont (1952).

### **1.1.4 Stadienspezifische Markerproteine**

Während der Reifung von Spermatogonien zu Spermien durchlaufen die Keimzellen eine Reihe von Entwicklungsstadien, in denen jeweils charakteristische Stoffwechselfvorgänge stattfinden. Diese spiegeln sich im jeweiligen Genexpressionsmuster wieder.

Während der Spermiogenese findet eine außergewöhnlich starke Chromatinkondensation statt, was durch den Austausch von Nucleoproteinen ermöglicht wird (Steger, 1999; Dadoune, 2003). Zunächst werden in runden Spermatiden Histone gegen Transition Proteine (TP) ausgetauscht, welche die Integrität der DNA während des Umbaus bewahren (Kierszenbaum, 2001; Boissonneault, 2002). In elongierten Spermatiden werden die Transition Proteine wiederum durch Protamine (Prm) ersetzt, welche die maximale Kondensation des Chromatins ermöglichen (Ward & Coffey, 1991; Braun, 2001). Da die Nucleoproteine in definierten Stadien der Spermiogenese exprimiert werden, ist es möglich, anhand der Expression dieser Proteine das Entwicklungsstadium der Keimzelle zu bestimmen.

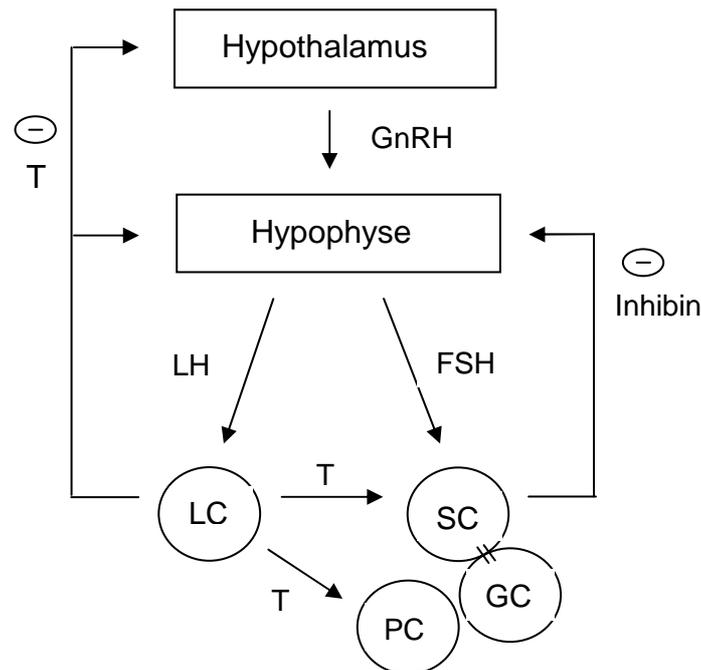
In immaturren Ratten wird die mRNA des TP1 erstmals in runden Spermatiden um den postnatalen Tag 32 exprimiert. Die Expression von TP2-mRNA folgt ab dem postnatalen Tag 34 (Marret et al., 1998). In adulten Ratten werden sowohl die Gene für TP1 und TP2 als auch für Prm1 vom Stadium VII bis zum Stadium XV transkribiert (Mali et al., 1988, Heidaran et al., 1988; Saunders et al., 1992). Die Translation findet etwa 3-7 Tage verzögert statt, wobei zuerst die Transition Proteine 1 und 2 und versetzt dazu Protamin 1 synthetisiert werden (Morales et al., 1991; Steger, 1999).

## **1.2 HORMONELLE REGULATION DER SPERMATOGENESE**

### **1.2.1 Hypothalamisch-hypophysärer Regelkreis**

Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) ist ein Dekapeptid, das pulsatil vom Hypothalamus in das hypothalamisch-hypophysäre Pfortadersystem sezerniert wird. Am Hypophysenvorderlappen bewirkt es die Ausschüttung der gonadotropen Hormone Follikel Stimulierendes Hormon (FSH) und Luteinisierendes Hormon (LH). Die beiden Hormone entfalten ihre Wirkung an ihren jeweiligen Zielzellen im Hoden. Follikel Stimulierendes Hormon wirkt auf die Sertoli-Zellen im Hodentubulus und

Luteinisierendes Hormon auf die Leydigzellen im interstitiellen Kompartiment. Auf den LH-Stimulus hin produzieren die Leydigzellen Testosteron (T), welches als negative Rückkoppelung in der Hypophyse die LH-Sekretion senkt und im Hypothalamus die GnRH-Sekretion und somit die LH- und FSH-Ausschüttung inhibiert. Auf den FSH-Stimulus wird in den Sertoli-Zellen das Glykoprotein Inhibin produziert, welches einen starken inhibierenden Effekt auf die FSH-Sekretion der Hypophyse hat (Abb. 3) (Guyton & Hall, 2000).



**Abb. 3:** Hypothalamisch-Hypophysärer Regelkreis zur hormonellen Regulation des Hodens. **GnRH:** Gonadotropin Releasing Hormon; **LH:** Luteinisierendes Hormon; **FSH:** Follikel stimulierendes Hormon; **T:** Testosteron; **LC:** Leydig-Zellen; **SC:** Sertoli-Zellen; **PC:** Peritubulärzellen; **GC:** Keimzellen

### 1.2.2 Modelle zur Untersuchung der Rolle von Testosteron und FSH in vivo

Die Spermatogenese ist ein komplexer Prozess, der von vielfältigen endo- und parakrinen Faktoren reguliert wird. Schon immer stellte sich die Frage, welche Faktoren essentiell für die Spermatogenese und welche redundant sind, und darüber hinaus, welche Schritte der Spermatogenese durch welche Faktoren reguliert werden. Deshalb wurden eine Fülle verschiedener Modelle entwickelt, denen gemeinsam ist, dass bestimmte Hormone der gonadotropen Achse entfernt und im folgenden wieder substituiert wurden. Somit können die Auswirkungen auf die Spermatogenese im Vorher-Nachher-Vergleich beurteilt werden.

Eines der ersten Modelle zum Entzug der gonadotropen Hormone ist die Hypophysektomie (Clermont & Harvey, 1965; Bartlett et al., 1989; Santulli et al., 1990). Dabei wurde eine Abnahme der Spermatozyten und runden Spermatozyten und ein vollständiges Fehlen der elongierten Spermatozyten festgestellt (Bartlett et al., 1989). Da durch die Hypophysektomie auch weitere Hormone wie Thyreotropin, Somatotropin, Prolaktin etc. entfernt werden, sind die Effekte nicht eindeutig den gonadotropen Hormonen zuzuordnen.

Versuche zur selektiven Entfernung der gonadotropen Hormone wurden mittels Immunisierung gegen GnRH (Madwha & Dym, 1976; Awoniyi et al., 1989; McLachlan et al., 1994a) oder durch Gabe von GnRH-Antagonisten unternommen (Rea et al., 1986; Sinha-Hikim & Swerdloff, 1993; Hikim & Swerdloff, 1995). Die Ergebnisse waren vergleichbar mit denen der Hypophysektomie, womit gezeigt werden konnte, dass die Effekte der Hypophysektomie auf die Spermatogenese, dem Verlust der gonadotropen Hormone zuzuschreiben ist und nicht den weiteren hypophysären Hormonen.

### **1.2.3 Testosteron (T) ist essentiell für die Spermatogenese**

Testosteron entfaltet seine Wirkung über Bindung an den intrazellulären Androgenrezeptor (AR). Dieser wird in Leydig-, Sertoli- und Peritubulärzellen exprimiert, über die Expression in Keimzellen herrscht jedoch Uneinigkeit. Eine Reihe von Arbeitsgruppen konnten keinen AR in Keimzellen nachweisen (Grootegoed, 1977; Anthony et al., 1989; Bremner et al., 1994; Shan et al., 1997), wogegen andere eine AR-Expression in einem oder mehreren Keimzellstadien zeigten (Galena et al., 1974; Wright & Frankel, 1980; Vornberger et al., 1994; Zhou et al., 1996).

Johnston et al. (2001) transplantierten Spermatogonien von AR-defizienten Mäusen auf azoospermische Mäuse mit intaktem AR. Im Empfängertier entwickelte sich eine normale Spermatogenese mit Bildung von Spermatozoen, trotz Abwesenheit des AR in den Keimzellen. Dies legt nahe, dass T seine Wirkung über die somatischen und nicht über die Keimzellen entfaltet.

Um selektiv die Wirkung von T auf die Spermatogenese zu untersuchen, wurden verschiedene Modelle entwickelt. Eines der ersten Modelle ist die Inaktivierung des AR, auch AR-„Knock-out“ (ARKO) genannt. Hierbei kann Testosteron auf die androgensensitiven Gewebe nicht wirken, der Phänotyp entspricht dem vollkommenen Androgen-Resistenz-Syndrom (Wilson, 1992; Quigley, 1995; Yeh et al., 2002). Bei

ARKO-Tieren ist der Einfluss von T auf die Spermatogenese nur eingeschränkt beurteilbar, da schon der Kryptorchismus alleine die Spermatogenese irreversibel schädigt. Wird der AR nur in Sertoli-Zellen (SC) inaktiviert (SCARKO), verläuft die externe Geschlechtsentwicklung normal. In der Spermatogenese ist bei fast normaler Spermatogonienanzahl die Anzahl der Spermatozyten etwa halbiert, runde Spermatoziden sind im Vergleich zum Wildtyp kaum vorhanden und elongierte Spermatoziden fehlen völlig (De Gendt et al., 2004; Chang et al., 2004). Das SCARKO-Modell stützt die Ergebnisse von Johnston et al. (2001), indem es zeigt, dass die Sertoli-Zell-vermittelte Androgenwirkung essentiell für eine vollständige Spermatogenese ist. Desweiteren demonstriert es, dass die Vollendung der Meiose mit der Entstehung haploider Zellen ein androgenabhängiger Schritt ist. Wird der AR selektiv in Peritubulärzellen (PC) inaktiviert, führt dies zu Oligozoospermie, jedoch bei erhaltener Fertilität. Dies zeigt, dass auch die PC eine Rolle in der Vermittlung der Androgenwirkung auf die Spermatogenese spielen (Zhang et al., 2006).

In der durch einen Gendefekt GnRH-defizienten hypogonadalen Maus (hpg-Maus) ist die Spermatogenese im Stadium der pachytänen Spermatozyten arretiert. Durch Substitution von T in der hpg-Maus nahm die Keimzellzahl dosisabhängig zu und wurde die Spermatogenese qualitativ wiederhergestellt (Singh et al., 1995).

Dass T auch für die Entwicklungsschritte der Spermiogenese essentiell ist, zeigen Versuche, in denen intratestikuläres T drastisch reduziert wurde. Dies führte neben einer Reduktion der Keimzellzahl zum Ausbleiben der Elongation und war nach Substitution von T voll reversibel (Mc Lachlan et al., 1994b). O'Donnell et al. (1994) zeigten, dass die Konversion von Spermatoziden zwischen den Stadien VII und VIII ein hochgradig testosteronabhängiger Schritt ist, wobei Kerr et al. (1993) dies auf die Testosteronabhängigkeit von Sertolizell-Membrankomplexen zurückführte. Dies impliziert, dass der Sertoli-Keimzell-Kontakt während der Elongation testosteronabhängig ist.

#### Zusammenfassung zur Rolle des Testosteron in der Spermatogenese

- Die Vollendung der Meiose, sowie die Spermiogenese sind Testosteron-abhängige Schritte der Spermatogenese
- Die Spermatogenese läuft mit Testosteron alleine qualitativ vollständig ab.
- Testosteron alleine kann die Spermatogenese wieder herstellen.

### **1.2.4 Follikel Stimulierendes Hormon (FSH) bestimmt die Kapazität der Spermatogenese**

Follikel stimulierendes Hormon wirkt über den FSH-Rezeptor, welcher im Hoden auf Sertoli-Zellen exprimiert ist. Bei Mäusen mit inaktiviertem FSH-Rezeptor (FORKO) produziert die Spermatogenese signifikant weniger Spermatozoen, ohne dass jedoch ein Arrest vorliegt, so dass die Mäuse, wenn auch vermindert, fertil sind (Krishnamurthy et al., 2000). Im Gegensatz dazu sind Mäuse mit einem LH-Rezeptor-Knock-out (LuRKO) infertil; die Spermatogenese ist hier im Stadium der runden Spermatiden arretiert (Zhang et al., 2001). Dies deckt sich mit den Effekten, die fehlendes T auf die Spermatogenese hat (vgl. 1.2.3).

Hypophysectomierte Ratten mit verminderter Keimzellzahl und fehlender Spermiogenese zeigen nach Substitution von FSH eine Zunahme der Keimzellzahl, die Elongation bleibt jedoch aus (Bartlett et al., 1989). Wird in hpg-Mäusen, die einen Arrest im Stadium der pachytänen Spermatozyten aufweisen, transgenes FSH (tg-FSH) exprimiert, kommt es, im Vergleich zu hpg-Mäusen ohne tg-FSH Expression, zu einer Zunahme der Spermatogonien und Spermatozyten, zur Entwicklung weniger runder Spermatiden, jedoch nicht zur Elongation (Haywood et al., 2003).

#### Zusammenfassung zur Rolle des FSH in der Spermatogenese

- FSH erhöht die Kapazität der Spermatogenese.
- Die Spermatogenese kann ohne Einfluss von FSH qualitativ vollständig ablaufen.
- FSH alleine kann die Spermatogenese incl. Spermiogenese nicht wiederherstellen.

### **1.2.5 Synergismus von Testosteron und FSH**

Die gemeinsame Applikation von T und FSH führte in hypophysectomierten Ratten zu einer quantitativ fast normalen Spermatogenese (Barlett et al., 1989). In hpg-Mäusen führte die kombinierte Behandlung von T und FSH zu einem drastischen (19-fachen) Anstieg der Anzahl der Spermatiden im Vergleich zur Applikation von FSH alleine. Somit erhöhen FSH und T zwar jeweils für sich die Keimzellanzahl der Spermatogenese, ihre volle Potenz entfalten sie jedoch nur bei gleichzeitigem Vorhandensein durch einen synergistischen Effekt (Haywood et al., 2003).

### 1.3 KEIMZELLKULTUR UND IN VITRO-SPERMATOGENESE

Neben den oben beschriebenen in vivo-Experimenten wurden auch zahlreiche Versuche in vitro durchgeführt, um die Regulation der Spermatogenese aufzuklären. Trotz der Bemühungen auf diesem Gebiet, ist es im Gegensatz zur Oogenese (Liu et al., 2001), noch nie gelungen, die vollständige Spermatogenese eines Säugers in vitro ablaufen zu lassen. Dies wird vor allem dem fehlenden Wissen über die exakten biochemischen Konditionen und den komplexen molekularen Regulationsmechanismen zugeschrieben und zeigt deutlich, dass die in vitro-Situation nicht direkt auf die Situation in vivo übertragbar ist. Der bislang größte Erfolg ist die in vitro-Differenzierung primärer Keimzellen der Ratte von leptotänen Spermatozyten zu runden Spermatoziden (Überblick in Staub, 2001 und Sofikitis, 2005).

Im Gegensatz zu Säugern ist es bei niederen Vertebraten gelungen, die Spermatogenese vollständig in vitro ablaufen zu lassen, und zwar beim Aal (Miura et al. 1991; 1996), beim Zebrafisch (Sakai, 2002) und beim Medakafisch (Hong et al., 2004).

Die Untersuchung der Keimzellendifferenzierung in vitro hat einige Vorteile, aber auch prinzipielle Nachteile gegenüber der in vivo-Situation.

**Vorteile:** Die einfache Veränderbarkeit der Temperatur und Atmosphäre, der Zusammensetzung des Mediums mit den zu testenden Faktoren, sowie die Möglichkeit zur Selektierung der Zellarten stellen eindeutige Vorteile dar. Die Versuche sind gut reproduzierbar und mit relativ geringem Aufwand und Kosten durchzuführen.

**Nachteile:** Die zumindest teilweise Zerstörung der Gewebestruktur und der Zellkontakte, die Aufhebung des natürlichen Milieus sowie die suboptimale Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sind offensichtliche Nachteile, die die in vitro-Differenzierung von Keimzellen limitieren.

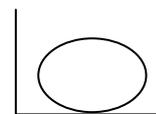
Es gibt verschiedene Systeme zur in vitro-Differenzierung männlicher Keimzellen:

**1. Immortalisierte Keimzelllinien** sind leicht zu handhaben und erlauben häufige Wiederholungen der Experimente unter konstanten Versuchsbedingungen. Jedoch verlieren die Keimzellen durch die Immortalisierung und häufiges Passagieren ihre ursprünglichen Eigenschaften, z. B. die Expression keimzellspezifischer Proteine (Wolkowicz et al., 1996). Feng et al. (2002) berichteten über die Differenzierung

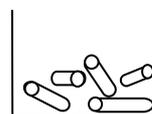
immortalisierter Spermato gonien zu Sperm atiden, jedoch waren diese Ergebnisse nicht reproduzierbar. Bei der Verwendung immortalisierter Keimzellen sind die Ergebnisse also nur sehr bedingt auf die in vivo Situation übertragbar.

**2. Primäre Keimzellen** werden frisch aus dem Hoden isoliert. Ihre Kultivierung ist schwierig, da sie sehr empfindlich sind und nur eine begrenzte Zeit überleben. Dafür besitzen sie alle Eigenschaften nativer Keimzellen. Es gibt prinzipiell drei verschiedene Möglichkeiten, um primäre Keimzellen zu kultivieren:

a) im Organverband, d. h. als ganzer Hoden (Organkultur)



b) im Tubulusverband, d. h. als Tubuli seminiferi



c) als vollkommen dissoziierte Zellen



#### Zu 2a) **Organkultur**

Vorteile der Organkultur sind der Erhalt der ursprünglichen Gewebearchitektur und somit aller Zellkontakte, ein Nachteil jedoch die schlechte Versorgung des Gewebes mit Nährstoffen und Sauerstoff. Die Organkultur eignet sich, um die Proliferation von Spermato gonien und deren Eintritt in die Meiose zu untersuchen und ermöglicht die Differenzierung preleptotäner zu pachytänen Spermato cyten. Die Überlebensfähigkeit der Spermato cyten und Sperm atiden ist jedoch sehr begrenzt (Steinberger et al., 1964; Aizawa & Nishimune, 1979; Boitani et al., 1993), so dass Keimzellen in der Organkultur die Meiose nicht vollständig durchlaufen können (Staub, 2001).

#### Zu 2b) **Kultur von Tubulusfragmenten**

Die Kultur von Tubulusfragmenten vereint zwei Vorteile miteinander, den Erhalt der Gewebearchitektur und die gegenüber der Organkultur verbesserter Versorgung der Zellen mit Medium.

In der ersten Kultur mit Tubulusfragmenten überlebten primäre Spermato cyten für 4 Wochen (Eddy & Kahri, 1976). Somit ist die Differenzierung der Keimzellen in vitro nicht mehr durch ihr Überleben begrenzt. In diesem System konnten pachytäne

Spermatocyten sowohl adulter (Toppari & Parvinen, 1985) als auch immaturer Ratten (Hue et al., 1998) die Meiose in vitro beenden. Staub et al. (2000) beobachteten sogar den Ablauf der gesamten Meiose von leptotänen Spermatocyten bis zu runden Spermatiden in vitro.

#### Zu 2c) **Kultur dissoziierter Zellen**

Bei der Kultivierung dissoziierter Zellen ist die Gewebearchitektur vollkommen zerstört und die Zell-Zell Kontakte aufgehoben, ein Vorteil jedoch ist die optimale Versorgung der Zellen durch das sie direkt umgebende Medium.

Diese Form der Keimzellkultivierung wurde meist als Kokultur mit Sertoli-Zellen durchgeführt, da dies das Überleben der Keimzellen stark verbesserte (Dietrich et al., 1983; Tres & Kierszenbaum, 1983). Orth und Boehm (1990) konnten zeigen, dass Keimzellen und Sertoli-Zellen in Kultur reassoziieren und funktionell miteinander verbunden sind. Pachytäne Spermatocyten können in der Sertoli-Keimzell-Kokultur die Meiose vollenden, was sowohl für immature als auch adulte Zellen gezeigt wurde (Dietrich et al., 1983; Le Maguerresse-Battistoni et al., 1991; Weiss et al., 1997). Jedoch ist das begrenzte Überleben wiederum ein limitierender Faktor für die weitere Differenzierung (Staub, 2001).

## 1.4 APOPTOSE

### 1.4.1 Bedeutung der Apoptose

Die Entstehung komplexer Strukturen in Organismen erfordert neben der Proliferation, Migration und Differenzierung von Zellen auch deren kontrolliertes Absterben, um Zellen selektiv wieder entfernen zu können. Dies geschieht durch den programmierten Zelltod, auch Apoptose genannt. Dies ist ein physiologischer Prozess, der in der Embryonalentwicklung zur Formbildung und Funktionsreifeung beiträgt, aber auch im Erwachsenenalter eine wesentliche Rolle bei der Zustandserhaltung spielt. So kommt ihr eine bedeutende Rolle bei der Onkogenese zu: Zellen mit fehlerhaftem Erbgut werden durch Apoptose vernichtet, eine Störung in der Apoptose kann wiederum zur Entstehung von Tumoren führen (Hengartner, 1997; Höffeler, 2004).

### 1.4.2 Molekulare Mechanismen der Apoptose

Die Definition der Apoptose erfolgte ursprünglich über charakteristische morphologische Veränderungen der apoptotischen Zelle. Diese wurden von Kerr et al. (1972) beschrieben und der Begriff der Apoptose erstmals hierfür geprägt. Diese morphologische Definition ist inzwischen von einer molekularen abgelöst worden, da die Morphologie in verschiedenen Zellarten sehr unterschiedlich sein kann. Die molekularen Mechanismen, die den Zelltod herbeiführen, sind dagegen hochkonserviert und finden sich in ähnlicher Form sowohl bei Menschen und Tieren als auch bei Pflanzen, Pilzen und Protozoen (Hengartner, 1997). Sie bestehen in ihrem Grundgerüst aus den Caspasen, den Proteinen der Bcl-2-Familie und den Mitochondrien (Abb. 3).

**Caspasen** sind substratspezifische Cysteinproteasen. Sie liegen als inaktive Proenzyme vor und werden durch enzymatische Spaltung aktiviert. Am Anfang der apoptotischen Signalwege werden sogenannte Initiatorcaspasen (Caspase-8, -9) aktiviert, die eine kaskadenförmige Aktivierung weiterer Caspasen nach sich zieht. Am Ende der Kaskade stehen Effektorcaspasen (Caspase-3, -6, -7), die als „ausführende Organe“ zum Überleben notwendige zelluläre Proteine spalten (Hengartner, 2000; Slater & Eilers, 2003).

Die **Bcl-2 Familie** besteht aus anti- und pro-apoptotischen Proteinen, die heterodimerisieren und sich so gegenseitig inaktivieren. Anti-apoptotische Proteine wie Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w gehören zum normalen Zellinventar und gewährleisten die Integrität der mitochondrialen Membran. Die pro-apoptotischen Proteine Bid, Bax, Bad

werden erst im Verlauf des apoptotischen Prozesses gebildet und induzieren eine Dysregulation der Mitochondrienmembran. Die Integrität der Mitochondrienmembran hängt somit vom Mengenverhältnis der beiden Subfamilien ab (Tsujimoto & Shimizu, 2000; Slater & Eilers, 2003).

Die **Mitochondrien** enthalten eine Reihe pro-apoptotischer Proteine, die durch Dysregulation der Membran freigesetzt werden. Das wichtigste ist hierbei das Cytochrom C.

Auslöser der Apoptose können sowohl extra- als auch intrazelluläre Faktoren sein, welche entweder einen extrinsischen oder intrinsischen Signalweg aktivieren, die in einer gemeinsamen Endstrecke münden (Höffeler, 2004) (Abb. 4).

**Der extrinsische Weg** wird durch Bindung von Liganden an sogenannte Todesrezeptoren oder durch das Ausbleiben von Überlebenssignalen ausgelöst (Slater & Eilers, 2003). Dies resultiert in der Aktivierung der Procaspase-8. Diese kann nun entweder direkt die Effektorcaspasen-3 oder -6 oder das pro-apoptotische Protein Bid aktivieren, welches zur Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien führt. An dieser Stelle mündet der extrinsische in den intrinsischen Weg.

**Der intrinsische Weg** kann durch diverse Auslöser aktiviert werden, deren wichtigster die Schädigung der DNA ist. Die meisten Stimuli führen über Aktivierung pro-apoptotischer Proteine der Bcl-2 Familie zur Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien. Cytochrom C oligomerisiert mit Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1) und aktiviert die Procaspase-9. Der Cytochrom C-Apaf-1-Procaspase-9-Komplex wird auch als Apoptosom bezeichnet und aktiviert nun die Effektorcaspase-3 (Hengartner, 2000; Wang, 2001).

**Die gemeinsame Endstrecke** beginnt auf der Ebene der Effektorcaspasen. Über den extrinsischen oder intrinsischen Weg werden die Caspasen-3, -6, -7 aktiviert, welche somit eine zentrale Rolle im Signalweg des programmierten Zelltodes einnehmen. Zu den Substraten der Effektorcaspasen gehören Bestandteile des Cytoskeletts, DNA-Reparaturenzyme und der Inhibitor der Caspase-aktivierten Desoxyribonuklease, was zu einer Aktivierung der entsprechenden Desoxyribonuklease und somit zur Fragmentierung der DNA führt (Slater & Eilers, 2003; Höffeler, 2004).

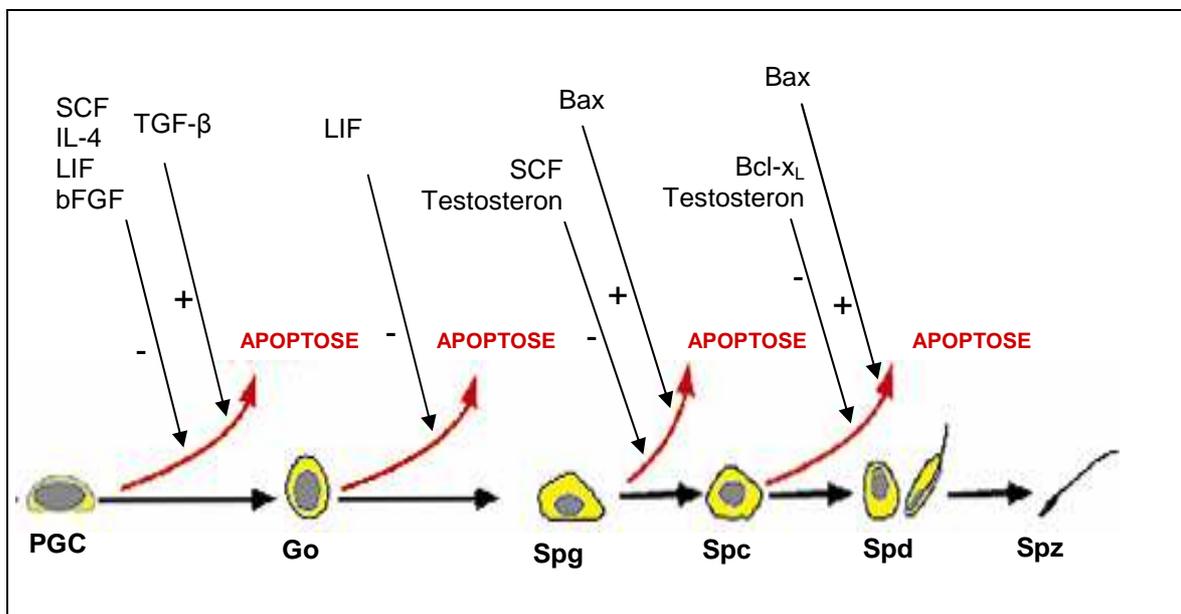


einen massiven Verlust an Keimzellen zur Folge haben (Huckins, 1978; Allan et al., 1987; Hikim & Swerdloff, 1999). Desweiteren sorgt sie für die selektive Beseitigung dysfunktioneller oder geschädigter Keimzellen im Sinne einer „Qualitätskontrolle“, um die Weitergabe fehlerhafter Erbinformation an einen möglichen Nachkommen zu verhindern (Print & Loveland, 2000). Somit ist das Vorkommen apoptotischer Spermatozyten und Spermatoziden im adulten Hoden ein normales Charakteristikum der Spermatogenese (Bartke, 1995; Furuchi et al., 1996).

Darüber hinaus ist die Apoptose bei pathologischen Zuständen, wie z.B. Hormonmangel, Einfluss von Toxinen, Erhöhung der skrotalen Temperatur ein wichtiges Instrument, um die geschädigten Keimzellen zu eliminieren (Hikim et al., 1995; 1997; Blanchard et al., 1996; Lue et al., 1999).

### Faktoren, die die Keimzellapoptose regulieren

Die Entscheidung, ob eine Keimzelle apoptotisch wird, ist über ein komplexes Netzwerk endokriner und parakriner Faktoren, sowie durch Zellkontakte mit den Sertoli-Zellen, reguliert (Abb. 5).



**Abb. 5:** Regulation der Differenzierung (schwarze Pfeile) und der Apoptose (rote Pfeile) durch pro- und anti-apoptotische Faktoren während der ersten Welle der Spermatogenese (Print & Loveland, 2000). **PGC:** primordiale Gonocyten, **Go:** Gonocyten, **Spg:** Spermatogonien, **Spc:** Spermatozyten, **Spd:** Spermatoziden, **Spz:** Spermatozoen

### **Endokrine Faktoren**

Der wichtigste endokrine Faktor zur Regulation der Spermatogenese ist Testosteron (vgl. 1.2.3). Der Entzug von Androgenen führte zur Zunahme apoptotischer Keimzellen im Hoden (Troiano et al., 1994; Brinkworth et al., 1995); in Übereinstimmung hiermit kann die Gabe von Testosteron die Keimzellapoptose in vitro verhindern und ist somit als Überlebensfaktor für die Keimzellen anzusehen (Erkkila et al., 1997) (Abb. 5). Ein weiterer Überlebensfaktor ist das FSH, das auf Keimzellen in kultivierten Tubuli seminiferi ebenfalls anti-apoptotisch wirkte (Henriksen et al., 1996).

### **Parakrine Faktoren und Zell-Zell-Kontakte**

Sertoli-Zellen können auf ihrer Oberfläche den anti-apoptotischen stem cell factor (SCF) und den pro-apoptotischen FasLigand exprimieren. Sie regulieren somit durch Zellkontakte die Apoptose von Keimzellen. Der anti-apoptotische Effekt von FSH wird zumindest teilweise über SCF vermittelt, welches mit dem c-kit Rezeptor auf Keimzellen interagiert und die Apoptose in allen Keimzellstadien reduziert (Yan et al., 2000). Weitere parakrine Faktoren mit anti-apoptotischer Wirkung sind der leukemia inhibitory factor (LIF) (De Felici & Dolci, 1991), Interleukin-4 (IL-4) (Cooke et al., 1996) und bone morphogenetic protein (BMP) (Lawson et al., 1999). Im Kontrast dazu ist Transforming Growth Factor-beta (TGF- $\beta$ ) ein Signalprotein mit pro-apoptotischer Wirkung (Olaso et al., 1998a).

## **1.5 TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA**

Die transformierenden Wachstumsfaktoren-beta (TGF- $\beta$ ) sind eine Gruppe von Cytokinen, die ursprünglich aufgrund ihrer transformierenden Wirkung auf Rattenfibroblasten in Kultur beschrieben und benannt wurden (Roberts & Sporn, 1985). Sie wirken sowohl auto- und parakrin als auch endokrin und regulieren entscheidende Schritte in Proliferation und Differenzierung vieler Gewebe.

### **Struktur**

Bei Säugern gibt es drei TGF- $\beta$ -Isoformen (TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, - $\beta$ 3), deren Aminosäure-Sequenz hochkonserviert ist (Taipale et al., 1998). Über diese definiert TGF- $\beta$  eine Gruppe verwandter Proteine, die TGF- $\beta$ -Superfamilie, welche neben dem TGF- $\beta$  das

bone morphogenetic protein (BMP), Inhibine und Activine und Müllerian inhibiting substance (MIS) beinhaltet. TGF- $\beta$  ist ein homodimeres Protein (Griffith et al., 1996). Es ist kovalent mit einem latency associated peptide (LAP) verknüpft, welches die Rezeptorbindungsstelle maskiert und TGF- $\beta$  somit inaktiviert. Da die TGF-betas ubiquitär sind, muss ihre tatsächliche Verfügbarkeit und Bioaktivität über ein komplexes Zusammenspiel von Mechanismen streng reguliert werden (Roberts, 1998).

### **Rezeptoren und Signaltransduktion**

TGF- $\beta$  vermittelt seine Wirkung hauptsächlich über drei Rezeptoren: TGF- $\beta$ -Rezeptor (T $\beta$ R)-1 und T $\beta$ RII sind Transmembranserin-/threoninkinasen, T $\beta$ RIII ist ein membranverankertes Proteoglycan (sog. Betaglycan).

Die initiale Bindung der Liganden erfolgt meist an T $\beta$ RII, welcher mit T $\beta$ RI assoziiert und diesen transphosphoryliert. Intrazellulär werden Smad-Proteine aktiviert, die in den Kern translozieren und als Transkriptionsaktivatoren wirken (Taipale et al., 1998; Lutz & Knaus, 2002). T $\beta$ RIII bindet die TGF- $\beta$ s und präsentiert sie dem T $\beta$ RII. Eine besondere Bedeutung kommt ihm dadurch zu, dass er eine hochaffine Bindung von TGF- $\beta$ 2 zu T $\beta$ RII induziert, welcher selbst nur eine geringe Affinität für TGF- $\beta$ 2 aufweist (Lutz & Knaus, 2002). Auf Endothelzellen binden TGF- $\beta$ 1 und - $\beta$ 3 an Endoglin (Cheifetz et al., 1992).

### **Zellphysiologische Bedeutung**

TGF- $\beta$  übt vielfältige Wirkungen in verschiedenen Geweben aus, hauptsächlich Inhibition der Proliferation epithelialer, endothelialer und hämatopoetischer Zellen, Stimulation der Proliferation mesenchymaler Zellen, Stimulation der Produktion von Extrazellulärmatrix und Immunsuppression durch antimitogene Wirkung (Taipale et al., 1998). Darüber hinaus sind TGF-betas essentiell bei der Morphogenese und der Apoptose der Keimzellen (Skinner & Moses, 1989; Olausson et al., 1998a).

### **TGF- $\beta$ und Apoptose**

Physiologischerweise wirkt TGF- $\beta$  inhibitorisch auf die Proliferation epithelialer, endothelialer und hämatopoetischer Zellen. Daher kann der Verlust der TGF- $\beta$ -Sensitivität zur Tumorentstehung beitragen (Gold, 1999). Verschiedene Mechanismen ermöglichen den Zellen, sich der inhibitorischen Wirkung von TGF- $\beta$  zu entziehen. Dazu gehört die Inaktivierung von TGF- $\beta$ -Rezeptoren durch Genmutationen, wie sie

beim Kolonkarzinom, Mamma- und Ovarialkarzinom vorkommen kann (Markowitz et al., 1995; Lu et al., 1996; Chen et al., 1998; Wang et al., 2000). Mutationen der Signaltransduktionsproteine verursachen ebenfalls eine reduzierte Empfindlichkeit für TGF- $\beta$  (Hahn et al., 1996). Die überwiegende Zahl der Mutationen betreffen jedoch downstream Proteine der Signalkaskade und ermöglichen es den Tumorzellen, TGF- $\beta$  sogar als Wachstumsfaktor zu nutzen (Siegel & Massagué, 2003). Somit sezernieren Tumorzellen oft selbst TGF-betas und reagieren darauf mit gesteigerter Invasivität und Metastasierung (Oft et al., 1998; Akhurst & Derynck, 2001).

### **TGF- $\beta$ im Rattenhoden**

Die Expression von TGF- $\beta$  im Hoden ist abhängig vom Entwicklungsstadium. Dabei ist die ausgeprägteste Veränderung der TGF- $\beta$ -Expression beim Eintritt in die Spermatogenese zu finden (Mullaney & Skinner, 1993). Im postnatalen Hoden nimmt die Menge an sezerniertem TGF- $\beta$ 1 und - $\beta$ 2 kontinuierlich ab, TGF $\beta$ 3 dagegen weist am Tag 15 nach Geburt einen Peak in seiner Konzentration auf und fällt erst dann ab. Wegen des zeitlichen Übereinstimmens des Konzentrationspeaks und dem Beginn der Spermatogenese wird TGF- $\beta$ 3 eine Rolle bei der Initiation der Spermatogenese zugeschrieben (Mullaney & Skinner, 1993).

Alle Zellarten des Hodens sind in Abhängigkeit von ihrem Differenzierungsgrad an der Produktion der TGF-betas beteiligt (Teerds & Dorrington, 1993; Gautier et al., 1994; Olaso et al., 1997; 1999). Ebenso exprimieren Peritubulär-, Leydig-, Sertoli-Zellen, sowie Keimzellen in verschiedenen Stadien die TGF- $\beta$ -Rezeptoren und stellen somit potentielle Wirkorte für TGF- $\beta$  dar (Le Magueresse-Battistoni et al., 1995; Olaso et al., 1998b; MacConell et al., 2002).

Das Vorkommen von TGF- $\beta$  und seinen Rezeptoren im Rattenhoden weist darauf hin, dass der Hoden nicht allein hormongesteuert ist, sondern auch auto- und parakrin reguliert wird. So spielt TGF- $\beta$  z.B. eine Rolle bei der Morphogenese des Hodens (Skinner & Moses, 1989; Konrad et al., 2000), bei der Regulation der Testosteronsynthese in Leydigzellen (Gautier et al., 1997), der Regulation des Aufbaus der Blut-Hoden-Schranke durch Sertoli-Zellen (Lui et al., 2001; 2003) und der Proliferation und Apoptose von Keimzellen (Hakovirta et al., 1993; Olaso et al., 1998a; Konrad et al., 2006).

## 1.6 KLINISCHE RELEVANZ DER IN VITRO-SPERMATOGENESE

### **Tumorpatienten**

Die Therapie von Tumoren bei jungen Patienten ist heutzutage sehr erfolgreich geworden. Die dabei eingesetzte Chemo- und Strahlentherapie führt jedoch durch Schädigung der schnell proliferierenden Gewebe bei Männern meist zur persistierenden Infertilität. Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit einer zuverlässigen Methode, welche es den Betroffenen ermöglicht, nach Beendigung der Chemotherapie Kinder zu zeugen. Die heutzutage gängige Methode ist die Kryokonservierung von Spermien, die jedoch in nur ca. 1/3 der Fälle tatsächlich zu Nachwuchs führt und nur für postpubertäre Patienten zur Verfügung steht (Blackhall et al., 2002). Erfolgversprechende Experimente wurden mit der Transplantation von Spermatogonien-Stammzellen bei Mäusen (Ogawa et al., 2000; Brinster et al., 2003), Ratten (Hamra et al., 2002) und Ziegen (Honaramooz et al., 2003) durchgeführt. Diese sind jedoch nicht ausgereift und bisher nicht in der Praxis beim Menschen einsetzbar (Orwig & Schlatt, 2005).

Somit besteht weiterhin ein Bedarf an Möglichkeiten, um nach einer Zytostatikabehandlung die Fertilität, vor allem auch bei präpubertären Patienten, wiederherzustellen. Die Entnahme testikulärer Stammzellen mit anschließender in vitro-Differenzierung könnte haploide Samenzellen liefern, welche mit Methoden der assistierten Reproduktion zur Befruchtung von Oozyten verwendet werden kann. Hierbei muss strengstens auf die Abwesenheit von Tumorzellen geachtet werden. Diese Methode setzt jedoch ein funktionierendes System zur Selektierung, Kultivierung und Differenzierung männlicher Keimzellen voraus, wie es in dieser Form zur Zeit noch nicht existiert.

### **Non-obstruktive Azoospermie**

Die non-obstruktive Azoospermie ist eine primäre testikuläre Differenzierungsstörung, die zur Infertilität führt. Dabei kann der Arrest der Spermatogenese in unterschiedlichen Differenzierungsstadien vorliegen (Sofikitis et al., 2005). Ist die Spermatogenese nach der Entwicklung haploider Keimzellen arretiert, können diese Männer mit Hilfe der assistierten Reproduktion Kinder bekommen (Amer et al., 1997; Antinori et al., 1997; Palermo et al., 1998; Sofikitis et al., 1998a). Die häufigste Form der non-obstruktiven Azoospermie weist jedoch einen Arrest während der Meiose im Stadium der Spermatocyten I auf, was bedeutet, dass die betroffenen Männer nicht von den

Methoden der assistierten Reproduktion profitieren können. Auch hier wäre die Entnahme premeiotischer Keimzellen durch eine testikuläre Biopsie mit in vitro-Differenzierung zu haploiden Zellen eine erfolgversprechende Methode. Die Befruchtung von Oozyten mit in vitro erzeugten runden Spermatiden führt jedoch nur in etwa 1/3 der Fälle zur Fertilisierung; bessere Erfolgsraten werden mit elongierten Spermatiden erzielt (Sofikitis et al., 1998b; Cremades et al., 2001; Sousa et al., 2002), jedoch ist die in vitro-Differenzierung zu elongierten Spermatiden noch nicht erfolgreich gelungen (Sofikitis, 2005). Ein weiterer limitierender Faktor dieser Methode sind chromosomale Abnormalitäten, die bei vielen auf diese Weise entstandenen Embryos vorlagen (Sousa et al., 2002).

Vor dem dargestellten Hintergrund des klinischen Einsatzes der in vitro-Spermatogenese, wird deutlich welche enorme Wichtigkeit die Aufklärung der Regulationsmechanismen der Spermatogenese hat. Das Unvermögen, die männliche Keimzellreifung vollständig in vitro ablaufen zu lassen, wird den unzulänglichen Methoden zur Isolierung und Aufreinigung definierter Keimzellpopulationen, sowie den unzureichenden Kenntnissen über die biochemischen und molekularen Regulationsmechanismen des Keimzellüberlebens und der Keimzellendifferenzierung zugeschrieben. Somit trägt jedes Experiment zur Kultivierung und Differenzierung von männlichen Keimzellen zur Aufklärung dieser Mechanismen bei, und bringt uns auf dem Weg zur Erfüllung des Kinderwunsches, z.B. nach keimzellschädigender Therapie oder bei non-obstruktiver Azoospermie, vorwärts.

## 1.7 ZIELSETZUNG

Sobald männliche Keimzellen in die Meiose eintreten, können sie ausschließlich zwei Wege einschlagen, den der Differenzierung oder den der Apoptose (Russell et al., 1987). In der Pubertät ist dies von besonderer Bedeutung, da während der ersten spermatogenetischen Welle eine massive Keimzellapoptose stattfindet, die für eine später funktionierende Spermatogenese essentiell ist (Rodriguez et al., 1997). Diese Entscheidung über Differenzierung oder Apoptose wird durch eine Vielzahl von endokrinen und parakrinen Faktoren reguliert. Zu den entscheidenden endokrinen Faktoren zählen Testosteron und FSH; unter den parakrinen Faktoren gehen wir davon aus, dass in der Pubertät die Transforming growth factor-betas (TGF- $\beta$ s) eine besondere Rolle im Rattenhoden spielen.

Daher war die Zielsetzung meines Projektes die Etablierung eines in vitro-Modells, das sowohl die Untersuchung der Differenzierung als auch der Apoptose von Keimzellen im pubertären Rattenhoden ermöglichen sollte. Bei der Etablierung war besonders zu beachten, dass primäre Keimzellen verwendet werden sollten, da immortalisierte Zellen ihre ursprünglichen Eigenschaften verlieren. Ebenso sollte der Sertoli-Keimzell-Kontakt in dem Kultursystem erhalten bleiben oder in vitro ermöglicht werden, da dieser sowohl für das Überleben, als auch die Differenzierung der Keimzellen essentiell ist.

Dieses in vitro-Modell soll vor allem zur Aufklärung der bisher nur ansatzweise verstandenen Regulationsmechanismen der Spermatogenese beitragen, vor allem der in vitro-Differenzierung männlicher Keimzellen zu Spermien. Bisher ist es in vitro nur gelungen, das Stadium der runden Spermatiden zu erreichen. Ein vollständiges Ablaufen der Spermatogenese in vitro würde jedoch verbesserte Therapiemöglichkeiten zur Erfüllung des Kinderwunsches bei männlicher Infertilität eröffnen. Somit gewinnt die Aufklärung der Regulationsmechanismen der Spermatogenese eine immense klinische Bedeutung.

## 2 Material und Methoden

---

### 2.1 MATERIAL

#### 2.1.1 Gewebe

Das Hodengewebe wurde bei jedem Versuch frisch durch eine inguinale Orchiektomie 20 Tage alter, männlicher Wistar Ratten (Charles River, Sulzfeld) gewonnen. Das Gewicht einer Ratte betrug in der Regel zwischen 35 und 50 Gramm. Da das Gewicht ein Maß für die Entwicklung darstellt und innerhalb einer Lieferung gelegentlich stark variierte, wurden die Hoden von Tieren schwerer als 50 Gramm für die Differenzierungsversuche nicht verwendet. Zum Vergleich wurden auch Hoden von adulten Ratten verwendet. Diese Ratten waren 60 Tage alt und wogen ca. 300 Gramm. Nach Entnahme der Hoden über einen inguinalen Schnitt wurden Nebenhoden und Ductus deferens abpräpariert, der Hoden in 1xPBS (pH 7,4) gewaschen und dann gewogen. Um Keime abzutöten, welche die Organ- oder Zellkultur kontaminieren können, wurde der Hoden mit intakter Tunica albuginea kurz in 1% Iodalkohol getunkt und danach drei mal in sterilem PBS gewaschen. Die Tunica albuginea wurde nun geschlitzt und die Tubuli seminiferi herausgelöst. Jetzt stand der Hoden für die Versuche zur Verfügung. Die Tierversuche wurden mit Genehmigung des Regierungspräsidiums Gießen durchgeführt (VI 63-19c20/15c MR 20/20).

#### 2.1.2 Geräte

- Mikroskop Axiovert 200  
mit AxioCam MRc (Farbversion)  
und Computersoftware MRGrab 1.0  
Carl Zeiss, München
- 96-well-plate Reader, Benchmark Reader  
und Software Microplate<sup>®</sup> Manager Version 5.1  
Bio-Rad, München
- Mikrobiologische Sicherheitswerkbank (Lamin Air)  
Heraeus, Hanau
- Gene Ray UV Photometer  
Biometra, Göttingen
- PTC-200 Peltier Thermal Cycler  
Biozym, Oldendorf

### 2.1.3 Chemikalien / Lösungen

Hier werden nur häufig und versuchsübergreifend verwendete Chemikalien und Lösungen aufgeführt. Alle spezifisch für die jeweiligen Versuche benötigten Chemikalien sind direkt bei den Versuchen aufgeführt.

10x phosphate buffered saline (PBS) pH 7,0	0,01M $\text{KH}_2\text{PO}_4$
Roche, Mannheim	0,1M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
	1,37M NaCl
	0,027M KCl
Bovines Serum Albumin (BSA)	Dade Behring, Marburg
Chloroform	Riedel-de Haen, Seelze
EDTA	Roth, Karlsruhe
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol vergällt, 100%, 96%, 80%, 70%	Apotheke Marburg
Ethanol, absolut	Riedel-de Haen, Seelze
Formalin-Lösung 4%	Uniklinikum Marburg
Isopropanol	Riedel-de Haen, Seelze
10% SDS solution	Gibco, Eggenstein
Pikrinsäure 1,2%	Riedel-de Haen, Seelze
1M Salzsäure	Merck, Darmstadt
Sucrose mind. 99,5%	Sigma, Taufkirchen
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Tween 20	ICN Biochemicals
Xylol	Merck, Darmstadt

Entionisiertes, steriles und analysenreines Wasser wurde mit Hilfe einer Reinstwasseranlage (Sartorius, Göttingen) hergestellt, im folgenden immer mit A. dest. bezeichnet. Für die Zellkultur wurde entweder Aqua ad iniectabilia (Braun, Melsungen) oder A.dest. nach Sterilfiltration mit einem Sterilfilter Porengröße  $0,22\mu\text{m}$  (Millex® GS, Millipore) verwendet. Für molekularbiologische Zwecke wurde autoklaviertes RNase-freies Wasser (Promega, Mannheim) benutzt.

## 2.2 METHODEN

### 2.2.1 Arbeiten mit Organ- und Zellkultur

#### 2.2.1.1 Allgemeines zum Arbeiten mit Organ- und Zellkultur

Beim Umgang mit Zellen muss sehr genau auf Keimfreiheit geachtet werden. Daher wurde unter einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom gearbeitet und sowohl die Hände als auch alle darunter befindlichen Gegenstände mit 70% Ethanol desinfiziert. Der Rand der Mediumflaschen wurde nach dem Öffnen unter der Bank abgeflammt, um dort angesiedelte Keime abzutöten. Alle Zellkulturmedien enthielten 100u/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin (Penicillin/Streptomycin, PAA, Cölbe) und 2,5µg/ml Amphotericin B (PAA), um den Befall der Kulturen mit Bakterien oder Pilzen zu verhindern. Weitere Kontaminationen wurden auch durch den Gebrauch gestopfter Pipetten vermieden.

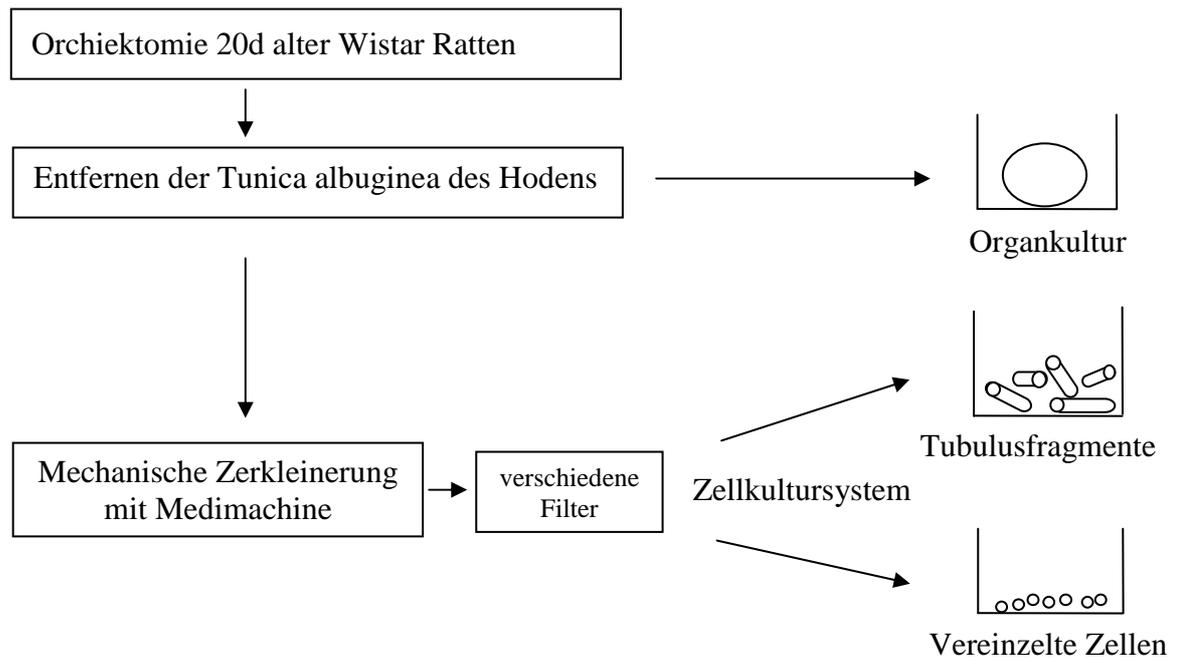
Immortalisierte Zellen wurden in Medium mit 10% fötalem Kälberserum (FKS, PAA) bei 37°C kultiviert, wobei Hodengewebe oder aus dem Hoden isolierte Zellen serumfrei und bei 32°C wuchsen. In beiden Fällen enthielt die Atmosphäre des Brutschranks 5% CO<sub>2</sub>. Zum Waschen der Zellen wurde calcium- und magnesiumfreies, steriles PBS (PAA) verwendet. Vor Gebrauch wurden alle Lösungen auf 37°C erwärmt.

#### 2.2.1.2 Modelle zur Kultivierung testikulärer Zellen

Das Hodengewebe wurde durch Orchiektomie 20 Tage alter Wistar Ratten gewonnen. Die nun folgende Kultivierung des Gewebes erfolgte auf verschiedene Arten (Abb. 6):

Als ganzer Hoden / Organkultursystem: Der Hoden wird nach Entfernung der Tunica albuginea als gesamtes Organ in Kultur genommen. Die Etablierung dieses Kultursystems wurde ausführlich von Keilani (2005) beschrieben.

Als Tubulusfragmente oder vereinzelte testikuläre Zellen (zusammenfassend als Zellkultursystem bezeichnet): Der Hoden wird nach Entfernung der Tunica albuginea mechanisch zerkleinert und die so erhaltenen Zellen kultiviert. Die Methodik ist in den Kapiteln 2.2.1.3 - 2.2.1.8 ausführlich beschrieben.



**Abb. 6:** Modelle zur Kultivierung testikulärer Zellen

### 2.2.1.3 Isolierung primärer Zellen aus Hodengewebe

Das Medimachine-System (Becton Dickinson) ist eine standardisierbare Methode zur mechanischen Disaggregation von Gewebe, bestehend aus drei Komponenten:

1. Medimachine: Sie arbeitet bei ca. 80 rpm.
2. Medicons<sup>TM</sup>: Sie enthalten ein Sieb mit etwa 100 hexagonalen Löchern, in welchen die hindurchgepressten Gewebefragmente von je 6 Mikro-Messern zerkleinert werden und in das Medium am Boden des Medicons fallen. Von dort aus können sie mit einer Spritze abgesaugt werden.
3. Filcons<sup>TM</sup>: Nach der Zerkleinerung des Gewebes wird die Zellsuspension mit einem Filcon gefiltert. Je nach gewählter Porengröße können Zellaggregate, einzelne Zellen oder Zellkerne den Filter passieren, während jeweils größere Bestandteile zurückgehalten werden.

Die Medicons und Filcons wurden stets in einer festen Kombination verwendet (Tab. 1), um bestimmte Anteile des Hodengewebes zu erhalten.

**Tab. 1:** Kombination von Medicons und Filcons (syringe type)

Medicon Porengröße	Filcon Porengröße	Verwendung
35µm	100µm	Isolierung von Zellen und kleineren Zellaggregaten
50µm	500µm	Isolierung von Tubulusfragmenten

Alle Arbeitsschritte wurden unter der mikrobiologischen Sicherheitswerkbank durchgeführt. Ein Medicon konnte für 4 Hoden (ca. 450g Gewebe) verwendet werden. Das Filcon wurde jeweils nach der Filtration von 20ml Zellsuspension erneuert.

### **Arbeitsgang**

Das Hodengewebe wurde vor und nach der Isolierung im Brutschrank bei 32°C in DMEM/F12 (1:1) aufbewahrt. Mit dem Skalpell wurde der zu bearbeitende Hoden in winzige, ca. 10mm<sup>3</sup> große, Stücke geschnitten und mit reichlich Medium befeuchtet.

Ein frisches Medicon wurde zwei mal mit 750µl Medium vorgespült, anschließend mit 4 bis 6 Gewebestückchen und 750µl Medium befüllt, in die Medimachine eingesetzt und diese etwa 45 Sekunden laufen gelassen. Die Zellsuspension wurde mit einer Kanüle (1,1mm Durchmesser) in eine Spritze gesaugt und das Medicon im Anschluss einmal mit Medium nachgespült. Im nächsten Schritt wurde es wieder mit Gewebestückchen und 750µl Medium befüllt.

Wenn die Spritze voll war, wurde die Zellsuspension durch ein vorher angefeuchtetes Filcon langsam in ein 50ml Gefäß (Falcon) filtriert und im Brutschrank aufbewahrt. Diese Schritte wurden so oft wiederholt bis alle Hoden verarbeitet waren.

Danach wurde die gefilterte Zellsuspension 6 min bei 600 rpm zentrifugiert, das Pellet resuspendiert und die Zentrifugation wiederholt. Das Pellet wurde nun in der gewünschten Menge Medium aufgenommen und auf die benötigte Anzahl von Wells verteilt. Die Kultivierung testikulärer Zellen erfolgte stets bei 32°C und 5% CO<sub>2</sub>.

#### **2.2.1.4 Vitalitätsfärbung und Zellzählung**

Nach der Isolierung wurden 10µl Zellsuspension mit 90µl Trypan Blau Lösung (ICN Biomedicals) gefärbt. Der Farbstoff dringt nur in tote Zellen ein, lebende Zellen mit intakter Zellmembran bleiben ungefärbt.

Eine Neubauer-Zählkammer wurde mit gefärbter Zellsuspension gefüllt und die ungefärbten Zellen in 4 Groß-Quadraten gezählt. Aus dem Mittelwert wurde, aufgrund des eingefüllten Volumens von 0,1µl, die Zellzahl in der Ausgangssuspension mit folgender Formel bestimmt: Mittelwert x 10<sup>4</sup> = Zellzahl/ml Zellsuspension. Der Verdünnungsfaktor der Trypan Blau Lösung muss anschließend durch Multiplikation mit 10 herausgerechnet werden.

### 2.2.1.5 Anreicherung von Sertoli-Zellen

Die Anreicherung von Sertoli-Zellen aus einer Zellsuspension aller testikulärer Zellen, wie man sie nach Isolierung mit der Medimachine erhält, erfolgte nach Buzzard et al. (2002). Die Zellsuspension wuchs 48 bis 72 h in DMEM/F12 1:1 mit 400IE/l rekombinantem humanem FSH (rhFSH, Puregon, Organon) in unbeschichteten Zellkulturflaschen (Greiner) an. Dabei wuchsen die Peritubulärzellen als Monolayer auf dem unbehandelten Material an, während die Sertoli-Zellen eher Zellaggregate bildeten und nur leicht anhefteten. Die Sertoli-Zellaggregate konnten nun durch leichtes Antippen der Kulturflasche abgelöst, mit dem Überstand abgesaugt und auf lamininbeschichtete Flaschen ( $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , Sigma) ausgesät werden.

### 2.2.1.6 Anreicherung von Keimzellen

Die Keimzellen wurden durch immunmagnetische Separation angereichert. Dazu benutzten wir folgende Materialien:

- Dynabeads<sup>R</sup> M-450 Epoxy, Dynal Biotech
- Ziege anti-Maus SCF-R/c-kit R&D Systems
- 0,1M Phosphatpuffer, pH 7,4 besteht aus 0,2M NaH<sub>2</sub>-Phosphat, 19ml  
0,2M Na<sub>2</sub>H-Phosphat, 81ml  
100ml A. dest.

### Prinzip der immunmagnetischen Separation

Die Dynabeads<sup>R</sup> M-450 sind magnetische Kügelchen mit einem Durchmesser von  $4,5\mu\text{m}$ , die mit Antikörpern oder anderen Liganden beschichtet werden können. Mit Hilfe der Dynabeads kann eine beliebige Zellart, gegen die man einen Antikörper besitzt, aus einem heterogenen Zellgemisch isoliert werden.

Wir verwendeten einen Antikörper, der spezifisch gegen ein Epitop von c-kit gerichtet war, beschichteten die Dynabeads damit und inkubierten diese mit einem Gemisch frisch isolierter testikulärer Zellen. Dabei band der Antikörper auf den Dynabeads an den c-kit-Rezeptor, welcher auf den Keimzellen exprimiert ist. Durch Anlegen eines Magnetfeldes konnten die Dynabeads und somit auch die Keimzellen aus dem Gemisch isoliert werden.

**A) Waschen der Beads**

Um die Dynabeads zu resuspendieren, wurde der Behälter 2 min geschüttelt und 250 $\mu$ l (entsprechend  $10^8$  Beads) sofort in ein Reagenzglas pipettiert. Das Reagenzglas wurde 60 sec in einem Magnethalter platziert, der Überstand abpipettiert, das Reagenzglas wieder aus dem Magnethalter entfernt, reichlich 0,1M Phosphatpuffer zugegeben und 2 min geschüttelt. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt und die Dynabeads beim letzten Mal in 550 $\mu$ l Phosphatpuffer aufgenommen. Jetzt waren die Dynabeads bereit zum Beschichten.

**B) Beschichten der Beads**

Es werden folgende Konzentrationsverhältnisse in der endgültigen Beschichtungs-Lösung empfohlen:

- Salz-/Pufferkonzentration > 0,05M
- 4 - 8 x  $10^8$  Beads/ml
- 5 $\mu$ g AK/ $10^7$  Beads

Um eine homogene Suspension zu erhalten, wurden die Dynabeads in 550 $\mu$ l Phosphatpuffer für 1 min gemischt und 250 $\mu$ l in Phosphatpuffer gelöster anti-c-kit Antikörper (50 $\mu$ g) dazugegeben. Die Dynabead-Antikörper Mischung inkubierte 20 h bei 4°C und 20 Umdrehungen/min auf einem Rotator (Labinco, Radius 9cm, Gerlinde Kisker). Nach 30 min wurden 200 $\mu$ l 2,5% BSA (Endkonzentration 0,5%) als Blockierungsprotein hinzugegeben.

Nach der Beschichtung wurde das Reagenzglas in einen Magnethalter gestellt und der Überstand, der die ungebundenen Antikörper enthält, entfernt. Anschließend folgten drei Waschschriffe in PBS mit 0,5% BSA bei 4°C. Beim letzten Waschen wurden die Beads in einem definierten Volumen aufgenommen. Sie waren nun gebrauchsfertig und bei 2°C bis 8°C mehrere Monate haltbar.

**C) Isolierung der Keimzellen**

Die primären testikulären Zellen wurden mit der Medimachine (vgl. 2.2.1.3) präpariert, die zu isolierende Keimzellzahl geschätzt und das Zellgemisch langsam auf 2°C bis 8°C heruntergekühlt. Die mit anti-c-kit beschichteten Dynabeads ( $10^8$ ) wurden zu 4ml Zellsuspension ( $2 \times 10^6$ /ml) gegeben, so dass ein Verhältnis von 12,5 Beads pro Zelle vorlag (idealer Bereich: 4 - 50 Beads pro Zelle). Das Gemisch inkubierte für 20 min bei 4°C und 20 Umdrehungen/min auf dem Rotator. Im Magnethalter erfolgte anschließend

die Entfernung der ungebundenen, in Lösung vorliegenden Zellen. Die an die Antikörper und somit an die Beads gebundenen Zellen wurden in PBS mit 0,5% BSA resuspendiert, 4 bis 6 mal gewaschen und samt Beads im Medium nach Staub (vgl. 2.2.2.2) kultiviert.

Nach gelungener Isolierung sollte die Zellablösung aufgrund von Antigen-turnover durch Inkubation über Nacht erfolgen. Dabei stören die Dynabeads die Proliferation nicht, proliferierende Zellen überwachsen die Beads.

### **2.2.1.7 Zellkultur mit Extrazellulärmatrix (ECM)**

Testikuläre Zellen wurden, alternativ zur Kultivierung auf Zellkulturplastik, auf und in Extrazellulärmatrix (Matrigel<sup>TM</sup>, BD) kultiviert, um morphologische Unterschiede zu untersuchen. Bei der Kultivierung auf ECM wurden die wells einer 12-well Platte mit 400µl eiskaltem Matrigel beschichtet, eine halbe Stunde bei 37°C gehärtet und dann ca. 10<sup>5</sup> Zellen in 2ml Medium daraufgegeben. Bei Kultivierung in ECM wurden ca. 10<sup>5</sup> Zellen in 400µl Medium mit 400µl eiskaltem Matrigel gemischt und mit 2ml Medium überschichtet. Um die Zellen wieder aus der ECM herauszulösen, wurde MatriSpere Cell Recovery Solution (Becton Dickinson) verwendet. Bei 2°C bis 8°C depolymerisiert sie die ECM ohne enzymatischen Verdau.

Vorbereitend wurden die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Gelschicht wurde in ein Falcon überführt und 2ml Cell Recovery Solution pro 12,25cm<sup>2</sup> Kulturfläche zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei 4°C wurden nochmals 1 bis 2ml zugegeben, das Falcon geschwenkt und weitere 30 min bis 1 h inkubiert. Das Absetzen der Zellen auf dem Boden des Falcons zeigte das Herauslösen aus der Matrix an. Nach vollständiger Verflüssigung des Gels wurde 5 min mit 800rpm bei 4°C zentrifugiert und das Pellet anschließend noch zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Nun konnten die Zellen weiter aufgearbeitet werden.

### **2.2.1.8 Einbettung der Tubulusfragmente und Zellaggregate**

Dieser Arbeitsschritt erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Anatomie und Zellbiologie Marburg (AG Georg Lüers).

Die Tubulusfragmente und Zellaggregate wurden aus dem Medium in 4% Paraformaldehyd, 0,15M HEPES, pH 7,4 überführt und für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden sie bei 1000 x g in einer Zentrifuge sedimentiert und in 1xPBS gewaschen. Nach wiederholter Zentrifugation wurden die Fragmente in

flüssiger, warmer Agarose (2% in 1xPBS) resuspendiert und durch deren Polymerisation bei RT eingebettet. Kleine Agaroseblöckchen ( $\varnothing \sim 2$  mm) wurden nun in ein bereits fixiertes, invertiertes Dünndarmfragment der Maus überführt und auf beiden Seiten mit Nähgarn abgebunden. Die so in Agarose und Darm eingeschlossenen Tubulusfragmente ließen sich ohne weiteren Gewebeverlust in Paraffin einbetten. Dazu wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und anschließend für 24h in Zedernöl (Merck, Darmstadt) inkubiert. Danach konnten sie in 62°C warmes flüssiges Paraffin (Vogel histo com, Giessen) eingebettet werden.

## 2.2.2 Aufbau der Zellkulturversuche mit primären Keimzellen

### 2.2.2.1 Untersuchung der TGF- $\beta$ -induzierten Apoptose

- Rekombinantes humanes TGF- $\beta$ 1 PAN (Aidenbach)
- Rekombinantes humanes TGF- $\beta$ 2 PAN (Aidenbach)
- Pentacosapeptid, bestehend aus AS 41 bis 65 von TGF- $\beta$ 2 (Huang et al., 1997)  
Sequenz: ANFCAGACPYLWSSDTQHTKVLISLY,  
synthetisiert von Seqlab (Göttingen)
- Bouin'sche Lösung (15 Teile Pikrinsäure, 5 Teile Formalin, 1 Teil Eisessig)

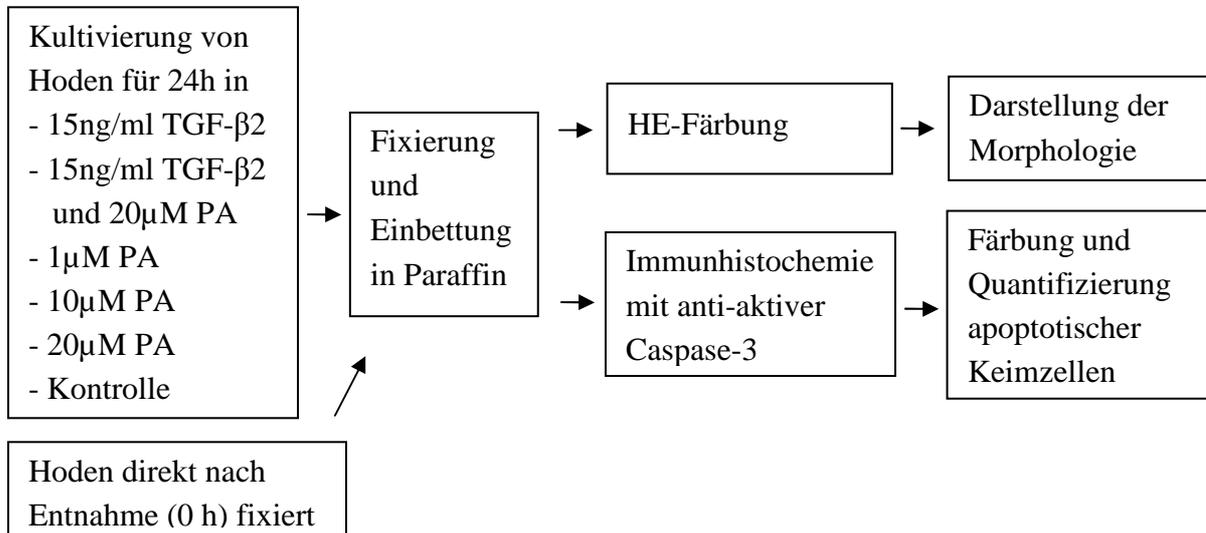
Der Einfluss von TGF- $\beta$ 1 und / oder - $\beta$ 2 auf die Keimzellapoptose wurde sowohl im Organkultursystem als auch im Zellkultursystem untersucht. Das Grundmedium bestand aus DMEM/F-12 (1:1; PAN), dem für jeden Versuch frisch 10mg/l Gentamycinsulfat (Sigma), 60mg/l G-Penicillin (Sigma), 1g/l BSA (Sigma) und 0,1mM 3-isobutyl-1-methylxanthin (Sigma) zugefügt wurde (Yan et al., 2000).

#### a) Organkultur

Nach Entfernung der Tunica albuginea wurden die Hoden einzeln in 12-well Platten in 3ml Medium für 24 h mit folgenden Zusätzen kultiviert:

- TGF- $\beta$ 2 (15ng/ml)
- Peptidantagonist (PA) (1-20 $\mu$ M)
- TGF- $\beta$ 2 (15ng/ml) und Peptidantagonist (20 $\mu$ M)
- Kontrolle (Medium ohne Zusätze)

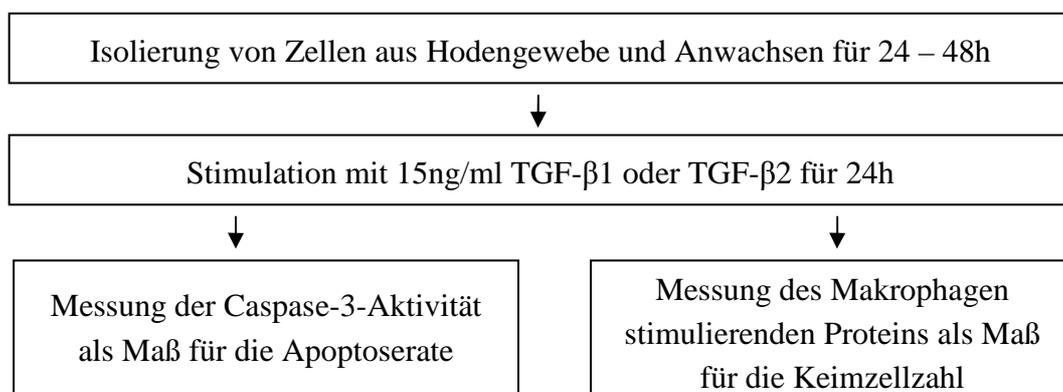
Anschließend wurden die Hoden in Bouin-Lösung über Nacht fixiert, entwässert und in Paraffin eingebettet. Die Gewebelöcke standen nun für eine HE- oder anti-aktive Caspase-3-Färbung zur Verfügung. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 7 dargestellt.



**Abb. 7:** Untersuchung TGF-β-induzierter Apoptose in Organkultur

## b) Zellkultur

Im Anschluss an die Isolierung primärer testikulärer Zellen (vgl. 2.2.1.3) wurden diese 24 bis 48 h anwachsen gelassen und dann für 12 h oder 24 h mit 15ng/ml TGF-β1 oder -β2 stimuliert. Als Positivkontrolle dienten HeLa Zellen, die für 3 h mit 1μM Staurosporine (Sigma) in DMSO behandelt worden waren. Anschließend wurde die Apoptoserate anhand der Caspase-3 Aktivität (vgl. 2.2.6) und die Anzahl der Spermatogonien und Spermatozyten anhand der MSP-Konzentration (vgl. 2.2.7) versus un behandelter Kontrolle gemessen. Der Versuchsablauf geht aus Abbildung 8 hervor.

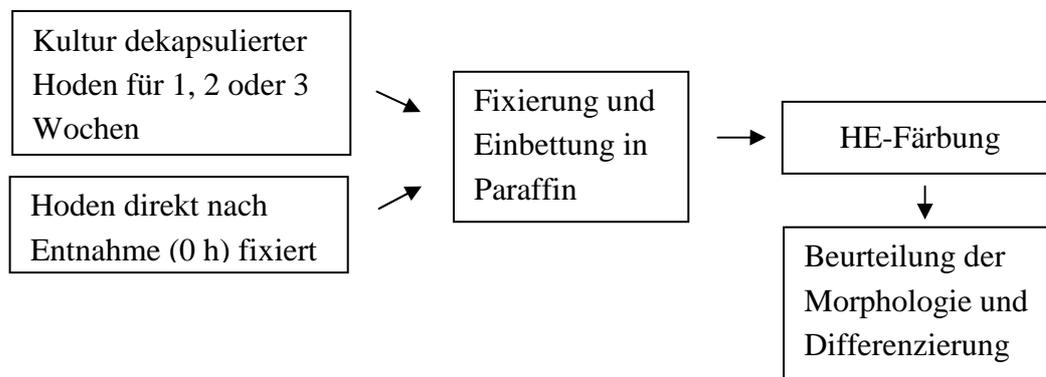


**Abb. 8:** Untersuchung TGF-β-induzierter Apoptose in Zellkultur

### 2.2.2.2 Untersuchung der Differenzierung

#### a) Organkultur

Die Hoden wurden für 1 bis 3 Wochen in speziell von der Firma PAN Biotech nach der Publikation von Staub et al. (2000) angefertigtem serumfreien Medium kultiviert. Gleich zu Beginn und nach jeder Woche in Kultur wurde ein Hoden in Bouin Lösung fixiert und zur Beurteilung der Morphologie und Differenzierung eine HE-Färbung durchgeführt. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 9 dargestellt.



**Abb. 9:** Untersuchung der Keimzellendifferenzierung in Organkultur

Medium nach Staub et al. (2000):

Grundmedium	DMEM/F12	
	mit 15mM Hepes und 1,2g/l Bicarbonat	
Antibiotika	Gentallin	20µg/ml
	Nystatin	20u/ml
Sonstige Zusätze	Insulin	10µg/ml
	Transferrin	10µg/ml
	Vitamin C	10 <sup>-4</sup> M
	Vitamin E	10µg/ml
	Retinol	3,3 x 10 <sup>-7</sup> M
	Retinolsäure	3,3 x 10 <sup>-7</sup> M
	Pyruvat	10 <sup>-3</sup> M
	Testosteron	10 <sup>-7</sup> M
	O(vine) FSH	1ng/ml (Sigma)

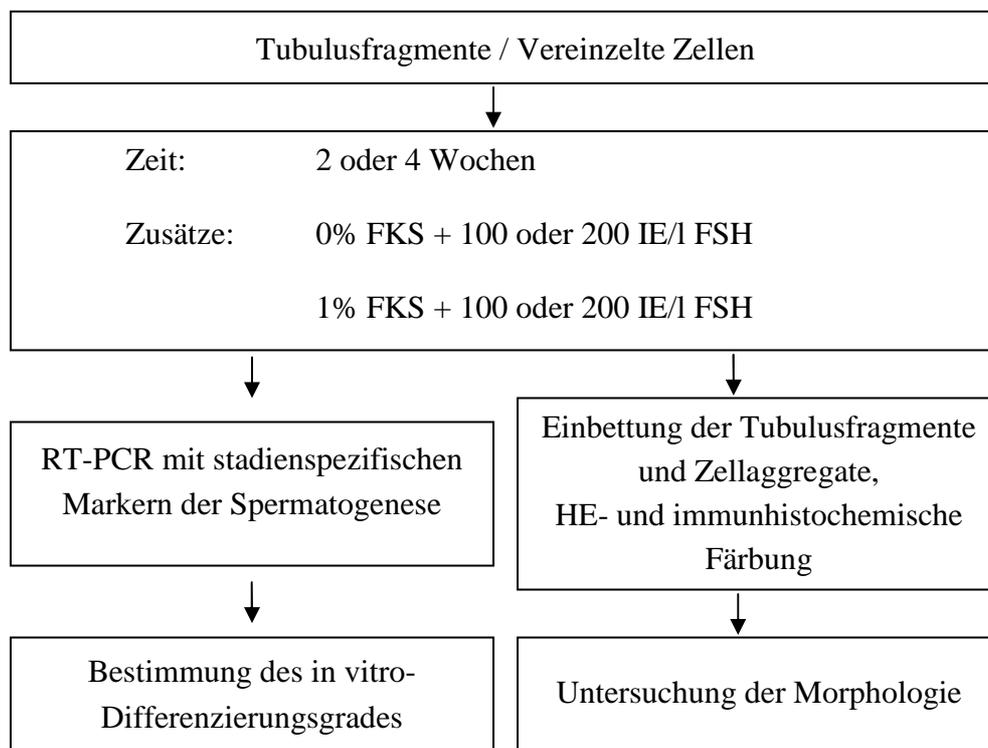
## b) Zellkultur

Im Anschluss an die Isolierung primärer testikulärer Zellen (vgl. 2.2.1.3) wurden die vereinzelt Zellen in Zweikammersystemen mit Inserts (0,4µm Porengröße, Falcon™) und die Tubulusfragmente in Einkammersystemen kultiviert.

Zweikammersysteme bestehen aus einer Kammer („Insert“) mit durchlässiger Bodenmembran, die in ein Zellkulturwell eingehängt wird. Das Medium wird in das Zellkulturwell gefüllt und nur dort gewechselt. Durch die Bodenmembran des „Inserts“ gelangt das Medium in das „Insert“, in dem sich die Zellen befinden. In einem solchen Zweikammersystem konditionieren die kultivierten Zellen das umgebende Medium, wodurch sie ihr eigenes Milieu schaffen, welches sonst bei jedem Mediumwechsel verloren ginge.

Zur Stimulation der Differenzierung wurden das Grundmedium DMEM/Ham's F12 (1:1; mit L-Glutamine, 15mM Hepes, 1,2g/l NaHCO<sub>3</sub>, PAN) mit folgenden Zusätzen erweitert (jeweils frisch zugegeben):

- |                                      |                    |         |
|--------------------------------------|--------------------|---------|
| • Testosteron                        | 10 <sup>-7</sup> M | Sigma   |
| • Pyruvat                            | 1mM                | Sigma   |
| • Fötale Kälberserum (FKS)           | 0% oder 1%         | PAA     |
| • rekombinantes humanes FSH, Puregon | 100 / 200IE/l      | Organon |



**Abb. 10:** Versuchsaufbau der Untersuchung der Keimzellendifferenzierung in Zellkultur

### **2.2.3 Kultivierung immortalisierter Zellen**

Helen Lancey (HeLa) Zellen wurden in DMEM „high glucose“ (mit 4,5g/l Glucose, L-Glutamine, 25mM Hepes, Na-Pyruvat, 3,7g/l NaHCO<sub>3</sub>) bei 37°C kultiviert.

#### **Auftauen immortalisierter Zellen**

Der Auftauprozess muss möglichst schnell vonstatten gehen. Dazu wurden die Zellen im Kryocup direkt aus dem Stickstoff (-196°C) ins Wasserbad von 37°C befördert. Sobald sie aufgetaut waren, wurden die Zellen in ein Falcon mit 25ml Medium gegeben und 8 bis 10 min bei 48 g zentrifugiert, um das DMSO zu beseitigen. Das Pellet wurde in 1ml Medium resuspendiert und zum Anwachsen vorzugsweise in eine 25cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit 8 bis 10ml Medium gegeben.

#### **Mediumwechsel**

Das Medium wurde möglichst vollständig mit der Pipette abgesaugt, die Zellen mit warmem, calciumfreien Zellkultur-PBS bedeckt und geschwenkt, dieses wiederum abgesaugt und frisches Medium dazugegeben.

#### **Passagieren der Zellen**

Zum Passagieren wurde das Medium der Zellen abgesaugt und die Zellen mit warmem Zellkultur-PBS gewaschen. Nach Abziehen des PBS wurden 500µl 1x Trypsin-EDTA-Lösung (PAA) auf die Zellen gegeben und diese in den Brutschrank bei 37°C gestellt. Die Inkubation dauerte, je nach Zellart, 1 bis 5 min und wurde beendet, wenn sich die Zellen bei leichtem Klopfen von der Platte lösten. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 25ml Medium, welches dann in ein Falcon überführt und bei 48 x g für 8 bis 10 min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1ml Medium aufgenommen und in den gewünschten Verdünnungen auf die neuen Zellkulturflaschen verteilt.

#### **Einfrieren immortalisierter Zellen**

Einzufrierende Zellen wurden passagiert und durch 10-minütige Zentrifugation pelletiert. Das Pellet wurde in 900µl Medium aufgenommen, die Zellsuspension in ein Kryocup gegeben und 2 bis 3 h im Kühlschrank auf 4°C heruntergekühlt. Danach erfolgte die Zugabe von 900µl 20% DMSO (1:5 mit Medium verdünnt), um die

Eiskristallbildung beim Einfrieren zu verhindern. Dann wurden die Zellen 1°C pro Stunde bis auf -80°C heruntergekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff (-196°C) aufbewahrt. Um das langsame Abkühlen zu ermöglichen, wurde das Kryocup in Alufolie gewickelt und in einem Styroporkasten geschützt, in den Gefrierschrank bei -80°C gestellt.

## **2.2.4 Histologische Methoden**

### **2.2.4.1 Herstellung der Paraffinschnitte**

Aus dem in Paraffin eingebetteten Gewebe wurden mit einem Rotationsmikrotom (Leitz, Wetzlar) 5µm dünne Schnitte anfertigt. Diese wurden in 40°C warmes Wasser überführt und auf sialinisierte Objektträger (Superfrost® Plus, Menzel-Gläser) aufgenommen. Anschließend wurden sie zur Trocknung und Anheftung auf dem Objektträger über Nacht in den Trockenschrank bei 37°C gestellt.

Vor der jeweiligen Färbung erfolgte die Entparaffinierung mit Xylol für 3x5 min, anschließend die Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe und Waschung in A.dest. und 1xPBS für jeweils 5 min. Danach konnten die HE- und immunhistochemischen Färbungen durchgeführt werden. Anschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und nach 2x5 min Inkubation in Xylol mit Entellan (Merck) eingedeckelt.

### **2.2.4.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE-Färbung)**

Um die Morphologie des Hodengewebes in den jeweiligen Versuchen zu beurteilen, wurden die Gewebeschnitte nach Hämatoxylin-Eosin angefärbt. Dazu wurde Mayers Hämalaunlösung (Merck) und Eosin G (Merck) verwendet. Mayers Hämalaunlösung war gebrauchsfertig, das Eosin wurde als 1%ige wässrige Lösung verwendet und mit einem Tropfen Eisessig angesäuert.

Die entparaffinierten Schnitte färbten etwa 10 min in Hämalaun und wurden anschließend 10 min in Leitungswasser gebläut. Die Färbung in Eosin erfolgte für 5 bis 7 min. Die folgende Dehydrierung und Eindeckelung wurde wie in 2.2.4.1 beschrieben durchgeführt.

### 2.2.4.3 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen wurden in drei Schritten mit dem EnVision™ Detektionssystem (DAKO) durchgeführt:

1. Der Primärantikörper (Tab. 2) bindet das Epitop, gegen das er gerichtet ist.
2. Der Sekundärantikörper (Tab. 3) bindet an den speziesspezifischen Fc-Teil des Primärantikörpers. Beim EnVision-System (DAKO) ist an den Fc-Teil des Sekundärantikörpers ein Dextranpolymer gebunden, welches eine große Zahl an Meerrettich-Peroxidasen trägt und somit das Signal um ein Vielfaches verstärkt. Hierdurch wird die Hintergrundfärbung herabgesetzt und der Einsatz des Primärantikörpers in geringen Konzentrationen ermöglicht.
3. Als Chromogen wurde 3,3-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB) verwendet. Es wird von der Peroxidase zu einem braunen, unlöslichen Farbstoff oxidiert, der nun das vom Primärantikörper erkannte Antigen markiert.

Für die Primärantikörper (Tab. 2) wurden die optimalen Antikörperkonzentrationen durch Verdünnungsreihen auf immatorem und adultem Hodengewebe der Ratte ermittelt. Die Verdünnung des Erstantikörpers erfolgte in Antibody Diluent (DAKO).

**Tab. 2:** Primärantikörper

Primärer Antikörper	Art	Verdünnung	Produzent	gerichtet gegen	Firma
Anti-aktive Caspase-3	monoklonal	1:60	Kaninchen	Mensch, Maus	BD Pharmingen
Anti-c-kit	polyklonal	1:150	Ziege	Maus	Santa Cruz
Anti-alpha smooth muscle actin	monoklonal	1:1000 - 1:2000	Maus	Mensch	Sigma
Anti-Mullerian inhibiting substance	polyklonal	1:500	Ziege	Mensch	Santa Cruz
Anti-Stem cell factor	polyklonal	1:50 - 1:1500	Kaninchen	Mensch	Santa Cruz
Anti-Transition Protein 1	polyklonal	1:100	Kaninchen	Mensch <sup>1</sup>	Steger (Gießen)
Anti-Protamin 1	polyklonal	1:50	Ziege	Maus	Santa Cruz
Anti-OSP/Claudin-11	polyklonal	1:100	Kaninchen	Maus	Zymed

<sup>1</sup>Der TP1-AK ist gegen die menschliche TP1-Sequenz AS 25-33: KSRKRGDDAN gerichtet.

**Tab. 3:** Sekundärantikörper

Sekundärer Antikörper	Verdünnung	Firma
Anti-rabbit envision labelled polymer	gebrauchsfertige Lösung	DAKO
Anti-mouse envision labelled polymer		DAKO
Anti-goat universal immuno-peroxidase polymer (Histofine)		Medac

### Standard Arbeitsgang

Die Gewebeschnitte durchliefen die Entparaffinierung und Rehydrierung wie in 2.2.4.1 beschrieben und wurden 3x5 min in 1xPBS gewaschen. Um die endogene Peroxidaseaktivität des Gewebes auszuschalten, wurden die Schnitte 20 min in 1xPBS mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck) inkubiert und dann 3x5 min in 1xPBS gewaschen. Die Demaskierung der Antigene erfolgte durch Anwendung von Hitze. Die Schnitte wurden standardmäßig bei 94°C in einem Kocher (Dampfgarer Multigourmet, Braun) in Target Retrieval Solution (pH 6,1; DAKO) für 30 min erhitzt oder alternativ in einer Mikrowelle in 10mM Natrium-Citratpuffer (pH 6) 3x5 min bei 600 Watt gekocht und anschließend 20 min bei RT abgekühlt. Nach erneutem Waschen für 3x5 min in 1xPBS wurden die Schnitte 20 min in 1xPBS mit 2% Magermilchpulver (Fluka) inkubiert, um unspezifische Bindung der Antikörper zu verringern.

Nach Abklopfen der Magermilch erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen Primärantikörpern (Tab. 2) in einer feuchten Kammer für 60 min bei RT. Anschließend wurde 3x5 min in PBS gewaschen, um ungebundene Primärantikörper zu entfernen. Nun wurden die Schnitte 30 min mit dem peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper (Tab. 3) inkubiert, der ebenfalls durch Waschen in PBS für 3x5 min entfernt wurde. Die Substratlösung (1:50 Verdünnung von DAB-Substrat in DAB-Diluent) wurde auf die Schnitte gegeben und 2 bis 10 min im Dunkeln belassen. Nach mikroskopischer Kontrolle wurde die Reaktion durch Spülen mit A. dest. beendet, die Schnitte nochmals 3x5 min in PBS gewaschen und anschließend mit Hämalaun (1:2 verdünnt) 1 bis 3 min gegengefärbt und 3 min in Leitungswasser gespült. Zum Schluss wurden sie wie in 2.2.4.1. beschrieben dehydriert und mit Entellan® (Merck) eingedeckelt.

### Arbeitsgang für Protamin 1

Um eine immunhistochemische Färbung von Protamin 1, eines sehr eng mit dem Chromatin assoziierten Proteins, durchführen zu können, war eine ausgiebigere Demaskierung als bei der Standardmethode notwendig.

- 
- Proteinase K-Puffer, pH 8,0 100mM Tris, 50mM EDTA
  - SDS/DTT/EDTA-Lösung 0,5ml 10% SDS, 385,5mg DTT in 50ml 0,5M EDTA-Lsg. und 50ml 0,1M Tris (pH 8,4 - 8,6)
  - DNase I (Promega) 40u/ml 2ml 0,05M Tris, 20µl 1M MgCl<sub>2</sub>, 80u DNase I (Promega)
  - Blockierungslösung 8g Magermilchpulver (Fluka) in 100ml 0,5M Tris, 200µl Triton X-100 (pH 7,2 - 7,4)

Zuerst wurde eine Hitzedemaskierung in der Mikrowelle wie im Standard Arbeitsgang durchgeführt und die Schnitte nach dem Abkühlen 3x5 min in 1xPBS gewaschen. Nun erfolgte eine Inkubation in 5M Harnstoff-Lösung (pH 8,5-9,0) für 10 min bei RT und nach kurzem Abwaschen in 1xPBS eine enzymatische Behandlung mit 1µg/ml Proteinase K für 30 min bei 37°C. Die Verdünnung wurde auf Eis mit Proteinase K-Puffer hergestellt und die Reaktion durch Abwaschen mit 1xPBS beendet. Danach wurde das Gewebe für 10 sec mit 4°C kalter, 20%ige Essigsäure behandelt und dann sofort mit 1xPBS abgewaschen. Die Schnitte wurden erneut 10 min bei RT mit 5M Harnstoff-Lösung überschichtet, und nach dem Abspülen mit 1xPBS, 25 min bei 37°C in 0,5M EDTA-Puffer (pH 8,5) inkubiert. Dieser wurde entfernt und die Schnitte für 3 bis 4 min mit 37°C warmer SDS/DTT/EDTA-Lösung bedeckt. Die Schnitte wurden in 1xPBS gewaschen, bevor ein Verdau mit 40 u/ml DNase I für 10 min bei RT durchgeführt wurde. Nach dem folgenden Waschen für 5 min in 1xPBS wurden die Schnitte zur Absättigung unspezifischer Bindungen 30 bis 60 min bei 37°C in der Blockierungslösung belassen. Nun erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper und alle weiteren Schritte nach dem Standardprotokoll.

## 2.2.5 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.5.1 RNA-Isolierung und Konzentrationsbestimmung

#### RNA-Isolierung

1 x TE-Puffer pH 7,5

10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA

Die Isolierung der Total-RNA aus Hodengewebe erfolgte mit TRIzol™ (Invitrogen). Um den Abbau von RNA während der Isolierung zu vermeiden, wurde die Präparation auf Eis und alle Zentrifugationsschritte bei 4°C durchgeführt.

Jeweils 50-100mg Hodengewebe wurde mit 1ml Trizol homogenisiert (Ultra Turrax®), das Homogenat mehrmals durch eine Kanüle (Ø 0,7mm) gezogen, um genomische DNA zu zerstören, und dann mit 0,5ml Chloroform versetzt. Nach 15 sec kräftigem Schütteln und 5- bis 10-minütiger Inkubation bei RT erfolgte die Zentrifugation bei 12.000 rpm für 15 min. Hierdurch ergab sich man eine Trennung in drei Phasen:

- obere, wässrige Phase enthält die Total-RNA
- mittlere, weißliche Phase enthält Proteine und Fette
- untere, rötliche Phase enthält die genomische DNA

Die obere farblose Phase wurde abgenommen, erneut mit 0,5 ml Chloroform versetzt und 2 min kräftig geschüttelt. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 12.000 rpm für 15 min wurde wiederum die obere Phase abgenommen, mit Chloroform versetzt und nochmals zentrifugiert. Dieser Schritt wurde auch noch ein drittes Mal wiederholt. Anschließend wurde der oberen Phase 0,5ml Isopropanol zugegeben, 10 min bei RT inkubiert und bei 12.000 rpm für 30 min zentrifugiert. Dieser Schritt bewirkt das Ausfällen der RNA als Pellet, welches nun nach Abnahme des Überstandes mit 1ml 70% Ethanol gewaschen und bei 8.000 rpm für 5 min zentrifugiert wurde. Das Ethanol wurde abgenommen und das luftgetrocknete Pellet in 50µl TE-Puffer (1:10 verdünnt, enthält 1:50 verdünntes RNasin 40u/µl, Promega) aufgenommen. Zum besseren Lösen des Pellets wurde die Probe vor der Messung der RNA-Konzentration einmal eingefroren und wieder aufgetaut.

Die Isolierung der Total-RNA aus Zellen in Kultur erfolgte mit TRIzol LS™ (Invitrogen). Die folgenden Arbeitsschritte sind fast identisch mit der Aufarbeitung des Gewebes in TRIzol™. Zuerst wurden die Zellen mit Zellkultur-PBS gewaschen und anschließend in 0,3 bis 0,4ml Trizol LS pro 10cm<sup>2</sup> bewachsene Fläche durch Auf- und

Abziehen mit der Pipette lysiert. Durch Zugabe von 200µl Chloroform pro 750µl TRIzol LS, 10-minütiger Inkubation bei RT und Zentrifugation bei 11.000 rpm für 15 min ergab sich die schon oben beschriebene Phasentrennung. Die RNA-Präzipitation erfolgte mit 500µl Isopropanol pro 750µl TRIzol LS und 10-minütiger Zentrifugation bei 11.000 rpm. Das RNA-Pellet wurde mit 1ml 70% Ethanol pro 750µl TRIzol gewaschen, 5 min bei 8.000 rpm zentrifugiert und im Anschluss in 50µl TE-Puffer (1:10 verdünnt, enthält 1:50 verdünntes RNasin 40u/µl, Promega) gelöst.

### **Bestimmung der RNA-Konzentration**

Die Messung der Nukleinsäurekonzentration und Reinheit der Probe wurde photometrisch (Gene Ray UV Photometer, Biometra) durchgeführt. Hierzu wurde die Absorption von 2µl RNA-Lösung in 68µl A. dest. in einer Quarzküvette bei 260nm und 280nm bestimmt. Bei 260nm wird die Konzentration der Nukleinsäuren und bei 280nm die der Proteine gemessen. Das Verhältnis der Absorptionen bei 260nm/280nm dient als Indikator für die Reinheit der Nukleinsäureproben; eine saubere Präparation hat ein Absorptionsverhältnis von 1,8 bis 2,0.

#### **2.2.5.2 Reverse Transkription**

Aus der RNA wird mit dem Omniscript Reverse Transkriptase Kit (Qiagen) cDNA synthetisiert. Bei jeder reversen Transkription musste das RNasin frisch im Verhältnis 1:4 mit 1x RT-Puffer auf 10u/µl verdünnt werden. Danach wurde der Master-Mix angesetzt.

Master-Mix (1-facher Ansatz):

10x RT-Puffer	2µl
dNTPs (5mM)	2µl
Oligo dT-Primer (10µM)	2µl
RNase Inhibitor (10u/µl)	1µl
Reverse Transkriptase (4u/µl)	1µl

Zwei µg RNA wurden mit nukleasefreiem Wasser auf 12µl aufgefüllt und dazu 8µl Master-Mix gegeben. Die reverse Transkription erfolgte durch eine einstündige Inkubation bei 37°C im Thermocycler. Die entstehende cDNA konnte nun in der PCR eingesetzt werden.

### 2.2.5.3 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist ein Verfahren, um Nukleotidsequenzen in vitro exponentiell zu amplifizieren und dadurch eine große Menge an identischen DNA-Sequenzen zu erhalten. Die cDNA ist dabei die Vorlage (Template), an der sich ein Oligonukleotid Primerpaar anlagern kann. Ein Primer besteht aus Oligonukleotiden, welche so konstruiert werden, dass sie komplementär zu DNA-Sequenzen des zu untersuchenden Gens sind und ein zu amplifizierendes Fragment flankieren. Der Ablauf einer PCR gliedert sich prinzipiell in drei Schritte:

#### 1. Schmelzen/Denaturieren des DNA-Templates:

Bei ausreichend hoher Temperatur brechen die Wasserstoffbindungen zwischen den Basenpaaren auf und es entstehen DNA-Einzelstränge. Am Schmelzpunkt liegen 50% der DNA als Doppelstrang und 50% als Einzelstrang vor.

**2. Annealing:** Das Absenken der Temperatur auf die Annealing-Temperatur (AT) ermöglicht die Anlagerung der Primer (Tab. 4) an das Template.

**3. Elongation:** Bei Anheben der Temperatur auf 72°C synthetisiert eine thermostabile Taq-Polymerase entlang der Vorlage eine komplementäre Kopie.

Diese drei Schritte werden 20 bis 30 mal wiederholt, so dass sich die Anzahl der Kopien ab dem zweiten Zyklus bei jedem Zyklus verdoppelt.

Die PCR wurde mit dem Taq DNA Polymerase Kit (Qiagen) durchgeführt. Zuerst wurde ein PCR Master-Mix aus den folgenden Komponenten hergestellt:

1-facher Ansatz:	10x Qiagen PCR Puffer	5µl
	dNTP-Mix (10mM)	1µl
	5' Primer (100pM)	1µl
	3' Primer (100pM)	1µl
	MgCl <sub>2</sub> (25mM)	variabel
	Taq DNA Polymerase (5u/µl)	0,25µl
	Aqua bidest	auf 48µl auffüllen

In 1,5ml Reaktionsgefäße wurden 2µl der synthetisierten cDNA vorgelegt, 48µl PCR Master-Mix dazupipettiert und gut gemischt. Die Amplifikation wurde in einem Peltier Thermal Cycler (PTC 200, Biozym) mit dem folgendem PCR-Programm vorgenommen:

Schritt 1	94°C	4 min
Schritt 2	94°C	45 sec
Schritt 3	AT	45 sec
Schritt 4	72°C	1 min 30 sec
Schritt 5	gehe zu Schritt 2 so oft wie Anzahl der Zyklen	
Schritt 6	94°C	45 sec
Schritt 7	AT	45 sec
Schritt 8	72°C	5 min
Schritt 9	Kühlung der Proben bei 8°C	

**Tab. 4:** Primer zur Charakterisierung der Differenzierung

Sequenz des verwendeten Primerpaars	Fragment- länge	AT und MgCl <sub>2</sub>	Acc. No	Position
GAPDH (27 Zyklen) – Housekeeping Gen 5'-TCA TCA GCA ATG CCT CCT GC-3' 5'-GCT CAG GGA TGA CCT TGC C-3'	234 bp	59°C 1,5mM	NM_017008	1280-1299 1495-1513
Rc-kit-R (30 Zyklen) – Marker für Keimzellen 5'-CCC GTG AAG TGG ATG GCA C-3' 5'-AGG CGT CCT CAT GCA CGA G-3'	439 bp	59°C 1,5mM	NM_022264	2541-2559 2961-2979
Transition protein 1 (RTP1) (25 Zyklen) – Marker für runde Spermatozoen 5'-CGA CCA GCC GCA AAC TAA AG-3' 5'-ACA AGT GGG ATC GGT AAT TGC-3'	162 bp	57°C 1,5mM	NM_017056	22-41 163-183
Transition Protein 2 (RTP2) (25 Zyklen) – Marker für runde Spermatozoen 5'-ATG GAC ACC AAG ATG CAG AG-3' 5'-GTA TCT TCG TCC TGA GCT AC-3'	339 bp	58°C 1,5mM	NM_017037	55-74 374-393
Protamin 1 (RPROT1) (25 Zyklen) – Marker für elongierte Spermatozoen 5'-ATG GCC AGA TAC CGA TGC TG-3' 5'-CCT AAA GGT GTA TGA GCG GC-3'	141 bp	55°C 2,5mM	NM_001002850	1-20 122-141



## **Gellauf**

Das Gel lief für 5 min bei 60 Volt und dann bis zur gewünschten Auftrennung der Proben bei 90 Volt. Anschließend wurde es auf einem Transilluminator bei 312nm mit einer Digitalkamera (Powershot G2, Canon) photographiert.

### **2.2.6 Messung der Caspase-3 Aktivität**

Die Apoptoserate der testikulären Zellen nach Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 und - $\beta$ 2 wurde anhand der Aktivität der Caspase-3 mit dem Caspase-3 / CPP32 Colorimetric Assay Kit (MBL) gemessen. Der Assay beruht auf der photometrischen Detektion des Chromophors p-Nitroanilid (pNA), welches nach Spaltung aus dem Substrat DEVD-pNA durch die aktive Caspase-3 entsteht. Im Vergleich mit einer nicht induzierten Kontrolle erhält man ein Maß für die Apoptoserate. Das Caspase-3 Assay Kit enthält:

- Zell Lyse Puffer
- 2x Reaktions Puffer
- DEVD-pNA (4mM)
- DTT (1M)
- Dilution Puffer

## **Arbeitsgang**

Nach der Isolierung primärer testikulärer Zellen (vgl. 2.2.1.3) wurden je  $5 \times 10^6$  Zellen pro well einer 6-well Platte ausgesät und nach 24h bis 48h die Apoptose mit 15ng/ml TGF- $\beta$ 1 oder - $\beta$ 2 für 12 h oder 24 h induziert. Für jede Zeitspanne wurden Kontrollen mit PBS mit 1% BSA (Lösungsmittel für TGF- $\beta$ 1 und - $\beta$ 2) angesetzt. Als Positivkontrolle dienten HeLa Zellen, die für 3 h mit 1 $\mu$ M Staurosporine (Sigma) behandelt wurden und mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen pro well einer 12-well Platte 12 Stunden vorher ausgesät wurden.

Im Anschluss wurden die Zellen in 100 $\mu$ l kaltem Zell Lyse Puffer aufgenommen, 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 1 min bei 10.000 x g in der Mikrozentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand, welcher die cytosolischen Proteine enthält, wurde abgenommen und darin die Proteinkonzentration bestimmt (vgl. 2.2.7) und die Proteinkonzentration auf 200 $\mu$ g Protein in 50 $\mu$ l Zell Lyse Puffer eingestellt. In einem anderen Gefäß wurden 10 $\mu$ l 1M DTT und 1ml 2x Reaktions Puffer gemischt und 50 $\mu$ l des Gemischs zu jeder Proteinprobe gegeben.

Zur Auswertung wurden die Proben auf eine 96-well Platte pipettiert und 5µl des 4mM Substrats DEVD-pNA zugegeben. Nach 1 bis 2 h Inkubation bei 37°C wurde die Absorption bei 405nm im Photometer (Benchmark Reader, Biorad) gemessen. Die durch Zelllysate und Puffer entstehende Hintergrund-Absorption wurde durch einen entsprechenden Leerwert von den Proben subtrahiert.

### **2.2.7 Messung der Proteinkonzentration**

Die Proteinkonzentration wurde für den Caspase-3 Assay mit dem Advanced Protein Assay Reagenz (ADV01, Cytoskeleton) bestimmt. Dazu wurde ein 5x Konzentrat des Reagenz mit A. dest. auf 1x Konzentration verdünnt. Zwei µl des Zell Lyse Puffers alleine bzw. der zu messenden Proteinprobe in Zell Lyse Puffer wurde zu 998µl der 1x Reagenz pipettiert und die Absorption bei 595nm gemessen. Die Absorption des Zell Lyse Puffers mit dem Reagenz wurde als Referenzwert durch das Gerät automatisch von den Proteinproben subtrahiert.

Die Standardkurve zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den Lysaten aus Hodenzellen wurde mit BSA ermittelt.

### **2.2.8 Messung der Konzentration des Makrophagen stimulierenden Proteins**

Makrophagen stimulierendes Protein (MSP) wird von Spermatogonien und Spermatozyten exprimiert und sezerniert (Ohshiro et al., 1996), so dass die Messung der MSP-Konzentration in Kulturen testikulärer Zellen als Maß für die Anzahl der darin enthaltenen Spermatogonien und Spermatozyten verwendet werden kann. Die Messung des MSP in Kulturen testikulärer Zellen nach Stimulation mit 15ng/ml TGF-β1 und -β2 versus Kontrolle wurde mit dem MSP-ELISA Duoset (R&D Systems) durchgeführt. Die Überstände wurden direkt aus der Zellkultur abgezogen und max. eine halbe Stunde bei 4°C gelagert. Der ELISA funktioniert nach dem Prinzip eines Sandwich-Immunoassays mit Peroxidase-katalysierter Farbreaktion. Die Vorbereitungen für den MSP-ELISA sind in Tabelle 5 beschrieben.

**Tab. 5:** Komponenten des MSP-ELISAs

Inhalt des Kits	Rekonstitution mit	Konzentration	Lagerung
Capture Antikörper	2ml 1xPBS	90µg/ml	-30°C
Detection Antikörper	2ml Reagent Diluent	90µg/ml	-30°C
Standard	0,5ml Reagent Diluent	280ng/ml Verdünnung auf 100ng/ml	-70°C
Streptavidin-HRP	gebrauchsfertig		4°C

Weitere benötigte Reagenzien:

- PBS pH 7,2 - 7,4, steril filtrieren (Millipore 0,22µm)
- Wasch-Puffer 0,05% Tween 20 in PBS, pH 7,2 - 7,4
- Block-Puffer 1% BSA, 5% Sucrose in PBS  
steril filtrieren (0,22µm), immer frisch ansetzen
- Reagent Diluent 1% BSA in PBS, steril filtrieren (0,22µm)
- Substrat Lösung Color Reagenz A und B (R&D Systems # DY999)
- Stop Lösung 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### Vorbereitung der Platte

Die Beschichtung der Mikrotiter-Platte erfolgte mit 100µl 1:90 in PBS verdünntem Capture-Antikörper. Die Platte wurde damit über Nacht inkubiert und anschließend drei mal mit Waschpuffer gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurde die beschichtete Platte anschließend mit 300µl Block-Puffer für mindestens 1 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen war die Platte bereit für die Zugabe der Proben bzw. Standards.

### Erstellen der Standardreihe

Der MSP-Standard wurde mit 450µl Reagent Diluent versetzt, um die höchste Konzentration (10ng/ml) der Standardreihe zu erhalten. Aus dieser wurde die Verdünnungsreihe mit den folgenden Konzentrationen erstellt: 10ng/ml, 5ng/ml, 2,5ng/ml, 1,25ng/ml, 0,625ng/ml, 0,3125ng/ml. Der Leerwert bestand nur aus Reagent Diluent.

### Weiteres Vorgehen

100µl Standard oder Probe wurden jeweils im Duplikat in jedes well pipettiert und 2 h inkubiert. Anschließend wurde die Platte drei mal mit Waschpuffer gewaschen, mit

100µl Detektions-Antikörper (1:90 in Reagent Diluent verdünnt) pro well versehen und wiederum 2 h inkubiert. Nach Entfernung des nicht gebundenen Antikörpers durch dreimaliges Waschen wurde 100µl Streptavidin-HRP (1:200 mit Reagent Diluent verdünnt) in jedes well pipettiert und 20 min im Dunkeln gelassen. Nach erneutem Waschen inkubierten die Proben 20 min im Dunkeln mit 100µl Substrat Lösung, die nicht mehr als 15 min vor Gebrauch aus Color Reagenz A und B zu gleichen Teilen gemischt wurde. Der entstehende Farbumschlag wurde nach 20 min durch Zugabe von 50µl Stop Lösung unterbrochen und die Platte zum gleichmäßigen Mischen der Reagenzien vorsichtig geschüttelt. Innerhalb von 30 min erfolgte die photometrische Messung (Benchmark Reader, Biorad) der Farbintensität bei einer Wellenlänge von 450nm mit einer Korrekturwellenlänge von 540nm. Dabei wurde die Software Microplate Manager<sup>®</sup> verwendet.

## **2.2.9 Auswertungen**

### **2.2.9.1 Zellzählung an immunhistochemischen Präparaten**

Nach der immunhistochemischen Färbung mit anti-aktiver Caspase-3 wurden die gefärbten Keimzellen quantifiziert. Die Zellzählung erfolgte durch zwei verschiedene Personen unabhängig voneinander und im Unwissen darüber, welches Präparat sie gerade zählten. Es wurden Keimzellen in 10 zufällig eingestellten Tubuli gezählt, wobei darauf geachtet wurde, nur rund oder rund-oval angeschnittene Tubuli zu verwenden. Der Durchmesser des gezählten Tubulus wurde am Bildschirm des PCs gemessen und so mit  $A = \pi \times r^2$  die gezählte Fläche berechnet. Am Ende der Zählung wurde der Mittelwert aus den 10 Zählungen durch die insgesamt gezählte Fläche geteilt. So erhielt man einen Index für die apoptotischen Zellen pro Flächeneinheit.

### **2.2.9.2 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung wurde nur mit Daten, die mindestens dreimal im Duplikat vorlagen, durchgeführt. Hierfür wurde das Statistikprogramm InStat Graphpad<sup>®</sup> ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) und Microsoft Excel verwendet. Bei normalverteilten Werten wurde der zweiseitige ungepaarte t-Test verwendet.

## 3 Ergebnisse

---

### 3.1 MARKERPROTEINE TESTIKULÄRER ZELLEN

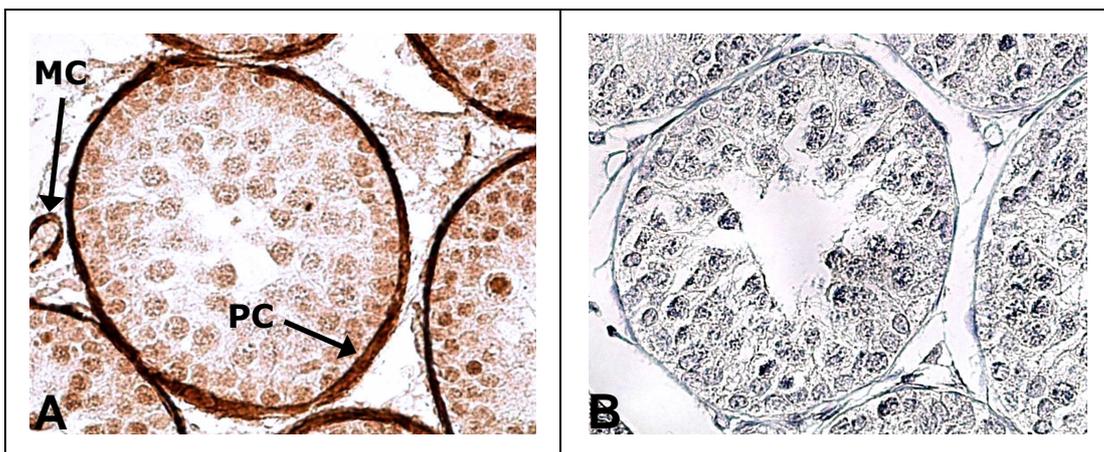
Jede Zellart im Hoden hat eine spezifische Funktion und verfügt daher über eine charakteristische Proteinausstattung. Anhand dieser zellspezifischen Proteine kann man eine Zellart auch außerhalb ihrer natürlichen Umgebung, z.B. in Zellkultur, identifizieren und diese Proteine somit als Marker für die jeweilige Zellart verwenden. Wir testeten Marker für Peritubulär-, Sertoli- und verschiedene Stadien von Keimzellen an immaturren (20d alt) und / oder adulten (60d alt) Rattenhoden.

#### 3.1.1 Peritubulärzellen

##### Alpha smooth muscle actin (ASMA)

Alpha smooth muscle actin ist eine Isoform des Aktins, die in den Myoidzellen des Hodens, den Peritubulärzellen, exprimiert wird (Skalli et al., 1986).

Wie in Abbildung 11 zu sehen ist, sind im 20 Tage alten Rattenhoden von den testikulären Zellen nur die Peritubulärzellen positiv für ASMA.



**Abb. 11:** A: Nachweis von Alpha smooth muscle actin im immaturren Rattenhoden. Färbung der Peritubulärzellen (PC) und Muskelzellen der Gefäße (MC) B: Negativkontrolle; Vergrößerung 400x

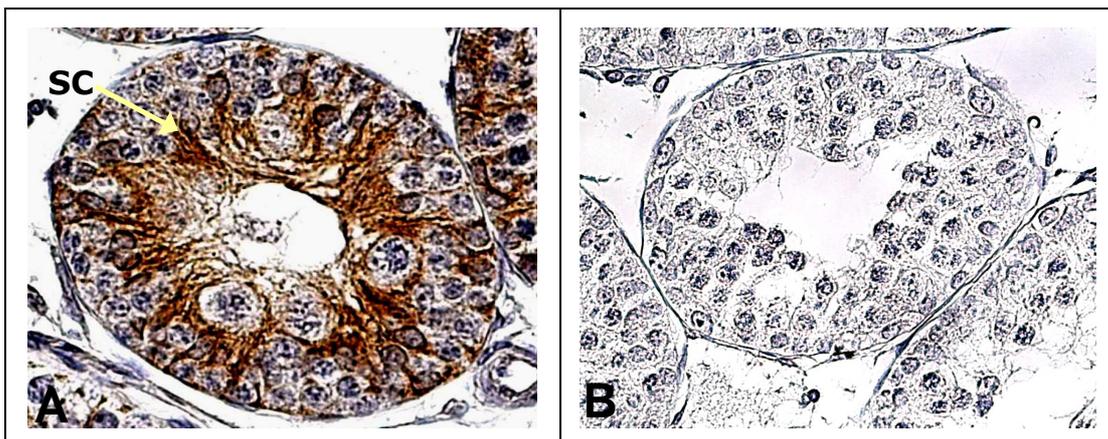
### 3.1.2 Sertoli-Zellen

#### Anti-Müller-Hormon (AMH)

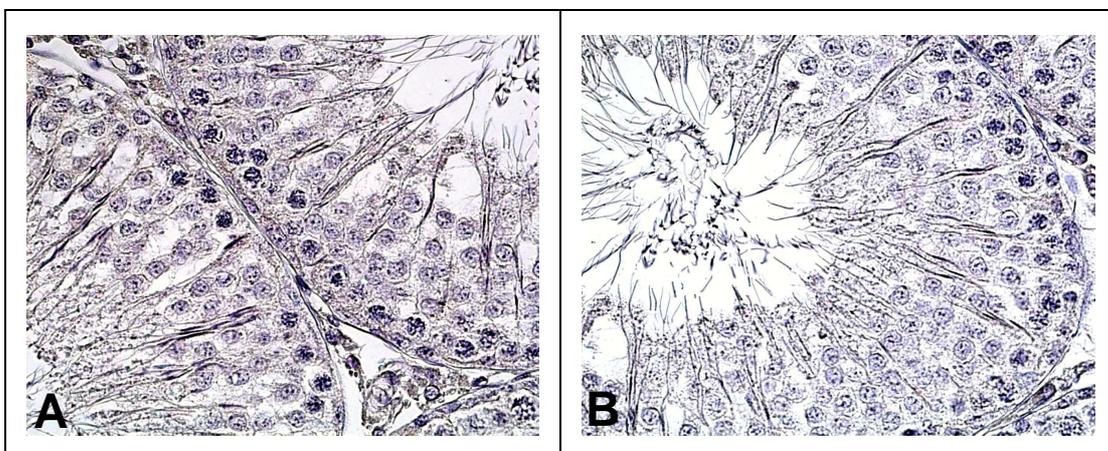
Anti-Müller-Hormon induziert die Regression der Müller-Gänge während der männlichen Embryonalentwicklung. Es wird in den Sertoli-Zellen vom Zeitpunkt der Differenzierung der Tubuli seminiferi bis zur Maturation in der Pubertät exprimiert (Rouiller-Fabre et al., 1998).

Die Tubuli 20 Tage alter immaturer Rattenhodens zeigen eine zur Mitte hin radiäre Anfärbung, die die Keimzellen ausspart. Dies ist ein typisches Muster für eine Anfärbung der Sertoli-Zellen, wobei hier nur das Cytoplasma und nicht die Zellkerne der Sertoli-Zellen gefärbt sind (Abb. 12).

Im adulten Hoden ist immunhistochemisch keine Expression von AMH nachweisbar (Abb.13).



**Abb. 12:** A: Nachweis von Anti-Müller-Hormon im immaturren Rattenhodens. Färbung der Sertoli-Zellen (SC) B: Negativkontrolle; Vergrößerung 400x

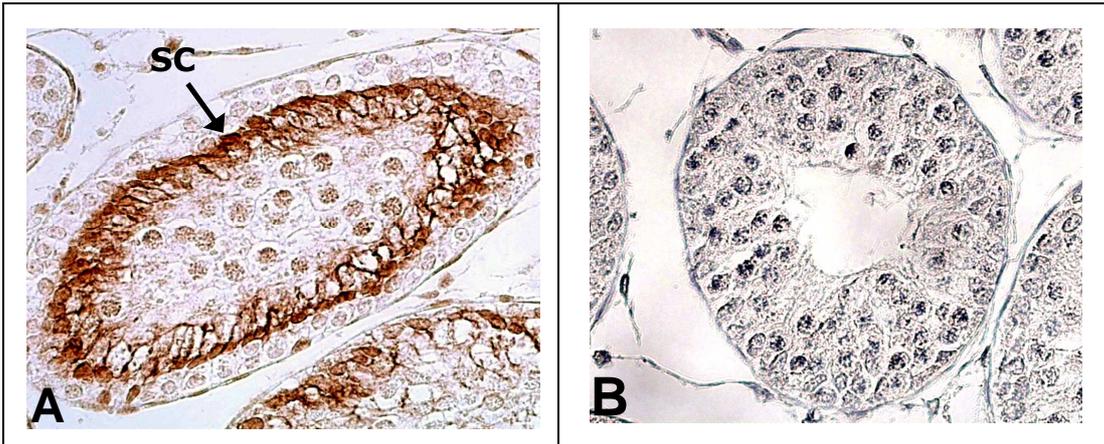


**Abb. 13:** A: Kein Nachweis von Anti-Müller-Hormon in ausdifferenzierten Sertoli-Zellen des adulten Rattenhodens. B: Negativkontrolle; Vergrößerung 400x

### Claudin-11

Claudin-11 ist ein von Sertoli-Zellen exprimiertes Transmembranprotein, welches die tight-junctions zwischen den Sertoli-Zellen ausbildet und somit am Aufbau der Blut-Hoden-Schranke beteiligt ist (Gow et al., 1999).

Die Abbildung 14 zeigt sowohl eine membranständige als auch nukleäre Anfärbung von Sertoli-Zellen mit anti-Claudin-11, die deutlich den Bereich der Blut-Hoden Schranke markiert. Auch vereinzelte Leydigzellen sind Claudin-11-positiv.



**Abb. 14:** **A:** Nachweis von-Claudin-11 im immaturren Rattenhoden. Färbung der Sertoli-Zellen (SC) im Bereich der Blut-Hoden-Schranke **B:** Negativkontrolle; Vergrößerung 400x

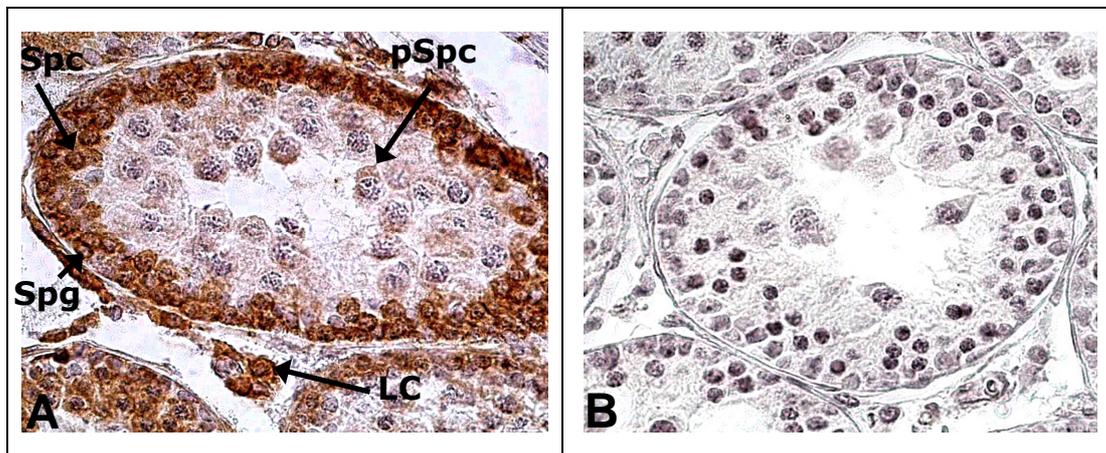
### 3.1.3 Keimzellen

#### C-kit

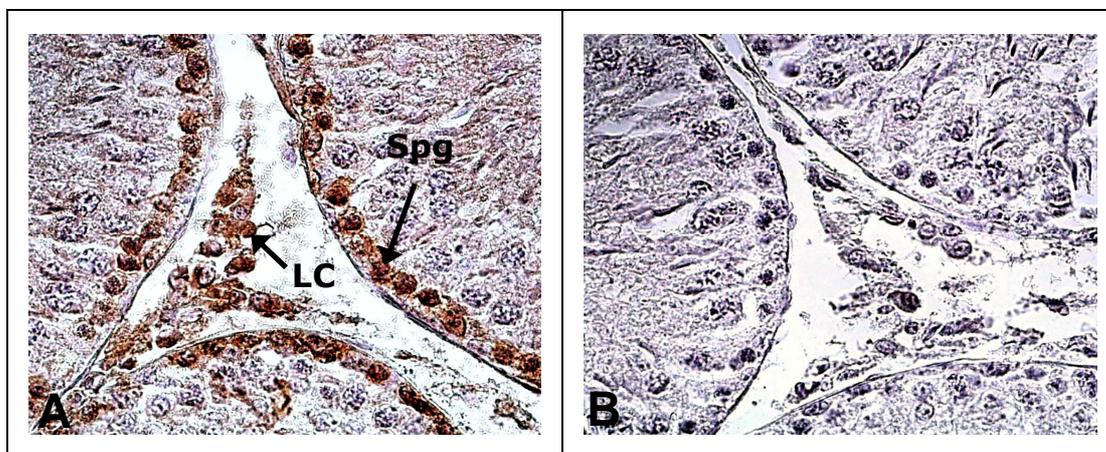
C-kit ist ein membranständiger Rezeptor mit Tyrosinkinase-Aktivität (Rossi et al., 2000), der sowohl im immaturren als auch im adulten Hoden in den Keimzellen exprimiert wird (Sorrentino et al., 1991).

Im 20 Tage alten Rattenhoden wird c-kit in Spermato gonien und frühen primären Spermato cyten, jedoch nicht in pachytänen Spermato cyten, exprimiert und ist vor allem membranständig lokalisiert. Des weiteren sind Leydig-Zellen c-kit positiv (Abb. 15).

Im adulten Hoden färben sich die Spermato gonien und Leydigzellen mit anti-c-kit spezifisch an. Sowohl spätere Spermato genesestadien, als auch Sertoli- und Peritubulärzellen sind c-kit-negativ (Abb. 16).



**Abb. 15:** **A:** Nachweis von c-kit im immaturren Rattenhoden. Färbung der Spermato gonien (Spg), frühen primären Spermato cyten (Spc) und Leydig-Zellen (LC). Keine Färbung der pachytänen Spermato cyten (pSpc) **B:** Negativkontrolle; Vergrößerung 400x

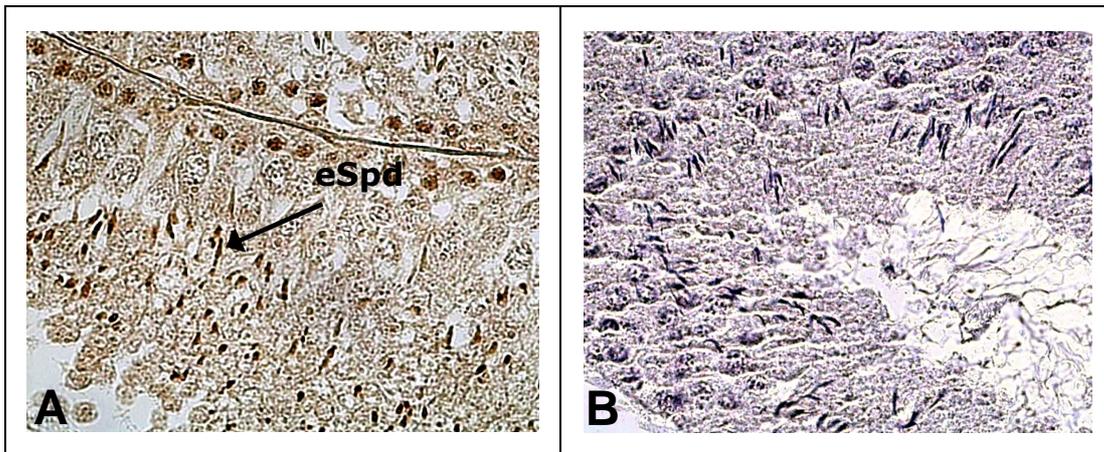


**Abb.16:** **A:** Nachweis von c-kit im adulten Rattenhoden. Färbung der Spermato gonien (Spg) und Leydig-Zellen (LC) **B:** Negativkontrolle; Vergrößerung 400x

### Transition Protein 1 (TP1)

Das Transition Protein 1 ist ein eng mit dem Chromatin assoziiertes Protein, das während der Spermiogenese in Keimzellen exprimiert wird und bei der Chromatin-kondensation der sich entwickelnden Spermien beteiligt ist (Steger, 1999).

Der immature Hoden wurde nicht mit anti-TP1 gefärbt, da hier keine Spermatiden vorliegen. Im adulten Hoden sind elongierte Spermatiden positiv für TP1, jedoch färbt der Antikörper auch die Zellkerne von Spermatogonien an. Außerdem ist eine starke Hintergrundfärbung vorhanden (Abb. 17).

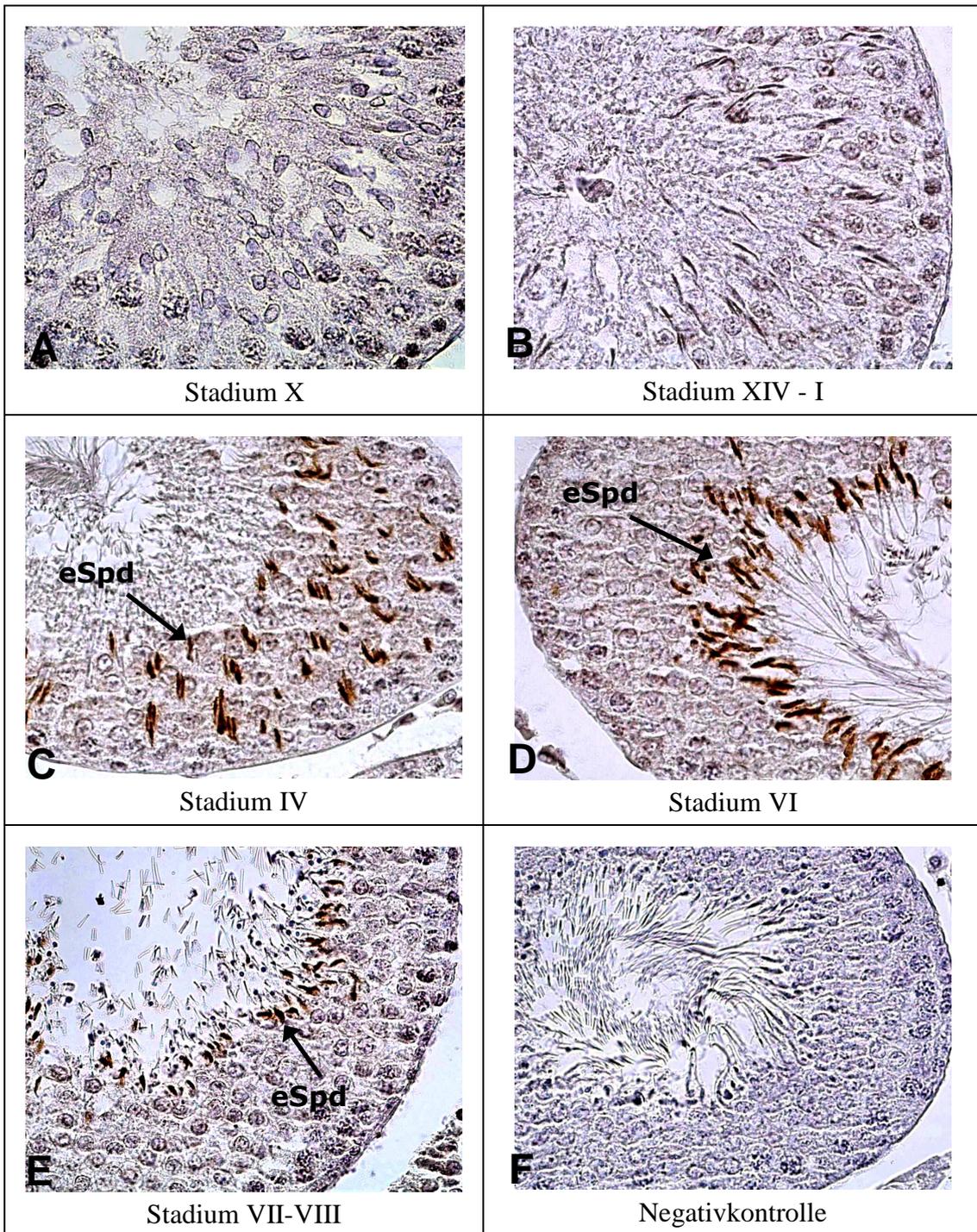


**Abb.17: A:** Nachweis von TP1 im adulten Rattenhoden. Färbung der elongierten Spermatiden (eSpd), unspezifische Färbung der Spermatogonien **B:** Negativkontrolle; Vergrößerung 400x

### Protamin 1 (Prm1)

Protamin 1 wird während der Spermiogenese in Keimzellen exprimiert. Wie das Transition Protein 1 spielt Protamin 1 eine Rolle bei der Chromatinkondensation, wird jedoch später im Laufe der Spermiogenese exprimiert (Steger, 1999).

Der immature Hoden wurde nicht mit anti-Prm1 gefärbt, da hier keine Spermatiden vorliegen. Im adulten Hoden sind elongierte Spermatiden ab dem Stadium II - IV bis zum Stadium VII/VIII positiv für Prm1, d.h. Prm1 ist in elongierten Spermatiden von Schritt 16-17 bis zu Schritt 19 (Spermatozoen) zu finden (Abb. 18).



**Abb. 18:** A, B, C, D, E: Nachweis von Protamin 1 im adulten Rattenhodent. Färbung der elongierten Spermatiden (eSpd) ab Stadium II-IV bis Stadium VII-VIII. F: Negativkontrolle; Vergrößerung 400x

### 3.1.3 Tabellarische Zusammenfassung

Die getesteten Marker testikulärer Zellen waren zum überwiegenden Teil zellspezifisch und können so zur Identifikation der jeweiligen Zellart in einem Gemisch verschiedener Zellarten herangezogen werden. Tabelle 6 enthält eine Zusammenfassung der Ergebnisse aus Kapitel 3.1.

**Tab. 6:** Expression zellspezifischer Marker im immaturren und adulten Rattenhoden. Im immaturren Hoden waren Keimzellen nur bis zum Stadium der primären Spermatocyten vertreten.

		Somatische Zellen			Keimzellen					
	Marker	SC	PC	LC	Spg	Spc 1	Spc 2	rSpd	eSpd	Spz
I M M A T U R	<b>ASMA</b>	-	+	-	-	-				
	<b>AMH</b>	+	-	-	-	-				
	<b>Claudin-11</b>	+	-	+ ?	-	-				
	<b>c-kit</b>	-	-	+	+	+				
A D U L T	<b>AMH</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<b>c-kit</b>	-	-	+	+	-	-	-	-	-
	<b>TP1</b>	-	-	-	+ ?	-	-	+	+	-
	<b>Prm1</b>	-	-	-	-	-	-	-	+	+

**SC:** Sertoli-Zellen; **PC:** Peritubulärzellen; **LC:** Leydigzellen; **Spg:** Spermatogonien; **Spc 1 / 2:** Spermatocyten 1. / 2. Ordnung; **rSpd:** runde Spermatiden; **eSpd:** elongierte Spermatiden; **Spz:** Spermatozoen; **+**: Färbung positiv; **-:** Färbung negativ; **?:** Färbung fraglich

### 3.2 ETABLIERUNG DES ZELLKULTURSYSTEMS PRIMÄRER TESTIKULÄRER ZELLEN

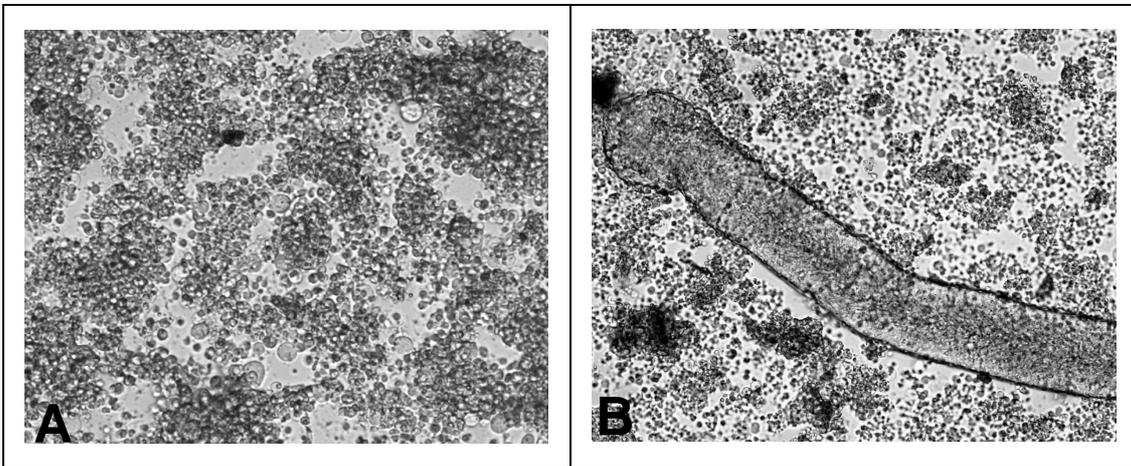
Neben der Organkultur ist die Kultur primärer testikulärer Zellen entweder im Tubulusverband oder als vollständig vereinzelt Zellen möglich. Im Folgenden ist die Etablierung und Histologie dieser Systeme dargestellt.

#### 3.2.1 Isolierung der Tubulusfragmente und Einzelzellen

Zur Herstellung der Tubulusfragmente und Einzelzellen wurde das Hodengewebe zunächst mit Hilfe der Medimachine und verschiedener Kombinationen an Medicons und Filcons mechanisch zerkleinert (vgl. 2.2.1.3).

Die Verwendung von Medicons der Größe 35 $\mu\text{m}$  in Kombination mit Filcons der Größe 100 $\mu\text{m}$  lieferte überwiegend vereinzelt Zellen und nur sehr wenige Tubulusfragmente (Abb. 19 A). Die Ausbeute belief sich hierbei auf ca. 1,5 bis 2,5  $\times 10^7$  Zellen / Gramm Hodengewebe.

Die Verwendung von Medicons der Größe 50 $\mu\text{m}$  in Kombination mit Filcons der Größe 500 $\mu\text{m}$  ergab Tubulusfragmente (Abb. 19 B).



**Abb.19:** Primäre testikuläre Zellen direkt nach der Isolierung aus dem immaturren Rattenhoden; **A:** Vollkommen vereinzelt Zellen; **B:** Tubulusfragment; Vergrößerung 100x

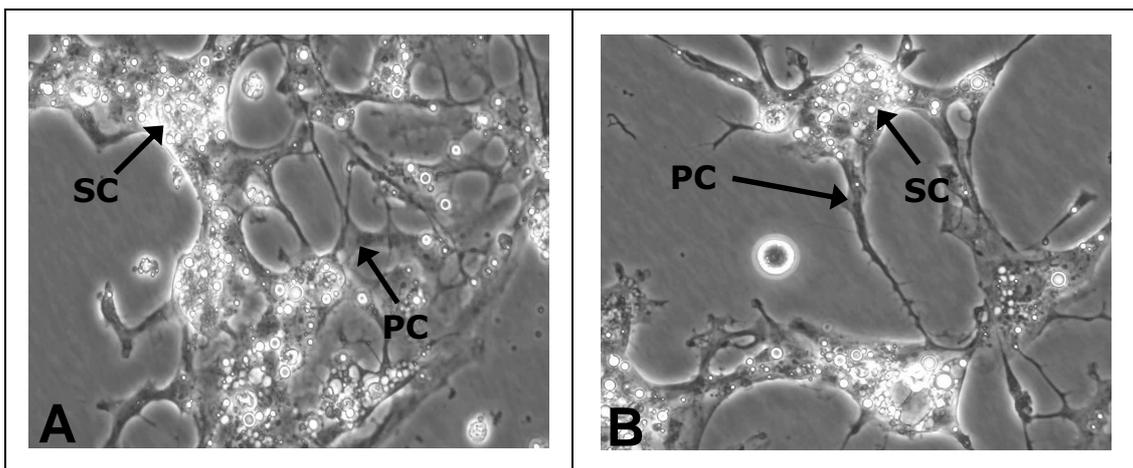
### Anreicherung verschiedener Zellarten

Die vereinzelt testikulären Zellen (Abb. 19 A) bestanden aus einem Zellgemisch aller im Hoden vorkommender Zellen. Für unsere Versuche sollten jedoch Sertoli- und Keimzellen angereichert werden.

#### A) Sertoli-Zellen

Bei der Isolierung von Sertoli-Zellen nach der Methode von Buzzard et al. (2002) (vgl. 2.2.1.5) machten wir für die weitere Versuchsplanung wichtige Beobachtungen:

1. Die Präparation lieferte keine reine Sertoli-Zellkultur, sondern wies regelmäßig Kontaminationen mit Peritubulärzellen auf.
2. Die Sertoli-Zellen wuchsen auf dem Zellkulturplastik nicht, wie von Buzzard et al. (2002) beschrieben, als Monolayer aus, sondern bildeten Zellaggregate in Suspension.
3. Stattdessen wuchsen die Sertoli-Zellen direkt auf den Peritubulärzellen an (Abb. 20).



**Abb. 20 A, B:** Sertoli-Zellen (SC), erkennbar an den Lichtreflexen intrazellulärer Lipidtröpfchen, wachsen auf Peritubulärzellen (PC) an. Vergrößerung 320x

#### B) Keimzellen

Die Anreicherung von Keimzellen aus der Hodenzellsuspension wurde durch die Selektion c-kit-positiver Zellen mit immunmagnetischer Separation (vgl. 2.2.1.6) versucht. Die Isolierung von Keimzellen aus dem Gemisch testikulärer Zellen gelang problemlos, jedoch erfolgte keine Ablösung der Keimzellen von den Beads und somit kein Anwachsen auf der Zellkulturplatte, was wahrscheinlich auf fehlende Proliferation der Keimzellen zurückzuführen ist. Daher war diese Methode zur Keimzellisolierung nicht brauchbar.

### **Fazit der Zellisolierung:**

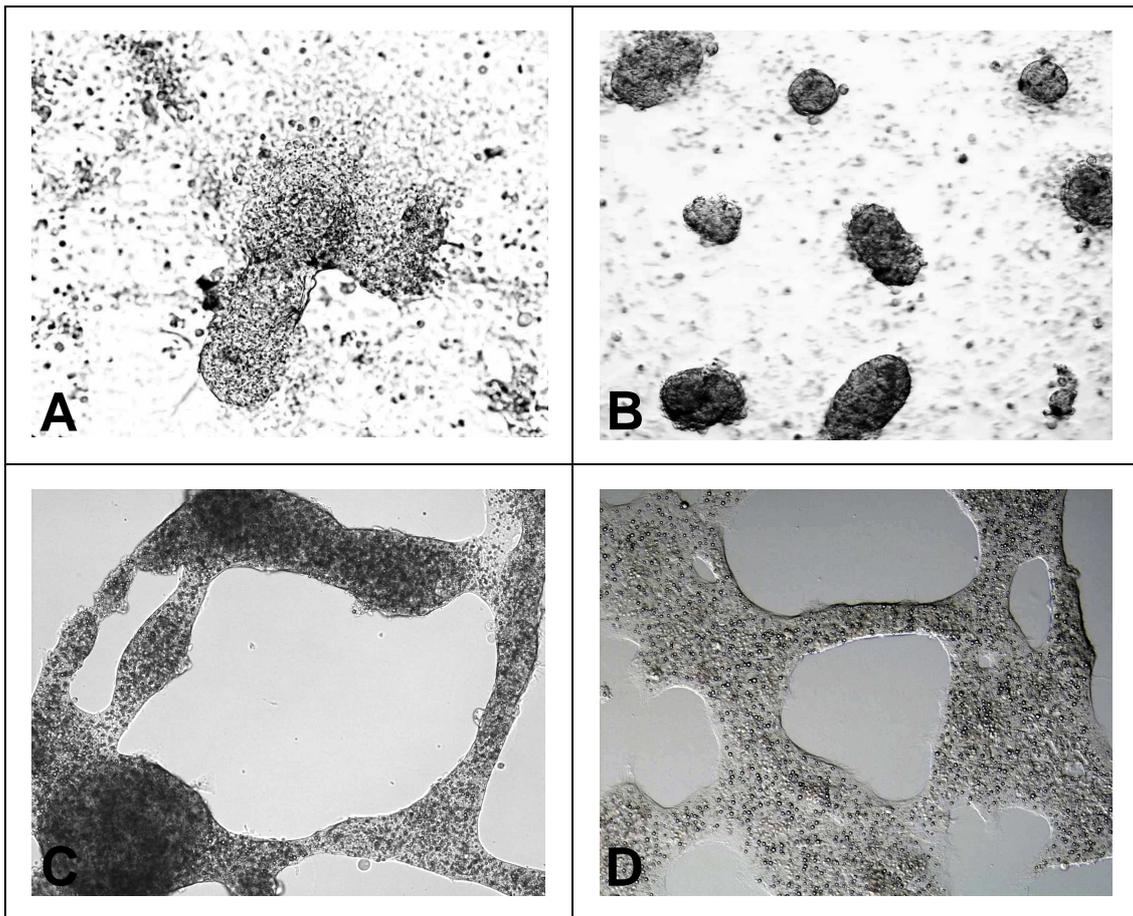
Mit Hilfe der Medimaschine lassen sich Tubuli seminiferi und vereinzelte Zellen einfach und zuverlässig reproduzierbar isolieren, jedoch scheiterte die Anreicherung der Sertoli- und Keimzellen mit den publizierten Methoden. Aufgrund der oben beschriebenen Beobachtung, dass Sertoli-Zellen in dem Kultursystem nur auf Peritubulärzellen anwachsen können, verwarfen wir das Ziel einer reinen Sertoli-Keimzell-Kultur und setzten unsere Versuche mit Zellgemischen fort, entweder in Form von Tubulusfragmenten oder in Form vereinzelter Zellen.

### **3.2.2 Histologie primärer testikulärer Zellen in vitro; Bildung von Clustern und Cords**

Nachdem Tubulusfragmente und vereinzelte Zellen mit der Medimachine isoliert worden waren, wurden sie in hormonsupplementiertem Medium kultiviert. Nach einigen Tagen begann sich die Aggregation der testikulären Zellen in charakteristischer Weise zu verändern. Zu Beginn der Kultur wuchsen die Zellen der Tubulusfragmente an den offenen Enden auf die Kulturplatte aus (Abb. 21 A). Später bildeten sich sowohl klumpenförmige Zellaggregate, im Folgenden als Cluster bezeichnet (Abb. 21 B), als auch Netzwerke, im Folgenden als Cords bezeichnet (Abb. 21 C, D).

Der Vorgang der Cluster- und Cordbildung vollzog sich bei Aussaat auf normalen Zellkulturwells aus Plastik innerhalb von 2-3 Wochen (Abb. 21 B, C) und bei Aussaat auf extrazellulärer Matrix (ECM) innerhalb von 2-4 Tagen (Abb. 21 D).

Cluster bildeten sich vornehmlich bei Kultur vereinzelter testikulärer Zellen, während sich Cords nur dann bildeten, wenn die Kultur Tubuli seminiferi enthielt. Dieses Phänomen war jedoch nicht ganz einheitlich zu steuern, da Kulturen aus vereinzelter Zellen gelegentlich wenige Tubulusfragmente enthielten und Kulturen mit Tubulusfragmenten selbstverständlich auch immer vereinzelte Zellen enthielten.



**Abb. 21:** Morphologie primärer testikulärer Zellen in Kultur. isoliert aus immaturrem Rattenhoden; Vergrößerung 100x

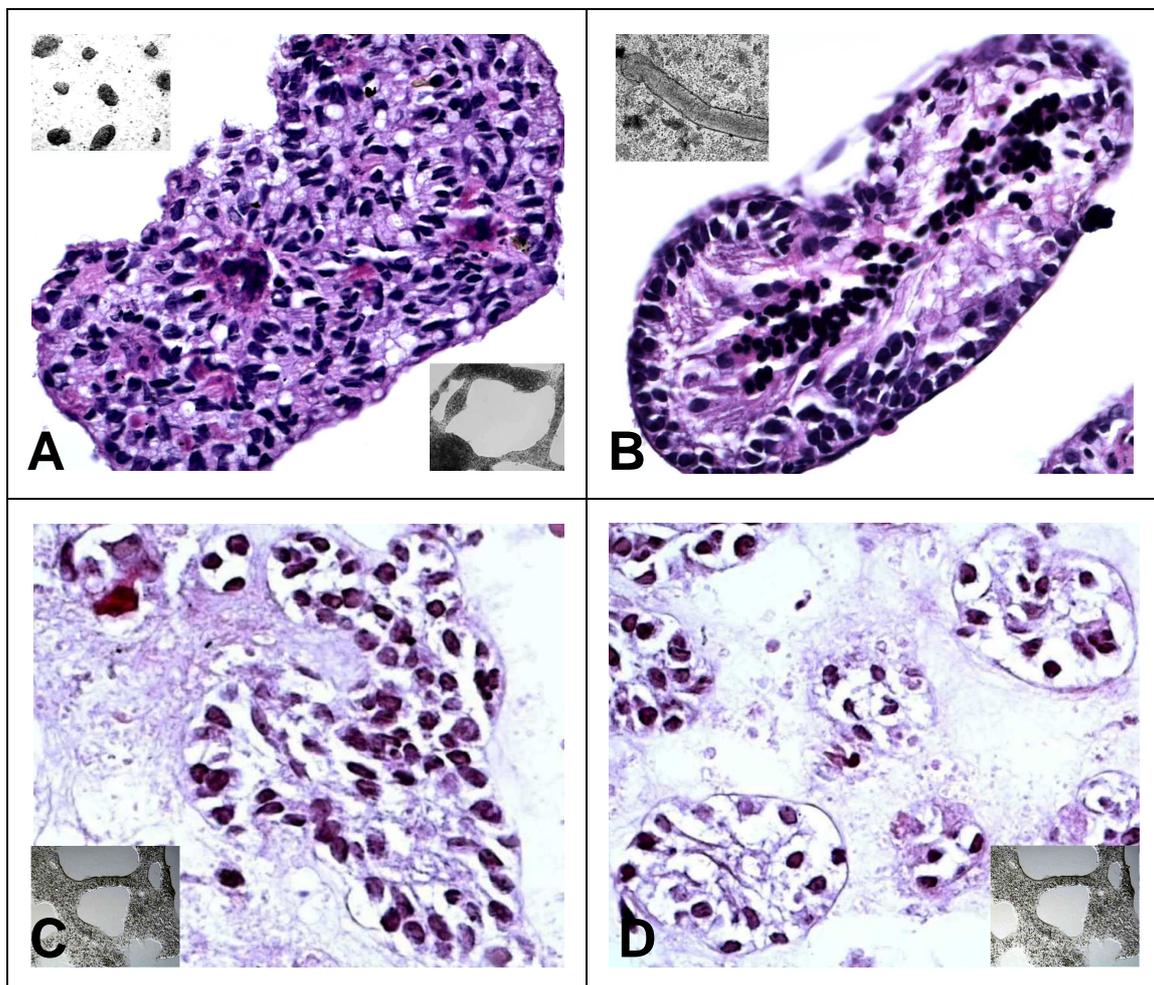
**A:** Tubulusfragment, aus dem Zellen auswachsen; 2 Tage in Kultur; **B:** Zellaggregate in Form von Cluster auf Zellkulturplastik, 2 Wochen in Kultur; **C:** Zellaggregate in Form von Cords auf Zellkulturplastik, 2 Wochen in Kultur; **D:** Zellaggregate in Form von Cords auf ECM, 2-4 Tage in Kultur

### 3.2.3 HE- und immunhistochemische Färbung der Cords und Tubulusfragmente

Die Veränderung der Aggregation der testikulären Zellen im Laufe der Kulturperiode ist ein starker Hinweis dafür, dass sich diese Zellen auch außerhalb des Hodens, z.B. hier in unserem Kultursystem, weiterentwickeln. Deshalb wurden die in Kultur entstandenen Cluster und Cords histologisch untersucht, um herauszufinden wie diese aufgebaut sind und ob ein Differenzierungsprozess stattgefunden hat.

Dabei konnten Cluster und Cords nicht getrennt voneinander untersucht werden, ohne deren Aggregate zu zerstören, so dass sie hier gemeinsam besprochen werden. Zum Vergleich wurden Tubuli seminiferi ebenfalls für 2 Wochen kultiviert. So war es möglich, den Aufbau der Cluster und Cords mit dem eines ursprünglichen Tubulus zu

vergleichen, und zu ermitteln, ob die testikulären Zellen in vitro die ursprüngliche Tubulusstruktur nachahmen.



**Abb. 22:** Vergleich der Querschnitte von Cords / Cluster (A) und Tubulusfragmenten (B). HE-Färbung, Vergrößerung 400x; Insets zeigen verwendetes Ausgangsmaterial (vgl. Abb. 21)

**A:** Querschnitt Cords und Cluster auf Zellkulturplastik nach 2 Wochen in Kultur; **B:** Tubulus seminiferus nach 2 Wochen in Kultur; **C, D:** Cluster und Cords in Extrazellulärmatrix nach 2-4 Tagen in Kultur

1. In der HE-Färbung wird deutlich, dass die auf normalem Zellkulturplastik entstandenen Cluster und Cords eine Ansammlung testikulärer Zellen ohne erkennbare Ordnung darstellen (Abb. 22 A). Die Tubuli seminiferi hingegen zeigten nach 2 Wochen in Kultur noch einen intakten Aufbau, jedoch war eine Chromatinkondensation und Anhäufung der Keimzellen im Lumen des Tubulus zu beobachten (Abb. 22 B).

2. Die in Extrazellulärmatrix entstandenen Cords zeigten eine deutliche Ähnlichkeit mit dem Aufbau eines normalen Tubulus. Multiple Zellverbände testikulärer Zellen bildeten in der Matrix Hohlräume aus und ahmten deutlich die ursprüngliche Tubulusstruktur nach (Abb. 22 C, D).

3. Eine Differenzierung der Keimzellen mit Entstehung von Spermatiden war in den Tubulusfragmenten rein histologisch nicht zu beobachten, jedoch ist dies in der diffusen Zellmischung der Cluster und Cords nur schwer zu beurteilen.

Durch den Verlust der ursprünglichen Tubulusarchitektur haben die testikulären Zellen ihre typische Form und Anordnung im Hoden verloren. Daher ist es in der HE-Färbung nicht möglich, die verschiedenen Zellarten des Hodens zu unterscheiden und zu beurteilen, ob eine Differenzierung der immaturen Keimzellen zu Spermatiden stattgefunden hat.

### **Immunhistochemie**

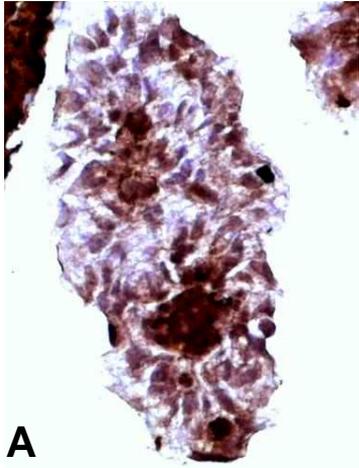
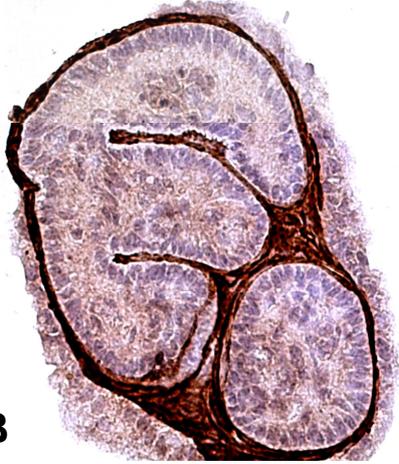
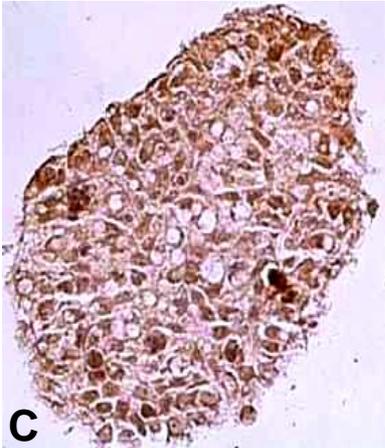
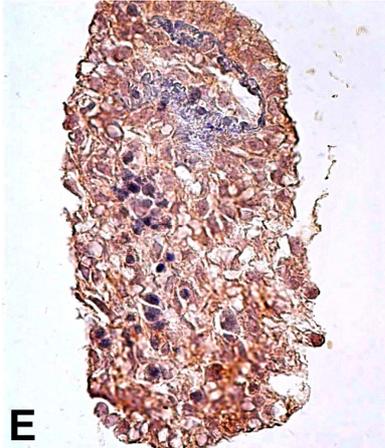
Die Immunhistochemie ermöglicht die Identifikation der verschiedenen Zellarten in den Cords und Tubulusfragmenten anhand der in Kapitel 3.1 vorgestellten zellspezifischen Marker. Peritubulärzellen wurden mit anti-ASMA, Sertoli-Zellen mit anti-AMH, Keimzellen mit anti-c-kit und die Blut-Hoden-Schranke mit anti-Claudin-11 sichtbar gemacht (Abb. 23).

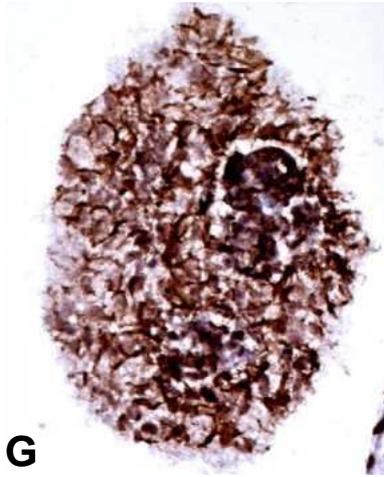
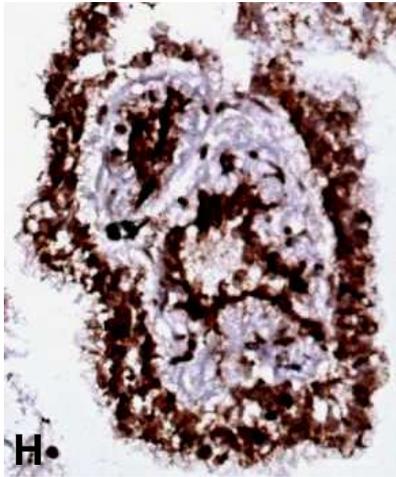
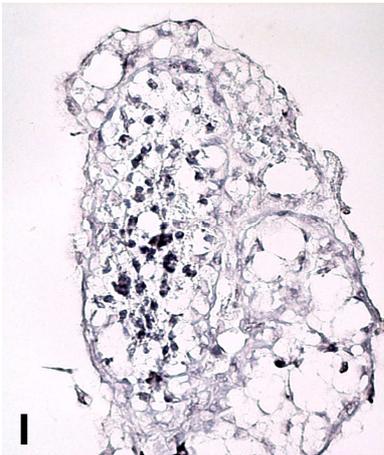
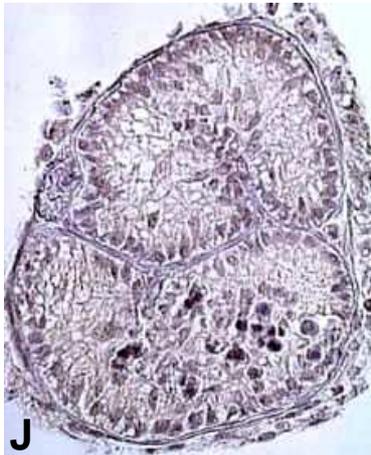
**Cords:** Sie zeigen, wie in der HE-Färbung, auch in der Immunhistochemie eine vollkommen unregelmäßige Anordnung aller Zellarten. Von allen Zellarten blieben die Sertoli-Zellen besonders gut erhalten (Abb. 23 E-H), während nach 2-wöchiger Kultur Peritubulär- und Keimzellen weniger zahlreich vorhanden waren (Abb. 23 A-D).

**Tubulusfragmente:** Nach 2-wöchiger Kultur waren die Tubulusfragmente und die in ihnen enthaltenen Zellen unterschiedlich gut erhalten. Die Peritubulärzellschicht war nach 2 Wochen in Kultur vollkommen intakt (Abb. 23 B) und ist mit dem Ausgangszustand im immaturen Hoden vergleichbar (vgl. Abb. 11 A).

Hingegen waren c-kit positive Keimzellen nach 2 Wochen nur noch vereinzelt in den Tubuli vorhanden (Abb. 23 D), was die schlechte Überlebensfähigkeit der Keimzellen in Kultur bestätigt.

Wie bei der AMH-Färbung deutlich wird, überleben Sertoli-Zellen die 2-wöchige Kulturzeit sehr gut, so dass auch die Blut-Hoden-Schranke in vitro erhalten blieb. Die in der anti-Claudin-11-Färbung um den Tubulus herum vorhandene Färbung (Abb. 23 H) lässt sich am ehesten dadurch erklären, dass sich Sertoli-Zellen in vitro um den Tubulus herum angelagert haben (vgl. Abb. 23 B, J) und hier mit angefärbt werden.

	Cords und Cluster	Tubulusfragmente
<p style="text-align: center;">A S M A</p>	 <p style="text-align: center;"><b>A</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>B</b></p>
<p style="text-align: center;">C - K I T</p>	 <p style="text-align: center;"><b>C</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>D</b></p>
<p style="text-align: center;">A M H</p>	 <p style="text-align: center;"><b>E</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>F</b></p>

	Cords und Cluster	Tubulusfragmente
CLAUDIN-11		
NEGATIVKONTROLLE		

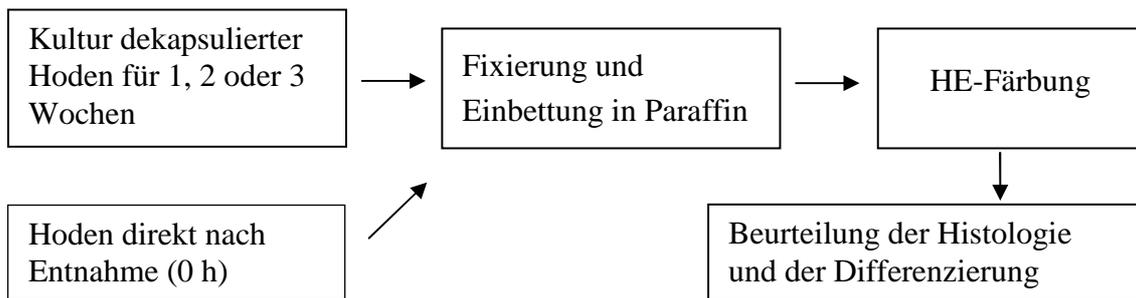
**Abb. 23:** Immunhistochemische Darstellung der testikulären Zellarten in Cords/Cluster und Tubulusfragmenten nach 2-wöchiger Kultivierung; Anfärbung der: **A, B:** Peritubulärzellen mit anti-ASMA; **C, D:** Keimzellen mit anti-c-kit; **E, F:** Sertoli-Zellen mit anti-AMH; **G, H:** Blut-Hoden-Schranke mit anti-Claudin-11; **I, J:** Negativkontrolle; Cords und Cluster waren vollkommen unregelmäßig angeordnete Aggregate aller testikulärer Zellarten. Tubulusfragmente blieben während einer 2-wöchigen Kulturperiode gut erhalten, wobei Peritubulär- und Sertoli-Zellen besser überlebten als Keimzellen. Vergrößerung 400x

### 3.3 DIFFERENZIERUNG PRIMÄRER TESTIKULÄRER ZELLEN IN VITRO

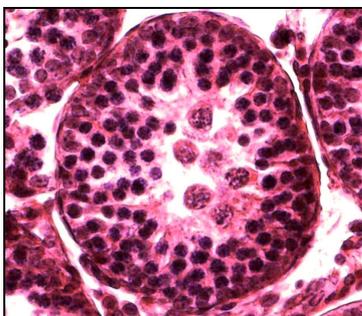
Die Fähigkeit männlicher Keimzellen, sich in vitro zu differenzieren, wurde in verschiedenen Systemen gezeigt (Übersicht in Staub, 2001). In dieser Arbeit wurde die Keimzeldifferenzierung in der Organkultur, in Tubulusfragmenten und mit vollkommen vereinzelter Zellen unter jeweils gleichbleibenden Bedingungen getestet.

#### 3.3.1 Untersuchung der Differenzierung in der Organkultur

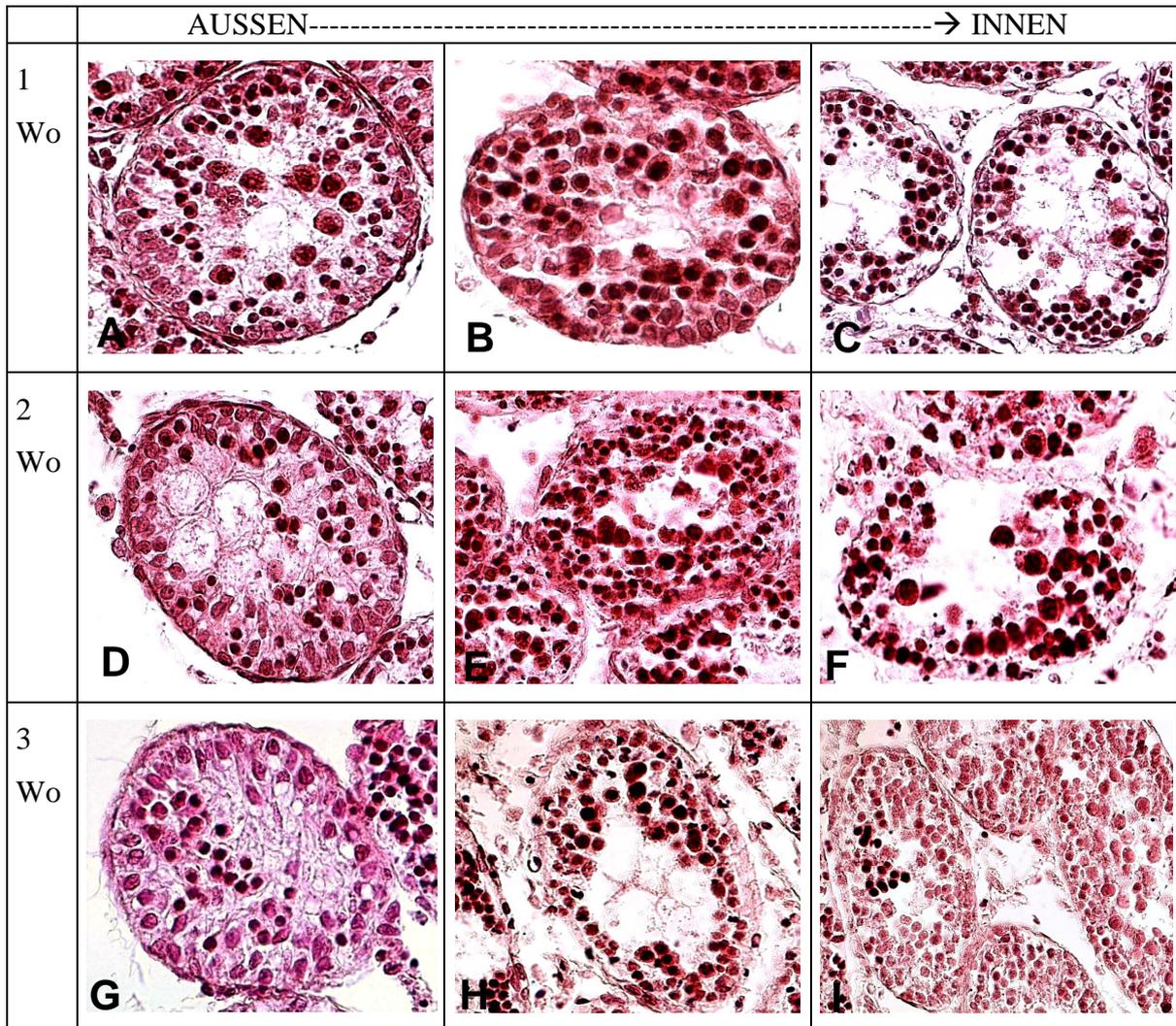
Ganze Hoden wurden nach Entfernung der Tunica albuginea für 1 bis 3 Wochen in hormonsupplementiertem Medium kultiviert. Nach jeder Woche wurde ein Hoden aus der Kultur genommen und die Histologie mit einer HE-Färbung untersucht. Ein direkt nach Entnahme fixierter Hoden (Abb. 25) zeigt den Ausgangszustand und dient dem Vergleich mit den 1 – 3 Wochen kultivierten Hoden. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 24 dargestellt.



**Abb. 24:** Versuchsaufbau der Analyse der Keimzeldifferenzierung in Organkultur



**Abb. 25:** Immaturer Hoden / Ausgangszustand der Versuche



**Abb. 26:** Tubulusstruktur immaturer Hoden nach ein-, zwei- oder dreiwöchiger Organkultur. Der Erhalt der Tubuli nahm mit zunehmender Kulturdauer und zentraler Lokalisation drastisch ab. HE-Färbung, Vergrößerung 100x; Wo: Woche  
**A-C:** 1 Woche in Kultur; **D-F:** 2 Wochen in Kultur; **G-I:** 3 Wochen in Kultur; **A, D, G:** äußere Tubuli; **B, E, H:** Tubuli in zweiter und dritter Reihe; **C, F, I:** zentrale Tubuli

Dieser Versuch zeigte deutlich, dass die Keimzellen sowohl in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer als auch von der Lokalisation im Hoden unterschiedlich gut erhalten blieben. Insgesamt verschlechterte sich der Zustand der Zellen in den Tubuli von außen nach innen und mit Zunahme der Kultivierungsdauer (Abb. 26).

### Histologie

Die außen gelegenen Tubuli blieben während der 3-wöchigen Kulturperiode vollkommen intakt, wobei die Anordnung der Keimzellen im Laufe der drei Wochen unregelmäßiger wurde und die Anzahl der darin enthaltenen Keimzellen abnahm (Abb. 26 A, D, G).

Die darauffolgenden Reihen an Tubuli zeigten nach zwei Wochen eine massive Chromatinkondensation mit zunehmend unregelmäßiger Anordnung der Zellen. Des Weiteren war ein Verblässen der Peritubulärzellschicht zu beobachten (Abb. 26 E). Nach drei Wochen war die Anzahl der Keimzellen so stark reduziert, dass Lücken in den Tubuli auftraten. Die Tubulusbegrenzung wurde unscharf, was auf eine Nekrose der Peritubulärzellen hindeutet (Abb. 26 H).

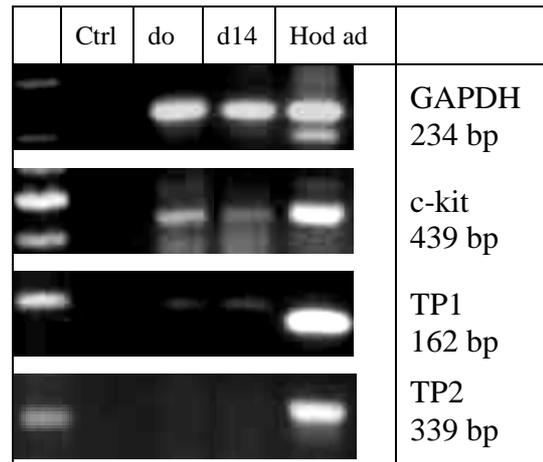
Die innen gelegenen Tubuli wiesen bereits nach einer Woche neben einer Chromatinkondensation, eine Verminderung der Zellzahl und Auflockerung der Gewebestruktur bei noch intakter Tubulusbegrenzung auf (Abb. 26 C). Schon nach zwei Wochen war keine durchgängige Peritubulärzellschicht mehr vorhanden (Abb. 26 F). Nach drei Wochen waren die zentralen Anteile der kultivierten Hoden fast vollkommen nekrotisch, erkennbar an der größtenteils fehlenden Kernfärbung. Nur vereinzelte Keimzellen überlebten die 3-wöchige Kultur im Organmodell (Abb. 26 I).

### **Differenzierung**

Zum Zeitpunkt der Entnahme der Hoden waren die am weitesten entwickelten Zellen des Keimepithels pachytäne Spermatozyten (vgl. Abb. 25). Merkmale der Differenzierung zu runden oder elongierten Spermatischen sind die Chromatinkondensation und die Elongation. In diesem Versuch konnte eine deutliche Chromatinkondensation der Keimzellen beobachtet werden, was jedoch wahrscheinlicher im Rahmen der Einstellung des Stoffwechsels und der Nekrose zu sehen ist. Eine Elongation der Keimzellen konnte nicht nachgewiesen werden.

Um die Zone der Nekrose zu verkleinern, wurden halbierte und geviertelte Hoden kultiviert. Das Ergebnis blieb jedoch das gleiche wie bei ganzen Hoden. Die inneren Anteile wurden stets nekrotisch und nur die äußeren Tubuli blieben intakt.

Um die Ergebnisse noch weiter zu optimieren und zu objektivieren, wurde eine weitere Organkultur mit selbst hergestelltem Medium mit Testosteron und rhFSH für zwei Wochen angelegt und anschließend das Überleben und der Differenzierungsgrad durch die Genexpression bestimmter Marker gemessen. Dabei wurde c-kit als Marker für das Überleben der Spermato gonien und Spermatozyten, TP1 und TP2 als Marker für die Entstehung runder Spermatischen und Prm1 für elongierte Spermatischen verwendet. Die GAPDH als „housekeeping gene“ diente dem Vergleich der Genexpression. Die Ergebnisse sind in Abbildung 30 dargestellt.



**Abb. 30:** Analyse der Genexpression immaturer Rattenhoden nach 2-wöchiger Organkultur. Das Medium enthielt  $10^{-7}$ M Testosteron und 200 IE/l rhFSH. Untersucht wurde die Expression von c-kit als Marker für das Überleben von Spermatogonien und Spermatozyten, TP1 und TP2 als Marker für runde Spermatozyten. **Ctrl:** Negativkontrolle; **do:** Kulturbeginn / Tag 0; **d14:** Kulturende / Tag 14; **Hod ad:** adulter Hoden / Positivkontrolle

### Überleben und Differenzierung in der Organkultur

In der Organkultur ist die Expression von c-kit nach 2-wöchiger Kultur nur noch schwach vorhanden, was zeigt, dass im ganzen Organverband nur wenige Keimzellen die 2-wöchige Kultivierung überleben. Die negative TP1- und TP2-Expression spiegelt das Fehlen haploider Keimzellen nach 2 Wochen wieder. Somit bestätigen die Ergebnisse der PCR die obigen histologischen Ergebnisse der Organkultur. Die histologisch beobachtete, mit der Kultivierungsdauer zunehmende Gewebnekrose, findet Ausdruck im Fehlen der Überlebens- und Differenzierungsmarker in der PCR.

### Fazit aus den Versuchen in der Organkultur:

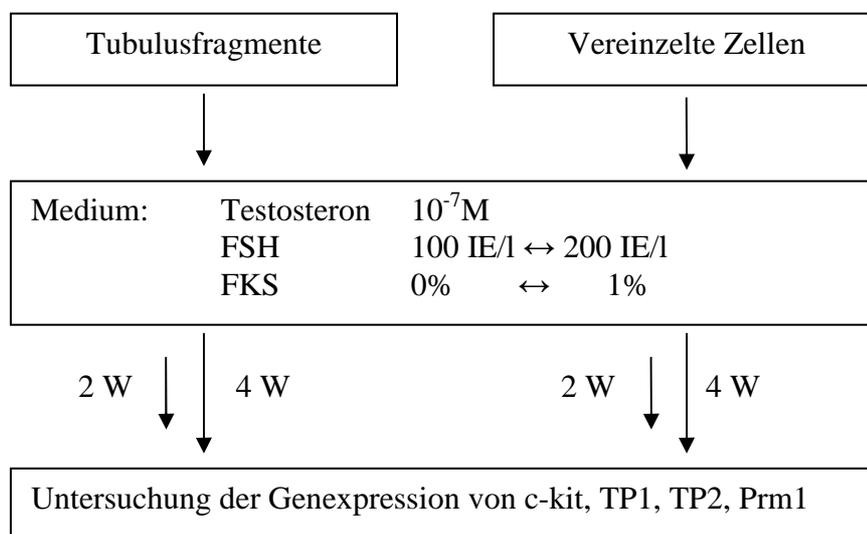
Aus den Ergebnissen dieses Versuches entstand die Idee für das Zellkulturmodell. Da in der Organkultur immer nur die Zellen in den außen gelegenen Tubuli überlebten, wurden in dem neuen System Tubulusfragmente oder ganz vereinzelte Zellen kultiviert. Damit sollte eine bessere Versorgung der Keimzellen durch das Kulturmedium erreicht, eine Nekrose der testikulären Zellen verhindert und somit bessere Voraussetzungen für die Differenzierung der Keimzellen geschaffen werden.

### 3.3.2 Untersuchung der Differenzierung in der Zellkultur

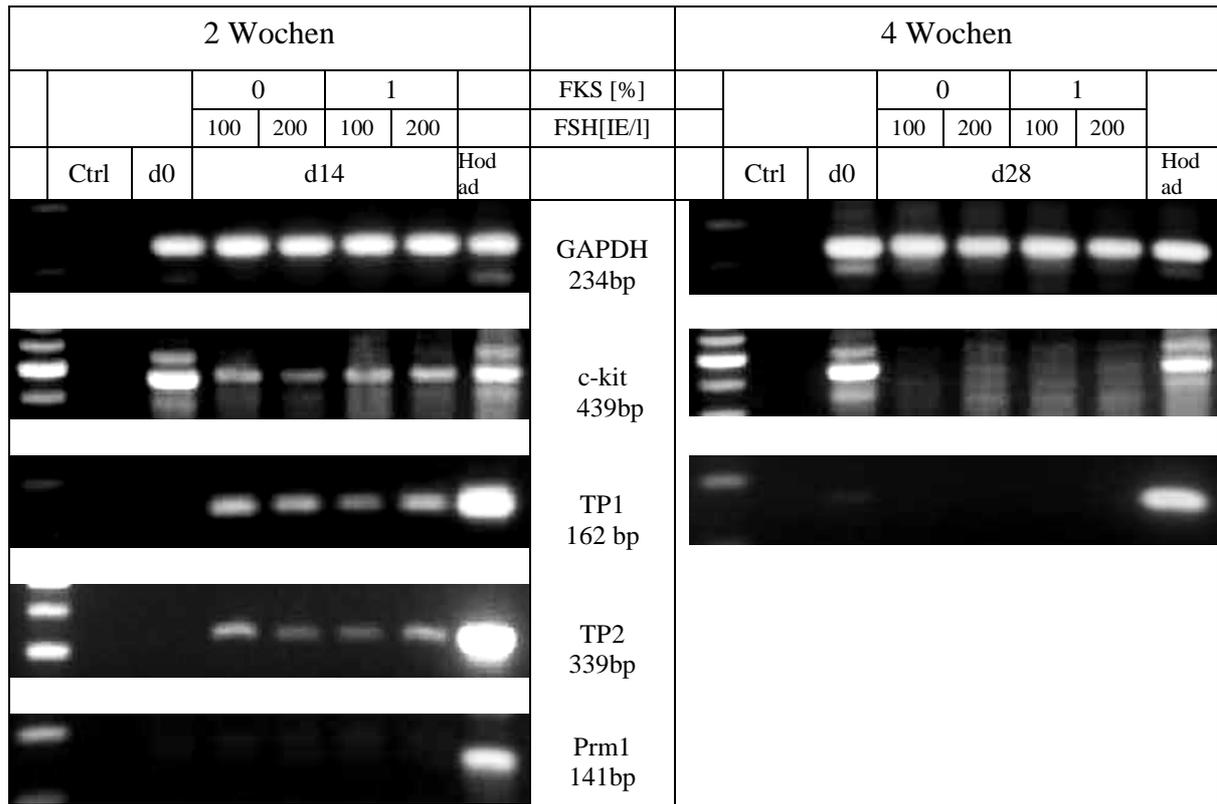
Zur Untersuchung der Differenzierung wurden testikuläre Zellen in selbst hergestelltem hormonsupplementiertem Medium kultiviert und dann das Überleben und der Differenzierungsgrad über die Genexpression verschiedener Marker, wie bei der Organkultur beschrieben (Kap. 3.4.1), bestimmt.

#### 3.3.2.1 In vitro-Differenzierung mit FSH und Testosteron

Die Differenzierung wurde sowohl mit Tubulusfragmenten im Einkammersystem als auch mit vereinzelt Zellen im Zweikammersystem (vgl. Staub et al., 2000) untersucht. Die Kulturdauer betrug 2 oder 4 Wochen, das Medium enthielt  $10^{-7}$ M Testosteron, 100 IE/l oder 200 IE/l rhFSH und 0% oder 1% FKS. Im Anschluss wurde die Genexpression von c-kit als Marker für das Überleben von Spermatogonien und Spermatocyten, von TP1 und TP2 als Marker für runde Spermatiden und von Prm1 als Marker für elongierte Spermatiden analysiert. Der genaue Versuchsablauf ist in Abbildung 27, die Ergebnisse in den Abbildungen 28 und 29 dargestellt.



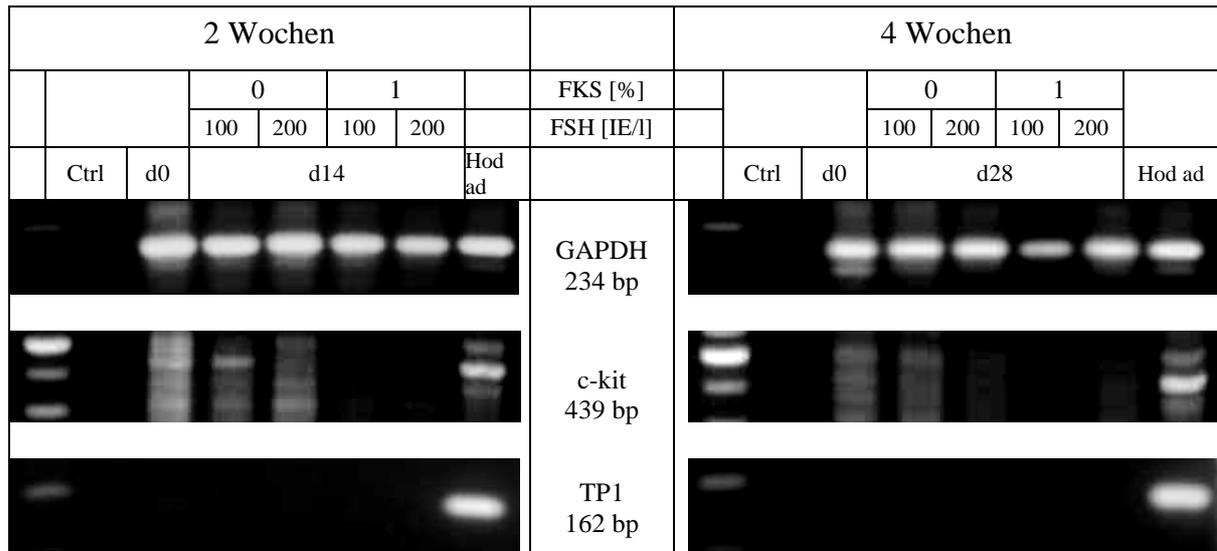
**Abb. 27:** Versuchsaufbau der Untersuchung der in vitro-Differenzierung immaturer testikulärer Keimzellen mit FSH und Testosteron; W: Wochen



**Abb. 28:** Analyse der Genexpression von Tubulusfragmenten aus 20d alten Rattenhodern nach 2- und 4-wöchiger Kultur. Das Medium enthielt  $10^{-7}$ M Testosteron und verschiedene Konzentrationen an FKS und rhFSH. Untersucht wurde die Expression von c-kit als Marker für das Überleben von Spermatogonien und Spermatocyten, TP1 und TP2 als Marker für runde Spermatiden und Prm1 als Marker für elongierte Spermatiden. **Ctrl:** Negativkontrolle; **do:** Kulturbeginn / Tag 0; **d14:** Kulturende / Tag 14; **d28:** Kulturende / Tag 28; **Hod ad:** adulter Hoden / Positivkontrolle; **FKS:** Fötales Kälberserum; **FSH:** Follikel stimulierendes Hormon

Nach 2-wöchiger Kultivierung von Tubulusfragmenten in hormonsupplementiertem Medium war die Expression von c-kit deutlich erhalten, wenn auch im Vergleich zum Ausgangszustand vermindert. Dies zeigt, dass die Spermatogonien und Spermatocyten in Tubulusfragmenten gut überleben können. Sowohl die TP1- als auch die TP2-Expression waren nach 2 Wochen im Vergleich zum Ausgangszustand gesteigert, was bedeutet, dass in diesem Zeitraum in vitro eine Differenzierung zu runden Spermatiden stattgefunden hat. Die Prm1-Expression blieb jedoch aus, was eine fehlende Elongation anzeigt.

Die nach 4-wöchiger Kulturdauer fehlende c-kit Expression zeigt ein Absterben der Spermatogonien und Spermatocyten und die fehlende TP1- und TP2-Expression ein Absterben der innerhalb von 2 Wochen entstandenen haploiden Keimzellen.

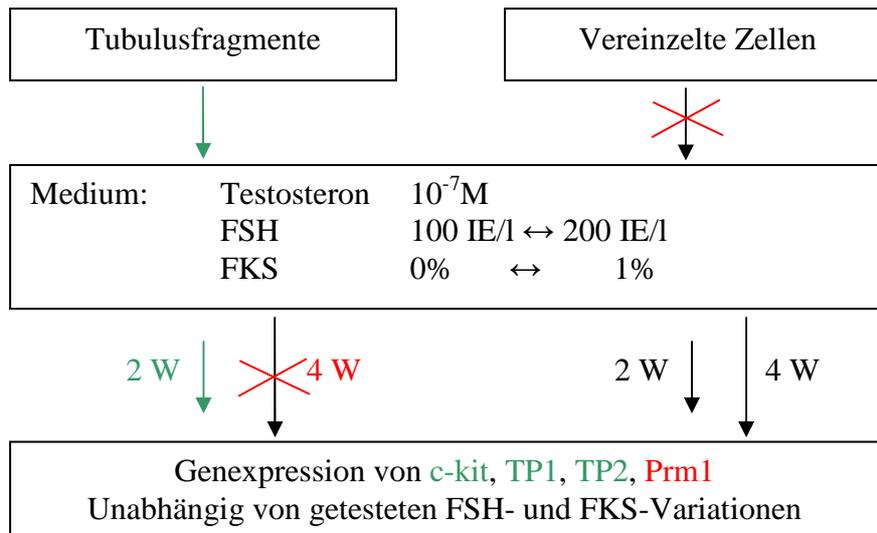


**Abb. 29:** Analyse der Genexpression in vereinzelter Zellen aus 20d alten Rattenhoden nach 2- und 4-wöchiger Kultur. Das Medium enthielt  $10^{-7}$ M Testosteron und verschiedene Konzentrationen an FKS und rhFSH. Untersucht wurde die Expression von c-kit als Marker für das Überleben von Spermatogonien und Spermatocyten, TP1 als Marker für runde Spermatiden. **Ctrl:** Negativkontrolle; **d0:** Kulturbeginn / Tag 0; **d14:** Kulturende / Tag 14; **d28:** Kulturende / Tag 28; **Hod ad:** adulter Hoden / Positivkontrolle; **FKS:** Fötales Kälberserum; **FSH:** Follikel stimulierendes Hormon

Nach 2-wöchiger Kultur vereinzelter testikulärer Zellen war die c-kit-Expression kaum noch vorhanden und nach 4 Wochen fehlte sie ganz. Dies zeigt ein frühes Absterben der Keimzellen innerhalb der ersten 2 Wochen. Des weiteren findet keine Differenzierung zu haploiden Zellen statt, wie an der fehlenden TP1-Expression erkennbar ist. Aufgrund der fehlenden Expression von TP1 wurde auf die Untersuchung der Marker für weiter fortgeschrittenere Differenzierung, TP2 und Prm1, verzichtet.

### Medium

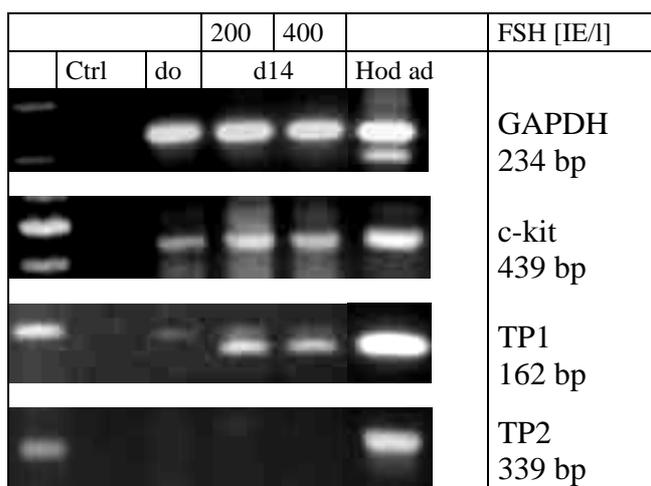
Es waren keine Unterschiede in der Expression des Spermatogonien- und Spermatocytenmarkers c-kit wie auch der Differenzierungsmarker TP1, TP2 und Prm1 zwischen den verschiedenen Zusammensetzungen des Mediums zu beobachten.



**Abb. 31:** Die in vitro-Differenzierung immaturer Keimzellen mit FSH und T war erfolgreich in Tubulusfragmenten, jedoch nicht in vereinzelt Zellen. Nach 2-wöchiger Kultur wurde mRNA von c-kit, TP1, TP2, aber nicht von Prm1 exprimiert. W: Wochen

### 3.3.2.2 In vitro-Differenzierung mit FSH alleine

In einem weiteren Versuch wurde der Einfluss von FSH alleine auf die Differenzierung von Keimzellen untersucht. Da in dem vorherigen Versuch nur in Tubulusfragmenten bei 2-wöchiger Kulturdauer eine Differenzierung zu beobachten war (vgl. Abb. 31), arbeiteten wir ausschließlich in diesem System weiter. Da 1% FKS im Vergleich zu 0% FKS keinen Einfluss auf das Überleben oder die Differenzierung gezeigt hatte, wurde es in diesem Versuchsansatz weggelassen.



**Abb. 32:** Analyse der Genexpression in Tubulusfragmenten aus 20d alten Rattenhoden nach 2-wöchiger Kultur. Das Kulturmedium enthielt nur rhFSH. Untersucht wurde die Expression von c-kit als Marker für das Überleben von Spermatogonien und Spermatozyten, von TP1 und TP2 als Marker für runde Spermatozyten. **Ctrl:** Negativkontrolle; **do:** Kulturbeginn/Tag 0; **d14:** Kulturende/Tag 14; **Hod ad:** adulter Hoden/ Positivkontrolle; **FSH:** Follikel stimulierendes Hormon

Die Keimzellen zeigten mit FSH alleine ein gutes Überleben innerhalb der 2-wöchigen Kulturperiode, wie an der deutlich vorhandenen c-kit-Expression zu erkennen war. Die TP1-Expression war nach 2-wöchiger Kultur im Vergleich zum Ausgangszustand erhöht, was zeigte, dass auch mit FSH alleine eine Differenzierung zu runden Spermatiden möglich ist. Eine TP2-Expression konnte jedoch nicht festgestellt werden. In diesem Versuch konnten sich also Spermatozyten innerhalb von 2 Wochen mit 200 IE/l FSH in Abwesenheit von Testosteron zu runden Spermatiden differenzieren. Dass nur TP1, jedoch nicht TP2 exprimiert wurde, kann ein Hinweis dafür sein, dass für den nächsten Differenzierungsschritt Testosteron benötigt wird. Sowohl beim Überleben als auch bei der Differenzierung war kein Unterschied in der Genexpression von c-kit, TP1 und TP2 zwischen 200 IE/l und 400 IE/l FSH messbar.

### **3.3.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse zur in vitro-Differenzierung**

Im Kultursystem mit Tubulusfragmenten waren nach 2 Wochen positive PCR-Marker für Überleben und Differenzierung der Keimzellen vorhanden. Dieses Kultursystem war das einzige, in dem die Keimzellen ein hinreichendes Überleben zeigten und sich innerhalb von 2 Wochen zu runden Spermatiden differenzierten. Enthielt das Medium als einziges Hormon FSH, wurde das Transition Protein 1 exprimiert. Enthielt das Medium FSH und Testosteron wurde auch das Transition Protein 2 exprimiert, was auf ein fortgeschrittenes Entwicklungsstadium der runden Spermatiden hinweist. Protamin 1, ein Marker für elongierte Spermatiden, wurde jedoch in beiden Ansätzen nicht exprimiert (Abb. 33).

Sowohl das Kultursystem mit vollkommen vereinzelt Zellen als auch die Organkultur haben sich für die Differenzierung von Keimzellen nicht bewährt, denn nach 2 Wochen waren sowohl die Marker für das Überleben von Spermato gonien und Spermato cyten als auch die Marker, die die Differenzierung der Keimzellen anzeigen, negativ.

Nach 4 Wochen waren in allen drei Kultursystemen weder der Überlebensmarker c-kit noch die Differenzierungsmarker TP1, TP2, Prm1 positiv (Abb. 33).

		c-kit Überleben	TP1 Runde Spd	TP2 Elongierte Spd	Prm1 Elongierte Spd
<b>Ganzes Organ (FSH + T)</b>					
<b>Tubulus- fragmente</b>	<b>FSH</b>				
	<b>FSH + T</b>				
<b>Vereinzelte Zellen (FSH + T)</b>					

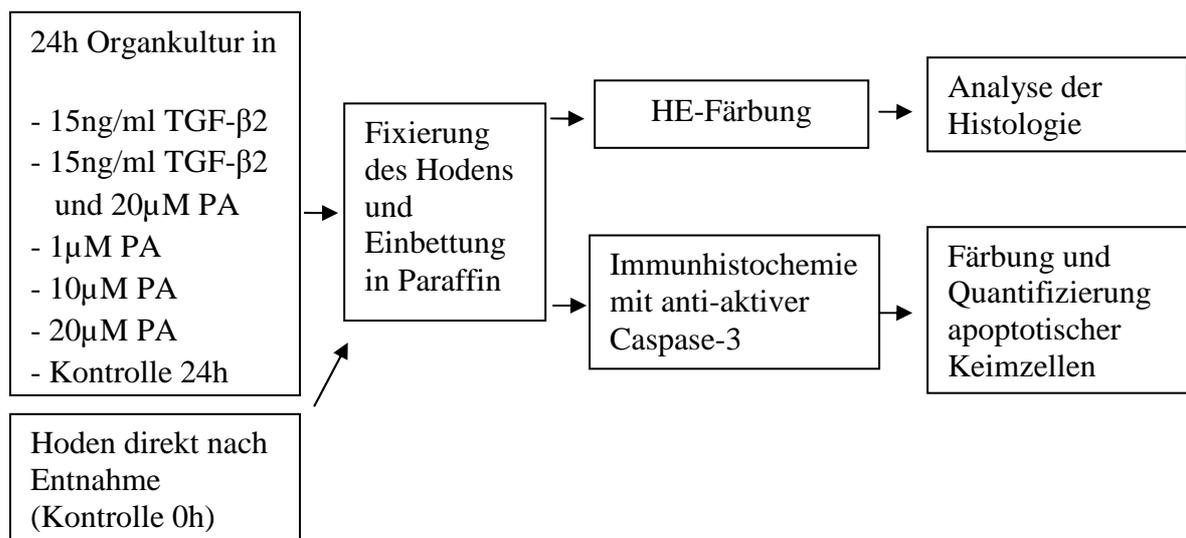
**Abb. 33:** Überblick über die Ergebnisse der in-vitro-Differenzierung immaturer testikulärer Zellen in der Organkultur, durchgeführt in Tubulusfragmenten und vereinzelter Zellen in hormonsupplementiertem Medium ( $10^{-7}$ M T und 200 IE/1 rhFSH oder 200 IE/1 rhFSH alleine), Kulturdauer 2 Wochen. FSH: Follikel stimulierendes Hormon; T: Testosteron

Das Überleben und das Fortschreiten der Differenzierung werden durch die grünen Pfeile dargestellt. In Organkultur war das Überleben der Keimzellen mäßig, es konnte keine Differenzierung beobachtet werden. In Tubulusfragmenten war das Überleben der Keimzellen sehr gut und es konnte Differenzierung beobachtet werden, die mit FSH und T zusammen weiter voran schritt als mit FSH alleine. Als vereinzelter Zellen war das Überleben der Keimzellen schlecht, es wurde keine Differenzierung beobachtet.

### 3.4 APOPTOSE PRIMÄRER TESTIKULÄRER ZELLEN IN VITRO

#### 3.4.1 Untersuchung TGF- $\beta$ 2-induzierter Keimzellapoptose in der Organkultur

Zur Untersuchung TGF- $\beta$ 2-induzierter Keimzellapoptose wurden Organkulturen mit verschiedenen Konzentrationen an TGF- $\beta$ 2 und einem Peptidantagonisten (PA) gegen TGF- $\beta$ 2 durchgeführt. Ein zur Kontrolle für 24h ohne Zusätze inkubierter immaturer Hoden, sowie ein direkt nach Entnahme fixierter Hoden, der die in vivo Situation wiedergibt, dienten als Vergleich. Im Anschluss wurde eine HE-Färbung zur Beurteilung der Histologie und eine immunhistochemische Färbung mit anti-aktiver-Caspase-3 zur Quantifizierung der Keimzellapoptose durchgeführt. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 34 dargestellt.



**Abb. 34:** Versuchsablauf der Untersuchung TGF- $\beta$ 2 induzierter Keimzellapoptose in Organkultur.

**Histologie**

1) Der Vergleich des direkt nach Entnahme fixierten Hodens (Abb. 35 A), mit dem für 24h kultivierten Kontrollhoden (Abb. 35 C) zeigt, dass während der 24-stündigen Kultur sowohl Zellen aus dem Intertubulärraum als auch innerhalb der Tubuli seminiferi verloren geht. Dies wird durch eine zunehmende Unregelmäßigkeit der Zellen innerhalb des Tubulus deutlich. Die Entstehung von Lücken weist auf eine Abnahme der Zellzahl im Vergleich zum Ausgangszustand hin. Des weiteren ist eine Chromatinkondensation, v.a. der Spermatozyten, und das Vorkommen dysmorpher Zellen im Lumen zu beobachten.

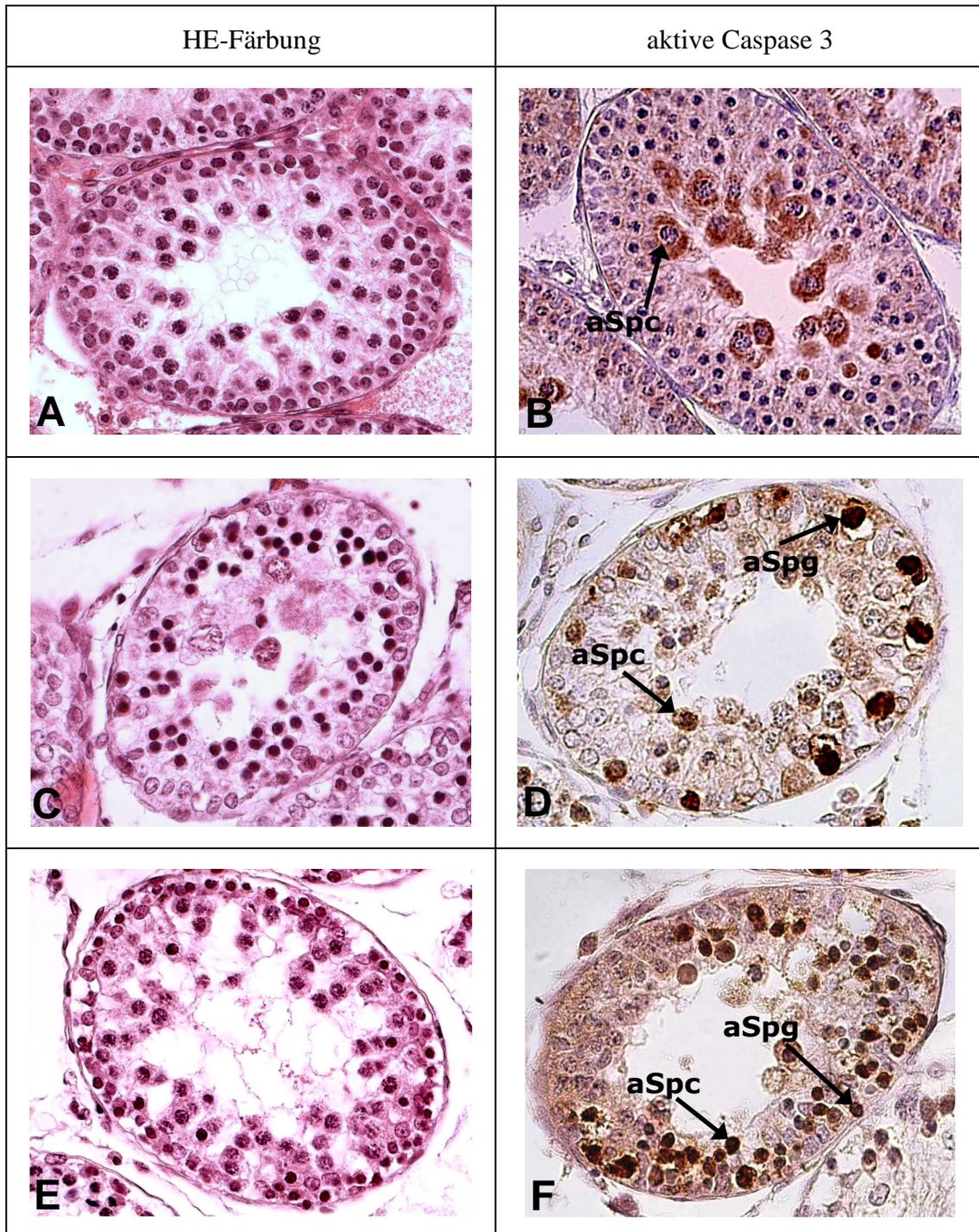
2) Die Behandlung mit 15ng/ml TGF- $\beta$ 2 führte zu einer weiteren Reduktion der Zellzahl im Tubulus und einer Auflockerung des Gewebes (Abb. 35 E), die jedoch nicht immer gleichmäßig zu beobachten war.

3) Die Behandlung mit dem Peptidantagonisten alleine oder in Kombination mit TGF- $\beta$ 2 führte zu keiner histologisch fassbaren Veränderungen, weshalb hiervon keine Photos dargestellt sind.

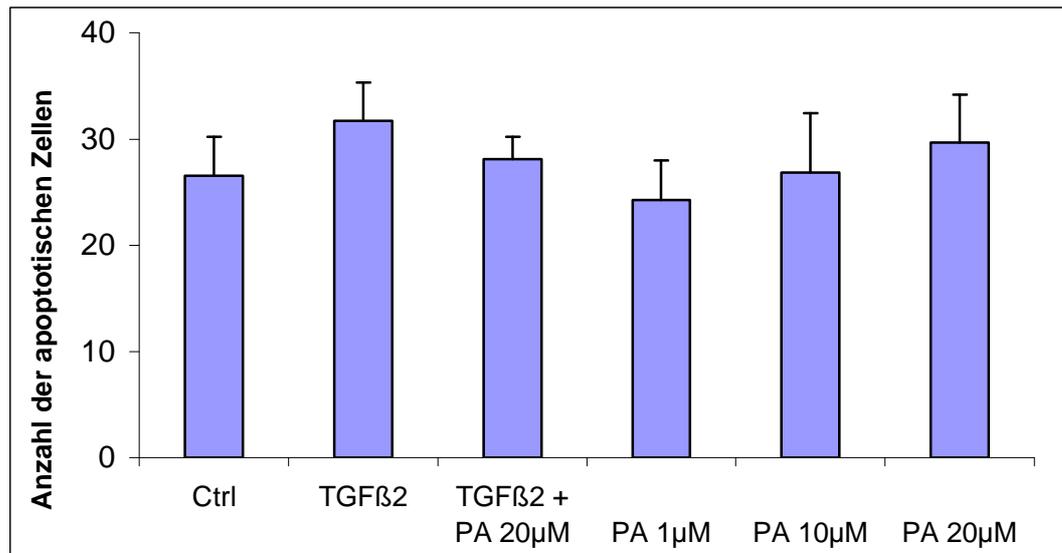
**Apoptose**

1) Die Lokalisation der apoptotischen Zellen in vivo unterschied sich deutlich von der in den kultivierten Hoden. In vivo war die Caspase-3 vor allem in luminal gelegenen Spermatozyten aktiviert (Abb. 35 B), während nach 24h Organkultur vor allem Spermatoγονien und basal gelegene Spermatozyten apoptotisch wurden (Abb. 35 D).

2) Die Behandlung mit 15ng/ml TGF- $\beta$ 2 führte, im Vergleich zum Kontrollhoden 24h, zu einer Zunahme der Caspase-3 positiven Zellen, vor allem der Spermatoγονien und Spermatozyten (Abb. 35 F). Dies war jedoch statistisch nicht signifikant.



**Abb. 35:** Tubulusstruktur (HE Färbung: A, C, E) und Keimzellapoptose (anti-aktive Caspase-3 Färbung: B, D, F) in immaturren Rattenhoden nach 24-stündiger Organkultur; **A, B:** Kontrolle 0h / in vivo Situation; **C, D:** Kontrolle 24h; **E, F:** 24h Behandlung mit 15ng/ml TGF- $\beta$ 2; Vergrößerung 400x; Mit Pfeilen sind Caspase-3 positive apoptotische Spermatogonien (aSpg) und Spermatocyten (aSpc) gekennzeichnet. Die Anzahl der apoptotischen Zellen steigt bei 24h-stündiger Stimulation mit TGF- $\beta$ 2 in Organkultur versus Kontrolle ohne Stimulation an. Im Vergleich zu in vivo sind vor allem basal gelegene Spermatocyten und Spermatogonien von der Apoptose betroffen.

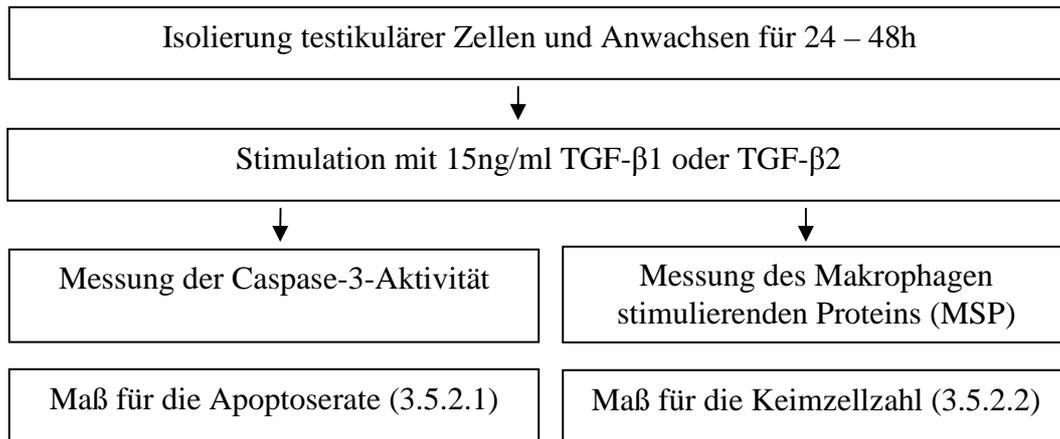


**Abb. 36:** Anzahl der Caspase-3 positiven apoptotischen Zellen in Abhängigkeit von den verschiedenen Behandlungen. Angabe des Mittelwertes + Standardfehler des Mittelwertes, Anzahl der Versuchsdurchführungen = 6; PA: Peptidantagonist

Zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen sind keine signifikanten Unterschiede vorhanden. Jedoch sind Trends zu erkennen: Bei Behandlung mit 15ng/ml TGF-β2 stieg die Anzahl der apoptotischen Zellen leicht an und wurde durch Zugabe des Peptidantagonisten wiederum verringert. Bei Applikation des Peptidantagonisten alleine war eine dosisabhängige Zunahme der apoptotischen Zellen zu beobachten.

### 3.4.2 Untersuchung der TGF-β1- und TGF-β2- induzierten Keimzellapoptose in der Zellkultur

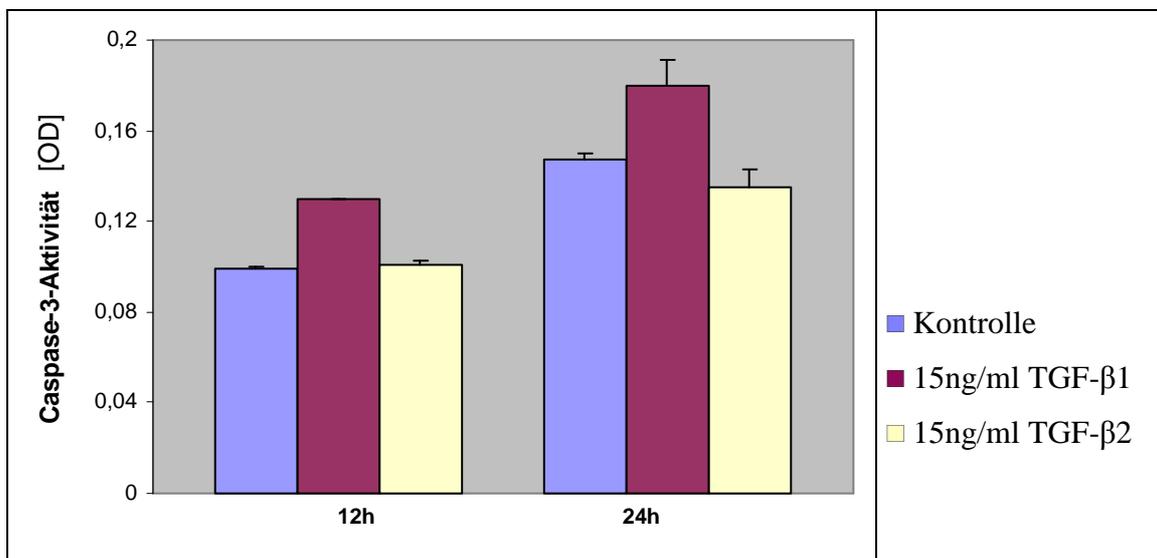
Zur Untersuchung der TGF-β1- und -β2-induzierten Apoptose im Zellkultursystem wurden Tubulusfragmente und vereinzelte Zellen für 24h mit TGF-β1 und TGF-β2 inkubiert. Im Anschluss wurde die Apoptoserate über die Caspase-3 Aktivität gemessen. Hiermit wurde jedoch die Apoptose aller in dem Zellgemisch vorhandenen Zellen, wie Sertoli-Zellen, Peritubulärzellen und Leydigzellen, gemessen. Da uns ausschließlich die TGF-β-induzierte Apoptose der Keimzellen interessierte, bestimmten wir parallel die Konzentration an MSP, welches ausschließlich von Keimzellen produziert wird und so ein Maß für die Keimzellanzahl darstellt. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 37 dargestellt.



**Abb.37:** Versuchsaufbau der Analyse TGF- $\beta$ -induzierter Keimzellapoptose in der Zellkultur

### 3.4.2.1 Caspase-3 Aktivität

Die Caspase-3 ist ein zentrales Enzym in der apoptotischen Signalkaskade (vgl. 1.4.2). Die Aktivität wurde mit einem kolorimetrischen Assay gemessen und spiegelt die Anzahl der apoptotischen Zellen in den verschiedenen Ansätzen wider.



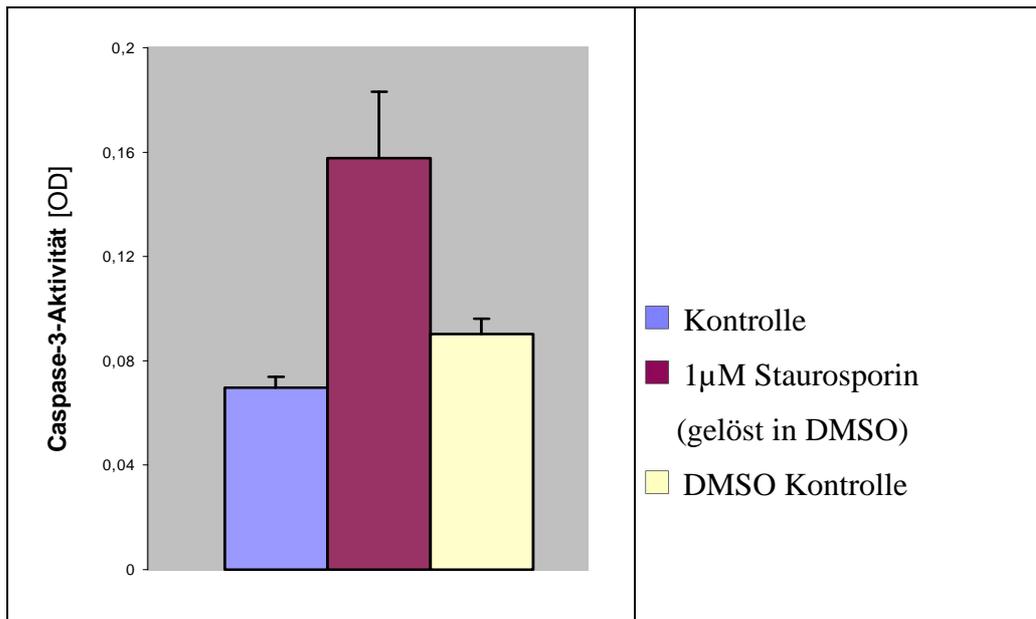
**Abb. 38:** Caspase-3-Aktivität in primären testikulären Zellen nach Stimulation mit 15ng/ml TGF- $\beta$ 1 oder TGF- $\beta$ 2. Angabe des Mittelwertes + Standardabweichung; Anzahl der Versuchsdurchführungen = 2.

Nach 12-stündiger Stimulation mit 15ng/ml TGF- $\beta$ 1 war die Caspase-3-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle auf das 1,3-fache erhöht. Bei Stimulation mit 15ng/ml TGF- $\beta$ 2 war keine Veränderung der Caspase-3 Aktivität zu beobachten. Nach 24-stündiger Inkubation war die Caspase-3-Aktivität bei TGF- $\beta$ 1 auf das 1,26-fache erhöht und bei TGF- $\beta$ 2 war wieder keine Veränderung zu beobachten. Dies zeigt, dass nur TGF- $\beta$ 1 und

nicht TGF- $\beta$ 2 die Apoptose in testikulären Zellen induziert. Bei diesem Versuch war die Anzahl der Durchführungen zu gering, um eine statistische Auswertung durchzuführen.

### Stimulation mit Staurosporin / Positivkontrolle

Als Positivkontrolle des kolorimetrischen Caspase-3-Assays wurden mit Staurosporin behandelte HeLa-Zellen eingesetzt.



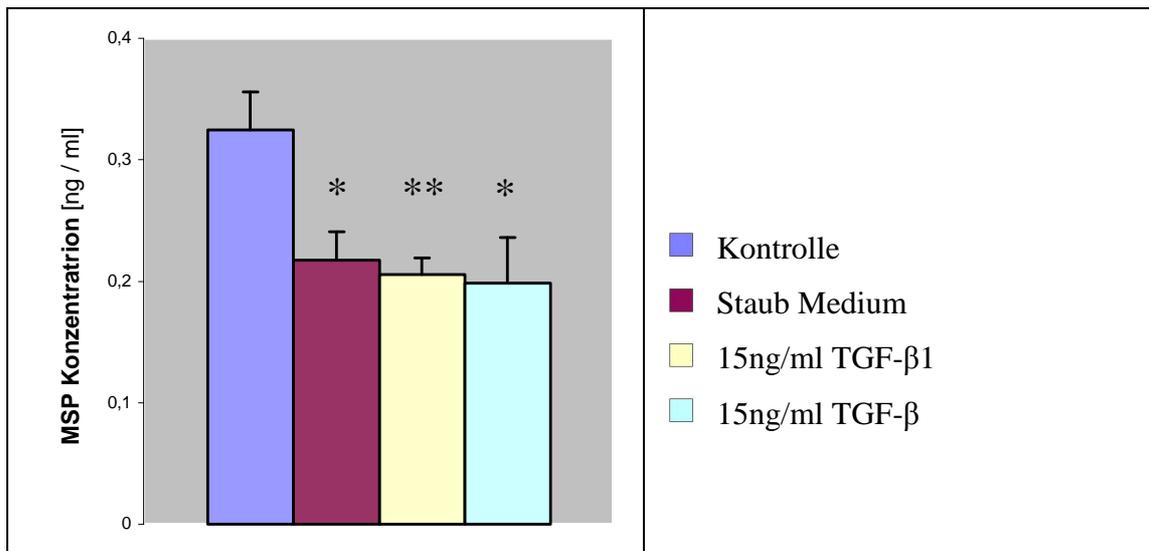
**Abb. 39:** Caspase-3-Aktivität in HeLa-Zellen nach Behandlung mit 1  $\mu$ M Staurosporin. Angabe des Mittelwerts + Standardfehler des Mittelwertes, Anzahl der Versuchsdurchführungen = 4.

Die Behandlung mit Staurosporin (gelöst in DMSO) erhöhte die Caspase-3 Aktivität auf das 2,3-fache der Kontrolle, wobei die Behandlung mit DMSO alleine schon die Caspase-3 Aktivität auf das 1,3-fache der Kontrolle erhöht. Somit macht das Staurosporin alleine nur eine 1,75-fache Erhöhung der Caspase-3 Aktivität aus.

Für die Fragestellung spielte dies jedoch keine Rolle, da diese Behandlung nur als Positivkontrolle diente und lediglich anzeigen sollte, dass der Test funktioniert, d.h. eine Erhöhung der Caspase-3-Aktivität messbar sein sollte, was hierbei der Fall war.

### 3.4.2.2 Makrophagen stimulierendes Protein

Das Makrophagen stimulierende Protein (MSP) gehört zur Familie der „hepatocyte growth factors“ und ist an der Induktion von Chemotaxis, Phagozytose und Konformationsänderungen von Makrophagen beteiligt. Es wird außer in Hepatocyten auch in Spermatogonien und Spermatozyten der Ratte produziert (Oshiro et al., 1996). Die Konzentration des MSPs wurde mit einem ELISA gemessen und spiegelt die Anzahl der Keimzellen in den verschiedenen Ansätzen wider. Der Einfluss des Hormonmediums nach Staub (2000) wurde hier ebenfalls getestet.



**Abb. 40:** MSP-Konzentration im Medium primärer testikulärer Zellen nach Stimulation mit TGF-β1, TGF-β2 und Medium nach Staub. Die Behandlung mit TGF-β1, TGF-β2 und Medium nach Staub reduzierte die Keimzellzahl im Vergleich zur Kontrolle signifikant. Darstellung des Mittelwertes + Standardfehler des Mittelwertes. Anzahl der Versuchsdurchführungen n = 8. Mit dem zweiseitigen ungepaarten t-Test ergaben sich folgende Signifikanzen: Ctrl vs Staub p = 0,0169, Ctrl vs TGF-β1 p = 0,0041, Ctrl vs TGF-β2 p = 0,0227. \*: p<0,05 / signifikant; \*\*: p<0,01 / hochsignifikant

Sowohl die 24-stündige Stimulation mit 15ng/ml TGF-β1 und TGF-β2 als auch die Kultur in Staub-Medium führten zu einer signifikanten Reduktion der MSP-Konzentration. Sie wurde durch TGF-β1 auf das 0,63-fache, durch TGF-β2 auf das 0,61-fache und durch das Staub-Medium auf das 0,67-fache der Kontrolle reduziert.

Da MSP von Spermatogonien und Spermatozyten produziert und sezerniert wird, deutet die Reduktion der MSP-Konzentration auf eine signifikante Reduktion dieser Zellarten durch Stimulation mit TGF-β1, TGF-β2 in vitro hin. Die ebenso starke Reduktion durch das Staub-Medium kann ein Hinweis dafür sein, dass es zur Kultur primärer testikulärer

Zellen weniger geeignet ist als das Standardmedium DMEM/F12, welches in der Kontrolle verwendet wurde.

**Zusammenfassung der Ergebnisse des Caspase-3 Assays und des MSP-ELISAs:**

TGF- $\beta$ 1: Durch Stimulation mit 15ng/ml TGF- $\beta$ 1 wurde in Kulturen immaturer Hodenzellen die Konzentration von MSP im Medium reduziert und die Aktivität der Caspase-3 erhöht. Dies weist auf eine Abnahme der Spermatogonien und Spermatozyten durch Apoptose hin.

TGF- $\beta$ 2: Durch Stimulation mit 15ng/ml TGF- $\beta$ 2 wurde in Kulturen immaturer Hodenzellen die Konzentration von MSP im Medium reduziert, ohne dass die Caspase-3 Aktivität erhöht war. Dies könnte auf eine nicht Caspase-vermittelte Apoptose der Spermatogonien und Spermatozyten hinweisen.

## 4 Diskussion

---

Die Spermatogenese verläuft in drei Phasen, die aus (1) der Proliferation der Stammzellen, (2) der Meiose und (3) der Spermiogenese bestehen. Sobald die Keimzellen in die Meiose eintreten, können sie sich nur noch differenzieren oder in die Apoptose gehen. Daher wurden in dieser Arbeit Kultursysteme etabliert und getestet, die sowohl die Untersuchung der Differenzierung als auch der Apoptose ermöglichen.

Im ersten Abschnitt der Diskussion werden die umfangreicheren Ergebnisse aus der in vitro-Differenzierung der Keimzellen und im zweiten Teil die Ergebnisse zur TGF- $\beta$ -induzierten Keimzellapoptose diskutiert.

### 4.1 IN VITRO DIFFERENZIERUNG IMMATURER TESTIKULÄRER KEIMZELLEN

Die Differenzierung von Keimzellen wird über ein komplexes Zusammenspiel endokriner und parakriner Faktoren sowie Zellkontakten reguliert, wobei die genauen Regulationsmechanismen erst ansatzweise verstanden sind. Zahlreiche in vitro-Systeme zur Kultivierung von Keimzellen haben zur Aufklärung dieser Mechanismen beigetragen. Jedoch sind deren Ergebnisse aufgrund der unterschiedlichen Kultursysteme, Präparation der Zellen, Kulturdauer und Zusammensetzung des Mediums nicht immer direkt miteinander vergleichbar (Übersicht in Sofikitis, 2005).

Daher war es unser Ziel, erstmals die 3 grundlegenden in vitro-Modelle zur Kultivierung männlicher Keimzellen, die Organkultur, die Kultur von Tubuli seminiferi und die Kultur vollkommen dissoziierter Zellen, unter gleich bleibenden Bedingungen bezüglich Überleben und Differenzierung der Keimzellen zu untersuchen.

Dabei wurden die besten Ergebnisse mit Tubuli seminiferi erzielt, in welchen die Differenzierung von Spermatocyten I zu runden Spermatiden, also die Meiose II, in vitro stattfand. Dies war unter dem Einfluss von FSH und Testosteron, aber auch unter dem alleinigen Einfluss von FSH innerhalb der 2-wöchigen Kulturperiode zu beobachten.

Zahlreiche Bemühungen, die gesamte Spermatogenese in vitro ablaufen zu lassen, scheiterten; einzelne Schritte der Spermatogenese hingegen wurden bereits oft in vitro nachvollzogen (z.B. Dietrich et al., 1983; Toppari & Parvinen, 1985; Le Magueresse-Battistoni et al., 1991; Weiss et al., 1997; Hue et al., 1998; Vigier et al., 2004), wobei

die Ausreifung zu Spermatozoen, die Spermiogenese, noch nie in vitro gelungen ist (Sofikitis et al., 2005). Der größte zusammenhängende Differenzierungsschritt in vitro, nämlich der Ablauf der gesamten Meiose von leptotänen Spermatozyten zu runden Spermatoziden, ist erstmals von Staub et al. (2000) beschrieben worden.

In der folgenden Diskussion werden die in der Arbeit erzielten Ergebnisse hauptsächlich mit den Resultaten von Staub et al. (2000) verglichen, da sie als Ausgangspunkt für die hier vorliegende Doktorarbeit dienen. Im Folgenden ist ein tabellarischer Überblick über die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Versuchsbedingungen unserer Versuche und der von Staub et al. (2000) dargestellt (Tab. 7). Die Gemeinsamkeiten sind in schwarzer, die Unterschiede in roter Schrift geschrieben und die Dinge, die einen Vorteil für die Keimzellendifferenzierung in vitro darstellen könnten, unterstrichen.

**Tab.7:** Gegenüberstellung der Versuchsbedingungen und Ergebnisse unserer Versuche (Laible) im Vergleich zu Staub et al. (2000)

	<b>Staub</b>	<b>Laible</b>
<b>Versuchstiere</b>	Wistar Ratten 20-22d	Wistar Ratten 20d
<b>Kultur- bedingungen</b>	32°C, 5% CO <sub>2</sub> DMEM/F12 Medium, serumfrei + 10 <sup>-3</sup> M Pyruvat + 10 <sup>-7</sup> M Testosteron + <b>ovine FSH 1ng/ml</b> + <b><u>Insulin, Transferrin, Vit. C,</u></b> <b><u>Vit. E, Retinol, Retinolsäure</u></b>	32°C, 5% CO <sub>2</sub> DMEM/F12 Medium, serumfrei + 10 <sup>-3</sup> M Pyruvat + 10 <sup>-7</sup> M Testosteron + <b><u>rh FSH 100 / 200 IE/l</u></b>
<b>Kultursystem</b>	Tubulusfragmente im <b><u>Zweikammersystem</u></b>	Tubulusfragmente im <b>Einkammersystem</b>
<b>Präparation</b>	<b><u>Enzymatische Dissoziation</u></b>	<b><u>Mechanische Dissoziation</u></b>
<b>Ergebnisse</b>	Differenzierung von leptotänen Spermatozyten zu runden Spermatoziden in 3 Wochen	Differenzierung von pachytänen Spermatozyten zu runden Spermatoziden in 2 Wochen

**Schwarz:** gleiche Versuchsbedingungen; **Rot:** unterschiedliche Versuchsbedingungen; **Unterstrichen:** Bedingungen, die eventuell vorteilhaft für die Differenzierung der Keimzellen sind.

## 4.1.1 Optimierung der Versuchsbedingungen

### 4.1.1.1 Versuchstiere und Kulturbedingungen

Bezüglich der Versuchstiere und der Kulturbedingungen stimmte der von uns gewählte Ansatz mit dem von Staub et al. (2000) überein. Wir verwendeten 20 Tage alte Wistar Ratten und wählten etablierte Standardbedingungen zur Kultivierung testikulärer Zellen. Da im Hoden, im Gegensatz zu anderen Organen, nicht die Körpertemperatur von 37°C, sondern 32°C - 35°C herrscht, sollten testikuläre Zellen bei dieser erniedrigten Temperatur kultiviert werden. Des weiteren ist das Hodengewebe sehr anfällig für oxidativen Stress, so dass eine ideale Atmosphäre aus 5% CO<sub>2</sub> in Luft besteht (Trowell, 1959; Steinberger et al., 1964).

### 4.1.1.2 Medium und Zusätze

In den letzten Jahren wurden mit dem Kulturmedium DMEM/F12 ohne Zusatz von Serum gute Ergebnisse in der Kultur testikulärer Zellen erzielt (Überblick in Staub, 2001). Daher wurde DMEM/F12 auch in diesen Versuchen verwendet. In der Frage, welche Zusätze bei der Kultur testikulärer Zellen notwendig sind, herrscht Uneinigkeit. Staub et al. (2000) setzten ihrem Medium diverse Substanzen zu (siehe Tabelle 7). Bei Verwendung dieses „Staub-Mediums“ (angefertigt von der Firma PAN) in unseren Versuchen wurde jedoch ein schlechteres Überleben der testikulären Zellen als in DMEM/F12 beobachtet. Objektiv war eine Reduktion der Keimzellanzahl messbar (vgl. 3.5.2.2). Dieser Widerspruch zu den von Staub et al. (2000) erzielten Ergebnissen mag eventuell in der schlechten Haltbarkeit der im Fertigmedium enthaltenen Substanzen begründet liegen. Für alle folgenden Versuche wurde das Medium selbst gemischt und nur die essentiellen Substanzen jeweils frisch hinzugefügt. Dies gilt für Pyruvat, da eine kurze Periode in der meiotischen Prophase beschrieben ist, in der Keimzellen keine Glucose verwerten können und sie einen alternativen Energielieferanten benötigen (Jutte et al., 1981; 1982). Des weiteren wurden die Hormone Testosteron und FSH hinzugefügt. Die Konzentration an Testosteron betrug, ebenso wie bei Staub et al. (2000), 10<sup>-7</sup>M (=28,8 ng/ml). Laut Zirkin et al. (1989) muss die Testosteronkonzentration im Hoden etwa 70 ng/ml betragen, um die volle spermatogenetische Potenz zu beobachten. Unterhalb von 20 ng/ml ist die Spermatogenese stark eingeschränkt. Damit liegt die Testosteronkonzentration bei unseren Versuchen mit 28,8 ng/ml zwar in einem akzeptablen, jedoch nicht im idealen

Konzentrationsbereich. Die FSH-Konzentration betrug 100 - 200 IE und im Gegensatz zu Staub et al. (2000) wurde humanes rekombinantes FSH und nicht Schaf-FSH verwendet.

Die Verwendung von Serum in der Kultur testikulärer Zellen mit dem Ziel der Differenzierung ist weitgehend verlassen worden (Übersicht bei Staub, 2001). Serum wirkt positiv auf die Proliferation und somit auf das Überleben (Marret & Durand, 2000), v.a. der somatischen Zellen (Creemers et al., 2002), hat jedoch nicht exakt aufgeklärte Einflüsse auf die Differenzierung der Keimzellen. Da Serum keine fest definierte Zusammensetzung hat, kann die Zugabe unvorhersehbare Einflüsse auf die Versuche haben, so dass die Experimente eventuell nicht reproduzierbar sind. In den Versuchen zur Differenzierung immaturer Keimzellen wurde 1% FKS gegen vollkommen serumfreies Kulturmedium getestet und in dieser Konzentration weder ein positiver noch ein negativer Einfluss des Serums auf das Überleben und die Differenzierung der Keimzellen festgestellt (vgl. Abb. 28, 29).

Als weiterer Zusatz wurde Extrazellulärmatrix (ECM) in der Kultur testikulärer Zellen getestet und dabei beobachtet, dass es *in vitro* zu einer dreidimensionalen Anordnung der Zellen mit Nachahmung der Tubulusstruktur kommt, wie sie schon von Hadley et al. (1985) beschrieben worden war. Dies weist stark darauf hin, dass mittels ECM die natürliche Umgebung nachgeahmt und Zell-Kontakte induziert werden bzw. erhalten bleiben, was optimale Voraussetzungen für die *in vitro*-Differenzierung schafft. Die Überlegenheit gegenüber Kultursystemen ohne ECM bezüglich Überleben und Differenzierung zeigten sowohl Lee et al. (2006) als auch Marret & Durand (2000). Leider ist es uns nicht gelungen, Überlebens- und Differenzierungsanalysen analog zu den anderen Kulturen durchführen, da sich am Ende der Kultivierungsdauer Zellen und ECM nicht sauber voneinander trennen ließen und somit eine PCR-Analyse nicht möglich war.

#### **4.1.2 Kultur von Tubulusfragmenten**

Analog zu Staub et al. (2000) wurden zur Kultivierung testikulärer Zellen auch Tubulusfragmente kultiviert. Hierbei bleibt die unmittelbare Umgebung der Keimzellen und somit alle Zell-Zell-Kontakte erhalten. Des Weiteren ermöglicht sie eine ausreichende Ernährung der Keimzellen durch Diffusion. Ebenso ist das Überleben der

Zellen in Tubulusfragmenten besser als bei vereinzelt Zellen (Marret & Durand, 2000), was eine notwendige Voraussetzung für die Differenzierung darstellt.

Nach wenigen Tagen wuchsen die in den Tubulusfragmenten enthaltenen Zellen an den offenen Enden auf die Kulturplatte aus und nehmen dabei die Keimzellen mit, wie schon 1976 von Eddy & Kahri beobachtet wurde.

#### **4.1.2.1 Gewinnung der Tubulusfragmente**

Staub et al. (2000) erhielten ihre Tubulusfragmente durch enzymatische Dissoziation. Dies ist ein kritischer Punkt für den Erfolg des gesamten Experiments, da dieser Schritt sehr von der Erfahrung des Durchführenden und der Einwirkungszeit der Enzyme abhängig ist. Staub et al. (2000) haben die Beobachtung gemacht, dass der Erfolg der Kultur sowohl stark von der Größe der Tubulusfragmente als auch vom Grad der enzymatischen Verdauung abhängt. Beides sind Größen, die schwer zu standardisieren sind.

Die von uns verwendete Präparationstechnik der Tubulusfragmente beruhte auf mechanischer Dissoziation mit einer speziellen Apparatur (Medimachine, BD). Dabei wird das Gewebe zunächst schonend zerkleinert und im Anschluss Zellen oder Zellaggregate bestimmter Größe mit standardisiertem Zubehör gewonnen (vgl. 2.2.1.3). Dieses System ist unabhängig von der Erfahrung des Durchführenden und liefert, unabhängig von der Person, immer die gleichen Größen an Tubulusfragmenten. Weiterhin ist es möglich, durch Variation des Zubehörs die Größe der Gewebestücke zu verändern. Somit steht für diese Versuche eine standardisierte Methode zur Verfügung, um unter gleich bleibenden Bedingungen Tubulusfragmente zu gewinnen und zuverlässig reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Darüber hinaus ist das mechanische Verfahren schonender für Oberflächenrezeptoren, die bei der enzymatischen Dissoziation verloren gehen können.

#### **4.1.2.2 Überleben der Keimzellen in Tubulusfragmenten**

Das Überleben der Spermatogonien und Spermatozyten in den Tubulusfragmenten wurde anhand der c-kit-Expression gemessen. Nach einer 2-wöchigen Kulturperiode wurde noch eine deutliche c-kit Expression in den Tubulusfragmenten beobachtet, was ein gutes Überleben der Keimzellen anzeigt. Nach 4-wöchiger Kultivierungsdauer war die c-kit-Expression jedoch kaum noch vorhanden, was ein Absterben eines Großteils der Keimzellen anzeigte. Bei Staub et al. (2000) betrug die Anzahl der Keimzellen nach

4 Wochen noch 20% der Ausgangspopulation. Dieser Wert wurde durch Zählung der überlebenden Keimzellen unter dem Mikroskop ermittelt, während die in unseren Versuchen ermittelte c-kit-Expression nur die tatsächlich stoffwechselaktiven Keimzellen erfasst und somit im Vergleich zu Staub et al. (2000) geringere Werte ermittelt. Da unsere Methode nur eine semiquantitative Analyse ermöglicht sind diese Resultate schlecht mit denen von Staub et al. (2000) vergleichbar.

Das sehr gute 2-wöchige und kaum noch vorhandene 4-wöchige Überleben der Keimzellen war sowohl bei Versuchen mit FSH alleine als auch bei gemeinsamer Verwendung von FSH und Testosteron zu beobachten. Vigier et al. (2004) fanden heraus, dass Testosteron und FSH die Überlebenshalbwertszeit der Keimzellen nicht beeinflusst, sondern nur die Differenzierung stimuliert. Dies steht jedoch im Gegensatz zu der Sichtweise, dass sowohl Testosteron als auch FSH anti-apoptotisch auf Keimzellen wirken (Print & Loveland, 2000).

Unterschiede im Kultursystems von Staub et al. (2000), die sich positiv auf das Überleben der Keimzellen auswirken können, sind zusätzliche zugegebene Faktoren, sowie die Verwendung von Zweikammersystemen (vgl. Tab. 7). Diese ermöglichen den Sertoli-Zellen, das Medium zu konditionieren und so ein Milieu zu schaffen, dass dem im Hoden ähnlich ist.

#### **4.1.2.3 Differenzierung der Keimzellen in Tubulusfragmenten**

Die bei unseren Versuchen verwendeten 20 Tage alten Wistar Ratten wiesen als fortgeschrittenste Keimzellen der Spermatogenese meist frühe pachytäne Spermatocyten auf. Nach zweiwöchiger Kultivierung mit  $10^{-7}$ M Testosteron und 100 IE/l rhFSH wurden sowohl das Transition Protein 1 als auch das Transition Protein 2 exprimiert. Dies zeigt die Entstehung haploider Keimzellen in vitro an (Hecht, 1990; Alfonso & Kistler, 1993). Die Ausgangszellen bei Staub et al. (2000) waren leptotäne Spermatocyten, welche BrdU-markiert waren. Die Differenzierung wurde anhand der Markierung verfolgt. Die Entwicklung erster runder Spermatiden war erst nach 3 Wochen zu beobachten, die Zunahme der TP1- und TP2-Expression verlief jedoch kontinuierlich. Die TP1-Expression war dabei nach 14 Tagen etwa verdoppelt und die TP2-Expression verfünffacht. Da die Genexpression in unseren Versuchen lediglich semiquantitativ gemessen wurde, können keine direkten Vergleiche gezogen werden. Anhand der Bandenbreite ist jedoch mindestens eine Verdopplung der Genexpression von TP1 und TP2 erkennbar.

**Expression von TP1 / TP2 unter gemeinsamem Einfluss von Testosteron und FSH**

Unter Einfluss von FSH und Testosteron war ein drastischer Anstieg der TP1- und TP2-Expression zwischen Kulturbeginn und dem Kulturende nach 14 Tagen zu beobachten. Daraus kann man folgern, dass die zu Kulturbeginn am weitesten fortgeschrittenen Keimzellen, die pachytänen Spermatocyten, sich innerhalb von 2 Wochen zu runden Spermatiden differenziert haben und nun TP1 und TP2 exprimieren. Weitere Arbeitsgruppen haben bestätigt, dass dieser Differenzierungsschritt innerhalb von 2 Wochen *in vitro* ablaufen kann (Weiss et al., 1997; Vigier et al., 2004).

Nach einer Kulturdauer von 4 Wochen war, bei kaum vorhandener c-kit-Expression, weder eine Expression von TP1 noch von TP2 vorhanden. Dies deutet auf ein Absterben, sowohl der Ausgangszellen (Spermatogonien und Spermatocyten) als auch der nach 2 Wochen gebildeten runden Spermatiden hin, die laut Weiss et al. (1997) in Kultur eine sehr begrenzte Lebensdauer haben.

In hpg-Mäusen, die mit Testosteron und FSH substituiert wurden, lief die Spermatogenese *in vivo* quantitativ und qualitativ vollständig ab (Haywood et al., 2003). *In vitro* gelingt dies mit Testosteron und FSH jedoch nicht. Dies zeigt deutlich, dass noch weitere Faktoren, die bisher unbekannt sind und *in vitro* fehlen, eine essentielle Rolle für die Spermatogenese spielen. Jedoch nicht nur unbekannte Faktoren, auch die schon erwähnte stark begrenzte Überlebensfähigkeit der Keimzellen *in vitro*, limitiert deren Differenzierungsprozess.

Trotzdem ist es uns in diesem Kultursystem gelungen, die Differenzierung von Spermatocyten zu runden Spermatiden, d.h. die entscheidenden Schritte der Meiose II *in vitro* nachzuvollziehen. Dies wurde, im Vergleich zu Staub et al. (2000) mit einem einfacheren und auf wesentlichere Dinge reduzierten, zuverlässig reproduzierbarem Kultursystem erreicht.

**Expression von TP1 / TP2 unter alleinigem Einfluss von FSH**

In einem zweiten Versuch wurde der alleinige Einfluss von FSH auf die Differenzierung getestet. Dabei war nach der gleichen Beobachtungszeit von 2 Wochen lediglich eine TP1-, aber keine TP2-Expression vorhanden. Ein Erklärungsansatz für diesen Unterschied ergibt sich aus dem unterschiedlichen Stellenwert, den Testosteron und FSH in der Spermatogenese haben. Ohne FSH ist die Kapazität der Spermatogenese vermindert, es besteht jedoch keine Infertilität, d.h. FSH ist für das qualitativ

vollständige Ablaufen der Spermatogenese nicht essentiell, sondern bestimmt deren Quantität (Krishnamurthy et al., 2000; Haywood et al., 2003). Ohne Testosteron hingegen kann die Spermatogenese qualitativ nicht vollständig ablaufen. Es ist sowohl für die Vollendung der Meiose, als auch für die darauf folgende Spermiogenese mit Entstehung von Spermatozoen essentiell (O'Donnell et al., 1994; Singh et al., 1995; De Gendt et al., 2004).

Da Testosteron bei der Vollendung der Meiose eine wesentliche Rolle spielt, bietet dies eine Erklärung dafür, dass die Differenzierung mit FSH alleine weniger weit voranschreitet (nur TP1-Expression) als mit Testosteron zusammen (TP1- und TP2-Expression).

#### **4.1.2.4 Zeitachse der Differenzierung in vitro**

Der zeitliche Ablauf der pubertären Spermatogenese ist in Russell et al. (1987) dargestellt. Danach enthalten die Tubuli seminiferi 20 Tage alter Sprague-Dawley Ratten als fortgeschrittenste Keimzellen pachytäne Spermatozyten im letzten Stadium. Dies entspricht in etwa unseren Wistar Ratten, die im Alter von 20 Tagen frühe bis mittlere pachytäne Spermatozyten als fortgeschrittenste Keimzellen aufweisen. Laut Russell et al. (1987) beginnt die Elongation ab dem postnatalen Tag 28, erste Spermatozoen finden sich am Tag 38. Daraus ergibt sich für die in vitro-Differenzierung, dass aus den frühen pachytänen Spermatozyten in 20 Tage alten Hoden nach einer Kultivierungsdauer von 14 Tagen am 34. postnatalen Tag elongierte Spermatozyten entstanden sein sollten, vorausgesetzt die in Entwicklung verläuft in vitro ebenso schnell wie in vivo. In unserem Kultursystem wurden nach 14 Tagen jedoch lediglich die Marker für runde Spermatozyten, TP1 und TP2, aber nicht das für elongierte Spermatozyten charakteristische Prm1 exprimiert. Somit gehen wir davon aus, dass runde Spermatozyten gebildet wurden, aber keine Elongation stattgefunden hat. Dies deckt sich mit der Beobachtung von Perrard et al. (2003), die in ihrem System eine Verzögerung der Differenzierung immaturer Keimzellen in vitro von mindestens 6 Tagen zum Ablauf in vivo beobachteten.

Nach Clermont et al. (1959) benötigt die Differenzierung früher pachytäner Spermatozyten zu runden Spermatozyten Stadium I mindestens 12 Tage (vgl. Abb. 2). Dieser zeitliche Ablauf der Spermatogenese-Stadien ist jedoch nur bei adulten Ratten mit etablierter Spermatogenese gültig und stimmt nicht notwendigerweise mit dem zeitlichen Ablauf der ersten spermatogenetischen Welle in der Pubertät überein, welche

wir *in vitro* untersuchten. Jedoch wäre nach Clermont et al. (1959) die Differenzierung von pachytänen Spermatozyten zu runden Spermatischen ohne weiteres innerhalb von 2 Wochen möglich.

Die Untersuchung der Expression stadienspezifischer Marker während der ersten spermatogenetischen Welle durch Marret et al. (1998), liefert bessere Hinweise über den zeitlichen Ablauf der Keimzellendifferenzierung in der Pubertät und ist direkt mit unseren Ergebnissen vergleichbar: Laut Marret et al. (1998) beginnt die TP1-mRNA-Expression in runden Spermatischen um den postnatalen Tag 32, die Expression von TP2-mRNA folgt ab dem postnatalen Tag 34. Diese *in vivo*-Beobachtung deckt sich mit unseren *in vitro*-Ergebnissen, in denen nach zweiwöchiger Kulturdauer, d.h. am postnatalen Tag 34, sowohl eine TP1- als auch TP2-Expression vorhanden war. Dies zeigt, dass die Keimzellendifferenzierung von pachytänen Spermatozyten zu runden Spermatischen unter den hier etablierten Kulturbedingungen *in vitro* im Vergleich zu *in vivo* nicht stark verzögert verläuft.

### **4.1.3 Organkultur**

Die früheste Form, Keimzellen zu kultivieren, ist die Organkultur; hierbei werden ganze Hoden oder Stücke davon kultiviert (Staub, 2001).

#### **4.1.3.1 Überleben der Keimzellen in der Organkultur**

Die Organkulturen immaturer Hoden wurden in unseren Versuchsreihen in DMEM mit Zusatz von Testosteron und FSH für eine maximale Dauer von 3 Wochen durchgeführt. Dabei wurde beobachtet, dass die äußeren, oberflächlich gelegenen Tubuli während der gesamten Kulturzeit intakt blieben, während die inneren Anteile des Hodens stets nekrotisch wurden. Dazwischen bildete sich eine Übergangszone, in der eine massive Chromatinkondensation zu beobachten war. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die inneren Gewebeanteile bei Kultur ganzer Hoden nicht adäquat mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden können.

Solche Nekroseareale wurden auch schon von Steinberger et al. (1964) beobachtet. Sie ließen sich durch Erhöhung des O<sub>2</sub>-Anteils in der Atmosphäre verringern, was jedoch wiederum durch erhöhten oxidativen Stress die Spermato gonien und Spermatozyten schädigte, so dass dies keine brauchbare Alternative ist (Steinberger et al., 1964).

Um die Gewebsnekrosen zu vermindern, kultivierten wir statt ganzer Hoden kleine Würfel von Hodengewebe. Die Beobachtung blieb jedoch dieselbe: Schon nach einer Woche wurden die inneren Anteile nekrotisch und es blieben immer nur die Zellen der Tubuli erhalten, die der äußersten Reihe angehörten, also direkt dem Medium zugänglich waren. Auch in diesen gut versorgten Tubuli nahm die Anzahl der Zellen im Laufe der 3 wöchigen Kultur stark ab. Die größte Abnahme war dabei innerhalb der ersten Woche zu verzeichnen und in den folgenden Wochen blieb die Anzahl der Zellen weitgehend stabil. Diese Beobachtung hatten auch Marret & Durand (2000) bei der Kultur von Tubulusfragmenten gemacht.

Dieses Ergebnis wurde durch die Untersuchung der c-kit-Expression bestätigt, welche schon nach 2 Wochen kaum mehr vorhanden war und somit das reduzierte Überleben der Keimzellen im Organkultursystem widerspiegelte. Dies steht im Widerspruch zu der von Steinberger & Steinberger (1967) publizierten Arbeit, in der Spermatogonien bis zu 6 Monaten und Spermatozyten bis zu 4 Wochen in Organkultur überlebten. Diese Ergebnisse waren jedoch mit 10% serumhaltigem Medium erzielt worden, was die Proliferation und das Überleben unterstützt (Marret & Durand, 2000). In unserem System war, anhand rein histologischer Kriterien, nach 3-wöchiger Kulturdauer ein besseres Überleben der Sertoli-Zellen im Vergleich zu den Keimzellen zu beobachten. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von Steinberger & Steinberger (1967), die das längste Überleben für Sertoli-Zellen und Typ A-Spermatogonien beschrieben haben.

#### **4.1.3.2 Differenzierung der Keimzellen in der Organkultur**

Im Vergleich zur Kultur von Tubulusfragmenten ist es in der Organ- und Gewebekultur bisher nicht möglich, die Meiose *in vitro* nachzuvollziehen. Es wurden nur Differenzierungsschritte bis zu pachytänen Spermatozyten beobachtet (Champy, 1920; Steinberger et al., 1964; Steinberger & Steinberger 1967; Aizawa & Nishimune, 1979). In unserem Organsystem bildeten zum Zeitpunkt des Kulturbeginns einzelne pachytäne Spermatozyten die Front der sich entwickelnden Spermatogenese. Während der gesamten Kulturzeit konnte kein Fortschreiten der Keimzeldifferenzierung in Form einer Chromatinkondensation und Elongation gefunden werden. Die nach ein und zwei Wochen in der Übergangszone beobachtete Chromatinkondensation wurde nicht als Differenzierung, sondern im Sinne der Einstellung der Stoffwechselaktivität interpretiert, da in der dritten Woche diese Zone ebenfalls nekrotisch wurde. Außer

dieser rein morphologischen Beurteilung führten wir mittels PCR eine Analyse spezifischer Genexpressionsmarker durch. Nach 2-wöchiger Kultur der Hoden in Medium mit FSH und Testosteron wurden weder TP1 noch TP2 als Marker für runde Spermatiden exprimiert. Dies erlaubt verschiedene Interpretationen. Erstens: Trotz hinreichend guten Überlebens hat in vitro keine Differenzierung zu haploiden Zellen stattgefunden, bereits von Steinberger & Steinberger (1967) beschrieben. Zweitens: Durch das Absterben der Ausgangszellen, v.a. der Spermatocyten, konnte keine Differenzierung stattfinden. Drittens: Es hat Differenzierung in vitro stattgefunden, die haploiden Zellen konnten jedoch nicht überleben. Steinberger & Steinberger (1967) haben beschrieben, dass runde Spermatiden in vitro schon innerhalb der ersten Tage degenerierten. In unserem Fall ist aufgrund des schlechten Gesamtüberlebens der Keimzellen wahrscheinlich, dass eine Differenzierung erst gar nicht stattfinden konnte, da sowohl die Ausgangszellen als auch die eventuell entstehenden Zellen schnell abstarben.

#### **4.1.4 Kultur dissoziierter Zellen**

In der Kultur von Tubulusfragmenten wurde regelmäßig beobachtet, dass durch das Auswachsen der Zellen an deren offenen Enden die Tubulusstruktur innerhalb von wenigen Tagen aufgehoben war. Die erfolgreiche Differenzierung der Keimzellen in diesem System lässt vermuten, dass nicht die exakte Tubulusarchitektur für das Überleben und die Differenzierung der Keimzellen essentiell ist, sondern das Vorhandensein der Zellkontakte, v.a. zu den Sertoli-Zellen. Unter der Vorstellung, die Versorgung der Keimzellen mit Sauerstoff und Nährstoffen durch vollkommene Dissoziation des Hodengewebes weiter verbessern zu können, kultivierten wir ein Gemisch von Einzelzellen. Voraussetzung ist, dass die vollkommen dissoziierten Zellen in vitro wieder reassoziieren können (Orth & Boehm, 1990). Zusätzlich nutzten wir Zweikammersysteme, in denen die Sertoli-Zellen das sie umgebende Medium konditionieren und so ein dem Hoden ähnlicheres Milieu schaffen können. In einem solchen Kokultursystem von Sertoli-Zellen und Keimzellen war es Le Maguire-Battistoni (1991) und Weiss et al. (1997) gelungen, die Differenzierung von pachytänen Spermatocyten zu runden Spermatiden zu beobachten.

Im Gegensatz dazu beobachteten wir bei vereinzelter Zellen schon innerhalb der ersten 2 Wochen ein stark reduziertes Überleben der Keimzellen, das Ausdruck in der stark

reduzierten Expression von c-kit fand. Ebenso wurden nach 2 Wochen keine Differenzierungsmarker exprimiert, was zeigt, dass in diesem System keine Differenzierung stattfand. Für dieses negative Ergebnis gibt es, wie bei der Organkultur, verschiedene Erklärungsansätze. Erstens: Aufgrund der schlechten Überlebensfähigkeit der Ausgangskeimzellen kann eine Differenzierung nicht stattfinden. Zweitens: Die Zellen können sich in diesem System nicht differenzieren und sterben daraufhin durch Apoptose ab.

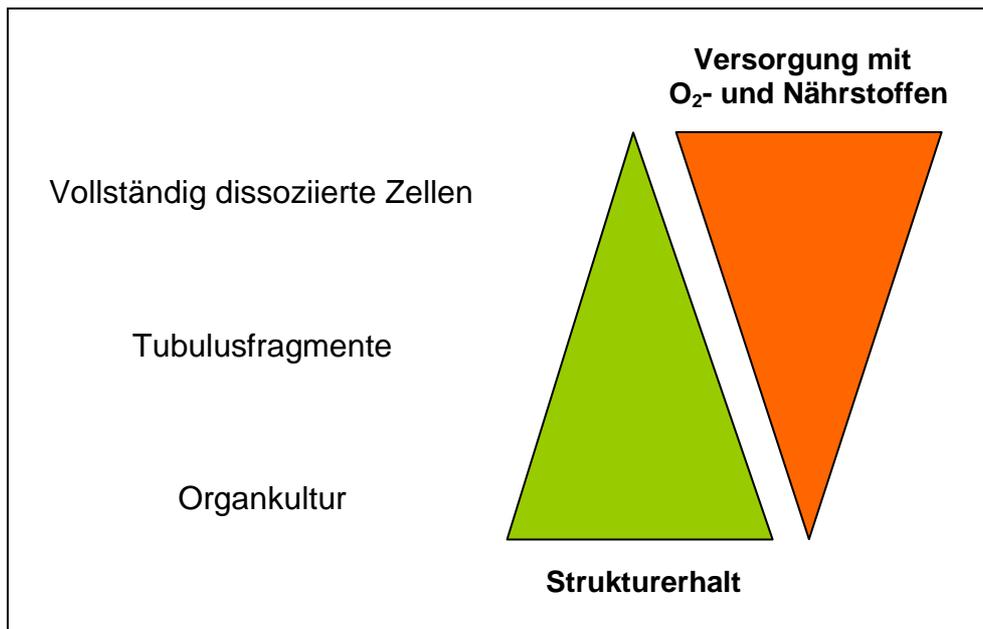
Da durch die maximale Zerkleinerung des Gewebes die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung nicht der limitierende Faktor sein kann, kann man davon ausgehen, dass die zerstörten Zellkontakte für das reduzierte Überleben und die fehlende Differenzierung verantwortlich sind.

### **Fazit aus den Versuchen zur in vitro-Differenzierung von Keimzellen**

In dieser Arbeit wurden die drei grundlegenden Modelle der Keimzellkultivierung, die Organkultur, die Kultur von Tubulusfragmenten und die Kultur vereinzelter Zellen, bezüglich Überleben und Differenzierung untersucht.

Von den drei Kultursystemen waren die Tubuli seminiferi das einzige System, das das Überleben und die Differenzierung von Keimzellen ermöglichte.

Sowohl die Organkultur als auch die Kultur vereinzelter Zellen zeigten ein reduziertes Überleben der Keimzellen, so dass keine Differenzierung beobachtet werden konnte. Die limitierenden Faktoren sind bei der Organkultur vor allem die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen und in der Kultur dissoziierter Zellen das Fehlen der Zellkontakte. Aus dem systematischen Vergleich dieser 3 Kultursysteme haben wir gelernt, dass Tubulusfragmente das ideale System darstellen, um Keimzellen zu kultivieren, da sie beide Voraussetzungen erfüllen. Die Abbildung 41 verdeutlicht zusammenfassend die verschiedenen Kultursysteme und ihre limitierenden Faktoren für das Überleben und die Differenzierung von Keimzellen.



**Abb. 41:** Kultursysteme testikulärer Zellen und ihre Limitierungen bezüglich des Strukturerhaltes und der Versorgung mit Sauerstoff- und Nährstoffen. Tubulusfragmente stellen das ideale System dar, um Keimzellen zu kultivieren, da sie sowohl den Erhalt der unmittelbaren Umgebung sowie die ausreichende Versorgung der Zellen gewährleisten.

#### 4.2 APOPTOSE IMMATURER TESTIKULÄRER ZELLEN UNTER EINFLUSS VON TGF- $\beta$

Die Apoptose ist ein physiologischer Bestandteil der Spermatogenese und dient sowohl der Elimination fehlerhafter Zellen als auch der Homöostase im Keimepithel (Print & Loveland, 2000). Eine besondere Rolle spielt sie während der Etablierung der Spermatogenese in der Pubertät, wo eine massive Keimzellapoptose stattfindet. Wird die Apoptose während der Pubertät unterbunden, führt dies zu bleibender Infertilität (Rodriguez et al., 1997).

Die TGF- $\beta$ s werden bis zur Pubertät im Rattenhoden stark exprimiert, sinken danach jedoch ab (Mullaney & Skinner, 1993). Des Weiteren ist bekannt, dass sie eine Rolle bei der parakrinen Regulation der Keimzellapoptose im fetalen Rattenhoden spielen (Olaso et al., 1998a).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Induktion der Keimzellapoptose durch TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 im pubertären Rattenhoden untersucht. In der Organkultur wurde nach 24-stündiger Stimulation mit TGF- $\beta$ 2 die aktive-Caspase-3 immunhistochemisch

nachgewiesen und durch Zählung der gefärbten Keimzellen quantifiziert. In der Zellkultur wurde nach 12- und 24-stündiger Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 die aktive-Caspase-3 mittels kolorimetrischem Assay und das in Spermatogonien und Spermatozyten exprimierte Makrophagen stimulierende Protein (MSP) mit einem ELISA bestimmt.

Dabei zeigte sich in der Organkultur keine signifikante Änderung in der Anzahl der Caspase-3-positiven apoptotischen Zellen nach Stimulation mit TGF- $\beta$ 2. Daraufhin wurde das Kultursystem zur Zellkultur hin gewechselt, da sie eine objektive und quantitative Messung der apoptotischen Signale ermöglicht. Aufgrund der zu geringen Anzahl an Wiederholungen war die Induktion der Keimzellapoptose durch TGF- $\beta$ 2 nicht statistisch auswertbar und somit nicht sicher beurteilbar. Der signifikante Abfall der MSP-Konzentration nach Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 spiegelt die Reduktion der Spermatogonien und Spermatozyten wider und ist ein starker Hinweis dafür, dass TGF- $\beta$  bei der Regulation der Keimzellanzahl wichtig zu sein scheint.

#### **4.2.1 Stellung der Caspasen**

Caspasen sind Cysteinproteasen, die während der Apoptose kaskadenförmig aktiviert werden. Am Ende der Kaskade stehen Effektorcaspasen (Caspase-3, -6, -7), die als „ausführende Organe“ zum Überleben notwendige zelluläre Proteine spalten und so den Zelltod herbeiführen (Hengartner, 2000; Slater & Eilers, 2003). In unseren Versuchen wurde der Nachweis der Aktivierung der Caspase-3 als Indikator für die Apoptose von Keimzellen verwendet. Dabei wurde die Tatsache genutzt, dass die Caspase-3 als Effektorcaspase am Ende der Caspasenkaskade steht und an diesem Punkt mehrere apoptotische Signalwege zusammenlaufen. So wird sie sowohl über den extrinsischen als auch über den intrinsischen Weg aktiviert (vgl. Abb. 4) und spielt eine zentrale Rolle im apoptotischen Prozess (Faleiro et al., 1997). Trotzdem muss darauf hingewiesen werden, dass Apoptose auch ohne die Aktivierung von Caspasen ablaufen kann und dass trotz der Aktivierung von Caspasen nicht in allen Geweben zu allen Zeitpunkten die Apoptose folgen muss (Alam et al., 1999; Kennedy et al., 1999). Erstaunlicherweise weisen viele Tiere mit Caspase-Knock-outs keine Störung der Spermatogenese oder Fertilität auf (Bergeron et al., 1998; Kuida et al., 1998; Wang et al., 1998; Woo et al., 1998). Dies mag eventuell daran liegen, dass das System der Caspase im Hoden redundant ist oder daran, dass keine essentielle Caspase inaktiviert wurde.

### 4.2.2 Makrophagen stimulierendes Protein (MSP)

Das Makrophagen stimulierende Protein gehört zur Familie der „hepatocyte growth factors“ und ist an der Induktion von Chemotaxis, Phagozytose und Konformationsänderungen von Makrophagen beteiligt. Es wird im Rattenhoden von Spermatogonien und Spermatozyten exprimiert und sezerniert (Oshiro et al., 1996).

In Kulturen testikulärer Zellen war nach 24-stündiger Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 eine signifikante Reduktion der MSP-Konzentration auf jeweils ca. 60% zu messen. Da MSP von Spermatogonien und Spermatozyten exprimiert und sezerniert wird, deutet die Reduktion der MSP-Konzentration auf eine signifikante Reduktion dieser Zellarten durch Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 *in vitro* hin.

Das MSP-Protein wurde jedoch im Zellkulturüberstand, das heißt im Kulturmedium ohne Zellen, gemessen. Daher ist auch eine TGF- $\beta$ -induzierte Hemmung der MSP-Sekretion als Mechanismus für die Abnahme der MSP-Konzentration denkbar. Diese Annahme kann dadurch gestützt werden, dass die Signalwege der TGF- $\beta$ s und MSP interagieren (Wang et al., 2004; Cheng et al., 2005).

### 4.2.3 Bedeutung der Apoptose im immaturren Hoden

Während der ersten spermatogenetischen Welle in der Pubertät findet eine massive Keimzellapoptose statt (Rodriguez et al., 1997), welche vor allem die Spermatozyten und Spermatogonien betrifft (Huckins et al., 1978; De Rooij & Lok, 1987; Yan et al., 2000). Auch im adulten Hoden kann man davon ausgehen, dass 25 -75% der erwarteten Keimzellausbeute während der Spermatogenese durch Apoptose verloren gehen (Print & Loveland, 2000).

Vor Kulturbeginn konnten wir eine Aktivierung der Caspase-3 in pachytänen Spermatozyten in 20 Tage alten Rattenhoden detektieren. Dies betraf vor allem die Zellen an der Front der sich entwickelnden Spermatogenese. Interessant war, dass sie nicht die typischen morphologischen Veränderungen apoptotischer Zellen, wie Kernpyknose und Abschnürung zytoplasmatischer Vesikel, sogenanntes „blebbing“ (Wyllie et al., 1980), aufwiesen. Statt dessen zeigten sie eher die morphologischen Charakteristika nekrotischer Zellen, wie ein aufgetriebenes, balloniertes Aussehen mit scholliger Kernfragmentierung. Dieses Erscheinungsbild ist als charakteristisch für Spermatozyten beschrieben worden, obwohl sie gleichzeitig auf molekularer Ebene Merkmale apoptotischer Zellen, wie z.B. die Hochregulierung apoptotischer Gene, der

Nachweis typischer DNA-Fragmentierung mittels DNA-Leiter und im TUNEL-Assay aufweisen (Brinkworth et al., 1995; Blanco-Rodriguez & Martinez-Garcia, 1996; Sinha Hikim et al., 1997). Die Ursache für das untypische Erscheinungsbild ist nicht endgültig geklärt. Jedoch ist dies ein Beispiel dafür, warum die ursprünglich morphologische Definition der Apoptose verlassen und von einer molekularen abgelöst wurde.

Nach 24-stündiger Kultivierung der immaturen Hoden waren in unseren Versuchen sowohl Spermatozyten als auch Spermato gonien von der Apoptose betroffen. Bezüglich der von der Apoptose betroffenen Zellarten war keine Veränderungen unter dem Einfluss von TGF- $\beta$ 2 festzustellen.

#### **4.2.4 Signalweg der TGF- $\beta$ vermittelten Apoptose**

TGF- $\beta$  vermittelt seine Wirkung über die hochaffinen Rezeptoren T $\beta$ RI und T $\beta$ RII und intrazellulär über die Smad-Proteine (vgl. 1.5). Die genauen Mechanismen über die TGF- $\beta$  zur Apoptose führt, sind nicht bekannt. Jedoch wird eine Aktivierung der Caspasenkaskade diskutiert, welche entweder direkt über die Phosphorylierung cytoplasmatischer Kinasen oder über den mitochondrialen Weg stattfindet (Übersicht in Schuster & Krieglstein, 2002). Jang et al. (2002) zeigten, dass ein Komplex aus Smad2, Smad3 und Smad4 den Promotor einer Kinase, der sogenannten „death associated protein kinase“ aktiviert, die wiederum die apoptotische Kaskade aktiviert.

#### **4.2.5 Vergleich der Kultursysteme zur Untersuchung der TGF- $\beta$ -induzierten Keimzellapoptose**

##### **4.2.5.1 Organkultur**

In der Organkultur bleibt die ursprüngliche Struktur des Hodens erhalten. Aufgrund der fehlenden Blutversorgung muss die Versorgung des Gewebes per Diffusion aus dem Kulturmedium erfolgen. Um dies zu ermöglichen, wird vor der Kultivierung die Tunica albuginea als Diffusionsbarriere entfernt. Dabei werden, selbst bei vorsichtigem Vorgehen, die außen gelegenen Tubuli seminiferi einem mechanischen Stress ausgesetzt, wodurch eventuell zusätzliche Apoptose induziert wird.

Des Weiteren wird der Vorteil des Strukturerhalts in der Organkultur in Bezug auf die Versorgung des Gewebes mit Medium und dem zu testenden TGF- $\beta$  leider zum Nachteil. Wie an den Langzeitkulturen zu beobachten ist, werden die zentral im Hoden gelegenen Tubuli nicht ausreichend mit Medium und Sauerstoff versorgt. Das impliziert, dass auch, beziehungsweise erst recht innerhalb von 24 Stunden das Medium

und TGF- $\beta$  das Hodeninnere nicht erreichen kann. Die gut versorgten, außen gelegenen Anteile, an denen der Einfluss von TGF- $\beta$  gemessen werden kann, unterliegen jedoch auch der mechanischen Manipulation, die bei der Entfernung der Tunica entsteht, so dass die Ergebnisse hier verzerrt sein können.

#### **4.2.5.2 Zellkultur**

Der Vorteil der Zellkultur gegenüber der Organkultur liegt vor allem darin, dass das Medium und das zu testende TGF- $\beta$  die hier vorliegenden Einzelzellen und Tubulusfragmente mühelos erreicht und seine Wirkung entfalten kann. Durch die mechanische Methode der Dissoziation werden die Zellen ebenfalls einem gewissen Stress ausgesetzt und haben durch die Vereinzelnung schlechtere Voraussetzungen, um in Kultur zu überleben. Dies kann der Grund für ein relativ hohes Ausgangsniveau der Apoptose in der Kontrollprobe und ein eventuell nur gering ausfallender Anstieg der Apoptose bei Stimulation mit TGF- $\beta$  sein. Von entscheidendem Vorteil für die Verwertung der Ergebnisse ist hier jedoch die Tatsache, dass die Zellen nach der Isolierung und vor der Verteilung auf die verschiedenen Ansätze durchmischt werden, so dass das apoptotische Ausgangsniveau in allen Ansätzen ungefähr gleich ist.

Aufgrund des großen Aufwandes, den die Anfertigung der Zellkultur darstellt, und Zeitmangel, wurden keine ausreichenden Wiederholungen der Experimente zur TGF- $\beta$ -induzierten Keimzellapoptose in der Zellkultur durchgeführt, um darüber eine klare Aussage treffen zu können.

Die Messungen der signifikanten MSP-Reduktion nach TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2-Stimulation zeigen jedoch deutlich, dass eine Abnahme der Keimzellanzahl unter Einfluss von TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 stattgefunden hat.

## 5 Zusammenfassung

---

Die Regulation der Spermatogenese beruht auf einem komplexen Zusammenspiel vielfältiger Faktoren auf endokriner, parakriner und zellulärer Ebene, wobei die genauen Mechanismen erst ansatzweise verstanden sind. Zahlreiche *in vitro*-Systeme zur Kultivierung von Keimzellen haben zur Aufklärung dieser Mechanismen beigetragen. Deren Ergebnisse sind jedoch aufgrund der unterschiedlichen Kultursysteme, Präparation der Zellen, Kulturdauer und Zusammensetzung des Mediums nicht immer direkt miteinander vergleichbar.

Daher wurden in dieser Arbeit die drei grundlegenden Systeme zur Kultivierung primärer testikulärer Zellen, nämlich die Organkultur, die Kultur von Tubulusfragmenten und die Kultur dissoziierter Zellen erstmals unter gleich bleibenden Bedingungen untersucht, um sie miteinander vergleichen zu können. Dabei wurden die Schwerpunkte auf die Untersuchung der Differenzierung und Apoptose von immaturren Keimzellen *in vitro* gelegt.

Die Gewinnung testikulärer Zellen der Ratte erfolgte mittels mechanischer Dissoziation des Hodengewebes mit einer Maschine. Dies erwies sich als unverzichtbarer Vorteil gegenüber den herkömmlichen Verfahren zur Zellgewinnung, da sie eine vom Experimentator unabhängige Isolierung von Zellaggregaten gewünschter Größe, wie z.B. Tubulusfragmente oder Einzelzellen, ermöglichte. Hiermit wurde ein standardisiertes und gut reproduzierbares *in vitro*-System zur Kultivierung testikulärer Zellen etabliert.

Wir beobachteten, dass dissoziierte testikuläre Zellen *in vitro* die Potenz aufweisen, wieder Aggregate auszubilden, die sich entweder als Cluster oder als Cords formierten. Dieser Prozess wurde durch die Zugabe von Extrazellulärmatrix stark beschleunigt. Dabei überlebten Peritubulär- und Sertoli-Zellen eine zweiwöchige Kulturdauer problemlos, während die Anzahl der Keimzellen nach dieser Zeit stark reduziert war.

Von den getesteten Systemen zur Kultivierung testikulärer Zellen boten nur die Tubulusfragmente die nötigen Voraussetzungen für Überleben und Differenzierung der Keimzellen. In diesem System gelang es innerhalb von zwei Wochen, die Differenzierung von pachytänen Spermatocyten zu runden Spermatiden zu beobachten. Das bedeutet, dass in diesem System die Meiose II *in vitro* ablaufen kann. Hierbei

waren die zugesetzten Hormone, Testosteron und FSH in Form des humanen rekombinanten FSHs, wichtige Faktoren für die erfolgreiche Differenzierung, die anhand der mRNA-Expression spezifischer Markergene beurteilt wurde. Die Expression von c-kit diente als Marker für das Überleben der Spermatogonien und Spermatocyten, Transition Protein-1 (TP1) und Transition Protein-2 (TP2) als Marker für runde Spermatiden und Protamin-1 als Marker für elongierte Spermatiden. Unter der gemeinsamen Wirkung von Testosteron und FSH war ein späterer Differenzierungsschritt zu beobachten, wie die mRNA-Expression von TP1 und TP2 bewies, als mit FSH alleine, wo nur TP1 exprimiert wurde. Eine Expression von Protamin-1 wurde in keinem unserer Versuche beobachtet, weshalb davon auszugehen ist, dass in vitro keine Elongation der Spermatiden stattfand. In der Organkultur und der Kultur vereinzelter testikulärer Zellen war das Überleben der immaturren Keimzellen stark reduziert und somit auch keine in vitro-Differenzierung der Keimzellen möglich.

Neben der Differenzierung spielt auch die Apoptose eine essentielle Rolle in der Spermatogenese. Es gibt Hinweise, dass TGF- $\beta$ , ein ubiquitäres und multifunktionelles Cytokin, von Bedeutung für die Keimzellapoptose in der pubertären Spermatogenese ist. Die Untersuchung der TGF- $\beta$ -induzierten Keimzellapoptose in vitro wurde in der Organkultur und der Kultur vereinzelter testikulärer Zellen durchgeführt.

Im Organmodell war es nicht möglich, TGF- $\beta$ 2 als eindeutigen Induktor der Keimzellapoptose zu identifizieren, was eventuell auf Unzulänglichkeiten der Methoden zurückzuführen ist. Im Zellkulturmodell zeigten sich jedoch Hinweise dafür, dass TGF- $\beta$ 1 die Anzahl immaturren Keimzellen bei gleichzeitiger Aktivierung der Apoptose reduzierte.

Neben der Untersuchung von Apoptose und Differenzierung, war ein essentieller Teil dieser Arbeit die Etablierung des in vitro-Systems zur Kultivierung männlicher Keimzellen über einen längeren Zeitraum. Im diesem Kultursystem war die Meiose der Keimzellen zu beobachten, was die Erforschung der Regulationsmechanismen der Spermatogenese in vitro ermöglicht. Somit sind die hier vorgelegten Ergebnisse Teil der langfristigen Zielsetzung, die gesamte Spermatogenese in vitro zu vollziehen. Dies würde die Therapieoptionen männlicher Infertilität aufgrund von Arresten in der Spermatogenese oder z.B. nach Behandlung mit Zytostatika deutlich voranbringen. Somit trägt diese Arbeit einen wichtigen Teil auf dem Weg zur Realisierung verbesserter Therapieoptionen bei männlicher Infertilität bei.

## 6 Literaturverzeichnis

---

- Aizawa S, Nishimune Y (1979). In vitro differentiation of type A spermatogonia in mouse cryptorchid testis. *J Reprod Fertil* 56:99-104
- Akhurst RJ, Derynck R (2001). TGF-beta signalling in cancer – a double-edged sword. *Trends Cell Biol* 11:44-51
- Alam A, Cohen LY, Aouad S, Sekaly RP (1999). Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells. *J Exp Med* 190:1879-90
- Alfonso PJ, Kistler WS (1993). Immunocytochemical localization of spermatid nuclear transition protein 2 in the testis of rats and mice. *Biol Reprod* 48:522-29
- Allan DJ, Harmon BV, Kerr JFR (1987). Cell death in spermatogenesis. In: Potten CS, editor. *Perspectives on mammalian cell death*. London, Oxford University Press 1987 p 229-258
- Amer M, Soliman E, El-Sadek M (1997). Is complete spermiogenesis failure a good indication for spermatid conception? *Lancet* 350:116
- Anthony CT, Kovacs WJ, Skinner MK (1989). Analysis of the androgen receptor in isolated testicular cell types with a microassay that uses an affinity ligand. *J Endocrinol* 125:2628-35
- Antinori S, Versaci C, Dani G (1997). Fertilization with human testicular spermatids: four successful pregnancies. *Hum Reprod* 12:285-91
- Awoniyi CA, Santulli R, Chandrashekar V, Schanbacher BD, Zirkin BR (1989). Quantitative restoration of advanced spermatogenic cells in adult male rats made azoospermic by active immunization against luteinizing hormone or gonadotropin-releasing hormone. *J Endocrinol* 125:1303-09
- Bartke A (1995). Apoptosis of male germ cells, a generalized or a cell type-specific phenomenon? *J Endocrinol* 136:3-4
- Bartlett JM, Weinbauer GF, Nieschlag E (1989). Differential effects of FSH and testosterone on the maintenance of spermatogenesis in the adult hypophysectomized rat. *J Endocrinol* 121:49-58
- Bergeron L, Perez GI, Macdonald G, Shi L, Sun Y, Jurisicova A, Varmuza S, Latham KE, Flaws JA, Salter JC, Hara H, Moskowitz MA, Li E, Greenberg A, Tilly JL, Yuan J (1998). Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. *Genes Dev* 12:1304-14
- Billig H, Furuta I, Rivier C, Tapanainen J, Parvinen M, Hsueh A (1995). Apoptosis in testis germ cells: Developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *J Endocrinol* 136:5-12

Blackhall FH, Atkinson AD, Maaya MB, Ryder WD, Horne G, Brison DR, Liebermann BA, Radford JA (2002). Semen cryopreservation, utilisation and reproductive outcome in men treated for Hodgkin's disease. *Br J Cancer* 87:381-84

Blanchard KT, Allard EK, Boekelheide K (1996). Fate of germ cells in 2,5-hexanedione-induced testicular injury. Apoptosis ist the mechanism of germ cell death. *Toxicol Appl Pharmacol* 137:141-48

Blanco-Rodriguez J, Martinez-Garcia C (1996). Spontaneous germ cell death in the testis of the adult rat takes the form of apoptosis: re-evaluation of cell types that exhibit the ability to die during spermatogenesis. *Cell Prolif* 29:13-31

Boissonneault G (2002). Chromatin remodeling during spermiogenesis: a possible role for the transition proteins in DNA strand break repair. *FEBS Lett* 514:111-14

Boitani C, Politi MG, Menna T (1993). Spermatogonial cell proliferation in organ culture of immature rat testis. *Biol Reprod* 48:761-67

Braun RE (2001). Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat Genet* 28:10-12

Bremner WJ, Millar MR, Sharpe RM, Saunders PT (1994). Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *J Endocrinol* 135: 1227-34

Brinkworth MH, Weinbauer GF, Schlatt S, Nieschlag E (1995) Identification of male germ cells undergoing apoptosis in adult rats. *J Reprod Fertil* 105:25-33

Brinster CJ, Ryu BY, Avarbock MR, Karagenc L, Brinster RL, Orwig KE (2003). Restoration of fertility by germ cell transplantation requires effective recipient preparation. *Biol Reprod* 69:412-20

Buzzard JJ, Wreford NG, Morrison JR (2002). Marked extension of proliferation of rat Sertoli cells in culture using recombinant human FSH. *Reproduction* 124:633-41

Champy C (1920). Quelques resultants de la méthode de culture des tissues. *Arch Zool Exp Gen* 60:461-500

Chang C, Chen YT, Yeh SD, Xu Q, Wang RS, Guillou F, Lardy H, Yeh S (2004). Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:6876-81

Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J, Letartell M (1992). Endoglin is a component of the Transforming growth factor- $\beta$  receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 267:19027-30

Chen T, Carter D, Garrigue-Antar L, Reiss M (1998). Transforming growth factor  $\beta$  type I receptor kinase mutant associated with metastatic breast cancer. *Cancer Res* 58:4805-10

- Cheng N, Bhowmick NA, Chytil A, Gorksa AE, Brown KA, Muraoka R, Arteaga CL, Neilson EG, Hayward SW, Moses HL (2005). Loss of TGF-beta type II receptor in fibroblasts promotes mammary carcinoma growth and invasion through upregulation of TGF-alpha-, MSP- and HGF-mediated signaling networks. *Oncogene* 24:5053-68
- Clermont Y, Perey B (1957). Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *Am J Anat* 100:241-67
- Clermont Y, Leblond CP, Messier B (1959). Duration of the cycle of the seminal epithelium of the rat. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 48:37-55
- Clermont Y, Harvey SC (1965). Duration of the cycle of the seminiferous epithelium of normal, hypophysectomized and hypophysectomized-hormone treated albino rats. *J Endocrinol* 76:80-89
- Cooke JE, Heasman J, Wylie CC (1996). The role of interleukin-4 in the regulation of mouse primordial germ cell numbers. *Dev Biol* 174:14-21
- Creemers LB, den Ouden K, van Pelt AMM, de Rooij DG (2002). Maintenance of adult mouse type A spermatogonia in vitro: Influence of serum and growth factors and comparison with prepubertal spermatogonial cell culture. *J Reprod* 124:791-99
- Cremades N, Sousa M, Bernabeu R, Barros A (2001). Development potential of elongating and elongated spermatids obtained after in vitro maturation of isolated round spermatids. *Hum Reprod* 16:1938-44
- Dadoune JP (2003). Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microsc Res Tech* 61:56-75
- De Felici M, Dolci S (1991). Leukemia inhibitory factor sustains the survival of mouse primordial germ cells cultured on TM4 feeder layers. *Dev Biol* 147:281-84
- De Gendt K, Swinnen JV, Saunders PT, Schoonjans L, Dewerchin M, Devos A, Tan K, Atanassova N, Claessens F, Lecureuil C, Heyns W, Carmeliet P, Guillou F, Sharpe RM, Verhoeven G (2004). A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:1327-32
- De Kretser DM, Kerr JB (1988). The cytology of the testis. In: Knobil E, Neill JD, Ewing LL, Greenwald GS, Markert CL, Pfaff DW (eds.) *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, 837-932
- De Rooij DG, Lok D (1987). Regulation of the density of spermatogonia in the seminiferous epithelium of the Chinese hamster: II. Differentiating spermatogonia. *Anat Rec* 217:131-36
- Dietrich AJJ, Scholten R, Vink ACG, Oud JL (1983). Testicular cell suspensions of the mouse in vitro. *Andrologia* 15:236-46
- Dym M, Clermont Y (1970). Role of spermatogonia in the repair of the seminiferous epithelium following x-irradiation of the rat testis. *Am J Anat* 128:265-82

- Eddy EM, Kahri AI (1976). Cell associations and surface features in cultures of juvenile rat seminiferous tubules. *Anat Rec* 185:333-58
- Erkkila K, Henriksen K, Hirvonen V, Rannikko S, Salo J, Parvinen M, Dunkel L (1997). Testosterone regulates apoptosis in adult human seminiferous tubules in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 82:2314-21
- Faleiro L, Kobayashi R, Fearnhead H, Lazebnik Y (1997). Multiple species of CPP32 and Mch2 are the major active caspases present in apoptotic cells. *EMBO J* 16:2271-81
- Feng LX, Chen Y, Dettin L, Pera RA, Herr JC, Goldberg E, Dym M (2002). Generation and in vitro differentiation of a spermatogonial cell line. *Science* 297:392-95
- Furuchi T, Masuko K, Nishimune Y, Obinata M, Matsui Y (1996). Inhibition of testicular germ cell apoptosis and differentiation in mice misexpressing Bcl-2 in spermatogonia. *Development* 122:1703-09
- Galena HJ, Pillar AK, Turner C (1974). Progesterone and androgen receptors in non-flagellate germ cells of the rat testis. *J Endocrinol* 63:223-37
- Gautier C, Levacher C, Avallet O, Vigier M, Rouiller-Fabre V, Lecerf L, Saez J, Habert R (1994). Immunohistochemical localization of transforming growth factor- $\beta$ 1 in the fetal and neonatal rat testis. *Mol Cell Endocrinol* 99:55-61
- Gautier C, Levacher C, Saez J, Habert R (1997). Transforming growth factor beta1 inhibits steroidogenesis in dispersed fetal testicular cells in culture. *Mol Cell Endocrinol* 131:21-30
- Gold LI (1999). The role for transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human cancer. *Crit Rev Oncog* 10:303-60
- Gow A, Southwood CM, Li JS, Pariali M, Riordan GP, Brodie SE, Danias J, Bronstein JM, Kachar B, Lazzarini RA (1999): CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in *Osp/claudin-11* null mice. *Cell* 99:649-59
- Griffith DL, Keck PC, Sampath TK, Rueger DC, Carlson WD (1996). Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein1: Structural paradigm for the transforming growth factor  $\beta$  superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:878-83
- Griswold MD (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Cell Dev Biol* 9:411-16
- Grootegeod JA, Peters MJ, Mulder E, Rommerts FF, Van der Molen HJ (1977). Absence of a nuclear androgen receptor in isolated germinal cells of rat testis. *Mol Cell Endocrinol* 9:159-67
- Guyton AC, Hall JE, editors. *Textbook of medical physiology*. WB Saunders Company, Philadelphia 2000, pp 925-26
- Hadley MA, Byers SW, Suarez-Quian CA, Kleinman HK, Dym M (1985). Extracellular matrix regulates Sertoli cell differentiation, testicular cord formation, and germ cell development in vitro. *J Cell Biol* 101:1511-22

Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, Da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE (1996). DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 271:350-53

Hakovirta H, Kaipia A, Söder O, Parvinen M (1993). Effects of activin-a, inhibin-a, and transforming growth factor- $\beta$ 1 on stage-specific deoxyribonucleic acid synthesis during rat seminiferous epithelial cycle. *J Endocrinol* 133:1664-68

Hamra FK, Gatlin J, Chapman KM, Grellhesl DM, Garcia JV, Hammer RE, Garbers DL (2002). Production of transgenic rats by lentiviral transduction of male germline stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:14931-36

Haywood M, Spaliviero J, Jimenez M, King NJC, Handelsman DJ, Allan CM (2003). Sertoli and germ cell development in hypogonadal (hpg) mice expressing transgenic follicle-stimulating hormone alone or in combination with testosterone. *J Endocrinol* 144:509-17

Hecht NB (1990). Regulation of "haploid expressed genes" in male germ cells. *J Reprod Fertil* 88:679-93

Heidaran MA, Showman RM, Kistler WS (1988). A cytochemical study of the transcriptional and translational regulation of nuclear transition protein 1 (TP1), a major chromosomal protein of mammalian spermatids. *J Cell Biol* 106:1427-33

Hengartner MO (1997). Apoptosis and the shape of death. *Dev Genet* 21:245-48

Hengartner MO (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770-76

Henriksen K, Kangasniemi M, Parvinen M, Kaipia A, Hakovirta H (1996). In vitro, follicle-stimulating hormone prevents apoptosis and stimulates desoxyribonucleic acid synthesis in the rat seminiferous epithelium in a stage-specific fashion. *J Endocrinol* 137:2141-49

Hikim AP, Swerdloff RS (1995). Temporal and stage-specific effects of recombinant human follicle-stimulating hormone on the maintenance of spermatogenesis in gonadotropin-releasing hormone antagonist-treated rat. *J Endocrinol* 136:253-61

Hikim AP, Swerdloff RS (1999). Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod* 4:38-47

Hikim AP, Wang C, Leung A, Swerdloff RS (1995). Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *J Endocrinol* 136:2770-75

Hikim AP, Rajavashisth TB, Hikim I, Lue Y, Bonavera JJ, Leung A, Wang C, Swerdloff RS (1997). Significance of apoptosis in the temporal and stage-specific loss of germ cells in the adult rat after gonadotropin deprivation. *Biol Reprod* 57:1193-1201

Höffeler F (2004). Chronik eines angekündigten Todes: Die Maschinerie der Apoptose. *Biol. Unserer Zeit* 1:16-23

- Honaramooz A, Behboodi E, Megee SO, Overton SA, Galantino-Homer H, Echelard Y, Dobrinski I (2003). Fertility and germline transmission of donor haplotype following germ cell transplantation in immuno-competent goats. *Biol Reprod* 69:1260-64
- Hong Y, Liu T, Zhao H, Xu H, Wang W, Liu R, Chen T, Deng J, Gui J (2004). Establishment of a normal medakafish spermatogonial cell line capable of sperm production in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:8011-16
- Huang SS, Liu Q, Johnson FE, Konish Y, Huang JS (1997). Transforming growth factor  $\beta$  peptide antagonists and their conversion to partial agonists. *J Biol Chem* 272(43):27155-59
- Huckins C (1978). The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: An analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *Anat Rec* 190:905-26
- Hue D, Staub C, Perrard-Sappori MH, Weiss M, Nicolle JC, Vigier M, Durand P (1998). Meiotic differentiation of germinal cell in three-week cultures of whole cell population from rat seminiferous tubules. *Biol Reprod* 59:379-87
- Jang CW, Chen CH, Chen CC, Chen JY, Su YH, Chen RH (2002). TGF-beta induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. *Nat Cell Biol* 4:51-58
- Johnston DS, Russell LD, Friel PJ, Griswold MD (2001). Murine germ cells do not require functional androgen receptors to complete spermatogenesis following spermatogonial stem cell transplantation. *J Endocrinol* 142:2405-08
- Jutte NH, Grootegoed JA, Rommerts FFG, van der Molen HJ (1981). Exogenous lactate is essential for metabolic activities in isolated rat spermatocytes and spermatids. *J Reprod Fertil* 62:399-405
- Jutte NH, Jansen R, Grootegoed JA, Rommerts FF, Clausen OP, van der Molen HJ (1982). Regulation of survival of rat pachytene spermatocytes by lactate supply from Sertoli cells. *J Reprod Fertil* 65:431-38
- Keilani MM (2005). Wirkung von Transforming growth factor-beta ( $-\beta_1$ ,  $-\beta_2$ ,  $-\beta_3$ ) auf die Apoptose und Differenzierung der Keimzellen im immaturren Rattenhoden. Dissertation an der Philipps-Universität Marburg
- Kennedy NJ, Kataoka T, Tschopp J, Budd RC (1999). Caspase activation is required for T cell proliferation. *J Exp Med* 190:1891-96
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-57
- Kerr JB, Savage GN, Millar M, Sharpe RM (1993). Response of the seminiferous epithelium of the rat testis to withdrawal of androgen: evidence for direct effect upon intercellular spaces associated with Sertoli cell junctional complexes. *Cell Tissue Res* 274:153-61
- Kierszenbaum AL (2001). Transition nuclear proteins during spermiogenesis: unrepaired DNA breaks not allowed. *Mol Reprod Dev* 58:357-58

- Konrad L, Albrecht M, Renneberg H, Aumüller G (2000). Transforming growth factor- $\beta$ 2 mediates mesenchymal-epithelial interactions of testicular somatic cells. *J Endocrinol* 141:3679-86
- Konrad L, Keilani MM, Laible L, Nottelmann R, Hofmann R (2006). Effects of TGF- $\beta$ s and a specific antagonist on apoptosis of immature rat male germ cells in vitro. *Apoptosis* 11:739-48
- Krishnamurthy H, Danilovich N, Morales CR, Sairam MR (2000). Qualitative and quantitative decline in spermatogenesis of the follicle-stimulating hormone receptor knockout (FORKO) mouse. *Biol Reprod* 62:1146-59
- Kuida K, Haydar TF, Kuan CY, Gu Y, Taya C, Karasuyama H, Su MS, Rakic P, Flavell RA (1998). Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated Caspase activation in mice lacking caspase-9. *Cell* 94:325-37
- Lawson KA, Dunn NR, Roelen BA, Zeinstra LM, Davis AM, Whight CV, Korving JP, Hogan BL (1999). Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* 13:424-36
- Le Magueresse-Battistoni B, Gérard N, Jégou B (1991). Pachytene spermatocytes can achieve meiotic process in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 179:1115-21
- Le Magueresse-Battistoni B, Morera AM, Goddard I, Benahmed M (1995). Expression of mRNAs for transforming growth factor- $\beta$  receptors in the rat testis. *J Endocrinol* 136:2788-91
- Leblond CP, Clermont Y (1952). Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann N Y Acad Sci* 55:548-73
- Lee JH, Kim HJ, Kim H, Lee SJ, Gye MC (2006). In vitro spermatogenesis by three-dimensional culture of rat testicular cells in collagen gel matrix. *Biomaterials* 27:2845-53
- Liu J, Van der Elst J, Van den Broecke, Dhont M (2001). Live Offspring by in vitro fertilization of oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential in vivo transplantation and in vitro maturation. *Biol Reprod* 64:171-78
- Lu SL, Zhang WC, Akiyama Y, Nomizu T, Yuasa Y (1996). Genomic structure of the transforming growth factor  $\beta$  type II receptor gene and its mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancers. *Cancer Res* 56:4595-98
- Lue Y, Sinha Hikim AP, Swerdloff RS, Im P, Taing KS, Bui T, Leung A, Wang C (1999). Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: Role of intratesticular testosterone (T) on stage-specificity. *J Endocrinol* 140:1709-17
- Lui WY, Lee WM, Cheng CY (2001). Transforming growth factor- $\beta$ 3 perturbs the inter-sertoli tight junction permeability barrier in vitro possibly mediated via its effects on occludin, zonula occludens-1, and claudin-11. *J Endocrinol* 142:1865-77
- Lui WY, Lee WM, Cheng CY (2003). TGF- $\beta$ s: their role in testicular function and Sertoli cell tight junction dynamics. *Internat J Androl* 26:147-60

- Lutz M, Knaus P (2002). Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network. *Cell Signal* 14:977-88
- MacConell LA, Leal AMO, Vale WW (2002). The distribution of betaglycan protein and mRNA in rat brain, pituitary, and gonads: Implications for a role for betaglycan in inhibin-mediated reproductive functions. *J Endocrinol* 143:1066-75
- Madhwa Raj HG, Dym M (1976). The effects of selective withdrawal of FSH or LH on spermatogenesis in the immature rat. *Biol Reprod* 14:489-94
- Mali P, Sandberg M, Vuorio E, Yelick PC, Hecht NB, Parvinen M (1988). Localization of protamine 1 mRNA in different stages of the cycle of the rat seminiferous epithelium. *J Cell Biol* 107:407-12
- Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B (1995). Inactivation of the type II TGF- $\beta$  receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 268:1336-38
- Marret C, Avallet O, Perrard-Sapori MH, Durand P (1998). Localization and quantitative expression of mRNAs encoding the testis-specific histone TH2B, the phosphoprotein p19, the transition proteins 1 and 2 during pubertal development and throughout the spermatogenic cycle of the rat. *Mol Reprod Dev* 51:22-35
- Marret C, Durand P (2000). Culture of porcine spermatogonia: Effects of purification of the germ cells, extracellular matrix and fetal calf serum on their survival and multiplication. *Reprod Nutr Dev* 40:305-19
- Marziali G, Lazzaro D, Sorrentino V (1993). Binding of germ cells to mutant Sld Sertoli cells is defective and is rescued by expression of the transmembrane form of the c-kit ligand. *Dev Biol* 157:182-190
- McLachlan RI, Wreford NG, Tsonis C, De Kretser DM, Robertson DM (1994a). Testosterone effects on spermatogenesis in the gonadotropin-releasing hormone-immunized rat. *Biol Reprod* 50:271-80
- Mc Lachlan RI, Wreford NG, Meachem SJ, De Kretser DM, Robertson DM (1994b). Effects of testosterone on spermatogenic cell populations in the adult rat. *Biol Reprod* 51:945-55
- Miura T, Yamauchi K, Takahashi H, Nagahama Y (1991). Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13090-95
- Miura C, Miura T, Yamashita M, Yamauchi K, Nagahama Y (1996). Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in germ-somatic cell coculture from immature Japanese eel testis. *Dev Growth Differ* 38:257-62
- Monesi V (1962). Autoradiographic study of DNA synthesis and the cell cycle in spermatogonia and spermatocytes of mouse testis using tritiated thymidine. *J Cell Biol* 14:1-18

- Monesi V (1965). Synthetic activities during spermatogenesis in the mouse RNA and protein. *Exp Cell Res* 39:197-224
- Morales CR, Kwon YK, Hecht NB (1991). Cytoplasmic localization during storage and translation of the mRNAs of transition protein 1 and protamine 1, two translationally regulated transcripts of the mammalian testis. *J Cell Sci* 100:119-31
- Mruk DD, Wong CH, Silvestrini B, Cheng CY (2006). A male contraceptive targeting germ cell adhesion. *Nat Med* 12:1323-28
- Mullaney BP, Skinner MK (1993). Transforming growth factor- $\beta$  ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2, and  $\beta$ 3) gene expression and action during pubertal development of the seminiferous tubule: Potential role at the onset of spermatogenesis. *Mol Endocrinol* 7:67-76
- O'Donnell L, Mc Lachlan RI, Wreford NG, Robertson DM (1994). Testosterone promotes the conversion of round spermatids between stages VII and VIII of the rat spermatogenic cycle. *J Endocrinol* 135:2608-14
- Oft M, Heider KH, Beug H (1998). TGF $\beta$  signalling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Curr Biol* 8:1243-52
- Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL (2000). Transplantation of male germ line stem cells restores fertility in infertile mice. *Nat Med* 6:29-34
- Olaso R, Gautier C, Levacher C, Durand P, Saez J, Habert R (1997). The immunohistochemical localization of transforming growth factor- $\beta$ <sub>2</sub> in the fetal and neonatal rat testis. *Mol Cell Endocrinol* 126:165-72
- Olaso R, Pairault C, Boulogne B, Durand P, Harbert R (1998a). Transforming growth factor  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 reduce the number of gonocytes by increasing apoptosis. *J Endocrinol* 139:733-40
- Olaso R, Pairault C, Habert R (1998b). Expression of type I and II receptors for transforming growth factor  $\beta$  in the adult rat testis. *Histochem Cell Biol* 110:613-18
- Olaso R, Pairault C, Saez J, Habert R (1999). Transforming growth factor  $\beta$ 3 in the fetal and neonatal rat testis: immunolocalization and effect on fetal Leydig cell function. *Histochem Cell Biol* 112:247-54
- Orth JM (1982). Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anat Rec* 203:485-92
- Orth JM, Boehm R (1990). Functional coupling of neonatal rat Sertoli cells and gonocytes in coculture. *J Endocrinol* 127:2812-20
- Orth JM, Gunsalus GL, Lamperti AA (1988). Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *J Endocrinol* 122:787-94
- Orwig KE, Schlatt S (2005). Cryopreservation and transplantation of spermatogonia and testicular tissue for preservation of male fertility. *J Natl Cancer Ins Monogr* 34:51-56

- Oshiro K, Iwama A, Matsuno K, Ezaki T, Sakamoto O, Hamaguchi I, Takasu N, Suda T (1996): Molecular cloning of rat macrophage-stimulating protein and its involvement in the male reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun* 227:273-280
- Palermo G, Schlegel P, Sills E (1998). Births after intra-cytoplasmic injection of sperm obtained by testicular extraction from men with non-mosaic Klinefelter syndrome. *N Engl J Med* 338:588-590
- Perey B, Clermont Y, Leblond CP (1961). The wave of the seminiferous epithelium in the rat. *Am J Anat* 108:47-77
- Perrard MH, Hue D, Staub C, Le Vern Y, Kerboeuf D, Durand P (2003). Development of the meiotic step in testes of pubertal rats: Comparison between the in vivo situation and under in vitro conditions. *Mol Reprod Dev* 65:86-95
- Print CG, Loveland KL (2000). Germ cell suicide: New insights into apoptosis during spermatogenesis. *Bioessays* 22:423-30
- Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, El-Awady MK, Wison EM, French FS (1995). Androgen receptor defects: historical, clinical and molecular perspectives. *Endocr Rev* 16:271-321
- Rea MA, Marshall GR, Weinbauer GF, Nieschlag E (1986). Testosterone maintains pituitary and serum FSH and spermatogenesis in gonadotrophin-releasing hormone antagonist-suppressed rats. *J Endocrinol* 108:101-07
- Roberts AB (1998). Molecular and cell biology of TGF- $\beta$ . *Miner Electrolyte Metab* 24:111-19
- Roberts AB, Sporn MB (1985). Transforming growth factors. *Cancer Surv* 4:683-705
- Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia , Vassalli P (1997). An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J* 16:2262-70
- Rossi P, Sette C, Dolci S, Geremia R (2000). Role of c-kit in mammalian spermatogenesis. *J Endocrinol Invest* 23:609-15
- Rouiller-Fabre V, Carmona S, Abou Merhi R, Cate R, Habert R, Vigier B (1998). Effect of anti-mullerian hormone on Sertoli and Leydig cell functions in fetal and immature rats. *Endocrinology* 139:1213-20
- Russell LD, Alger LE, Nequin LG (1987). Hormonal control of pubertal spermatogenesis. *J Endocrinol* 120:1615-32
- Russell LD (1993). Normal development of the testis. In: Mohr U, Dungworth DL, Capen CC (eds.) *Pathophysiology of the aging rat*. ILSI Press, Washington DC, 395-405
- Russell LD, Ettl RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED (1990). Mammalian Spermatogenesis. In: *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Cache River Press, Clearwater, FL, 1-40

- Sakai N (2002). Transmeiotic differentiation of zebrafish germ cells into functional sperm in culture. *Development* 129:3359-65
- Santulli R, Sprando RL, Awoniyi CA, Ewing LL, Zirkin BR (1990). To what extent can spermatogenesis be maintained in the hypophysectomized adult rat testis with exogenously administered testosterone? *J Endocrinol* 126:95-101
- Saunders PT, Millar MR, Maguire SM, Sharpe RM (1992). Stage-specific expression of rat transition protein 2 mRNA and possible localization to the chromatoid body of step 7 spermatids by in situ hybridization using a nonradioactive riboprobe. *Mol Reprod Dev* 33:385-91
- Schuster N, Krieglstein K (2002). Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis. *Cell Tissue Res* 307:1-14
- Shan LX, Bardin CW, Hardy MP (1997). Immunohistochemical analysis of androgen effects on androgen receptor expression in developing Leydig and Sertoli cells. *J Endocrinol* 138:1259-66
- Siegel PM, Massagué J (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF- $\beta$  in homeostasis and cancer. *Nature Rev Cancer* 3:807-20
- Singh J, O'Neill C, Handelsman DJ (1995). Induction of spermatogenesis by androgens in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *J Endocrinol* 136:5311-21
- Sinha-Hikim AP, Swerdloff RS (1993). Temporal and stage-specific changes in spermatogenesis of rat after gonadotropin deprivation by a potent gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *J Endocrinol* 133:2161-70
- Sinha-Hikim AP, Lue Y, Swerdloff RS (1997). Separation of germ cell apoptosis from toxin-induced cell death by necrosis in situ end-labelling histochemistry after glutaraldehyde fixation. *Tissue Cell* 29:487-93
- Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzouana G, Gillessen D, Gabbiani G (1986): A monoclonal antibody against  $\alpha$ -smooth muscle actin: A new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 103:2787-96
- Skinner MK, Moses HL (1989). Transforming growth factor $\beta$  gene expression and action in the seminiferous tubule: Peritubular cell-sertoli cell interactions. *Mol Endocrinol* 3:625-34
- Slater EP, Eilers M (2003). Zellteilung, Zellzykluskontrolle und Apoptose. In: *Lehrbuch Vorklinik, Band A*. Schmidt RF, Unsicker K, Birbaumer N, Kurtz A, Scharl M (Hrsg.)
- Sofikitis N, Mantzavinos T, Loutradis D, Yamamoto Y, Tarlatzis V, Miyagawa I (1998a). Ooplasmic injections of secondary spermatocytes for non-obstructive azoospermia. *Lancet* 351:1177-78
- Sofikitis N, Miyagawa I, Yamamoto Y, Loutradis D, Mantzavinos T, Tarlatzis V (1998b). Micro- and macro-consequences of ooplasmic injections of early haploid male gametes. *Hum Reprod Update* 4:197-212

Sofikitis N, Pappas E, Kawatani A, Baltogiannis D, Loutradis D, Kanakas N, Giannakis D, Dimitriadis F, Tsoukanelis K, Georgiou I, Makrydimas G, Mio Y, Tarlatzis V, Meleko M, Miyagawa I (2005). Efforts to create an artificial testis: Culture systems of male germ cells under biochemical conditions resembling the seminiferous tubular biochemical environment. *Hum Reprod Update* 11:229-59

Sorrentino V, Giorgi M, Geremia R, Besmer P, Rossi P (1991). Expression of the c-kit protooncogene in the murine male germ cells. *Oncogene* 6:149-51

Sousa M, Cremades N, Alves C, Silva J, Barros A (2002). Developmental potential of human spermatogenic cells co-cultured with Sertoli-cells. *Hum Reprod* 17:161-72

Staub C (2001). A century of research on mammalian male germ cell meiotic differentiation in vitro. *J Androl* 22:911-26

Staub C, Hue D, Nicolle JC, Perrard-Sapori MH, Segretain D, Durand P (2000). The whole meiotic process can occur in vitro in untransformed rat spermatogenic cells. *Exp Cell Res* 260:85-95

Steger K (1999). Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. *Anat Embryol* 199:471-87

Steinberger A, Steinberger E (1967). Factors affecting spermatogenesis in organ cultures of mammalian testes. *J Reprod Fertil suppl* 2:117-24

Steinberger A, Steinberger E (1971). Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis in vivo and in organ culture. *Biol Reprod* 4:84-87

Steinberger A, Steinberger E, Perloff WH (1964). Mammalian testis in organ culture. *Exp Cell Res* 36:19-27

Taipale J, Saharinen J, Keski-Oja J (1998): Extracellular matrix-associated transforming growth factor- $\beta$ : role in cancer cell growth and invasion. *Adv Cancer Res* 75:87-134

Teerds KJ, Dorrington JH (1993). Localization of transforming growth factor  $\beta_1$  and  $\beta_2$  during testicular development in the rat. *Biol Reprod* 48:40-45

Toppari J, Parvinen M (1985). In vitro differentiation of rat seminiferous tubular segments from defined stages of the epithelial cycle. Morphologic and immunolocalization analysis. *J Androl* 6:334-43

Tres LL, Kierszenbaum AL (1983). Viability of rat spermatogenic cells in vitro is facilitated by their coculture with Sertoli cells in serum-free hormone-supplemented medium. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:3377-81

Troiano L, Fustini MF, Lovato E, Frasoldati A, Malorni W, Capri M, Grassilli E, Marrama P, Franceschi C (1994). Apoptosis and spermatogenesis: Evidence from an vivo model of testosterone withdrawal in the adult rat. *Biochem Biophys Res Commun* 202:1315-21

Trowell OA (1959). The culture of mature organs in a synthetic medium. *Exp Cell Res* 16:118-47

- Tsujimoto Y, Shimizu S (2000). Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett* 466:6-10
- Vigier M, Weiss M, Perrard MH, Godet M, Durand P (2004). The effects of FSH and of testosterone on the completion of meiosis and the very early Steps of spermiogenesis of the rat: an in vitro study. *Mol Endocrinol* 33:729-42
- Vornberger W, Prins G, Musto NA, Suarez-Quian CA (1994). Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis. *J Endocrinol* 134:2307-16
- Wang S, Miura M, Jung YK, Zhou H, Li E, Yuan J (1998). Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE. *Cell* 92:501-09
- Wang D, Kanuma T, Mizunuma H, Takama F, Ibuki Y, Wake N, Mogi A, Shitara Y, Takenoshita S (2000). Analysis of specific gene mutations in the transforming growth factor-beta signal transduction pathway in human ovarian cancer. *Cancer Res* 60:4507-12
- Wang X (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15:2922-33
- Wang D, Shen Q, Chen YQ, Wang MH (2004). Collaborative activities of macrophage-stimulating protein and transforming growth factor-beta1 in induction of epithelial to mesenchymal transition: roles of the RON receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 23:1668-80
- Ward WS, Coffey DS (1991). DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 44:569-74
- Weinbauer GF, Wessels J (1999). 'Paracrine' control of spermatogenesis. *Andrologia* 31:249-62
- Weiss M, Vigier M, Hue D, Perrard-Sappori MH, Marret C, Avallet O, Durand P (1997). Pre- and post-meiotic expression of male germ cell specific genes throughout 2-week cocultures of rat germinal and Sertoli cells. *Biol Reprod* 57:68-76
- Wilson JD (1992). Syndromes of androgen resistance. *Biol Reprod* 46:168-73
- Wolkowicz MJ, Coonrod SA, Reddi PP, Millan JL, Hofmann MC, Herr JC (1996). Refinement of the differentiated phenotype of the spermatogenic cell line GC-2spd(ts) *Biol Reprod* 55:923-32
- Woo M, Hakem R, Soengas MS, Duncan GS, Shahinian A, Kagi D, Hakem A, McCurrach M, Khoo W, Kaufman SA, Senaldi G, Howard T, Lowe SW, Mak TW (1998). Essential contribution of caspase-3/ CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev* 12:806-19
- Wright WW, Frankel AI (1980). An androgen receptor in the nuclei of late spermatids in testes of male rats. *J Endocrinol* 107:314-18
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR (1980). Cell death. The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68:251-306

Yan W, Suominen J, Toppari J (2000). Stem cell factor protects germ cells from apoptosis in vitro. *J Cell Sci* 113:161-68

Yeh S, Tsai MY, Xu Q, Mu XM, Lardy H, Huang KE, Lin H, Yeh SD, Altuwaijri S, Zhou X, Xing L, Boyce BF, Hung MC, Zhang S, Gan L, Chang C (2002). Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:13498-503

Zhang FP, Poutanen M, Wilbertz J, Huhtaniemi I (2001). Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. *Mol Endocrinol* 15:172-83

Zhang C, Yeh S, Chen YT, Wu CC, Chuang KH, Lin HY, Wang RS, Chang YJ, Mendis-Handagama C, Hu L, Lardy H, Chang C (2006). Oligozoospermia with normal fertility in male mice lacking the androgen receptor in testis peritubular myoid cells. *PNAS USA* 103:17718-23

Zhou X, Kudo A, Kawakami H, Hirano H (1996). Immunohistochemical localization of androgen receptor in mouse testicular germ cells during fetal and postnatal development. *Anat Rec* 245:509-18

Zirkin BR, Santulli R, Awoniyi CA, Ewing LL (1989). Maintenance of advanced spermatogenic cells in the adult testis: Quantitative relationship to testosterone concentration within the testis. *J Endocrinol* 124:3043-49

## **7 Anhang**

---

Meine akademischen Lehrer im Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität zu Marburg waren die Damen und Herren:

Aumüller, Barth, Basler, Baum, Czubayko, Daut, Feuser, Gerdes, Geus, Grau, Gudermann, Hasilik, Hertl, Hofmann, Junclas, Klenk, Klose, Koolmann, Krause, Kretschmer, Krieg, Kuhlmann, Lang, Lill, Maier, Maisch, Meinhardt, Moll, Mueller, Mutters, Neubauer, Oertel, Rausch, Remschmidt, Renz, Richter, Röhm, Röper, Schäfer, Schnabel, Seitz, Steininger, Studer, Thursar, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wulf

## Danksagung

Zum Abschluss meiner Arbeit möchte ich gerne meinem Doktorvater PD Dr. Lutz Konrad für die Überlassung des Themas, sowie die engagierte Betreuung und Unterstützung bei dessen Umsetzung danken. Durch seine Hilfe und wertvollen Ratschläge konnte ich oft Auswege aus vermeintlichen Sackgassen finden. Außerdem möchte ich mich ganz herzlich für die vielen Möglichkeiten bedanken, meine Ergebnisse auf Kongressen zu präsentieren. Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Hofmann für die Möglichkeit, die Laborräumlichkeiten, für meine Doktorarbeit zu nutzen.

Ganz herzlich danke ich Frau Renate Nottelmann für die liebevolle Unterstützung über die gesamte Arbeit hinweg. Ihre sowohl tatkräftige als auch seelisch-moralische Hilfe hat mir oft den Laboralltag erleichtert und versüßt. Ein ebenso herzliches Dankeschön geht an Frau Heidrun Brandt, die mich in die Molekularbiologie eingearbeitet hat und jederzeit ein offenes Ohr für alle meine Fragen hatte. Für die gute Zusammenarbeit und unkomplizierte Hilfe im Labor möchte ich mich auch bei Jana Riemann bedanken.

Ich danke allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Ansgar Schmidt, die es mir ermöglichten, in ihrem Labor Western Blots durchzuführen und mir durch ihre unkomplizierte Art viel geholfen haben.

Allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern des Klinikums Marburg, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, sei hier ebenfalls ganz herzlich gedankt.

Dem DFG-Graduiertenkolleg danke ich für die finanzielle Unterstützung meines Promotionsprojektes und die vielen Möglichkeiten, die mir zur wissenschaftlichen Weiterbildung geboten wurden.

Und „last but not least“ möchte ich meinen Eltern dafür danken, dass sie mich in allen Lebenslagen unterstützt haben und immer für mich da sind. Ein großes Extra-Dankeschön geht an meinem Bruder Mark und alle Freunde, die mich durch Anregungen, Kritik und ihre Freundschaft unterstützt haben, und so dazu beigetragen haben, dass diese Doktorarbeit entsteht und auch ein Ende findet.

Das vorliegende Forschungsprojekt wurde durch Vortag oder Posterdokumentation auf folgenden Kongressen vorgestellt:

27. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Berlin, 2004

3<sup>rd</sup> European Congress of Andrology, Münster, 2004

28. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Heidelberg, 2005

4<sup>th</sup> Congress of the DFG-Graduate Seminar “Cell-Cell Interaction in Reproduction”, Giessen, 2005

Teile dieses Forschungsprojekts und Ergebnisse dieser Arbeit sind in folgenden Kongressbänden als Kurzbeitrag publiziert:

Laible L, Keilani MM, Nottelmann R, Hofmann R, Konrad L (2004) Induction of apoptosis of rat germ cells by transforming growth factor (TGF)-betas and counteraction by antagonists. *Eur J Cell Biol* 83 (Suppl 54):69, MS 5-7.

Laible L, Keilani MM, Nottelmann R, Hofmann R, Konrad L (2004) Inhibition of apoptosis of germ cells by transforming growth factor (TGF)- $\beta$  antagonists and establishment of long term culture of testicular cords in vitro. *Andrologia* 36(4):251, PO154.

Laible L, Lüers G, Keilani MM, Nottelmann R, Hofmann R, Konrad L (2005) Differentiation and apoptosis of immature rat germ cells in vitro. *Eur J Cell Biol* 84 (Suppl 55):110-111, S9-4.

Laible L, Keilani MM, Nottelmann R, Hofmann R, Konrad L (2005). Differentiation and apoptosis of immature rat germ cells in vitro. *Andrologia* 37:146.