

Zusammenfassung

Der Wissensstand zur Spermatogenese und Befruchtung entwickelt sich nur langsam weiter. Ein Grund dafür liegt darin, dass man nicht weiß, welche und wie viele Komponenten an diesen Prozessen beteiligt sind. Einige Gene und ihre Regulation sind inzwischen zwar bekannt, aber den Großteil gilt es noch zu entdecken. Um die Prozesse der Stammzellerneuerung und der Spermatogenese besser zu verstehen, ist es notwendig, eine vollständige Liste der Gene, die in in den jeweiligen Differenzierungsstadien an- oder ausgeschaltet werden, zu erstellen. Dieses Wissen würde die Entwicklung eines Kultursystems für Keimzellen vorantreiben und die Manipulation von Gameten ermöglichen. Das gezielte entfernen von Genen (Knockout) ist zur Zeit nur in der Maus durchführbar, denn nur hier ist es möglich, embryonale Stammzellen in Kultur zu halten. Genetisch modifizierte Keimzellen könnten einen alternativen Weg zur Erzeugung von Knockouts in der Ratte und anderen Säugetieren bieten. Die Erstellung von Genexpressionsprofilen von männlichen Keimzellen in Zellkultur und während ihrer Entwicklung zu reifen Spermien im Hoden würde auch zur Entdeckung von Proteinen führen, die Schlüsselrollen in der Spermatogenese und bei der Befruchtung spielen.

Zur Entdeckung der Gene, die an den verschiedenen Phasen der Spermatogenese beteiligt sind, haben wir cDNA-Mikroarrays benutzt. DNA-Mikroarrays ermöglichen die simultane Ermittlung der Expressionslevel von zehntausendenden Genen und boten daher ein ausgezeichnete Methode, um die Gene der Spermatogenese zu untersuchen. Unser erster Ansatz bestand in der Herstellung von Mikroarrays mit hodenspezifischen Genen der Maus. Die Anwendung dieser Mikroarrays lieferte zwar vielversprechende Ergebnisse, im Vergleich zu Produkten von kommerziellen Anbietern erwiesen sich unsere Mikroarrays jedoch als weit weniger verlässlich und effizient, weniger empfindlich und teurer. Mit Affymetrix Genchips (Maus und Ratte) haben wir dann die Genexpression während der Differenzierung von Keimzellen *in vivo* und *in vitro* analysiert. Das Ergebnis ist eine Datensammlung von beträchtlichem Wert, welche einen Großteil der an den Prozessen der Spermatogenese und Befruchtung beteiligten Gene enthält.

Um die Gene zu identifizieren, die in den Stammzellen der Spermatogenese stärker exprimiert sind als in differenzierten Gameten, haben wir Genexpressionsprofile von Keimzellen der Ratte unter verschiedenen Bedingungen in Zellkultur erstellt. In Kultur auf STO-Fibroblasten verlieren die Zellen ihren Stammzellcharakter, auf MSC-1-Sertolizellen dagegen behalten sie ihn. Die Expressionslevel einer großen Anzahl von Genen sinkt in Kultur auf STO-Zellen und im Hoden während der ersten Welle der Spermatogenese; in Kultur auf MSC-1-Zellen zeigt aber nur eines Bruchteil dieser Gene (ca. 250) konstante Expressionslevel. Sollte die Expression spezifischer Gene die Stammzellfunktion regulieren, dann sind diese Gene potentielle Regulatoren. Auf der Basis dieser

Markergene haben wir einen Stammzellindex für Spermatogonien erstellt, welcher Stammzellaktivität in der Ratte und der Maus voraussagt. Diese Genmarker bieten uns jetzt ein verlässliches und schnelles Mittel, Stammzellen in Kultur zu identifizieren, und könnten den aufwendigen Transfers von Keimzellen in einen Empfängerhoden, die derzeitige Methode, mit der der Stammzellcharakter von Spermatogonien bestimmt wird, ersetzen. Dadurch wird sicherlich die Entwicklung von verbesserten Kulturbedingungen beschleunigt. Die Expansion von Stammzellen der Spermatogenese *in vitro* würde genomische Modifikationen an diesen Zellen zulassen, was wiederum Gen-Knockout in anderen Säugetieren als Mäusen ermöglichen könnte.

Vergleicht man die Gene, die in Stammzellen der Spermatogenese erhöht exprimiert sind, mit denen anderer Stammzelltypen, z.B. embryonalen, neuronalen oder hämatopoetischen Stammzellen, findet man nur sehr wenig Überschneidung. Diese Diskrepanz kann teilweise durch technische Unterschiede oder durch geringe Reinheit der verschiedenen Stammzellpopulationen erklärt werden. Allerdings legen andere Studien nahe, dass es in Bezug auf die Genexpression nur wenige Gemeinsamkeiten zwischen verschiedenen Stammzelltypen gibt. Ob es tatsächlich einen Satz Gene gibt, der in allen Stammzelltypen erhöht exprimiert ist, ist im Moment fraglich.

Wir haben außerdem Expressionsdaten von ca. 20000 Genen im Hoden der Maus während unterschiedlicher Zeitpunkte in der postnatalen Entwicklung ermittelt. Durch Subtraktion der Gene, die in Sertolizellen und den interstitiellen Zellen des Hoden exprimiert sind, konnten wir ein Expressionsprofil der Keimzellen während der Spermatogenese erstellen. Durch Clusteranalyse der Expressionsmuster stießen wir auf mehr als 1500 Gene, deren Expression deutlich mit Beginn der Meiose und der Spermiohistogenese ansteigt. Bemerkenswerterweise scheinen fast 20% dieser Gene nur in der männlichen Keimbahn exprimiert zu sein. Keimzell-spezifische Gene sind dagegen in der frühen Keimzellentwicklung selten. Durch Auswertung der NCBI Unigene Datenbank, gekoppelt mit quantitativer Real-Time PCR, lässt sich ableiten, dass ca. 4% des Genoms der Maus ausschließlich der Expression von post-meiotischen Transkripten gewidmet ist. Ungefähr zwei Drittel dieser Gene sind noch vollständig unerforscht. Die meisten der entsprechenden Proteine sind möglicherweise in reifen Spermatozoen zu finden. Die Ergebnisse von Knockouts an 19 dieser Gene erlauben die Schlussfolgerung, dass die Mehrzahl eine bedeutende Rolle für die Fruchtbarkeit spielt. Wir haben eine erstaunlich große Zahl an Genen identifiziert, die ganz spezifisch von männlichen Keimzellen spät in ihrer Entwicklung exprimiert sind. Diese Liste bietet eine Fülle potentieller Zielen für nicht-hormonelle Verhütungsmittel für den Mann und eine große Anzahl an Genen, die möglicherweise wichtig für die Befruchtung sind.

Oligonucleotid-Mikroarrays haben sich als die ideale Methode zur Untersuchung der Genexpression von Stammzellen der Spermatogenese und der verschiedenen Differenzierungsstadien der Keimzellen herausgestellt. Im Vergleich zu anderen Studien, die anderen Methoden benutzten, haben wir die bei weitem umfangreichste Datensammlung erstellt. Diese Daten werden sich als extrem wertvoll bei der Suche nach einem Zellsystem für Keimzellen erweisen und uns wichtige Hinweise zur Entschlüsselung der Spermatogenese und Befruchtung geben.