

Aus dem
Institut für Zoo- und Wildtierforschung (IZW)
im Forschungsverbund Berlin e.V.

Eingereicht über die
Professur für interdisziplinäre Zoo- und Wildtierforschung
des Fachbereiches Veterinärmedizin der
Freien Universität Berlin

Die saisonale Spermatogenese des Rehbockes ***(Capreolus capreolus)***

*Charakterisierung der saisonalen Veränderungen histomorphometrischer
Parameter des Rehhodens in Beziehung zur immunhistochemischen
Lokalisation der Wachstumsfaktoren TGF β 1 und 3, aFGF und VEGF*

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jennifer Schön
Tierärztin aus Lübeck

Berlin 2003

Journal Nr.: 2788

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. L. Brunnberg
Erster Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. Hofer
Zweiter Gutachter: PD Dr. T. Klonisch
Dritter Prüfer: Univ.-Prof. Dr. J. Plendl

Deskriptoren: Roe Deer, Testes, Spermatogenesis, Seasonal Changes,
Histology, Growth Factors, Immunohistochemistry

Tag der Promotion: 13.02.2004

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

Dissertation, Freie Universität Berlin, 2003

ISBN 3-89820-693-9

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

This document is protected by **copyright**.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of Mensch & Buch Verlag.

© **MENSCH & BUCH VERLAG**, Berlin 2004

Nordendstr. 75, 13156 Berlin • 030 - 45 49 48 66

<http://www.menschundbuch.de> • info@menschundbuch.de

Gewidmet:

Marga Künz

Rosalia Köhler

Gerda Rosner

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Grundlegende Prinzipien der Hodenstruktur und -funktion	4
2.1.1	Die Funktionen des Hodenparenchyms: Gametogenese und Hormonproduktion ...	4
2.1.1.1	Interstitielles Kompartiment: Steroidogenese	4
2.1.1.2	Tubuläres Kompartiment: Spermatogenese	5
2.1.1.2.1	Mitotische Vermehrung der Keimzellen: Spermatogonien	6
2.1.1.2.2	Meiose: Spermatozyten.....	8
2.1.1.2.3	Spermiogenese: Spermatisden entwickeln ihre funktionelle Form	9
2.1.1.2.4	Sertolizellen: die somatischen „Kindermädchen“ der germinativen Zellen	10
2.1.2	Teilung und Differenzierung der Keimzellen folgen einem streng determinierten Muster.....	13
2.1.2.1	Kriterien der Stadieneinteilung: der Versuch einer Systematisierung.....	13
2.2	Die Hypothalamus-Hypophysen-Gonadenachse kontrolliert die Spermatogenese	16
2.3	Wachstumsfaktoren modulieren und vermitteln hormonelle Signale	16
2.3.1	„insulin-like growth factors“ (IGFs) stimulieren die Proliferation verschiedenster Zelltypen	17
2.3.2	Die „fibroblast growth factor“ (FGF)-Familie besitzt starke mitogene Aktivität.....	18
2.3.3	„transforming growth factors“ (TGFs) regulieren Zellwachstum und -differenzierung	19
2.3.4	Der VEGF beeinflusst Endothelwachstum und -permeabilität.....	20
2.4	Die saisonal determinierte Spermatogenese	21
2.4.1	Das Reh (<i>Capreolus capreolus</i>) als Modelltier für die saisonale Spermatogenese.....	24
2.4.2	Saisonale Expression von Wachstumsfaktoren im Testisgewebe	26
3	FAZIT UND ZIELSTELLUNG	27

4	MATERIAL UND METHODEN	28
4.1	Chemikalien und Reagenzien	28
4.2	Laborgeräte	29
4.3	Verbrauchsmaterialien	30
4.4	Lösungen	31
4.4.1	Puffer	31
4.4.2	Fixierlösungen	32
4.4.3	Einbettmedium für die Elektronenmikroskopie	32
4.4.4	Lösungen für die histologischen Färbungen	33
4.5	Tiere	33
4.6	Probengewinnung	33
4.6.1	Präparation der Hoden	33
4.7	Histologische Aufarbeitung	34
4.7.1	Lichtmikroskopie	34
4.7.1.1	Histologische Färbungen	35
4.7.2	Elektronenmikroskopie	36
4.7.2.1	Trimmen und Schneiden	36
4.8	Bestimmung der Spermatogenesestadien	37
4.9	Morphometrie	38
4.9.1	Bestimmung der Durchmesser der Tubuli seminiferi	38
4.9.2	Bestimmung der Gewebezusammensetzung	38
4.9.3	Zellzählung zur Bestimmung der zellulären Komposition der Tubuli seminiferi	39
4.9.3.1	Mathematisches Modell für die Auswirkungen geometrischer Veränderungen auf die Sertolizellanzahl	39
4.10	Western Blot zur Spezifitätskontrolle der Antikörper für die Immunhistochemie	40
4.10.1	Proteinisolierung aus dem Gewebe	40
4.10.2	SDS-PAGE Gelelektrophorese	40
4.10.3	Western Blot und Immunodetektion	40

4.11 Immunhistochemie	41
4.11.1 Markierung der Leydigzellen mittels Immunhistochemie gegen den „relaxin-like factor“ (RLF)	42
4.11.1.1 Bestimmung der interstitiellen Gesamtzellanzahl und der Leydigzellanzahl	43
4.11.1.2 Mathematisches Modell für die Auswirkungen geometrischer Veränderungen auf die Anzahl interstitieller Zellen	43
4.11.2 Immunhistochemische Markierung der Gefäßendothelien	45
4.11.3 Nachweis der Wachstumsfaktoren	46
4.12 Statistische Analyse	48
5 ERGEBNISSE	49
5.1 Histologisch-morphometrische Untersuchung der saisonalen Veränderungen im Hodenparenchym des Rehbockes.....	49
5.1.1 Qualitative Beschreibung des histologischen Bildes	49
5.1.2 Quantitative Erfassung der saisonalen Veränderungen	55
5.1.2.1 Gewebezusammensetzung	55
5.1.2.2 Tubulusdurchmesser	55
5.1.2.3 Veränderungen der zellulären Zusammensetzung der Tubuli seminiferi	56
5.1.2.3.1 Sertolizellen	56
5.1.2.3.2 Spermatogonien	58
5.1.2.3.3 Spermatozyten	59
5.1.2.3.4 Spermatisden	60
5.1.3 Systematisierung der Spermatogenese des Rehbockes	60
5.1.4 Veränderungen der zellulären Zusammensetzung des Interstitiums	65
5.1.4.1 Interstitielle Gesamtzellzahl und Leydig'sche Zwischenzellen.....	65
5.1.4.2 Blutgefäße.....	69
5.2 Immunhistochemischer Nachweis saisonal exprimierter Wachstumsfaktoren	71
5.2.1 Western Blot und Immunodetektion zur Antikörper-Charakterisierung	71
5.2.1.1 Polyklonaler Kaninchen anti-Human-TGF β 1 Antikörper (Santa Cruz Biotechnologies).....	71
5.2.1.2 Polyklonaler Kaninchen anti-Human-TGF β 3 Antikörper (Santa Cruz Biotechnologies).....	71
5.2.1.3 Polyklonaler Maus anti-Human-VEGF Antikörper (RDI).....	71
5.2.1.4 Polyklonaler Kaninchen anti-Bovin-aFGF Antikörper (RDI).....	73

5.2.2	Immunhistochemische Detektion des TGFβ1 im Hodengewebe des Rehbockes	74
5.2.3	Immunhistochemische Detektion des TGFβ3	74
5.2.4	Immunhistochemische Detektion des VEGF	79
5.2.5	Immunhistochemische Detektion des aFGF	79
6	DISKUSSION	84
6.1	Diskussion der Ergebnisse	84
6.1.1	Die saisonalen Veränderungen am Hodenparenchym des Rehbockes.....	84
6.1.1.1	Germinative Zellen: Dynamik der Spermatogeneseaktivierung	85
6.1.1.2	Die Gesamtzahl von Leydig- und Sertolizellen bleibt über das Jahr konstant.	87
6.1.1.3	Hypothese: Leydigzellen ändern im Jahreszyklus lediglich ihren Zustand.....	88
6.1.1.4	Der RLF ist ein Differenzierungsgrad-abhängiger Marker für Leydigzellen.....	89
6.1.1.5	Die Blutgefäßdichte zeigt kaum saisonale Veränderungen.	90
6.1.2	Vier regulatorische Proteine, vier unterschiedliche saisonale Expressionsmuster	91
6.1.2.1	TGFβ1 und Apoptose	92
6.1.2.2	TGFβ3: Kommunikation zwischen germinativen Zellen und Sertolizellen.....	92
6.1.2.3	VEGF zeigt auf Proteinebene durchaus einen saisonalen Expressionsverlauf	93
6.1.2.4	Interagieren Sertolizelle und Spermatozyt über aFGF?	94
6.2	Kritische Bewertung der Methodik	95
6.2.1	Es wurde wenig, aber gut vergleichbares Probenmaterial untersucht	95
6.2.2	Die Probengewinnung und –aufarbeitung wurde weitgehend optimiert.	95
6.2.3	Die verwendeten Antikörper sind unterschiedlich gut für den Western Blot geeignet.....	96
6.3	Die Ergebnisse der Studie werfen neue Fragen auf.....	97
7	ZUSAMMENFASSUNG	98
8	SUMMARY	101

Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
A. bidest.	Aqua bidestillata, doppelt destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
ABP	Androgen bindendes Protein
aFGF	„acidic fibroblast growth factor“, saurer Fibroblasten Wachstumsfaktor
AS	Aminosäure
bFGF	„basic fibroblast growth factor“, basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor
BSA	Bovines Serumalbumin
DAB	Diaminobenzidin
DTT	Dithiothreit
EDS	Ethandimethansulfonat
EGF	“epidermal growth factor“, epidermaler Wachstumsfaktor
FGF	“fibroblast growth factor“, Fibroblasten Wachstumsfaktor
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
G	Zentrifugalbeschleunigung
GF	“growth factor“, Wachstumsfaktor
GH	“growth hormone“, Wachstumshormon
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
h	Stunde
HCG	Humanes Choriongonadotropin
HE	Hämalaun - Eosin
HVL	Hypophysenvorderlappen
IGF	“insulin-like growth factor“, insulinähnlicher Wachstumsfaktor
IgG	Immunglobulin G
kD	kilo Dalton
LH	Luteinisierendes Hormon
mg	Milligramm
min	Minute
mm	Millimeter
mRNA	“messenger ribonucleic acid“, ”Boten“-Ribonukleinsäure
nm	Nanometer
PAGE	Polyakrylamid Gelelektrophorese
PAS	“periodic-acid-Schiff“

PBS	“phosphat buffered saline”, phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBS-T	PBS mit Tween 20
PCR	“polymerase chain reaction”, Polymerasekettenreaktion
POD	Peroxidase
RLF	“relaxin-like factor”, relaxinähnlicher Faktor
RNA	“ribonucleic acid”, Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	„sodium dodecyl sulfate“, Natriumdodecylsulphat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Spg	Spermatogonie
Spt	Spermatide
Spz	Spermatozyt
TGF α	“transforming growth factor alpha”, transformierender Wachstumsfaktor alpha
TGF β	“transforming growth factor beta”, transformierender Wachstumsfaktor beta
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGF	“vascular endothelial growth factor”, vaskulärer Endothelzellen- Wachstumsfaktor

Danksagung:

Herrn Prof. Dr. H. Hofer und Frau Dr. K. Jewgenow danke ich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. S. Blottner für die kompetente Betreuung der Dissertation. Er ist fachlich wie menschlich ein Vorbild, und es war eine Freude mit ihm zu arbeiten.

Die Forschungsgruppe 4 des IZW hat mir die Aufnahme in ihre Gemeinschaft leicht gemacht und für viele vergnügliche Stunden gesorgt. Hierfür ein herzliches Dankeschön.

Vielen Dank besonders an Marlies Rohleder und Christiane Franz für ihre Hilfsbereitschaft und die Geduld, mit der sie meinen aufbrausenden Charakter während der gemeinsamen Arbeit ertragen haben.

Dagmar Viertel danke ich für die freundliche Einarbeitung in die Elektronenmikroskopie.

Dr. F. Göritz und Frau A. Krause danke ich für die Durchführung der Kastrationen und die schönen „laborfreien“ Tage auf der Feldforschungsstation.

Herr Dr. T. Klonisch und Frau Dr. S. Hombach-Klonisch gebührt mein Dank für die gute Kooperation, die hilfreichen Anregungen und fachlichen Diskussionen.

Vielen Dank auch an Herrn und Frau Baumann für ihren Einsatz bei der Pflege der Rehe auf der Feldforschungsstation Niederfinow.

Herrn Dr. W. Streich danke ich für die Ableitung der mathematischen Formel zur interstitiellen Gesamtzellzahl.

Jennifer Ringleb danke ich ganz herzlich für Ihre Freundschaft und die exzellente Zusammenarbeit im „Double Jenny Team“.

Alexandra Lehnen danke ich dafür, dass Sie mich trotz der vielen Arbeit in „Bewegung“ gehalten hat.

Meine Familie hat mir stets den nötigen Rückhalt gegeben. Vielen Dank!

Einen besonders herzlichen Dank an Volkmar Stolley für seine unerschütterliche Geduld mit mir und seine „Motivationskünste“.

Mein Dank gilt auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die mit ihrer finanziellen Unterstützung diese Arbeit ermöglicht hat.