

## 2 Literaturübersicht

Die der sexuellen Reproduktion zugrunde liegenden Mechanismen beschäftigen die Forschung schon seit langer Zeit. Der Grundstein für ein nicht religiös, sondern naturwissenschaftlich geprägtes Verständnis der Fortpflanzung wurde bereits in der Renaissance gelegt. Mit Hilfe neuer Technologien und Instrumente (vor allem des Mikroskops) beraubten die Wissenschaftler die Fortpflanzung immer schneller (wenn auch nicht vollständig) ihrer „Mysterien“. Schon 1658 beschrieb Aubrey das Vorhandensein von feinsten Kanälchen im Hodengewebe. 1678 untersuchte van Leeuwenhook mit einem selbstkonstruierten primitiven Mikroskop menschliches Sperma und spekulierte über dessen Ursprung aus dem Hodengewebe. Mit der schnellen Weiterentwicklung der Technik und deren optischen Möglichkeiten zog 1841 der Schweizer Biologe Koelliker bei seinen Untersuchungen an marinen Invertebraten den Schluss, dass Spermatozoen Transformationen von bereits im Hoden angelegten Zellen seien. In den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts entwickelten Clermont und Leblond die Akrosomenanfärbung mittels „periodic-acid-Schiff“-Reaktion. Dies ermöglichte erstmals eine klare systematische Einteilung und Beurteilung der Spermatogenese verschiedener Tierarten. Seither versucht die Wissenschaft, den Prozess der Spermatogenese sowie die ihn regulierenden Mechanismen aufzudecken und zu verstehen.

Heute sind die grundlegenden Prinzipien der Hodenfunktion bei den meisten Säugetieren bekannt und ausführlich beschrieben. Die biochemischen und molekularen Mechanismen ihrer Regulation dagegen sind noch unvollständig erforscht und stehen gegenwärtig im Vordergrund der Untersuchungen. Im Folgenden sollen die bekannten Grundlagen sowie wichtige offene Fragen kurz erläutert werden.

## 2.1 Grundlegende Prinzipien der Hodenstruktur und -funktion

### 2.1.1 Die Funktionen des Hodenparenchyms: Gametogenese und Hormonproduktion

Der Hoden erfüllt im wesentlichen zwei Hauptaufgaben: Produktion und Bereitstellung der männlichen Gameten (Spermatogenese) und die Synthese und Sekretion der männlichen Geschlechtshormone (Steroidogenese). Spermatogenese und Steroidogenese finden in zwei nach morphologischen und funktionellen Kriterien voneinander getrennten Kompartimenten statt. Das tubuläre Kompartiment, bestehend aus den Tubuli seminiferi oder Samenkanälchen, ist die epitheliale, mit einer Basalmembran umgebene Struktur, in der die Spermatogenese erfolgt. Als interstitielles, intertubuläres Kompartiment oder Interstitium wird der Raum zwischen den Samenkanälchen bezeichnet. Hier findet die Steroidogenese statt (Nieschlag und Behre 1996).

#### 2.1.1.1 Interstitielles Kompartiment: Steroidogenese

Der Volumenanteil dieses Kompartimentes beträgt bei den meisten Spezies 10-20%. Extrem wenig interstitielles Gewebe besitzt der Degu (*Octodon degus*) mit ca. 7%, während das interstitielle Kompartiment des Kamels (*Camelus dromedarius*) je nach Saison bis zu 39% (Zayed et al. 1995), das des Waldmurmeltieres (*Marmota monax*) sogar fast 70% des Hodenparenchyms ausmacht (Russell et al. 1990b). Auf die hormonproduzierenden Zellen des Interstitiums, die Leydigzellen, entfallen beim Menschen etwa 10-20% des interstitiellen Volumens, die Anzahl dieser Zellen ist demnach relativ gering (Nieschlag und Behre 1996).

Soweit von Labornagetieren und dem Menschen bekannt, entwickeln sich reife, adulte Leydigzellen im postnatalen Testis aus undifferenzierten mesenchymalen Vorläuferzellen. Sie wandern entweder aus den Tubuli des embryonalen Mesonephros in die Gonadenanlage ein oder entstammen dem Mesoderm, welches das lockere Bindegewebe der sich entwickelnden Gonade formt. Während einige dieser Zellen sich schon während der Fetalentwicklung zu Leydigzellen oder anderen interstitiellen Zelltypen entwickeln, verbleiben andere meist peritubulär lokalisierte Zellen in undifferenziertem Zustand und dienen als Vorläufer (sogenannte „precursor cells“) für die Leydigzellpopulation des postnatalen Testis. Der erste Schritt in der Leydigzelldifferenzierung ist die Umwandlung der „precursor cells“ in „Leydig cell progenitors“. Diese beiden Zelltypen sind nur funktionell, nicht aber morphologisch voneinander zu unterscheiden. Progenitor-Zellen bilden bereits steroidogene Enzyme, LH-Rezeptoren und zeigen teilweise schon Androgenproduktion. Die nächste Stufe der Differenzierung beinhaltet auch eine morphologische Veränderung der Leydigzellen. Sie können jetzt als neue adulte Leydigzellen bezeichnet werden. Im Gegensatz zu den

spindelförmigen Vorläufern sind adulte Leydigzellen polygonal und befinden sich nicht mehr im peritubulären Bereich, sondern wandern tiefer in das Interstitium ein. Sie weisen nur wenig Zytoplasma auf, so dass der Nukleus relativ groß erscheint. Diese neuen Leydigzellen entwickeln sich im Folgenden noch weiter, was sich vor allem durch einen Zuwachs an Zytoplasma und das Auftreten dort eingelagerter Lipidtröpfchen zeigt. Diese Lipidtröpfchen treten ausschließlich bei noch unreifen adulten Leydigzellen auf. Sie gehen im letzten Differenzierungsschritt wieder verloren, während die Testosteronsekretion, die Aktivität der steroidogenen Enzyme und die Sensitivität der Rezeptoren für LH noch einmal signifikant ansteigt (Mendis-Handagama 1991; Desjardins und Ewing 1993; Lejeune et al. 1998; Mendis-Handagama und Ariyaratne 2001). Untersuchungen an asaisonalen Labortieren haben gezeigt, dass die maturen Leydigzellen eine stabile Population bilden, die keine oder nur eine sehr geringe Fluktuationsrate („cell turnover“) aufweisen (Teerds et al. 1989; Mendis-Handagama 1991). Es ist jedoch möglich, ihre Vorläuferzellen durch eine artifizielle Zerstörung der Leydigzellen mittels Ethandimethansulfonat (EDS) zur Differenzierung anzuregen (Sharpe et al. 1990). Durch dauerhafte Behandlung mit humanem Choriongonadotropin (hCG, ein LH-Analogon) können sowohl die vorhandenen Leydigzellen zur Proliferation als auch die Vorläuferzellen zur Differenzierung veranlasst werden (Mendis-Handagama und Ariyaratne 2001).

Als weitere Funktionen des Interstitiums sind Versorgung, Immunkompetenz und Bewegung zu nennen. Im interstitiellen Kompartiment verlaufen im lockeren Bindegewebe Blut- und Lymphgefäße sowie Nervenbahnen. Weiterhin befinden sich hier auch zum Immunsystem gehörende Zellen wie Makrophagen und Lymphozyten. Die Samenkanälchen werden außerhalb der Basalmembran von sogenannten peritubulären Zellen (Myofibroblasten) umgeben. Hierbei handelt es sich um modifizierte Myozyten mit der Fähigkeit zu spontaner Kontraktion. Diese Zellen bilden 2 - 6 konzentrische Lagen um den Tubulus und sorgen durch periodische Kontraktionen für eine peristaltische Bewegung des gesamten Hodenkanälchens. Man vermutet, dass dadurch die Spermien im Lumen des Tubulus in Richtung der abführenden Kanäle geschwemmt werden (Nieschlag und Behre 1996).

#### *2.1.1.2 Tubuläres Kompartiment: Spermatogenese*

Im tubulären Kompartiment findet die Spermatogenese statt. Sie umfasst all die Prozesse, während derer diploide Zellen mehrere mitotische und zwei meiotische Teilungen durchlaufen, um sich zu hochdifferenzierten und -spezialisierten haploiden männlichen Keimzellen zu entwickeln. Abbildung 1 stellt schematisch einen Ausschnitt aus einem quer geschnittenen Tubulus seminiferus dar.

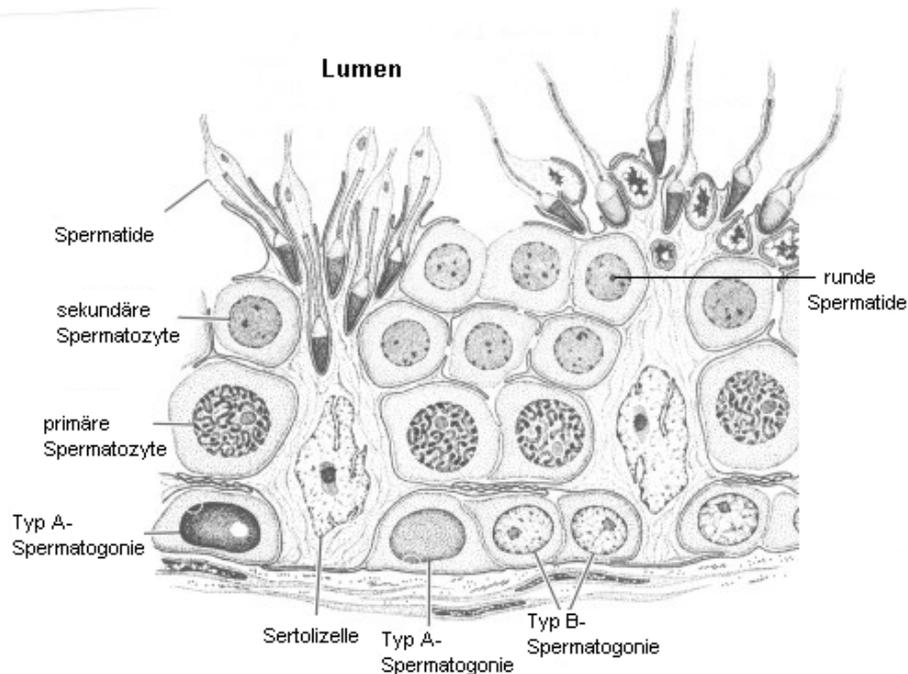


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Ausschnittes aus dem Tubulus seminiferus (verändert nach: <http://www.erin.utoronto.ca/~w3bio380/Lectsked/Lect06/Sperm2.htm#2>, Professor H. O'Day, University of Toronto, Human development, Lecture 6, Formation of the male sex cells: Spermatogenesis)

### Spermatogenese beinhaltet

- Erneuerung, Proliferation und Differenzierung der Spermatogonien
- Meiose (Erzeugung der Haploidie und genetische Rekombination)
- Differenzierung der Meioseprodukte während der Spermio-genese

#### 2.1.1.2.1 Mitotische Vermehrung der Keimzellen: Spermatogonien

Die männlichen Individuen der meisten Säugetierspezies produzieren während ihrer reproduktiven Phase Millionen von Spermien pro Tag. Hierzu ist zunächst eine Vermehrung der spermatogenen Zellen nötig. Diese Aufgabe erfüllen die „Ursprungszellen“ der Spermatogenese: die Spermatogonien (Russell et al. 1990a). Ebner unterschied sie 1871 von den Sertolizellen und La Valette St. Georg bezeichnete sie 1876 erstmals als Spermatogonien (de Kretser und Kerr 1994).

Spermatogonien teilen sich mehrfach mitotisch, treten im Anschluss daran in die Meiose ein und differenzieren zu Spermien. Die mitotischen Teilungen bewirken hierbei eine Vertausendfachung der Zellanzahl, während die Meiose lediglich zu einer weiteren Vervierfachung führt. Die Spermatogonienpopulation muss aber nicht nur die Vermehrung der

in die Spermatogenese eintretenden Zellen gewährleisten, sie muss sich auch stets selbst erneuern. Man unterscheidet drei Arten von Spermatogonien: Stammzellen, proliferierende und differenzierende Spermatogonien. Die ersten beiden Gruppen werden auch als undifferenzierte Spermatogonien bezeichnet. Stammzellen gelten aufgrund ihrer niedrigen Teilungsrate als sehr widerstandsfähig gegen schädliche Einflüsse aus der Umwelt. Die proliferierenden und differenzierenden Spermatogonien zeigen eine wesentlich höhere Teilungsrate und sind dementsprechend anfälliger gegen Noxen, welche die Spermatogenese beeinflussen können (Russell et al. 1990a; de Kretser und Kerr 1994).

Die Spermatogonien wurden zunächst aufgrund ihrer unterschiedlichen Chromatin-Verteilung in den Zellkernen in zwei Spermatogonientypen unterteilt: „dusty cells“ (Chromatin staubartig über den Zellkern verteilt) und „crusty cells“ (krustige Chromatinschollen im Nukleoplasma). Heute ist eine andere Terminologie gebräuchlich. Man spricht von den „dusty cells“ als A-Spermatogonien und von den „crusty cells“ als B-Spermatogonien. Morphologische Zwischenstufen werden als intermediäre Spermatogonien bezeichnet (Russell et al. 1990a; de Kretser und Kerr 1994). Das Modell von Huckins und Oakberg, das sogenannte  $A_s$ -Modell, geht davon aus, dass eine Population von undifferenzierten Spermatogonien der Basalmembran der Tubuli seminiferi aufliegt. Aufgrund ihrer topographischen Anordnung können einzeln liegende ( $A_{\text{single}}$ ,  $A_s$ ), gepaarte ( $A_{\text{paired}}$ ,  $A_p$ ) und aufgereihete ( $A_{\text{aligned}}$ ,  $A_{\text{al}}$ ) Spermatogonien unterschieden werden.  $A_s$  Spermatogonien werden als Stammzellen angesehen, deren Tochterzellen sich entweder voneinander lösen und zu neuen Stammzellen werden können oder als  $A_p$  Spermatogonien durch interzelluläre Brücken miteinander verbunden bleiben und weitere Zellteilungen durchlaufen, so dass sie in Ketten zu 4, 8 oder 16 Zellen zusammenliegen und als  $A_{\text{al}}$  bezeichnet werden können.  $A_{\text{al}}$  Spermatogonien entwickeln sich zu A1-Spermatogonien, der ersten Generation sich differenzierender Spermatogonien. Auch sie teilen sich noch mehrfach (A2-, A3-, A4-, Intermediäre, B-Spermatogonien) und treten dann als primäre Spermatozyten in die Meiose ein (Abb. 2).

Nur einige der verschiedenen Spermatogonientypen lassen sich auch wirklich morphologisch voneinander unterscheiden. In den meisten Spezies erscheinen alle Typ A-Spermatogonien relativ ähnlich. Es ist aber meist möglich, Typ A-, Intermediär- und B-Spermatogonien durch die Beurteilung von Menge und Verteilung des Chromatins im Zellkern voneinander abzugrenzen (Russell et al. 1990a).

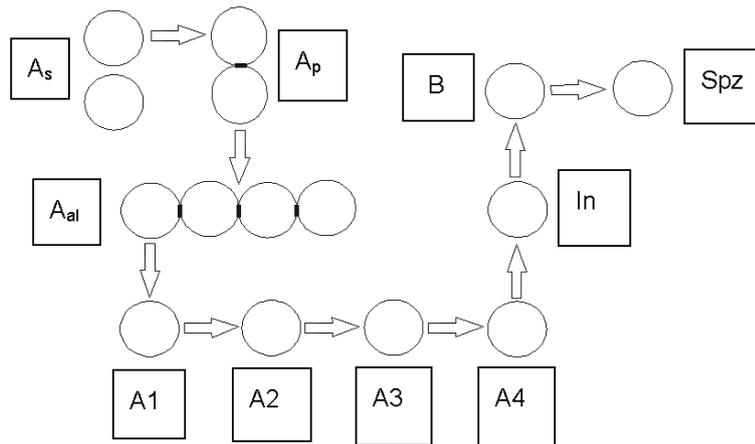


Abb. 2: Schematische Darstellung der Spermatogonienentwicklung (A<sub>s</sub>, A<sub>single</sub>-Spermatogonien; A<sub>al</sub>, A<sub>aligned</sub>-Spermatogonien; A<sub>p</sub>, A<sub>paired</sub>-Spermatogonien; In, intermediäre Spermatogonien; B, B-Spermatogonien; Spz, Spermatozyten)

#### 2.1.1.2.2 Meiose: Spermatozyten

Am Ende ihrer Differenzierungsphase teilen sich die B-Spermatogonien und treten als leptotäne Spermatozyten in die Prophase der Meiose ein. Sie lösen sich von der Basalmembran ab und wandern in Richtung Interstitium, wobei sich ihr Zellkern abrundet. Im Zygotän der meiotischen Prophase lagern sich die homologen Chromosomen entlang der synaptonemalen Komplexe aneinander. Da die Chromosomen nun gepaart vorliegen, erscheinen die Chromatinfäden im Lichtmikroskop dicker als in den leptotänen Spermatozyten. In pachytänen Spermatozyten sind die Chromosomen vollständig gepaart und verbleiben so für einen längeren Zeitraum (in allen bisher untersuchten Spezies über eine Woche). Pachytäne Zellen werden synthetisch sehr aktiv und nehmen in der Größe rapide zu. Die Kerne werden größer, das Chromatin erscheint dadurch weiter verteilt. Späte pachytäne Spermatozytenkerne sind immer ovoid, frühere hingegen rund. Die diplotäne Phase der Meiose ist nur kurz. Der synaptonemale Komplex verschwindet, die Chromosomenpaare lösen sich bis auf einige Gebiete (Chiasmata) wieder voneinander. Diese Phase ist im histologischen Bild nur schwer auszumachen. Diplotäne Spermatozyten sind die größten Spermatozyten und damit die größten männlichen germinativen Zellen überhaupt. Während die Prophase der Meiose eine sehr lange Zeit beansprucht, wird die Zellteilung im Anschluss sehr schnell beendet. Die erste meiotische Teilung (Äquationsteilung) lässt sekundäre Spermatozyten entstehen. Die ebenfalls sehr schnell erfolgende zweite meiotische Teilung (Reduktionsteilung) bringt die runden, haploiden Spermatisen hervor (Übersichten: Russell et al. 1990a; de Kretser und Kerr 1994).

### 2.1.1.2.3 Spermiogenese: Spermatozoen entwickeln ihre funktionelle Form

Das Spermium ist das Endprodukt der Spermatogenese: eine außergewöhnliche Zelle, die darauf ausgerichtet ist, ihre DNA in eine weit entfernte Zielzelle, die Oozyte, einzubringen. Zu diesem Zweck ist sie ausgestattet mit einem Kopf, der kompakte, kondensierte DNA enthält, einem Akrosom, das Enzyme und andere spezifische Proteine beinhaltet und einem Schwanz, bestehend aus einem kontraktilem Apparat und den Zellorganellen, welche die zur Bewegung notwendige Energie bereitstellen. Die Umwandlung von Spermatozoen zu Spermien ist ein ebenso faszinierender wie komplexer Vorgang. Es findet keine Zellteilung statt, vielmehr ein metamorphotischer Prozess, in dessen Verlauf eine gleichmäßig geformte Zelle zu einer äußerlich stark kompartmentierten, hochspezifischen, motilen Struktur umgewandelt wird. Dieser Prozess beinhaltet zeitgleich die Kondensation und strukturelle Ausformung des Zellkerns, die Entwicklung von Akrosom und Flagellum und die Abstoßung großer Zytoplasmaanteile (Übersichten: Clermont und Leblond 1955; Russell et al. 1990a; de Kretser und Kerr 1994; Nieschlag und Behre 1996; de Kretser et al. 1998).

Bei den meisten Säugetierspezies verändert sich die Position des Kerns während der Spermiogenese von zentral nach exzentrisch. Indem das Zytoplasma immer stärker zurückweicht, wird die von der Zellmembran umschlossene Kernfläche immer größer. Gemeinsam mit dieser Lokalisationsveränderung des Kerns findet eine fortschreitende Kondensation des Chromatins statt, das schließlich zu einer kompakten Masse wird. Hierbei werden lysinreiche Histone gegen argininreiche, hoden-spezifische Protamine ausgetauscht. In der späten Spermiogenese kommt es zur nahezu vollständigen Einstellung der Gentranskription innerhalb des Zellkerns. Während der Chromatinverdichtung verliert der Kern immer mehr an Volumen und bildet eine für jede Spezies charakteristische Form aus.

Die Entwicklung des Akrosoms lässt sich in vier Phasen einteilen: Golgi-, Kappen-, akrosomale und Reifungsphase. Während der *Golgi*-Phase finden sich in den neu entstandenen Spermatozoen im kernnahen Golgi-Apparat einige kleine membranumschlossene Vakuolen, deren granulärer Inhalt sich mit der „periodic-acid-Schiff“ (PAS) Reaktion anfärben lässt. Einige dieser Vakuolen mit den sogenannten proakrosomalen Granula vereinigen sich zum akrosomalen Vesikel. Es bewegt sich auf den Kern zu und lagert sich an die Kernmembran an. In der darauf folgenden *Kappenphase* flacht sich das akrosomale Vesikel ab und legt sich kappenartig um den Kern. Das akrosomale Granulum fließt erst in der *akrosomalen Phase* zwischen die Membranblätter ein und formt so das Akrosom. Die *Reifungsphase* schließt die Entwicklung ab. Das Akrosom zieht sich langsam über einen großen Teil des Kerns und passt sich der Elongation des Zellkerns an.

Die Entwicklung des Flagellums beginnt, indem die Zentriolen der jungen runden Spermatide zur Zelloberfläche wandern, wo eines der beiden ein Axonem bildet. Diese Struktur beinhaltet Mikrotubuli, die in einem  $9 \times 2 + 2$  System angeordnet sind. Das Flagellum wächst schnell in Richtung Tubuluslumen, wobei sein Zentriol wieder ins Zytoplasma hinein auf den Kern zuwandert. Die an ihm haftende Plasmamembran faltet sich dabei ein. Das Flagellum implantiert an der Kernmembran und zwar immer an dem Pol, der dem Akrosom gegenüberliegt. Zur vollständigen Ausdifferenzierung des Flagellums gehört das helikale Arrangement der Mitochondrien um das Mittelstück, die Formation von „dense fibres“ als Stützelemente im Mittel- und Endstück und die Stabilisierung des Endstückes durch fibröse Ringe.

Die Spermatide reduziert ihr Volumen um etwa 75%, bevor sie als Spermium mit der Spermiation in das Tubuluslumen entlassen wird. Zu diesem Zweck wird während des Elongationsprozesses zunächst Wasser aus Kern und Zytoplasma ausgeschleust, was die höhere Dichte, die diese Zellen im mikroskopischen Bild aufweisen, erklärt. Außerdem wird Zytoplasma durch die immer wieder kurzfristig auftretenden tubulobulbären Komplexe am Kopf der Spermatide abgeschnürt und von Sertolizellen phagozytiert. Noch während der Spermiation wird rund ein Viertel des Zytoplasmas mit dem sogenannten Restkörperchen („residual body“) eliminiert. Auch diese Fragmente werden von den Sertolizellen phagozytiert. Nur ein kleiner Zytoplasmotropfen bleibt im Halsbereich der Spermatide erhalten, welcher erst mit fortschreitender Reifung des Spermiums im Nebenhoden verschwindet.

#### 2.1.1.2.4 Sertolizellen: die somatischen „Kinder mädchen“ der germinativen Zellen

Sertolizellen stellen die einzige somatische Zellpopulation innerhalb der Tubuli seminiferi dar. Sie vermehren sich während der Pubertät und werden nach Erreichen der Geschlechtsreife als teilungsinaktiv angesehen. Lichtmikroskopisch sind diese Zellen schwer fassbar. Es ist nur ihr unregelmäßig geformter Zellkern, mit dem großen oftmals dreigeteilten Nukleolus, erkennbar. Sertolizellen sitzen wie die Spermatogonien der Basalmembran auf, reichen aber mit ihren Zellausläufern bis an das Lumen der Tubuli heran, was einer Höhe von bis zu 100  $\mu\text{m}$  entspricht. Ihre feinen Zellausläufer umfließen alle germinativen Zellen mit Ausnahme der Spermatogonien (Übersicht: Bardin et al. 1994).

### „Blut-Hoden-Schranke“

Das Keimepithel wird durch die Sertolizellen in zwei permanente Kompartimente unterteilt. Im basalen Kompartiment liegen die Spermatogonien und Spermatozyten bis zum frühen Leptotänstadium. Diese Zellen haben relativ freien Zugang zu der die Tubuli umgebende Lymphe und damit indirekt zu Stoffen, die im Blut zirkulieren. Oberhalb dieser direkt der Basallamina aufsitzenden Zellen verbinden sich die Sertolizellen basolateral mittels “tight junctions“, grenzen damit das basale vom luminalen Kompartiment ab und bilden so die Blut-Hoden-Schranke (die heute eigentlich korrekt „Sertolizell-Schranke“ genannt werden sollte). Ein drittes, nicht permanentes Kompartiment, wird während des Durchtrittes der Spermatozyten durch die Blut-Hoden-Schranke gebildet, was durch gezieltes Lösen und Neuformen von “tight junctions“ zwischen den Sertolizellen ermöglicht wird. Das Aufbauen dieses *intermediären* Kompartimentes sichert die Aufrechterhaltung der Sertolizell-Schranke. Diese immunologische Barriere hindert das Immunsystem an der Erkennung von Autoantigenen, die auf Spermatozyten oder Spermatiden exprimiert werden. Sie ist aber keinesfalls als völlig undurchlässiges Gebilde anzusehen. Vielmehr unterstützt sie auch den gezielten und kontrollierten Transport bestimmter Substanzen. Einige, meist höhermolekulare Stoffe, können nur über einen zytoplasmatischen Transit durch die Sertolizelle zu den germinativen Zellen gelangen, während andere offenbar selektiv über interzelluläre Kanäle eingeschleust werden.

Die Sertolizellen scheinen sich aktiv am Transport der Keimzellen vom basalen zum adluminalen Kompartiment zu beteiligen. Diese Bewegung wird zum einen durch den steigenden Druck der sich vermehrenden germinativen Zellen gefördert, aber offensichtlich auch durch das gezielte Eingehen und Lösen von Sertolizell-Keimzell-Verbindungen bewerkstelligt. Durch ebensolche Verbindungen werden die elongierenden Spermatiden bis zur Spermiation in tiefen Krypten innerhalb der Sertolizelle festgehalten. Sie entlässt die Spermatide während der Spermiation in das Tubulolumen und beteiligt sich dabei aktiv am Ablösungsprozess.

### Sertolizellen sorgen für Stabilität und Kommunikation

Sertolizellen unterhalten zahlreiche Kontakte zu anderen Zellen und azellulären Elementen des Tubulus. Sie sind untereinander über Desmosomen, “gap junctions“ und “tight junctions“, mit den germinativen Zellen über desmosomähnliche Apparate, “gap junctions“ und tubulobulbäre Komplexe und mit der Basallamina über Hemidesmosomen verbunden. All diese Verknüpfungen stabilisieren die strukturelle Integrität der Tubuli und ermöglichen den Sertolizellen eine intensive Zell-Zell-Kommunikation, die für einen synchronisierten Ablauf der Spermatogenese unerlässlich ist (Schulze 1992). Ein weiterer erheblicher Effekt dieser

interzellulären Kontakte besteht darin, dass die Flüssigkeit, die von den Sertolizellen ständig in das Tubuluslumen abgegeben wird, nicht basal abgeführt und von der Lymphe aufgenommen werden kann. Dies bewirkt den Aufbau eines gewissen Druckes, welcher das Tubuluslumen weit hält. Diese Flüssigkeit ist auch das Medium, mit dem die Spermien nach der Spermiation durch die abführenden Kanäle bis in den Nebenhoden transportiert werden.

### Nutritive Versorgung der Keimzellen

Sertolizellen fungieren als versorgende „Brückenzellen“, indem sie die Keimzellen mit aus Blut und Lymphe gewonnenen Substanzen versorgen. Dabei reichen sie die Nährstoffe allerdings nicht nur weiter, sie modellieren und modifizieren sie noch während des Transfers und passen sie an die Bedürfnisse der Keimzellen an.

### Phagozytose

Germinative Zellen sind aufgrund ihrer hohen Teilungsrate sehr degenerationsanfällig. Degeneration und Apoptose sind Prozesse, die während der Spermatogenese immer in einem gewissen Umfang ablaufen. Alle so zugrunde gegangenen Zellen, wie auch Zytoplasmaabschnürungen während der Spermio-genese, werden von den Sertolizellen aufgenommen und eliminiert.

### Sertolizellen und hormonelle Steuerung

Sertolizellen sind Zielzellen von Hormonen und Mediatoren ihrer Signale. Sie besitzen Rezeptoren für das Follikel-stimulierende Hormon (FSH) und für Testosteron. Viele der von den Sertolizellen produzierten und sezernierten Proteine modulieren Hormonsignale. So wird z.B. das androgenbindende Protein von ihnen gebildet, das zur Vermittlung der Androgenwirkung im Hodengewebe benötigt wird (Hagenas et al. 1975). In limitiertem Umfang sind Sertolizellen zur Steroidogenese und zum Steroidmetabolismus befähigt; die Bedeutung dieser Hormonproduktion ist aber noch nicht vollständig geklärt (Russell et al. 1990a; Bardin et al. 1994). Des Weiteren produzieren sie Wachstumsfaktoren (“transforming growth factor  $\alpha$  und  $\beta$ ”, “insulin-like growth factor”) und andere signalgebende Proteine (Übersicht: Schulze 1992).

## **2.1.2 Teilung und Differenzierung der Keimzellen folgen einem streng determinierten Muster**

Bei der Spermatogenese handelt es sich um einen stetigen Prozess von Teilung und Differenzierung. An einer bestimmten Stelle des Keimepithels sind somit immer mehrere Entwicklungsstufen germinativer Zellen gleichzeitig im Verbund mit der Sertolizelle anzutreffen. Jeder dieser Teilungs- und Differenzierungsschritte nimmt eine festgelegte Zeitspanne in Anspruch. Dadurch ist die Kombination der gleichzeitig an einem Ort des Tubulus zu beobachtenden Entwicklungsstufen relativ genau festgelegt (zeitliche Abhängigkeit). Benachbart liegende Spermatogonien scheinen sich in ihrer Teilungsfrequenz zu synchronisieren. Darüber hinaus sind alle Zellen, die aus einer „Stamm Spermatogonie“ hervorgehen, über interzelluläre Brücken mit einander verbunden, weshalb bei den meisten Tierarten die Spermatogenese in ganzen Tubulussegmenten synchron verläuft. Die Ausnahme bilden hier Primaten, bei denen die Zellgruppierungen nicht segmental sondern helikal angeordnet sind (räumliche Abhängigkeit).

Im histologischen Bild können also in quer angeschnittenen Tubuli seminiferi stets verschiedene Typen von germinativen Zellen identifiziert werden, die in konzentrischen Schichten übereinanderliegen. Diese Kompositionen germinativer Zelltypen in unterschiedlichen Entwicklungsstufen werden als Zellassoziation oder auch Spermatogenesestadien bezeichnet. Unter dem Spermatogenesezyklus versteht man die zeitliche Abfolge aller Spermatogenesestadien an einem Ort des Keimepithels (Übersicht: Sharpe 1994).

### *2.1.2.1 Kriterien der Stadieneinteilung: der Versuch einer Systematisierung*

Der Prozess der Spermatogenese läuft streng koordiniert ab, so dass die Spermatogenesestadien stets auch bestimmte Funktionszustände der sie bildenden Zelltypen widerspiegeln. Dies zeigt sich z.B. in der stadienspezifischen Expression bestimmter Gene und Proteine (Sharpe et al. 1992; Sluka et al. 2002; Yu et al. 2003). Es ist daher besonders für Untersuchungen zur Feinregulation der Spermatogenese wichtig, diese Stadien einteilen und dokumentieren zu können. Immer wieder ergeben sich aber Probleme bei dem Versuch, biologische Vorgänge mittels Systematisierung dem menschlichen Verständnis näher zu bringen. Die Ursache hierfür liegt sicherlich darin begründet, dass biologische Vorgänge meist nicht systematisch oder kategorisch ablaufen, sondern aus kontinuierlichen Veränderungen bestehen, die fließend ineinander übergehen. Auch und gerade die Spermatogenese ist ein solcher Prozess. Die Einteilung der Spermatogenesestadien ist eine artifizielle Schematisierung und kann die Wirklichkeit nur begrenzt widerspiegeln. Die Zahl der Spermatogenesestadien richtet sich nach den für die Einteilung herangezogenen Kriterien.

Des Weiteren beeinflusst auch die Fähigkeit des Untersuchenden, kleine und kleinste Unterschiede in der Entwicklung der germinativen Zellen noch zu erkennen und sicher wiederaufzufinden, die Zahl der definierten Stadien (Sharpe 1994).

Eine von vielen Untersuchern genutzte Methode zur Unterscheidung und Systematisierung der Spermatogenesestadien haben Clermont und Leblond 1952 entwickelt. Sie basiert auf der Darstellung der Veränderungen des akrosomalen Systems der Spermatiden mittels PAS-Reaktion. Diese Veränderungen werden als Ordnungskriterien für die Stadien genutzt (Leblond und Clermont 1952a; Leblond und Clermont 1952b; Clermont und Leblond 1955; Clermont 1972). Daneben findet ein weiteres von Roosen-Runge und Giesel 1950 entwickeltes System Verwendung, bei dem die Kernbilder der Zellassoziationen als Kriterium dienen. Die Spermatogenesezyklen der Haus- und Labortiere sind heute detailliert beschrieben. Leider verwenden verschiedene Untersucher verschiedene Systeme der Einteilung und der schematischen Klassifizierung. Eine Vergleichbarkeit der Arbeiten zu einem Tier, wie auch zwischen den Spezies, ist somit nicht gegeben, wie Tabelle 1 verdeutlicht.

Böhme und Pier versuchten 1986 ein System zu etablieren, welches praktikable Hinweise für eine übersichtliche Betrachtung des Spermatogenesezyklus gibt, um eben dieser mangelnden Vergleichbarkeit, bedingt durch die verwendeten unterschiedlichen Einteilungskriterien, entgegenzuwirken. Es wird davon ausgegangen, dass bei der Entwicklung von der runden zur elongierten Spermatide grundsätzlich 8 Entwicklungsstufen abgrenzbar sind. Eine weitere Unterteilung ist zwar bei vielen Spezies möglich, aber der Vergleichbarkeit der Ereignisse abträglich. Des Weiteren wird versucht, eine allgemeingültige schematische Form für den Spermatogenesezyklus zu etablieren. Als Stadium I wird das Stadium bezeichnet, in dem die neue Spermatidengeneration erscheint. Stadium IV ist als Spermiationsstadium festgelegt und in Stadium VIII ist die Elongation der Spermatiden abgeschlossen sowie die meiotische Teilung vollendet. Die Ordnungskriterien dieser Studie sind zwar von den Verhältnissen beim Kater gewonnen, da sie aber wichtige Vorgänge während der Spermatogenese erfassen, sind sie allgemein anwendbar und machen Aussagen für einzelne Spezies vergleichbar (Böhme und Pier 1986).

Trotz solcher Ansätze sind aber auch die Verfasser jüngst erschienener Veröffentlichungen nicht bereit, sich auf solche allgemein gültigen Regeln einzulassen. In der neuesten, erstmals quantitativ ausgerichteten Arbeit zum Spermatogenesezyklus des Katers werden die Keimepithelstadien zum wiederholten Male eingeteilt. Man kommt zwar in dieser Einteilung betreffend die Zellassoziationen zu grundsätzlich gleichen Ergebnissen, zieht es aber vor, wiederum eine neue Reihenfolge und schematische Darstellungsweise zu wählen (Franca und Godinho 2003).

Tierart	Stadien	Spermiation in Stadium	Autor
Rind	8	8	Berchthold 1963
	8	3	Suswillo und Watson 1993
	12	6	Berndston 1974
Schwein	8	8	Franca und Cardoso 1998
Pferd	8	8	Johnson 1978
Hund	8	6	Russell 1990
Silberfuchs	8	8	Berg 1998
Katze	8	4	Pier 1996
	8	8	Franca 2003
Maus	12	9	Russell 1990
Hasenmaus	9	4	Munoz 1998
Ratte	14	9	Russell 1990
Präriehund	10	10	Foreman 1997
Damhirsch	8	8	Wrobel 1993
Rothirsch	8	8	Hochereau- de Reviere 1978

Tabelle 1: Vergleich verschiedener Arbeiten zum Spermatogenesezyklus

In der Literatur finden sich kaum systematische Arbeiten zur Einteilung der Keimepithelstadien bei den Cerviden. Bisher wurden nur Dam- und Rothirsch dahingehend untersucht, wobei angemerkt werden sollte, dass in der Arbeit zum Rothirsch die Einteilung übernommen wurde, die Roosen-Runge und Giesel 1950 für die Ratte beschrieben haben (Hochereau-de Reviere und Lincoln 1978; Wrobel et al. 1993). Für das Reh sind die Stadien des Keimepithelzyklus bisher nicht charakterisiert worden.

## **2.2 Die Hypothalamus-Hypophysen-Gonadenachse kontrolliert die Spermatogenese**

Die Spermatogenese wird über die Hypothalamus-Hypophysen-Gonadenachse hormonell reguliert. Der Hypothalamus entlässt pulsatil „Gonadotropin Releasing Hormon“ (GnRH) in das pfortaderähnliche Gefäßsystem des Hypophysenvorderlappens (HVL). Dadurch wird der HVL zur Ausschüttung der Gonadotropine „luteinisierendes Hormon“ (LH) und „follikelstimulierendes Hormon“ (FSH) in den Blutkreislauf angeregt. LH stimuliert im Hodengewebe die Androgenproduktion der Leydig'schen Zwischenzellen. Testosteron wird in den Blutkreislauf abgegeben und kann über einen negativen Rückkopplungsmechanismus die LH-Ausschüttung aus dem HVL senken. Im Hodengewebe selbst wird das Testosteron in das basale Kompartiment der Samenkanälchen eingeschleust, kann die Blut-Hoden-Schranke aber erst in Verbindung mit dem Androgen-bindenden Protein (ABP) überwinden. Die Zielzelle des Gonadotropins FSH ist die Sertolizelle. Sie produziert unter FSH-Einfluss das ABP und erhöht so die Testosteronkonzentration im Hodenkanälchen. Die FSH-Freisetzung wird durch ein von den Sertolizellen produziertes „Inhibin“ reguliert (Übersichten: Zirkin 1993; Sharpe 1994; Steger 2001).

Die Wirkung des Androgens Testosteron ist komplex und durchaus nicht auf das Hodengewebe beschränkt. Es ist für die Ausbildung und Funktion der Gonaden, die Formung des Muskel-Skeletapparates und die Stimulation der Libido essentiell (Nieschlag und Behre 1996). Innerhalb der Spermatogenese entfaltet das Testosteron eine spezifische Wirkung auf die Reifung von runden zu elongierten Spermatozyten (O'Donnell et al. 1994). Testosteronentzug kann aber auch zu einer unmittelbaren Arretierung der meiotischen Transformation primärer Spermatozyten zu Spermatozyten und damit zu einer Blockierung der Spermienproduktion führen (Suresh et al. 1995; Jeyakumar et al. 1995).

## **2.3 Wachstumsfaktoren modulieren und vermitteln hormonelle Signale**

Gonadotropin-Rezeptoren finden sich im Hodengewebe nur auf Leydig- bzw. Sertolizellen. Diese Zellen regulieren die Spermatogenese nicht allein durch die Testosteronbildung und -bindung, vielmehr werden die endokrinen Signale darüber hinaus von einer Vielzahl lokaler Faktoren moduliert, die über parakrine oder autokrine Mechanismen wirksam sind. Beispiele dafür sind das c-kit System, die Interleukine und auch bestimmte Adhäsionsmoleküle. Eine besondere Bedeutung kommt innerhalb der Gruppe signalgebender Proteine den Wachstumsfaktoren zu (Skinner 1987; Skinner 1991; Skinner et al. 1991; Verhoeven 1992; Spiteri-Grech und Nieschlag 1993; Schlatt et al. 1997).

Im Gegensatz zu Hormonen werden Wachstumsfaktoren nicht in speziellen endokrinen Organen gebildet, sondern von unterschiedlichsten Zellen ausgeschüttet. Meist sind die relativ kleinen Peptide lokal am Ort ihrer Produktion wirksam. Dabei sind sowohl para- als auch

autokrine Mechanismen möglich. Allerdings lassen sich endo- und parakrine Regulationswege nicht immer strikt abgrenzen, da auch Wachstumsfaktoren im Blut zirkulieren (wie z.B. IGF-1 und -2) und so auf weit entfernte Zielzellen Einfluss nehmen können. Zusätzlich zu wachstumsstimulierenden und differenzierungsfördernden Wirkungen können Wachstumsfaktoren auch unterschiedlichste metabolische Effekte in der Zielzelle auslösen (Übersicht: Pimentel 1994a).

Para- und autokrine Mechanismen sind gerade in der Spermatogenese bisher noch unvollständig untersucht. Trotz der bekanntermaßen sehr verwobenen und umgebungsabhängigen Mechanismen werden viele dieser Studien an genetisch veränderten Labortieren oder in der Zellkultur durchgeführt. Beim zumeist asaisonalen Labortier wird im Zusammenhang mit Wachstumsfaktoren häufig die postnatale bis pubertale Phase beleuchtet. Diese Vorgänge sind sicher nicht ohne weiteres auf die saisonal regulierte Spermatogenese übertragbar. Sie werden aber im folgende Abschnitt trotzdem mit aufgeführt, da er einen Eindruck von der vielfältigen Aufgabe dieser Faktoren vermitteln soll.

### **2.3.1 „insulin-like growth factors“ (IGFs) stimulieren die Proliferation verschiedenster Zelltypen**

Die insulinähnlichen Wachstumsfaktoren sind Teil der „insulin-like superfamily“, zu der neben den Wachstumsfaktoren IGF-1, IGF-2 und dem „relaxin-like growth factor“ (RLF) auch die Hormone Placentin und Relaxin gehören. Diese etwas widersprüchliche Zusammenfassung funktionell unterschiedlicher Proteine zu einer Familie rührt daher, dass sie alle eine Struktur besitzen, die der des Insulins sehr ähnlich ist. Die Wirkung beider IGF-Proteine wird durch die Bildung spezifischer Bindungsproteine moduliert (LeRoith und Roberts, Jr. 1993).

#### IGF-1 vermittelt viele Wirkungen des Wachstumshormons

IGF-1 spielt im Wachstumsgeschehen der Mammalia eine breitgefächerte Rolle. Das 70 Aminosäuren (AS) lange Polypeptid kann als im Blut zirkulierender Wachstumsfaktor systemisch agieren. Genauso ist es aber auch ein Aktivator lokaler Wachstumsprozesse sowie der Zell- und Gewebedifferenzierung (Daughaday und Rotwein 1989; Rotwein et al. 1993). IGF-1 wird vorwiegend in der Leber ausgeschüttet, gleichzeitig wird er aber von den meisten Gewebetypen des Körpers gebildet und vermittelt viele Effekte des Wachstumshormons (GH) (Vasilatos-Younken et al. 1997). Im Testisgewebe wurde er in Leydig- und Sertolizellen detektiert. IGF-1 Membran-Rezeptoren befinden sich auf Sertoli- und Leydigzellen, aber auch auf sekundären Spermatozyten und frühen Spermatischen, was die Vermutung nahe legt, dass dieser Faktor autokrin auf die Sertoli- und Leydigzellfunktion Einfluss nimmt, ebenso, wie er parakrin im Keimepithelzyklus eine Rolle spielt (Vannelli et al. 1988; Spiteri-Grech und Nieschlag 1993). Des Weiteren stimuliert er *in vitro* die

Steroidogenese in den Leydigzellen (Benahmed et al. 1987) und scheint an der Differenzierung dieser Zellen entscheidend mitzuwirken (Benton et al. 1995).

#### IGF-2 stimuliert die DNA Synthese testikulärer Zellen

Der IGF-2, ein 67 AS langes Polypeptid, spielt offensichtlich eine immense Rolle in der Embryonal- und Fötalentwicklung, u.a. während der Blastozysten-Formierung (Harvey und Kaye 1992). Auch er zirkuliert im Blut und hat damit eine endokrine Komponente. Er nimmt Einfluss auf den Metabolismus verschiedener Zelltypen (Gluckman und Ambler 1993). Die mRNA des IGF-2 findet sich in den Hoden adulter Ziegen in Spermatogonien, primären Spermatozyten und einigen peritubulären Zellen (Flores et al. 1998). *In vitro* stimuliert IGF-2 die prämitotische DNA-Synthese in Spermatogonien der Ratte und fördert (beim Feuerbauchmolch, *Cynops pyrrhogaster*) deren Differenzierung (Soder et al. 1992; Nakayama et al. 1999).

#### RLF ist ein Marker-Protein für vollständig differenzierte Leydigzellen

Der „relaxin-like factor“ ist ein erst seit relativ kurzer Zeit bekanntes Mitglied der „insulin-like family“ (Adham et al. 1993). Ebenso bekannt als „Leydig cell insulin-like factor“ (Ley-IL) ist er das Produkt des „insulin-like growth factor 3“ (INSL3) Gens (Ivell und Bathgate 2002). Er wird als 131 AS langes Prä-pro-protein gebildet. Das prozessierte Protein besteht aus einer A- (26 AS) und einer B-Kette (32 AS), bei einem Molekulargewicht von 6,25 kD (Adham et al. 1993). Der Faktor und die für ihn kodierende mRNA werden in großen Mengen in den Leydigzellen des interstitiellen Hodengewebes gebildet. Seine Produktion ist vom Differenzierungsgrad der Leydigzelle abhängig (Ivell und Bathgate 2002). Die RLF-Expression ist ein Marker für vollständig differenzierte „adult-type“ Leydigzellen; in präpubertalen, unreifen Leydigzellen sowie in „ent-differenzierten“ Zellen der seltenen Leydigzelltumore wird dieser Faktor nur sehr schwach exprimiert (Ivell et al. 1997; Klonisch et al. 1999).

### **2.3.2 Die „fibroblast growth factor“ (FGF)-Familie besitzt starke mitogene Aktivität**

Die FGF Familie besteht aus 19 verschiedenen Proteinen mit einem Molekulargewicht von 14 - 16 kD (Nishimura et al. 1999). Sie besitzen eine stark mitogene Wirkung auf Fibroblasten und andere neuroektodermale und mesodermale Zelltypen, spielen aber auch eine Rolle in der Differenzierung verschiedener Zellen. FGFs wirken je nach Zielzelle und Produktionsort mitogen, chemotaktisch, neurotrop oder angiogen. Sie interagieren mit mehreren hoch- und niedrigaffinen Rezeptoren und binden an Heparin sowie Heparansulfatproteoglykane auf Zellen, ebenso wie in der extrazellulären Matrix (Pimentel 1994b). Die bekanntesten Vertreter dieser Gruppe sind FGF-1, der saure „acidic“ FGF (aFGF) und FGF-2, der basische FGF (bFGF).

### aFGF: Überlebensfaktor und Mitogen

Der saure Fibroblasten-Wachstumsfaktor wird erst durch die Abspaltung von einem 155 AS langen Präkursorprotein biologisch aktiv. Er besitzt als aktives Protein 140 AS, wobei die Sequenzen des humanen und des bovinen Faktors zu 92% homolog sind. Bisher wurde dieser Faktor *in vivo* nur in der Retina und im Gehirn verschiedener Tiere nachgewiesen (Pimentel 1994b).

Über Ziel- und Produktionszellen des aFGF im Testis ist sehr wenig bekannt. Eine *in vitro* Studie zeigt, dass dieser Faktor eine mitogene Wirkung auf kultivierte Leydigzellen besitzt (Zheng et al. 1990). Im Testis der adulten Ratte ist aFGF immunhistochemisch in Leydigzellen, Sertolizellen und Spermatozyten detektiert worden (Cancilla et al. 2000). Des Weiteren hat er sich in Sertoli-Zell/ Spermatozyten Kokulturen von prä- und postnatalen Rattentestes als Überlebensfaktor für Sertolizellen und als mitogen für Spermatozyten erwiesen (Dissel-Emiliani et al. 1996).

### bFGF ist ein potentes Mitogen und Chemoattraktant für Kapillarendothelien

Auch das bFGF-Protein entsteht durch Abspaltung aus einem 155 AS langen Präkursorprotein. Das prozessierte Protein besteht aus 146 AS, wobei sich die Sequenzen des bovinen und humanen Proteins in nur 2 AS unterscheiden (Gospodarowicz et al. 1987). bFGF wirkt mitogen auf Zellen mesodermalen oder neuroektodermalen Ursprungs und ist *in vivo* in der Lage, die Angiogenese zu stimulieren (Pimentel 1994b).

In Untersuchungen an Nagetieren konnte der Faktor vorwiegend in pachytänen Spermatozyten nachgewiesen werden (Mayerhofer et al. 1991; Lahr et al. 1992). Auch Spermatozyten und elongierende Spermatozyten scheinen bFGF zu enthalten, wohingegen der Faktor weder in Sertoli- noch in Leydigzellen nachgewiesen werden konnte (Mayerhofer et al. 1991).

### **2.3.3 „transforming growth factors“ (TGFs) regulieren Zellwachstum und -differenzierung**

Bei den transformierenden Wachstumsfaktoren handelt es sich um eine Gruppe von strukturell und funktionell ähnlichen Polypeptiden, die in zwei Haupttypen unterteilt werden, TGF $\alpha$  und TGF $\beta$ .

#### Auch TGF $\alpha$ ist mitogen aktiv

Der TGF $\alpha$  gehört zur epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)-Familie, besteht aus 50 AS und besitzt ein Molekulargewicht von 7,4 kD (Pimentel 1994b). Er wird durch proteolytische Spaltung aus einem 160 AS langen Präkursorprotein gebildet. Zwischen verschiedenen

Spezies zeigt sich eine hohe Homologie. Die mitogene Wirkung des TGF $\alpha$  entfaltet sich über den Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF), da zwischen diesen Peptiden eine strukturelle Analogie besteht (Carpenter und Wahl 1990).

Faktoren der TGF $\alpha$ /EGF-Familie sind für die Proliferation spermatogener Zellen notwendig (Tsutsumi et al. 1986; Mullaney und Skinner 1991; Caussanel et al. 1996). Hauptquelle des EGF sind die Leydigzellen, er wird allerdings auch von germinativen Zellen produziert (Caussanel et al. 1996). Die Expression des EGF-Gens korreliert mit der Proliferation der Leydigzellen und der Initiierung der Spermatogenese (Zhang et al. 1997; Yan et al. 1998). TGF $\alpha$  scheint hauptsächlich in somatischen Zellen lokalisiert zu sein. *In vitro* konnte nachgewiesen werden, dass Sertoli- und peritubuläre Zellen diesen Faktor sezernieren, während er *in vivo* hauptsächlich in Leydig- und Sertolizellen detektiert wurde (Skinner et al. 1989; Caussanel et al. 1996; Nakazumi et al. 1996).

#### TGF $\beta$ werden vorwiegend inhibierende Wirkungen zugeschrieben

Die drei Isoformen des TGF $\beta$  werden zunächst als Präkursorproteine (TGF $\beta$ 1: 390 AS; TGF $\beta$ 2: 414 AS; TGF $\beta$ 3: 412 AS) synthetisiert. Das jeweils prozessierte Protein hat ein Molekulargewicht von 25 kD und besteht aus zwei Monomeren der 112 AS langen C-Termini der Präkursoren, die proteolytisch abgespaltet wurden (ten Dijke et al. 1988).

Der TGF $\beta$  ist einmalig in der Zahl und Variabilität seiner Effekte auf zelluläre Differenzierung und Proliferation (Massague 2000). Er kann in Abhängigkeit von Zelltyp und Umgebung die Proliferation entweder stimulieren oder inhibieren. Die Bedeutung der Umgebung wird durch die Beobachtung deutlich, dass TGF $\beta$  die Proliferation des gleichen Zelltyps in Monolayer-Kulturen hemmt, sie jedoch in Suspensionskultur stimuliert (Nilsen- Hamilton 1990). TGF $\beta$  induziert in verschiedenen Zelltypen die Apoptose (Bursch et al. 1992).

Auch im Testisgewebe sind die Wirkungen des TGF $\beta$  eher inhibitorischer Natur. Er hemmt *in vitro* die Steroidogenese in Leydigzellen (Lin et al. 1987; Morera et al. 1988) und wirkt sich negativ auf die Proliferation primordialer Keimzellen aus (Godin und Wylie 1991). Das TGF $\beta$  System durchläuft während der postnatalen Hodenentwicklung verschiedene Stadien zellspezifischer Expression, die auf eine Rolle dieses Faktors in der Proliferationshemmung präpubertaler Keimzellen und postpubertaler somatischer Zellen hinweisen (Caussanel et al. 1997).

#### **2.3.4 Der VEGF beeinflusst Endothelwachstum und -permeabilität**

Der "vascular endothelial growth factor" ist ein hochspezifisches Mitogen. Unter seinem Einfluss entstehen Blutgefäße beispielsweise während der Embryogenese und bei der Wundheilung. Des Weiteren induziert er eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität (Pan et al.

1999). Trotz seiner hohen Spezifität scheint VEGF nicht allein auf Endothelzellen zu wirken, so konnten VEGF-Rezeptoren auch auf Monozyten nachgewiesen werden (Korpelainen et al. 1998).

Im Testis des Menschen wirkt VEGF ebenfalls, wenn auch eventuell nicht ausschließlich, auf Gefäßendothelien. Die Endothelien scheinen diesen Faktor nicht zu exprimieren, sie weisen allerdings Rezeptoren für ihn auf. Die mRNA des VEGF, das Protein selbst und Rezeptoren für diesen Wachstumsfaktor konnten in Leydig- und Sertolizellen nachgewiesen werden, beides Zelltypen, die nicht endothelialen Ursprungs sind. Es könnte also eine parakrine Kommunikation zwischen diesen Zelltypen existieren, welche die Angiogenese und die Gefäßpermeabilität im Testisparenchym moduliert (Ergun et al. 1997).

## 2.4 Die saisonal determinierte Spermatogenese

Fast alle Wirbeltierarten der kalten oder gemäßigten Klimazonen zeigen eine saisonale Reproduktionsaktivität als Anpassung an die Umwelt zur Optimierung der Bedingungen für Geburt und Aufzucht der Jungen. Sie schließt den zyklischen Wechsel zwischen Hodenwachstum und -involution bzw. aktivierter und arretierter Spermatogenese ein (Übersichten: (Lincoln 1989; Bronson und Heidemann 1994).

Die präzise jahreszeitliche Regulation wird durch externe Faktoren gesteuert, die auf die „biologische Uhr“ des Tieres einwirken. Hauptzeitgeber ist in unseren Breiten die Photoperiode. Gesteuert durch den suprachiasmatischen Nucleus im Zwischenhirn wird von der Zirbeldrüse nur nachts Melatonin ausgeschüttet. So wird die sich verändernde Tageslichtlänge im Jahresverlauf in ein unterschiedlich lang andauerndes hormonelles Signal umgesetzt. Melatonin greift über eine Modulation der Freisetzung von GnRH in die Hypothalamus-Hypophysen-Gonadenachse ein.

Bei einigen Tierarten sind die Veränderungen der Testisgröße und –morphologie, sowie der Hormonprofile in Abhängigkeit von der Saison beschrieben worden. Beispielfhaft seien hier zu nennen: Rothirsch, *Cervus elaphus* (Hochereau-de Reviers und Lincoln 1978), Leierhirsch, *Cervus eldi* (Monfort et al. 1993a; Monfort et al. 1993b), Maultierhirsch, *Odocoileus hemionus* (Markwald et al. 1971), Feldhase, *Lepus europaeus* (Blottner et al. 1999; Strbenc und Bavdek 2001; Brodowski et al. 2001), Nerz, *Mustela lutreola* (Blottner et al. 1999), Rötelmaus, *Clethrionomys glareolus* (Tahka et al. 1983) und das Reh, *Capreolus capreolus* (Short und Mann 1966; Markwald et al. 1971; Hartung und Schoppmeyer 1986; Hartung und Schoppmeyer 1994; Blottner und Roelants 1998; Roelants et al. 2002; Goeritz et al. 2003).

Es zeichnen sich in diesen Studien einige Grundprinzipien für saisonale Hodenveränderungen ab. Allen Spezies ist gemein, dass das Testisgewicht zur Brunft hin ansteigt. Dieser Vorgang ist mit einer Zunahme des Durchmessers (und der Länge) der Tubuli seminiferi und einer Vermehrung der germinativen Zellen korreliert. Die Ausprägung der saisonalen Veränderungen ist bei den einzelnen Spezies sehr unterschiedlich. So ist sie z.B. beim amerikanischen Nerz (*Mustela vison*) sehr extrem. Bei dieser Tierart verringert sich die Testisgröße mit der Arretierung der Spermatogenese außerhalb der Paarungszeit um 83%. Es befinden sich ausschließlich Sertolizellen und Spermatogonien in den Tubuli seminiferi der zurückgebildeten Hoden (Sundqvist et al. 1988). Der Feldhase zeigt dagegen einen etwas anderen Jahreszyklus. Seine Paarungszeit findet von Januar bis August statt, sie ist also ausgesprochen lang. Dementsprechend ist die Spermatogenese über einen langen Zeitraum maximal aktiv, um dann erst gegen Ende des Herbstes, im Oktober, schnell an Aktivität zu verlieren. Die Anzahl der in die Meiose eintretenden germinativen Zellen nimmt auch beim Feldhasen außerhalb der Paarungszeit stark ab, im Tubulus sind aber immer noch einige dieser differenzierenden Zellen zu finden (Brodowski et al. 2001). Beim Rothirsch sind sogar über den gesamten Jahresverlauf hinweg alle germinativen Zelltypen in den Tubuli seminiferi vertreten, während sich lediglich die Häufigkeit einzelner Spermatogenesestadien verändert (Hochereau-de Reviere und Lincoln 1978). Die Ausprägung der saisonalen Veränderungen im Keimepithel stellt Abb. 3 an Beispielen schematisch dar.

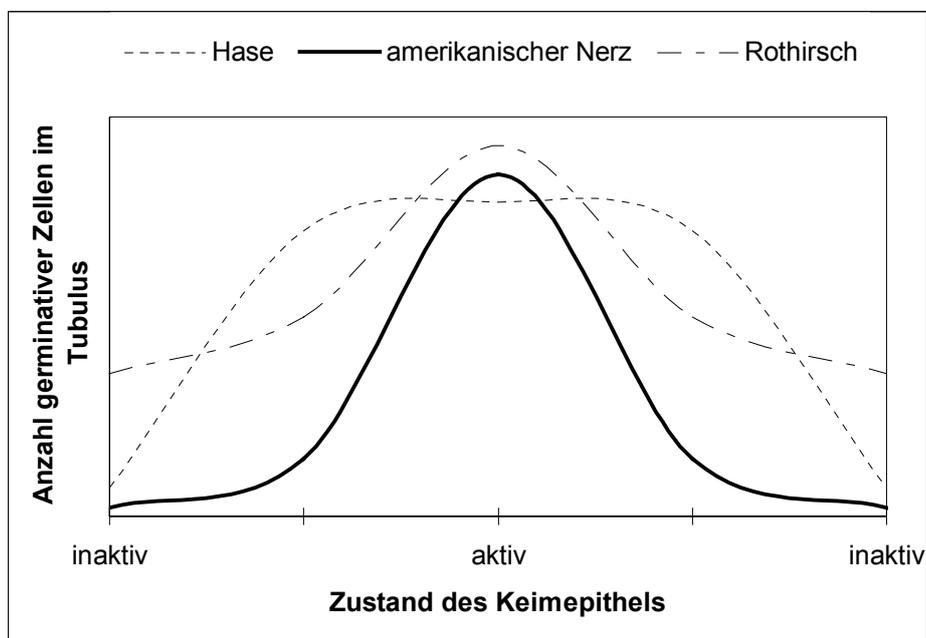


Abbildung 3: Ausprägung der saisonalen Veränderungen im Keimepithel bei ausgewählten Spezies (Schema)

Einige Untersucher stellten auch im interstitiellen Kompartiment einen deutlichen saisonalen Wandel fest. Beim Rothirsch ist das Volumen des intertubulären Gewebes zur Brunft signifikant erhöht. In dieser Arbeit wird, wie auch in der Untersuchung zum Maultierhirsch, auf eine Veränderung in der Morphologie der Leydigzellen hingewiesen (Markwald et al. 1971; Hochereau-de Reviers und Lincoln 1978).

Hinsichtlich der Gesamtzahl der Leydigzellen sind die Ergebnisse der Arbeiten zu verschiedenen Spezies sehr unterschiedlich. Beim Klippschliefer scheint sich ihre Zahl saisonabhängig nicht zu verändern (Neaves 1973), während sie sich sowohl beim Waldmurmeltier (Hikim et al. 1991) als auch beim Kamel (Zayed et al. 1995) um etwa die Hälfte verringert.

Die meisten Studien über die saisonalen Veränderungen der somatischen Zellen des Hodens, und hier besonders der Leydigzellen, wurden an Labortieren, vor allem am Goldhamster (*Mesocricetus auratus*) durchgeführt. In diesen Untersuchungen wurde die Saison artifiziell durch den Wechsel des Lichtregimes von Kurz- auf Langtage (oder umgekehrt) vorgegeben. Auch die Ergebnisse dieser Studien zu nur einer Spezies sind kontrovers. Während Hardy (1987) und Sinha Hikim (1988) bei der Frage nach der Anzahl der Leydigzellen pro Testis zu dem Ergebnis kommen, dass ein Abfall der Zahl in der inaktiven Phase der Spermatogenese zu verzeichnen ist (Hardy et al. 1987; Sinha Hikim et al. 1988), bleibt die Zahl dieser Zellen laut Johnson konstant (Johnson et al. 1987).

Einheitlich wird die veränderte Struktur der Leydigzellen in der inaktiven Phase beurteilt. Es kommt zur Reduktion fast aller Zellorganellen, die Kernstruktur verändert sich und die Zellgröße nimmt beträchtlich ab (Sinha Hikim et al. 1988). Die Frage, ob die Zahl der Leydigzellen im saisonalen Zyklus ab- und wieder zunimmt oder ob die Zellen lediglich eine Zustandsänderung erfahren, ist offensichtlich noch nicht abschließend geklärt.

#### **2.4.1 Das Reh (*Capreolus capreolus*) als Modelltier für die saisonale Spermatogenese**

Tiere, die saisonale Reproduktionszyklen ausprägen, sind durch ihre physiologische „up- and down“-Regulation ein interessantes Modell für die Untersuchung genereller Mechanismen innerhalb der Spermatogenese (Hikim et al. 1988). Meist finden solche Untersuchungen unter artifiziellen Bedingungen im Labor mittels Veränderung der Photoperiode statt. Sie beschränken sich oft auf den Vergleich des Zustands des vollständig aktiven Hodens mit dem des vollständig inaktiven. Beim Wildtier Reh können diese Vorgänge unter weitgehend natürlichen Bedingungen beobachtet werden.

Die Brunft des Rehs findet im Sommer während weniger Wochen im Juli und August statt. Die zunehmende Photoperiode des Frühjahres stimuliert die Testosteronsekretion bei dieser Tierart. Die Ricken sind (einzigartig in der Gruppe der Ungulaten) monoöstrisch (Hoffmann et al. 1978), implantieren den Embryo erst nach einer 5 Monate andauernden Diapause und setzen die Kitze im Frühjahr. Rehböcke verteidigen ihr Revier über einen relativ langen Zeitraum von April bis September (Sempere et al. 1998).

Einige Arbeiten beschreiben qualitativ die histomorphologischen Veränderungen des Hodenparenchyms des Rehbocks und vergleichen diese mit dem Testosterongehalt von Testisgewebe und Serum, der Geweihbildung sowie dem Spermiengehalt der Nebenhoden (Short und Mann 1966; Hartung und Schoppmeyer 1986; Marchlewska-Koj und Kruczek 1988; Hartung und Schoppmeyer 1994). Einheitlich werden die Monate Januar und Februar als weitgehend inaktiv beschrieben. In den Tubuli seminiferi sind ausschließlich Spermatogonien und Sertolizellen zu finden. Der Testosterongehalt des Hodengewebes ist in dieser Zeit extrem gering. Über die Anzahl der Leydigzellen, die ja zu dem Testosterongehalt in direkter Beziehung stehen müsste, gibt es (entsprechend den Arbeiten zum Goldhamster) wiederum kontroverse Aussagen. Laut Short und Mann (Short und Mann 1966) sind in diesem Zeitraum keine Leydigzellen im Interstitium erkennbar. Marchlewska-Koj spricht dagegen nur von einer veränderten Zellform gegenüber der Brunftperiode (Marchlewska-Koj und Kruczek 1988). Im März finden sich bereits die ersten primären Spermatozyten in den Tubuli seminiferi und der Testosterongehalt beginnt zu steigen. Damit korreliert das erste Erscheinen (bzw. eine Formveränderung) einzelner Leydigzellen. Im Mai scheint die Spermatogenese vollständig aktiviert zu sein, die Testosteronkonzentration ist erheblich gestiegen. Es sind nun im Interstitium prominent Leydigzellen erkennbar. Zum Juli hin steigt die Testosteronkonzentration im Testisgewebe noch einmal an, um dann noch während der Brunft im August scharf abzufallen. Auch die Zahl der Leydigzellen nimmt schon zu diesem Zeitpunkt deutlich ab, obschon die Spermatogenese noch vollständig aktiv scheint. Im

September sind kaum noch Leydigzellen auffindbar (bzw. haben die Leydigzellen ihre Form grundlegend verändert), was sich auch in der Testosteronkonzentration des Gewebes widerspiegelt, die gegen null tendiert. Nichtsdestotrotz sind noch in großen Mengen germinative Zellen in den Tubuli seminiferi vorhanden, vornehmlich jedoch sekundäre Spermatozyten und Spermatiden. Zum Dezember hin bildet sich das Hodengewebe zurück. Die Böcke verlieren ihre Geweihe und die Testosteronkonzentration verweilt auf dem vorher beschriebenen niedrigen Niveau (Short und Mann 1966; Hartung und Schoppmeyer 1986; Hartung und Schoppmeyer 1994).

Quantitativ sind die Veränderungen in der Spermatogenese des Rehbockes mittels Durchflusszytometrie untersucht worden (Blottner und Roelants 1998; Roelants et al. 2002). Hierbei werden die einzelnen Zellen nach ihrem DNA Gehalt klassifiziert. Es können so Aussagen getroffen werden über die Anteile von haploiden gegenüber diploiden Zellen und solchen, die ihren DNA-Gehalt verdoppelt haben, also die Mitose bzw. die Meiose (primäre Spermatozyten) durchlaufen. Die meisten haploiden Zellen werden erwartungsgemäß zur Brunft bereitgestellt, während die Meioserate schon vor der Brunft ihren Höhepunkt erreicht. Die höchste Mitoserate (Zellen in der G2M-Phase des Zellzyklus) findet sich beim Rehbock bereits im Frühjahr. Die genaue Differenzierung der somatischen Zellen des Hodens sowie der einzelnen Entwicklungsstadien spermatogener Zellen gelingt mit dieser Methodik allerdings nicht.

Die saisonale Spermatogenese des Rehbockes ist hervorragend für Studien geeignet, die sich mit den ihr zugrundeliegenden Regulationsmechanismen beschäftigen. Sie zeichnet sich durch einen über den gesamten Jahreszyklus kontinuierlichen Verlauf der Veränderungen in der spermatogenen Aktivität aus. Beginnend mit einer in den Wintermonaten (im Gegensatz zu vielen anderen Wildtierarten) *vollständig* arretierten Spermatogenese, hin zu einer *vollständig* aktivierten kurz vor der Brunft im Juni/Juli, lassen sich die saisonalen Veränderungen und das damit verbundene Zusammenspiel von Regulationsfaktoren sehr gut ohne künstliche Beeinflussung der Photoperiode beobachten.

#### 2.4.2 Saisonale Expression von Wachstumsfaktoren im Testisgewebe

Über die saisonale Expression der Wachstumsfaktoren und ihrer Wirkungen im Hoden ist bisher sehr wenig bekannt. Die hierzu vorliegenden Arbeiten betreffen zumeist den auch endokrin (Bildungsort Leber) wirkenden IGF-1. Er stimuliert das Wachstum in fast allen Geweben des Körpers. Die Sekretion des IGF-1 ist deutlich saisonabhängig (Suttie et al. 1989; Suttie et al. 1991; Webster et al. 1996; Adam et al. 1996; Reyes et al. 1997). Die Plasmakonzentration dieses Faktors korreliert streng mit der Testosteronkonzentration (Adam et al. 1995).

Eine Arbeit beschäftigt sich mit dem VEGF im Testisgewebe der Weißfußmaus (*Peromyscus leucopus*). Es zeigte sich, dass dieser Faktor während der kurzen Photoperiode (ausserhalb der Paarungszeit) wesentlich niedriger exprimiert wird (Young und Nelson 2000).

Eine umfangreiche Studie über die saisonale Expression einiger Wachstumsfaktoren beim Reh ist der vorliegenden Arbeit vorausgegangen. Die mRNA Expression der Faktoren aFGF, bFGF, IGF-1 und -2, TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ 1 und TGF $\beta$ 3 wurde im Testisgewebe des Rehbockes semiquantitativ untersucht. Ihre Lokalisation erfolgte mittels *in situ* Hybridisierung. TGF $\alpha$  zeigt hierbei eine sehr geringe Expression ohne saisonale Veränderungen. Einen ganz anderen Verlauf über das Jahr hinweg zeigen TGF $\beta$ 1 und TGF $\beta$ 3. Sie weisen einen deutlichen Höhepunkt zur Zeit der Brunft auf. Die RNA dieser Faktoren ist vorwiegend in germinativen Zellen lokalisiert. Der aFGF wird ausschließlich von somatischen Zellen des Hodenparenchyms gebildet und zeigt einen relativ konstanten Verlauf mit einem signifikanten Abfall zum April. Der bFGF, IGF-1 und IGF-2 werden vor der Brunft im Frühjahr am höchsten exprimiert (Wagener 2002).

Diese unterschiedlichen Expressionsverläufe lassen auf eine spezifische Funktion der Wachstumsfaktoren bei der saisonalen Spermatogeneseregulation schließen.