

6 Diskussion

6.1 Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wird die Spermatogenese des Rehbockes erstmals exakt beschrieben. Die saisonalen Veränderungen im Hodenparenchym werden quantifiziert und in Beziehung zur saisonalen Expression ausgewählter Wachstumsfaktoren gesetzt.

6.1.1 Die saisonalen Veränderungen am Hodenparenchym des Rehbockes

Saisonal determinierte Umgestaltungen von Testisgewicht und Struktur ergeben sich aus folgenden, auf Zellebene ablaufenden Veränderungen:

Die steigende Anzahl spermatogener Zellen bedingt das Wachstum und die Volumenzunahme des Testis. Aus der Vergrößerung der Tubulusdurchmesser resultiert eine Herabsetzung der Gesamtzahlen einiger Zelltypen pro Gramm Gewebe und Flächeneinheit. Zusätzlich vergrößert sich der Abstand zwischen den Tubuli seminiferi parallel zur Verkleinerung der Tubulusdurchmesser und der Verringerung der Epithelhöhe im Tubulus, was eine Verschiebung der Proportionen im Volumenanteil von interstitiellem und tubulären Kompartiment zur Folge hat.

Aus der Literatur geht hervor, dass der Hoden des Rehbockes sein Volumen zur Brunftperiode rund um das fünffache gegenüber der fortpflanzungsinaktiven Zeit vergrößert (Short und Mann 1966; Hartung und Schoppmeyer 1986; Goeritz et al. 2003). In welchem Maße aber die einzelnen Gewebekomponenten an dieser enormen Ausdehnung des Parenchyms beteiligt sind, ist bisher nicht untersucht worden.

Der tubuläre Volumenanteil beträgt zur Zeit der aktiven Spermatogenese etwa 76%. Dies entspricht den für andere Spezies erhobenen Daten (Russell et al. 1990b; D'Occhio und Aspden 1999) einschließlich einem saisonalen Cerviden, dem Damhirsch (77,2%, Wrobel et al. 1993). Dieser Wert kommt der idealen geometrischen Verteilung gleichmäßig verteilter Kreise in einer Fläche sehr nahe (78,5%).

Im rückgebildeten Hoden des Rehbockes sind beide Kompartimente zu etwa 50% vertreten. Ähnliche saisonale Veränderungen wurden bereits für das Kamel beschrieben, bei dem sich der Anteil des tubulären Kompartimentes von 76% in der aktiven auf 61% in der inaktiven Phase reduziert (Zayed 1995).

Insgesamt scheint sich das Wachstum des Hodenparenchyms zur Brunftperiode hauptsächlich aus der Zunahme der germinativen Zellen zu ergeben.

6.1.1.1 Germinative Zellen: Dynamik der Spermatogeneseaktivierung

Das Keimepithel des Rehbockes erfährt im Jahresverlauf grundlegende Veränderungen. Die Ergebnisse aus der Zählung der germinativen Zellen decken sich mit den aus der Literatur bekannten qualitativen Beschreibungen der Veränderungen innerhalb der Tubuli seminiferi. Diese Veränderungen wurden aber zum ersten mal quantitativ festgehalten. Damit ist es möglich, ein relativ exaktes Bild der Dynamik der Spermatogeneseaktivierung und -arretierung zu zeichnen, wie Abb. 39 verdeutlicht.

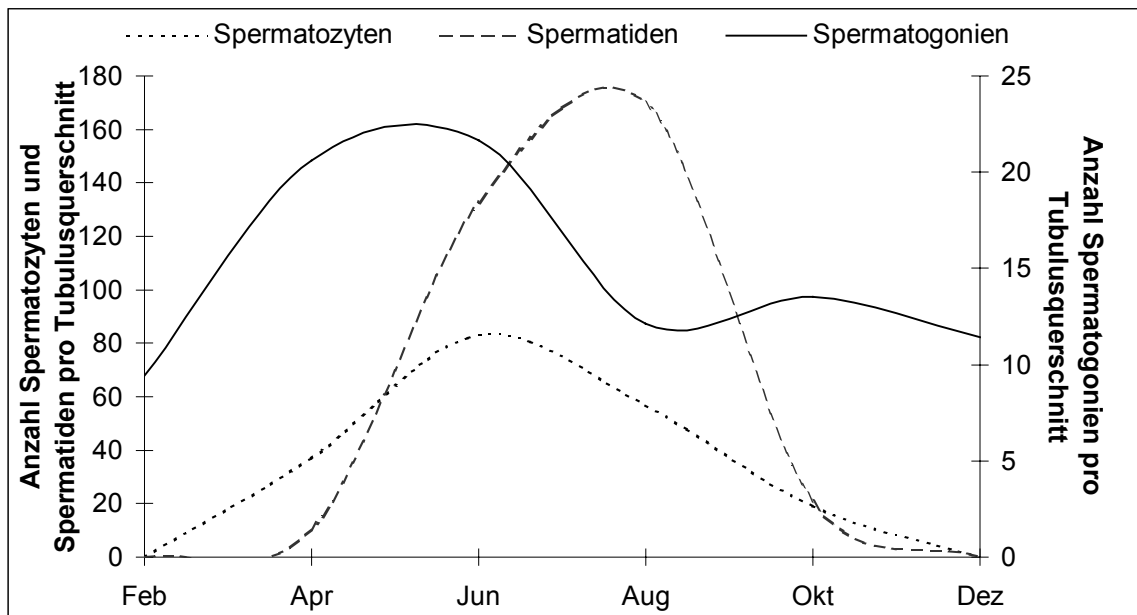


Abbildung 39: Dynamik der saisonalen Spermatogenese des Rehbockes (halbschematisch)

Die prinzipiellen Abläufe innerhalb der Spermatogenese sind bei allen bisher untersuchten Säugetierarten ähnlich (Sharpe 1994). Der streng koordinierte Prozess bedingt einen zyklischen Wechsel verschiedener Zellassoziationen im Keimepithel (Leblond und Clermont 1952a; Russell et al. 1990a). Die Kriterien für diese Stadieneinteilung sind allerdings nicht standardisiert, was zur Folge hat, dass verschiedene Autoren sehr unterschiedliche Einteilungskriterien verwenden und die Ergebnisse sogar innerhalb einer Spezies nicht ohne weiteres vergleichbar sind. Obwohl diese Erkenntnis nicht neu ist, sträuben sich einige Autoren zugunsten einer vermeintlich größeren Genauigkeit der Aussagen gegen eine Standardisierung der Darstellungsweise (Berndston und Desjardins 1974; Russell et al. 1990a). Demgegenüber wird in anderen Arbeiten die besser vergleichbare Einteilung der Spermatogenese in 8 Stadien als ausreichend genau angesehen (Ortavant und Courot 1977; Böhme und Pier 1986). Um die Darstellungen aber wirklich zu vereinheitlichen, ist es nötig, sich zudem noch auf eine Stadienreihenfolge zu einigen, bei der das Spermiationsstadium

entweder auf das Stadium 4 oder das Stadium 8 festgelegt wird. In dieser Arbeit wurde die von Böhme und Pier vorgeschlagene Einteilung gewählt, die das Erscheinen der neuen Spermatidengeneration als Stadium 1, die Spermiation als Stadium 4 und die meiotische Teilung als Stadium 8 bezeichnet.

Der Keimepithelzyklus des Rehbockes lässt sich allerdings nur im Juni anhand der von Pier (1986) vorgeschlagenen Kriterien in 8 Stadien einteilen, weil schon während der Brunftperiode die proliferative Aktivität einiger Zelltypen nachlässt (Abb. 39). Für die Aufrechterhaltung eines „steady-state“ Zustandes ist ein stetiger Nachschub germinativer Zellen aus gleichmäßig proliferierenden Spermatogonien nötig, wie wir es von asaisonalen Tieren kennen. Die Spermatogonien stellen beim Rehbock aber bereits zwischen Juni und August ihre Proliferation weitgehend ein. Wiederkehrende Zellassoziationen können so nicht mehr entstehen.

Der Spermatogenesezyklus dauert bei den Ruminantia ca. 50-55 Tage. Soll also die Produktion von befruchtungsfähigen Spermien beim Rehbock im Juli- August ihren Höhepunkt erreichen, kann die Teilung der Vorläuferzellen schon fast zwei Monate vorher eingestellt werden, um die energieaufwändige Spermienproduktion über die Brunftperiode hinaus zu vermeiden. Dies spiegelt sich in den in dieser Arbeit präsentierten Zellzählungen genau so wieder. Ein solcher Mechanismus könnte grundlegend in der saisonalen Spermatogenese vieler Spezies sein.

Es ist daher um so interessanter, dass Arbeiten über andere saisonal reproduzierende Spezies zu anderen Ergebnissen kommen. So können beim Rothirsch auch außerhalb der Brunft noch alle Stadien der Spermatogenese nachgewiesen werden (Hochereau-de Reviere und Lincoln 1978). Beim Nerz werden Spermatogenesestadien beschrieben, die sich über 5 Monate hinweg nicht verändern, obwohl die Brunft bei diesen Tieren in einem sehr kleinen Zeitfenster im Februar und März stattfindet (Pelletier 1986). In den inaktiven, zurückgebildeten Hoden des Hamsters werden die Zählwerte für Sertoli- und Keimzellnuklei auf die Spermatogenesestadien 7 und 8 bezogen, genau wie in den Testes der aktiven Periode (Sinha Hikim et al. 1988). Als Grund für solche Angaben könnten entweder Speziesunterschiede in Frage kommen oder es müssen Ungenauigkeiten in der Definition und Identifikation der Stadien angenommen werden.

In Bezug auf saisonale Tiere ist die strenge Einteilung der Spermatogenesestadien generell von sehr begrenztem Wert. In einer „steady-state“ Spermatogenese liegen dieser Schematisierung natürlich immer wiederkehrende Assoziationen von Zelltypen und Geschehnissen innerhalb des Zellzyklus zugrunde, die eine solche Einteilung wichtig und sinnvoll machen. In der saisonalen Spermatogenese ist diese Stetigkeit aber so nicht zu

beobachten. Das „Fließgleichgewicht“ von ständiger Proliferation und Spermatidenbereitstellung stellt sich beim saisonal reproduzierenden Tier nicht oder höchstens temporär ein. Hier muss man auf die einzelnen Zelltypen selbst fokussieren. Quantitative Aussagen zu deren Häufigkeit und Entwicklungszustand sind in diesem Falle sinnvoller, um deren Aktionen im Zellverbund zu verstehen. Eine starre schematische Einteilung wird den biologischen Ereignissen nicht gerecht.

6.1.1.2 Die Gesamtzahl von Leydig- und Sertolizellen bleibt über das Jahr konstant.

Es wurde in dieser Arbeit ein einfaches mathematisches Modell benutzt, um zunächst zu überprüfen, wie allein die morphometrisch gemessene saisonale Veränderung des Hodenparenchyms die Zelldichte einer konstanten somatischen Zellpopulation verändert. Der Vergleich der tatsächlich morphometrisch erhobenen Werte für die Anzahl der Sertoli- und interstitiellen Zellen mit diesen theoretischen Zahlen ergab in beiden Fällen eine gute Übereinstimmung. Die Zahl dieser Zellen scheint über den Jahresverlauf hinweg tatsächlich konstant zu bleiben. In der von uns verwendeten Ableitung wird bewusst auf die Ermittlung von Gesamtzahlen pro Testis verzichtet, da Formeln, die mit mehreren geometrischen Konstanten arbeiten (z.B. Kugelvolumen für Zellkerne, Ellipsoidvolumen für den Testis), im biologischen System unweigerlich Fehlerrisiken bergen (Mendis-Handagama und Ewing 1990). Es wird lediglich vorausgesetzt, dass die Veränderungen im Gesamttestisvolumen sich proportional in Veränderungen der Gesamtfläche von Gewebeschnitten widerspiegeln. Alle anderen in die Rechnung eingehenden Werte sind direkt an den in der Studie berücksichtigten Tieren gemessen.

Die Erkenntnis einer konstanten Zellanzahl über den Jahresverlauf ist für Sertolizellen nicht neu. Es ist häufig beschrieben worden, dass es sich um eine weitgehend stabile Zellpopulation handelt, die auch beim saisonalen Tier keinen Schwankungen unterliegt, die über den normalen Zell-„turnover“ hinausgehen (Bardin et al. 1994).

Weit interessanter (und überraschend) ist jedoch, dass auch die interstitielle Gesamtzellanzahl gleich bleibt, besonders im Hinblick auf die in der Literatur teilweise kontroversen Aussagen über saisonale Veränderungen in der Leydigzellpopulation. Die wenigen hierzu vorliegenden Arbeiten ergaben mehrheitlich eine Abnahme der Leydigzellanzahl während der Hodeninvolution, was mit dem für viele Spezies beschriebenen Abfall des Serumtestosteronspiegels während dieser Zeit korreliert (Bartke et al. 1996). Aussagen zur Beziehung zwischen der Gesamtanzahl interstitieller Zellen und der Leydigzellanzahl werden nach unseren Kenntnissen nicht getroffen.

Bei einigen dieser Untersuchungen wurden komplizierte Berechnungen unter Einbeziehung geometrischer Konstanten vorgenommen (Hardy et al. 1987; Sinha Hikim et al. 1988; Zayed et al. 1995), um die Gesamt-Leydigzellanzahl pro Testis zu ermitteln. Es fehlt aber eine klare Definition, wann eine Leydigzelle als solche bezeichnet werden kann. Wenn sich die Morphologie dieser Zellen, wie alle Autoren einheitlich berichten, außerhalb der Brunft stark verändert, wie ist dann eine Leydigzelle von einem interstitiellen Fibroblasten zweifelsfrei zu unterscheiden? Bei einigen Spezies mögen die morphologischen Veränderungen dieser Zellen vielleicht nicht so ausgeprägt sein wie beim Reh. Man kann aber zumindest für das Reh festhalten, dass es ohne eine entsprechende Markierung *nicht* möglich ist, diese Zellen sicher anhand morphologischer Kriterien licht- oder elektronenmikroskopisch zu erkennen. Zu diesem Ergebnis kamen auch Short und Mann (1966), die außerhalb der Brunftperiode keine Leydigzellen im Interstitium ausmachen konnten. Marchlewska-Koj (1988) sprach dagegen in ihrer Studie von einer Formveränderung der Leydigzellen, ohne Kriterien zu benennen, nach denen sie Leydigzellen von anderen interstitiellen Zellen unterscheiden konnte.

Um der Frage nachzugehen, ob und in welchem Maße sich die Leydigzellanzahl im Interstitium des Rehhodens ändert, war es unserer Meinung nach nötig, diese Zellen spezifisch zu markieren. Dies gelingt sehr gut mit Antikörpern gegen den „relaxin-like factor“, der im Hoden (auch bei Ziege und Cerviden) ausschließlich von adulten differenzierten Leydigzellen gebildet wird (Ivell et al. 1997; Hombach-Klonisch et al. 1999; Hombach-Klonisch et al. 2000). Anhand dieser Markierung konnte gezeigt werden, dass sich zwischen Oktober und Februar keine adulten, differenzierten Leydigzellen im intertubulären Gewebe des Rehbockes befinden. Bedenkt man, dass die interstitielle Gesamtzellzahl über den Jahresverlauf offensichtlich gleich bleibt, steht so die Frage im Raum, woraus die Leydigzellen, die schon im April in großer Zahl im Interstitium zu finden sind (43% aller interstitiellen Zellen zeigen zu dieser Zeit RLF positive Anfärbungen) so schnell entstehen und ob, bzw. wie sie in der kurzen Zeit zwischen Juni und Oktober vollständig abgebaut werden.

6.1.1.3 Hypothese: Leydigzellen ändern im Jahreszyklus lediglich ihren Zustand

Bei den enormen Schwankungen innerhalb der Leydigzellpopulation des Rehhodens könnte es sich, anders als von manchen Autoren für saisonale Tiere angenommen, um eine reine Zustandsänderung der Zellen handeln und nicht um einen Prozess von Proliferation und Apoptose.

Für diese Hypothese sprechen Untersuchungen an der Weißfußmaus, die ergaben, dass auch während der Involutionsphase des Hodens apoptotische Zellen fast ausschließlich im Tubulus lokalisiert sind und nicht im Interstitium (Young et al. 1999).

Die Hypothese wäre natürlich widerlegt, wenn der Nachweis gelänge, dass die „Veränderung“ der Leydigzellanzahlen durch Proliferation (April) und Apoptose (August) im Interstitium bedingt sind. Diese Vorgänge sind durch entsprechende Marker nachweisbar. Erste Versuche mit der immunhistochemischen Markierung des proliferations-assoziierten Antigens Ki-67 und dem Nachweis von Apoptose-markierenden DNA-Degradationen ergaben bisher über den gesamten Jahresverlauf eine extrem niedrige Proliferations- und Apoptoserate im Interstitium (Schoen et al., unveröffentlicht).

Nimmt man nun an, es handele sich nicht um eine Zu- oder Abnahme der Leydigzellen, bleibt die Frage offen, um was für eine Art von „Zustandsänderung“ es sich bei den saisonalen Veränderungen handelt.

6.1.1.4 Der RLF ist ein Differenzierungsgrad-abhängiger Marker für Leydigzellen

Der RLF wird, anders als die Enzyme der Steroidogenese (wie z.B. 17 β -Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase), die ebenfalls für die Leydigzellmarkierung Verwendung finden, schon relativ früh in der Entwicklung der Zelle produziert. Lediglich stark entdifferenzierte Zellen, wie sie z.B. in den seltenen Leydigzelltumoren des Menschen vorkommen, bilden diesen Faktor nicht (Klonisch et al. 1999), ebenso wie immature präpubertale Leydigzellen (Ivell und Bathgate 2002).

Könnte es sich bei den fibroblastenförmigen Zellen, die außerhalb der Brunftperiode einen großen Teil des Interstitiums ausmachen, also um eine Art entdifferenzierte Form der Leydigzellen handeln? In der inaktiven Periode (Oktober bis Februar) gleicht sich die Form der interstitiellen Zellen des Rehs den mesenchymähnlichen „Leydig-progenitor-cells“ an, wie sie bei der Ratte beschrieben sind (Mendis-Handagama und Ariyaratne 2001). Auch hier geht das Signal für die (in diesem Fall postnatale) Differenzierung der Zellen vom peritubulären Raum aus.

Die Ausbildung von Zellverbänden ist ein weiteres Kriterium für die vollständige Ausdifferenzierung adulter Leydigzellen. Leydigzellen liegen beim Reh nicht in abgrenzbaren Zellzusammenlagerungen vor, wie dies z.B. bei Schafbock, Bulle, Elefant, Affe und Mensch beschrieben wird (Fawcett 1973).

Man kann also für die Leydigzellen des Rehbockes einen Zustand annehmen, in dem diese nie das Stadium der *vollständigen* Ausdifferenzierung erreichen, sondern abhängig von der Saison (gesteuert durch ex- und intrinsische Signale) den Grad ihrer Differenzierung ändern.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können allerdings nur Indizien für die oben beschriebenen Hypothesen sein, und sollten durch genaue Untersuchungen, unter anderem zu Proliferation und Apoptose im Interstitium, untermauert werden.

6.1.1.5 Die Blutgefäßdichte zeigt kaum saisonale Veränderungen

Der Anteil der Blutgefäße am intertubulären Gewebe schwankt beim Rehbock über den Jahresverlauf zwischen 3 und 7%. Dies entspricht einer Kapillardichte von ca. 300 bis 600 Kapillaren pro mm² Interstitiumsfläche. Eine deutliche Saisonabhängigkeit ist nicht zu beobachten. Auch stimmt die Anzahl der Kapillaranschnitte bis auf den Monat Juni gut mit den Werten überein, die sich für eine konstante Anzahl Kapillaranschnitte allein aus den geometrischen Veränderungen des Testisparenchyms ableiten lassen. Um diese Ergebnisse abzusichern, sollte die Technik der Kapillarerfassung und Messung noch verfeinert werden. Andere Markierungsmöglichkeiten für Kapillarendothelien könnten genutzt und durch Messungen bei höherer Vergrößerung könnte die Messgenauigkeit erhöht werden.

Es gibt nach unserer Kenntnis bisher keine quantitativen Angaben über saisonale Veränderungen der Blutgefäßdichte im Hoden. Die angiogenetische Aktivität des Hodenparenchyms adulter asaisonaler Tier wurde bisher als sehr gering beschrieben. Dies wird auch in neuesten Veröffentlichungen bestätigt, wenn auch für Endothelzellen des Hodens eine wesentlich höhere Proliferationsrate als für die anderer Organe festgestellt wurde. Es scheint sich hierbei um einen erhöhten Zell-„turnover“ zu handeln, nicht um Angiogenese im eigentlichen Sinne (Franck Lissbrant et al. 2003).

Natürlich wäre es denkbar, dass beim saisonalen Tier zur Brunft hin aufgrund der gesteigerten Leistung des Hodens auch die Kapillardichte durch Sprossung erhöht wird. Hierzu wäre aber eine Erhöhung der Proliferation des Endothels gegenüber der inaktiven Periode nötig. Ein solcher Proliferationsanstieg konnte in unseren Vorversuchen mit der Markierung des proliferations-assoziierten Antigens Ki-67 nicht bestätigt werden (Schön et al., unveröffentlicht). Auch müssten die zur Brunft entstandenen Kapillaren recht schnell wieder eingeschmolzen werden. Eine erhöhte Anzahl apoptotischer Endothelzellen konnte in Vorversuchen mittels Markierung von DNA-Degradationen während oder nach der Brunft ebenfalls nicht detektiert werden. Auch bei der Weißfußmaus wurde während der Testisinvolutions keine Steigerung der Apoptoserate in Blutgefäßendothelien nachgewiesen (Young et al. 1999).

Es sollte bezüglich der Fragestellung, ob eine saisonale Veränderung der Blutgefäßdichte vorliegt zunächst die Proliferationsrate der Endothelzellen genauer untersucht werden. Parallel könnte eine Visualisierung der Angiogenese (z.B. durch die Markierung von Fibronectin) versucht werden, um eine reine Zellerneuerung von tatsächlicher Gefäßneubildung abzugrenzen. Des Weiteren könnte mittels Ultraschalltechnik *in vivo* abgeklärt werden, ob saisonale Unterschiede in der Durchblutungsrate des Testisparenchyms bestehen.

6.1.2 Vier regulatorische Proteine, vier unterschiedliche saisonale Expressionsmuster

Die in dieser Arbeit auf Proteinebene nachgewiesenen Wachstumsfaktoren haben in einer vorangegangenen Studie auf RNA-Ebene über den Jahresverlauf unterschiedliche Expressionsmuster gezeigt (Wagener et al. 2000). TGFβ1 wird über das ganze Jahr auf einem höheren Niveau exprimiert als TGFβ3. Beide zeigen eine Expressionsanstieg zur Brunft, während aFGF kurz vor der Brunft ein Minimum aufweist und ansonsten relativ konstant exprimiert wird. Die VEGF Expression verläuft ganzjährig ohne signifikante Peaks. Es war deshalb interessant zu prüfen, ob die vorliegenden Expressionsmustern sich auch immunhistochemisch widerspiegeln, ob die Lokalisation der mRNA mit der des Proteins übereinstimmt und ob man daraus Rückschlüsse hinsichtlich Produktions- und Zielzelle treffen kann.

Eine kurze Zusammenfassung der Ergebnisse zur saisonalen Expression der untersuchten Wachstumsfaktoren zeigt Tabelle 4.

	Wagener 2002		vorliegende Studie
	PCR (Expressionshöhe mRNA)	<i>In situ</i> Hybridisierung (Lokalisation mRNA)	Immunhistochemie (Lokalisation Protein)
TGFβ1	Maximum zur Brunft, ganzjährig sehr hohes Expressionsniveau	Spermatozyten und wenige interstitielle Zellen	Wenige tubuläre Zellen, evtl. apoptotisch
TGFβ3	Maximum zur Brunft, sonst sehr niedrig exprimiert	Spermatozyten und runde Spermatozoen	Spermatozoen, runde Spermatozoen und Sertolizellen
aFGF	Minimum in der Hauptwachstumsphase, sonst gleichbleibendes Expressionsniveau	Interstitielle und Sertolizellen	Elongierende Spermatozoen und interstitielle Zellen
VEGF	Ganzjährig gleichbleibendes Expressionsniveau (Wagener, unveröffentlicht)	-	Interstitielle Zellen und spermatogene Zellen

Tabelle 4: Übersicht der Ergebnisse zur saisonalen Expression von Wachstumsfaktoren im Hodenparenchym des Rehbockes

6.1.2.1 *TGF β 1 und Apoptose*

Bei den durch den anti-Human-TGF β 1 Antikörper markierten spermatogenen Zellen könnte es sich anhand morphologischer Kriterien um apoptotische Zellen in verschiedenen Stadien des programmierten Zelltodes handeln. Um dem weiter nachzugehen, sollte eine Doppelmarkierung mit einem apoptosespezifischen Marker versucht werden. Aus der Literatur sind wachstumshemmende sowie apoptosefördernde Eigenschaften dieses Faktors bekannt (Bursch et al. 1992; Caussanel et al. 1997). Auch würde der leichte Anstieg seiner Expression zur Brunft hin zu dieser Annahme passen. Die Apoptoserate steigt zur Brunft hin ebenfalls leicht an, bleibt aber im gesamten restlichen Jahresverlauf auf einem ähnlichen Niveau. Die vergleichsweise hohe RNA-Expression steht im Widerspruch zu der geringen Anzahl detektierter positiver Zellen. Es könnte sich hier um einen Faktor mit sehr geringer Halbwertszeit handeln. Auch ist die Apoptose ein eher kurzfristiges Ereignis, da solchermaßen abgestorbene Zellen normalerweise sehr rasch resorbiert werden.

6.1.2.2 *TGF β 3: Kommunikation zwischen germinativen Zellen und Sertolizellen*

Die Lokalisation des TGF β 3 Proteins deckt sich nicht vollständig mit der Lokalisation seiner mRNA. Während die mRNA ausschließlich in prä- und postmeiotischen germinativen Zellen zu finden ist (Wagener 2002), kann das Protein auch deutlich im Zytoplasma der Sertolizellen detektiert werden. Bei dem Rezeptor für den TGF β 3 handelt es sich um eine zellmembranständige, heteromere Serin-Threonin-Kinase, die nach Bindung des Liganden sehr schnell internalisiert wird (Di Guglielmo et al. 2003). Es ist daher möglich, dass immunhistochemisch die Rezeptor-Ligand-Komplexe in der Sertolizelle detektiert wurden. Die Sertolizelle könnte also die Zielzelle dieses Faktors darstellen. Gleichzeitig hat diese Zellart aber auch eine Transitfunktion, so dass auch Spermatogonien oder interstitielle Zellen, die ansonsten von den Spermatozyten durch die Sertolizell-Schranke getrennt sind, durchaus als Zielzellen in Frage kommen. Der Expressionspeak des TGF β 3 zur Brunft deckt sich mit den maximalen Zahlen von Spermatozyten und Spermatischen in dieser Zeit. Dieser Faktor könnte demnach an der Kommunikation zwischen germinativen Zellen und Sertolizellen oder, wie in der Literatur beschrieben, an der Interaktion zwischen prä- und postmeiotischen Keimzellen beteiligt sein, bzw. autokrin die Meiose initiieren. Denkbar wäre auch, dass TGF β 3 die Sertolizelle zur Bereitstellung oder Ausschüttung von Substanzen anregt, die für die Meiose essentiell sind. Bei der pubertären Ratte wurde beschrieben, dass TGF β 3 an der Induktion der Spermatogenese beteiligt sei. Aus dem Zeitmuster der Nachweisbarkeit des Proteins im Testis des Rehs ergibt sich, dass dies bei der saisonalen Aktivierung der Spermatogenese (zumindest beim Reh) offenbar nicht der Fall ist.

6.1.2.3 VEGF zeigt auf Proteinebene durchaus einen saisonalen Expressionsverlauf

Der VEGF wird zur Zeit gerade im Zusammenhang mit der Spermatogenese viel diskutiert. Erst in letzter Zeit wurde deutlich, dass ihm innerhalb der Spermatogeneseregulation eventuell eine Bedeutung zukommt, die über seine Wirkung als Mitogen für Endothelien weit hinausgeht. Im menschlichen Testis wird der VEGF und der VEGF Rezeptor Flt1 von Leydig- und Sertolizellen gebildet. Der Rezeptor ist auch in Kapillarendothelien nachweisbar (Ergun et al. 1997). Erst jüngst wurde die DNA des VEGF auch zum ersten Mal in Spermatogonien der Maus nachgewiesen (Yu et al. 2003). Das Protein konnte in Sertolizellen und interstitiellen Zellen nachgewiesen werden. VEGF-Rezeptoren finden sich bei diesem Tier auf Leydigzellen, Sertolizellen, Spermatozyten und Spermatischen (Nalbandian et al. 2003).

Interstitielle Zellen zeigen beim Rehbock ebenfalls eine Anfärbung für das VEGF-Protein. Eine deutliche Färbung der Endothelzellen ist nicht zu beobachten. Man sollte aber bedenken, dass keine Doppelmarkierung von Endothelien und VEGF durchgeführt wurde und die interstitiellen Zellen morphologisch gerade in den Wintermonaten nur schwer voneinander abzugrenzen sind. Es ist also möglich, dass auch Endothelien diesen Faktor beinhalten. Im tubulären Kompartiment ist das Protein in Spermatogonien detektierbar, nicht jedoch in Sertolizellen. Soweit jahreszeitabhängig vorhanden, kann VEGF beim Reh auch in Spermatozyten und runde Spermatischen nachgewiesen werden. Leider fehlt für den VEGF beim Reh noch die Lokalisation der mRNA, so dass Produktions- und Zielzellen bisher nicht unterschieden werden können.

Es zeigte sich mittels PCR kein signifikanter saisonaler Verlauf der mRNA-Expression des VEGF. Das Expressionsmuster des Proteins erscheint jedoch sehr wohl saisonabhängig. Die immunhistochemische Färbung nimmt zur Brunft hin (April bis August) stark zu, um dann schnell wieder an Intensität zu verlieren (Oktober bis Februar). Sollte die mRNA dieses Faktors, wie bei anderen Spezies beschrieben, von Leydig- bzw. interstitiellen Zellen, Sertolizellen und Spermatogonien exprimiert werden, so kann das gleichbleibende Niveau aus den Veränderungen in der zellulären Struktur des Rehhodens erklärt werden. Die exprimierenden Zellen könnten in den Wintermonaten eine geringere Menge VEGF-mRNA enthalten. Ihr Anteil am Gesamthodengewebe ist zu dieser Zeit aber sehr hoch, dies erklärt das relativ hohe Expressionsniveau pro Einheit Gesamt-RNA. Zur Brunft hin nimmt der Anteil der exprimierenden Zellen am Gesamtgewebe stark ab. Gleichzeitig könnte entweder die Expressionsleistung der Zellen ansteigen (dafür spricht die intensivere immunhistochemische Anfärbung) und/oder es kommen weitere Zellen hinzu, die den Faktor selbst exprimieren (Spermatozyten und Spermatischen). Diese könnten aber ebenso die Zielzellen für VEGF darstellen, wie dies bei der Maus der Fall zu sein scheint. Das Expressionsniveau pro Einheit Gesamt-RNA würde sich so kaum verändern.

VEGF könnte im Hoden für die hohe Proliferationsrate von Kapillarendothelien eine Rolle spielen. Seine saison-, zelltyp- und zellzyklusspezifische Expression spricht aber eindeutig auch für eine Aufgabe innerhalb der Proliferations- und Differenzierungsprozesse spermatogener Zellen.

6.1.2.4 Interagieren Sertolizelle und Spermatoide über aFGF?

Die mRNA für den aFGF wird im Hoden des Rehbockes über den gesamten Jahresverlauf hinweg exprimiert. Die Erfassung seiner relativen Expressionshöhe mittels quantitativer PCR zeigte, dass das Minimum der Expression mit der höchsten Mitoserate im April zusammenfällt. Lokalisiert ist die mRNA dieses Faktors ausschließlich in somatischen Zellen des Hodenparenchyms, in Sertoli- und interstitiellen Zellen, die in der Brunftperiode als Leydigzellen angesprochen werden können (Wagener 2002). Ob es sich auch außerhalb der fortpflanzungsaktiven Zeit um eventuell entdifferenzierte Leydigzellen handelt, die diesen Faktor weiterhin exprimieren, ist zum jetzigen Zeitpunkt unklar.

Das aFGF-Protein befindet sich allerdings durchaus nicht ausschließlich in somatischen Zellen. Interstitiell ist es ganzjährig nachweisbar, während es tubulär erst kurz vor und während der Brunft im akrosomalen Bereich elongierender Spermatoiden der Stadien VI bis III ausgemacht werden kann. Die immunhistochemische Färbung ist während des Spermationsstadiums (IV) und in abgeschwommenen Spermatoiden nicht mehr sichtbar. Das Protein ist zu keiner Zeit der Probennahme in Sertolizellen detektierbar.

Gerade bei diesem Faktor wird deutlich, wie wichtig zum einen der Proteinnachweis für die Interpretation der RNA-Expression, und wie unersetzlich zum anderen eine exakte quantitative Erfassung der Zellen des Gewebes für das Verständnis der erhobenen, ebenfalls quantitativen PCR-Daten ist. Der „Einbruch“ der Expression des aFGF im April war bisher nicht erklärbar. Wenn man bedenkt, dass die Zahl der Sertoli- und Leydigzellen über das Jahr hinweg vermutlich gleich bleibt, wird die Abnahme des Anteils der aFGF-RNA an der Gesamt-RNA verständlich. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei nicht um eine echte Abnahme der Expression, sondern eher um eine Abnahme des Anteils der exprimierenden Zellen am Gesamtgewebe. Der darauf folgende Wiederanstieg der aFGF-mRNA-Menge vor der Brunft beruht möglicherweise auf einer Steigerung der Expression der einzelnen Zelle, da nun Spermatoiden (eine der Zielzellen) gebildet werden.

Es ist vorstellbar, dass der aFGF eine Rolle bei der Formung des Akrosoms spielt, oder für die Verankerung der Spermatoiden in der Sertolizelle essentiell ist. Um solche funktionellen Fragen aufzuklären, sind weiterreichende Studien der Rezeptorverteilung und Wirkung nötig. Es ist jedoch anzunehmen, dass dieser Faktor eine gewisse Funktion in der Kommunikation zwischen Sertoli- und germinativer Zelle hat. Da auch die interstitiellen Zellen zur Brunft hin

deutlich mehr aFGF produzieren (wobei dieses „mehr“ im Moment nicht quantifizierbar ist), könnte auch die diesem Faktor zugeschriebene mitogene Wirkung im Hoden eine Rolle spielen.

6.2 Kritische Bewertung der Methodik

6.2.1 Es wurde wenig, aber gut vergleichbares Probenmaterial untersucht

Bei Arbeiten an Wildtieren besteht meist die Schwierigkeit darin, genügend vergleichbares Probenmaterial zu gewinnen. Die von uns verwendeten Proben stammen von Rehen, die in der institutseigenen Feldforschungsstation Niederfinow unter annähernd standardisierten Bedingungen gehalten wurden. Die zur Probengewinnung verwendeten Tiere waren in etwa gleich alt (2 - 4 Jahre), unterlagen dem gleichen Fütterungsregime und waren den gleichen geoklimatischen Einflüssen ausgesetzt. Bei der begrenzten Zahl an Proben ($n = 3$ Hoden je Probenmonat, $n_{\text{gesamt}} = 18$) handelt es sich also vermutlich um gut vergleichbares Material. Eine Vergrößerung des Stichprobenumfanges wäre nur durch Einbeziehung von Probenmaterial aus freier Wildbahn (z.B. Jagd- und Fallwild) möglich gewesen. Solche Tiere sind betreffend Alter, Sozialstatus und körperlicher Kondition meist sehr unterschiedlich. Hinzu kommt, dass unter Feldbedingungen die Probennahme und –aufarbeitung kaum standardisiert werden kann, für viele der durchgeführten Untersuchungen eine zügige Probennahme am möglichst noch lebenden oder frischtoten Tier aber von großer Bedeutung ist.

Bei der histomorphometrischen Messung der Gewebezusammensetzung und der Tubulusdurchmesser sowie auch bei der Zählung der Sertolizellen sind die Standardfehler der Mittelwerte sehr klein, die individuellen Unterschiede zwischen den Tieren bzw. die Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Einzelzählungen sind gering. Die hier angegebenen Werte sollten also dem wahren Mittelwert recht nahe kommen. Bei der Anzahl der germinativen Zellen sind relativ große individuelle Unterschiede in der Ausprägung der proliferativen Aktivität zu erkennen. Das Zeitmuster der Aktivierung und Arretierung der Spermatogenese ist aber bei allen Tieren sehr ähnlich.

6.2.2 Die Probengewinnung und –aufarbeitung wurde weitgehend optimiert

Die hier präsentierte Studie ist in ein umfangreiches Projekt zur Charakterisierung der saisonalen Spermatogenese des Rehbockes eingebettet. Dies macht einen Kompromiss zwischen der optimalen Probengewinnung für eine konkrete Fragestellung einerseits und der möglichst vielseitigen Verwendung des Probenmaterials andererseits nötig. Aufgrund der optimalen Bedingungen in der Feldforschungsstation konnte die Probennahme standardisiert

werden. Die Proben für die Western-Blot-Charakterisierung der Antikörper wurden schon ca. 5 min nach Entnahme aus dem anästhesierten Tier in flüssigen Stickstoff verbracht. Auch die histologischen Proben befanden sich nach maximal 15 min in den Fixierlösungen. Die optimale Fixierungsmethode für histologische Hodengewebeproben ist sicherlich die Perfusion, das heißt die Einleitung des Fixationsmittels in das komplette Organ durch die Arteria testicularis. Dies war aber aufgrund der Fülle von verschiedenen Untersuchungen, die auch außerhalb der vorliegenden Arbeit an dem Material durchgeführt werden sollten, nicht möglich. Es wurde also in Vorversuchen mit Material vom Rind eine schonende Immersionsfixierung mit Bouin'scher Lösung bei Kühlschranktemperatur mit anschließender schneller Entwässerung (keine langen Inkubationszeiten in niedrigprozentigem Alkohol) etabliert. Sie scheint für die vorliegenden Fragestellungen, besonders im Bezug auf die Immunhistochemie, am besten geeignet zu sein.

6.2.3 Die verwendeten Antikörper sind unterschiedlich gut für den Western Blot geeignet

Keiner der käuflich erworbenen Antikörper ist Reh-spezifisch. Sie sind entweder gegen humane oder gegen bovine Wachstumsfaktoren gerichtet. Es sollte also durch den Western Blot mit anschließender Immundetektion die Spezifität der Antikörper auch im Rehgewebe getestet werden. Leider war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, Wachstumsfaktoren des Rehs zu isolieren oder zu produzieren, um sie als Positivkontrolle mitzuführen. Bei einigen Wachstumsfaktoren liegen die Molekulargewichte der detektierten Proteine durchaus im erwarteten Bereich, was für eine spezifische Reaktion mit dem Antigen spricht. Im Falle des Antikörpers gegen den bovinen aFGF (Firma RDI) ist dies nicht der Fall. Das detektierte Protein ist ca. 5 – 10 kD größer als erwartet. Hierzu ist allerdings zu sagen, dass laut Auskunft einer Firma, die ebenfalls Antikörper gegen aFGF vertreibt (Santa Cruz Biotechnologies), dieser Faktor prinzipiell etwas oberhalb seines erwarteten Molekulargewichtsbereiches von 15 – 17 kD läuft. Die Ursache hierfür kann der Hersteller nicht angeben. Da es nicht möglich war, eine echte Positivkontrolle mitzuführen, wurde das Testislysat eines Bullen als Kontrolle benutzt. Die beiden Proben ergaben nach Einsatz eines modifizierten Probenpuffers (doppelte Konzentration DTT) Banden im selben Molekulargewichtsbereich. Der hier genutzte Antikörper ist laut Hersteller nicht für den Western Blot geeignet. Es ist dennoch gelungen, ein System zu etablieren, welches den Nachweis eines Proteins mit diesem Antikörper ermöglicht. Dieses System ist allerdings fragil und die Ergebnisse sind schwierig zu reproduzieren. Die Immunhistochemie sowie auch der Western Blot sollten nach Möglichkeit mit einem besser für den Western Blot geeigneten Antikörper wiederholt werden, um die hier präsentierten Ergebnisse abzusichern.

6.3 Die Ergebnisse der Studie werfen neue Fragen auf

Die vorliegende Arbeit konnte einige grundlegende Fragen zur Dynamik der saisonalen Spermatogenese des Rehbockes genauer klären. Es wurden aber vor allem betreffend die interstitiellen Zellen und deren Entwicklung im saisonalen Geschehen neue Fragen aufgeworfen. Weitere Erkenntnisse, insbesondere zum Verhältnis von Proliferation und Apoptose im interstitiellen Kompartiment, sind nötig, um die aufgestellten Hypothesen zu verifizieren. Diese Fragestellung wird in einem inzwischen bereits angelaufenen Projekt bearbeitet. Auch gesicherte Aussagen zur saisonalen Blutgefäßverteilung sind erst möglich, wenn der Stichprobenumfang für diese Fragestellung im Zuge der Weiterführung des Projektes erhöht werden kann. Die Detektion der Wachstumsfaktoren im Hodenparenchym sollte, will man funktionelle Rückschlüsse ziehen, Ansatzpunkt für eine umfangreiche Studie hinsichtlich Rezeptordichte und -verteilung sein. Es ergeben sich somit aus der bearbeiteten Fragestellung eine Vielzahl neuer interessanter Aspekte für nachfolgende Untersuchungen.