

**Die Abbildungen aus der Dissertation befinden sich in einer
Extra-Datei im HTML-Format:**

[suessabb.htm](#) (3.071.501 Bytes)

**Aus dem
Institut für Anatomie der Universität Regensburg**

eingereicht über
das Institut für Veterinär-Anatomie des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
Laboratorium: Prof. Dr. K.D. Budras

Identifizierung, Lokalisation und Kinetik
der Urgeschlechtszellen des Rindes sowie
morphodynamische Aspekte der Gonadogenese

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Franz Süß
Tierarzt aus Weiden/Opf.

Berlin 1998
Journal-Nr. 2167

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs der
Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.- Prof. Dr. K. Hartung
Erster Gutachter:	Univ.- Prof. Dr. K.-D. Budras
Zweiter Gutachter:	Univ.- Prof. Dr. Dr. K.-H. Wrobel

Tag der Promotion:	19.06.1998
--------------------	------------

1. EINLEITUNG	6
1.1 STAND DER DISKUSSION. ZIEL DER ARBEIT	6
1.2 CHARAKTERISIERUNG DER VERWENDETEN MARKER	9
1.2.1 Laminin.....	9
1.2.2 Heparansulfat.....	10
1.2.3 LNGFR.....	10
1.2.4 MIB-1	11
1.2.5 Lektine.....	12
1.2.6 Cholinesterasen (AChE/BuChE).....	14
1.2.7 NADP-abhängige Oxydoreductasen (NADPH-TRed und 3β-HSDH).....	17
1.2.8 Leucinaminopeptidase (LAP).....	18
1.2.9 Alkalische Phosphatase (ALP)	18
2. MATERIAL UND METHODEN.....	21
2.1 GEWEBEMATERIAL.....	21
2.1.1 MATERIALENTNAHME.....	21
2.1.2 Fixierung für Histologie, Enzym-, Lektin- und Immunhistochemie.....	22
2.1.3 Präparation der Materialblöcke.....	22
2.1.4 Herstellung der Kryostatschnitte.....	23
2.2 HISTOLOGIE	23
2.3 IMMUNHISTOCHEMIE.....	25
2.3.1 Prinzip der Methode.....	25
2.3.2 Versuchsanordnung.....	26
2.4 LEKTINHISTOCHEMIE	27
2.4.1 Versuchsanordnung.....	27
2.5 ENZYMHISTOCHEMIE	29
2.5.1 Esterasen (AChE und BuChE).....	29
2.5.1.1 Prinzip der Reaktion	29
2.5.1.2 Variation der Versuchsbedingungen.....	29
2.5.1.3 Versuchsanordnung	30
2.5.2 Weitere enzymhistochemische Untersuchungen	31
2.5.2.1 NADPH-TRed	31
2.5.2.2 3β-HSDH.....	31
2.5.2.3 Leucinaminopeptidase (LAP)	31
2.5.2.4 Alkalische Phosphatase (ALP)	31
2.6 POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR).....	32
2.6.1 Prinzip der Methode.....	32
2.6.2 Versuchsdurchführung	33
3. BEFUNDE.....	34
3.1 IDENTIFIKATION BOVINER PGC.....	34
3.2 LOKALISATION BOVINER PGC.....	36
3.2.1 Stadium der Keimscheibe	37
3.2.2 Stadium des Keimdrüsenfeldes	38
3.2.3 Stadium der Gonadenleiste.....	42
3.2.4 Stadium der Gonadenfalte.....	44
3.2.5 Stadium nach der Gonadendifferenzierung.....	48

4. DISKUSSION	55
4.1 DIE BEDEUTUNG VON LEKTINREAKTIONEN FÜR DIE IDENTIFIZIERUNG VON PGC.....	55
4.2 DIE ALLOKATION DER KEIMZELLINIE	58
4.3 DIE RELEVANZ DER VERSCHIEDENEN TRANSLOKATIONSTHEORIEN	63
4.4 DIE BEDEUTUNG SOG. EKTOPISCHER KEIMZELLEN	71
4.5 WECHSELBEZIEHUNGEN VON KEIMZELLEN MIT STRUKTUREN DES GONADALEN AREALS.	
DIE BEDEUTUNG VON NEPHROSTOMEN. URSPRUNG DES INTERRENALBLASTEMS	73
4.6 PGC NACH DER GONADENDIFFERENZIERUNG	77
4.7 IDENTIFIZIERUNG UND LOKALISATION DER KEIMZELLEN IM FRÜHEN OVAR.	
DIE BEDEUTUNG MEDULLÄRER STEROIDPRODUZIERENDER AREALE	82
4.8 KEIMBAHN, DETERMINATION UND TRANSDIFFERENZIERUNG	85
5. LEGENDEN	89
5.1 LEGENDEN ZU DEN ABBILDUNGEN.....	89
5.2 LEGENDEN ZU DEN TABELLEN	111
5.2.1 <i>Legende zu den Tabellen 1a, b</i>	111
5.2.2 <i>Legende zu Tabelle 2</i>	112
5.2.3 <i>Legende zu Tabelle 3</i>	112
6. TABELLEN UND ABBILDUNGEN	113
6.1 TABELLEN.....	113
6.2 ABBILDUNGEN	119
7. ZUSAMMENFASSUNG.....	134
8. SUMMARY	137
9. LITERATURVERZEICHNIS.....	139
10. ANHANG	165
10.1 LEBENSLAUF.....	165
10.2 DANKSAGUNG.....	166

1. Einleitung

1.1 Stand der Diskussion. Ziel der Arbeit

Der Ursprung und die Entwicklung der Keimzellen von Chordaten und Invertebraten nehmen die Aufmerksamkeit von Embryologen seit mehr als 100 Jahren in Anspruch (Darstellungen des historischen Hintergrundes: Bounoure 1939; Heath 1978; Hardisty 1978; Niewkoop und Sutasurya 1979, 1981; Eddy und Hahnel 1983; Wylie et al. 1986).

Grundsätzliche Probleme der Identifikation, Charakterisierung, Lineagerestriktion und Allokation, sowie der Differenzierung von PGC (Primordialkeimzellen, Urgeschlechtszellen, Gonozyten) wurden an Insekten (*Drosophila*), Amphibien (Anuren, Urodelen), Vögeln (Huhn) und, was Säugetiere betrifft, vorzugsweise an Mäuseembryonen zu lösen versucht und wiederholt zusammengefasst (McLaren 1981, 1983, 1992). Viele in mancher Hinsicht relevante Arten wie Reptilien und Cephalochordaten sind dagegen weitgehend vernachlässigt worden. Auch über Haussäugetiere existieren kaum detaillierte Untersuchungen. Üblicherweise werden die an Mäuseembryonen erhobenen Befunde verallgemeinert und auch auf Spezies mit signifikant unterschiedlicher Embryogenese übertragen. Ein explosiv wachsender Dottersack, sowie ein rapides Wachstum des dorsalen Mesenteriums interferieren beispielsweise beim Rinderembryo deutlich mit den Behauptungen einer aktiven interstitiellen Migration der PGC von extraembryonalen bzw. extragonadalen Lokalisationen zur Gonadenanlage.

Untersuchungen boviner PGC sind allerdings durch eine Reihe technischer Schwierigkeiten belastet. Wie bei den meisten Säugetieren, so können auch bovine potentielle PGC durch den Nachweis der

alkalischen Phosphatase (ALP) identifiziert werden (Ohno und Gropp 1965; Gropp und Ohno 1966; Jost und Prépin 1966). Da aber auch vermehrt andere embryonale Strukturen und Zellen ALP-positiv reagieren, ist die Verwendung der ALP als spezifischer Marker für PGC nicht unumstritten (Essenberg et al. 1955; Zamboni und Merchant 1973; Heath 1978). Vor allem ist fraglich, ob der Aufenthaltsort der PGC zum Zeitpunkt der erstmaligen ALP-Positivität den tatsächlichen Entstehungsort im Sinne einer Segregation der determinierten Keimzelllinie markiert (Snow und Monk 1983). Nur ein Teil der ALP-positiven Zellen wird zudem auch tatsächlich zu PGC (Labosky et al. 1994), und unklar bleibt der Anteil bzw. die Persistenz ALP-negativer totipotenter Zellen am späteren Keimzellpool (Snow und Monk 1983; Eddy und Hahnel 1983); diese Frage hängt mit der Zeitdauer der Allokation zusammen.

Erschwert wird die Identifizierung der PGC bei Rinderembryonen dadurch, daß mit 23 Tagen Areale des Keimdrüsenfeldes (Palisadenblastem) und ab dem 30. Tag post inseminationem (p.i.) fast das gesamte Gonadenblastem ALP-positiv reagieren (Jost und Prépin 1966). Diese Reaktion wird über die geschlechtliche Differenzierung hinaus, die beim Rind bisher auf den 40. Tag datiert wurde, in einem geschlechtsabhängigen Muster beibehalten (Gropp und Ohno 1966). Wegen dieser besonderen Situation ist die ALP-Histochemie beim Rind nicht in der Lage, alle PGC der indifferenten Gonade zu dokumentieren. Notwendigerweise sind daher in dem beschriebenen Zeitraum keine genauen Daten bezüglich der Anzahl und räumlichen Verteilung der PGC verfügbar. Das Auftreten und Verhalten von PGC in Rinderembryonen, die jünger als 25 Tage alt sind, ist bis dato vollkommen unbekannt.

Einen besonderen Diskussionspunkt stellt beim Rind die Modalität der Translokation von PGC in die Gonadenanlage dar. Jost und Prépin (1966) interpretieren die bei 25 bis 31 Tage alten Rinderembryonen in der Coelombucht und im dorsalen Mesenterium gefundenen ALP-positiven

Zellen als aktiv zum Gonadenprimordium migrierende PGC. Funde ALP-positiver Zellen in Leber und Gefäßen veranlassen sie nicht, diesen als PGC angesprochenen Zellen eine größere Bedeutung bei der Gonadenbesiedelung via intravasaler Migrationsroute beizumessen. Mit den intravasalen Funden ALP-positiver Zellen erklären sie lediglich den Austausch von PGC zwischen dizygoten Rinderzwillingen ungleichen Geschlechts (ermöglicht durch obligates frühes Fusionieren von Gefäßen der Chorioallantoismembran).

Wartenberg (1983) andererseits war außerstande, im langen dorsalen Mesenterium eines ungefähr 30 Tage alten Rinderembryos PGC zu identifizieren und folgerte aufgrund intravasaler Keimzellfunde eine ausschließliche Kolonisierung der Gonadenanlage über das Blutgefäßsystem mit Extravasation im Riesenglomerulum des Mesonephros. Den Ort der Intravasation, wie sie als Kopfsichel beim Huhn durch Swift (1914) und Dantschakoff (1941) beschrieben wird, können allerdings weder Jost und Prépin (1966) noch Wartenberg (1983) angeben.¹

Die vorliegende Arbeit war im wesentlichen durch die kontroversen Befunde und Interpretationen in der Literatur bestimmt. Das vollkommene Fehlen an Informationen über frühe Stadien von Rinderembryonen, sowie die zunehmende Bedeutung assistierter Reproduktion gerade bei dieser Spezies waren weitere motivierende Faktoren für die Anfertigung dieser Untersuchung.

Die in etwa gleichlange Gestationsdauer und ein ähnlicher Zeitplan bei der embryonalen Entwicklung von Rind und Mensch erlauben zudem sinnvolle Vergleiche zwischen beiden Spezies.

Um die Unzulänglichkeiten der ALP-Reaktion bei der Identifizierung von bovinen Keimzellen zu umgehen, bzw. auch um den Wert der ALP-

¹ Das Alter der von ihnen untersuchten Embryonen läßt auch keine Aussage darüber erwarten; eine Intravasation müßte vor dem 25. Tag p. i. stattfinden.

Reaktion zu rehabilitieren, wurden für die vorliegende Untersuchung eine Reihe von Lektinen mit verschiedenen Bindungskapazitäten für ihre Eignung als spezifische Marker für bovine PGC getestet. Zudem wird über die räumliche Verteilung von PGC in der gesamten Periode, von der ersten Beobachtung am 18. Tag bis über die geschlechtliche Differenzierung hinaus, berichtet.

Da Keimzellen auch über die Zeit der Gonadendifferenzierung hinaus als PGC bezeichnet werden, erschien es angebracht, diesen bisher vernachlässigten, aber entscheidenden Zeitraum (40. - 80. Tag), miteinzubeziehen. Dabei ergaben sich zwangsläufig Berührungspunkte mit zentralen Fragen der Gonadogenese. Einige Aspekte davon wie z.B. die prämeiotische Steroidsynthese im Ovar, der Zusammenhang von Gonadenblastem und Nebennierenrindenblastem oder die Bedeutung von Nephrostomen werden thematisiert.

1.2 Charakterisierung der verwendeten Marker

1.2.1 Laminin

Laminin ist ein extrazelluläres Glykoprotein und stellt als biologisch aktive Komponente den strukturellen Hauptbestandteil vieler Basalmembranen. Es spielt eine bedeutende Rolle in vielen Aspekten der Zellbiologie. Seine drei Ketten sind durch Disulfidbrücken zusammengehalten und verbinden sich an ihren Enden sowohl mit Kollagen IV, Heparansulfat und Proteoglykanen als auch mit Rezeptoren (Integrinen) von Zelloberflächen. Laminin moduliert aufgrund seiner Adhäsionspotenz Zelldifferenzierung,

Zellform und Zellbewegungen und wird in verschiedenen Variationen in der Embryogenese, Organogenese und Cancerogenese beobachtet.

Eine Affinität der Keimzellen zu Strukturen der Basalmembran ist gerade während der Migration und Gonadenbesiedlung auffällig.

1.2.2 Heparansulfat

Heparansulfat - Proteoglycan (HSPG) ist ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix (ECM), besonders der (glomerulären) Basalmembranen und spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Ionenverteilung, sowie beim Auf- und Abbau von Basalmembranen während der Ontogenese der Gonade. Die Funktion als Leitstruktur für Migrationsbewegungen, z. B. von Keimzellen, aber auch allgemein in der epithelio-mesenchymalen Transformation (EMT), der Hodenstrangformation, sowie der Tunica- und Gefäßbildung rechtfertigt den Routineeinsatz bei serieller Bearbeitung der Gonaden.

1.2.3 LNGFR

LNGFR (low-affinity nerve growth factor receptor) wird vor allem bei der Differenzierung des Nervengewebes beobachtet (Chao 1992), aber auch in anderen Geweben und Organen während der Ontogenese exprimiert (Russo et al. 1994). Auch im Hodengewebe verschiedener Spezies (Persson et al. 1990, Graham et al. 1992) wird der Rezeptor gefunden. Russo et al. (1994) konnten eine NGFR-Expression in den mesenchymalen intertubulären Zellen pränataler Hoden nachweisen, die sich postnatal auf peritubuläre Zellen beschränkt; in keinem anderen mesenchymalen Gewebe des Fötus wurde der Rezeptor beobachtet.

Diese Besonderheit des gonadalen Mesenchyms wurde mit einem monoklonalen mouse-anti-human Antikörper gegen die low affinity form des Rezeptors, von Wrobel et al. (1996a) bei einem 7 Monate alten Rinderfötus bestätigt: Nach Differenzierung zu peritubulären Zellen resp. Leydigzellen ist die Reaktion auf Hodenfibroblasten beschränkt, die sich dadurch zeitlebens als potentielle Stammzellen dieser hormonell bedeutsamen Differenzierungsstadien erweisen.

Bei bovinen postnatalen Spermatogonienstadien wurde dieses Rezeptorprotein ebenfalls für eine begrenzte Zeitdauer, die mit intratubulären Bewegungen der Spermatogonien korreliert, an der Zellmembran gefunden (Wrobel et al. 1996a). Die selektiven Funde von NGFR im dorsalen Mesenterium, Gonadenhilus und um Gonadengefäße bei Rinderembryonen mit indifferenter Gonade werden in dieser Dissertation zum ersten Mal beschrieben.

1.2.4 MIB-1

Der Antikörper MIB-1 wird in der Immunhistochemie zunehmend zur Detektion von Zellproliferationen in situ eingesetzt (Hall und Levison 1990, Duchrow et al. 1994). Das nachzuweisende antigene alkalische Protein Ki-67 ist proteaseempfindlich und weist einen hohen Gehalt an Prolin und Lysin auf (Duchrow et al. 1994). Nach Untersuchungen von Schlüter et al. (1993) ist Ki-67 für den Ablauf des Zellzyklus erforderlich. Es ist während der S-, vor allem jedoch in der G₂- und M-phase, aber auch während der späten G₁-phase des Zellzyklus vorhanden (Gerdes et al. 1984, Sasaki et al. 1987). Vermutlich wegen seiner kurzen Halbwertszeit von 1 - 2 h ist die Menge von Ki-67 Protein unmittelbar nach der Mitose am geringsten und daher nicht nachweisbar. Obwohl dadurch nicht alle proliferierenden Zellen dargestellt werden können,

erweist sich der monoklonale Antikörper MIB-1 (Becker 1992) als ein sehr aussagekräftiger Marker, und wird auch von Wrobel et al. (1996b) bei Untersuchungen der bovinen Spermiogenese erfolgreich eingesetzt. Bei unseren Untersuchungen boviner Gewebe konnten die unterschiedlich proliferativen Aktivitäten einzelner Zonen - intra- und extragonadal - zu bestimmten Zeiten sicher durch MIB-1 erkannt werden, wodurch eine Beurteilung bisher nur vermuteter morphogenetischer Bewegungsabläufe - auch ganzer Gewebsverbände - ermöglicht wird.

1.2.5 Lektine

Lektine sind Proteine oder Glykoproteine pflanzlicher (exogene Lektine) oder tierischer (endogene Lektine) Herkunft mit mindestens zwei Zuckerbindungsstellen. Sie bilden zusammen mit Antikörpern und Enzymen die Familie der kohlenhydratbindenden Moleküle und kommen in Viren, Bakterien und anderen Mikroorganismen, sowie in Pflanzen, Invertebraten und Vertebraten vor. Sie besitzen selbst keine enzymatische Aktivität und sind nicht immunogen. Obwohl die Funktion der Lektine sehr unterschiedlich sein kann, ist ihnen allen eine spezifische Affinität zu bestimmten Zuckerstrukturen gemeinsam. Sie binden an terminale oder interne Glykokonjugate, die wiederum komplex an membranständigen Proteinen, Peptiden oder Lipiden N- oder O-glykosidisch gebunden sind.

Lektine sind nach dem heutigen Stand der Forschung bedeutsam für Interaktionen zwischen Zellen und ihrer Umgebung, besonders während des Wachstums und der Differenzierung. Zellerkennung und Adhäsionsvorgänge spielen gerade in Migrationsphasen eine große Rolle, sind aber auch bei der Signaltransduktion durch Membranen, bei Proliferations- und Induktionsvorgängen, in der Immunabwehr und bei Apoptosen beteiligt.

Der Einsatz von Oligosacchariden in der medizinischen Biologie erhält dadurch zunehmend Bedeutung: Die Veränderung von Adhäsionseigenschaften maligner Zellen ist z. B. bei der Metastasierung von Krebszellen ein entscheidender Faktor. Die Blockade der zuckerbindenden Lektinstrukturen mit entsprechenden Sacchariden verhindert die Anheftung zirkulierender Krebszellen und damit die Metastasenbildung. Veränderte Lektine an Zelloberflächen neoplastischer Gewebe erlauben Identifizierung, Lokalisierung und Quantifizierung maligner Prozesse. Spezifische Angriffspunkte für Diagnose und Therapie sind dadurch möglich. Beim Drug targeting mittels Lektinen werden Glycokonjugat-Liganden als Marker mit hoher Bindungsspezifität (homing molecules) gegen tumorspezifische Glycokonjugate oder Lektinrezeptoren eingesetzt. Sie dienen als Träger für Cytotoxine, Oligonukleotide und Chemotherapeutika. Durch den Bedarf an Werkzeugen zum Studium von Embryonalentwicklung, Zelldifferenzierung und Morphogenese, Zell-Zell-Wechselwirkungen, histochemischer Diagnostik und Strukturänderungen auf Zelloberflächen steigt gleichermaßen auch die Bedeutung der Lektine. Durch ihre relativ selektive Bindungspotenz sind Lektine in der Lage, auch bestimmte Zelllinien zu markieren. Die Spezifität dieser affinen Bindungen wird allerdings, abgesehen von der Zunahme lektintypischer Lektinbindungsstellen somatischer Zelllinien unverwechselbarer Provenienz (Eihäute, Urnierentubuli, Chorda), durch die gemeinsamen Oberflächenantigene von Blutzellen, Hämangioblasten, Carcinomzellen und PGC relativiert; eine selektive Identifizierung über ein speziesspezifisches Lektinmuster ist dann notwendig. Funktionelle Anpassungen, die bestimmte Oberflächenantigene erzwingen, sind z. B. bei der Migration sowie Intra- und Extravasation verschiedener Zellarten zu beobachten: Das von Mäusekeimzellen phasenbegrenzt (Migration) exprimierte Antigen SSEA₁, ein Trisaccharid, erkennt Galactose (β_1 -4) N-acetyl-glucosamine (α 1-3) fucose (Gooi et al. 1981) und ist auch bei der

Interaktion bestimmter Blutzellen mit Gefäßendothelien beteiligt. Ein anderer Antikörper (QH₁) erkennt bei Wachteln sowohl hämangioblastische Zelllinien als auch frühe Keimzellen. Schwieriger, wenn überhaupt, sind PGC von anderen Stammzellen der Hämatopoese und von Carcinomzellen über Oberflächenantigene und Lektinmuster zu differenzieren: EMA-1 ist ein monoklonaler IgM-Antikörper, der ursprünglich gegen embryonale Carcinomzellen produziert und erst später als „spezifischer“ Marker für PGC benutzt wurde. Die Pluripotenz bestimmter Zelllinien, die durch Persistenz des undifferenzierten Zustands oder durch De- und Transdifferenzierung (unter bestimmten Bedingungen) eine identische Genexpression zur Grundlage hat, verweist auf eine gemeinsame Problematik und einen bislang ungelösten Zusammenhang von undifferenzierten, nicht determinierten Keimzellen, bestimmten Tumorzellen, Teratocarcinomzellen und Stammzellen der Hämatopoese. Diese problematischen Beziehungen werden auch bei der Anwendung der ALP-Reaktion offenkundig: Auch hier reagieren maligne Seminome und Linien embryonaler Zellen (EG-cells) sowie carcinogene Zellen (EC-cells) ALP-positiv.

1.2.6 Cholinesterasen (AChE/BuChE)

Die spezifische Rolle der Cholinesterasen in der Neurotransmission cholinergischer Synapsen adulter Organismen ist bekannt: Beendigung der Erregung myo- und interneuronaler Verbindungen; dabei wird Acetylcholin in seine Bestandteile zerlegt.

Ontogenetisch treten Cholinesterasen aber bereits viel früher und in verschiedenen anderen „unspezifischen“ Funktionen auf (Drews 1993). Mit dem Begriff „embryonale cholinesterase“ bezeichnet Drews (1993) eine Aktivität in embryonalen Geweben, die in einem ontogenetisch

frühen und begrenztem Zeitraum bei der Differenzierung von Organen (Blastemphase) zu beobachten ist. Nach der Differenzierung zu definitiven Organstrukturen verschwindet diese Reaktion wieder.

Da diese Enzymexpressionen auch während morphogenetischer Bewegungen im mesenchymalen Gewebe auftreten und auch bei Migrationen einzelner Zellen (PGC, Neuralleistenzellen) zu beobachten ist, scheinen sie ontogenetisch allgemein zelluläre Bewegungen zu regulieren (Drews 1993). Proliferierende (BuChE) und differenzierende (AChE) Zonen werden von Layer (1990) als zeitlich und räumlich aufeinanderfolgende Phasen morphogenetischer Vorgänge interpretiert. Die Expression von AChE in PGC beim Hühnerembryo in bestimmten Stadien sowie im direkten Vergleich mit der bekannten PAS-Reaktion wird von Bachmann (1990) vorgestellt.

Wir konnten bei Rinderembryonen diese Beobachtungen im wesentlichen bestätigen. AChE tritt zum ersten Mal in einem 23 Tage alten Embryo bei der Tubulusbildung des intermediären Mesoderms auf. Danach folgen in charakteristischer Abfolge Expressionen von BuChE und nachfolgend AChE in bestimmten Kernarealen des Neuralrohrs. Diese Reaktionen dienen uns bei Rinderembryonen, die nicht durch künstliche Befruchtung gewonnen waren, zusätzlich zur sicheren Identifizierung und Einordnung des Entwicklungszustandes.

Von da an werden zunehmend ChE-positive neuronale Strukturen und ihre Wege (Neuralleistenzellen) verfolgbar. Besonders aufschlußreich ist die beobachtbare Entwicklung und Bedeutung des AChE/BuChE-positiven Gonadenblastems für die Gonadenmorphogenese. Dadurch können Informationen über die Blastementwicklung erhalten werden, die zusammen mit ALP, WFA und LAP eine Differenzierung von Zellen im Blastem ermöglichen.

Im Unterschied zur ALP-Blastemreaktion zeigt das Interrenalblastem keine ChE-Expression; umso deutlicher sind die stark AChE-positiven

Neuralleistenzellen bis weit über die Differenzierung hinaus bei der Besiedelung des Nebennierenrindenblastems zu beobachten.

Die Esterasen markieren selektiv die subcoelotheliale basalmembranähnliche Matrix. Die Selektivität der Esterasereaktion bekommt durch die Tatsache, daß in übrigen embryonalen Geweben die ECM-Strukturen keine Esterasen, wohl aber Heparansulfat und Laminin exprimieren, besonderes Gewicht. Auch beim Rinderembryo zeigen PGC ab einer bestimmten Differenzierungshöhe eine AChE-Reaktion. In der Kombination mit der NADPH-Tetrazoliumreduktase (NADPH-TRed) stellt diese Enzymreaktion eine weitere Möglichkeit dar, PGC, allerdings erst ab dem 30. Tag - nach der Besiedelung der Gonade -, deutlich zu kennzeichnen. Es werden aber damit wesentlich weniger PGC als mit ALP oder den Lektinen erfaßt. Auch Bachmann (1990) konnte bei Hühnerembryonen mit AChE nur ein Drittel der mit PAS positiv reagierenden Keimzellen ermitteln. Ab dem Stadium der geschlechtlichen Differenzierung ist beim Rinderembryo diese Keimzellbestimmung bereits wieder obsolet; die als Besonderheit beim Rind auftretende starke AChE-Reaktion der aggregierenden Präsertolizellen verdeckt die schwächer reagierenden Keimzellen im Gebiet der sich bildenden Hodenstränge. Somit ist die Phase der adäquaten Keimzellerkennung beim männlichen Rinderembryo auf einen kurzen (~ 10 Tage) Zeitraum beschränkt. Die kräftige und deutliche AChE-Positivität der Präsertolizellen erlaubt allerdings bereits am 38. Tag eine enzymhistochemische Geschlechtsbestimmung und ist bis ins adulte Stadium ausgeprägt und typisch.¹ Eine homologe AChE-Reaktion beim weiblichen Embryo ist rudimentär peripher des Reteblastems in einzelnen Zellen der Marksträngen zu erkennen. Die Intensität der Reaktion in den

¹ Dhh (desert hedgehog) codiert für ein Signalmolekül, das in Sertolivorläuferzellen unmittelbar nach der Sry-Aktivierung exprimiert wird und ebenfalls noch im adulten Hoden persistiert (Bitgood et al. 1996); es ist für verschiedene, insbesondere frühe Stadien der Spermatogenese essentiell. Eine Beziehung zur AChE-Expression ist wahrscheinlich.

Präsertolizellen und in den Zellen der Markstränge (intragonadales Rete) entspricht der von Nerven und Nervenfasern sowie der spezifischen ECM im subcoelothelialen Bereich der Gonadenanlage; die schwächere Expression der PGC ist der im Gonadenblastem vergleichbar und ist, auch in ihrer Deutlichkeit, den Identifizierungsmöglichkeiten durch ALP und den Lektinen unterlegen.

1.2.7 NADP-abhängige Oxydoreductasen (NADPH-TRed und 3 β -HSDH)

In einigen Fällen war zur Kontrastierung der AChE-Reaktion eine Gegenfärbung mit Hämalan gebracht. Sinnvoller erwies sich eine Vorinkubation (vor der AChE-Reaktion) mit NADPH und einem Tetrazoliumsalz (NADPH-TRed-Reaktion); damit werden membran-gebundene Flavinenzyme nachgewiesen (NADPH-Tetrazolium-reduktasen), die für eine effektive Oxidation des reduzierten Coenzym (NADPH) sorgen. Der Wasserstoff wird dann auf das Tetrazoliumsalz übertragen, wodurch blaues Formazan entsteht. AChE-positive Keimzellen erscheinen danach mit einem blauen Rand umgeben und sind daher, vor allem in der Nähe des ebenfalls AChE-positiven Gonadenblastems, deutlicher erkennbar.

Nach der geschlechtlichen Differenzierung erwies sich die NADPH-TRed-Inkubation als geeignet zur Detektion steroidproduzierender Zellen bei beiden Geschlechtern. Weil Tetrazoliumreduktasen Lokalisation und Intensität von fixierungsempfindlichen Dehydrogenasen bestimmen (Lojda et al. 1976) deckt sich die Lokalisation der 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (3 β -HSDH) mit der NADPH-TRed. Da in embryonalen Zwischenzellen beide Reaktionen erkennbar sind, kann eine

positive NADPH-TRed hier als stellvertretend für 3 β -HSDH angesehen werden.

1.2.8 Leucinaminopeptidase (LAP)

Diese enzymhistochemische Reaktion ist spezifisch für die intratestikulären samenableitenden Wege des adulten Rindes (Wrobel und El Etreby 1971), ermöglicht aber bereits im Zeitraum kurz nach der geschlechtlichen Differenzierung (ca. 42 Tage) die Identifizierung des Reteblastems. Bis in das adulte Stadium hinein ist diese Enzymreaktion bei beiden Geschlechtern für das Rete charakteristisch. Dadurch ist es möglich, die frühzeitige Genese des Reteblastems aus dem parazentralen Gonadenblastem zu verfolgen, was eine wesentlich frühere Datierung des Beginns der Retedifferenzierung beim Rind erlaubt als von Anton (1987) angegeben. Die Reaktion ist sehr spezifisch und wird nur noch in bestimmten Tubuli von Mesonephros und Metanephros angetroffen, was als Indiz für die Herkunft des Reteapparates aus dem Mesonephros bzw. aus den Zellen des intermediären Mesoderms gelten kann.

1.2.9 Alkalische Phosphatase (ALP)

ALPs (orthophosphoric monoester phosphohydrolase) sind ubiquitäre, membrangebundene Enzyme, die in der Lage sind, eine große Bandbreite von Monophosphat-Estern bei einem alkalischen pH-Optimum zu hydrolysieren. Eine große Anzahl von Gewebsvarianten (TSAP, IAP, GCAP, PAP, BAP)¹ erlaubt inzwischen bei einigen Spezies eine

¹ Tissue Specific-, Intestinale-, Germ Cell-, Placentare-, Bone- Alkalische Phosphatase

immunhistologische Abklärung der Spezifitätsfrage, die auch in der Tumordiagnostik relevant ist (Hustin et al. 1987). Zwei davon (PAP, BAP) wurden von uns erfolglos an Rinderembryonen getestet.

McKay et al. (1953) waren die ersten, die bei Säugetieren in PGC eine ALP-Aktivität demonstrieren konnten. Diese Enzymreaktion wurde seither durch Chiquoine (1954), Mintz (1957 b), Jeon und Kennedy (1973), Eddy (1975) und zuletzt von Ullmann (1997) bei verschiedenen Spezies als Keimzellmarkierung etabliert, trotz einiger kritischer Stimmen (Essenberg 1955, Zamboni 1973). ALPs kommen in der Natur in so verschiedenen Spezies wie E. coli und Mensch vor, was eine fundamentale Rolle vermuten läßt. Die vorwiegende Lokalisation in der Zellmembran von Keimzellen läßt auf eine Beteiligung beim Transmembrantransport von Metaboliten schließen. Die Abwesenheit bedeutender Energiereserven (Dotter) in Säugetierkeimzellen erklärt die Notwendigkeit dieses Transfers (Zamboni und Merchant 1973). Die PGC einiger Spezies (Kaninchen, Beuteltiere) zeigen allerdings keine ALP-Reaktion, und die Deletion der dafür zuständigen Gensequenz bei Mäusen (Mc Gregor 1995) verursacht keine Änderung der Fähigkeit, die Gonaden besiedeln zu können. Von Hui et al. (1996) wird eine ALP-Reaktion immer mit Zelldifferenzierung assoziiert gefunden und ein Einfluß auf Zellproliferation und morphologische Differenzierung konstatiert. Auch eine Rolle bei Zellmigrationen, Zellzyklusvorgängen und bei der Tumorgenese werden von ihnen angegeben: Zellteilungen, morphologische Differenzierungen und Migration werden durch intrazelluläre Mikrotubuli ermöglicht, und eine Zunahme der Tubulintranskription läuft parallel einer zunehmenden ALP-Aktivität.

Die Fähigkeit der ALP-Reaktion zur Detektion von PGC beim Rind (bis 10 cm SSL) konnte durch die Anwendung der Lektin histochemie bestätigt werden. Im Vergleich zur Lektin histochemie markiert die ALP ontogenetisch frühere Differenzierungsstadien (Stammzellen von

Keimzell- und Blutzelllinie) und ist in vielen Stadien und Geweben nur zusammen mit den Lektinen ein wertvolles Instrument zur Klärung der Keimzelltopographie und ihrer Differenzierungsstadien. Eine zusätzliche Bedeutung der ALP-Reaktion beim Rind dürfte (zusammen mit AChE, BuChE, WFA und LAP) in der Aufdeckung von Ursprung und Verlauf des Gonadenblastems liegen.

2. Material und Methoden

2.1 Gewebematerial

2.1.1 Materialentnahme

Für die vorliegende Arbeit wurden 114 Embryonen (Tabelle 1) aus Schlachtrindern der Rasse Deutsches Fleckvieh (34 davon mit indifferenter Gonade) untersucht.¹

Das Alter wurde, falls es nicht durch gezielte künstliche Besamung gesichert war, durch Messung der SSL und durch den Entwicklungszustand bestimmt.

Bei einem Teil der Embryonen mit indifferenter Gonade, wurde das Geschlecht mittels PCR bestimmt. Dafür wurden bei jüngeren Embryonen die Eihäute, von älteren Embryonen die Kopfreion verwendet. Kleinere Embryonen (< 2 cm SSL) wurden nach Eröffnung der Bauchhöhle in toto fixiert. Bei größeren Föten wurden die Gonaden samt Adnexen, sowie Teile der dorsalen Körperwand, Nebenniere und Leberstücke entnommen und sofort immersionsfixiert:

¹ Alle Embryonen resp. Föten befanden sich im prämeiotischen Zeitraum bzw. vor dem Proliferationsstop, der zeitäquivalent in der Terminologie nach Hilscher (1984) den Übergang zur T₁-Prospermatogonie markiert (< 80 Tage). Da verschiedentlich in der Literatur der Begriff PGC ab dem 60. Tag nicht mehr verwendet wird (stattdessen M-Prospermatogonie bzw. Oogonie), wurde eine systematische Befunderhebung über diesen Zeitpunkt hinaus nicht mehr durchgeführt. Die hohen Kennzahlen der Embryonen in Tab.1 sowie gelegentliche Hinweise auf Befunde, die an älteren Föten (> 80 Tage) erhoben wurden, finden ihre Erklärung darin, daß insgesamt 212 Embryonen bzw. Föten zur Verfügung standen. Einige Ergebnisse stammen auch aus Untersuchungen präpuberaler, puberaler sowie adulter Gonaden, die ebenfalls aus den umliegenden Schlachthöfen gewonnen bzw. vom Institut für Anatomie in Regensburg zur Verfügung gestellt wurden.

2.1.2 Fixierung für Histologie, Enzym-, Lektin- und Immunhistochemie

1. 30 min in Lösung 1: 4 % Paraformaldehyd
15 % Pikrinsäure
in 0.1 M Phosphatpuffer pH 7.3
0.1 % Glutaraldehyd
2. Dann 3 h in Lösung 2: Zusammensetzung siehe Lösung 1, jedoch ohne Glutaraldehyd
3. Mindestens 3 x 10 min waschen mit 0.1 M Phosphatpuffer
4. Anschließend in 10 %, 20 %, 30 % Saccharose bis jeweils zur Gewebssättigung (Sinken des Gewebes)

2.1.3 Präparation der Materialblöcke

Nach dem Fixieren wurden die Präparate für das Schneiden am Kryostat vorbereitet. Hierfür wurden sie in eine Haltevorrichtung aus Messing eingelegt, mit Tissue-TEK (OCT-Compound: Miles, Elkhardt, Ind., USA) eingebettet und in flüssigem Stickstoff gefroren. Nach Überführung in den Kryostaten wurden sie mittels Tissue-TEK auf einen Objekthalter aus Messing aufgefroren.

2.1.4 Herstellung der Kryostatschnitte

Zur Herstellung der Gefrierschnitte wurde ein Kryostat (Microm HM 500 OM) verwendet.

Die jüngeren Rinderembryonen wurden i. d. Regel seriell (horizontal bzw. longitudinal) in Schnittdicken von 8 - 10 µm zerlegt; die Schnitte wurden auf mit Chromgelatine beschichtete Objektträger aufgezogen.

Anschließend wurden die Objektträger entweder gestapelt und in Alufolien verpackt bei - 30°C gelagert, oder sofort bearbeitet. Vor der Färbereaktion wurden sie 2 min. luftgetrocknet.

Die Schnitte für Immun- und Lektin histochemie, ALP und NADPH-TRed wurden mit PAP-PEN umrandet, um zu verhindern, daß das Inkubationsmedium vom Objektträger abfließen kann. Die Schnitte zur Esterasenbestimmung wurden nicht umrandet, sondern direkt in Standküvetten mit dem entsprechenden Medium übertragen.

2.2 Histologie

Für histologische Präparate wurden die Objektträger in Aqua bidest hydriert (Kryostatschnitte). Einige wenige Rinderembryonen waren in Paraffin eingebettet. Sie wurden in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Für Übersichtspräparate und besondere Fragestellungen (in der Literatur angegebene Keimzellfärbungen, Lipidnachweise, Geschlechtsbestimmung usw.) wurden verschiedene Färbungen getestet bzw. regelmäßig verwendet:

1. Masson-Goldner (Trichromfärbung zur Darstellung von Bindegewebe)
2. Orange-Eosin-Toluidinblau

3. Hämatoxylin-Säurefuchsin-Orange-Anilinblau
4. Metachromatische Färbung mit Toluidinblau (von Zamboni 1973 bei Schaf- und Mäuseembryonen angewandt). Sie ist bei Rinderembryonen zur Identifizierung von PGC ungeeignet; ebenso
5. Eosin-Azur; mit dieser Lösung hatte Rubaschkin (1908, 1909, 1912) mehrere Säugetierembryonen (Kaninchen, Meerschweinchen) auf Keimzellen hin erfolgreich untersucht.
6. Aldehydfuchsin-Lichtgrün-Färbung
7. Resorcin-Fuchsin-van Gieson
8. Azanfärbung
9. Darstellung des Geschlechtschromatins nach Barr und Bertram (1949). Nach unseren Erfahrungen ist diese Methode eine unsichere Geschlechtsbestimmung bei Rinderembryonen. Vor allen Dingen kernhaltige Erythrocytenvorstufen erschweren hier die Diagnostik.
10. Quinacrin-dihydrochlorsalz (diese Geschlechtsbestimmung mittels Fluoreszenz erwies sich als ungenau)
11. Sudanschwarz B (für gebundenes Fett)
12. Scharlachrot (neutrale Fette)
13. Otan-Methode nach Adams (Phospholipide und Triglyceride)
14. Kupfer-Phtalocyanin (Phospholipide und Ganglioside)

7, 8, 11 - 14 wurden vorwiegend bei der Untersuchung der Eihäute angewendet.

2.3 Immunhistochemie

2.3.1 Prinzip der Methode

Das Prinzip der hier verwendeten Reaktionen beruht auf einer indirekten Avidin-Biotin-Methode: Ein gegen ein nachzuweisendes Antigen gerichteter, unkonjugierter Antikörper bindet an das Epitop des entsprechenden Antigens. Ein mit Biotin konjugierter sekundärer Antikörper bindet in einem zweiten Reaktionsschritt an diesen Antikörper. Um unspezifische Bindungen der Antikörper am Gewebe zu verhindern, wurden die Schnitte vor der ersten Inkubation mit einem Blockingpuffer behandelt, der neben fötalem Kälberserum auch Ziegenserum (der sekundäre Antikörper stammte jeweils von der Ziege) enthielt.

Zur Hemmung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte mit Phenylhydrazin (Jasani et al. 1986) und H_2O_2 vorbehandelt.

Nun wurde mit ABC (Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex) inkubiert. Avidin ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht (MG) von 68000 und wird aus Hühnereiweiß gewonnen (Romeis 1989). Bei der Reaktion wird die extrem hohe Affinität (Diss.konst. 10^{-15}) des Avidinmoleküls zum Vitamin Biotin genutzt.

Vor allem bei stärkerer Verdünnung der Primär-Antikörper wurden gegenüber der weniger spezifischen PAP-Methode (Sternberger 1979) signifikante Steigerungen der Sensitivität festgestellt (Hsu et al. 1981).

2.3.2 Versuchsanordnung

Für ein optimales Ergebnis der Immunreaktion erwies sich die Erstellung von Verdünnungsreihen als notwendig; die Präparate wurden mit verschiedenen Konzentrationen der Primär-Antikörper inkubiert (siehe 3 a-d). Die Immunhistochemie wurde auf Objektträgern mit Kryostatschnitten, die mit PAP-PEN umrahmt wurden, durchgeführt:

1. Vorinkubation und
2. Spülen (siehe Lektinhistochemie)
3. Inkubation bei Raumtemperatur über Nacht mit dem jeweiligen Primärantikörper in Blocking Puffer
 - a) 1 : 80 monoclonal mouse anti-human Ki-67/MIB-1 (Dianova, Hamburg)
 - b) 1 : 1000 mouse anti-human heparan sulfate (Boehringer, Mannheim)
 - c) 1 : 200 rabbit anti-human laminin (Sigma oder Transduction Lab, Lexington, Kentucky, USA)
 - d) 1 : 1000; 1 : 2000 mouse anti-human LNGFR/clone 8211 nerve growth factor receptor, low-affinity form (Boehringer, Mannheim)
 - e) 1 : 10/40/60 mouse anti-mouse EMA-1 (Developmental Studies Hybridoma Bank, Baltimore, MD, USA)
4. Spülung wie in Schritt 2
5. Inkubation (60 min) mit einem Sekundärantikörper entweder
 - a) 1 : 100 Ziege anti-mouse IgG biotinyliert (Jackson, West Grove, PA, USA) oder
 - b) 1 : 200 Ziege anti-rabbit IgG biotinyliert (Jackson)
6. Spülen wie in 2 oder 4
7. Absättigung der endogenen Peroxidase wie in Schritt 4 der Lektinhistochemie

8. Nochmaliges Spülen (wie in 2, 4 oder 6) in TBS
9. Inkubation mit Avidin-Biotin-Peroxidase Complex, ABC (Vector) nach Hsu et al. (1981) für 60 min
10. Spülen wie in 2, 4, 6 oder 8
11. Entwickeln mit DAB wie in Schritt 8 der Lektinhistochemie
12. Nochmals spülen in TBS
13. Dehydrieren in Äthanol und Xylol, eindeckeln mit DPX (siehe Lektinhistochemie)

Kontrollen wurden wie folgt hergestellt:

1. Der Inkubationsschritt mit dem primären Antikörper wurde weggelassen und die Präparate stattdessen in Blockingpuffer belassen.
2. Präinkubation des Primär-Antikörpers mit dem entsprechenden Antigen (LNGFR, MIB, Laminin, Heparansulfat) für 4 h bei Raumtemperatur. Verwendet wurden Antigen im Überschuß und Antikörper in optimaler Verdünnung.
3. Eine positive Kontrolle mit dem EMA-1-Antikörper (auch als SCC-1 bekannt) wurde an 7, 8, 10 und 12 Tage alten Mäuseembryonen (erfolgreich) durchgeführt.

2.4 Lektinhistochemie

2.4.1 Versuchsanordnung

Die Lektinhistochemie wurde mit 28 biotinylierten Lektinen (Sigma, München oder Vector, Burlingame, Calif., USA) durchgeführt. Es wurden Testserien mit verschiedenen Konzentrationen ausprobiert. Optimale Ergebnisse wurden mit hochverdünnten Lektinen erzielt (siehe Tabelle 2). Alle Schritte der Lektinhistochemie wurden an Kryostatschnitten

durchgeführt (8 - 10 µm). Nach dem Schneiden und Umranden mit PAP-PEN (Science Services, München) wurden die Schnitte wie folgt weiterbehandelt:

1. Vorinkubation mit Blockingpuffer (45 min); (0.08 M TRIS, pH 7.4; 0.15 % Thimerosal; 0.8 % Triton X-100; 0.8 % NaCl; 10 % normales Ziegenserum (DAKO, Hamburg) und fötales Kälberserum (Seromed, München)
2. Inkubation mit dem jeweiligen Lektin in optimaler Konzentration (siehe Tabelle 2) in Blockingpuffer bei Raumtemperatur über Nacht
3. 3 x 10 min spülen in Waschpuffer (0.05 M TRIS, pH 7.4; 0.8 % NaCl; 0.015 % Triton X-100)
4. Inkubation mit Phenylhydrazin für 10 min bei 37°C zur Absättigung der endogenen Peroxidase (Jasani et al. 1986; Wynford-Thomas et al. 1986)
5. 3 x 10 min spülen in Waschpuffer wie unter 3
6. Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase (1 : 200) für 60 min bei Raumtemperatur
7. 3 x 10 min spülen wie unter 3 und 5
8. Entwickeln mit DAB Kit (Immunotech, Hamburg) unter Hinzufügung von 0.002 % $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ und 0.04 % $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Kujat et al. 1993)
9. Erneutes Spülen mit TBS (wie unter 3, 5 und 7)
10. Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol, eindeckeln mit DPX

Kontrollen wurden durchgeführt:

1. Ohne Lektin
2. Mit Lektinen zusammen mit den entsprechenden Hemmzuckern (in TBS) in geeignet hohen Konzentrationen (z. B. WGA mit N-acetyl-D-glucosamin)

Diese Kontrollschnitte bleiben ohne Reaktion.

2.5 Enzymhistochemie

2.5.1 Esterasen (AChE und BuChE)

2.5.1.1 Prinzip der Reaktion

Die Reaktion beruht auf zwei aufeinanderfolgenden Schritten:

1. Durch enzymatische Hydrolyse eines Acetylthiocholin-Salzes freigesetzte Sulphydrylgruppen reduzieren in der Substratlösung Ferricyanid-Ionen (Fe III) zu Ferrocyanid-Ionen (Fe II) und werden dabei selbst oxidiert.
2. Die Ferrocyanid-Ionen bilden mit Kupferionen Kupferferrocyanat, einen braunen Niederschlag (Hatchett-Braun). Durch Zusatz von Iso-OMPA werden unspezifische Esterasen selektiv gehemmt. Das pH-Optimum der Enzyme liegt zwischen 7,5 und 8 (Pearse 1972).

2.5.1.2 Variation der Versuchsbedingungen

Zur Darstellung von PGC, Gonadenblastem, Präsertolizellen und Nervenfasern beim Rinderembryo wurde das Originalrezept von Karnovsky und Roots (1964) abgewandelt (Kujat et al. 1993), um die Stabilität des Mediums zu erhöhen; außerdem werden dadurch unspezifische Komplexbildungen reduziert. Deshalb konnte die Substratlösung bei einem pH-Wert von 5,5 im Kühlschrank (5°C) 24 h lang aufbewahrt werden, ohne gewechselt werden zu müssen. Spätere Versuche erwiesen einen 1/2- bis 2-stündigen Aufenthalt im Wärmeschrank als äquivalent.

Nach Tsuji und Larabi (1983) wurde Kupfersulfat durch Kupferchlorid und Acetylthiocholinjodid durch Acetylthiocholinchlorid sowie

Butyrylthiocholinjodid durch Butyrylthiocholinchlorid ersetzt. Statt Maleatpuffer wurde MES-Puffer verwendet, da es nur wenig Kupferionen bindet.

Diese modifizierte Lösung ist bei 5°C über 24 h (bis 72 h) stabil, zeigt kaum Ausfällungen und ergibt keine unspezifischen Niederschläge im Gewebe.

Bei jüngeren Embryonen konnten dadurch schwache Reaktionen durch längere Inkubation verstärkt werden. Eine allzu lange Inkubation überfärbt Stellen einer naturgemäß starken Aktivität.

2.5.1.3 Versuchsanordnung

1. Für die Cholinesterasereaktionen wurde, wie bei allen anderen Reaktionen auch, immersionsfixiertes Rinderembryonenmaterial verwendet. Das Enzym toleriert die Fixierung mit Formaldehyd und Glutaraldehyd (Lojda 1976).
2. Die Präparate wurden nach Lufttrocknung für 10 min in die Spüllösung I übertragen.
3. Anschließend wurden sie für ca. 24 h bei einem pH-Wert von 5,5 bei 5°C im Kühlschrank inkubiert. (Wahlweise 30 min - 2 h im feuchten Wärmeschrank bei 37°C; laufende Kontrollen, altersstadienbedingt, sind erforderlich).
4. Danach werden die Präparate in der Spüllösung II für 10 min gespült und dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Depex eingedeckelt.

Die Zusammensetzung der Spüllösungen I und II sowie der Inkubationslösung erfolgte nach Kujat et al. (1993).

2.5.2 Weitere enzymhistochemische Untersuchungen

2.5.2.1 NADPH-TRed

Diese Reaktion wurde in der Modifizierung nach Pearse (1972) angewandt.

2.5.2.2 3 β -HSDH

Die 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase wurde nach Lojda (1976) nachgewiesen. Als Substrat diente dabei Dehydroepiandrosteron. Die Empfindlichkeit von Dehydrogenasen gegenüber formaldehydfixiertem Material zeigte sich auch hier in einer reduzierten Farbgebung verglichen mit der NADPH-TRedreaktion (vgl. Abb. 49 a mit Abb. 49 b).

2.5.2.3 Leucinaminopeptidase (LAP)

Diese Reaktion wurde nach Nachlas et al. (1957) durchgeführt. Die Reaktion beruht auf einer Azokopplung. Das Reaktionsprodukt ist violett.

2.5.2.4 Alkalische Phosphatase (ALP)

Die ALP wurde in zwei Varianten, nach Gomori (1952) und nach McGadey (1970), durchgeführt.

2.6 Polymerase Chain Reaction (PCR)

2.6.1 Prinzip der Methode

Eine Geschlechtsbestimmung wurde durchgeführt, um etwaige geschlechtsdifferente Wachstumsgeschwindigkeiten vor der Gonadendifferenzierung (Mittwoch 1986) morphologisch leichter erfassen zu können. Die Darstellung des Geschlechtschromatins erwies sich insbesondere bei jüngeren Embryonen als ungeeignet. Auch mit Quinacrin-dihydrochlorosalz konnten keine sicheren Aussagen gemacht werden. Eine Geschlechtsbestimmung mit der ebenfalls häufig angewandten Metaphasenplatten-Methode wurde nicht mehr weiterverfolgt, nachdem die PCR-Methode als Methode der Wahl etabliert werden konnte.

Die Amplifikation von DNA in vitro wurde von Mullis (1983) eingeführt. Das Prinzip der PCR basiert auf der Denaturierung eines doppelsträngigen DNA-Templates, an das sich am 5'- und 3'-Ende des zu amplifizierenden Bereiches spezifische Oligonukleotidmoleküle (Primer) anlagern (Annealing). Diese Primer werden von einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase in Anwesenheit freier Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTPs) verlängert.

Die DNA-Polymerase elongiert den entstehenden DNA-Doppelstrang (ds DNA) solange, bis sie von der DNA „abfällt“ bzw. die Reaktion unterbrochen wird. Dieser Abbruch wird z. B. durch Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 95°C (verbunden mit einer Denaturierung der ds DNA) erreicht. Kühlt man den Ansatz in Anwesenheit dieser Primer wieder auf 60°- 40°C, so binden diese in Abhängigkeit ihres mittleren Schmelzwertes (T_m-Wertes) an die komplementären Sequenzen des Templates. Die Synthese eines weiteren Doppelstranges kann jetzt wiederholt werden. Die PCR bietet in Kombination mit einer thermostabilen DNA-Polymerase den Vorteil, daß alle Komponenten

(Enzym, Template, Primer, dNTPs etc.) in einem Reaktionsgefäß zusammengeführt werden können. Dadurch kann die DNA vollautomatisch in einem Thermocycler amplifiziert werden. Die Effizienz bzw. Sensitivität dieses Systems zeigt sich schon bei der Durchführung von 25 PCR-Zyklen, da aus einem Zielmolekül bereits $3,2 \times 10^7$ Kopien synthetisiert werden.

2.6.2 Versuchsdurchführung

Die PCR wurde nach der Methode von Ennis und Gallagher (1994) durchgeführt. Es wurden verschiedene Primer angewandt:

1. Ein Primerpaar SJ19/SJ20 des Y-Chromosoms (Quelle der Primer: Tanja Vogel, Med. Hochschule Hannover). Adulter Rinderhoden diente als Positivkontrolle.
2. Ein Primerpaar, das ein 280 bp-Fragment des X-Chromosoms und ein 217 bp der Amelogeninsequenz des Y-Chromosoms amplifiziert (Quelle dieses Primerpaares: Life Technologies Ltd. Paisley, Scotland). Denaturierung, Annealing und Elongation wurden 30 x wiederholt. Die PCR-Produkte wurden durch Gel-Elektrophorese analysiert (3 % Agarosegel in 100 ml TBE-Puffer, 2 µl Ethidiumbromid) und durch UV-Bestrahlung visualisiert.

3. Befunde

3.1 Identifikation boviner PGC

Die Identifizierung von Keimzellen bei Rinderembryonen erfolgte durch die Anwendung der ALP-Reaktion, der AChE-Reaktion, der Lektin-histochemie, sowie anhand histologischer Merkmale.

Embryonale Keimzellen sind polygonale Zellen, von denen einige mit dezenten cytoplasmatischen Fortsätzen ausgestattet sind. Ihre Größe und Morphologie ändert sich mit dem Alter der Embryonen und der intraembryonalen Lokalisation. Der Kern ist meist rund, 1 - 2 Nukleoli sind vorhanden.

Alle PGC geben eine positive ALP-Reaktion. Wo ALP-positive Keimzellen durch eine positive ALP-Reaktion des umgebenden Gewebes maskiert werden, ist die Lektin histochemie und mit Einschränkungen die AChE-Reaktion eine adäquate Möglichkeit der Identifizierung.

Eine große Anzahl (28) von Lektinen (Tabelle 2) wurde auf ihre Fähigkeit, an Keimzellen zu binden, geprüft. Von diesen Lektinen waren 12 mehr oder weniger geeignet, Keimzellen zu markieren: BPA, CAA (Abb. 33), DBA (Abb. 26), ECA, SBA, GSA I, PTA, STA (Abb. 22, 23 a, 52 a, 53 a), SJA, WGA (Abb. 8, 9, 20 a, 23 b, 28 c, 35, 37), VVA, WFA (Abb. 16, 19, 23 c, 28 a, 33, 39, 52 c, 53 c, 54, 55). GSA I reagiert nur mit einer intracytoplasmatischen Struktur, die sich als Golgiapparat identifizieren läßt. Die anderen 11 Lektine zeigen zusätzlich eine starke Reaktion der Zellmembran und eine etwas schwächere Reaktion im gesamten Zytoplasma. Außer an embryonalen Keimzellen binden alle 12 Lektine auch an andere embryonale Gewebe, was aber eigentlich nie eine exakte Identifikation erschwert. Im allgemeinen können durch serielle Bearbeitung bei konsekutiver Untersuchung mit ALP, WGA, WFA und

STA alle Identifizierungsprobleme hinsichtlich der PGC befriedigend gelöst werden.

Intraembryonale putative PGC in der caudalen Körperhälfte reagieren positiv mit ALP und allen 12 Lektinen.

ALP-positive potentielle PGC im Dottersack und in Höhe des Vorderdarms sind niemals lektin-positiv.

Potentielle PGC in der Leber zeigen ein eingeschränktes Lektinbindungsmuster. Embryonen mit Gonadenleisten und Gonadenfalten besitzen bereits ein zunehmend gut ausgebildetes Leberprimordium, das makroskopisch als Leberwulst prominiert. In diesem sind zwischen 27 und 40 Tagen und darüber hinaus rasch anwachsende Zahlen ALP-positiver Zellen zu ermitteln. Von diesen Zellen sind nur eine limitierte Anzahl auch lektinpositiv, und zwar reagieren sie nur mit WFA, VVA, CAA, DBA und SBA in jeweils etwa gleichen Zahlen. Die potentiellen PGC in der Leber übertreffen alle anderen im gesamten Embryo gezählten PGC bei weitem. WGA und STA sowie alle übrigen Lektine reagieren mit diesen potentiellen PGC in der Leber nicht. SBA reagiert zwar mit potentiellen PGC in der Leber, nicht aber mit putativen bzw. prospektiven PGC der indifferenten Gonade (Keimfeld, Gonadenleiste, Gonadenfalte). In der Leberanlage (Abb. 26 a) reagiert das DBA-Lektin mit etwa derselben Anzahl potentieller PGC wie die Lektine WFA, VVA, CAA und SBA. In der indifferenten Gonade reagieren die PGC im allgemeinen mit DBA negativ, mit der regelmäßigen Ausnahme von 1 - 2 Zellen/Schnitt (Abb. 26 b). Auf gleicher Schnitthöhe sind aber 10 - 50 und mehr PGC mit ALP (Abb. 7) und den anderen zuverlässigen Lektinen (WGA, WFA, STA) vorhanden. Ab dem 30. Tag kann überdies eine moderate AChE-Reaktion der Keimzellen nachgewiesen werden (Abb. 31). Da der mesonephrogene Anteil des Gonadenblastems ab diesem Zeitpunkt ebenfalls moderat AChE-positiv wird, sind PGC nur bei einer Doppelinkubation mit NADPH-TRed visualisierbar. Die Aktivität der AChE in Keimzellen und im Blastem

ist über die Zeit der geschlechtlichen Differenzierung hinaus zu finden. Für die Identifizierung von bovinen PGC ist diese enzymatische Reaktion aufgrund der schwachen Esterasereaktion jedoch weniger geeignet. Zudem überdeckt zum Zeitpunkt der geschlechtlichen Differenzierung eine rinderspezifische und starke AChE-Aktivität der Präsertolizellen die schwach ausgeprägte Reaktion der PGC an den Stellen der Hodenstrangformation im männlichen Embryo (Abb. 36, 45). Die rudimentären homologen Zellaggregationen (medullary cords, Markstränge) beim weiblichen Embryo beeinträchtigen hier die Erkennung von PGC weit weniger (Abb. 51). Die Bedeutung der AChE-Reaktion beim Rind liegt insgesamt weniger in der Identifizierung von PGC, sondern in der differenzierten Darstellung der Gonadenblastemontogenese (Abb. 41, 42, 45, 47).

3.2 Lokalisation boviner PGC

Markante Ereignisse der Embryo- bzw. Gonadogenese rechtfertigen eine Einteilung des Untersuchungsmaterials in fünf Gruppen.

3.2.1 Stadium der Keimscheibe

3.2.2 Stadium des Keimdrüsenfeldes

3.2.3 Stadium der Gonadenleiste

3.2.4 Stadium der Gonadenfalte

3.2.5 Stadium nach der Gonadendifferenzierung

Den bei den einzelnen Stadien erhobenen Befunden werden mehr oder weniger ausführliche Beschreibungen des allgemeinen Entwicklungszustandes aber auch Begriffsklärungen vorangestellt, wenn es zur Erklärung des Sachverhaltes notwendig erscheint.

3.2.1 Stadium der Keimscheibe

Die trilaminare Keimscheibe einer 18 Tage alten männlichen elongierten Blastozyste (25 cm) mißt etwa 800 µm in der Länge, ist 400 µm breit und hat die Form einer gewellten Schuhsohle, die dem Dottersack noch vollkommen aufliegt (Abb. 1). Die Amnionhöhle ist bereits in ganzer Länge geschlossen, die Gastrulation hat zur Entwicklung von Primitivstreifen und Chordafortsatz geführt. Der große gefaltete Dottersack zeigt mikroskopisch zwei verschiedene Regionen (Abb. 3, 4). Die proximale Region besitzt ein niedriges entodermales Epithel ähnlich dem intraembryonalen Entoderm und ist bedeckt von einer äußeren Schicht extraembryonalen Mesoderms, das an der sog. Grenzfurche kontinuierlich in das intraembryonale Mesoderm übergeht. Das Mesoderm der proximalen Dottersackwand zeigt starke MIB-1-Immunoreaktivität und ist deutlich in Blutzelldifferenzierung und Gefäßformation involviert. Etwa 1 mm von der Keimscheibengrenze entfernt beginnt abrupt die distale Region des Dottersackes.¹ Hier ist das entodermale Epithel stark erhöht und wölbt sich dadurch in das Lumen des Dottersackes vor. Dieses auffallend kräftig ausgebildete Epithel enthält geringe Mengen Lipide. Das extraembryonale Mesoderm dieser distalen Region zeigt keine Anzeichen einer Hämatopoese, besitzt jedoch im Unterschied zur proximalen Dottersackwand kollagene Fasern.

ALP-positive Zellen sind vorwiegend caudal in der proximalen Dottersackwand lokalisiert (Abb. 2 - 4) und liegen nur ausnahmsweise lateral von der Keimscheibe in der Dottersackwand. Keine potentiellen PGC können in cranialen Positionen gefunden werden.² Die Gesamtzahl

¹ Dieser Unterschied ist möglicherweise eine Folge der Einschaltung des Chordafortsatzes in die dorsale Dottersackwand (Chordaplatte).

² Ein zeitlich limitierter Aufenthalt von PGC im Areal der Herzplatte (erstes Blutbildungszentrum) ist als Kopfsichel (germinal crescent anterior) von Swift (1914, 1915) und Dantschakoff (1941) bei Hühnervögeln beschrieben.

aller potentiellen PGC der Dottersackwand beträgt mindestens 100; die höchsten Konzentrationen (4 bis 12 pro Schnitt) werden unmittelbar nach Verlassen des caudalen Keimscheibenrandes gezählt, in einer Entfernung von weniger als 100 µm. Weiter entfernt nimmt die Zahl potentieller PGC deutlich ab, und ab einer Distanz von 800 µm vom Keimscheibenrand entfernt sind nur noch einzelne potentielle ALP-positive PGC zu finden. In der Dottersackwand selbst liegen die potentiellen PGC im mesodermalen Gewebe oft in engem Kontakt mit Blutinseln oder zu der delikaten Basalmembran, die undeutlich zwischen Mesoderm und Entoderm ausgebildet ist (Abb. 10). Zusätzlich zu den annähernd 100 potentiellen PGC der proximalen Dottersackwand kann eine Akkumulation dicht gelagerter ALP-positiver Zellen im kaudalen Keimscheibenende beobachtet werden (Abb. 2). Diese positiven Zellen sind zum Teil kleiner als die potentiellen PGC der Dottersackwand, teils von ähnlicher Größe und Gestalt.

3.2.2 Stadium des Keimdrüsenfeldes

Embryonen mit 23, 24 und 25 Tagen sind im frühen Somitenstadium und ungefähr 3 mm lang (Abb. 5). Der Trophoblast ist weiter elongiert, mißt jetzt 40 cm und besetzt beide Uterushörner. Für ein besseres Verständnis der Keimzellverteilung sollen einige besondere speziesspezifische Merkmale boviner Embryonen dieser bisher vernachlässigten ontogenetischen Phase herausgehoben werden: Die spaltförmige Öffnung zwischen prospektivem Mitteldarm und Dottersack (Darmrinne) ist von beträchtlicher Länge und mißt annähernd 600 µm, 400 µm und 200 µm am 23., 24. respektive 25. Tag. Die vordere Darmforte führt in einen kurzen Vorderdarm mit drei ausgebildeten Schlundtaschen, die hintere Darmforte öffnet sich zu einem beträchtlich längeren

Hinterdarmabschnitt. Die Abfaltung des embryonalen Körpers von der extraembryonalen Region ist ventral des Vorderdarms bereits erfolgt; nach caudal zu sind die Lateralfalten auf einer Länge von etwa 1000 µm noch nicht fusioniert. Als Konsequenz dieses protrahierten Arrangements sind Dottersackstiel (Darmnabel) in der cranialen Hälfte und Allantoisstiel am Ende der caudalen Hälfte des Embryos noch weit voneinander entfernt (Abb. 5). Intraembryonal liegt der Darm noch in enger Nachbarschaft zur - abhängig von der Körperregion - paarigen bzw. unpaaren Aorta, zur Chorda und zu den mesonephrogenen Strukturen, die sich im caudalen Abschnitt noch im Zustand der mesenchymo-epithelialen Transformation (MET) befinden.

Hervorzuheben ist, daß ein dorsales Mesenterium zu diesem Zeitabschnitt noch nicht entwickelt ist (Abb. 6 - 9).

Im Zeitabschnitt vom 23. - 25. Tag ist die Mehrzahl der PGC intraembryonal lokalisiert. Ihre Zahl wächst von etwa 500 (23. Tag) auf mehr als 1000 (25. Tag) an. Nur ein geringer Prozentsatz (ca. 100) potentieller PGC ist extraembryonal in der caudalen Wand des stark expandierten Dottersackes zu finden (Abb. 10), wo sie in einem Abstand von 3 mm und mehr vom Embryo entfernt liegen (Abb. 29 b). Hier sind sie auf eine definierte Strecke beschränkt und liegen in kettenförmiger Anordnung. In der gut ausgebildeten sichelförmigen Allantois (Abb.5) und im Allantoisstiel sind in dieser Phase, wie auch später, zwar reichlich Vaskularisationen, nie jedoch PGC zu finden.¹

Von den intraembryonalen PGC sind diejenigen im Gebiet von Hinterdarm und Mitteldarm derart typisch angeordnet (Abb. 6 - 9), daß sie einer exakten Beschreibung bedürfen. Es handelt sich hier um die Zone des Mesonephros und beinhaltet damit auch die Region der prospektiven

¹ Dieser Befund stellt keine Ausnahme dar. Auch Ullmann (1997) konnte bei Wallabies keine PGC in der Allantois finden. Bei allen anderen bisher untersuchten Säugetieren wird gerade der Allantoisstiel zu den ersten und häufigsten Lokalisationen, wenn nicht Ursprungsorten, der PGC gezählt.

Gonadenanlage. Die putativen PGC dieses Abschnittes sind die einzigen PGC dieser Entwicklungsphase, die mit allen 12 Lektinen reagieren, die überhaupt eine Affinität zu PGC haben. Verfolgt man die Ereignisse an Querschnitten in caudo-cranialer Richtung, so ist erkennbar, daß die ersten putativen PGC auf der Höhe des sich gerade schließenden hinteren Neuroporus posterior auftreten (Abb. 6).¹ Sie liegen hier im Darmepithel.²

Weiter nach kranial zu, werden zunehmend putative PGC im Mesenchym des Darmrohres beobachtet. Sie liegen in der Wand des Hinterdarmes (Abb. 7, 8) und des prospektiven Mitteldarmes (jetzt noch dorsale Dottersackwand; Abb. 9 a, b) sowie im paraaortalen Mesenchym des ventralen (besonders ventromedialen) Aspekts des Mesonephros (Abb. 9b).

Betrachtet man die putativen PGC der Darmwand in einer Serie von Querschnitten, liegen sie caudal mehr im ventralen Sektor, nach cranial zu vorwiegend dorsal. Parallel dieser ventrodorsalen Verschiebung findet ein Abdriften nach lateral statt: Aus dem Darmepithel zuerst ins intestinale Mesenchym (Abb. 7), dann in eine vorwiegend sub- und intracoelotheliale Lage im Areal des prospektiven Mitteldarmes (Abb. 9). Es ist an dieser Stelle eine deutliche Erhöhung des Coelomepithels an der dorsolateralen Außenwand des Dottersackes zu sehen (Abb. 9, 29 a), und innen markiert ein erhöhtes Epithel den künftigen Darmabschnitt (Einschnürungsstelle). Dieses besondere zylindrische Coelothel mit dem darunterliegenden Mesenchym - beide ALP-positiv - stellen aller Wahrscheinlichkeit nach das erste morphologische Substrat des Keimdrüsenfeldes von Felix (1906) dar. Es flacht sich zu diesem Zeitpunkt zur Coelombucht hin noch

¹ Von hier nach caudal sind dorsales Darmdach mit Chorda (epitheliale Chordaplatte) und Neuralrohr noch verbunden, nach cranial schaltet sich die Chorda aus dem Darmdach aus.

² Es soll an dieser Stelle darauf hinverwiesen werden, daß eine epitheliale Lokalisation nur in der Nähe der späteren Kloakenmembran sowie der Buccopharyngealmembran eingenommen wird: Auch in entgegengesetzter Richtung findet man im Epithel der Schlundtaschen potentielle PGC (Abb. 12); diese Lokalisationen sind beim Menschen Prädilektionsstellen von Teratocarcinomen (Heath 1978, Moore 1990).

deutlich ab; später wird es sich um die Coelombucht herumschlagen und die Gonadenleiste bilden (Abb. 14 a).¹ Im flachen Mesothel der ventromedialen Urnierenvorwölbung, dort wo später die Gonadenanlage einmal lokalisiert sein wird, sind aber bereits jetzt PGC zu finden (Abb. 9 b, 11).

Cranial der vorderen Darmforte sind weniger potentielle PGC zu finden. Sie liegen verstreut im periaortalen Mesenchym (Abb. 11).

Auffallend ist eine Konzentration ALP-positiver potentieller PGC im entodermalen Epithel und im periarteriellen Mesenchym der 2. und 3. Schlundtasche (Abb. 12).

Gelegentlich werden auch intravasale potentielle PGC in verschiedensten viszerale Gefäßen der Embryonen angetroffen. Auffällig werden sie aufgrund der Kapillardichte besonders im Riesenglomerulum der Urniere. Querschnitte zeigen hier auch manchmal mehrere PGC im flachen Coelothel und darunterliegenden Mesenchym der ventrolateralen Urnierenvorwölbung (laterale Coelombucht), obwohl Keimzellen weder im viszerale Mesoderm des Darms und der medialen Coelombucht noch in der ventromedialen Splanchnopleura der Urniere in derselben Schnitthöhe zu finden sind. Ein eher seltener Fund ist die Präsenz ALP-positiver Zellen in der Somatopleura der Lateralfalten.²

¹ Der Vergleich dieser ALP-positiven Zone (Palisadenblastem) des dorsalen Dottersackwandabschnittes (prospektiver Mitteldarm, Abb. 29 a) mit dem ALP-positiven Gonadenblastem der Gonadenleiste (Abb. 20 b) zeigt eine gewisse Ähnlichkeit und dokumentiert die demaskierende Bedeutung von Lektinen.

² Diese auffälligen Lokalisationen werden von Niewkoop und Sutasurya (1979) auch bei Urodelen gefunden. Ihr Zustandekommen wird durch eine zeitliche Interferenz von Darmbildung und Coelomentstehung erklärt: Die PGC sollen bereits vor der Trennung von Splanchnopleura und Somatopleura im Mesoderm des prospektiven Seitenplattenmesoderms durch einen epigenetischen Prozess alloziert werden. Während diese Autoren die Vögel zum sog. Anurentyp zählen, werden Mammalier dem Urodelentyp zugerechnet: Keimzellen entstehen hier ontogenetisch sehr spät durch Induktionsprozesse (Vannemann 1917). Als Konsequenz einer Position von Keimzellen in der Somatopleura wird von den Autoren eine Migration der PGC von lateral nach medial zur Gonadenanlage (nicht über das dorsale Mesenterium) angenommen.

3.2.3 Stadium der Gonadenleiste

Bei 27 - 31 Tage alten Embryonen (Abb. 13) mit einer Länge von 7 bis 11 mm ist bereits eine deutliche Gonadenleiste entwickelt. Ihr Areal verdickt sich am ventromedialen Aspekt der Urniere auf deren ganzer Länge und hebt sich zunehmend ab. Eine deutlich erhöhte MIB-1-Aktivität (Abb. 14 a) läßt auf kurze Zellzyklen und schnelle Proliferationsraten des zwei bis mehrschichtigen zylindrischen Gonadenleistenepithels schließen. Zwischen diesem und dem darunterliegenden Mesenchym, dessen periphere Zellschicht ebenfalls eine erhöhte Mitoseaktivität (MIB-1) zeigt (Abb. 24), ist eine relativ breite basalmembranähnliche Matrix deponiert. Ihre Anwesenheit bleibt auf die Gonadenleiste beschränkt und fehlt unter dem benachbarten flachen und einschichtigen Coelothel. Die basalmembranähnliche Matrix enthält Heparansulfat (Abb. 15, 20 c) und Laminin, reagiert positiv mit WFA (Abb. 16) sowie auch deutlich mit AChE (Abb. 30) und BuChE. Das Gewebe zwischen dieser basallaminaähnlichen Matrix und dem Mesonephros besteht aus sinusoidalen Ästen der Subkardinalvene und einem dichten Gefüge besonderer mesenchymalen Zellen, die eine moderate Reaktion mit WFA (Abb. 16) und einem Antikörper gegen LNGFR (Abb. 34 a) zeigen. In cranio-caudaler Richtung zeigen die Gonadenleisten eine etwas gekrümmte Form. Ihre cranialen und caudalen Enden bedecken noch den lateralen Aspekt des dorsalen Mesenteriums, sowie die Coelombucht mitsamt Teilen der medialen Urnierenvorwölbung. Der zentrale Teil der Gonadenleiste ist bereits nach lateral positioniert und liegt, wie später die Gonadenfalte, exklusiv dem ventromedialen Teil des Mesonephros auf. Diese zentrale Portion weist die höchste MIB-1-Aktivität (Abb. 14 a) auf sowie die umfangreichsten Ablagerungen einer nirgendwo sonst im

embryonalen Gewebe beobachtbaren basalmembranähnlichen Matrix mit AChE-Reaktion (Abb. 30).

Am cranialen Ende der Gonadenleiste (rete ridge nach Burns 1941) liegen putative PGC vorzugsweise in der Tiefe, nahe der Bowman'schen Kapsel des Riesenglomerulums (Abb. 17). An dieser Stelle der Kapsel entspringt die ALP-positive gemeinsame Blastemwurzel von Gonade und Interrenalorgan,¹ die sich rasch aufteilt: Der mediocraniale Anteil stellt sich als Primordium der Nebennierenrinde heraus (Abb. 17, 27), der laterale Zweig ist zusätzlich AChE-positiv (Abb. 31, 41) und erstreckt sich in die Gonadenleiste hinein. In diesem Gebiet und weiter caudal können ALP-positive putative PGC, die in diesen Blastemsträngen oder in unmittelbarer Nähe liegen, nicht mehr zuverlässig identifiziert werden. In diesen Fällen ist die Anwendung PGC-charakterisierender Lektine (WGA, WFA, STA) unabdingbar.²

Weiter caudal sind die putativen PGC in der Gonadenleiste vorwiegend im dichtgelagerten Mesenchym zwischen Mesonephros und Coelothel zu finden. Ab der zentralen Region und in der caudalen Portion der Gonadenleiste nehmen die putativen PGC vorzugsweise eine subcoelotheliale Position ein und liegen dort in engem Kontakt mit Komponenten der gut ausgebildeten basallaminaähnlichen Matrix (Abb. 14 b, 16).

Eine geringe Anzahl weiterer potentieller PGC sind wiederum im Gebiet der Kiemenbögen, im Lumen verschiedener intraembryonaler Gefäße sowie in der Dottersackwand, weit vom Embryo entfernt, zu finden.

¹ Beide Blasteme sind beim Rind mit ALP zeitgleich um den 30. Tag p.i. darstellbar. Mit histologischen Methoden wird das Interrenalblastem in der Regel zeitlich vor dem Gonadenblastem identifiziert. Upadhyay und Zamboni (1982) datieren z.B. beim Schaf die Entstehung der primären Nebennierenrinde auf den 24. Tag p.i., des Gonadenblastems auf den 28. Tag p.i.

² Der Vergleich von Abb. 9 a mit Abb. 29 a zeigt, daß Lektine in ALP-positiven Arealen des Keimdrüsenfeldes bereits schon früher (23. Tag), vor der Ausbildung einer Gonadenleiste, potentielle PGC demaskieren können.

Bedeutend größere Zahlen sind in der Leberanlage sowie im dorsalen Mesenterium zu ermitteln und erfordern eine besondere Beachtung.

Eine große Anzahl ALP-positiver potentieller PGC wird in der Leber sowie im Nebenmesenterium, das die Bursa omentalis bilden hilft und die Leber an das Septum transversum fixiert, gezählt (Abb. 18). Ein beträchtlicher Teil dieser am Sinusendothel oder zwischen den Leberzellen liegenden ALP-positiven Zellen reagiert auch positiv mit WFA, VVA, CAA, DBA (Abb. 26 a) und SBA, aber nicht mit WGA oder STA.

Das elongierte dorsale Mesenterium von Mitteldarm und Hinterdarm (Abb. 19) ist eine weitere regelmäßige Lokalisation ALP-positiver putativer PGC, die allerdings hier mit allen 12 Lektinen positiv reagieren. Die Verteilung von PGC innerhalb des beim Rind auffallend langen Mesenteriums ist jedoch nicht gleichmäßig. Nur in einer kurzen Strecke im Bereich des Mitteldarms sind die PGC auf ganzer Länge des Mesenteriums zu finden. In den meisten Schnitten sind die putativen PGC in der Mesenterialwurzel in der Nähe der medialen Coelombucht und periaortal, (besonders ventrolateral) sowie unmittelbar um das Darmrohr konzentriert; im langen Mesenteriumabschnitt dazwischen sind dann keine PGC zu finden.

3.2.4 Stadium der Gonadenfalte

Die indifferente Gonade 32 - 40 Tage alter Embryonen wird als Gonadenfalte bezeichnet, weil sie sich vom ventromedialen Aspekt der Urniere am 32. Tag abfaltet und dadurch ein spindelförmiges Aussehen mit anfangs breiten Verbindungszonen zum Mesonephros besitzt (Abb. 20). Diese Verbindung differenziert sich bei älteren Embryonen dieses Zeitraums zu einer dünnen mittleren Portion, dem späteren eigentlichen

Mesogonadium¹, während cranial und caudal hiervon breite Verbindungen als Pedunculi erhalten bleiben. Der Strang aus ALP-positivem Gewebe, der bereits in der Gonadenleiste jüngerer Embryonen sichtbar war (Abb. 17), ist jetzt elongiert und verbreitert und nimmt, von der Kapsel des Riesenglomerulums der Urniere ausgehend, die ganze Länge der Gonadenfalte ein (Abb. 28 b). Der craniale Anfang dieses ALP-positiven Areals liegt im cranialen Pedunculus (Hilus) und zeigt Verbindungen sowohl zur Bowman'schen Kapsel einschließlich ihrer Septierungen als auch zum ALP-positiven Blastem des Interrenalorgans (Abb. 27), welches bereits von zellulären Abkömmlingen der Neuralleiste tangiert bzw. durchsetzt wird. Dünne ALP-, Laminin- und WFA-positive Gewebsstränge verbinden in diesem Bereich das Gonadenblastem auch mit der Coelomhöhle und werden als Nephrostomalkanälchen interpretiert (Abb. 27, 32, 33, 41, 43, 55, 59). Ab der Zeit der Gonadenfalte bindet WFA selektiv an bestimmte Zellen des Gonadenblastems (Abb. 28, 33, 54, 55). Das Coelothel und mesenchymale Bereiche des Hilus aber auch der cranialen Hälfte der indifferenten Gonade bleiben ALP-negativ (Abb. 27); das übrige zentrale Gewebe ist ALP-positiv (Abb. 21 a). Das Aussehen der caudalen Gonadenhälfte ändert sich mit zunehmendem Alter: In jüngeren Embryonen ist das gesamte Organ homogen ALP-positiv (Abb. 20 b, 21a). Gegen Ende der indifferenten Periode kann man einen kontinuierlichen Rückgang der ALP-Reaktion beobachten (Abb. 28 b). Coelothel und subcoelotheliales Gewebe werden jetzt auch hier negativ. Zeitgleich werden an der mesogonadalen Gonadenperipherie auf ganzer Länge polymorphe tiefergelegene Areale ALP-negativ (Abb. 28 b). Diese negativen Bezirke werden vorwiegend um sich formierende Blutgefäße herum gefunden und fusionieren mit dem bereits vorhandenen

¹ Der Begriff Meso ist normalerweise der Verbindung von einem Organ und der Körperwand vorbehalten. Das Mesogonadium verbindet zwar Gonade und Urniere bzw. deren Relikte, also zwei Organe, ist aber als Ausdruck etabliert.

subcoelothelialen ALP-negativen Gewebe. Dort wo das Gonadenblastem ALP-positiv reagiert, ist eine Identifizierung der ebenfalls ALP-positiven Keimzellen unmöglich. Ein vergleichbares Problem ergibt sich bei der Durchführung der AChE-Reaktion, bei der ebenfalls Blastemkern und PGC dieses Enzym in gleicher Intensität produzieren. Nur eine Doppelinkubation mit NADPH-TRed kann hier die PGC vom Blastem abgrenzen (Abb. 31). Die ohnehin nur moderate AChE-Reaktion der PGC ist erst ab dem 30. Tag p.i. zu finden. Zehn Tage später ist sie im Hoden bereits wieder durch eine rinderspezifische kräftige AChE-Positivität der Präsertolizellen überdeckt und für die Identifizierung von PGC ungeeignet. Aus diesem Grund ist die Lektinhistochemie beim Rind (WFA, WGA, STA) die Methode der Wahl zur Identifizierung von PGC in der indifferenten Gonade und darüber hinaus (Abb. 22, 23, 28 a, c). Mit ihr kann gezeigt werden, daß die PGC der indifferenten Gonade generell in der äußeren Peripherie des Organs und nur in geringen Mengen in zentralen Arealen lokalisiert sind. Eine geringe Zahl ist im Hilusbereich zu finden, die meisten liegen caudal und abmesogonadal. Genau dort ist eine starke Zellproliferation mit MIB-1-IR nachzuweisen (Abb. 24). Diese proliferationsaktive Coelothelschicht wird durch eine MIB-1-negative Schicht von einer zweiten Zone hoher MIB-1-Aktivität getrennt, die exakt das Areal kennzeichnet, wo ALP-positive und -negative Blastemkomponenten durchmischt sind. Der MIB-1-negative Raum ist durch Zellarmut charakterisiert und enthält eine große Anzahl von Matrixkomponenten, die mit WFA, Laminin und Heparansulfat reagieren. Eine deutliche AChE (bzw. BuChE)-Aktivität dieses definierten subcoelothelialen Areals ist besonders hervorzuheben, da normale Basalmembranen sonst nie diese Reaktionen zeigen. Die Mehrzahl der PGC sind in engem Kontakt mit diesem Matrixmaterial zu finden (Abb. 23c), liegen aber auch darüber im Coelothel oder unterhalb im Mesenchym, d. h. in beiden proliferationsaktiven Zonen. Bei der passiven

Verlagerung einzelner Keimzellen ins Gonadeninnere dient dieses Matrixmaterial offenbar als Leitschiene, die von Proliferationssträngen des Coelothels aufgebrochen und mitgenommen wird (Abb. 25).

Perigonadale und extragonadale PGC sind bei Embryonen mit indifferenten Gonaden regelmäßig zu finden (Abb. 21 b). Diese Zellen sind ALP-positiv, und viele von ihnen reagieren auch mit Lektinen, entweder mit der kompletten Batterie aller 12 einschließlich WGA und STA (putative PGC im dorsalen Mesenterium und in der Coelombucht; Abb. 22) oder mit einer limitierten Anzahl von Lektinen.

Die Zahl der potentiellen PGC im Leberprimordium hat zugenommen und stellt trotzdem nur einen sehr geringen Teil der dort vorhandenen ALP-positiven Zellen dar. ALP-, WFA- und STA-positive Zellen sind auch wieder in Blutgefäßen, im paraaortalem Gewebe und in der Nachbarschaft des Rückenmarks¹ im Differenzierungsbereich der Somiten nachweisbar.

Eine Häufung ALP-positiver Zellen, die sicher nicht alle nur potentielle PGC sind, ist bei sagittal geführten Schnitten axial im dorsalen Körperwandmesenchym und besonders im Kopfmesenchym² (Mundbodenbereich) auch in diesem Stadium auffällig.

¹ Experimentelle Untersuchungen an Kröten zeigen, daß die attraktive Potenz des Somitenmesoderms auf Keimzellen durch Zellen der Neuralleiste verstärkt wird (Gipouloux et al. 1992).

² Intravasale PGC von Hühnerembryonen siedeln sich nach Resektion der Gonadenregion vorwiegend im Kopfmesenchym ab (Nakamura et al. 1991). Offensichtlich sind zwei Prädispositionsstellen für PGC vorhanden, die möglicherweise mit dem cranialen und caudalen Organisationszentrum von Drews (1993) korrelieren. Im Rinderembryo nehmen PGC ebenfalls nur cranial und caudal in der Nähe der Membranen eine besondere, nämlich epitheliale Position im Entoderm ein. Teratocarcinome treten vorwiegend in diesem Bereich auf (Heath 1978; Moore 1990). Nach Vannemann (1917) ist beim Armadillo für die Allokation der Keimzellen der induzierende Kontakt von ento- und ektodermalem Gewebe, wie er in der Rachen- bzw. Kloakenmembran geschieht, ursächlich. Die Ausbuchtungen im Areal dieser Membranen (Rathke'sche Tasche, Seessel'sche Nebentasche, Allantois) sind nicht zufällig polar: Der Primitivstreifen als verlängerter Blastoporus verspannt Urmund und Neumund und ist die morphologische Basis der funktionellen Hypophysen- Gonaden- Achse. Die therapeutische Beeinflussbarkeit des oronasalen Raumes durch vaginale Akupunktur nach Buchheit (1987) wird durch diesen ontogenetischen Kontext erklärt. Auch die parasymphatischen Kernareale im ZNS zeigen bekanntlich eine craniosacrale Polarität.

Funde einzelner PGC in Nephrostomalkanälchen und ihren Öffnungen zum Coelom sind ebenfalls keine Seltenheit (Abb. 33).

3.2.5 Stadium nach der Gonadendifferenzierung

Über den Zeitpunkt der geschlechtlichen Gonadendifferenzierung beim Rind findet man in der Literatur unterschiedliche Angaben. Es ist dies sowohl sachlich als auch technisch begründet. Zum einen sind bereits bei Blastozysten von 8 Tagen vollkommen verschiedene Entwicklungsstufen zu beobachten (eigene Beobachtung). Auch Rüsse (1991) findet bei 14 Tage alten Embryonen Längen von 1 mm bis 6 cm. Ein variables Wachstum boviner Embryonen in den ersten drei Wochen p.i. wird auch von Wathes et al. (1997) gefunden und als eine Funktion von Ovar (Verhältnis von Progesteron und Östrogen) und dem Insulin-like Growth Factor (IGF)-System begriffen. Beide Parameter beeinflussen über die metabolische und sekretorische Aktivität von Eileiter und Endometrium das embryonale Wachstum. Sie werden ihrerseits bestimmt von der Energiebalance resp. der Ernährung des Muttertieres¹ (Wathes et al. 1997). Diese Befunde erklären auch die Angaben von Shemesh (1980), die eine geschlechtliche Differenzierung boviner embryonaler Gonadenprimordien aufgrund morphologischer Kriterien erst um den 45. Tag (45 ± 3 Tage = 3,3 - 4,1 cm SSL) für möglich halten. Nach Gier und Marion (1970) findet sie bereits am 41. Tag statt. Rüsse (1991) hält weibliche und

¹ Annähernd 30 % aller bovinen Embryonen werden während der ersten drei Wochen dadurch verloren, daß diese Bedingungen nicht optimiert sind: Ein unterentwickelter Trophoblast sezerniert nur geringe Mengen an Trophoblast Interferon_{tau} (TIF_τ), die nicht ausreichen, um die Entwicklung des Oxitocinrezeptors, der sich am 16. Tag des Zyklus im Endometrium bildet, zu verhindern. Deshalb kommt es über die an diese Rezeptorenentwicklung gekoppelte Prostaglandin F_{2α}-synthese zur Luteolyse mit nachfolgendem Abort (Wathes et al. 1997).

männliche PGC für Induktoren der geschlechtlichen Differenzierung¹, die zwischen 40. - 42. Tag (2 - 3,5 cm) geschieht. Schrag (1984) sieht bei 39 Tage alten Rinderembryonen (2 cm SSL) mit histologischen Methoden die Bildung einer Tunica albuginea und eine Aggregation der Präsertolizellen. Eine zusätzliche Unsicherheit bei der Altersbestimmung resultiert aber auch daraus, daß Altersschätzungen beinahe ohne Ausnahme auf SSL-Messungen beruhen. Da die zunehmende Krümmung des Embryos in den Fruchthüllen wesentlich die Messungen beeinflusst, ist der wahre Entwicklungszustand nach unserer Erfahrung nur über den Differenzierungszustand geeigneter Strukturen (z. B. Rückenmark, Somiten usw.) in Verbindung mit dem Besamungszeitpunkt genauer eingrenzbar.

Eine rinderspezifische, kräftige AChE-Reaktion der Präsertolizellaggregate (Abb. 36, 45, 46) erlaubt uns bereits zwischen dem 38. und 42. Tag eine morphologische Differenzierung der bis dahin indifferenten Gonade. Diese enzymatische AChE-Reaktion ist vom Zeitpunkt ihres ersten Auftretens an für die Präsertolizellen (und für die Sertolizellen des adulten Bullen) charakteristisch (Abb. 47, 48). Die plattenartigen Aggregationen (4 - 6 Zellagen) differenzieren sich in der Peripherie des dezent AChE-positiven Gonadenblastems (Abb. 45, 47) unmittelbar unter einer WFA-positiven Mesenchymschicht, die als prospektive Tunica albuginea unter einem jetzt abgeflachten Coelothel liegt (Abb. 54, 55). Die Platten konvergieren zentripetal, wo sie in dünne Stränge (1 - 3 Zellagen) übergehen, die mit dem Reteblastem in Verbindung stehen. Der gleichzeitige Beginn einer Tunicabildung kann aufgrund der

¹ Bei Vögeln ist die Lokalisation der PGC in Cortex oder Medulla von entscheidender Bedeutung für die Gonadendifferenzierung zu Ovar bzw. Hoden. Die Bedeutung von Keimzellen für die Sexdetermination ist aber bei Mammaliern umstritten. Von Rüsse (1991) wird sie anerkannt. Gillman (1948) sieht bei menschlichen Embryonen in synchronen geschlechtsspezifischen Veränderungen der Adrenalorgane den entscheidenden Faktor für die geschlechtliche Gonadendifferenzierung. Ein ursächlicher Zusammenhang von Keimzellen und Zyklusvorgängen im „embryonalen Organ Ovar“ (Mossmann 1973) ist jedenfalls unumstritten.

hodentypischen subcoelothelialen Vaskularisation¹ bereits unter der Lupe am unpräparierten Hoden beobachtet werden (das gleichaltrige in dieser Hinsicht gefäßlose Ovar ist zudem immer deutlich kleiner). Durch die starke AChE-Positivität der Präsertolizellen wird die schwache AChE-Aktivität der PGC in diesen Platten überdeckt. In großer Anzahl sind PGC jedoch anfangs noch (40 - 60 Tage p.i.) in der Mesenchymschicht der prospektiven Tunica albuginea mit der kombinierten AChE-NADPH-TRed-Reaktion zu sehen (Abb. 45).

Eine Identifizierung der PGC mit der ALP-Reaktion im Hoden von bis zu etwa 45 Tagen alten Embryonen (ca. 3,2 cm SSL) ist ebenfalls nur in der prospektiven Tunica albuginea möglich. Aber auch hier wird sie an manchen Stellen durch eine nun erstmalig auftretende ALP-Reaktion der Gefäßendothelien erschwert. Erst nach dem Rückzug der ALP-Reaktion aus den Präsertolizellen wird eine Demaskierung der ALP-positiven PGC im Gonadeninnern möglich (Abb. 52 b). Die typische ALP-Positivität der Keimzellen, die ab dem 18. Tag die Identifizierung der PGC in Rinderembryonen ermöglicht, kann von da an bis zum 80. Tag (10 - 15 cm SSL) verfolgt werden.² Mit Lektinen (WGA, WFA, STA) wird deutlich, daß sich im Zeitintervall kurz nach der Differenzierung (2 - 5 cm SSL) viele PGC noch in der Region der späteren Tunica albuginea befinden, eine Lokalisation, die der in der indifferenten Gonade entspricht und für die Lokalisation weiblicher PGC typisch bleibt (Rüsse 1991). Vorerst sind nur wenige PGC im peripheren Anteil der Präsertolizellplatten zu finden (Abb. 35). Zunehmend treten PGC (bzw. M-Prospermatogonien) vermehrt

¹ Die A. testicularis verläuft am epididymalen Hodenrand in der Tunica albuginea bis zum caudalen Hodenpol und zieht nach Aufteilung in der Tunica albuginea wieder nach cranial. Im Ovar erreicht die A. ovarica den caudalen Gonadenpol nicht. Sie betritt das Mesovarium und erschöpft sich in der hilären Aufästelung (siehe dazu auch Felix 1911).

² Nach Hilscher (1974) werden beim Menschen ab dem 60. Tag (Keimballenbildung und Beginn der Urnierenrückbildung beim Rind) die PGC zu M-Prospermatogonien, ab dem 80. Tag zu T1-Prospermatogonien. Der 82. Tag wird auch von Rüsse (1981) für das Rind als Meiosebeginn weiblicher PGC angegeben und ein Zusammenhang mit dem Ende der Urnierenrückbildung vermutet.

in den Hodensträngen auch des Gonadeninnern auf. Gleichzeitig nehmen sie in der tunicalen Mesenchymschicht rasch ab (Abb. 37).

Unmittelbar nach dem Sichtbarwerden der Präsertolizellaggregationen mit AChE bilden sich steroidproduzierende Areale im Interstitium¹ aus (Abb. 45, 47), die typisch angeordnet sind (Schrag 1986). Mit 3 β -HSDH, NADPH-TRed² (Abb. 48) und ALP (Abb. 52 b) läßt sich zudem eine deutliche Konzentration dieser Zellen zwischen den reteblastemnahen Hodensträngen nachweisen. Da auch WFA bei Föten bis 15 cm SSL (Abb. 55 a) an interstitielle, vor allem peritubuläre Zellen bindet, ist die Differenzierung der PGC in den genannten Zeiträumen mit ALP und WFA unübersichtlich. Eine Identifizierung mit STA (Abb. 52 a) ist, wie in den vorhergehenden Stadien, durch die gleichzeitige Bindung an Gefäßendothelien ebenfalls nicht immer ganz unproblematisch. WGA, aber auch andere Lektine wie CAA, GSA usw. zeigen die PGC-Verteilung im Hoden am deutlichsten (Abb.37).

Gegen Ende des Beobachtungszeitraumes (80 Tage) verlieren die Keimzellen der Gonade ihre Lektinbindungsstellen für 9 der 12 Lektine. Nur DBA, WFA und VVA reagieren über diesen Zeitpunkt hinaus. Die Lektinbindungskapazität der PGC geht dabei mit dem Eindringen in das Gonadeninnere verloren.

¹ Diese Reihenfolge entspricht auch der von Bitgood et al. (1996) gefundenen Kaskade von Genexpressionen: Entstehung und das Funktionieren von Leydigzellen sind auf die Dhh-Expression von Präsertolizellen angewiesen.

² Die NADPH-TRed- Reaktion embryonaler Strukturen ist im Untersuchungszeitraum auf wenige Zelllinien beschränkt. Gonadenblastem der indifferenten Gonade, Nebennierenrindenblastem, einige Neuronenareale des ZNS sowie periphere Ganglienzellen (Darm), Gefäßendothelien sowie bestimmte Tubulusabschnitte von Urniere und Nachniere reagieren mehr oder weniger deutlich. Eine besonders kräftige Reaktion zeigen immer bestimmte interstitielle Zellen von Hoden und Ovar sowie Zellen der Nebennierenrinde nach der geschlechtlichen Gonadendifferenzierung. Nur diese Zellen erweisen sich bei der Überprüfung mit 3 β -HSDH als steroidproduktiv. Eine Ausnahmestellung kommt der Schilddrüse zu. Neben einer kräftigen ALP-Reaktion einzelner Zellen des Ductus hypoglossus sowie des wabenartigen Schilddrüsenprimordiums zeigen diese Zellen eine starke NADPH-TRed- Reaktion bereits vor der Gonadendifferenzierung, die mit 3 β -HSDH negativ ist. Eine Überprüfung der NADPH-TRed mit 3 β -HSDH ist deshalb immer unbedingt erforderlich.

Ein seltener Fund sind PGC in und um das Reteblastem. Diese Struktur ist im Hilusbereich des Hodens ALP-, AChE- und WFA-positiv und kann zudem ab dem 42. Tag (2,1 cm SSL) durch eine beim Rind spezifische LAP-Positivität bei beiden Geschlechtern (Abb. 40) als parazentraler Kern des Gonadenblastems selektiv identifiziert werden. Diese besondere enzymatische Reaktion ist beim Rind auf Organe des intermediären Mesoderms beschränkt (Strukturen von Meso- und Metanephros, Reteapparat) und erlaubt bei systematischer Anwendung eine Darstellung von Reteherkunft und Reteontogenese. Die histochemische Abgrenzung von Rete testis bzw. Rete ovarii und deren Ausdehnung im Urogenitaltrakt ist mit LAP noch im adulten Hoden (Wrobel und El Etreby 1971) bzw. Ovar (unveröffentlicht) möglich.

Das Ovar soll nach Ohno et al. (1977) und Wachtel et al. (1975) bei Fehlen des Y-Chromosoms konstitutiv, gleichsam als Verlängerung der indifferenten Gonadensituation, entstehen. Diese Morphodynamik trifft nur auf Spezies (Maus, Ratte, Hamster) mit einem Modus einer Meiose zu, die unmittelbar auf die Gonadendifferenzierung erfolgt (immediate meiosis). Bei Spezies mit verzögerter Meiose (delayed meiosis: Rind, Mensch, Kaninchen) werden unmittelbar nach der geschlechtlichen Differenzierung ein Cortex und eine Medulla gebildet, und im Zeitraum bis zum Beginn der Meiose werden beträchtliche Mengen Östrogen synthetisiert. Beim Rind wird eine nennenswerte Östrogensynthese vor der Meiose kontrovers beurteilt. Shemesh et al. (1978) bejahen, Rüsse (1991) verneint sie.

Die charakteristische und ovartypische Gonadenmorphologie wird bereits durch das Fehlen einer tunicalen Vaskularisierung um den 40. Tag bei Lupenbetrachtung auffällig. Auf dem Querschnitt erhält das Ovar, bedingt durch den länglichen Hilus, ein zunehmend pilzförmiges Aussehen. Zudem ist ein gleichaltes Ovar immer um ca. 25% kleiner als ein Hoden. Mit den von uns angewandten histochemischen Markern lassen sich

charakteristische Merkmale erfassen, die das Ovar von Anfang an vom Hoden unterscheiden. Gemeinsam bleibt beiden Gonaden die Reaktion des Gonaden- bzw. Reteblastems mit ALP, AChE, WFA resp. LAP, auch wenn die Kinetik der einzelnen Reaktionen unterschiedlich ist: Die ALP zieht sich z. B. beim Ovar aus dem Interstitium zurück und persistiert in den Prägranulosazellen¹; dadurch sind die ALP-positiven PGC maskiert bzw. kaum davon zu differenzieren.

Die meisten PGC sind im Cortex lokalisiert, der durch eine subcorticale vaskularisierte Bindegewebsschicht von der Medulla getrennt ist (Abb. 39, 50, 51). Eine subcoelotheliale Basalmembran sowie eine Tunica albuginea sind zu dieser Zeit noch nicht ausgebildet. Ein hohes stellenweise mehrschichtiges Coelothel liegt dadurch direkt einer Keimzellschicht auf, die ab 3,2 cm SSL² bereits eine deutliche Eingliederung in Keimballen (Abb. 56, 58) erkennen lässt (Abb. 56, 58). Die darunter liegende subcorticale Bindegewebsschicht ist stark vaskularisiert und wird von Zellstraßen dezenter ALP-Reaktion überbrückt.³ Mit Lektinen wird die wirkliche Zahl der PGC in den Keimballen des Ovarkortex darstellbar

¹ Die von Gropp und Ohno (1966) aufgrund der Persistenz der ALP-Aktivität von Interstitialzellen des Hodens und der Prägranulosazellen des Ovars eingeforderte Homologie zwischen beiden Zellarten mit dem Postulat einer gemeinsamen Herkunft ist problematisch.

² Rüsse (1989) gibt eine erste Keimballenbildung beim Rind mit gleichzeitigem Auftreten von Interzellularbrücken bei einer SSL von 5,5 cm = 64 Tagen an; diese rechtfertigen den Begriff Oogonien ab diesem Zeitpunkt. Wartenberg (1982) und Motta (1997) sehen beim Humanfötus ebenfalls eine Keimballenbildung um den 60. Tag zeitparallel zu einer plötzlichen mitotischen Aktivität der PGC beider Geschlechter, die dadurch im Hoden als M-Prospermatogonien bezeichnet werden. In diesen Keimballen findet jedoch nicht sofort die Bildung von Interzellularbrücken statt; ein intermediärer Typ der PGC (Präoogonien) wird beschrieben. Erst kurz vor dem Eintritt in die Prophase der Meiose findet eine Synchronisierung der Mitosen (erkennbar durch identische Chromosomenkonfigurationen) statt, deren Anzahl spezieskonstant (beim Rind 4) ist und mit der Bildung von Interzellularkanälen einhergeht. Erst ab diesem Zeitpunkt (ca. 70 Tage) wird von diesen Autoren der Begriff Oogonie verwendet.

³ Diese Kontaktzonen bleiben im langgezogenen Hilusbereich erhalten; dort ist die subcorticale Zone sehr schmal, Keimballen und Markstränge (medullary cords bzw. intragonadales Rete) sind hier - entgegen Rüsse (1983) - in Kontakt (Abb.58). Nach Byskov und Hoyer (1988) ist dieser Kontakt für die Meioseinduktion notwendig. Prägranulosazellen sollen ebenfalls - wenigstens zum Teil - (Wartenberg 1989) aus diesen Retezellen rekrutiert werden. Die Beschränkung des Kontakts beider Strukturen auf die Hilusregion beim Rind ist erklärungsbedürftig.

(>100/Schnitt). Transversalschnitte mit STA, WFA und WGA (Abb. 53, 54) zeigen aber auch in der Medulla, und zwar im Übergangsbereich von Reteblastem und Marksträngen (intragonadales Rete, medullary cords) immer eine relativ große Anzahl (>20/Schnitt) von PGC, die halbkreisförmig einem steroidproduktiven Bereich (Abb. 39, 49) aufliegen (bereits bei 3,1 cm SSL = 45 Tagen).¹ Steroidproduzierende Zellen sind im gesamten Zeitintervall (3,3 - 8 cm SSL) der „aktiven Phase“ nach Shemesh (1980) enzymhistochemisch nachzuweisen. Zunehmend breiten sie sich in dieser Phase als flächenartige steroidproduktive Areale im Raum der Markstränge aus (Abb. 50). Die rudimentäre AChE-Reaktion einzelner Zellen dieser Markstränge (Abb. 51) verweist auf die Homologie mit den Präsertolizellen. Die ovartypische Zonierung des frühen Rinderovars mit der Zweischichtung der Keimzellenanordnung, sowie deren Beziehung zu den Blastemen ist beim Vergleich der Reaktionen mit Laminin, AChE-NADPH-TRed, 3 β -HSDH und ALP sowie den verschiedenen Lektinen der Abb. 38, 39, 44, 49, 50, 51, 53, 58, von denen einige aus konsekutiven Schnittserien stammen, besonders deutlich zu sehen.

¹ Diese medullären PGC werden auch beim Menschen (Wartenberg 1989; Motta 1997) beschrieben; eine Atresie, Apoptose bzw. Follikelbildung wird diskutiert. Eine Exfoliation, wie sie von Motta (1997) als zusätzlicher Mechanismus der bekannten fötalen Diminution kortikaler Keimzellen im Ovar des Menschen gefunden wird, dürfte für medulläre Keimzellen nicht zutreffen. In das Coelom könnten medulläre Keimzellen jedoch retrograd über rete-tubale Anastomosen (RTC) gelangen. Obwohl Beobachtungen verschiedener Differenzierungsstufen der Keimzellen im Rete vorliegen (Mossmann 1973), ist eine Follikelreifung im Retesystem bisher nicht beschrieben worden. Der riskante Follikelsprung, mehrheitlich in der Nähe der RTC bzw. Fimbrien, ist demgegenüber vom Ansatz her eigentlich eine abenteuerliche Variante und bedarf sekundär zusätzlicher Sicherungen (Eiabnahmemechanismus). Die wirkliche Bedeutung der Cortex - bzw. Medullapositionen der Keimzellen zusammen mit ihren Wechselbeziehungen zu steroidproduzierenden Arealen bedarf einer weitergehenden Untersuchung.

4. Diskussion

4.1 Die Bedeutung von Lektinreaktionen für die Identifizierung von PGC

Zuckerverbindungen an Zelloberflächen spielen eine bedeutende Rolle während Wachstum, Differenzierung, Zellmigration und embryonaler Induktionsprozesse. Die Anwendung von Lektinen verschiedener Spezifität an Gewebeschnitten ist eine probate Methode, die üblicherweise angewandt wird, um die Verteilung von Glykokonjugaten in einzelnen Zellen oder in Geweben zu untersuchen. Nach Goldstein und Poretz (1986) werden die meisten Lektine pflanzlicher und tierischer Herkunft in 5 Gruppen eingeteilt.

1. Mannose/Glucose-bindende Gruppe (Vertreter: ConA)
2. N-acetyl-glucosamin-bindende Gruppe (Vertreter: WGA, STA, GSA I)
3. N-acetyl-galactosamin/galactose-bindende Gruppe (Vertreter: WFA, BPA, DBA, SBA)
4. L-fucose-bindende Gruppe (Vertreter: AAA, LTA, UEA I)
5. Sialinsäure-bindende Gruppe (Vertreter: LPA)

Repräsentanten aller 5 Gruppen wurden auf ihre Affinität zu bovinen embryonalen und fötalen Keimzellen überprüft. Obwohl viele der getesteten 28 Lektine mit verschiedenen embryonalen Strukturen - teils sehr spezifisch - reagierten, ergaben nur die folgenden 12 Lektine ein positives Resultat mit Keimzellen: BPA, CAA, DBA, ECA, SBA, GSA I, PTA, STA, SJA, WGA, VVA und WFA.

Diese Lektine gehören ausschließlich zu den Gruppen 2 und 3 der oben genannten Klassifikation, die eine Affinität zu N-acetyl-glucosamin und N-

acetyl-galactosamin/galactose besitzen. Eine exklusive Beschränkung dieser Zuckerverbindungen auf Keimzellen ist allerdings nicht zu beobachten.¹ Nur DBA zeigt in frühen ontogenetischen Stadien eine hochspezifische Affinität zu Keimzellen; alle anderen an Keimzellen positiven Lektine binden zusätzlich und zunehmend auch an andere embryonale Strukturen. Insbesondere differenzieren sie lektincharakteristisch verschiedene Tubulusabschnitte des Mesonephros, sowie Eihäute, Chorda (WFA) oder Gefäßendothel (GSA I, STA).

Die Lektinbindung von Zuckern ähnlicher Zusammensetzung kann von der Konfiguration (α oder β), Lokalisation der spezifischen Sequenzen (terminal oder innen) und der Gewebefixierung stark beeinflusst werden. Dies erklärt auch die unterschiedlichen Reaktionen von Lektinen einer Gruppe. Weiterhin können benachbarte Strukturen das Bindungsverhalten von Lektinen beeinflussen und damit z.B. trotz Anwesenheit des passenden Zuckerrestes negative Resultate hervorbringen. Deshalb ist es immer angebracht, eine größere Anzahl von Lektinen auch für die Untersuchung nur eines Zuckertyps anzuwenden (Walker 1988). Für die routinemäßige Identifizierung boviner embryonaler (putativer und prospektiver) PGC bei seriellen Untersuchungen genügt es - zusätzlich zur ALP-Reaktion - WGA, WFA und STA zu benutzen; man erhält damit die deutlichsten und verlässlichsten Resultate. WFA, WGA und STA-Lektine charakterisieren putative und prospektive PGC in der hinteren Körperregion (Region von Mitteldarm und Hinterdarm). Mit WFA-Lektin erhält man zusätzlich Lektin-positive potentielle PGC in der Leber, die ihrerseits eine Auswahl der ALP-positiven Zellen im Leberprimordium darstellen.

Das Lektinbindungsmuster boviner embryonaler Keimzellen unterscheidet sich wesentlich von aviären PGC, wo Glc/Man-, Gal-gruppen, N-acetyl-

¹ Eine ALP-Aktivität ist beim Rinderembryo ebenfalls nicht auf Keimzellen beschränkt und zunehmend auch in anderen Zelllinien zu finden.

lactosamine und N-N'diacetylchitobiosesequenzen die affinen Bindungsstellen sind (Didier et al. 1990).

Bovine embryonale Keimzellen zeigen allerdings ein Muster, das ähnlich, aber nicht identisch mit dem von Farel et al. (1987) an Ratten-Keimzellen gefundenen Muster ist. Da fucosylierte Mono- und Dipolylactosamin-Carbohydratgruppen an bovinen embryonalen Keimzellen nicht auftreten, konnte der von uns an Mäuse- und Rinderembryonen angewandte monoklonale Antikörper SCC-1 (oder EMA-1), der diese Sequenzen erkennt, beim Rinderembryo nicht positiv reagieren. EMA-1 wurde ursprünglich gegen Karzinomzellen einer Mausmutante konzipiert und später erst als ein geeigneter, „spezifischer“ Marker für Mäuse- und Hühnerkeimzellen erkannt und benutzt (Hahnel und Eddy 1986; Urven et al. 1988). Ein weiterer Antikörper, 4C9, der mit poly-N-acetyllactosamin reagiert und durch α -L-fucosidase und lacto-N-fucopentaose III inhibiert wird, ist ebenfalls spezifisch für Maus-PGC (Yoshinaga et al. 1991). Alle diese Befunde lassen darauf schließen, daß die Carbohydratmuster an den Oberflächen von embryonalen Keimzellen speziescharakteristisch und daher separat für jede Spezies zu klären sind. PGC von Mäuseembryonen binden z. B. auch PNA-Lektin (Maekawa und Nishimune 1985).¹ Dieses hat eine Affinität zu terminalen D-galactosylresiduen, vorzugsweise Gal- β ₁-3 GalNac, (Lotan et al. 1975) und ist bei Mäusen an der Oberfläche der Zellmembran unreifer Thymozyten, präimplantierter Embryonen, embryonaler Carcinomzellen sowie den meisten Differenzierungsstadien der Keimzellen zu finden (Reisner et al. 1976, 1977). Diese PNA-Affinität sowie die Abwesenheit

¹ Eine Zusammenstellung der bisher gefundenen Oberflächenantigene an Maus- PGC geben Viebahn et al. (1998). Die Entwicklung von Antikörpern gegen intracytoplasmatische PGC-Strukturen (Nuage- ähnliche Substanzen), wie sie vom selben Autor (Viebahn et al. 1998) für das Kaninchen vorgestellt wird, ist eine vielversprechende Neuerung. Dabei ist allerdings eine KZ- Spezifität unterstellt, die nicht unumstritten ist (Eddy 1975; Weakly 1976; Niewkoop und Sutasurya 1979, 1981; Eddy und Hahnel 1983).

entsprechender Lektinbindungsstellen an Leydig-, Sertoli- und peritubulären Zellen wird zur Anreicherung von Keimzellen für in vitro-Versuche genutzt (Lotan et al. 1975). Mit PNA konnten wir bei PGC von Rinderembryonen mit der in der Tabelle 2 angegebenen Konzentration sowie der angewandten Fixierung keine Reaktion erhalten. Die PGC von Haussäugetieren sind daher nicht generell durch PNA- identifizierbar, wie es Rüsse und Sinowatz (1991) angeben.¹

4.2 Die Allokation der Keimzelllinie

Der Unterschied im Verteilungsmuster von ALP und Lektinen bei bovinen PGC deutet eine schrittweise Akquisition von typischen Merkmalen der Keimzelllinie an, die abhängig ist von der Zeit (ontogenetische Reife), Lokalisation und induzierter Genexpression (Tab. 3). Sehr wahrscheinlich korrespondiert die Akkumulation ALP-positiver Zellen am caudalen Ende der Keimscheibe eines 18 Tage alten Rinderkonzeptus mit einer Ansammlung von Zellen, die Rubaschkin (1908) bei Kaninchenembryonen vergleichbarer ontogenetischer Reife mit Eosin-Azur anfärbte und bereits als Keimzellen deutete. Aus einem Cluster von etwa 100 ALP-positiver Zellen am caudalen Ende des Primitivstreifens ordnen Ginsburg et al. (1990), Ginsburg (1994) bei der Maus 45 Zellen einer „founder population“ zu. Das Schicksal der übrigen 55 ALP-positiven Zellen ist unklar; ein definierter Überlappungsbereich der „fate maps“ von Blutstammzellen und PGC caudal des Primitivstreifens ist allerdings

¹ Das trifft auch für die Angaben der genannten Autoren bezüglich der ALP zu: Dieses Enzym kann ebenfalls nicht in Keimzellen aller Säugetiere nachgewiesen werden. ALP wird in Keimzellen des Kaninchens (Chretien 1965), der Beuteltiere mit Ausnahme der Wallabies (Ullmann 1997), des Schweins (geschlechtsabhängig; Bielanska-Osuchowska 1965) sowie in bestimmten Mäusemutanten (McGregor et al. 1995) nicht gefunden; in Keimzellen des Huhns in Mengen, die für eine Identifizierung nicht ausreichen (McGregor et al. 1995).

experimentell bewiesen (Ginsburg 1994).¹ In neueren Arbeiten wird die gemeinsame Basis von Keimzelltumoren und hämatologischen Neoplasien von mehreren Autoren thematisiert (Goldman 1985; Nichols et al. 1985; Reynoso et al. 1986; Friedmann 1987; Logothetou-Rella 1996b). Die am Primitivstreifenende zu findenden aggregierten ALP-Zellen repräsentieren offenbar die ersten hämatopoetischen Stammzellen, deren direkte Abkömmlinge in der Allantoiswand (zumindest beim Menschen), im Dottersackmesoderm und im intraembryonalen Mesoderm alloziert werden (Rich 1997). Was die ALP-positiven Zellen in der Dottersackwand eines 18 Tage alten Rinderembryos betrifft, kann es als sicher gelten, daß diejenigen ab einer Distanz von mehr als 100 µm von der caudalen Grenze der 3-blättrigen Keimscheibe entfernt, niemals definitive PGC werden, sondern mit dem schnell wachsenden Dottersack weiter in die Peripherie verlagert werden. Als Konsequenz davon kann man bei 23 bis 25 Tage alten Rinderembryonen ALP-positive Zellen von ähnlichem Aussehen in einer Entfernung von 3 mm zum Embryo in einer Bucht des Dottersackes sehen. Um auszudrücken, daß ALP-positive pluripotente Zellen junger Rinderembryonen nicht nur zukünftige PGC sind, sondern auch die Kapazität besitzen, als hämatopoetische Stammzellen zu fungieren, bezeichnen wir alle PGC als potentielle PGC (pot. PGC), wenn sie nicht mit allen 3 ausgewählten Lektinen (WFA, STA, WGA) reagieren. Wenn PGC sowohl mit ALP als auch mit diesen drei Lektinen reagieren, werden sie als putative PGC bezeichnet (put. PGC). Diese sind auf

¹ Als phylogenetisch interessante Parallele dazu sind Befunde bei Insekten (*Drosophila*) zu werten, wo ebenfalls nicht alle Polargranula enthaltenden Zellen ausschließlich Keimzellen werden (Niewkoop und Sutasuraya 1981). In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, daß bereits Rückert (1899), Schwierigkeiten hatte, sog. Megasphären (Blutstammzellen) von Keimzellen zu unterscheiden, und bei Beards (1900) Untersuchungen an Rochen (*Raja batis*) nimmt dieser Diskussionspunkt einen beträchtlichen Raum ein. Die wenigen Untersuchungen an niederen Vertebraten (Cephalochordaten, Tunicaten) zeigen, daß sich die hier noch segmental angeordneten Gonaden um sog. Hämoblasten entwickeln. Die Keimzellen entstehen aus diesen oder aus Lymphoblasten (Niewkoop und Sutasuraya 1981). Eine Folge dieser in situ-Allokation ist das Fehlen einer Keimbahn. Eine Migration ist nicht notwendig.

definierte Areale bzw. Körpersegmente beschränkt (Tab. 3). Bei 23 - 25 Tage alten Embryonen sind sie in der Höhe von Mitteldarm und Hinterdarm einschließlich Keimfeld und prospektiver Gonadenleiste zu finden. In der Abb. 6 wird deutlich, daß die Allokation der PGC-Vorläuferzellen aus dem Epiblasten (Lawson und Hage 1994) dort stattfindet, wo die Chorda sich aus dem Darm und dem Neuralrohr ausschaltet (siehe auch Witschi 1948). Der induktive Einfluß des Entoderms, der nach Vanneman (1917) sowie Lawson und Hage (1994) als ursächlich für die Allokation vermutet wird, ist durch diesen anatomischen Zusammenhang gegeben; nach caudal zu sind Chorda resp. Primitivstreifen im Schwanzblastem aufgelöst. Es kann angenommen werden, daß die Allokation von Keimzellen aus dem Chorda-Mesodermkomplex erst mit der Bildung des letzten Somiten beendet ist (Hamilton et al. 1972). Damit ist die Anhäufung von PGC/Blut-Stammzellen axial und ventrolateral der Aorta am Ende der 4. Woche hinreichend erklärt: Die extraembryonale Überlappung der „fate maps“ von PGC- und Blutvorläuferzellen axial und caudal des Primitivstreifens liegt nach der Caudalabfaltung intraembryonal, axial und dispersiert nach cranial. Diese von Lawson und Hage (1994) im Mausmodell gefundenen Allokationsbewegungen können unter Berücksichtigung der zeitlichen Differenzen auch beim Rind zur Erklärung der Anhäufung pluripotenter Stammzellen in der Aorta-Gonaden-Mesonephros-Region (AGM-Region) angenommen werden.

„Fate maps“ beschreiben nur die Allokation und nicht die Determination von Zelllinien, die nicht schon während der Gastrulation stattfinden muß, sondern in speziellen Fällen sich erst am finalen Bestimmungsort ereignet (Tam und Behringer 1997). Eine Regionalisierung von Zellschicksalen, wie sie durch die „fate maps“ augenscheinlich wird, ist nur ein Indiz dafür, daß (und wie) Zellen bei der Gastrulation in bestimmte Körperregionen positioniert werden. Individuelle Zellen bleiben dabei flexibel, was ihre

Potenz betrifft (Tam und Behringer 1997). Nur wenn eine derart potente, spezifische Zelle zur richtigen Zeit an den richtigen Ort, die Gonadenleiste, plaziert ist, wird sie zur PGC (Dixon 1994). Die Spezifität allgemein vorkommender, aber auch spezieller (Aktivin, Nodin, Chordin) Wachstumsfaktoren liegt nach Drews (1993) in ihrer zeitlich und räumlich determinierten Expression und wird als Phasenspezifität bezeichnet. Die besondere Bedeutung dieser Phasenspezifität bei der Keimzellenbildung wird bei experimentellen Untersuchungen an Drosophilalarven deutlich (Dixon 1994): nur das termingerechte Erreichen einer genügenden Menge¹ von kompetentem Polplasma am caudalen Pol der Gastrula induziert potentielle PGC bzw. sogenannte Polzellen (die sich aber nicht ausschließlich zu Keimzellen entwickeln); eine Verzögerung der Nukleusmigration in das Polplasma um nur 30 Minuten verhindert bereits ihre Bildung. Auch Mintz und Illmensee (1975) konnten zeigen, daß Stammzellen aus Teratocarcinomen nur in einer geeigneten Umgebung auf normale Wachstums Signale adäquat antworten bzw. ihre Totipotenz realisieren können².

¹ Die Zahl der Zellen (founding population) bzw. die Konzentration von Wachstumsfaktoren ist dabei von nicht unerheblicher Bedeutung: Nach Gurdon (1988) ermöglicht ein „community effect“ einer Zelle ihr Schicksal zu ändern; d.h. Quantität kann dann in Qualität umschlagen.

² Hier zeigt sich erneut, daß die Stammzellenproblematik nicht nur in der Gonadogenese, sondern auch in der Tumorbildung und frühembryonalen Zellentwicklung von grundsätzlichem Interesse ist: Die Totipotenz von Carcinomzellen ermöglicht (bei Injektion in Blastozysten der Maus) Chimären mit funktionierenden Spermien; damit können Nachkommen gezeugt werden, deren Vater ein Teratocarcinom ist (Martin 1987). Die Möglichkeit, Teratome zu bilden ist eine Fähigkeit gewisser embryonaler Zelltypen inklusive PGC. Der Ursprung und die Differenzierung von PGC und von Teratocarcinomen sind, wie das Phänomen der Parthenogenese, eng zusammenhängende Probleme (Heath 1978). Teratocarcinome entstehen aus PGC und/oder aus multipotenten embryonalen, auch parthenotischen Zellen, die dem Einfluß embryonaler Organisation entkommen (Martin 1978). Als kardinale Organisationszentren gelten Kopf- und Schwanzblastem, deren archencephale bzw. spinocaudale Induktoren die Körperachse konstituieren (Drews 1993). Diese Zusammenhänge erklären die Prädispositionsstellen von Teratocarcinomen im Areal der Rachen- (Heath 1978) sowie Kloakenmembran (Moore 1990).

Zwischen 27 und 31 Tagen sind PGC in der Gonadenleiste, aber auch im inzwischen entstandenen dorsalen Mesenterium zu beobachten. Zwischen 32 und 40 Tagen sind sie in der Gonadenfalte in beträchtlicher Anzahl zu finden, aber auch in geringeren Mengen im dorsalen Mesenterium und in der Coelombucht. Die räumlich-zeitliche Verteilung dieser putativen PGC läßt darauf schließen, daß nur ein bestimmter, in unmittelbarer Nähe der indifferenten Gonade befindlicher Anteil putativer Keimzellen den chemotaktischen ($TGF_{\beta 1}$) Einflüssen des Bestimmungsortes unterliegt (Godin et al. 1990, 1991), d. h. auch wirklich prospektive PGC sind. Nur aus diesen werden die definitiven PGC der Gametogenese rekrutiert.

Neuere Untersuchungen bestätigen, daß die definitiven „longterm reconstituting haematopoietic stem cells“ ausschließlich in der AGM-Region (Muller et al. 1994; Sanchez et al.; Medvinsky und Dzierzak 1996, 1997) entstehen, wohingegen hämatopoetische Vorläuferzellen im Dottersack kurzlebig und von begrenzter Kapazität sind (Dieterlen-Lievre et al. 1993, 1997a, 1997b). Putative PGC und paraaortale hämatopoetische Stammzellclone sind zeitweise im selben Areal zu finden, und beide können „multilineage hämatopoesis“ initiieren (Kelemen 1997).¹ Eine „lineage restriction“ von embryonalen Keimzellen findet offenbar erst im spezifischen Mikromilieu der Gonade statt (Labosky et al. 1994); wahrscheinlich sogar erst nach einer bestimmten Zeit, in der organspezifische Differenzierungsschritte induziert werden. Labosky et al. (1994) konnten bei Mäusen experimentell eine irreversible Determination

¹ Ein Indiz dieser Blutsverwandtschaft von Keimzellen sind Funde meiotischer Chromosomenfigurationen in malignen Neoplasien von Blutstammzellen (Logothetou-Rella 1996a). Auch das hämatopoetische Potential von Teratocarcinomen, das Auftreten fötalen Hämoglobins in testikulären Keimzelltumoren sowie die Assoziation von hämalen und germinalen Elementen in Mäusestämmen mit defizientem W locus verweisen zumindest auf gemeinsame Regulationsfaktoren hämatopoetischer Stammzellen, PGC sowie Melanozytenvorläuferzellen (Friedmann 1987).

erst zwischen 12 und 13 Tagen p. c. ausmachen: Bis dahin erlaubt die prospektive Potenz der Keimzellen die Etablierung anderer Zelllinien (EG-cells) in vitro.¹ Das entsprechende Zeitäquivalent beim Rind wäre ca. 80 Tage (Beginn der Meiose). Zu diesem Zeitpunkt finden wir in der männlichen Gonade ein Verschwinden der ALP-Reaktion sowie der meisten Lektinbindungsstellen (ausgenommen für WFA, DBA und VVA) an Keimzellen und konstatieren das Erscheinen eines neuen Antigens, das mit PGP 9.5 nachweisbar ist.

Die Leberanlage von 23 - 40 Tage alten Rinderembryonen enthält eine zunehmende Anzahl ALP-positiver Zellen, die sicher nicht alle potentielle PGC sind. Der Einsatz von bestimmten Lektinen (WFA, VVA, CAA, DBA und SBA) greift davon die potentielle Fraktion heraus. Alle anderen Lektine, also auch WGA und STA, reagieren nicht. Daher werden die lektinpositiven Zellen der Leber definitionsgemäß zu potentiellen PGC gezählt, obwohl sie - vorzugsweise - ein hämatopoetisches Schicksal haben dürften. Denn auch die Leber enthält zu dieser Zeit zahlreiche Vorläufer von Blutzellen einschließlich Stammzellen (Dawood et al. 1990; Thomas 1997).

4.3 Die Relevanz der verschiedenen Translokationstheorien

Aufgrund von Untersuchungen an 25 - 31 Tage alten bovinen Embryonen versuchten Jost und Prépin (1966) sowie Wartenberg (1983) bei einem etwa 30 Tage alten Embryo die Frage zu beantworten, auf welche Weise die embryonalen Keimzellen beim Rind die Gonadenanlage erreichen.

¹ Möglicherweise fällt die von Labosky et al. (1994) nachgewiesene prospektive Potenz der PGC nur unter pathophysiologischen Bedingungen mit ihrer prospektiven Bedeutung zusammen. Die Schnittmenge beider Begriffe könnte individuell verschieden groß sein: Sie beinhaltet den umstrittenen Zeitpunkt der KZ-Lineagerestriktion.

Das Fazit dieser Bemühungen (siehe Einleitung) ist widersprüchlich und nicht einleuchtend. Grund dafür ist sicher einmal die Tatsache, daß wesentliche Ereignisse für die Beurteilung intraembryonaler Keimzellbewegungen vor dem 25. Tag stattfinden. Unsere Beobachtungen an jüngeren Embryonen (18 - 24 Tage) sprechen gegen die Theorie einer aktiven, interstitiellen Migration via dorsalem Mesenterium (Jost und Prépin 1966) aber auch gegen die Theorie einer (ausschließlichen) aktiven, intravasalen Translokation zur Gonadenanlage. Auch nach neueren Befunden (Mc Laren 1994; Gomperts 1994) findet die in unzähligen in-vitro- Versuchen verifizierte aktive interstitielle Migration in vivo nur sehr begrenzt statt: Sie soll nur mehr für die epithelio- mesenchymale Translokation aus dem Darmepithel gelten. In Übereinstimmung mit Witschi (1948) kann diese besondere Lokalisation der PGC im Darmepithel als ein zufälliges Ereignis bei der frühen Darmbildung betrachtet werden, die eher ein Hindernis für PGC auf der „Migrationsroute“ darstellt und keine *conditio sine qua non* ist. Die Basalmembran zwischen entodermalem Dottersackepithel (prospektives Hinterdarmepithel) und visceralem Mesoderm ist am 18. Tag derart delikat, daß sie die Lage in beiden Keimblättern erlaubt. Es ist aber gleichgültig, ob nach der caudalen Abfaltung diese Membran am 23. Tag noch diskontinuierlich ist, lysiert werden muß, oder/und von einem eiabnahmeähnlichen Mechanismus von Coelothelzellen aus dem Darmepithel „gepflückt“ wird, wie es durch Wartenberg (1990) vertreten wird: Durch die abrupte Mesoentwicklung werden bei Rinderembryonen darmnahe PGC aus der AGM-Region schnell und weit nach ventral verlagert, daß sie für eine aktive interstitielle Migration sowieso nicht in Frage kommen. Eine ähnliche rasante embryofugale Wachstumsbewegung ist bei der mesodermalen Umwachsung des beim Rind sehr gut ausgebildeten Dottersacks die Ursache für das Abdriften der PGC in distante extraembryonale Positionen, aus denen eine

amöboide Migration (über Dottersack- bzw. Haftstiel) , wie sie noch von Hinrichsen (1990) beschrieben wird, unwahrscheinlich erscheint. Daß vor allem passive Transportmechanismen eine Hauptrolle spielen (sog. morphogenetische Bewegungen) kann insbesondere durch die Verwendung von MIB, LNGFR und ALP verdeutlicht werden. Wartenberg (1983) war bei einem etwa 30 Tage alten Rinderembryo nicht in der Lage, im bereits extrem langen dorsalen Mesenterium PGC zu identifizieren. Er benutzte allerdings weder ALP noch Lektine. In Übereinstimmung mit Jost und Prépin (1966) hatten wir nie Probleme, ALP-positive und lektinpositive putative PGC im dorsalen Mesenterium von Embryonen etwa gleichen Alters zu finden: Die Verteilung darin ist allerdings wegen der erfolgten Verlängerung des Meso sehr ungleichmäßig und kann nur anhand von Serienschnitten korrekt erfaßt werden. In den meisten Schnitten sind tatsächlich putative PGC nicht in der ganzen Länge des dorsalen Mesenteriums zu finden, sondern meist proximal in der Nähe der Coelombucht und der Mesenterialwurzel konzentriert sowie distal nur in unmittelbarer Nähe des Darmrohres zu beobachten.

In Übereinstimmung mit Wartenberg (1983) kann deshalb angenommen werden, daß die PGC in der Nachbarschaft des Darms und im langen Meso durch aktive interstitielle Migration wohl kaum die beträchtliche Distanz zur Gonadenanlage erreichen können:¹ Die rasche Verlängerung des Mesenteriums, deren Grundlage mitotisch besonders aktive Areale um das Darmrohr darstellen - die Mesenterialwurzel ist inaktiv (MIB, LNGFR, ALP) - translokiert sie eher in die Gegenrichtung.² Aber wir

¹ Vollkommen unüberbrückbar erscheint die Distanz von Dottersack zur Gonade. Die mesodermale Umwachsung des relativ großen Dottersackes beim Rind nimmt früh allozierte PGC sehr weit embryofugal mit. Nur spät allozierte PGC kommen daher durch die caudale Abfaltung intraembryonal-axial zu liegen.

² Eine Affinität der Chordaplatte als spezifischer Teil des dorsalen Darmdaches zu den Keimzellen mag dabei eine Rolle spielen (Snow 1983). Dadurch könnten Keimzellen bei der Entstehung und abrupten Verlängerung des Mesenteriums aus der AGM-Region mitgenommen werden. Eine Einschaltung der Chorda in das Entoderm wurde beim Rind allerdings (wie die Existenz eines canalis neurentericus; siehe aber dazu Legende zu Abb. 6) bisher nicht beschrieben (Michel 1972). Auch bei der Maus soll sie nicht

stimmen nicht mit der Folgerung überein, die Wartenberg (1983) aufgrund dieses Tatbestandes und aufgrund intravasaler Funde von Keimzellen zieht: Nämlich, daß bei bovinen PGC die intravasale Translokation die exklusive Route zur Gonadenanlage darstellt, wie es für Vögel und einige Reptilien nachgewiesen ist (Ginsburg 1994). Die Annahme eines intravasalen Transports boviner PGC vom Dottersack zur Gonadenanlage stützt sich in der Hauptsache auch auf die Untersuchungen von Ohno und Gropp (1965), die PGC des jeweils anderen Geschlechts in der Gonade dizygoter Rinderzwillinge beschrieben. Bislang konnten jedoch bei Zwillingen, die als Embryonen bzw. Föten eine gemeinsame Blutzirkulation hatten, keine überzeugenden Befunde von Keimzellchimärismus erbracht werden (Snow und Monk 1983). Auch wir können eine Anzahl potentieller PGC mit positiver ALP- und WFA-Reaktion im Lumen intraembryonaler Gefäße bei Embryonen und Föten zwischen 25 und 40 Tagen, sogar auch weit über die geschlechtliche Differenzierung hinaus (3,8 cm SSL), finden.¹ In Anbetracht neuerer Funde, die zeigen, daß PGC und hämatopoetische Zellen eine gemeinsame Stammzelle teilen (Friedmann 1987; Pardanaud et al. 1987; Dieterlen-Liévre et al. 1988; Kelemen 1997; Medvinsky und Dzierzak 1997; Rich 1995, 1997) haben die Konsequenzen, die mit der Absiedelung dieser gelegentlichen intravasalen potentiellen PGC verbunden wären und in der Vergangenheit

existieren (Sadler 1998). Nach Langman (1989) wird eine vorübergehende Integration der Chorda in die dorsale Dottersackwand nur beim Menschen und Meerschweinchen, nach Drews (1993) auch beim Igel beobachtet. Der Zusammenhang von pluripotentem Chordamaterial und Entoderm und ihre Bedeutung für die Allokation von Keimzellen ist jedoch offensichtlich: Wie Witschi (1948) beim menschlichen Embryo, so sehen auch wir beim Rinderembryo die ersten pot. PGC im Darmepithel genau an der Stelle, wo sich die Chorda aus dem dorsalen Darmdach (und aus der Neuralrinne, die sich hier schließt) ausschaltet (Abb. 6).

¹ Intravasale Zellreaktionen mit STA und GSA I sind nicht eindeutig, da andere Blutzellen sowie Gefäßendothelien mitreagieren. WGA-Lektin zeigt keine intravasalen Reaktionen.

möglicherweise überbewertet wurden, bedeutend an Brisanz verloren.¹ Aus zwei anderen Gründen erscheint im übrigen eine intravasale Migration vom Dottersack aus - zumindest zur Erklärung der bereits am 23. Tag im prospektiven Gebiet der Gonadenanlage vorhandenen PGC - fraglich: Zum einen sind mit GSA I-Lektin zwar ein Großteil der Blutzellen im Dottersack, jedoch nicht intraembryonal positiv; eine Fusion extra- und intraembryonaler Gefäße kann daher am 23. Tag (entgegen Rüsse 1991) noch nicht erfolgt sein. Zum anderen sind alle jemals im Dottersack gefundenen potentiellen PGC exklusiv ALP-positiv und binden zu keiner Zeit Lektine. Die prospektiven PGC im Keimdrüsenfeld (prospektive Gonadenanlage) des 23 Tage alten Rinderembryos exprimieren aber bereits alle Lektine, die sie als putative oder sogar prospektive PGC ausweisen: Dieser Differenzierungsschritt ist also schon vollzogen. Daraus folgt zwingend, daß die zu diesem Zeitpunkt an dieser Stelle zu beobachtenden PGC weder über aktive interstitielle Migration via dorsalem Mesenterium (das noch nicht existiert), noch über aktive intravasale Migration aus dem Dottersack dorthin gelangt sein können. Bereits mit 23 Tagen sind die Mehrzahl der bovinen putativen PGC intraembryonal in der Wand von Mitteldarm und Hinterdarm, im paraaortalen Mesenchym und im Coelothel der ventralen Urnierenvorwölbung positioniert. Sie befinden sich damit in Positionen, die von Felix (1911) als Keimdrüsenfeld zusammengefaßt wurden. Dieses Areal konkretisiert sich später zur Gonadenleiste.² Fünf Tage früher, bei 18 Tage alten Embryonen, werden potentielle PGC in der caudalen Wand

¹ Die Möglichkeit, daß potentielle, putative, resp. prospektive PGC zusätzlich, ab einem zu klärenden Zeitpunkt, eine zeitlang über den Gefäßweg die Gonade besiedeln können, wäre durch experimentelle Rind/Huhn Chimärenversuche verifizierbar, wie es Yoshinaga et al. (1992) und Nakamura et al. (1991) am Wachtel/Huhn-Modell demonstrieren konnten: ALP-, WFA-, WGA- und DBA- positive PGC wären von den PAS-positiven PGC in der Kükengonade leicht zu unterscheiden.

² Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß beim Rinderembryo wie beim Hühnerembryo die ersten hochprismatischen Coelothelzellen im Keimdrüsenfeld des Darmbereiches gegenüber dem erhöhten Darmepithel auftreten und sich erst später jenseits der Coelombucht auf der ventromedialen Urnierenvorwölbung vorfinden.

des Dottersackes nahe der Grenze zur dreiblättrigen Keimscheibe gesichtet. Diese initiale Verschiebung von PGC von den Positionen im 18tägigen zu den Lokalisationen im 23-tägigen Embryo wird durch die morphogenetischen Bewegungen der Darmbildung und die ontogenetischen Vorgänge beim Übergang der flachen Keimscheibe zum zylindrischen Embryonalkörper bewirkt: Der proximale caudale Teil der extraembryonalen Dottersackwand wird dabei zu Teilen des intraembryonalen Hinterdarms. PGC im Areal der dorsalen Dottersackwand bleiben arretiert (Snow 1983) und sind ab dem Zeitpunkt der Ausschaltung der Chorda aus dem dorsalen Darmdach (Chordaplatte) beobachtbar. Eine derartige passive Translokation früher PGC von einer extraembryonalen Position in die Hinterdarmregion scheint bei allen Säugetieren aufzutreten (Heath 1978; Niewkoop und Sutasurya 1979). Die Dauer dieser Bewegungen sowie auch der Mesodermverschiebungen hängen wesentlich von der Lebensdauer und Produktivität des Primitivstreifens als Grundlage für Mesoderm- und PGC-Allokation ab.¹ Die terminale Bewegung der PGC vom Darmmesenchym via dorsalem Mesenterium zum Gonadenprimordium wird allgemein dann als aktiver Prozess (Heath 1978) angesehen der abhängig vom Diffusionsgradienten chemoattraktiver Stoffe ($TGF_{\beta 1}$) ist (Rogulska et al. 1971). Er wird vermittelt durch Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) wie Fibronectin (Alvarez-Buylla und Merchant-Larios 1986), Tenascin (Anstrom und Tucker 1996) und einer Reihe von Wachstumsfaktoren. Eine von Wartenberg (1983) modifizierte „contact guidance“ (nach Weis 1908) wird zusätzlich angenommen.²

¹ Nach Moore (1990) soll eine Primitivstreifenaktivität beim Menschen bis Ende der 4. Woche nachweisbar sein.

² Inwieweit das Gewebe des Darmprimordiums selbst invasives und migrierendes Verhalten der PGC stimuliert, wie es Jaglarz und Howard (1994) bei *Drosophila* bewiesen haben wollen, ist fraglich.

Für Spezies mit kurzem dorsalen Mesenterium und frühem Erscheinen einer Gonadenanlage, wie es auch z.B. bei der Maus der Fall ist, sind diese Konzepte gut geeignet. Bei Rinderembryonen erscheint eine Gonadenleiste mit einer möglichen Produktion chemoattraktiver Stoffe erst um den 27. Tag, sieht man von den hochprismatischen Zellen des Darmareals und der dorsalen Körperwand als mögliche Produktionsstätten von $TGF_{\beta 1}$ ab. Zu dieser Zeit ist das dorsale Mesenterium bereits in einem Ausmaß verlängert, daß die Annahme einer interstitiellen aktiven Migration der PGC aus der Darmumgebung und aus dem dorsalen Mesenterium zur Gonadenanlage unrealistisch wird. Eine aktive Migration über lange Distanzen ist auch nicht notwendig bei dieser Spezies. Das Keimfeld als Vorläufer der Gonadenleiste ist der Sitz putativer PGC bereits am 23. Tag, und weitere putative PGC sind bereits in engster Nachbarschaft positioniert. Von Anfang an enthält also die Gonadenleiste bereits eine stattliche Anzahl prospektiver PGC, und zusätzlich mögen prospektive PGC durch aktive Migration aus der unmittelbaren Nachbarschaft (perigonadale Keimzellen) hinzukommen: Die Zahl der zu diesem Zeitpunkt schon vorhandenen PGC, ihr Überleben vorausgesetzt, ist bei normaler Mitoserate völlig ausreichend, um die Mengen später gezählter PGC hinreichend zu erklären.

Aus diesen genannten Gründen ist die Bedeutung einer Migration beim Rinderembryo in dem Ausmaß, wie sie bisher bei anderen Spezies gefordert wurde, nur auf den Raum der Coelombucht (AGM-Region) zu beschränken (prospektive PGC): Dort spielen in der terminalen Migrationsphase die beschriebenen Faktoren wie Chemotaxis, „Contact guidance“, Adhäsionsmoleküle der ECM, Fibronectin und Tenascin eine Rolle.¹ Diese terminale Migration würde auch nach spekulativer

¹ Eine Migrationsbewegung über kurze Strecken wird auch schon deshalb erforderlich, weil eine gewisse Anzahl von PGC der Gonadenleiste bei der Abfaltung am 32. Tag zur Gonadenfalte wieder perigonadal zu liegen kommt.

Extravasation für PGC mit intravasalen Vorstufen gelten. Sogar die von Witschi (1941) an menschlichen Embryonen beschriebene, und von uns an Rinderembryonen bestätigte ventro-dorsale sowie medio-laterale Verschiebung der Keimzellpositionen in caudo-cranialer Richtung kann nicht mit aktiver Wanderung der Keimzellen, erzwungen durch eine oblique Bildung des Darmmesenteriums, erklärt werden, wie Wylie et al. (1986) spekulieren, weil ein Mesenterium zu diesem Zeitpunkt eben noch nicht vorhanden ist. Der Verdacht, daß anderen Mechanismen als einer aktiven Migration eine größere Bedeutung bei der Gonadenbesiedelung zukommen könnte, wurde nicht zuletzt auch von McLaren (1994) während des Symposiums über Germline Development geäußert. Auch Gomperts (1996) bewies mit Totalpräparaten von Mäuseembryonen eine dreidimensionale Anordnung aggregierter Keimzellen als Mechanismus der Translokation und hält selbst bei Mäusen mit kurzem Meso eine amöboide Migration individueller PGC für unbedeutend. Die vielen seit der Akzeptanz der extraembryonalen oder extragonadalen „Entstehung“ von Keimzellen durchgeführten in vitro-Versuche, die eine amöboide Bewegung der PGC erkennen lassen (wie sie viele undifferenzierte Zellen zeigen), sind offensichtlich in vivo von begrenzter Bedeutung. Auch später, in der indifferenten Gonade, ist die asymmetrische Verteilung der PGC mit einer Konzentration am caudalen Ende und besonders auf der abmesogonadalen Seite, sowie der darauffolgende Transfer in medulläre Regionen der Gonade nicht vorwiegend die Konsequenz einer aktiven amöboiden Migration. Die starke Proliferationsaktivität des Coelothels und der Zellen in der Peripherie des Gonadenblastems, wie sie durch die hohe MIB-1-Aktivität ausgedrückt wird, ist zusammen mit Änderungen der ECM vermutlich viel entscheidender für intragonadale PGC-Ortswechsel.

4.4 Die Bedeutung sog. ektopischer Keimzellen

Ein bemerkenswerter Fund bei 23 - 31 Tage alten bovinen Embryonen ist die regelmäßige Präsenz potentieller, ALP-positiver PGC im entodermalen und mesodermalen Gewebe der Kiemenbögen. Diese Lokalisation von PGC im späteren Thymus wird von Friedmann (1987) geradezu eingefordert als Erklärung für das beim Menschen gehäufte Auftreten von Seminomen im Thymus bei Persistieren dieser pluripotenten Zellen. In der Zeit vor der vorliegenden Dissertation konnten allerdings nie, weder beim Menschen noch beim Rind, PGC in diesem Areal aufgezeigt werden.

Vor der Entdeckung einer gemeinsamen Stammzelle von PGC und hämatopoetischen Zellen (Friedmann 1987; Rich 1997; Kelemen 1997), wurden alle potentiellen PGC in perigonadalen und extragonadalen Lokalisationen als von der gedachten, spekulativen Migrationsroute abgeirrt, daher ektopische Keimzellen angesehen (Hardisty 1978). Diese ektopischen PGC sollten im Regelfall degenerieren, werden aber auch unter bestimmten pathologischen Bedingungen für die relativ selten vorkommenden Keimzelltumore, Embryome, Teratome und Teratocarcinome verantwortlich gemacht (Schlumberger 1946; Stark 1959; Mintz 1960; Stevens 1964; Johnson et al. 1973; Cox 1975). Diese Erklärungen können wohl für die relativ geringen Zahlen extragonadaler PGC zutreffen, wie sie gelegentlich bei Säugetieren, auch beim Menschen, vorkommen; die außergewöhnlich hohen Zahlen an „ektopischen“ PGC, wie wir sie hier bei Rinderembryonen finden und wie sie Yoshinaga et al. (1990) beim bush baby (*Galago crassicaudatus crassicaudatus*) vorgelegt haben, verlangen eine andere Auslegung. Da bei diesen Spezies die meisten dieser ektopischen Zellen in einem Areal gezählt werden, das von Medvinsky und Dzierzak (1997) als AGM-Region

definiert wird, müssen sie eher als Zellen mit hämatopoetischer Perspektive und nicht als ektopische PGC betrachtet werden.¹

Noch bei Rinderföten mit 16 cm SSL sind in der Nebenniere und im periadrenalen Bindegewebe oftmals beträchtliche Zahlen ALP- und lektinpositiver Zellen zu finden (unveröffentlicht). Eine parallele Beobachtung konnten wir mit AChE bei 7 Tage alten Küken im axialen Raum zwischen den Interrenalorganen machen (unveröffentlicht). Auch diese ektopischen Funde deuten eher auf vestigiale hämatopoetische Aktivitäten hin. Eine ähnliche Interpretation dürfte auch für die Konzentration potentieller PGC in den Kiemenbögen boviner Embryonen zutreffen, die sicher nicht auf der Route liegen, die von migrierenden PGC normalerweise eingeschlagen wird und daher keinesfalls als aberrante PGC zu werten sind. Der Thymus fungiert nicht nur als Hauptorgan für die T-Zellentwicklung, sondern agiert, insbesondere embryonal, vorübergehend als eine Stätte multipotentieller Hämatopoese (Kendall 1980, 1995; Kendall et al. 1997). Die potentiellen PGC in der Wand des Vorderdarms können unter pathologischen Bedingungen zu Keimzelltumoren entarten. Diese Neoplasmen treten am häufigsten axial in der Region von Pharynx, Nacken und Schilddrüse (Horowitz und Hall 1991) auf. Zudem sind mediastinale Keimzelltumore primäre Neoplasien (Cox 1975, Hailemariam et al. 1997) von denen bekannt ist, daß sie ihren Ursprung im Thymus und seinen ontogenetischen Relikten haben (Schlumberger 1946; Friedmann 1951, 1987). Betrachtet man die dualen Entwicklungskapazitäten der potentiellen PGC im Embryo, ist es wohl eher angebracht, diese Tumore thymischen Ursprungs als Stammzelltumore zu bezeichnen.

¹ Die von Zamboni (1973) bei der Maus vorwiegend in der Nebenniere gefundenen ektopischen Keimzellen werden von Logothetou-Rella (1996b) als Stammzellen des Nebennierenrindenparenchyms interpretiert.

4.5 Wechselbeziehungen von Keimzellen mit Strukturen des gonadalen Areals. Die Bedeutung von Nephrostomen. Ursprung des Interrenalblastems

Ein weiterer diskussionswürdiger Befund ist die Lokalisation einer großen Anzahl WFA- und ALP-positiver putativer PGC in der präsumptiven progonadalen Gonadenleistenregion an und in unmittelbarer Nähe der Bowman'schen Kapsel. Diese relativ schwach reagierenden putativen PGC sind um den 30. Tag genau dort positioniert, wo zum gleichen Zeitpunkt mit ALP der Beginn eines gemeinsamen mesonephrogenen Blastems von Gonade und Interrenalorgan aus der Bowman'schen Kapsel der Urniere dokumentiert werden kann (Abb. 17, 18, 27). Die Vermutung einer gemeinsamen Herkunft beider Blasteme wurde bereits von Gropp und Ohno (1966) geäußert. Die Genese des Gonadenblastems beim Rinderembryo wurde aber bisher um den 40. Tag datiert und eine in loco-Entstehung aus dem ortsständigem Mesenchym (Rüsse 1981) angenommen. Die Konzentration putativer PGC im Ursprungsgebiet beider Blasteme zu diesem Zeitpunkt läßt eine Induktionsbeziehung vermuten.

Eine weitere Wechselbeziehung ist durch die gleichzeitige Präsenz ektodermaler Zellen am medialen Aspekt des Interrenalblastems denkbar. Sie ist enzymhistochemisch mit ALP, AChE und BuChE, immunhistochemisch mit LNGFR und vor allem L_1 ¹ (unveröffentlicht) nachweisbar. Eine Infiltration des mesodermalen Interrenalprimordiums durch neuronale Zellen, die aus der Neuralleiste stammen, ist bereits um den 36. Tag zu beobachten². Der morphologische Zusammenhang beider

¹ Anti- L_1 ist ein polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen das Neuralzellenadhäsionsmolekül L_1 . Bezugsquelle: M. Schachner, ETH-Hönggerberg, HPM; CH - 8093 Zürich.

² Das erstmalige Auftreten von Sympathoblasten im Areal des Interrenalblastems zwischen Aorta und Urniere wurde bisher mit histologischen Methoden auf den 45. Tag (2,7 cm SSL) datiert (Katznelson 1966; Sinowatz 1991) und bedarf einer Überprüfung ggf. einer Korrektur.

Blasteme ermöglicht interessante Spekulationen: Davidoff et al. (1992) finden bei immunhistochemischen Untersuchungen adulter Leydigzellen beim Menschen eine Reihe von Substanzen, die bisher als neural-spezifisch bezeichnet wurden, und definieren interstitielle steroidbildende Zellen als neue Glieder eines diffusen neuroendokrinen Systems.

Besonders auffallend ist der bevorzugte Aufenthalt von PGC in und um eine basalmembranähnliche Matrix, die zwischen proliferierendem Coelothel und der mitotisch aktiven Peripherie des Gonadenblastems liegt.

Das Gebiet der prospektiven Gonadenfalte wird dadurch früh sichtbar. Diese mit Heparansulfat, WFA und AChE deutlich reagierende Zone zeigt eine Abhängigkeit von der Körperregion und vom Alter der Embryonen. Die PGC dieses Arealen reagieren meist sehr deutlich mit ALP und den Lektinen. Die bevorzugte Position von PGC entlang besonders reagierender Strukturen der ECM ist in jeder Altersstufe auffällig. Sowohl im Dottersack, aber auch in der weiteren Entwicklung sehen wir konstant eine Tendenz zur subcoelothelialen Lokalisation an und um Basalmembranen. Anhand dieser Leitstrukturen, die später in das Innere der Gonade einbrechen, findet auch eine verhaltene Besiedlung des Gonadeninneren noch vor der geschlechtlichen Differenzierung statt. Hierbei ist eine Asymmetrie zu beobachten, die dadurch zustande kommt, daß beim Rind das Reteblastem parazentral verläuft und nicht, wie von Wartenberg (1981) behauptet, beim Rind ein zentrales Blastem darstellt. Die Mehrzahl der Keimzellen liegt in der Peripherie des mesonephrosabgewandten Teils der Gonade. Hier wird auch die Basalmembran diskontinuierlich (Abb. 25) und dient als Schiene beim passiven Abgleiten der PGC, die von Proliferationsknospen aus basalen Zellen des Coelomepithels ins Gonadeninnere mitgenommen werden, ein Vorgang, der detailliert von Budras und Schmidt (1976) beim Huhn beschrieben ist.

Ein weiterer interessanter Befund ist die mehrmals gefundene Lokalisation von PGC an und in sog. Nephrostomalkanälchen¹ und deren Coelomöffnungen (Abb. 33). An seriell bearbeiteten Embryonen sind diese rudimentären Strukturen der medialen Coelombucht nur bei „besonders sorgfältiger Untersuchung“ (Roosen-Runge 1961 bei der Ratte) zu finden (Abb. 28a, 32, 33, 41, 43, 55b). Daher sind diese phylogenetischen Rudimente beim Rind bisher nicht beschrieben bzw. wurden in Unkenntnis der Zusammenhänge fehlgedeutet: Bei Katznelson (1966) dienen entsprechende Invaginationen der medialen Coelombucht in der AGM-Region sowie die von dort ausgehenden Verbindungen zu dem Areal zwischen Aorta und Mesonephros als Erklärung für die Herkunft der primären Nebenniere aus proliferierendem Coelothel². Witschi (1948) weist ausdrücklich auf das Fehlen von Keimzellen in den Coelomöffnungen der Nephrostome hin. Bei Ratten werden PGC von Roosen-Runge (1961) jedoch ebenfalls in diesen Genitalkanälchen³ beschrieben. Ein früher Kontakt von PGC mit diesen Strukturen, deren Äquivalente später nach der Ovulation ebenfalls Transportfunktion (Müller'sche Gänge) erfüllen (Drews 1993), ist auch bei Rinderembryonen üblich. Ihre Bedeutung für einen embryonalen Transfer von PGC ins

¹ Die korrekte Bezeichnung wäre nach Brambell (1930) und Goodrich (1945) Nephromixia, weil diese Kanälchen sowohl der Ableitung von Exkreten als auch von Gameten dienen. Nephrostome sind es nur dann, wenn sie ausschließlich der Harnableitung aus dem Coelom dienen bzw. gedient haben.

² Eine ausschließliche oder wesentliche coelotheliale Beteiligung an der Bildung des Interrenalorgans ist seitdem nicht nur beim Rind (Michel 1972; Sinowatz 1991), sondern auch beim Menschen (Crowder 1957; Langman 1989) akzeptiert. Der Mesonephros spielt angeblich keine bzw. nur eine untergeordnete Rolle in der Gefäßbildung. Die hier vorgelegten Befunde belegen jedoch einen ausschließlichen mesonephrogenen Ursprung des Nebennierenrindenprimordiums aus der Bowman'schen Kapsel des Riesenglomerulums, wie er auch von Upadhyay und Zamboni (1982) beim Schaf gefunden wird. Eine coelotheliale Beteiligung liegt auch beim Rind nicht vor. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, daß bei Spezies, die noch keine Nachniere entwickelt haben (Fische, Amphibien) die Interrenalzellen im Mesonephros integriert sind (Poll 1906; Jones 1957). Vgl. dazu auch Fußnote der Legende zu Abb. 55 a, b.

³ Der Begriff Genitalkanal ist eigentlich für die Verbindung von Coelom und Körperoberfläche reserviert. Ein Kontakt von Vornierenkanal und Ektoderm wird zwar von Michel (1972) angegeben, bisher wurden aber entsprechende vestigiale Strukturen bei Mammaliern nicht als Genitalkanäle anerkannt (Witschi 1948).

Gonadeninnere via Blastem dürfte gering sein. Der retrograde Weg als Rekapitulation eines phylogenetisch bedeutsamen Keimzelltransfers ist wahrscheinlicher (Roosen-Runge 1961). Für eine Beteiligung dieser Nephrostome der Coelombucht an einer kontinuierlichen und langanhaltenden Kontribution coelothelialer Elemente zum „zentralen“ Gonadenblastem, wie es in Wartenbergs Dualtheorie (1979) essentiell wird, liegen keine Anhaltspunkte vor: Die „Konfrontationszone“ von intermediärem Mesoderm und Seitenplattenmesoderm in der oberen Coelombucht läßt vor der Ablösung keine auffallende MIB-1-Aktivität erkennen, die auf ein proliferationsaktives Reservoir schließen ließe. Ebenso gibt es keine Hinweise darauf, daß die Formation der Gonadenleiste beim Rind durch diese Genitalkanälchen eingeleitet wird, wie es Wartenberg (1989) für das Kaninchen und Satoh (1985) für die Ratte behaupten. Die Genitalleiste entsteht beim Rind aus dem Teil des Keimdrüsenfeldes, das sich von der Mesenterialwurzel über die Coelombucht auf die Urniere verschiebt. Dieser Vorgang wurde bisher nur bei Vögeln beobachtet (Niewkoop und Sutasurya 1979). Nephrostomata werden von Roosen-Runge (1961) detailliert beschrieben und von Goodrich (1930, 1945) in ihren phylogenetischen Aspekten dargestellt. In Übereinstimmung mit Burns (1941) ist die Bedeutung dieser rudimentären Kanäle der Vornierenorganisation für die Gonadenontogenese ausschließlich in der Formierung des Reteapparates zu suchen¹. Nach Semon (1890) und

¹ Eine Relevanz erhalten diese Kanäle allenfalls noch in der frühen Hodenstrangformation der männl. Gonade mancher Spezies. Verbindungen von Coelom und Hodenzentralkanal (die homologe Struktur des Retelängskanals) via Tubuli seminiferi sind in der Gonadenontogenese verschiedener Reptilien ein normaler Befund (Raynaud und Pieau 1985). Die nephrostomiale Region liegt dort in der „adrenal groove“, die Gonadenleiste und Nebennierenprimordium trennt. Horst (1987) beobachtet bei der Hodenstrangformation des frühen Schafhodens ebenfalls noch Verbindungen dieser Hodenstränge zum Coelom. Im frühen Rinderhoden konnten wir entsprechende Strukturen caudal der „rete-ridge“ nicht ausmachen. Die letzten Coelomverbindungen sind allerdings auch noch nach der Gonadendifferenzierung bei beiden Geschlechtern in der progonadalen Region des Gonadenblastems deutlich sichtbar. (Abb. 28a, 32, 33, 41, 43, 55b)

Busse (1985) stellen sie allerdings, nach ihrer Ablösung von der Seitenplatte, Anteile des Nebennierenprimordiums.

Die vorderste Coelomöffnung einer homologen Serie von Reteinvaginationen persistiert als Ostium tubae bzw. Appendix des Hodens und behält zeitlebens beim weiblichen Rind durch rete-tubale Verbindungen Kontakt zum Retesystem¹ (Felix 1906; Odend'hal 1986). Diese Coelomöffnung garantiert eine hormonell abhängige Expulsion von Sekreten², denen eine Funktion für das cyclische Geschehen beim weibl. Rind zukommt (Archbald 1971). Die Behinderung dieser Sekretion führt zu Retecysten, die von Bedeutung für das Fertilitätsgeschehen sind (Wenzel et al. 1987). Eine Funktion als hormonelle Drüse wird ebenfalls propagiert. Die eindeutigen Funde von Verbindungen zwischen Reteblastem und Coelom (Abb. 55a) in der oberen, medialen Coelombucht stellen mit Sicherheit das von Odend'hal (1986) und Wenzel (1987) gesuchte embryologische Substrat dieser TRC (tubo-retiale connection) dar. Topographisch-anatomisch sind sie die eigentliche Grenze zwischen viszeralem (Splanchnopleura) und parietalem (Somatopleura) Blatt des Seitenplattenmesoderms, das sich an dieser Stelle noch in Verbindung mit dem Nephrotom (intermediäres Mesoderm) befindet.

4.6 PGC nach der Gonadendifferenzierung

Eine Beschreibung der Lokalisation und Identifizierung von PGC führt über den Zeitraum der Gonadendifferenzierung hinaus, da die Keimzellen

¹ Dieser von Odend'hal et al. 1986 als sensationelle Entdeckung gefeierte Befund ist 80 Jahre vor ihnen bereits von Felix und Bühler (1906) gebührend erklärt und zeichnerisch (auf S. 301) dargestellt worden.

² Die Möglichkeit einer Expulsion von medullären Keimzellen per Rete-Coelomverbindungen ist dabei nicht auszuschließen.

noch eine geraume Zeit danach als PGC bezeichnet werden. Sie sind in diesem bisher sehr unvollständig untersuchten Zeitraum noch sexuell undifferenziert (Zuckerman und Baker 1977; Motta und Makabe 1982; Makabe et al. 1991), d.h. zumindest bipotent (Budras 1979): Von genetisch weiblichen Küken ist bekannt, daß nach linksseitiger Kastration die rechte Gonade bei medullärer Lage der PGC zu einer Spermatogenese fähig wird (Dantschakoff 1941).¹

Deutlicher zeigt sich eine Multipotenz von PGC bei den in vitro-Versuchen Laboskys (1984): Embryonale Keimzellen, die aus PGC von 8 - 12,5 Tage alten Mäuseembryonen unter Zusatz von Wachstumsfaktoren (LIF, bFGF, Steel-factor) kultiviert werden, behalten nicht nur ihre ALP-Positivität und Immortalität, sondern sind - bei altersabhängig abnehmender Potenz - pluripotent (Teratocarcinome) bzw. totipotent (bei Injektion in Blastozysten).² Die Maus zählt zu den Spezies mit „immediate meiosis“: Unmittelbar nach der Gonadendifferenzierung (12 Tage) treten die weiblichen PGC in die Prophase der Meiose ein, die männlichen PGC werden mitotisch arretiert. Parallel dazu geht auch die ALP-Reaktion zwischen dem 12. und 13. Tag dramatisch zurück. In diesen kurzen Zeitraum fällt offenbar die endgültige Determination der Keimzelllinie. Die PGC werden zu Oogonien bzw. Oozyten resp. Prä spermatogonien. Die Überlappung von Gonadendifferenzierung und Keimzellendifferenzierung führt bei diesen Spezies zum Bild der verlängerten indifferenten Gonadensituation beim Ovar. Cortex und Medulla werden nicht ausgebildet, eine Östrogensynthese wird in dem hier kurzen prämeiotischen Zeitraum nicht beobachtet. Bei Spezies mit verzögerter Meiose (delayed meiosis) wie Kaninchen, Mensch und Rind sind es zum

¹ Dabei ist allerdings das Vorhandensein der rechten Nebenniere unabdingbar (Budras 1972). Ein wesentlicher Beitrag des Nebennierenprimordiums zur geschlechtlichen Differenzierung wird von Vines (1935) und Gillman (1948) auch beim Menschen beschrieben.

² Interessant ist dabei, daß die männliche Keimzelllinie diese Potenz länger beibehält.

Teil beträchtliche Zeitspannen (Rind und Mensch: 40 Tage) mit schrittweisen Differenzierungen der Keimzellen von der Gonadendifferenzierung (40. Tag Rind/Mensch) bis zum Eintritt in die Meiose bzw. zur sog. mitotischen Arretierung der Keimzellen in der männlichen Keimzelllinie. In diesem entscheidenden, relativ langen Zeitraum findet die endgültige Determination statt.¹ Wenn PGC auch grundsätzlich definiert werden können als Zellen einer noch nicht endgültig determinierten Zelllinie, wurden bislang bei Spezies mit verzögerter Meiose entsprechende Untersuchungen zum Determinationszeitpunkt nicht durchgeführt. Die angegebenen morphologischen Kriterien zur Abgrenzung der PGC von PräspERMATOGONIEEN bzw. OOGONIEEN sind vage, die Terminologie spezies-gebunden und oft uneinheitlich: Lokalisation im Tubulus (Gondos und Hobel 1971), zunehmende Interzellulärbrückenbildung (Fukuda 1975; Wartenberg 1989), Veränderungen der Glykogenspeicherung beim Menschen (Falin 1969; Holstein et al. 1971), sowie ein dramatischer Anstieg (M-Prospermatogonie) und Abfall (T1-Prospermatogonie) der Mitoserate (Hilscher 1974, 1976; Wartenberg 1974, 1976) sind speziesgebundene Charakterisierungen anhand quantitativer Merkmale und daher von zweifelhaftem allgemeinem Wert. Dabei werden zeitsynchrone Proliferationsaktivitäten der weiblichen und männlichen Keimzelllinie (M-Prospermatogonie - Keimballenbildung; T1-Prospermatogonie - Eintritt der Oogonien in die Meiose) von Hilscher (1974,1976) und Wartenberg (1974, 1976) aufgestellt, obwohl die Gonadogenese bei beiden Geschlechtern vollkommen verschieden verläuft, und ein entscheidender

¹ Ob und wieviele PGC persistieren, im sog. Keimepithel neu entstehen (Waldeyer 1870, Essenberg 1955, Mossmann 1973) bzw. unter bestimmten Umständen (growth factor) aus Gonien dedifferenzieren, soll nicht weiter behandelt werden, ist aber nicht nur für die Tumorphathologie (Hustin et al. 1987) interessant (ALP-Reaktion in Seminomen). Diese Fragen berühren historische und zentrale Themen (primäre bzw. sekundäre Keimbahn). Eine Neo-Oogenese wird z. B. von Horst (1987) beim weiblichen Schaf p. p. sowie von Yoshinaga (1990) noch bei adulten Galagos beschrieben.

Einfluß dieser geschlechtstypischen Vorgänge auf die Differenzierungsvorgänge der Keimzellen auch von den Autoren erkannt wird.

Wartenberg (1974, 1976) führt dabei einen intermediären Typ zwischen PGC und Oogonie ein, der noch keine Interzellularbrücken aufweist. Bei Fukuda et al. (1975) ist ein entsprechender intermediärer Zelltyp zwischen Gonozyt und fötaler Spermatogonie durch abnehmende Kern-Plasma-Relation, kernnahe Mitochondrienlage sowie Zunahme der Interzellularbrücken charakterisiert.

Beim Rind liegt zu diesem Zeitintervall der Begriffsunsicherheit nur eine Untersuchung vor (Schrag 1984). Schrag (1984) beobachtet Nexus zwischen Keimzellen bei Rinderföten von 5,6 - 9,5 cm SSL, die danach verschwinden. Ab 7 cm, besonders aber ab 10 cm, werden Interzellularbrücken gefunden. Weder Glykogeneinlagerungen noch die Positionen von Keimzellen in den sich bildenden Tubuli (peripher/zentral) oder Unterschiede von Proliferationsaktivitäten der Keimzellen (eine mitotische Aktivität beginnt nach Schrag gleich nach der Tubulusformation und läßt erst nach der 15. Graviditätswoche wieder nach) rechtfertigen ihren Befunden zufolge eine Einteilung nach den bei anderen Spezies üblichen Kriterien. Helle und große, sowie kleine und dunkle Keimzellen werden daher einfach als unterschiedliche Funktionszustände gewertet. Die von Schrag (1984) gewählte, angeblich willkürliche Einteilung embryonaler bzw. fötaler Keimzellen orientiert sich dennoch an der weiblichen Keimzelllinie (Keimballenbildung, Meiosebeginn).

Die von uns vorgelegten enzym- und lektinhistochemischen Ergebnisse lassen zwar bereits bestimmte Stadien der Keimzelldifferenzierung erkennen. Für eine sinnvolle Terminologie sind jedoch weitergehende Untersuchungen notwendig, die vor allem den Determinationszeitpunkt der Keimzelllinie eingrenzen. Dazu gehören sicher immunhistochemische Nachweise von TGF bzw. bFGF-Rezeptoren an PGC, die in der Gonade herunterreguliert werden und dadurch die Keimzelldifferenzierung

erlauben.¹ Vor allem aber dürfte die Etablierung von Zelllinien aus PGC unterschiedlichen embryonalen Alters und Geschlechts dieser prämeiotischen Periode helfen, um die schrittweise abnehmende Pluripotenz der PGC zu klären.

Der Verlust der ALP-Positivität sowohl in der weiblichen als auch in der männlichen Keimzelllinie um den 80. Tag ist sehr charakteristisch.²

Mit dem Verschwinden der ALP-Reaktion verlieren die Keimzellen der männlichen Linie auch 9 der 12 Lektinbindungsstellen. Nur WFA, VVA und DBA persistieren. Zusammen mit einem neuen Antigenprofil, das mit PGP 9.5 nachweisbar ist, identifizieren sie determinierte PräspERMATOGONIE und stellen bis in das adulte Stadium hinein wertvolle Instrumente zur Untersuchung der Spermatogenese dar (Ertl und Wrobel 1992, Wrobel et al. 1995a,b). Eine Wechselbeziehung von Gonadogenese und Keimzellendifferenzierung kommt jedoch bereits mit dem zeitlich vorangehenden Verschwinden der ALP-Positivität aus den Präsertolizellen zum Ausdruck. Dadurch werden die ALP-positiven PGC in den Hodensträngen sichtbar. Diese Phase entspricht in etwa dem Erscheinen der M-Prospermatogonien nach der Terminologie von Wartenberg (1974, 1976). Die kontinuierliche relative Abnahme von PGC in der Tunica albuginea des Hodens kann dabei auf die Größenzunahme des Organs bei gleichbleibender Mitoseaktivität der PGC in dieser Region erklärt werden.

¹ Die Immortalität von PGC aus EG-Zelllinien, die sich u. a. in einer persistierenden ALP-Reaktion dokumentiert, beruht offenbar auf einem Impuls durch bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), der im Primitivstreifen, nicht jedoch in der Gonade exprimiert wird (Labosky 1994).

² Dieser Zeitpunkt entspricht dem Beginn der mitotisch arretierten T1-Prospermatogonie der Terminologie von Hilscher (1981) und Wartenberg (1989). Zeitparallel treten die Oogonien in die Prophase der Meiose ein. Die Oogonien verlieren hier auch beim Menschen die ALP-Reaktion (Motta 1997). Die Zeitintervalle von Mensch und Rind sind in etwa gleichzusetzen.

4.7 Identifizierung und Lokalisation der Keimzellen im frühen Ovar. Die Bedeutung medullärer steroidproduzierender Areale

Synchron zu den oben dargestellten Vorgängen im frühen Hoden findet nach Rüsse (1982) der Einschluß von PGC in die Keimballen des Ovars statt bei gleichzeitiger Bildung von Interzellularbrücken. Wartenberg (1989) und Motta (1997) geben die Keimballenbildung beim Menschen zum selben Zeitraum an. Während die PGC von Rüsse (1982) von nun an bereits Oogonien genannt werden, ordnet Wartenberg (1989) diese Keimzellen einem intermediären Typ von PGC zu, die sich nach den Mitosen noch vollständig trennen. Nur die Keimzellen, die unmittelbar vor Beginn der Meiose eine identische Chromosomenkonfiguration zeigen, werden von ihm als Oogonien bezeichnet.

Wir finden beim Rind eine Keimballenbildung bereits bei Embryonen mit 3,2 cm SSL. Die wesentlichen Lektine (WFA, WGA, STA) reagieren mit den PGC auch im Ovar über den Zeitraum der Keimballenbildung hinaus. Lektinreaktionen lassen dabei die PGC-Verteilung im Cortex des Ovars wesentlich deutlicher erkennen als es die ALP-Reaktion erlaubt. In diesem Zeitraum verschwindet die ALP-Reaktion des Blastems aus dem Interstitium (sexueller Dimorphismus des Blastems) und persistiert noch eine zeitlang in den Prägranulosazellen. Nach dem Rückzug der ALP-Reaktion aus den Begleitzellen wird dieses Enzym erneut in abgeschnürten Primordialfollikeln gebildet. Eine deutliche Aktivität ist außerdem in den Zellen vieler Marksbläuche zu beobachten. Diese ALP-Reaktionen verhindern eine Identifizierung der ALP-positiven PGC im Mark des Ovars. In diesem Zeitraum sind mit dieser Enzymreaktion nur PGC in den Keimballen der Ovarrinde zu erkennen. Mit Lektinen werden

jedoch auch medulläre Keimzellen demaskiert.¹ Sie liegen dort in einer typischen bandförmigen Anordnung im Areal der Markschräuche (medullary cords, intragonadales Rete) in der Nähe steroidproduzierender Zellansammlungen (Abb. 39, 49). Beinahe synchron zum Erscheinen fötaler Leydigzellen im Hoden sind also steroidproduktive Areale auch im Interstitium von 45 Tage alten Ovarien, die bereits Keimballen ausbilden, zu beobachten. Aufgrund des doch beträchtlichen Umfangs sowie der Lokalisation sind die steroidproduzierenden Zellen in 45 Tage alten Ovarien beim Rind nicht als Hiluszweischenzellen, von denen eine Androgenproduktion bekannt ist, anzusprechen. Außerdem korrelieren diese steroidbildenden Zellen zeitlich nicht mit den Funden steroidpositiver, interstitieller Zellen von Gondos und Hobel (1973) oder Wartenberg (1989) die in subcorticaler Position von der 12. bis 20. Woche beim Menschen vereinzelt gefunden werden.²

Unsere Funde sind allerdings mit den biochemischen Untersuchungen von Shemesh et al. (1978) und Shemesh (1980) zu vereinbaren. Diese Autoren finden in Rinderovarien der sog. aktiven Phase (3,3 - 8 cm SSL) eine Östradiol-17- β -sekretion, ohne allerdings eine Lokalisation angeben zu können. Auch Raeside (1985) findet im prämeiotischen Rinderovar signifikante Östrogenmengen und Payen et al. (1996) weisen bei

¹ Im Allgemeinen wird als typisch männliche Lokalisation der PGC die Medulla, als weibliche Keimzellverteilung der Cortex angegeben (Rüsse 1991). Diese Behauptungen scheinen beim Rind nicht grundsätzlich zu stimmen: In der ersten Zeit nach der gonadalen Differenzierung sind oft ebenso viele PGC im „Cortex“ (prospektive Tunica albuginea) des Hodens wie in den darunter gelegenen Platten (Hodenstränge) zu finden. Medulläre Keimzellen werden beim weiblichen Vogel (Swift 1914, 1915; Willier 1937, 1939), beim Kaninchen (Viebahn et al. 1998), aber auch beim weiblichen menschlichen Embryo (Wartenberg 1989) gefunden. Die Lokalisation der PGC ist z. B. bei Hühnervögeln entscheidend für die Gonadendifferenzierung. Nach Kastration des linken Ovars von weiblichen Küken bildet sich meist rechts ein Hoden wegen der normalerweise medullären Position der Keimzellen im rechten Ovar. Liegen zufällig mehr PGC im Cortex, entsteht ein Ovar (Dantschakoff 1941).

² Entsprechende Funde einzelner steroidproduktiver Areale geringeren Umfangs im Rete und in unmittelbarer Nähe einzelner Markstränge treten auch beim Rinderfötus zur Zeit der Primordialfollikelbildung auf (unveröffentlicht).

weiblichen Schafföten zum Zeitpunkt der Gonadendifferenzierung (30. Tag) mit RT-PCR bereits Aromatase nach.¹

Von Spezies mit verzögertem Meiosebeginn ist, im Gegensatz zu Spezies mit einer unmittelbar nach der Geschlechtsdifferenzierung stattfindenden Meiose, die Bildung von Östrogenen in dieser frühen prämeiotischen Phase bekannt, wenn auch nicht Lehrbuchmeinung. Rüsse (1991) gesteht zwar dem Schweineovar (Raeside 1985 findet hier nur Androstenedion), nicht aber dem frühen Ovar des Rindes eine beträchtliche Östrogensynthese zu. Die von uns gefundenen steroidproduzierenden Areale im Bereich der Markstränge können aber durchaus das morphologische Substrat der biochemischen Messungen von Shemesh (1980) sein. Die funktionelle Bedeutung einer derart frühen Hormonsynthese diesen Umfangs für die weibliche Entwicklung, für die Differenzierung der PGC in den Keimballen des Cortex sowie besonders der Medulla, aber auch ihre Beziehung zu den Stromazellen des Ovars und Nebenvovars wird auch von Shemesh (1980) erkannt.² Folgt man der Interpretation von Byskov (1986), nach der Steroidproduktion grundsätzlich eine Barriere zwischen Keimzellen und steroidproduzierenden Zellen (cord), bzw. den Untergang der Keimzellen voraussetzt - nachdem vorher ein induktiver Kontakt stattfand - so sind medulläre Keimzellen im Ovar apoptotische Zellen und erklären dadurch das Auftreten dieser frühen Steroidproduktion.

Eine andere Bedeutung früher Östrogensynthese wird von MacLaughlin et al. (1983) angegeben. Sie weisen bei Vögeln eine hemmende Wirkung von Östrogenen auf den Anti-Müller-Effekt von AMH nach, das auch in Granulosazellen gebildet wird.

¹ Diese Östrogensynthese verschwindet mit dem Einsetzen der Meiose (Byskov 1986). Sie wird erst von den Granulosazellen der Theka interna wieder aufgenommen (Rüsse 1991)

² Im Mesenchym der weiblichen Uteri finden wir zu dieser Zeit Östrogenrezeptoren, die eine Beteiligung von Östrogen an der Involution zum Epoophoron vermuten lassen (unveröffentlicht).

4.8 Keimbahn, Determination und Transdifferenzierung

Die vorgelegte Arbeit legt eine kritische Distanzierung von zentralen Konzepten der Keimzellforschung nahe. Die Möglichkeit einer späten Rekrutierung von PGC aus Stammzellen mit hämatopoetischer Potenz in der AGM-Region, sowie einer persistierenden Multipotenz über die Phase der Gonadendifferenzierung hinaus erlaubt keine frühe und strikte Trennung von somatischen Zellen und Keimzellen, wie sie der Begriff Keimbahn suggeriert¹.

Weismans (1885) Konzept von der Kontinuität eines Keimplasmas mit dem Ziel der Generationssicherung erscheint anachron. Seine Auffassung, die von Nussbaum (1880) erstmalig geäußert wurde und in verschiedenen Variationen bis heute überdauert hat, beruht auf der Identifizierung einer vermeintlichen Keimzelllinie bereits im frühen Furchungsstadium. Die keimzell-determinierende Bedeutung dieses sog. Germinalplasmas (Polargranula, Nuage) ist jedoch umstritten (Niewkoop und Sutasurya 1981; Eddy 1984); seine wirkliche Funktion ist nach wie vor unklar. Bei Vögeln existieren diese Substanzen überhaupt nicht, bei Säugetieren ist eine lückenlose Kontinuität bisher nicht nachgewiesen. Dixon (1994) interpretiert diese Granula als Schutzmechanismus vor Genexpressionen (escape der de-novo methylation) die bei der endgültigen Ausbildung der Körperform notwendig werden.

¹ Die Länge der Keimbahn, d. h. eine frühe oder späte Segregation einer Keimzelllinie hat unmittelbar mit dem germ track (Keimzellenbahn) zu tun, dem Weg, den die Keimzellen von ihrer Identifizierung ab bis zu ihrem Bestimmungsort zurücklegen müssen. Bei Cephalochordaten entstehen die Keimzellen aus Hämo-/Lymphoblasten am Ort der -segmental angelegten - Gonadenformation; eine Translokation (germ track) ist daher überflüssig (Niewkoop und Sutasurya 1979). Diese Aussagen sind wesentlich von der sicheren Identifizierung sowie der Differenzierung von anderen Zelllinien abhängig; dieses Caveat gilt insbesondere für ältere Arbeiten.

Die Pluripotenz von Keimzellen kann durch diesen Schutz, wenn eine Distanzenklave nicht möglich ist, trotz induktiver Einflüsse erhalten bleiben. Weakly (1982) findet Nuage-Substanzen auch in anderen Zelllinien und beobachtet eine Abhängigkeit von mitochondrialen Umbauprozessen.

Die Segregation potentieller PGC (die mit Recht auch potentielle Blutstammzellen genannt werden könnten) aus dem undifferenzierten Primitivstreifengewebe bedeutet daher noch keine Trennung von somatischen Linien und Keimzelllinien. Die Indifferenz wird erst unter den Bedingungen der männlichen resp. weiblichen Gonadensituation aufgehoben. Dort verlieren die potentiellen PGC schrittweise ihre Pluripotenz und spezialisieren sich zu determinierten Zellen. Ihre Spezialisierung unterscheidet sich grundsätzlich von anderen Zelllinien nur dadurch, daß die Fähigkeit zur Totipotenz unter den Gonadenbedingungen konserviert und bei der Syngamie wiedererlangt und realisiert werden kann. Die Zusammenhänge von Immortalität, Totipotenz, Meiose/Mitose- Entscheidung, X- Inaktivierung und X-Reaktivierung in der Meiose, sowie DNA- Methylation sind nur unvollständig geklärt, gelten aber bisher als Begriffe, die der Keimzelllinie unter physiologischen Bedingungen eigentümlich sind.

Die Bildung der Keimzelllinie repräsentiert daher nur einen anderen Typ der zellulären Differenzierung, deren Besonderheit in der Konservierung und potentiellen Aktivierung der gesamten Entwicklungspotenzen besteht (Niewkoop und Sutasurya 1981). Diese Möglichkeiten sind bei der differenzierten Eizelle zusätzlich und wesentlich im Cytoplasma konserviert. Differentielle Genaktivitäten sind grundsätzlich reversibel; durch nukleo-cytoplasmatische Interaktionen wird zwar in der Regel eine fortschreitende Stabilisierung des Differenzierungsstatus erreicht; die Rigidität dieses Prozesses ist aber relativ. Sogenannte determinierte Zellen werden zunehmend als nur vorübergehend determiniert entlarvt:

Die Transdifferenzierung (Budras 1972; Wartenberg 1985) bereits „determinierter“ Zellen der Urniere zu Zellen der Gonade mit vollkommen anderen Genexpressionen ist nur ein Beispiel für die Notwendigkeit einer Neuorientierung anachroner Begriffsinhalte. Auch die Entstehung pathologischer Zellformen mit ALP-Aktivität in Seminomen und Teratocarcinomen verweist möglicherweise nur auf diese Tatsache einer Reaktivierung bereits „determinierter“ Zellen unter bestimmten Umständen. In der Dispersion bzw. Metastasierung von Carcinomzellen haben diese epithelio-mesenchymalen Transitionen als „EMT-like modifications“ eine fundamentale Bedeutung (Boyer et al. 1996). Unabhängig von ihrer Keimblattherkunft ist die Transformation etablierter Epithelien in mesenchymale Zellen und vice versa ein Ereignis, das sich in der Ontogenese mehrfach wiederholt (Plazentation, Gastrulation, Nephrogenese). Über die Ein- und Ausschaltung von Mastergenen wird eine Kaskade von Prozessen ausgelöst, die an „checkpoints“ reguliert werden (Hay 1995; Davies 1996; Vicovac, Aplin 1996): Nur die Präsenz spezifischer Signale (Wachstumsfaktoren wie EGF, FGF, TGF β , HGF/SF; Aktivine; Tyrosinkinaserzeptoren; Wnts) garantiert den weiteren Verlauf des Prozesses. Die Expression neuer Genkombinationen, die für Transkriptionsfaktoren codieren (Hox genes, Pax genes, zinc finger proteins) sowie morphoregulatorische Moleküle wie CAMs, Cadherine und extrazelluläre Matrixliganden gewährleisten eine zeitgerechte Transformation von Epithel in Mesenchym und umgekehrt (Viebahn 1995). Die EMT in der Gonadogenese stellt somit ein durchaus gängiges und bereits mehrfach erprobtes Prinzip der Ontogenese dar. Ehemals epitheliale Zellen (Coelothel, Urniere) konstituieren zusammen mit ortsständigem Mesenchym sowie mit mesenchymalen Elementen der Urniere (Podozyten¹, Mesangiumzellen) das sog. Gonadenblastem.

¹ Podozyten nehmen eine Sonderstellung ein. Nach Davies (1996) entstehen einige von ihnen aus der präsumptiven Bowman'schen Kapsel und differenzieren zu Zellen mit teils

Die darauffolgende MET ist ein eher seltenes Ereignis, wird aber bereits in der Somitenbildung und in der Tubulusformation des metanephrogenen Blastems vollzogen. Im Hoden führt sie zur Hodenstrangformation. Ob allerdings die Dedifferenzierung epithelialer Zellen unterschiedlicher Herkunft (Seitenplattenmesoderm, intermediäres Mesoderm) zu einem einheitlichen Differenzierungsgrad mesenchymaler Zellen im Gonadenblastem führt, wie es der Begriff Blastem suggeriert, wäre zu klären. Nur wenn die Prägung der ersten Determination in den pluripotenten Zellen des Gonadenblastems konserviert wird, ist die Herkunft der Zellen, seit 100 Jahren kontrovers diskutiert, von Bedeutung.¹ Wir können beim Rinderembryo mit den Blastemmarkern ALP, AChE, WFA und LAP sowie mit LNGFR² verschiedene Differenzierungsstadien dieser mesenchymalen Blastemzellen erkennen, die eine Revision des Begriffes Blastem nahelegen bzw. die Verwendung dieses Begriffes nur in einer früheren Phase der Gonadogenese gestatten. Für eine Klärung dieser fundamentalen Frage sind jedoch weitere Untersuchungen mit diesen bovinspezifischen Markern notwendig.

epithelialen (mit α_6 -Integrinen und desmosomalen Elementen, jedoch keine Cytokeratine oder c-met), teils mesenchymalen (α_3 -Integrine, Vimentin) Eigenschaften. Sie bilden eine Zellschicht, die zwar organisiert ist, aber kein typisches Epithel darstellt (partielle EMT).

¹ Vor ein ähnliches Problem ist die Erforschung der Nierenentwicklung gestellt. Auch hier ist bisher unklar, ob im metanephrogenen Blastem bereits von Anfang an pluripotente Stromazellen zusammen mit Zellen prospektiver epithelialer Potenz maskiert sind, erst durch die Ureterknospe induziert werden oder durch einen Prozess der lateralen Inhibition entstehen, der zwei distinkte Phänotypen aus einer anfangs homogenen Population induzierter Stammzellen kreiert (Davies 1996).

² Die epitheliale Komponente ist ohne ihr induktiv wirksames Mesenchym nicht in der Lage, eine Organstruktur aufzubauen oder sich biochemisch zu differenzieren. Obwohl das Mesenchym in allen Organanlagen gleich aussieht, ist es organspezifisch. In der Gonade von Rinderembryonen ist es durch LNGFR darstellbar (Abb. 34). Diese Spezifität kann nicht alleine durch den induktiven Einfluß des Epithels in den vorhergehenden Stadien erklärt werden (Langman 1998), sondern wird offenbar durch die Wechselwirkungen der epithelio-mesenchymalen-und mesenchymo-epithelialen-Transformationen erreicht

5. Legenden

5.1 Legenden zu den Abbildungen

Abb. 1 - 4.

Männlicher Embryo Nr. 200, 18 Tage, ALP, x 225.

Abb. 1. Querschnitt durch die Mitte einer dreiblättrigen Keimscheibe. Der apikale Abschnitt des Ektoderms ist ALP-positiv. In Keimscheibenhöhe sind PGC nur ausnahmsweise in der lateralen Dottersackwand (nicht auf dieser Abb.) vorhanden. Am: Amnionhöhle; zwischen Ektoderm (Ec) und Entoderm (Pfeilspitze) ist intraembryonales Mesoderm sichtbar. Der Chordafortsatz ist durch einen Stern markiert. Da die Einfaltungen noch kaum erfolgt sind, liegt die Keimscheibe flach auf dem Dottersack (Ys).

Abb. 2. Am caudalen Ende der Keimscheibe sieht man eine Akkumulation ALP-positiver Zellen. Einzelne ALP-positive Zellen (potentielle PGC) sind auch in der proximalen Dottersackwand lokalisiert und durch Pfeile gekennzeichnet. Ys: Dottersack

Abb. 3. Schnitt durch den Dottersack (Ys) unmittelbar caudal von Abb. 2. Viele ALP-positive PGC (Pfeile) liegen einzeln oder in kleinen Gruppen in der proximalen Dottersackregion. Pfeilspitzen zeigen die Grenze zur distalen Dottersackregion.

Abb. 4. Querschnitt durch die Dottersackwand, annähernd 150 µm caudal von Abb. 2. Bezeichnungen wie in Abb. 3. Die Anzahl potentieller PGC hat im Vergleich zu Abb. 3 abgenommen. Die PGC liegen weiter auseinander. Die der Keimscheibe benachbarten Areale der proximalen Dottersackwand enthalten die meisten PGC. Es ist dieser caudale Abschnitt, der später durch die caudalen Abfaltungsprozesse intraembryonal zu liegen kommt. Möglicherweise werden die später im Keimfeld der dorsalen Dottersackwand zu findenden PGC erst im Zeitraum zwischen 18. und 23. Tag angelegt. Die am 18. Tag in der

Dottersackwand auftretenden PGC könnten durch das Dottersackwachstum so weit in die Peripherie verlagert werden, daß sie für die Besiedelung der Gonade keine Rolle spielen. Die wichtigen Faktoren für Dottersackwachstum und Mesodermbewegungen aus dem Primitivstreifen, entscheidend für PGC-Allokation, sind beim Rind nicht bekannt, da Untersuchungen entsprechender embryonaler Stadien (zwischen 18. und 23. Tag) fehlen. Beim Menschen wird das Verschwinden des Primitivstreifens von Moore (1990) erst auf das Ende der 4. Woche datiert.

Abb. 5.

Embryo Nr. 185, 23 Tage, x 7. Die Stiele von Allantois (Al) und Dottersack (Ys) sind etwa 1200 µm voneinander entfernt. Die Linien zeigen die Schnitthöhen der Abb. 6 - 12 (Abb. 11 und 12 sind Embryo Nr. 170 entnommen) an. Weitere Details sind dem Text zu entnehmen.

Abb. 6.

Embryo Nr. 185, 23 Tage, ALP, x 140. Nur die am weitesten caudal (diese Abb.) und cranial zu findenden PGC liegen im entodermalen Epithel des Darmrohres (G). In dieser Schnitthöhe schließt sich der Neuroporus posterior. Die Chorda schaltet sich hier aus dem Darmdach aus, ist aber dorsal noch mit dem Neuralrohr verbunden. Die Existenz eines Canalis neurentericus wird beim Rind bestritten (Michel 1972). Daß aber eine entsprechende Struktur, welche die Amnionhöhle bzw. das Neuralrohr mit der Dottersackhöhle verbindet, beim Rind existiert, ist durch WFA-positives Chordamaterial, das vom dorsalen Darmdach zapfenartig in das Darmlumen ragt, belegbar. Diese Überbleibsel einer stattgefundenen Chordaeinschaltung sind auf einer beträchtlichen Strecke (>0,1mm cranial der Stelle, die Abb. 6 zeigt, gut zu beobachten) Die Somiten (So) und das intermediäre Mesoderm sind noch undifferenziert; die epitheliale Transformation des hier bereits verdichteten Mesenchyms findet unmittelbar cranial dieses Schnittes statt. Die paarigen Aorten (A) liegen weit voneinander entfernt. Der Wolff'sche Gang ist

durch einen Pfeil markiert. Die Strecke zwischen den Pfeilspitzen weist erhöhtes Coelomepithel auf und ist mit dem Keimfeld von Felix (1911) identisch.

Abb. 7.

Embryo Nr. 185, 23 Tage, ALP, x. 140. Querschnitt ca. 400 µm cranial von Abb. 6. Die Zahl der ALP-positiven putativen PGC ist angewachsen. Die Zellen liegen jetzt im Mesenchym des Darmrohres. Ein dorsales Mesenterium ist noch nicht ausgebildet. Die Aorten (A) sind näher zur Medianen gerückt und separieren Darm und Chorda. Die Differenzierung der Somiten (So) in Dermatomyotom und Sklerotom ist fortgeschritten. Intraembryonale Blutzellen in den Gefäßen sind ALP-negativ. Zwischen den Pfeilen das Keimdrüsenfeld von Felix (1911).

Abb. 8.

Embryo Nr. 185, 23 Tage, WGA, x 140. Querschnitt durch die Hinterdarmregion cranial von Abb. 7. Die lektinpositiven PGC liegen im Areal des Keimdrüsenfeldes. Unter dem Wolff'schen Gang ist ein Urnierentubulus (Mt) epithelialisiert. Das Amniongewebe (oben) reagiert stark WGA-positiv. Alle anderen Bezeichnungen sind den Abb. 6 und 7 zu entnehmen.

Abb. 9.

Embryo Nr. 185, 23 Tage, WGA, 9a: x 40, 9b: x 140. Querschnitt in Höhe des Mitteldarms. Der Darm ist in offener Verbindung (Darmnabel) mit dem gut ausgebildeten Dottersack (Ys), der noch einmal auf der linken Seite angeschnitten ist (Abb. 9a). Das hohe Coelothel (zwischen den Pfeilspitzen in Abb. 9b), das dem dorsalen Dottersack (prospekt. Darm) aufliegt, enthält zwei WGA-positive putative PGC und wird später um die Coelombucht nach lateral umgeschlagen. Eine dritte positive PGC (Pfeil) ist am medialen Aspekt des Mesonephros (M), in eine WGA-positive Glykocalix eingesenkt, abgebildet. Das Coelothel ist zu dieser Zeit hier noch flach. Auf dieser Schnitthöhe (Darmnabel) ist die Aorta (A) unpaar, cranial und caudal davon noch paarig.

Abb. 10.

Embryo Nr. 185, 23 Tage, ALP, x 350. Drei ALP-positive, lektinnegative potentielle PGC im Dottersack weit (3 mm) vom Embryo entfernt. Die potentiellen PGC liegen vorzugsweise zwischen dem entodermalen Epithel und dem extraembryonalen Mesenchym, das Blutgefäße mit ALP-negativen Blutzellen enthält. Andere PGC dieses Embryos liegen wie aufgefädelt in einer Ausbuchtung des Dottersackes (s. Abb. 29b). Eine solche Anordnung ist jedoch selten. Ys: Dottersack; V: Gefäße.

Abb. 11.

Männlicher Embryo Nr. 170, 24 Tage, ALP, x 140. Schnitt in Höhe der vorderen Darmpforte. Positive potentielle PGC sind in der weiteren Umgebung der hier unpaaren Aorta (A) verstreut. Eine PGC (Pfeil) ist auch am ventro-medialen Aspekt der Urniere (M) zu sehen.

Abb. 12.

Männlicher Embryo Nr. 170, 24 Tage, ALP, x 350. ALP-positive, lektinnegative potentielle PGC liegen im entodermalen Epithel des zweiten (II) und im Mesenchym des dritten (III) Kiemenbogens. Die dritte Kiemenbogenarterie (bA), die zweite Schlundtasche (Pp) und die Amnionhöhle (Amc) sind gekennzeichnet.

Abb. 13.

Embryo Nr. 165, 27 Tage, x 10. Dottersackstiel (Ys) und Allantois (Al) sind noch weit voneinander entfernt. Die Urniere (M) ist gut ausgebildet. Gliedmaßenknospen sind mit Sternen markiert.

Abb. 14.

Embryo Nr. 157, 31 Tage, x 140, 14a: MIB-1-IR, 14b: ALP. Querschnitt durch die Mitte der Gonadenleiste. Die starke Proliferationsaktivität des Coelothels dieser umschriebenen Region ist durch MIB-1-IR nachweisbar (14a). Putative

PGC in diesem Abschnitt der Gonadenleiste liegen im Coelothel bzw. darunter (14b). Einige putative PGC sind auch in der Mesenterialwurzel (Me) zu sehen. Gc: Riesenglomerulum des Mesonephros.

Abb. 15.

Embryo Nr. 157, 31 Tage, Heparansulfat, x 350. Schnitt durch die Mitte der Gonadenleiste. Das proliferationsaktive Coelothel und der dicht gelagerte Mesenchymkern (Mc) der Leiste sind durch eine diskontinuierliche Basallamina-ähnliche Schicht getrennt, die mit einem Antikörper gegen Heparansulfat reagiert. Diese Schicht enthält auch Laminin und reagiert mit AChE (Abb. 30) und BChE (nicht demonstriert). Die Basalmembranen des Riesenglomerulums (Gc) und der Bowman'schen Kapsel sind ebenfalls Laminin- und Heparansulfat-positiv, zeigen jedoch mit WFA und Esterasen negative Resultate.

Abb. 16.

Embryo Nr. 157, 31 Tage, WFA, x 350. Querschnitt durch das kraniale Drittel der Gonadenleiste. Die Heparansulfat-positiv Matrix (s. Abb. 15) ist auch WFA-positiv. Eine etwas schwächere WFA-Reaktion zeigt der Mesenchymkern (Mc) der Gonadenleiste. Die stark positiven putativen PGC (Pfeile) sind in Kontakt mit der subcoelothelialen Matrix, liegen aber auch tiefer im Mesenchym in der Nähe der Bowman'schen Kapsel.

Abb. 17.

Embryo Nr. 157, 31 Tage, ALP, x 225. Schnitt durch das craniale Ende der Gonadenleiste (progonadale Region bzw. „rete ridge“ nach Burns 1941). Zwei ALP-positive Blasteme nehmen ihren Ursprung aus der Kapsel des Riesenglomerulums (Gc): Das mediale stellt das Nebennierenrindenprimordium (Ad) dar, das auf dieser Schnitthöhe bereits in Differenzierung ist (Arrondierung um Gefäße). Es entspringt weiter cranial und liegt der Kapsel auf langer Strecke an. Das laterale Blastem (Pfeil) hat nur einen begrenzten Kontakt mit der Kapsel

(Hilusstiel) und erstreckt sich in die Gonadenleiste. Putative ALP-positive PGC dieser Region sind maskiert, wenn sie innerhalb der beiden Blasteme liegen. Für deren Identifizierung ist die Lektin histochemie notwendig.

Abb. 18.

Embryo Nr. 157, 31 Tage, ALP, x 40. Querschnitt durch die Gegend der Leber (L). Von den ALP-positiven Zellen der Leber reagiert nur ein Teil mit Lektinen. Weitere embryonale Strukturen sind ebenfalls ALP-positiv: Neuralrohr, Spinalganglien, Vorderdarmmesenchym und proximale Urnientubuli. Die Bowman'sche Kapsel des Riesenglomerulums (G) reagiert nur an bestimmten Stellen (Blastemabgänge, Harnpole). Der Wolff'sche Gang (Pfeil) und die Tubenproliferationszone, das Primordium des Müller'schen Ganges (Pfeilspitze) sind ebenfalls ALP-positiv.

Abb. 19.

Embryo Nr. 157, 31 Tage, WFA, x 40. Querschnitt auf der Höhe des Mitteldarms. Im Vergleich zu den Abb. 6 - 8 ist jetzt ein extrem langes dorsales Mesenterium (Me) auffällig. Nur in diesem Körperabschnitt sind auf ganzer Länge des Mesos Lektin-positiv putative PGC (Pfeile) zu finden. In der Regel sind die PGC auf zwei Lokalisationen beschränkt: Sie liegen in nächster Nähe des Darmrohres und vor allem in der Mesenterialwurzel nahe der medialen Coelombucht. Nur die letzteren haben eine realistische Chance, die Gonadenanlage durch aktive Migration zu erreichen (prospektive PGC).

Abb. 20 a, b, c.

Weiblicher Embryo Nr. 159, 34 Tage, x 140. 20a: WGA, 20b: ALP, 20c: Heparansulfat. Benachbarte Serienschnitte durch die caudale Hälfte einer frühen indifferenten Gonade (Gonadenfalte). Das mehrschichtige Coelomepithel ist vom Mesenchymkern der Gonade durch eine Heparansulfat-positive Schicht getrennt (Abb. 20 c). Coelothel und das darunterliegende Mesenchym sind hier beide ALP-

positiv (Abb. 20 b). Die Heparansulfat-positive Schicht korrespondiert mit ALP-negativen Arealen. ALP-positive PGC liegen in der Coelombucht, werden jedoch in der eigentlichen Gonade maskiert. Intragonadale PGC können daher nur mit Lektinen sichtbar gemacht werden (Abb. 20 a): Die Keimzellen liegen im allgemeinen in Kontakt mit der Heparansulfat-positiven Schicht; selten liegen sie im Mesenchymkern. Eine breite ALP-negative Zone wird zum Mesogonadium (Mg) und verbindet auch später Gonade mit Mesonephros (M) bzw. Epididymis oder Epoophoron. Das dorsale Darmmeso ist am oberen Bildrand zu sehen.

Abb. 21 a, b.

Embryo Nr. 14a, 35 Tage, ALP, 21a: x 30, 21b: x 140. 21a: Querschnitt durch die caudale Hälfte indifferenter Gonaden. Intragonadale PGC werden durch eine kräftige ALP-Reaktion des Gonadenblastems verdeckt. Eine große Anzahl potentieller PGC im ventrolateralen paraaortalen Gewebe (AGM-Region) ist auch mit Lektinen (STA, WFA) darstellbar und ist bei stärkerer Vergrößerung (Abb. 20 b) deutlich zu sehen. Die Orientierung der beiden Fotos zur Körperachse ist durch d: dorsal und v: ventral angegeben.

Abb. 22.

Männlicher Embryo Nr. 32, 37 Tage, STA, x 90. Querschnitt durch beide indifferente Gonaden. STA-positive PGC liegen vorwiegend in subcoelothelialer Position, aber auch innerhalb des mesenchymalen Kerns. Extragonadale PGC sind um die Coelombucht (C) herum aufgefädelt. Dorsales Mesenterium des Darms (Me) und Mesonephros (M) sind ebenfalls gekennzeichnet. Die Lektinbindung (STA und GSA I) der Gefäßendothelien (Aorta) beeinträchtigt nicht die sichere Identifizierung der PGC sondern gibt später zusätzliche Informationen über die geschlechtsunterschiedliche Vaskularisation der Gonaden.

Abb. 23 a, b, c.

Embryo Nr. 162, 35 Tage, x 140. 23a: STA, 23b: WGA, 23c: WFA. Querschnitte durch die rechte (a, b) und linke (c) Gonade in etwa derselben Höhe. In dieser Phase der Gonadenentwicklung ist die ALP-Reaktion für eine Identifizierung intragonadaler PGC besonders ungeeignet. Hier ist die Lektin histochemie die Methode der Wahl. Zwei PGC (Pfeile) sind auch im dorsalen Mesenterium (Me) in der Nähe der Coelombucht (Pfeilspitze) lokalisiert. In Abb. 23c ist der Kontakt von PGC mit dem WFA-positiven basallaminaähnlichen Material auffällig.

Abb. 24.

Weiblicher Embryo Nr. 9, 34 Tage, MIB-1-IR, x 225. Starke Proliferationsaktivität im mehrschichtigen Coelomepithel der indifferenten Gonade. Moderate Proliferationsaktivität in der Peripherie des mesenchymalen Kerns. Die MIB-1-negative subcoelotheliale Zone ist das bevorzugte Areal für die Lage von PGC. (vgl. mit Abb. 23). M: Mesonephros.

Abb. 25.

Weiblicher Embryo Nr. 9, 34 Tage, Laminin-IR, x 225. Der gleiche Embryo wie in Abb. 24, aber andere Seite und andere Schnitthöhe, deswegen unterschiedliche Größe. Die Proliferationsaktivitäten im Coelothel verlagern Teile der basallaminaähnlichen Lamin-, Heparansulfat-, AChE- und WFA-positiven Matrix ins Gonadeninnere. Die Translokation ursprünglich peripher situierter PGC in medulläre Positionen findet entlang dieser Leitschienen entlang statt (vgl. mit 23c).

Abb. 26 a, b.

26a: Weiblicher Embryo Nr. 9, 34 Tage, 26b: Embryo Nr. 185, 23 Tage, DBA, x 140.

Das Reaktionsmuster von DBA unterscheidet sich von dem anderer Lektine. In der Leberanlage (Abb. 26 a) bindet DBA an etwa die gleiche Anzahl potentieller PGC wie WFA, VVA, SBA und CAA. Im Keimfeld, in der Gonadenleiste bzw. -falte

sind nur einzelne PGC DBA-positiv (Abb. 26 b). Vergleiche Abb. 26 b mit den Abb. 7 und 8 (gleicher Embryo, ähnliche Schnitthöhe).

Abb. 27.

Embryo Nr. 147, 39 Tage, ALP, x 350. Die für die indifferente Gonade charakteristische positive ALP-Reaktion (siehe Abb. 20b, 21a, 28b) endet cranial in einem kompakten Blastem (Gb). Dieses Gonadenblastem steht in direkter Verbindung mit dem ebenfalls ALP-positiven Nebennierenrindenblastem (Ad) und durch einen Strang positiver Zellen (Pfeil) mit einer Invagination des Coeloms (Cc) in der medialen Coelombucht. Die letztgenannte Struktur repräsentiert eines von mehreren Nephrostomata und wird häufig als coelotheliale Komponente beider Blasteme fehlinterpretiert (siehe auch Abb. 28 a, 32, 33, 41, 43, 55 b). Das Coelothel sowie das darunterliegende Mesenchym (prosp. Tunica albuginea) sind hier im Gonadenblastem (Pfeilspitze) immer ALP-negativ (siehe hierzu Abb. 20b und 21a); dadurch sind dort die wenigen PGC des Hilusbereichs auch mit der ALP-Reaktion zu sehen. Gc: Riesenglomerulum.

Abb. 28 a, b, c.

Embryo Nr. 147, 39 Tage, x 55. 28a: WFA, 28b: ALP, 28c: WGA. Drei Längsschnitte mit sagittaler (dorso-ventraler) Schnittführung durch die rechte indifferente Gonade kurz vor der geschlechtlichen Differenzierung. Nur diese Schnittführung - nicht die medio-laterale - erlaubt folgende Befunderhebungen: a) Das mesonephrogene Riesenglomerulum (Gc) reicht über das Niveau des adrenalen Blastems (Ad) hinaus nach cranial und andererseits erstreckt es sich über die ganze Länge des Mesonephros bis zum caudalen Ende der noch langgestreckten Gonade, d. h. es nimmt die ganze Länge des Mesonephros ein. b) Die PGC nehmen bevorzugt eine subcoelotheliale Lage ein, und die Mehrzahl liegt mesonephrosabgewandt (abmesogonadal, links). In der Hilusregion liegen nur wenige PGC, die am sichersten mit Lektinreaktionen dargestellt werden können (Pfeile). Kurz vor der Gonadendifferenzierung beginnt die ALP-Reaktion sich in

einer geschlechtstypischen Weise zurückzuziehen (Abb. 28b), wie es im Text beschrieben wird.

Abb. 29 a, b.

Embryo Nr. 185, 23 Tage, ALP, 29a: x 40, 29b: x 25. 29a zeigt einen Querschnitt in Höhe des Mitteldarms wie Abb. 9. Die mediale Coelombucht liegt oberhalb des dorsalen Dottersackwandabschnittes. Die ALP-positiven Mesenchym- und Coelothelregionen des prospektiven Darmabschnittes sind durch eine dünne Lage ALP-negativer extrazellulärer Matrix (bei dieser Vergrößerung kaum sichtbar) getrennt (vgl. ähnliche Situation im Gonadenblastem der Abb. 20 b). Das ALP-positive palisadenähnliche Coelothel des Keimfeldes maskiert bereits in diesem frühen Zeitraum eventuell dort vorhandene PGC (vgl. Abb. 9). Einschnürungsstelle des dorsalen Dottersackwandabschnittes (Pfeile), Dotter (Pfeilspitze), Dottersack (Ys), Lateralfalten (L). Abb. 29b verdeutlicht die Dimensionen von Embryo und Dottersack sowie die Distanz der PGC im Dottersack zum Embryo im Bereich der hinteren Darmpforte. Schnittführung und Dottersacklage erlauben nicht die Darstellung der tatsächlich vorhandenen Kontinuität von Embryo und Dottersack. Die 10 PGC im Dottersack (Pfeil in Abb. 29b) (von etwa 100 gezählten PGC) liegen bei diesem Embryo ausschließlich wie aufgefädelt in einer separaten Bucht. PGC sind auch im Darmmesenchym und der Coelombucht intraembryonal ALP-positiv.

Abb. 30.

Embryo Nr. 157, 31 Tage, AChE, x 140. Querschnitt durch die Gonadenleiste kurz vor der Gonadenabfaltung. Während Laminin-IR und Heparansulfat-IR auch die Basalmembran anderer Strukturen markiert (Abb. 15), ist die AChE-Positivität exklusiv diesem definierten subcoelothelialen Matrixbereich der Gonadenleiste vorbehalten. Das aufliegende Coelothel sowie die periphere Zone des anschließenden Mesenchymkernes sind hier besonders proliferationsaktiv (siehe Abb. 14). In dieser besonderen Matrix lagern die meisten PGC. Nur im Abschnitt

der prospektiven Gonadenfalte verlagert sich dieses markante Areal von der medialen Coelombucht nach lateral und kommt ventromedian der Urniere zu liegen. Die meisten Blutzellen im Riesenglomerulum (Gc) und Mesenterium (Me) sind ebenfalls AChE-positiv. v: ventral; d: dorsal.

Abb. 31.

Embryo Nr. 162, 35 Tage, AChE und NADPH-TRed- Doppelreaktion, x 140. Querschnitt durch die Mitte der Gonadenfalte; das schwach AChE-positive parazentrale Blastem löst sich abmesogonadal auf. Die Doppelinkubation mit NADPH-TRed ermöglicht in diesem Zeitraum die Identifizierung einiger PGC (Pfeile) in der Peripherie der Gonade. Riesenglomerulum (Gc); Urnientubuli (Mt); dorsales Meso (Me).

Abb. 32.

Weiblicher Embryo Nr. 81, ca. 47 Tage, Laminin, x 140. Ausschnitt vom Hilusbereich der Abb. 59. Die organisierte Netzstruktur des Reteblastems verliert sich in der Gonade und im Auflösungsbereich der Bowman'schen Kapsel des Riesenglomerulums (vgl. mit Abb. 54 und 53b). Eine differenzierte Struktur, die als Nephrostom zu identifizieren ist, verbindet Reteblastem mit der Coelomhöhle (Pfeil). Gc: Riesenglomerulum; Cc: Coelom.

Abb. 33.

Embryo Nr. 147, indifferente Gonade, 39 Tage, WFA, x 140. Ausschnitt vom Hilusbereich der Abb. 28 a. In der Coelombucht (Cb) liegen WFA-positive PGC an der Coelomöffnung und im Gang eines Nephrostoms (Pfeil). Die Verbindung dieser Struktur zum WFA-positiven Blastem (Pfeilspitzen) ist durch die Schnittführung nicht erhalten (siehe aber dazu Abb. 54, 56 und 52 b). Zum geschlechtsunterschiedlichen Verhalten des WFA-positiven Gonadenblastems siehe Abb. 54 und 55 a, b.

Abb. 34 a, b, c.

34a: Embryo Nr. 9, 34 Tage, LNGFR-IR, x 55; 34b: Männlicher Embryo Nr. 156, ca.42 Tage, LNGFR-IR, x 90; 34c: Weiblicher Embryo Nr. 145, ca. 50 Tage, LNGFR-IR, x 40. Querschnitte jeweils durch die Gonadenmitte. Die Rezeptoren für den NGF sind bei 34 a deutlich im Grenzstrang (Sy), um das Darmrohr (G), sowie um einzelne mesonephrogene Gefäße (Pfeil) ausgebildet. Die Topographie der kräftigen Immunreaktion im distalen Teil des dorsalen Mesenteriums (Me) entspricht der ALP-Reaktion an gleicher Stelle (Abb. 18); die MIB-1-IR dieses dorsalen Mesoabschnittes ist ebenfalls deutlich erhöht und weist dadurch diesen darmnahen Teil des Mesenteriums als proliferationsaktiv aus. Die Mesowurzel (Mr) ist bei allen drei Reaktionen negativ. Die Besonderheit des gonadalen Mesenchyms kommt durch eine moderate LNGFR-IR zum Ausdruck (Pfeilspitzen). ALP ist in der Gonade an dieser Stelle negativ, das LNGFR-negative Gonadenareal in dieser Schnitthöhe ALP- positiv. Die LNGFR-Immunreaktion wird nach der gonadalen Differenzierung geschlechtstypisch beibehalten (34 b und c). Gc: Riesenglomerulum; Mt: Urnientubulus.

Im frühen Hoden (34b) sind besonders kräftige Reaktionen des Mesenchyms im peripheren Markbereich zu sehen. Von dort differenzieren sich die Präsertolizellplatten. Dort treten die ersten steroidpositiven Zellen auf (vgl. mit Abb. 35 und Abb. 36). Mt: Urnientubulus.

Im frühen Ovar (34c) reagiert das Mesenchym der Medulla im Bereich der Markstränge (Mc) und im Cortex (Co). Die Subcorticalis (Sc) ist wie die Tunica albuginea des Hodens in Abb. 34b negativ. Vgl. Abb. 34c mit den Abb. 49a, 49b, 51, 53a, 53c, 56, 58. Ad: Nebennierenanlage; V: Urnierengefäße.

Abb. 35.

Männlicher Embryo Nr. 156, ca. 42 Tage, WGA, x 90. Querschnitt in Höhe der Gonadenmitte (gleiche Schnitthöhe wie Abb. 34b). Das Interstitium reagiert schwach mit WGA. Nur wenige PGC liegen in den peripheren Präsertolizellaggregaten. Die meisten PGC sind in der subcoelothelialen

Mesenchymschicht zu finden. Das Reteblastem ist mit einem Stern gekennzeichnet.
M: Mesonephros; Gc: Riesenglomerulum.

Abb. 36.

Männlicher Embryo, ca. 43 Tage, AChE, x 90. Querschnitt durch die Gonadenmitte. In der Kontaktzone mit der subcoelothelialen Mesenchymschicht (Tunica albuginea) sind die stark AChE-positiven Zellplatten deutlich breiter. Der Zustrom mesonephrogener Zellen aus dem Reteblastem (*) erfolgt zentrifugal, die Differenzierung zentripetal. Die moderate AChE-Reaktion der PGC wird durch die starke AChE-Expression der Präsertolizellen überdeckt. Ohne Doppelinkubation sind hier auch in der prospektiven Tunica albuginea keine PGC zu identifizieren.

Abb. 37.

Männlicher Embryo Nr. 126; ca. 47 Tage, WGA, x 140. Ausschnitt aus einem Hoden. Gonadenmitte. Die PGC in den Hodensträngen haben im Vergleich zu Abb. 35 deutlich zugenommen und entsprechen den M-Prospermatogonien nach Hilscher (1974). Einige liegen dennoch in der äußeren Schicht der Tunica albuginea (Pfeile). Eine moderate WGA-Reaktion des Interstitiums (Pfeilspitzen) läßt die Hodenstränge mit den PGC besser hervortreten.

Abb. 38.

Weiblicher Embryo Nr. 145, ca. 54 Tage, AChE/NADPH-TRed, x 55. Im Längsschnitt werden die Länge des AChE-positiven Gonadenblastems zu diesem Zeitpunkt sowie der Ursprung aus der Bowman'schen Kapsel (Gc) besonders deutlich. Das Blastem löst sich in der weiblichen Gonade auf. Die PGC in den Keimballen des Cortex sind deutlich identifizierbar. Dieselbe Gonade und Schnittführung wie Abb. 59 (Laminin) bzw. Abb. 54 (WFA). Pfeilspitzen verdeutlichen die Länge des Gonadenblastems. K: Nachniere.

Abb. 39.

Weiblicher Embryo Nr. 145, ca. 54 Tage, WFA/NADPH-TRed, x 90. Längsschnitt durch das Ovar, Folgeschnitt von Abb. 38. In der Doppelinkubation mit NADPH-TRed läßt sich mit WFA, im Gegensatz zu AChE, die topographische Lage medullärer PGC demonstrieren. Pfeilspitzen deuten auf ein bandförmiges NADPH-TRed-positives wolkiges Areal im Bereich von Marksträngen und Hilus. Diese Zone ist bei der Überprüfung mit 3 β -HSDH positiv (vgl. Abb. 49a). Medulläre PGC im Ovar lassen sich mit der ALP-Reaktion aufgrund der ALP-Reaktion des Blastems nicht identifizieren (vgl. Abb. 43, 44 und 53b).

Abb. 40.

Männlicher Embryo Nr. 83, ca. 40 Tage, LAP, x 90. Querschnitt durch die Gonadenmitte. Bereits zu diesem Zeitpunkt wird der Kern des AChE- und ALP-positiven männlichen Gonadenblastems LAP-positiv. Diese Reaktion charakterisiert den Beginn der Retedifferenzierung und ist bei beiden Geschlechtern charakteristisch für das Rete und die Abkömmlinge der Urniere. PGC-Funde im LAP-positiven Bereich sind eher selten. M: Mesonephros; K: Nachniere

Abb. 41.

Männlicher Embryo Nr. 33, ca. 42 Tage, AChE/Hämatoxylin, x 140. Querschnitt im Hilusgebiet mit deutlicher Zonierung der Gonade. Der AChE-positive Kern steht in Kontakt mit der Bowman'schen Kapsel. Das Coelothel ist mehrschichtig; die dazwischen liegende mesenchymdichte Zone ist im Hilusgebiet besonders breit und AChE-, ALP- und LAP-negativ (prospektive Tunica albuginea). Der Pfeil zeigt auf ein Nephrostom in der medialen Coelombucht (Cb). Me: Mesenterium; Gc: Riesenglomerulum.

Abb. 42.

Männlicher Embryo Nr. 101, ca. 48 Tage, AChE, x 55. Querschnitt im oberen Gonadendrittel. Das parazentrale, schwach AChE-positive Blastem bildet stark

AChE-positive Präsertolizellplatten. Dieser Differenzierungsprozess erfolgt von caudal nach cranial, von medial nach lateral und von außen nach innen und ist hier im cranialen Abschnitt der Gonade angekommen (vgl. mit Längsschnitt von Abb. 47, einer etwa gleich alten Gonade). Cb: Coelombucht; Gc: Riesenglomerulum.

Abb. 43.

Weiblicher Embryo Nr. 131, ca. 45 Tage, ALP, x 140. Ein Querschnitt im cranialen Gonadendrittel unterscheidet sich nicht bei beiden Geschlechtern. Die Verbindung des Blastems mit der Bowman'schen Kapsel liegt etwas cranial dieser Schnitthöhe. Eine Verbindung des ALP-positiven Blastems zur Coelomhöhle (Nephrostom) ist deutlich ALP-positiv (Pfeil). Im Coelothel und subcoelothelial liegen einige wenige PGC. Die Dreischichtung der Gonade ist mit der ALP-Reaktion im Vergleich zu Abb. 41 undeutlich. Gc: Riesenglomerulum; Cb: Coelomkontakt des Blastems in der medialen Coelombucht (Nephrostom).

Abb. 44.

Weiblicher Embryo Nr. 173, ca. 45 Tage, ALP, x 55. Querschnitt durch die Gonadenmitte. Die PGC des Cortex sind gut zu sehen. Das ALP-positive Blastem ist in dieser Schnitthöhe noch kompakt und verdeckt medulläre PGC. Der Rückzug der ALP-Reaktion aus dem Blastem findet im Vergleich zu gleichaltrigen männlichen Embryonen später - und zuerst aus den interstitiellen Zellen - statt. Das Nebennierenrindenblastem (Ad) ist ALP-positiv, jedoch AChE-, WFA- und LAP-negativ. Sp: Milz; G: Darm; Go: Gonade.

Abb. 45.

Männlicher Embryo Nr. 144, ca. 43 Tage cm, AChE/NADPH-TRed, x 140. Querschnitt durch die caudale Hälfte des Hodens unmittelbar nach der Gonadendifferenzierung. In der breiten subcoelothelialen Mesenchymschicht sind - durch die Doppelinkubation mit NADPH-Reductase - relativ viele PGC darstellbar (Pfeile). Aus dem parazentralen, moderat AChE-positiven Gonadenblastem (*)

differenzieren sich die ersten Präsertolizellaggregate (Hatchett-Braun) (vgl. auch Abb. 42 und 46). Um die breiten, peripheren Aggregate in der Kontaktzone mit der prosp. Tunica albuginea sieht man schwach blau gefärbte Areale. Bei diesen NADPH-T-Red- positiven Zonen handelt es sich um Ansammlungen von embryonalen Leydigzellen. Die Reaktion ist auf die Zunahme mitochondrialer Aktivität zurückzuführen. In der Embryonalzeit läßt sich Cholinesterase histochemisch in jeder Organanlage nachweisen, wenn sich die Organstruktur formt. Embryonale Zellen benutzen während der Morphogenese den Neurotransmitter ACh zur Kommunikation. Nur morphogenetisch aktive Zellbezirke zeigen einen braunen Farbniederschlag (Hatchett-Braun). Mt: Urnientubuli.

Abb. 46.

Männlicher Embryo Nr. 52, ca. 42 Tage, AChE/ NADPH-T-Red, x 55. Ein Längsschnitt durch eine etwa gleichaltrige Gonade wie in Abb.45 zeigt den Abgang des Blastems von der Bowman'schen Kapsel des Riesenglomerulums und die einsetzende Differenzierung in der Peripherie der caudalen Gonadenhälfte. Die Überfärbung mit NADPH-T-Red, sichtbar an der starken Reaktion der Urnientubuli (Mt), überdeckt die moderate AChE-Reaktion des Blastems im Gonadeninneren. Eine Mischzone beider Enzymreaktionen ist im Hilusgebiet ausgebildet. Gc:Riesenglomerulum.

Abb. 47.

Männlicher Embryo Nr. 98, ca. 51 Tage, AChE + Diaphorase, x 55. Längsschnitt. Der caudo-craniale Differenzierungsprozess hat den oberen Gonadenpol erreicht (siehe auch Abb. 42). Der moderat AChE-positive Blastemstiel (*) hat Kontakt mit der Kapsel des Riesenglomerulums (Pfeil). Die PGC in den Hodensträngen sind maskiert, aus der Tunica in der Regel verschwunden (vgl. mit Abb. 52 a, b, c). Das Verhältnis von AChE/NADPH-T-Red-positiven Abschnitten der Urnientubuli (Mt) ändert sich mit dem Funktionszustand der Urniere. Es ist möglicherweise

auch geschlechtsunterschiedlich. Auf die Möglichkeit einer biologisch wichtigen Steroidproduktivität mesonephrogener Tubuluszellen weist Abb. 49 hin. Gc: Riesenglomerulum.

Abb. 48.

Männlicher Embryo Nr. 123, ca. 48 Tage, AChE/NADPH-TRed, x 140. Ein Querschnitt durch die Gonadenmitte zeigt die fortgeschrittene Organisation der Hodenstränge, sowie eine retenahe Konzentration fötaler Leydigzellareale. Die Zahl der PGC in den Hodensträngen hat zugenommen, wird aber durch die starke AChE-Expression der Sertolizellen maskiert. Vergleiche aber entsprechende Stadien mit Lektin histochemie (Abb. 53, 54, 55 sowie Abb. 37). Das Reteblastem ist durch einen Stern markiert.

Abb. 49 a, b.

Weiblicher Embryo Nr. 92, ca. 47 Tage, 49a: 3β -HSDH, x 55; 49b: NADPH-TRed, x 55. Querschnitt durch das craniale Drittel der weiblichen Gonade. Die Topographie von NADPH-TRed- und 3β -HSDH-positiven Zellen im Bereich der Markstränge (halbkreisförmige Anordnung) korrelieren deutlich (Nachbarschnitte). Die optisch deutlichere Farbgebung sowie die bessere Kombinierbarkeit mit der AChE-Reaktion rechtfertigt die Routineanwendung mit NADPH-TRed zur Darstellung steroidproduzierender Areale beim männlichen und weiblichen Embryo dieses Alters. Zur Kontrolle wurde die 3β -HSDH-Reaktion stichprobenartig eingesetzt. Die Information zur Lage der PGC zu diesen Arealen geben die Abb. 39 sowie die Abb. 54 und 56.

Abb. 50.

Weiblicher Embryo Nr. 145, ca. 53 Tage, AChE/NADPH-T-Red, x 90. Ein Querschnitt demonstriert die rasch anwachsenden PGC-Zahlen im Cortex. Er zeigt außerdem deutlich, daß die steroidproduzierenden Areale nicht in der gesamten Region der Markstränge, sondern in dieser Schnitthöhe nur unmittelbar um das

Reteblastem (*) konzentriert sind. Vgl. dazu die Topographie steroidproduzierender Areale des Hodens in Abb. 48. Sc: Subcorticalis .

Abb. 51.

Weiblicher Embryo Nr. 92, ca. 47 Tage, AChE, x 90. Dieselbe Gonade und Schnitthöhe wie Abb. 49. Auf die Homologie von Präsertolizellen und Zellen der Markstränge verweist eine punktuelle AChE-Positivität von Zellen dieser Markstränge. Reteblastem (*) und Subcorticalis (Sc), dazwischen die Markstränge (medullary cords bzw. intragonadales Rete). Eine leichte AChE-Reaktion ist auch im mesenchymalen Teil des Cortex auffällig; das negative Coelothel des Ovars ist deutlich erhöht. Gc: Riesenglomerulum.

Abb. 52 a, b, c.

Männlicher Embryo Nr. 126, ca. 47 Tage, 52a: STA, 52b: ALP, 52c: WFA, x 55. Drei Längsschnitte durch den Hoden mit verschiedenen Markern demonstrieren die Schwierigkeiten bei der Identifizierung der Keimzellen. Deutlich wird die parazentrale Lage des späteren Mediastinums (*) und die Zunahme der PGC in den Hodensträngen zu diesem Zeitpunkt. Die Identifizierung der PGC wird bei STA durch die Lektinbindung der Gefäßendothelien besonders in der Tunica erschwert. Bei ALP und WFA sind es die interstitiellen Zellen des retenahen Areals, die positiv reagieren und dadurch die Übersichtlichkeit beeinträchtigen. Die ALP-Aktivität hat sich erst zu diesem Zeitpunkt aus den foetalen Sertolizellen zurückgezogen ermöglicht aber dann bis 10 cm SSL eine Identifizierung der PGC mit dieser Reaktion. WGA (siehe dazu auch Abb. 35 und 37) bindet dagegen in der Gonade spezifisch an PGC; somatische Hodenzellen reagieren nicht. Mg: Mesogonadium.

Abb. 53 a, b, c.

Weiblicher Embryo Nr. 16, ca. 47 Tage und Nr. 81, ca. 47 Tage, 53a: Nr. 16, STA, x 55, 53b: Nr. 81, ALP, x 55, 53c: Nr. 16, WFA, x 25. Der Längsschnitt mit

ALP (53b) verdeutlicht noch einmal (siehe AChE-Reaktion Abb. Nr. 38, sowie Lamininreaktion Abb. 32) die Länge des Blastems in der weiblichen Gonade. (Zum selben Zeitpunkt hat sich im Hoden die ALP-Reaktion bereits aus den Sertolizellen zurückgezogen). ALP-positive Zellen sind nur im Cortex zu sehen. STA erschwert auch im Ovar an manchen Stellen die Differenzierung der PGC vom Gefäßendothel. Das PGC-freie Areal ist das Reteblastem (*). Die medullären PGC sind besonders deutlich mit WFA (und WGA) darstellbar (Abb. 53 c; vgl. auch Abb. 39). Die WFA-Bindung einiger interstitieller Zellen mesonephrogener Herkunft ist an Längsschnitten (wie in Abb. 54) noch deutlicher zu sehen, behindert jedoch im Ovar nicht die Identifizierung der PGC mit WFA-Lektin. K: Niere; M: Urniere; Mg: Mesogonadium.

Abb. 54, 55 a, b.

Abb. 54. Weiblicher Embryo Nr. 81, ca. 47 Tage, WFA, x 140.

Abb. 55 a, b. Männlicher Embryo Nr. 98, ca. 50 Tage, 55a: WFA, x 55, 55b: WFA, x 140 (Ausschnitt von a). Längsschnitte durch eine männliche (Abb. 55 a, b) sowie eine weibliche (Abb. 54) Gonade etwa gleichen Alters. Das WFA-positive Blastem erstreckt sich über den kranialen Anfang des Riesenglomerulums (Gc) hinaus und erhält eine breite Kontaktfläche zum Coelomepithel (3 Pfeilspitzen) in der Tubenproliferationszone. Weitere Coelomkontakte (Nephrostomata) sind als Inskriptionsstellen des Reteblastems (55b) durch eine zusätzliche Einziehung der Coelotheloberfläche sowie einem Verblässen der moderaten WFA-Reaktion des Coelothels dieser Stellen markant (2 Pfeilspitzen). Einige WFA-positive potentielle PGC liegen in den Kapillarschlingen des Riesenglomerulums (Pfeile). Eine sichere Identifizierung WFA-positiver Zellen in den retenahen Strängen wird durch die WFA-Reaktion interstitieller Zellen mit auffallend peritubulärer Lokalisation erschwert. Der Zusammenhang dieser WFA-positiven Zellen mit den WFA-positiven Zellen des Blastems kann durch Schnittserien belegt werden; eine

mesonephrogene Herkunft bzw. Beeinflussung ist daher wahrscheinlich¹. Ein Zusammenhang von Blastem und interstitiellen Zellen wird auch mit ALP deutlich (Abb. 52 b). ALP ist zu dieser Zeit im Gegensatz zu WFA in allen Zellen des Blastems positiv und im Interstitium in denjenigen Zellen, die mit 3 β -HSDH bzw. NADPH-T-Red als fötale Leydigzellen verifizierbar sind (Abb. 45). Eine Selektion peritubulärer Zellen ist mit ALP, anders als bei WFA, nicht festzustellen. Die Identifizierung von PGC im Cortex der weiblichen Gonade (Abb. 54) ist hier einfacher: Die WFA-Lektinbindungsfähigkeit von Zellen mesonephrogener Herkunft ist auf medulläre hilusnahe Areale beschränkt, die mit den steroidproduzierenden Zellarealen der Abb. 49 a, b und 50 übereinstimmen dürften. Die Darstellung der tatsächlich vorhandenen Blastemkontinuität sowie die wahre Länge des Blastems ist aufgrund der Ovarkrümmung bei gerader Schnitfführung - wie in Abb. 53b auch - selten möglich. Gc:Riesenglomerulum; Mt:Urnierentubuli.

Abb. 56.

Embryo Nr. 16, ca. 47 Tage, Laminin, x 90. Schnitt durch Ovarmitte zeigt bereits den typischen Aufbau des Rinderovars zu dieser Zeit kurz nach der Gonadendifferenzierung. Eine Keimballenbildung im Cortex (Co) ist bereits erfolgt; eine lamininpositive Matrix, die nicht überall kontinuierlich ist, grenzt die Keimballen mit den PGC von der Subcorticalis (Sc) ab. Coelothel und Keimballenschicht werden durch keine Membran getrennt, der Übergang ist kontinuierlich. Die vaskularisierte (durch GSA I oder STA darstellbare)

¹ Vereinzelt Funde steroidaktiver Nebennierenrindenorgane (> 1cm) mit typisch adultem Aufbau im Epoophoron adulter Rinder (unveröffentlicht) sind ein weiterer Hinweis auf die mesonephrogene Herkunft steroidproduzierender Zellen. Bei Vögeln (Emu) ist eine Transformation epigenitaler Mesonephrostubuli (Ductuli aberrantes) zu Interrenalknötchen - bei Nichtanschluß an das Retesystem der Gonade - nachgewiesen (Budras et al. 1980, 1987). Das bevorzugte Proliferieren dieser steroidproduzierenden Stränge in die Nebennierenkapsel ist offenbar die Folge der persistierenden tropographischen Anatomie der Hühnervögel: Der Deszensus der Gonaden führt bei Mammaliern zur frühen Trennung von Nebenniere und Gonade. Die gemeinsame Steroidproduktion weist aber zeitlebens auf die gemeinsame Wurzel im intermediären Mesoderm hin (Abb. 27). Funde von akzessorischen Nebennierenrinden im Lig. latum des Menschen werden seit Marchand (1883) als Marchand'sche Nebennieren bezeichnet.

Subcorticalis (Sc) trennt Rinde und Mark unvollständig. Die verdichteten Stränge in der Medulla (Pfeilspitzen) stellen die Markstränge dar. Der im Vergleich zum Hoden (Abb. 57) vollkommen verschiedene Aufbau der ovariellen extrazellulären Matrix kommt bei der direkten Gegenüberstellung deutlich zum Ausdruck.

Zur Lage der PGC in dieser Schnitthöhe orientieren die Abb. 54, 53 a, c und Abb. 39. Den Zusammenhang mit dem Gonadenblastem vermitteln die Abb. 54, 53 b und Abb. 38. Über die Beziehung der Lamininstrukturen zu den steroidproduzierenden Arealen informieren Abb. 49a, b sowie Abb. 50.

Abb. 57.

Männlicher Embryo Nr. 34, ca. 44 Tage, Laminin, x 225. Querschnitt in der caudalen Gonadenhälfte. Deutlich vaskularisierte Tunica und Verbreiterung der Hodenstränge in der Peripherie (Pfeile). Dort sind zu dieser Zeit auch die meisten PGC (vgl. WGA in Abb. 35) sowie NGF-Rezeptoren (Abb. 34 b) zu finden. Mediastinum mit Reteblastem (*).

Abb. 58.

Weiblicher Embryo Nr. 6, ca. 55 Tage, Laminin, x 55. Der Querschnitt zeigt die fortgeschrittene Keimballenbildung. Am Hilus (Pfeilspitze) stehen sie in Kontakt mit den Marksträngen: Die Subcorticalis ist hier deutlich überbrückt. Reteblastem (*). Zur mutmaßlichen Bedeutung von Cortex-Medulla-Kontakten (Meioseinduktion, Kontribution mesonephrogener Zellen zu den Prägranulosazellen) siehe Text. Gc: Riesenglomerulum.

Abb. 59.

Weiblicher Embryo Nr. 81, ca. 47 Tage, Laminin, x 55. Längsschnitt. Das Gonadenblastem ist im Hilus deutlich organisiert, an der Bowman'schen Kapsel und im Gonadeninneren desorganisiert. Die vollkommen unterschiedlichen Bilder, die sich aus verschiedenen Höhen von Querschnitten ergeben, sind bei Kenntnis dieses Längsschnittes leichter nachvollziehbar. Die PGC sind an die Peripherie

gedrängt (Abb. 54, gleiche Gonade, gleiche Schnittführung). Der lamininkonturierte Retestrumpf ist mit ALP-positiven (Abb. 53 b) bzw. AChE-positiven (Abb. 38) Blastemzellen gefüllt. Nicht alle Zellen des Blastems binden aber WFA (Abb. 54). Ein Ausschnitt (Abb. 32) von Abb. 59 repräsentiert den Coelomkontakt (Nephrostom) in der medialen Coelombucht (Pfeil) deutlicher. Cc: Coelom; Cb: mediale Coelombucht; Gc: Riesenglomerulum; K: Niere.

5.2 Legenden zu den Tabellen

5.2.1 Legende zu den Tabellen 1a, b

Tabelle 1.

Liste der untersuchten Rinderembryonen (föten) sowie Erklärung der Hochzahlen:

- 1: Künstliche Besamung (KB) - gezielte Schlachtung
- 2: Serielle Schnitte durch den ganzen Embryo
- 3: Geschlechtsbestimmung durch PCR (m; w)
- 4: Serielle Bearbeitung der indifferenten Gonade und selektiv repräsentative Schnitte vom Rest des Embryos

Embryonen ohne ¹ wurden in verschiedenen Schlachthöfen gesammelt. Von Embryonen ohne ² oder ⁴ wurden repräsentative Schnitte angefertigt. Nur das Alter von Embryonen, die durch kontrollierte Insemination (p. i.) gewonnen wurden, ist das wahre Alter; das Alter aller anderen Embryonen wurde aufgrund von SSL-Messungen sowie ontogenetischer Reife kalkuliert bzw. aus den Längen-Alters-Angaben vorhandener Tabellen in der Fachliteratur (siehe Rüsse 1991) entnommen. Die Bestimmung des Alters allein aufgrund der Längenmessung ist sehr unzuverlässig; Embryonen gleichen Alters unterscheiden sich beträchtlich in der Länge. Dies liegt sicher zum Teil an den bemerkenswerten Unterschieden in der frühen Ontogenese: 8 Tage alte Rinderembryonen können noch in der frühen Morula sein oder sind bereits aus der Zona pellucida geschlüpft (elongiertes Blastozystenstadium).

Die Geschlechtsbestimmung mittels PCR wurde aufgrund von Untersuchungen (Mittwoch 1989) durchgeführt, die eine geschlechtsunterschiedliche Wachstumsrate vor der Gonadendifferenzierung bei Ratten beobachten. Bei Rinderembryonen mit indifferenten Gonaden sind keine Unterschiede, zumindest was Zahl und Lokalisation der PGC betrifft, feststellen.

5.2.2 Legende zu Tabelle 2

Liste der angewandten Lektine mit Angabe der geeigneten Arbeitskonzentrationen. Abkürzungen der Glykokonjugate: Fuc: Fucose; Gal: Galactose; GalNac: N-acetylgalactosamin; Man: Mannose; NeuNac: N-acetylneuraminsäure.

5.2.3 Legende zu Tabelle 3

Lokalisation der verschiedenen Entwicklungsstadien boviner PGC. Die Stationen der Keimbahn sind besonders hervorgehoben (Fettdruck). In Normalschrift festgehaltene Lokalisationen unterstreichen die duale Möglichkeit der „PGC“ in Gametogenese und Hämatopoese.

6. Tabellen und Abbildungen

6.1 Tabellen

Tabelle 1a

Nummer des Embryos	Scheitel-Steiß-Länge (SSL) in mm	Alter (in Tagen)
200 ^{1,2,3} m		18
202 ¹		20
203 ¹		22
167 ¹		22
185 ^{1,2}		23
170 ^{1,2,3} m		24
166 ^{1,2}		25
165 ^{1,2}		27
143 ^{1,2}		29
115 ^{1,2,3} f		29
160 ^{1,2,3} m		30
157 ^{1,2}		31
161 ^{1,2,3} m		32
11 ³ m	11.0	33
159 ^{1,3,4} f		34
9 ³ f	13.0	34
162 ^{1,4}		35
158 ^{1,4}		35
14 a	13.0	35
14 b	13.5	35
32 ³ m	14.0	36
204 ^{1,3,4} f		37
24 ³ m	15.0	37
153 ^{1,4}		38
175 ^{1,4}		38
27 ³ f	17.0	38
147	18.0	39
29 ³ m	18.0	39
124	19.0	39
128	19.0	39
140	18.0	39
53	19.0	39
106 ³ f	19.0	39

Tabelle 1b

Nummer des Embryos	Scheitel-Steiß-Länge (SSL) in cm	Alter in Tagen
205 w	2.0	40
83 m	2.1	
82 m	2.2	
113 w	2.3	
52 m	2.3	
156 m	2.3	
114 w	2.4	
8 m	2.4	
33 m	2.4	
34 w	2.5	
114 m	2.5	
186 w	2.5	
171 m (Zwilling)	2.7	45
131 w	2.8	
129 w	2.8	
187 w	3.0	
174 w	3.0	
92 w	3.1	
81 w	3.3	
112 m	3.3	
74 w	3.3	
211 m	3.4	
35 m	3.5	
123 m	3.5	
126 m	3.5	
84 m	3.6	
138 m	3.7	
201 m	3.7	
199 w	3.8	
98 m	3.9	50
101 m	3.9	
176 w	3.9	
97 m	4.0	
100 m	4.0	
155 w	4.0	
194 m	4.0	
64 w	4.4	

Tabelle 1b (Fortsetzung)

Nummer des Embryos	Scheitel-Steiß-Länge (SSL) in cm	Alter in Tagen
198 m	4.5	
172 m	4.5	
145 w	4.5	
173 w (Zwilling)	4.5	
142 m	4.6	
134 w	4.7	
6 w	4.8	55
197 m	5.0	
36 m	5.0	
108 w	5.0	
136 m	5.0	
89 w	5.1	
111 w	5.2	
196 m	5.2	
110 w	5.3	
95 w	5.4	
120 m	5.9	
85 w	6.0	
132 w	6.0	
150 w	6.0	
80 w	6.1	
130 m	6.2	
88 w	6.5	
122 w	6.5	
104 m	6.6	60
3 m	7	
37 w	7	
107 w	7	
109 m	7	
121 m	7	
190 m	7	
209a w (Zwilling)	7	
209b m (Zwilling)	7	
51 m	7.3	
13 w	8	
96 m	8	
98 w	8	

Tabelle 1b (Fortsetzung)

Nummer des Embryos	Scheitel-Steiß-Länge (SSL) in cm	Alter in Tagen
146 m	9	
38 w	10	75
65 m	10	
137 w	10	
164 w	10	
191 m	10	
207 m	10	

Tabelle 2

Lektin		Lektinbindungsstelle	Arbeitskonzentration
Taxonomische	Abkürzung	(erkanntes Glykoconjugat)	des Lektins
Bezeichnung			
Agaricus bisporus	ABA	β -D-Gal(1 \rightarrow 3)-D-GalNac	0,008 μ g/ml
Anguilla anguilla	AAA	α -L-Fuc	0,125 μ g/ml
Arachis hypogaea	PNA	β -D-Gal(1 \rightarrow 3, 4)-D-GalNac	0,01 μ g/ml
Bauhinia purpurea	BPA	α - and β -GalNac	0,031 μ g/ml
Canavalia ensiformis	ConA	α -D-Man > α -D-Glc	0,031 μ g/ml
Caragana aborescens	CAA	D-GalNac	verdünnt 1 : 1000
Datura stramonium	DSA	GlcNac (β 1, 4GlcNac) ₁₋₃	0,016 μ g/ml
Dolichos biflorus	DBA	α -D-GalNac	0,124 μ g/ml
Erythrina cristagalli	ECA	β -D-Gal(1 \rightarrow 4)-D-GlcNac > α -GalNac	0,0024 μ g/ml
Glycine max	SBA	α - and β -D-GalNac	0,124 μ g/ml
Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia	GSA I	α -GalNac > α -Gal	0,125 μ g /ml
Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia	GSA II	α - and β -GlcNac	2,0 μ g/ml
Helix pomatia	HPA	GalNac- α 1,3 GalNac	verdünnt 1 : 1000
Limulus polyphemus	LPA	NeuNac	0,03 ng/ml
Maackia amurensis	MAA	fetuin	0,008 μ g/ml
Maclura pomifera	MPA	α -D-GalNac > D-Gal	0,001 μ g/ml
Mycoplasma gallisepti- cum	MGA	glycophorin	7,5 μ g/ml
Naja mocambique	NMA	heparin	0,001 μ g/ml
Psophocarpus tetra- gonolobus	PTA	α -D-GalNac > D-Gal	0,032 μ g/ml
Ricinus communis	RCA	β -D-Gal > α -D-Gal	0,062 μ g/ml
Solanum tuberosum	STA	(β -D-GlcNac) ₁₋₄	2,0 μ g/ml
Sophora japonica	SJA	GalNac β 1,6 Gal	0,031 μ g/ml
Tetragonolobus purpurea	TPA	α -L-Fuc	0,5 μ g/ml
Triticum vulgare	WGA	(β -D-GlcNac) _n linked 1 \rightarrow 4; NeuNac	0,062 μ g/ml
Ulex europaeus	UEA I	α -L-Fuc	0,004 μ g/ml
Ulex europaeus	UEA II	(β -D-GlcNac) ₂	2,0 μ g/ml
Vicia villosa	VVA	α -D-GalNac	0,16 μ g/ml
Wisteria floribunda	WFA	GalNac 1, 6 Gal > α -GalNac	0,062 μ g/ml

Tabelle 3

	Potentielle PGC ALP-positiv Lektin-negativ	Potentielle PGC ALP-positiv Beschränkte Anzahl von Lektinbindungsstellen, nicht WGA und STA	Putative PGC ALP-positiv Alle 12 Lektine positiv einschließlich STA, WFA, WGA
18 Tage	in der hinteren Hälfte der axialen Dottersackregion	-	-
23-25 Tage	Dottersack Leberanlage intraembryonale Gefäße	Leberanlage intraembryonale Gefäße	Hinter- und Mitteldarmwand Kaudales paraaortales Mesenchym; ventraler Aspekt der Urniere; mediale Coelombucht
27-31 Tage	Kiemenbögen paraaortales Mesen- chym des Vorderdarms	Leber	Gonadenleiste mediale Coelombucht dorsales Mesenterium
32-39 Tage	Leber	paraaortales Mesenchym intraembryonale Gefäße	Gonadenleiste mediale Coelombucht dorsales Mesenterium

6.2 Abbildungen

7. Zusammenfassung

Identifizierung, Lokalisation und Kinetik der Urgeschlechtszellen des Rindes sowie morphodynamische Aspekte der Gonadogenese.

Es werden die Ergebnisse einer Untersuchung über die räumliche Verteilung sowie der Kinetik boviner Urgeschlechtszellen (PGC = primordial germ cells) von 114 Embryonen bzw. Föten mit einem Alter von 18 bis 80 Tagen vorgestellt. Darunter befinden sich 34 Embryonen mit indifferenter Gonade. Besondere Beachtung finden morphodynamische Aspekte der Gonadogenese, wenn sie in Zusammenhang mit der Lokalisation und Differenzierung der Keimzellen stehen. Dabei wird über z. T. bisher unbekannte enzym- und lektinhistochemische Möglichkeiten der Blastemdarstellung berichtet, die zwar hochspezifisch für das Rind sind aber dennoch allgemeines Interesse beanspruchen, da sie zentrale Fragen der Gonadenontogenese berühren. Für eine verlässliche Identifizierung der PGC ist die alkalische Phosphatase (ALP) nur in Kombination mit der Lektinhistochemie (STA, WGA, WFA) die Methode der Wahl. Der AChE-Reaktion kommt in dieser Hinsicht eine untergeordnete Bedeutung zu. Die ersten potentiellen PGC konnten bei einem 18 Tage alten Rinderembryo in der caudalen Wand des Dottersackes gefunden werden. ALP- und Lektin-positive putative PGC werden intraembryonal bereits vor Ausbildung einer Gonadenleiste bzw. eines dorsalen Mesenteriums im Areal des prospektiven Gonadenprimordiums bei 23 - 25 Tage alten Embryonen beobachtet. Sie zeigen im Dottersack und um das Darmrohr, das im Darmnabel zum Dottersack noch weit geöffnet ist (Darmrinne), eine typische Anordnung, die detailliert beschrieben wird. Nach Konkretisierung der Gonadenleiste

aus dem Keimfeld sind deshalb bereits eine beträchtliche Anzahl von PGC dort anwesend. Diese Befunde sind mit einer aktiven Einwanderung aus einer extraembryonalen oder extragonadalen Lokalisation nicht vereinbar: Nur perigonadale PGC sind daher prospektive PGC. Im cranialen Ende der Gonadenleiste finden wir PGC bevorzugt an der Bowman'schen Kapsel des mesonephrogenen Riesenglomerulums. Weiter caudal, im Gebiet der prospektiven Gonadenfalte, liegen die PGC subcoelothelial in Kontakt mit einer Heparansulfat-, AChE- und WFA-positiven basallaminaähnlichen Matrix. In der Genitalfalte (32 - 39 Tage) sind die PGC unsymmetrisch verteilt. Sie liegen vorwiegend abmesogonadal und caudal; im Hilusgebiet sind sie seltener anzutreffen. Nach der Gonadendifferenzierung liegen die weiblichen PGC vorwiegend in lamininbegrenzten Keimballen im Cortex; auffallend hohe PGC-Zahlen in typischer Anordnung werden aber auch im Bereich der Markschläuche in der Nähe steroidproduzierender Areale, die bisher in diesem Zeitraum nicht beschrieben sind, gefunden. Die männlichen PGC liegen auch nach der Gonadendifferenzierung anfangs noch in beträchtlicher Menge in der peripheren Mesenchymschicht (prosp. Tunica albuginea); zunehmend können sie gleichmäßig verteilt in den Präsertolizellaggregationen gezählt werden. Extragonadale potentielle PGC werden bei bovinen Embryonen mit indifferenter Gonade regelmäßig, bei Föten manchmal gefunden. Diese Zellen liegen vorzugsweise im paraaortalen Gewebe, aber auch in der Leber. In Blutgefäßen werden sie bis 3,9 cm SSL, periadrenal bis 16 cm SSL beobachtet. In Anbetracht neuerer Erkenntnisse, die einen gemeinsamen Ursprung von Keimzellen und hämatopoetischen Zellen nahelegen, können aus den Befunden folgende Schlüsse gezogen werden:

a) Eine Restriktion der Keimzelllinie (Determination) findet nicht vor der Gonadenbesiedelung statt.

b) Extraembryonale und extragonadale PGC sind multifunktionale Zellen und nicht ausschließlich ektopische Keimzellen, die zur Apoptose bestimmt oder Ursache pathologischer Entwicklungen sind.

Der Verlust der ALP-Positivität und der Abbau der meisten Lektinbindungsstellen sowie das Auftreten eines neuen Antigens (PGP 9.5) am 80. Tag p. i. in der männlichen Keimzelllinie charakterisieren einen wichtigen Differenzierungsschritt der PräspERMATOGENESE. Zeitsynchrone Veränderungen in der Differenzierung der weiblichen Keimzelllinie sind durch Stichproben verifiziert; weitergehende systematische Untersuchungen der Zeitspanne unmittelbar nach der Gonadendifferenzierung sind erforderlich.

8. Summary

Identification, localisation and kinetics of bovine primordial germ cells and morphodynamic aspects of early gonadogenesis.

The temporospatial distribution of bovine primordial germ cells (PGC) was studied in 114 embryos 18- to 60-day-old. From these, 34 embryos were from the period prior to gonadal differentiation. For a reliable identification of PGC the alkaline phosphatase (AP)-reaction in combination with lectin histochemistry (WGA, WFA, STA) is recommended as the method of choice. The use of the acetylcholinesterase- (AChE) reaction is of limited importance. The first potential PGC are identified in a 18-day-old trilaminar embryo in the caudal wall of the proximal yolk sac at a distance of less than 100 μm from the germ disc. AP- and lectin-positive putative PGC are observed in intraembryonic location close to the mesonephros in 23- to 25-day-old embryos, that is several days before a gonadal ridge and a typical dorsal mesentery are developed. When the gonadal ridge appears (about day 27), it contains a certain number of PGC from the very beginning. This finding is at variance with the tenet of an active immigration from an extraembryonic or extragonadal localization: from our observation follows, only perigonadal PGC are prospective PGC. At the cranial end of the gonadal ridge, PGC prefer a localization close to the capsule of the mesonephric giant corpuscle. Further caudally, in the region of the prospective gonadal ridge, the PGC are found in a subcoelothelial position in contact with a heparansulfate-, AChE-, and WFA-positive basal lamina-like matrix. In the sexually indifferent gonadal fold (32 to 39 days) the PGC are also unevenly distributed. They

concentrate at the caudal end and at the abmesogonadal side and are seldom seen in the hilus region. After the differentiation of the gonad, the female PGC are mostly located in the gonadal cortex in laminin-delineated areas (Keimballen). Immediately after gonadal differentiation, significant numbers are also found around the medullary cords in the neighbourhood of a steroid hormone producing zone described here for the first time.

The male PGC after gonadal differentiation are generally located in the peripheral mesenchyme (future tunica albuginea) as they were also seen in the indifferent situation. Somewhat later in the young male gonad their number has increased, and the cells lie equally scattered within aggregations of pre-Sertoli cells.

Extragonadal potential PGC are regularly encountered in bovine embryos with indifferent gonads, seldom afterwards. Such cells occur predominantly in the paraaortal tissue (especially in the areas of somite desintegration), but also in the liver, in blood vessels and in periadrenal site.

In the light of recent evidence that germ cells and hematopoietic cells share a common ancestor, the results enforce two conclusions:

- a) Lineage restriction of PGC does not take place before these cells have settled in the gonad and establish contact with pre-Sertoli cells.
- b) Extragonadal embryonic PGC are multifunctional and more than only ectopic candidates for degeneration or pathologic developments.

The sudden stop of both, AP-positivity and the typical lectin binding, about day 80 p.i. coincide with the appearance of a new germ cell typical antigen (protein gene product 9,5) in the testis and characterize a decisive step of differentiation from PGC to prespermatogonia.

Similar changes as seen in the male line very likely are also occur in female development; however, additional investigations of the time span immediately following female gonadal differentiation are necessary.

9. Literaturverzeichnis

Alvarez-Buylla A, Merchant-Larios H (1986) Mouse primordial germ cells use fibronectin as a substrate for migration. *Exp Cell Res* 165: 362 - 368

Anstrom KK, Tucker RP (1996) Tenascin-C lines the migratory pathways of avian PGC and haematopoietic progenitor cells. *Dev Dyn* 206: 437 - 446

Anton H (1987) Vergleichende Untersuchungen über die Entwicklung des Rete testis und Rete ovarii beim Rind (*Bos primigenius taurus f. taurus*), Diss München

Archbald LF, Schultz RH, Fahning ML, Kurtz HJ, Zemjanis R (1971) Rete ovarii in heifers: A preliminary study. *J Reprod Fertil* 26: 413-414

Bachmann G (1990) Histochemischer Nachweis der embryonalen Cholinesterase in der Gonadenentwicklung des Hühnerembryos. Diplomarbeit Fak Biologie Tübingen

Barr ML, Bertram EG (1949) A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature* 163: 676-677

Becker MHG, Key G, Baron B, Duchrow M, Schlüter C, Flad HD, Gerdes J (1992) MIB-1-3, new monoclonal antibodies against the proliferation-associated antigen previously defined by Ki-67 (Abstract). *Histochem J* 24: 610

Beard J (1900) The morphological continuity of the germ cells in *Raja batis*. *Anat Anz* 18: 465 - 485

Bielanska-Osuchowska Z (1965) Studies on the development of the gonads in embryos of the domestic pig (*Sus scrofa*). Distribution of nucleic acids, proteins, polysaccharides and alkaline phosphatase during sexual differentiation of the gonads. Folia morph (Warszawa) 24: 327-344

Bitgood MJ, Shen L, Mc Mahon AP (1996) Sertoli cell signaling by Desert hedgehog (Dhh) regulates the male germline. Current Biol 6: 298-304

Bounoure L (1939) L'origine des cellules reproductrices et le problème de la lignée germinale 271 pp, Gauthier-Villars, Paris

Boyer B, Vallés AM, Theiry JP (1996) Model systems of epithelium-mesenchyme transitions. Acta Anat 156: 227-239

Brambell FWR (1930) The development of sex in vertebrates. Green and Co., London

Budras KD (1972) Das Epoophoron der Henne und die Transformation seiner Epithelzellen in Interrenal- und Interstitialzellen. Ergeb Anat Entwickl - Gesch 46: 1-70

Budras KD, Schmidt FG (1976) Die Frühentwicklung der Gonaden und die Ontogenese von Rete testis und Tubuli seminiferi recti beim Huhn (*Gallus domesticus*). Zbl Vet Med C Anat Histol Embryol 5: 267-289

Budras KD, Höftmann M, Wallenburg I (1979) Umformung des Rete ovarii zum Rete testis und des Epoophoron zum Nebenhoden nach experimenteller Geschlechtsumkehr bei *Gallus domesticus*. Acta Anat 104: 23-35

Budras KD, Wallenburg I, Meier U (1980) Experimentelle vergleichend-anatomische Untersuchungen über die Umwandlung von Urnierenüberbleibseln zu steroidhormonbildenden Knötchen in Nebenovar und Nebenhoden von Vögeln. *Verh Anat Ges* 74: 479-482

Budras KD, Weyrauch KD, Marks G (1978) Mesonephrogene Herkunft steroidhormonproduzierender Interrenalknötchen im Nebenhoden des Emu (*Dromaius novaehollandiae*). *Anat Histol Embryol* 16:210-214

Buchheit HJ (1985) Die vaginale Akupunktur. Phylogenetische und embryogenetische Grundlagen. Neurophysiologische und kulturhistorische Aspekte. Karl F.Haug Verlag Heidelberg

Burns RK (1941) The origin of the rete-apparatus in the opossum. *Science* 94: 142-144

Busse A (1985) Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Bedeutung der Urniere auf die pränatale Entwicklung des Interrenalorgans beim Emu (*Dromaius novae hollandiae*) Diss Berlin Journal-Nr. 1231

Byskov AG (1986) Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Phys Rev* 66: 71-117

Byskov AG, Hoyer PE (1988) Embryology of mammalian gonads and ducts. In: Knobil E, Neill J (eds) *The physiology of reproduction*. Raven Press, New York, pp 265-302

Chao MV (1992) Neurotrophin receptors. A window into neuronal differentiation. *Neuron* 9: 583-593

Chiquoine AD (1954) The identification, origin and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *Anat Rec* 118: 135-145

Cox JD (1975) Primary malignant germinal tumors of the mediastinum: a study of 24 cases. *Cancer* 36: 1162-1168

Crowder RE (1957) Development of the adrenal gland in man. *Contr Embryol* 36: 242 - 251

Davis JA (1996) Mesenchyme to epithelium transition during development of the mammalian kidney tubule. *Acta Anat* 156: 187-201

Dawood KA, Brisol CV, Thomas DB, Riches AC (1990) Regulation of haematopoietic stem cell proliferation by stimulatory produced by murine fetal and adult liver. *J Anat* 168: 209-216

Didier E, Didier P, Fargeix N, Guillot J, Thiery JP (1990) Expression and distribution of carbohydrate sequences in chick germ cells: a comparative study with lectins and the NC-1/HNK-1 monoclonal antibody. *Int J Dev Biol* 34: 421-431

Dieterlen-Lievre F, Pardanaud L, Yassine F, Lormier F (1988) Early haemopoietic stem cells in the avian embryo. *J Cell Sci Suppl* 10: 29-44

Dieterlen-Lievre F, Pardanaud L, Godin I, Garcia-Porrero J, Cumano A, Marcos M (1993) Developmental relationships between hemopoiesis and vasculogenesis, *CR Acad Sci* 316: 892-901

Dieterlen-Lievre F, Godin I, Pardanaud L (1997a) Where do hematopoietic stem cells come from? *Int Arch Allergy Immunol* 112: 3-8

Dieterlen-Lievre F, Pardanaud L, Godin J, Cumano A (1997b) Emergence of intraembryonic haematopoietic stem cells in the avian and mouse embryo. In: Anat Soc Symp Extramedullary Haematopoiesis, J Anat 190: 311

Dixon KE (1994) Evolutionary aspects of primordial germ cell formation. In: Germline development Ciba Found Symp 182, J Wiley and Sons, Chichester, pp 92-110

Drews U (1993) Taschenatlas der Embryologie. Thieme Verlag Stuttgart

Duchrow M, Gerdes J, Schlüter C (1994) The proliferation associated Ki-67 protein: definition in molecular terms. Cell Prolif 27: 235 - 242

Eddy EM (1975) Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. Int Rev Cytol 43: 229 - 280

Eddy EM, Hahnel AC (1983) Embryonic cell potency and establishment of the germ cell line. In: Current problems in germ cell differentiation. McLaren A, Wylie CC (eds), Cambridge University Press, pp 41-69

Ennis S, Gallagher TF (1994) A PCR-based sex-determination assay in cattle based on the bovine amelogenin locus. Anim Gen 25: 425-427

Ertl C, Wrobel KH (1992) Distribution of sugar residues in the bovine testis during postnatal ontogenesis demonstrated with lectin-horseradish-peroxidase conjugates. Histochemistry 97: 161 - 171

Essenberg JM, Horowitz M, Davidson S, Ryder VL (1955) Further studies of germ cell problem. Anat Rec 121: 112-116

Eyal-Giladi H, Ginsburg M, Farbarov A (1981) Avian primordial germ cells are of epiblastic origin. *J Embryol Exp Morphol* 65: 139 - 147

Fazel AR, Schulte BA, Thompson RP, Spicer SS (1987) Presence of a unique glycoconjugate on the surface of rat primordial germ cells during migration. *Cell Diff* 21: 199-211

Fazel AR, Schulte BA, Spicer SS (1990) Glycoconjugate unique to migrating primordial germ cells differs with genera. *Anat Rec* 228: 177 - 184

Felix W, Bühler A (1906) Die Entwicklung der Harn und Geschlechtsorgane. In: O. Hertwigs Handbuch der vergleichenden und experimentellen Entwicklungslehre der Wirbeltiere Band III. Gustav Fischer, Jena, pp 81-442

Felix W (1911) Die Entwicklung der Harn- und Geschlechtsorgane. In: Keibel F, Mall FP (eds) Handbuch der Entwicklungsgeschichte des Menschen Bd 2. Hirzel, Leipzig, pp 732-955

Friedman NB (1951) The comparative morphogenesis of extragenital and gonadal teratoid tumours. *Cancer* 4: 264-276

Friedman NB (1987) The function of the primordial germ cell in extragonadal tissues. *Int J Androl* 10: 43-49

Fujimoto T, Ukeshima A, Kiyofugi R (1975) The origin, migration and morphology of the primordial germ cells in the chick embryo. *Anat Rec* 185: 139 - 154

Gerdes J, Lemke H, Wacker HH, Schwab J, Stein H (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133: 1710 - 1715

Ginsburg M, Eyal-Giladi H (1986) Temporal and spatial aspects of the gradual migration of primordial germ cells from the epiblast into the germinal crescent in the avian embryo. *J Embryol Exp Morphol* 95: 53 - 71

Ginsburg M (1994) Primordial germ cell formation in birds. In: *Germline development Ciba Found Symp* 182. J Wiley and Sons, Chichester, pp 52-61

Ginsburg M, Snow MHL, McLaren A (1990) Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 110: 521-528

Gipouloux JD, Girard C, Delbos M (1992) The neural crest enhances the attractive potency of the somitic mesoderm towards the PGCs of the toad embryo. *Eur Arch Biol* 103: 37 - 40

Godin I, Wylie C, Heasman (1990) Genital ridges exert long-range effects on mouse primordial germ cell numbers and direction of migration in culture. *Development* 108: 357 - 363

Godin I, Wylie CC (1991) TGF- β_1 inhibits proliferation and has a chemotropic effect on mouse primordial germ cells in culture. *Development* 113: 1451 - 1457

Goldstein IJ, Poretz RD (1986) Isolation, physicochemical characterization and carbohydrate-binding specificity of lectins. In: *Bog-Hansen TC, Freed DLJ (eds) Lectins*. Sigma Chem Comp, St. Louis, pp 33-247

Gomperts M, Garcia-Castro M, Wylie C (1994) Interactions between primordial germ cells play a role in their migration in mouse embryos. *Development* 120: 135 - 141

Gomori G (1952) *Microscopic histochemistry, principles and practice*. Univ Chicago Press, Chicago

Goodrich ES (1945) The study of nephridia and genital ducts since 1895. *Quart J Micr Sci* 86: 113 - 392

Gooi HC, Feizi T, Kapadia A, Knowles BB, Solter D, Evans MJ (1981) Stage specific embryonic antigen involves 1-3 fucosylated type 2 blood group chains. *Nature* 292: 156 - 158

Graham CW, Lynch JH, Djakiew D (1992) Distribution of nerve growth factor-like protein and nerve growth factor receptor in human benign prostatic hyperplasia and prostatic adenocarcinoma. *J Urol* 147: 1444 - 1447

Gropp A, Ohno S (1966) The presence of a common embryonic blastema for ovarian and testicular parenchymal (follicular, interstitial and tubular) cells in cattle, *Bos taurus*. *Z Zellforsch* 74: 505 - 528

Gurdon IB (1988) A community effect in animal development. *Nature* 336: 772-774

Hahnel AC, Eddy EM (1986) Cell surface markers of mouse primordial germ cells defined by two monoclonal antibodies. *Gamete Res* 15: 25-34

Hailemariam S, Engeler DS, Bannwart F, Amin MB (1997) Primary mediastinal germ cell tumor with intratubular germ cell neoplasia of the testis - further support for germ cell origin of these tumors. *Cancer* 79: 1031-1036

Hall PA, Levison DA (1990) Review: assessment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol* 43: 184 - 192

Hamilton WJ, Boyd JD, Mossman HW (1972) *Human Embryology*. W Heffer & Sons Ltd, Cambridge

Hardisty MW (1978) Primordial germ cells and the vertebrate germ line. In: Jones RE (ed) *The vertebrate ovary*. Plenum Press, New York, pp 1-45

Hay ED (1995) An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat* 154: 8-20

Heath JK (1978) Mammalian germ cells. In: Johnson MH (ed) *Development in mammals* Vol. 3. North-Holland Publ Comp, Amsterdam, New York, Oxford, pp 267-298

Hilscher B, Hilscher W, Bühlhoff-Ohnholz B, Krämer U, Birke A, Pelzer H, Gauss G (1974) Kinetics of gametogenesis I. Comparative histological and autoradiographic studies of oocytes and transitional prospermatogonia during oogenesis and prespermatogenesis. *Cell Tissue Res* 154: 443-470

Hilscher W, Hilscher B (1976) Kinetic of the male gametogenesis. *Andrologia* 8: 105-116

Hilscher W (1981) T₁-prospermatogonia (primordial spermatogonia of Rauh): the „ameiotic“ counterpart of early oocytes. *Fortschr Androl* 7: 21 - 32

Hinrichsen KV (1990) Implantationsstadien und frühe Keimesentwicklung. In: Hinrichsen KV (ed) Humanembryologie Springer-Verlag Berlin, pp 94-117

Horowitz MB, Hall WA (1991) Central nervous system germinomas. A review. Arch Neurol 48: 652-657

Horst O (1987) Die Entwicklung des Ovars beim Schaf. Diss Berlin

Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981) Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J Histochem Cytochem 29: 577 - 580

Hui MZ, Balram S, Tenenbaum HC (1996) Expression of tissue non-specific alkaline phosphatase stimulates differentiated behaviour in specific transformed cell populations. Anat Rec 244: 423 - 436

Hustin J, Colette J, Franchimont P (1987) Immunohistochemical demonstration of placental alkaline phosphatase in various states of testicular development and in germ cell tumours. Int J Androl 10: 29 - 35

Jaglarz MK, Howard KR (1994) Primordial germ cell migration in *Drosophila melanogaster* is controlled by somatic tissue. Development 120: 83 - 89

Jasani B, Wynford-Thomas D, Thomas ND, Newman GR (1986) Broad-spectrum, non-deleterious inhibition of endogenous peroxidase: LM and EM application. Histochem J 18: 56 (Abstract)

Jeon KW, Kennedy JR (1973) The primordial germ cells in early mouse embryos: light and electron microscopic studies. Dev Biol 31: 275 - 284

Johnson DE, Laneri JP, Mountain CF, Luna M (1973) Extragonadal germ cell tumors. *Surgery* 73: 85-90

Jones JC (1957) *The adrenal cortex*. Cambridge University Press, London

Josso N, Vigier B, Tran D, Picard JY (1985) Initiation of production of Anti-Müllerian Hormone by the fetal gonad. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 74: 96 - 100

Jost A, Prépin J (1966) Données sur la migration des cellules germinales primordiales du fœtus de veau. *Arch Anat Micr* 55: 161 - 186

Karnovsky MJ, Roots L (1964) A „direct-coloring“ thiocholine method for cholinesterases. *J Histochem Cytochem* 12: 219 - 221

Katznelson ZS (1966) Die Entwicklung der Nebenniere des Rindes. *Z Mikr Anat Forsch* 75: 245-269

Kelemen E (1997) The origin of haematopoietic progenitors in the human embryo. In: *Anat Soc Symp Extramedullary Haematopoiesis*, *J Anat* 190: 312

Kendall MD (1980) The occurrence of erythropoiesis in the thymus of the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Cell Tissue Res* 212: 307-314

Kendall MD (1995) Hemopoiesis in the thymus. *Dev Immunol* 4: 157-168

Kendall MD, Mitchell BS, Schumacher U (1997) Haematopoiesis in the thymus. In: *Anat Soc Symp Extramedullary Haematopoiesis*, *J Anat* 190: 313

Kujat R, Rose C, Wrobel KH (1993) The innervation of the bovine ductus deferens: comparison of a modified acetylcholinesterase-reaction with immunoreactivities of cholinacetyl-transferase and panneuronal markers. *Histochemistry* 99: 231 - 239

Labosky PA, Barlow DP, Hogan BL (1994) Embryonic germ lines and their derivation from mouse primordio germ cells. In: *Germline development Ciba Found Symp* 182. J Wiley and Sons, Chichester, pp 157-168

Langman J (1989) *Medizinische Embryologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York

Lavoir MC, Basur PK, Betteridge KJ (1994) Isolation and identification of germ cells from fetal bovine ovaries. *Mol Repr Dev* 37: 413 - 424

Layer PG (1991) Cholinesterases during development of the avian nervous system. *Cell Mol Neurobiol* 11: 7-33

Logothetou-Rella H (1996a) Meiosis in hematological malignancies. In situ cytogenetic morphology. *Histol Histopathol* 11: 943-963

Logothetou-Rella H (1996b) Description of primordial germ cells, oogonia, oocytes and embryo-like growth in squash preparations of tissues from hematological malignancies. *Histol Histopathol* 11: 965-984

Lojda Z, Gossrau R, Schiebler TH (1976) *Enzymhistochemische Methoden*. Springer Verlag: Berlin, Heidelberg, New York

Lotan R, Skuttelsky E, Danon D, Sharon N (1975) The purification, composition and specificity of the anti-T lectin from peanut (*arachis hypogea*). *J Biol Chem* 250: 8518-8523

Mac Laughlin DT, Hutson JM, Donahoe PK (1983) Specific östradiol binding in embryonic müllerian ducts: a potential modulator of regression in the male and female ducts. *Endocrinology* 113: 141-145

Maekawa M, Nishimune Y (1985) Separation of germ cells from somatic cells in mouse testis by affinity for a lectin, Peanut agglutinin. *Biol Reprod* 32: 419-425

Makabe S, Naguro T, Nottola SA (1991) Migration of germ cells, development of the ovary and folliculogenesis. In: Familiari G, Makabe S, Motta PM (eds), *Ultrastructure of the ovary*. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, pp 1-27

Marchand F (1883) Über akzessorische Nebennieren im Ligamentum latum. *Virchows Arch Pathol Anat* 92: 11-19

Martin GR (1978) Advantages and limitations of teratocarcinoma stem cells as models of development. In: *Development in mammals Vol. 3*. North-Holland Publ Comp, Amsterdam, New York, Oxford, pp 225-265

McGadey J (1970) A tetrazolium method for non-specific alkaline phosphatase. *Histochemie* 23: 180 - 184

McGregor GR, Zambrowicz BP, Soriano P (1995) Tissue non-specific alkaline phosphatase is expressed in both embryonic and extraembryonic lineages during mouse embryogenesis but is not required for migration of primordial germ cells. *Development* 121: 1487 - 1496

McKay DG, Hertig AT, Adams EC (1953) Histochemical observations on the germ cells of human embryos. *Anat Rec* 117: 201 - 222

McLaren A (1981) *Germ cells and soma: a new look at an old problem*. Yale Univ Press, New Haven CT

McLaren A (1983) Primordial germ cells in mice. *Bibl Anat* 24: 59-66

McLaren A (1992) Development of primordial germ cells in the mouse. *Andrologia* 24: 243-247

Medvinsky A, Dzierzak E (1996) Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 86: 897-906

Medvinsky A, Dzierzak E (1997) The AGM region initiates definitive haematopoiesis in the mouse embryo. In: *Anat Soc Symp Extramedullary Haematopoiesis*, *J Anat* 190: 311-312

Mintz B (1960) Embryological phases of mammalian gametogenesis. *J Cell Comp Physiol* 55: 31-45

Mintz B, Illmensee K (1975) Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 72, 3585-3589

Mittwoch U (1989) Sex differentiation in mammals and tempo of growth: probabilities vs. switches. *J Theoret Biol* 137: 445-455

Moore KL (1990) *Embryologie*. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York

Mossman D (1973) Comparative morphology of the mammalian ovary. University of Wisconsin Press, Madison

Motta PM, Makabe S (1982) Development of the ovarian surface and associated germ cells in the human fetus. *Cell Tiss Res* 226: 493-510

Motta PM, Makabe S, Nottola SA (1997) The ultrastructure of human reproduction. I. The natural history of the female germ cell: origin, migration and differentiation inside the developing ovary. *Human Reproduction Update*, Vol. 3, No. 3 pp 281-295

Muller AM, Medvinsky A, Strouboulis J, Grosveld F, Dzierzak E (1994) Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* 1: 291-301

Nachlas MM, Crawford DT, Seligman AM (1957) The histochemical demonstration of leucine aminopeptidase. *J Histochem Cytochem* 5: 264 - 278

Nakamura M, Kuwana T, Miyayama Y, Yoshinaga K (1991) Ectopic colonization of primordial germ cells in the chick embryo lacking the gonads. *Anat Rec* 229: 109-115

Nieuwkoop PD, Sutasurya LA (1979) Primordial germ cells in the chordates. Embryogenesis and phylogenesis. Cambridge University Press

Nieuwkoop, Sutasurya (1981) Primordial germ cells in the invertebrates. Cambridge University Press

Nussbaum M (1880) Zur Differenzierung des Geschlechts im Tierreich. *Arch Mikrosk Anat Entw Mech* 18: 1-121

Odenthal S, Wenzel JGW, Player EC (1986) The rete ovarii of cattle and deer communicates with the uterine tube. *Anat Rec* 216: 40-43

Ohno S (1977) The Y-linked H-Y antigen locus and the X-linked Tfm locus as major regulatory genes of the mammalian sex determining mechanism. *J Steroid Biochem* 8: 585 - 592

Ohno S, Gropp A (1965) Embryological basis for germ cell chimerism in mammals. *Cytogenesis* 4: 251 - 261

Pardanaud L, Buck C, Dieterlen-Liévre F (1987) Early germ cell segregation and distribution in the quail blastodisc. *Cell Differ* 22: 47-59

Payen E, Pailhoux E, Merhi RA, Gianquinto L, Kirszenbaum M, Locatelli A, Cotinot C (1996) Characterisation of ovine SRY-transcript and developmental expression of genes involved in sexual differentiation. *Int J Dev Biol* 40: 567 - 575

Pearse AGE (1972) *Histochemistry. Theoretical and applied.* Churchill Livingstone, Edinburgh, London, New York

Persson H, Ayer-Le Lievre C, Söder O, Villar MJ, Metsis M, Olson L, Ritzen M, Höhfelt T (1990) Expression of β -nerve growth factor receptor in mRNA in Sertoli cells downregulated by testosterone. *Science* 147: 404 - 407

Poll H (1906) Die vergleichende Entwicklungsgeschichte der Nebennierensysteme der Wirbeltiere. In: Hertwig's Handbuch der vergleichenden und experimentellen Entwicklungslehre der Wirbeltiere, Bd 3, Jena, pp 443 - 603

Raeside J I (1985) Steroidogenesis and gonadal differentiation in the fetal pig. Arch Anat Micr Morphol Exp 74: 87-90

Ramkissoo Y, Goodfellow P (1996) Early steps in mammalian sex determination. Curr Opin Genet Dev 6: 316 - 321

Raynaud A, Pieau C (1985) Les premiers stades de la formation des glandes génitales chez les reptiles. Arch Anat Micr Morphol Exp 74: 42 - 49

Reisner Y, Linker Israeli M, Sharon N (1976) Separation of mouse thymocytes into two subpopulations by the use of peanut-agglutinin. J Cell Immunol 25: 129 - 134

Reisner Y, Gachelin G, Dubois P, Nicolas JF, Sharon N, Jacob F (1977) Interaction of peanut agglutinin, a lectin specific for nonreducing terminal D-galactosyl residues, with embryonal carcinoma cells. Dev Biol 49: 119 - 131

Rich N (1995a) Primordial germ cells are capable of producing cells of the hematopoietic system in vitro. Blood 86: 463-472

Rich N (1995b) Hemopoietic-initiating cells. J Perinat Med 23: 31-38

Rich N (1997) The roots of the haematopoietic tree: finite ontogeny. In: Anat Soc Symp Extramedullary Haematopoiesis, J Anat 190: 311

Rogulska TR, Ozdzanski L, Komar A (1971) Behaviour of mouse primordial germ cells in the chick embryo. J Embryol Exp Morphol 25: 155-164

Romeis B (1989) Mikroskopische Technik. 17. Aufl, Böck P (ed), Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore

Roosen-Runge EC (1961) Rudimental „Genital canals“ of the gonad in rat embryos. Acta Anat. 44: 1-10

Rubaschkin W (1908) Zur Frage der Entstehung von Keimzellen bei Säugetierembryonen. Anat Anz 32: 222 - 224

Rubaschkin W (1909) Über die Urgeschlechtszellen bei Säugetieren. Anat Hefte 39: 604-652

Rubaschkin W (1912) Zur Lehre von der Keimbahn bei Säugetieren. Anat Hefte 46: 345-411

Rüsse I (1981) Blastemzellen zwischen Mesonephros und Ovaranlage. Verh Anat Ges 75: 475-477

Rüsse I (1982) Interzellularbrücken zwischen weiblichen Keimzellen beim Rind und Schaf. Verh Anat Ges 76: 367-369

Rüsse I (1983) Oogenesis in cattle and sheep. Bibl Anat 24: 77-92

Rüsse I (1991) Frühgravidität, Implantation und Plazentation. In: Rüsse I, Sinowatz F (eds) Lehrbuch der Embryologie der Haustiere. Parey, Berlin, Hamburg, pp 153-218

Rüsse I, Sinowatz F (1991) Gametogenese. In: Rüsse I, Sinowatz F (eds) Lehrbuch der Embryologie der Haustiere. Parey, Berlin, Hamburg, pp 42 - 92

Russo MA, Odorisio T, Fradeani A, Rienzi L, De Felici M, Cattaneo A, Siramsa G (1994) Low affinity nerve growth factor receptor is expressed during testicular

morphogenesis and in germ cells at specific stages of spermatogenesis. *Mol Reprod Dev* 37: 157 - 166

Sadler TW (1998) *Medizinische Embryologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York

Sanchez MJ, Holmes A, Miles C, Dzierzak E (1996) Characterization of the first definitive hematopoietic stem cells in the AGM and liver of the mouse embryo. *Immunity* 5: 513-525

Sasaki K, Murakami R, Kawasaki M, Takahashi M (1987) The cell cycle associated change of Ki-67 reactive nuclear antigen expression. *J Cell Physiol* 135: 579 - 584

Satoh M (1985) The histogenesis of the gonad in rat embryos. *J Anat* 143: 17 - 37

Schiebler TH (1996) *Histologie*. Springer-Verlag Berlin

Schlüter C, Duchrow M, Wahlenberg C, Becker MHG, Key G, Flad HD, Gerdes J (1993) Molecular cloning of the cell proliferation associated nuclear antigen defined by antibody Ki-67: a unique gene encoding for a new PEST protein. *J Cell Biol* 123: 513 - 522

Schlumberger HG (1946) Teratoma of anterior mediastinum in group of military age: study of 16 cases and review of theories of genesis. *Arch Pathol* 41: 398-444

Schrag D (1983) *Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur fetalen Differenzierung der männlichen Keimdrüse des Rindes*. Diss München

Semon R (1890) Über die morphologische Bedeutung der Urniere in ihrem Verhältnis zur Vorniere und Nebenniere und über ihre Verbindung mit dem Genitalsystem. Anat Anz Bd 5, 455 - 482

Shemesh M, Ailenberg M, Milaguir F, Ayalon N, Hansel W (1978) Hormone secretion by cultured bovine pre- and postimplantation gonads. Biol Reprod 19, 761 - 767

Shemesh M (1980) Estradiol-17 β biosynthesis by the early bovine fetal ovary during the active and refractory phases. Biol Reprod 23, 577 - 582

Sinowatz F (1991) Nervensystem. In: Rüsse I, Sinowatz F (eds) Lehrbuch der Embryologie der Haustiere. Parey, Berlin, Hamburg, pp 247 - 286

Snow MHL, Monk M (1983) Emergence and migration of mouse primordial germ cells. In: McLaren A, Wylie CC (eds) Current problems in germ cell differentiation. Cambridge Univ Press, Cambridge, pp 115-136

Stark OJ (1959) Die streuenden Geschlechtszellen von *Triton alpestris*. Z Zellforsch Mikr Anat 50: 694-748

Sternberger LA (1979) Immunocytochemistry, 2nd ed, John Wiley, New York

Stevens LC (1964) L'origine des tératomes chez les mammifères. In: Wolff E (ed) L'origine de la lignée germinale. Hermann, Paris, pp 335-354

Swift CH (1914) Origin and early history of the primordial germ cell in the chick. Am J Anat 15: 483 - 516

Swift CH (1915) Origin of the definitive sex cells in the female chick and their relation to the primordial germ cells. *Am J Anat* 18: 441 - 470

Tam PPL, Behringer RR (1997) Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan. *Mech Dev* 68: 3-25

Thomas DB (1997) Hepatic haematopoiesis. In: *Anat Soc Symp Extramedullary Haematopoiesis*, *J Anat* 190: 312

Tsuji S, Larabi Y (1983) A modification of thiocholine-ferricyanide method of Karnovsky and Roots for localization of acetylcholinesterase activity without interference by Koelle's copper thiocholine iodide precipitate. *Histochemistry* 78: 317 - 323

Ukeshima A, Yoshinaga K, Fujimoto T (1991) Scanning and transmission electron microscopic observations of chick primordial germ cells with special reference to the extravasation in their migration course. *J Electr Micr* 40: 124 - 128

Ullmann SL, Shaw G (1997) Migration of PGCs to the developing gonadal ridge in the tammar wallaby *Macropus eugenii*. *J Reprod Fert* 110: 135 - 143

Upadhyay S, Zamboni L (1982) Preliminary observations on the role of the mesonephros in the development of the adrenal cortex. *Anat Rec* 202: 105 - 111

Urven LE, Erickson CA, Abbot UK, McCarrey JR (1988) Analysis of germ line development in the chick using anti-mouse EC antibody. *Development* 103: 299-304

Vannemann AS (1917) The early history of the germ cells in the armadillo, *Tatusia novemcincta*. Am J Anat 22: 314-363

Vicovac L, Aplin JD (1996) Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation. Acta Anat 156: 202-216

Viebahn C (1996) Epithelio-mesenchymal transformation during formation of the mesoderm in the mammalian embryo. Acta Anat 154: 79-97

Viebahn C, Miething A, Wartenberg H (1998) Primordial germ cells of the rabbit are specifically recognized by a monoclonal antibody labelling the perimitochondrial cytoplasm. Histochem Cell Biol 109: 49-58

Vines HWC (1935) Ectopic testis. J Pathol Bacteriol 40: 161 - 167

Wachtel SS, Ohno S, Koo GC, Boyse EA (1975) Possible role for H-Y antigen in the primary determination of sex. Nature 257: 235 - 236

Waldeyer W (1906) Die Geschlechtszellen. In: Hertwig's Handbuch der vergleichenden und experimentellen Entwicklungslehre der Wirbeltiere, Vol 1, Fischer, Jena, pp 86 - 476

Walker RA (1988) The use of lectins in histology and histopathology. A review. In: Bog-Hansen TC, Freed DLJ (eds): Lectins. Sigma Chem Comp, St. Louis, pp 591-600

Wartenberg H (1974) Spermatogenese-Oogenese: Ein cytomorphologischer Vergleich. Verh Anat Ges 68: 63-92

Wartenberg H (1976) Comparative cytomorphologic aspects of the male germ cells, especially of the „gonia“. *Andrologia* 8: 117-130

Wartenberg A (1978) Human testicular development and the role of the mesonephros in the origin of a dual Sertoli cell system. *Andrologia* 10: 1 - 21

Wartenberg H (1982) Development of the early human ovary and role of the mesonephros in the differentiation of the cortex. *Anat Embryol* 165: 253 - 280

Wartenberg H (1983) Germ cell migration induced and guided by somatic cell interaction. *Bibl Anat* 24: 93 - 110

Wartenberg H (1985) Origin of gonadal blastemal cells in mammalian gonadogenesis. *Arch Anat Micr Morphol Exp* 74: 60 - 63

Wartenberg H (1989) Ultrastructure of fetal ovary including oogenesis. In: *Ultrastructure of human gametogenesis and early embryogenesis*. Blerkom J, Motta PM (eds), Kluwer Acad Publ, Boston, Dordrecht, pp 61-84

Wartenberg H (1990) Entwicklung der Genitalorgane und Bildung der Gameten. In: Hinrichsen KV (ed) *Humanembryologie*, Springer Verlag Berlin, pp 745-822

Wathes DC, Robinson RS, Mann GE, Lamming GE (1997) The establishment of early pregnancy in cows. 1st Conf Eur Soc Dom Anim Reprod Mariensee 1997, Abstract Booklet

Weakly BS (1976) Variations in mitochondrial size and ultrastructure during germ cell development. *Cell Tissue Res* 169: 531 - 550

Weisman A (1885) Die Continuität des Keimplasmas als Grundlage einer Theorie der Vererbung. Fischer-Verlag, Jena

Wenzel JGW, Odend'hal S, Player EC (1987) Histological and histochemical characterization of the bovine rete ovarii through the estrous cycle and gestation. *Anat Histol Embryol* 16: 124-135

Willier BH (1937) Experimentally produced sterile gonads and the problem of germ cells in the chick embryo. *Anat Rec* 70: 89-112

Willier BH (1939) Embryonic development of sex. In: Sex and internal secretions (Allen E, ed), 2nd ed, Baltimore, pp 64 - 144

Witschi E (1948) Migration of the germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal folds. *Contr Embryol* 209: 67 - 80

Witschi E (1956) The development of vertebrates. Saunders Philadelphia, New York

Wrobel KH, El Etreby MF (1971) Enzymhistotopochemie an der männlichen Keimdrüse des Rindes während ihrer fötalen und postnatalen Entwicklung. *Histochemie* 26: 160-179

Wrobel KH, Bickel D, Kujat R, Schimmel M (1995a) Configuration and distribution of bovine spermatogonia. *Cell Tissue Res* 279: 277 - 289

Wrobel KH, Bickel D, Kujat R, Schimmel M (1995b) Evolution and ultrastructure of the bovine spermatogonia precursor cell line. *Cell Tissue Res* 281: 249-259

Wrobel KH, Bickel D, Schimmel M, Kujat R (1996a) Immunohistochemical demonstration of nerve growth factor receptor in bovine testis. *Cell Tissue Res* 285: 189-197

Wrobel KH, Bickel D, Kujat R (1996b) Immunohistochemical study of seminiferous epithelium in adult bovine testis using monoclonal antibodies against Ki-67 protein and proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *Cell Tissue Res* (1996) 283: 191 - 201

Wylie CC, Stott D, Donovan PJ (1986) Primordial germ cell migration. In: *Developmental Biology. A comprehensive synthesis, vol. 2. The Cellular Basis of Morphogenesis*. Browder L (ed), New York Plenum Press, pp 433 - 448

Wynford-Thomas D, Jasani B, Newman GR (1986) Immunohistochemical localization of cell surface receptors using a novel method permitting simple, rapid and reliable LM/EM correlation. *Histochem J* 18: 387 - 396

Yoshinaga K, Hess DL, Hendrickx AG, Zamboni L (1990) Germinal cell ectopism in the strepsirhine prosimian *Galago crassicaudatus crassicaudatus*. *Am J Anat* 187: 213-231

Yoshinaga K, Muramatsu H, Muramatsu T (1991) Immunohistochemical localization of the carbohydrate antigen 4C9 in the mouse embryo: a reliable marker of mouse primordial germ cells. *Differentiation* 48: 75-82

Yoshinaga K, Fujimoto T, Nakamura M, Terakura H (1992) Selective lectin-binding sites of primordial germ cells in chick and quail embryos. *Anat Rec* 233: 625 - 632

Zamboni L, Merchant H (1973) The fine morphology of mouse primordial germ cells in extragonadal locations. *Am J Anat* 137:

Zuckerman S, Baker TG (1977) The development of the ovary and the process of oogenesis. In: Zuckerman S and Weir BJ (eds) *The ovary*, 2nd ed, Vol 1, Academic Press, New York, London, pp 41 - 67

10. Anhang

10.1 Lebenslauf

Name:	Franz Josef Eduard S ü ß	
Geburtsdatum:	18. Juni 1951	
Geburtsort:	Weiden/Opf.	
Staatsangehörigkeit:	deutsch	
Vater:	Franz Xaver Süß	
Mutter:	Rita Barbara Süß, geb. Geitner	
Schulbildung:	1957 - 1961	Pestalozzischule Weiden
	1962 - 1972	Kepler-Gymnasium Weiden
	1972	Abitur
	1972 - 1974	Studium der Soziologie und Philosophie an der Universität Regensburg
	1974 - 1976	Studium der Pädagogik an der Fachhochschule Augsburg
	1977 - 1982	Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin
	1982	Approbation
Berufliche Tätigkeiten:	1982 - 1988	Assistenz in verschiedenen Tierarztpraxen der BRD; Vertretertätigkeiten
	1988 - 1995	Praxisinhaber einer Gemischtpraxis in Erbdorf/Steinwald
	seit 1995	Doktorand und wiss. Mitarbeiter am Lehrstuhl für Anatomie der Universität Regensburg bei Prof. Dr. Dr. K.-H. Wrobel

10.2 Danksagung

Diese Arbeit verdankt ihr Zustandekommen einer stattlichen Anzahl schicksalhafter Ereignisse und Personen, die dabei nach Kräften mitgewirkt haben.

In erster Linie danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. K.H. Wrobel für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, für seine Unterstützung und konstruktive Kritik beim Abfassen der Arbeit. Seine Fürsprache, sein Vertrauen und seine Geduld waren für das Gelingen maßgeblich.

Herrn Prof. Dr. K.D. Budras danke ich für die Einreichung der Arbeit.

Anregungen und freundliche Unterstützung fand ich bei Frau Prof. emerit. Dr. I. Rüsse, die ihre jahrelangen Erfahrungen in diesem faszinierenden Gebiet bereitwillig in persönlichen Gesprächen diskutiert hat.

Herrn Dr. R. Kujat danke ich besonders für seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft und vielfältigen Hilfestellungen in technischen und inhaltlichen Fragen.

Ich danke auch den Landwirten und Viehhändlern sowie den Amtstierärzten/innen und Fleischbeschauern der Schlachthöfe Amberg, Ansbach, Furth i.W., Landshut, München, Straubing und Weiden, die bei der Beschaffung von Embryonen behilflich waren.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Anatomischen Institutes der Universität Regensburg bedanken, die mich während der Erstellung dieser Arbeit liebevoll begleitet, beraten und unterstützt haben.