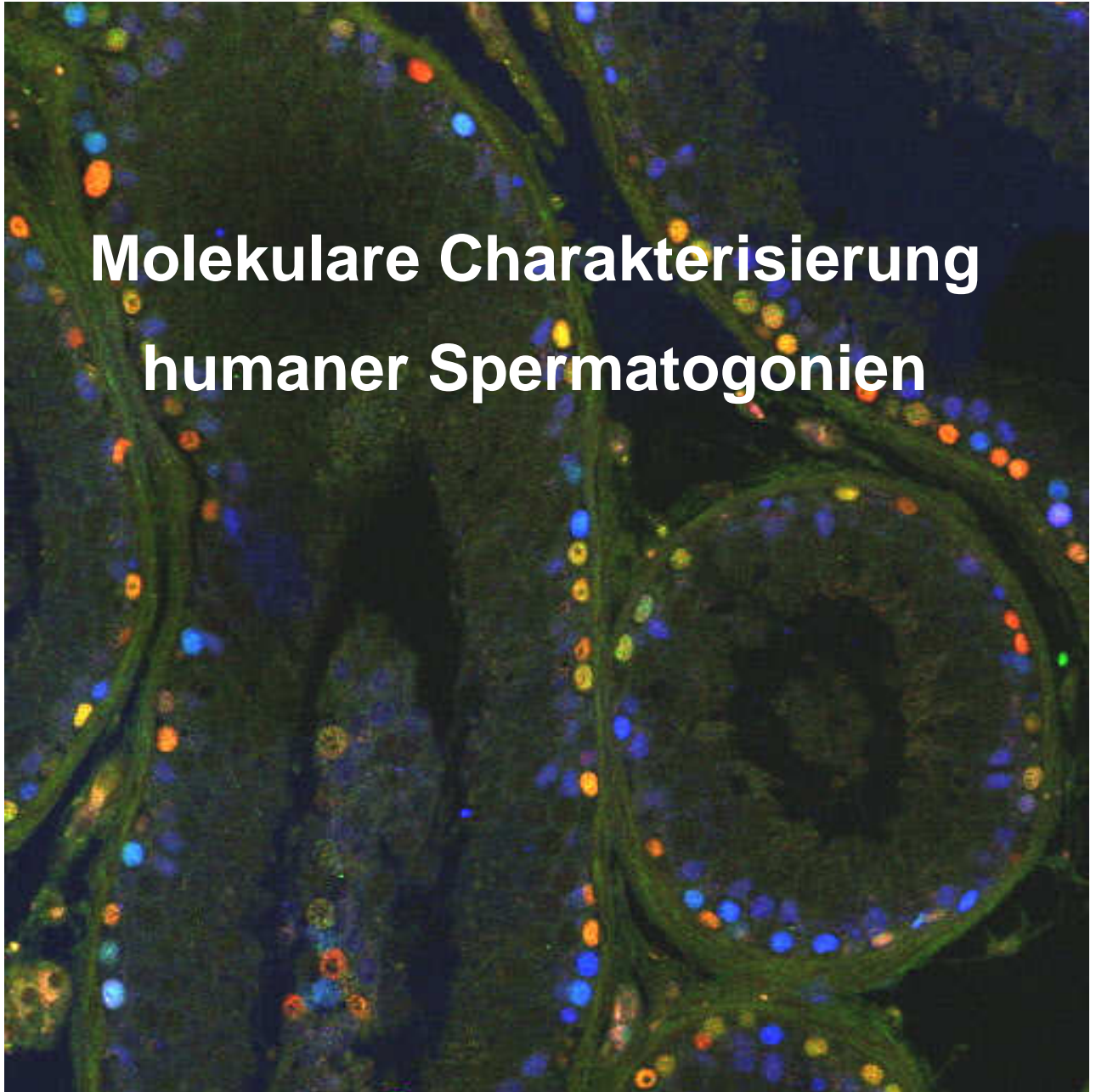


# Molekulare Charakterisierung humaner Spermatogonien



# **Molekulare Charakterisierung humaner Spermato gonien**

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften  
des Fachbereichs Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und  
Naturwissenschaften der Universität Hamburg

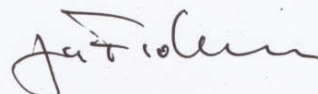
vorgelegt von

**KATHREIN VON KOPYLOW**

**Hamburg 2011**

Genehmigt vom Fachbereich Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Frau Prof. Dr. C. KIRCHHOFF  
Weitere Gutachterin der Dissertation:  
Frau Prof. Dr. I. BRUCHHAUS  
Tag der Disputation: 28. Oktober 2011

Hamburg, den 26. September 2011



Professor Dr. J. Fromm  
Vorsitzender des Promotionsausschusses  
Biologie

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die Spermatogenese im adulten Organismus.....	1
1.2	Die funktionelle Organisation des Hodens .....	1
1.3	Spermatogonientypen des Menschen.....	2
1.4	Stammzellen.....	4
1.5	Spermatogoniale Stammzellen .....	5
1.6	Modelle der Spermatogoniogenese .....	6
1.7	Der fetale Hoden .....	9
1.8	Hodenpathologien und der Johnsen-Score.....	10
1.9	Der Zellzyklus.....	11
1.10	Untersuchte Marker humaner Spermatogonien .....	13
1.10.1	Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor 3 .....	13
1.10.2	DSG2 .....	17
1.10.3	UTF1 .....	18
1.10.4	SPOC1 .....	19
1.10.5	DMRT1.....	20
1.10.6	Der Proliferationsmarker Ki-67 .....	20
1.10.7	Der Nukleolusmarker C23 .....	23
1.10.8	RBM3 .....	23
1.10.9	EXOSC10 .....	24
1.10.10	SNAP91 .....	25
1.10.11	CBL (C-CBL, CBL2) .....	26
1.10.12	c-Kit.....	26
1.10.13	UCHL1/PGP9.5.....	26
1.10.14	Übersicht der untersuchten Marker .....	27
1.11	Zielsetzung der Doktorarbeit.....	28
2	Materialien, Methoden, Computerprogramme .....	29
2.1	Materialien.....	29
2.1.1	Chemikalien .....	29
2.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	30
2.1.3	Geräte .....	31
2.1.4	Reaktions-Kits, Enzyme und biologische Substanzen .....	31

2.1.5	Puffer und Lösungen .....	32
2.1.6	Oligodesoxyribonukleotide (Primer).....	33
2.1.7	Primärantikörper für Immunhistochemie / Immunfluoreszenz .....	34
2.1.8	Sekundärantikörper, Kits und biologische Substanzen für Immunhistochemie, Immunfluoreszenz und MACS-Selektion.....	35
2.1.9	Gewebeproben.....	35
2.2	Methoden .....	37
2.2.1	Auswertung der Mikroarray-Daten zum Filtern spermatogonien-spezifischer Gene .....	37
2.2.2	RNA-Isolation .....	37
2.2.3	Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration .....	38
2.2.4	Bestimmung von Integrität und Reinheit der RNA am Bioanalyzer .....	38
2.2.5	cDNA-Synthese.....	39
2.2.6	Real-time RT-PCR .....	40
2.2.7	Auswertung der real-time RT-PCR-Ergebnisse .....	44
2.2.8	Fixierung der Gewebeproben für Expressionsstudien auf Proteinebene.....	46
2.2.9	Immunhistochemie / Immunfluoreszenz .....	46
2.2.10	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie .....	49
2.2.11	Immunzytochemie an isolierten Keimzellen.....	50
2.2.12	Kurzzeitkultur von Keimzellen .....	51
2.2.13	Magnetic-activated cell sorting (MACS).....	51
2.2.14	Gesamtpräparation von <i>Tubuli seminiferi (whole mount)</i> .....	53
2.3	Computerprogramme .....	54
3	Ergebnisse.....	55
3.1	Untersuchungen spermatogonien-spezifischer Expressionsmuster auf mRNA- Ebene.....	55
3.1.1	Filtern der Mikroarray-Daten.....	55
3.1.2	Validierung der Mikroarray-Analyse mittels real-time RT-PCR.....	58
3.1.2.1	Validierung der Mikroarray-Analyse mittels real-time RT-PCR zur Detektion spermatogonien-spezifischer Gene.....	59
3.1.2.2	Vergleich der Genexpressions-Ratios mit Bland-Altman-Plot.....	61
3.2	Untersuchungen der Expression spermatogonien-spezifischer Marker auf Proteinebene .....	63
3.2.1	Validierung der Mikroarray-Analyse mittels Immunhistochemie und Immunfluoreszenz.....	63

3.2.1.1	Fibroblastenwachstumsfaktor (FGFR3) .....	63
3.2.1.2	UTF1 .....	66
3.2.1.3	SPOC1 .....	68
3.2.1.4	Desmoglein 2 (DSG2), CBL, SNAP91 .....	69
3.2.2	Immunhistochemie und Immunfluoreszenz weiterer spermatogonienpezifischer Marker .....	70
3.2.2.1	DMRT1 .....	70
3.2.2.2	EXOSC10.....	73
3.2.2.3	Der Proliferationsmarker KI-67 .....	78
3.2.2.4	KIT.....	79
3.2.2.5	RBM3 .....	81
3.2.2.6	Kontrollen .....	82
3.2.2.7	Expression ausgewählter Markerproteine in fetalem Hodengewebe .....	83
3.2.3	Die Heterogenität der adulten Spermatogonien bezüglich der UTF1-, SPOC1- und DMRT1-Expression .....	85
3.2.4	Untersuchungen zur Wechselwirkung verschiedener Marker .....	87
3.2.4.1	DMRT1 und UTF1 schließen sich weitgehend aus .....	87
3.2.4.2	DMRT1- und FGFR3-Expression schließen sich gegenseitig aus.....	89
3.2.4.3	Koexpression von DMRT1 und KI-67.....	90
3.2.4.4	DMRT1-/KIT-Koexpression kommt in verschiedenen Spermatogonientypen vor.....	91
3.2.4.5	Koexpression von KIT und KI-67 .....	93
3.2.4.6	KIT und UTF1 schließen sich weitgehend aus.....	94
3.2.4.7	Spermatogonien mit vielen cytoplasmatischen FGFR3-Vesikeln bilden eine Subpopulation der UTF1-positiven Zellen .....	97
3.2.4.8	FGFR3- und KI-67-Markierung schließen sich gegenseitig aus .....	99
3.2.4.9	UTF1 und RBM3 sind kolokalisierte Kernmarker .....	100
3.2.4.10	Zusammenfassung der Proteinexpressionsdaten .....	102
3.2.5	Immunfluoreszenzmarkierung in Gesamtpräparationen ( <i>whole mount</i> ) von <i>Tubuli seminiferi</i> .....	103
3.2.6	Untersuchungen und Experimente mit vereinzelt Keimzellen .....	109
3.2.6.1	Immunzytochemie mit UTF1 .....	109
3.2.6.2	Kurzzeitkultur zur Trennung der Keimzellen von somatischen Zellen .....	110
3.2.6.3	MACS-Selektion .....	111
4	Diskussion .....	114

4.1	Die real-time RT-PCR bestätigt wichtige durch Mikroarray-Analyse identifizierte spermatogonienexprimierte RNAs .....	114
4.2	Die spermatogonien-spezifische Expression wichtiger Marker-Proteine wird durch Immunfärbung bestätigt.....	114
4.2.1	FGFR3 und UTF1 als potentielle Marker für spermatogoniale Stammzellen....	115
4.2.2	Die Rolle von DMRT1 in der humanen Spermatogoniogenese.....	117
4.2.3	Die Rolle des spermatogonialen Differenzierungsmarkers KIT .....	118
4.2.4	EXOSC10 .....	119
4.2.5	Hypothesen zur Interpretation der generierten Daten .....	121
5	Ausblick .....	125
6	Zusammenfassung .....	127
7	Literatur, Quellen aus dem Internet.....	129
8	Anhang .....	139
	Berechnungen zur Erstellung der Bland-Altman-Plots.....	139
	Danksagung.....	141

## Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1.01:</b> Der Johnsen-Score. Nach Johnsen (1970).	10
<b>Tab. 1.02:</b> Der modifizierte Johnsen-Score (mJ-Score) nach de Kretser & Holstein (1976).	10
<b>Tab. 1.03:</b> Zusammenfassung der untersuchten Marker.	27
<b>Tab. 2.01:</b> Verwendete Primer.	33
<b>Tab. 2.02:</b> Verwendete Primärantikörper.	34
<b>Tab. 2.04:</b> Ansatz 1 zur cDNA-Synthese.	39
<b>Tab. 2.05:</b> Ansatz 2 zur cDNA-Synthese.	40
<b>Tab. 2.06:</b> Ansatz real-time PCR.	43
<b>Tab. 2.07:</b> Bedingungen real-time PCR.	44
<b>Tab. 2.08:</b> Bedingungen real-time PCR für UTF1.	44
<b>Tab. 3.01:</b> Ratiowerte der Genexpression zwischen mJ-Score 2-, mJ-Score 3-, mJ-Score 5- und mJ-Score 10-Patienten.	59
<b>Tab. 3.02:</b> Zusammenfassung der Ergebnisse zur Proteinexpression bezogen auf morphologisch definierte Spermatogonientypen.	102
<b>Tab. 3.03:</b> Zusammenfassung der Ergebnisse zur Proteinexpression bzgl. des spermatogonialen zellulären Kompartiments.	102
<b>Tab. 3.04:</b> Zusammenfassung der Ergebnisse der Protein-Koexpressionsanalysen.	103
<b>Tab. A01:</b> Vergleich der Genexpressionsratios zwischen mJ-Score 2 und 3.	139
<b>Tab. A02:</b> Vergleich der Genexpressionsratios zwischen mJ-Score 2 und 5.	139
<b>Tab. A03:</b> Vergleich der Genexpressionsratios zwischen mJ-Score 2 und 10.	140



## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1.01:</b> Aufbau des männlichen Keimepithels.	2
<b>Abb. 1.02:</b> Schematische Darstellung der Spermatogonientypen des Menschen.	3
<b>Abb. 1.03:</b> Elektronenmikroskopische Darstellungen von Zellkernen der unterschiedlichen Spermatogonientypen.	4
<b>Abb. 1.04:</b> Einfaches Modell der humanen Spermatogonienentwicklung von Clermont.	7
<b>Abb. 1.05:</b> Erweitertes Modell der humanen Spermatogonienentwicklung von Clermont.	7
<b>Abb. 1.06:</b> Revidiertes Modell der humanen Spermatogoniogenese.	8
<b>Abb. 1.07:</b> Der modifizierte Johnsen-Score nach de Kretser & Holstein.	11
<b>Abb. 1.08:</b> Der Zellzyklus.	12
<b>Abb. 1.09:</b> FGFR-Domänenstruktur und Isoformen.	14
<b>Abb. 1.10:</b> Durch FGFR3 aktivierte intrazelluläre Signalwege.	15
<b>Abb. 1.11:</b> Modell eines Desmosoms.	17
<b>Abb. 1.12:</b> Desmosomen zwischen zwei Spermatogonien.	18
<b>Abb. 1.13:</b> Ki-67 im Zellzyklus.	21
<b>Abb. 1.14:</b> Schematische Darstellung der perichromosomalen Scheide.	22
<b>Abb. 1.15:</b> Schematischer Aufbau eines Nukleolus.	23
<b>Abb. 1.16:</b> Domänenstruktur von EXOSC10.	24
<b>Abb. 1.17:</b> Schematischer Aufbau der Proteinstruktur des SNAP91-Proteins (AP-3).	25
<b>Abb. 1.18:</b> Entstehung eines Clathrinvesikels zum Transport von Frachtproteinen.	25
<b>Abb. 2.01:</b> Phasen der PCR, dargestellt mittels Fluoreszenzmessung während einer real-time PCR.	41
<b>Abb. 2.02:</b> Schmelzpunkt-Analyse eines PCR-Produktes.	43
<b>Abb. 2.03:</b> „ <i>Window-of-linearity</i> -Methode“ nach Ramakers.	45
<b>Abb. 2.04:</b> Prinzip der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie.	49
<b>Abb. 2.05:</b> Aufbau einer MACS-Selektionssäule.	52
<b>Abb. 2.06:</b> Prinzip der MACS-Selektion.	53
<b>Abb. 3.01:</b> Clusteranalyse der Mikroarray-Daten unter Verwendung aller Gene.	56
<b>Abb. 3.02:</b> Clusteranalyse nach den 200 signifikantesten Genen.	57
<b>Abb. 3.03:</b> Principal component analysis.	58
<b>Abb. 3.04:</b> Bland-Altman-Plot zum Vergleich der Genexpressions-Ratios zwischen Mikroarray-Analyse (A) und real-time RT-PCR (R).	62
<b>Abb. 3.05:</b> Immunhistochemie gegen ein Epitop des Proteins FGFR3.	64

<b>Abb. 3.06:</b> FGFR3-Expression in den unterschiedlichen Spermatogonientypen mittels Immunhistochemie.	64
<b>Abb. 3.07:</b> FGFR3-Expressionsmuster in Spermatogonien mittels Immunfluoreszenz.	65
<b>Abb. 3.08:</b> Kolokalisation von FGFR3 mit zwei verschiedenen Antikörpern.	65
<b>Abb. 3.09:</b> UTF1-Immunhistochemie.	66
<b>Abb. 3.10:</b> UTF1-Immunfluoreszenzmarkierung.	67
<b>Abb. 3.11:</b> SPOC1-Immunhistochemie.	68
<b>Abb. 3.12:</b> Immunhistochemie gegen Epitope der Proteine DSG2, CBL bzw. SNAP91.	69
<b>Abb. 3.14:</b> Immunhistochemischer Nachweis der DMRT1-Expression in B-Spermatogonien.	71
<b>Abb. 3.15:</b> Nachweis der DMRT1-Expression in A pale-Spermatogonien mittels Immunfluoreszenz.	72
<b>Abb. 3.16:</b> DMRT1-Expression während der Mitose.	72
<b>Abb. 3.17:</b> EXOSC10 in der „Vakuole“ von A dark-Spermatogonien.	74
<b>Abb. 3.18:</b> EXOSC10-Expression in A pale- und B-Spermatogonien sowie Sertolizellkernen.	75
<b>Abb. 3.20:</b> Kolokalisation von EXOSC10 mit Nukleolusmarker C23 in Nukleoli von Spermatogonien.	77
<b>Abb. 3.21:</b> Kolokalisation von EXOSC10 mit Proliferationsmarker KI-67.	77
<b>Abb. 3.22:</b> KI-67-Markierung proliferierender Spermatogonien.	78
<b>Abb. 3.23:</b> KI-67-Expression in Spermatogonien während der Mitose.	78
<b>Abb. 3.24:</b> KI-67-Immunfluoreszenz-Markierung dargestellt mit Fluoreszenzmikroskopie.	79
<b>Abb. 3.25:</b> KIT-Expression in Spermatogonien mittels Immunhistochemie.	80
<b>Abb. 3.26:</b> Immunhistochemie gegen ein Epitop des Proteins KIT und KIT-Expression in verschiedenen Spermatogonientypen.	80
<b>Abb. 3.27:</b> KIT-Expression in Mastzellen.	81
<b>Abb. 3.28:</b> RBM3-Expression im männlichen Keimepithel.	82
<b>Abb. 3.29:</b> Kontrollen für die Immunhistochemie und die Immunfluoreszenz.	83
<b>Abb. 3.30:</b> Immunhistochemie an fetalem Hodengewebe.	84
<b>Abb. 3.31:</b> Ko-Immunfluoreszenzfärbung für die drei in Spermatogonienkernen exprimierten Proteine UTF1, SPOC1 und DMRT1 auf adultem Hodengewebe.	85
<b>Abb. 3.32:</b> Venn-Diagramm der UTF1-/SPOC1-/DMRT1-Expressionsmuster in adulten Hodenschnittpräparaten.	86
<b>Abb. 3.33:</b> Immunfluoreszenz-Dreifachmarkierung für UTF1, SPOC1 und DMRT1.	87
<b>Abb. 3.34:</b> Immunfluoreszenz-Dreifachmarkierung für UTF1, SPOC1 und DMRT1.	88

<b>Abb. 3.35:</b> Immunfluoreszenz-Dreifachmarkierung für SPOC1, FGFR3 und DMRT1.	89
<b>Abb. 3.36:</b> Immunfluoreszenz-Dreifachmarkierung für KI-67, SPOC1 und DMRT1.	90
<b>Abb. 3.37:</b> KI-67-/DMRT1-/SPOC1-Expressionstypen von Spermatogonien.	91
<b>Abb. 3.38:</b> DMRT1-/KIT-Koexpression in Spermatogonien.	92
<b>Abb. 3.39:</b> DMRT1-/KIT-Koexpression in verschiedenen Spermatogonientypen.	93
<b>Abb. 3.40:</b> KIT-/KI-67-Doppel-Immunfluoreszenz in Spermatogonien.	94
<b>Abb. 3.41:</b> UTF1 und KIT in Spermatogonien (I).	95
<b>Abb. 3.42:</b> UTF1 und KIT in Spermatogonien (II).	96
<b>Abb. 3.43:</b> Immunfluoreszenz-Dreifachmarkierung für UTF1, SPOC1 und FGFR3.	98
<b>Abb. 3.44:</b> Immunfluoreszenzmarkierung für FGFR3 und KI-67.	99
<b>Abb. 3.45:</b> RBM3- und UTF1-Koexpression in Spermatogonien.	100
<b>Abb. 3.46:</b> RBM3-/UTF1-Koexpression in Zellkernen von Spermatogonien.	101
<b>Abb. 3.47:</b> <i>Whole mount</i> -Präparation (I).	104
<b>Abb. 3.48:</b> <i>Whole mount</i> -Präparation (II).	105
<b>Abb. 3.49:</b> <i>Whole mount</i> -Präparation (III).	106
<b>Abb. 3.50:</b> <i>Whole mount</i> -Präparation (IV).	107
<b>Abb. 3.51:</b> <i>Whole mount</i> -Präparation (V).	108
<b>Abb. 3.52:</b> UTF1-Immunhistochemie auf PAF-fixierten menschlichen Keimzellen.	109
<b>Abb. 3.53:</b> UTF1-Immunfluoreszenz an isolierten, PAF-fixierten menschlichen Keimzellen nach Kurzzeitkultur.	110
<b>Abb. 3.54:</b> Immunzytochemie MACS-selektierter Zellen.	111
<b>Abb. 4.01:</b> Schema der humanen Spermatogonien-Entwicklung bezogen auf die Expression der Marker UTF1, SPOC1, DMRT1 und KIT.	122
<b>Abb. 4.02:</b> Gesamtschema der humanen Spermatogonienentwicklung bzgl. aller untersuchten Marker.	123

## Abkürzungsverzeichnis / Glossar

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C23	Nucleolin, NCL
ca.	circa
CBL	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence
CD34	<i>Cluster of differentiation 34</i> ; Zelloberflächenmarker
cDNA	<i>complementary DNA</i> ; komplementäre DNA
d.h.	das heißt
DMRT1	<i>Doublesex and Mab-3 related transcription factor 1</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DRAQ5	Fluoreszenz-DNA-Interkalator; Derivat des Antibiotikums Anthracyclin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii / et aliae; und andere
etc.	et cetera; und so weiter
FGFR3	<i>Fibroblast growth factor receptor 3</i> , Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor 3
g	Gramm
g	<i>g-force</i> ; rcf, <i>relative centrifugal force</i> ; relative Zentrifugalbeschleunigung
GDNF	<i>Glial cell line derived neurotrophic factor</i>
HBSS	<i>Hanks Balanced Salt Solution</i>
IHC	Immunhistochemie
k.A.	keine Angabe
KI-67	<i>antigen identified by monoclonal antibody Ki-67</i>
l	Liter
M	molar
min	Minute
mJ-Score	modifizierter Johnsen-Score
μ-	Mikro-
n	Anzahl

OCT4	OCT3, POU5F1, <i>POU class 5 homeobox 1</i> ; Transkriptionsfaktor, Pluripotenzmarker
PAF	Paraformaldehyd
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
PCA	<i>principal component</i> -Analyse
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PLZF	<i>Promyelocytic leukemia zinc finger</i> , Transkriptionsfaktor, Pluripotenzmarker, Marker für undifferenzierte Spermatogonien
RBM3	<i>RNA binding motif protein 3</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
s	Sekunde
s.	siehe
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SNAP91	<i>Synaptosomal-associated protein</i>
SOX2	SRY ( <i>sex determining region Y</i> )-box 2; Transkriptionsfaktor
SPOC1	<i>Survival time associated PHD-finger protein in ovarian cancer</i> , PHF13
SCF	<i>Stem cell factor</i> , Ligand von KIT
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung ( <i>Tris-buffered saline</i> )
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-Zusatz
TESE	<i>testicular spermatozoa extraction</i>
u.	und
u.a.	unter anderem
UCHL1	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase)</i> ; PGP9.5
UTF1	<i>Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1</i>
vgl.	vergleiche
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Spermatogenese im adulten Organismus

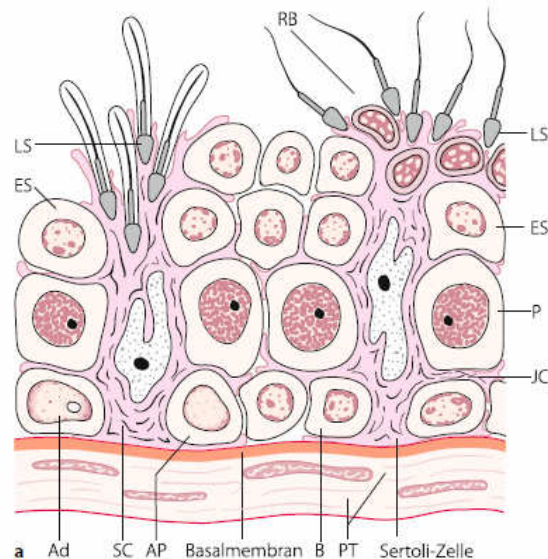
Die Spermatogenese ist der Prozess, bei dem aus der spermatogonialen Stammzelle die reifen Spermatozoen entstehen. In der ersten Phase der Spermatogenese proliferieren die Spermatogonien und differenzieren dabei zu Spermatozyten. Gleichzeitig wird durch Selbsterneuerung die Anzahl der spermatogonialen Stammzellen erhalten. In der zweiten Phase entstehen durch meiotische Reduktionsteilung der primären und sekundären Spermatozyten die haploiden Spermatiden. Die dritte Phase führt durch eine komplexe Serie cytologischer Transformationen der Spermatiden zur Entstehung der reifen Spermatozoen. Phase 1 und 3 sind morphologisch speziesspezifisch. Die Spermatozyten während der Meiose (Phase 2) zeigen innerhalb der Mammalier ähnliche morphologische Charakteristika (Clermont, 1972).

## 1.2 Die funktionelle Organisation des Hodens

Der menschliche Hoden wird durch Bindegewebssepten in ca. 250 bis 300 Lobuli unterteilt. In jedem Lobulus sind ein bis drei stark aufgeknäulte Samenkanälchen (*Tubuli seminiferi*) lokalisiert, die das Keimepithel enthalten. Der Raum zwischen den *Tubuli seminiferi* wird durch das Interstitium ausgefüllt. Dieses enthält neben den Leydigzellen, die das wichtigste männliche Geschlechtshormon, das Testosteron, sowie den *Insulin-like Factor 3* produzieren, lockeres Bindegewebe, Immunzellen, Blut- und Lymphgefäße und Nerven. Die Samenkanälchen nehmen 60 bis 80 Prozent des Hodenvolumens ein. Sie sind umhüllt von der *Lamina propria*. Diese besteht aus einer Basalmembran und den peritubulären Zellen (Myofibroblasten). Innerhalb des Keimepithels befindet sich neben den Keimzellen auch ein somatischer Zelltyp, die Sertolizellen. Diese im adulten Organismus teilungsinaktiven Zellen bilden das Stützgerüst des Keimepithels. Sie sitzen der Basalmembran auf und reichen bis in das Tubuluslumen hinein. Dabei umschließen sie die Keimzellen mit ihren cytoplasmatischen Fortsätzen und Ramifikationen. Sie dienen der Versorgung der Keimzellen mit lebensnotwendigen Faktoren, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren, Cytokinen, Steroiden und Prostaglandinen. Durch ihre Verbindungen untereinander, den *tight junctions*, bilden die Sertolizellen die Blut-Hoden-Schranke.

Die Keimzellen sind im Keimepithel entsprechend ihres Reifezustandes von außen nach innen angeordnet. Die Spermatogonien befinden sich direkt auf der *Lamina propria* oder behalten, selbst in differenzierterem Zustand, immer noch Kontakt zu dieser. In Richtung des Tubuluslumens folgen dann die primären und die sekundären Spermatozyten, danach die runden sowie die elongierten Spermatiden (Weinbauer et al., 2009; Abb. 1.01). Während der gesamten

Spermatogenese bleiben die Keimzellen durch Cytoplasmabrücken zu einem Synzytium verbunden (Dym & Fawcett, 1971; aus Abb. 1.01 nicht ersichtlich).



**Abb. 1.01:** Aufbau des männlichen Keimepithels. Abbildung nach Weinbauer et al., 2009 [verändert nach Amann, 2008], entnommen aus Nieschlag (2009). Ad, A dark-Spermatogonie; SC, Sertolizelle; Ap, A pale-Spermatogonie; B, B-Spermatogonie; PT, peritubuläre Zelle; JC, tight junctions; P, Spermatozyten; ES, frühe und runde Spermatiden; LS, späte und elongierte Spermatiden; RB, Residualkörper (abgestoßenes Cytoplasma der reifen Spermatiden).

### 1.3 Spermatogiontypen des Menschen

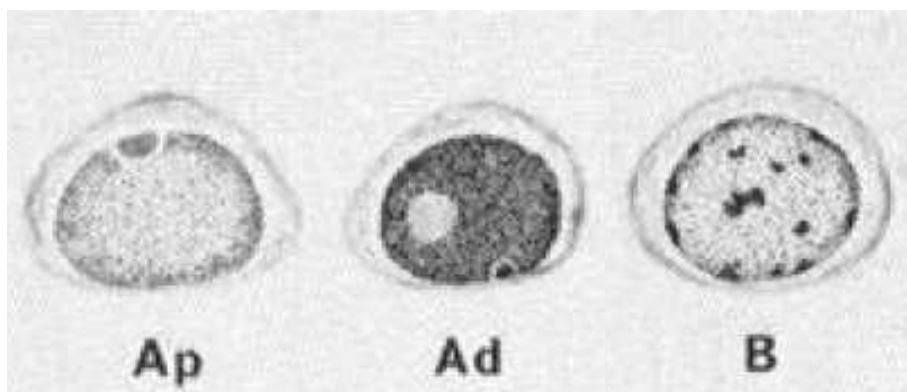
Der Name Spermatogonie wurde erstmalig 1876 von A. v. la Valette St. George für das früheste männliche Keimzellstadium benutzt. Er betrachtete diesen Begriff synonym zu dem Terminus „Ursamenzelle“ (zitiert nach Roosen-Runge & Barlow, 1953). Nach einiger Konfusion in der Nomenklatur versteht man heutzutage unter Spermatogonien diejenigen diploiden Zellen, die die frühesten Vorläufer der Spermatiden im adulten männlichen Keimepithel darstellen. Die Spermatogiontypen des Menschen wurden von Clermont beschrieben (Abb. 1.02). Dieser klassifizierte sie als A- und B-Spermatogonien. Die A-Spermatogonien wurden aufgrund der Chromatinverteilung im Zellkern nach einer Gewebefixierung mit Zenkers Formol weiterhin in A dark- und A pale-Spermatogonien unterteilt. A dark-Spermatogonien besitzen einen runden oder ovalen Zellkern mit fein granuliertem, homogenem, dunkel anfärbbarem Chromatin, eine oder mehrere nukleäre „Vakuolen“ und peripher gelegene Nukleoli (Clermont 1963; 1966; 1972).

Die A dark-„Vakuolen“ (ein bis drei pro Zelle) wurden von Clermont (1963) als Kavitäten bzw. vakuoläre Räume verschiedener Größe innerhalb der dichten Chromatinmasse der Zellkerne

beschrieben. Erstmals erwähnt wurden die „Vakuolen“ in Spermatogonien jedoch bereits von Branca im Jahre 1924. Roosen-Runge & Barlow konnten diese Struktur nicht mit Eisen-Hämatoxylin, aber mit Hilfe der Färbung nach Mann schwach mit Eosin anfärben (zitiert nach Roosen-Runge & Barlow, 1953). In seiner Publikation von 1966 beschrieb Clermont diese Struktur im Kernzentrum des oben genannten spermatogonialen Typs als „vakuolenähnlich“, in der sich bei genauerer Untersuchung die Präsenz schwach eosinophilen Materials zeigt. 1968 wurde die nukleäre „Vakuole“ der A dark-Spermatogonien von Tres und Solari als „klarer Raum mit 1 – 3 µm Durchmesser ohne scharfe Begrenzung“ bezeichnet. Diese Struktur scheint nach diesen Autoren keine Chromatinfibrillen, aber eine sehr blasse fibrilläre Matrix mit homogen verteilter Granula (Körnchengröße von 250 – 300 Å) zu enthalten, deren Peripherie verdichtet ist. 1971 wurde die genannte Kernstruktur von Rowley et al. als eine Region der Rarefaktion (= Zone der Verdünnung) bezeichnet. Auch Clermont (1972) ergänzte seine Beschreibungen der „Vakuole“ um „Kavität im Zentrum des Kerns, blass gefärbtes Material enthaltend“.

A pale-Spermatogonien zeichnen sich durch einen runden bis ovalen Zellkern mit blassem Chromatin sowie ein bis zwei der Kernmembran anhaftenden Nukleoli aus. Die Chromatingranula der A pale-Spermatogonien sind etwas gröber als bei den A-dark-Spermatogonien. Beide A-Spermatogonientypen liegen der Basallamina der *Tubuli seminiferi* an (Clermont 1963; 1966; 1972).

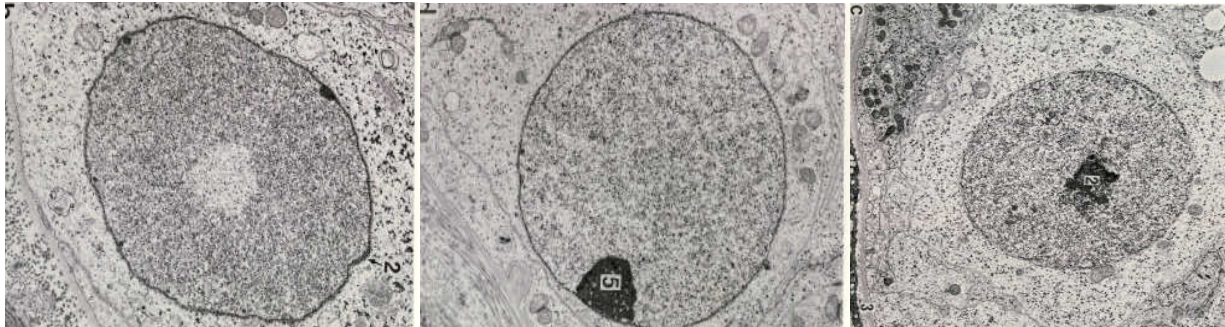
Die B-Spermatogonien haben einen runden Kern, der etwas gröber granuliertes, blaßes Chromatin sowie einen zentral gelegenen Nukleolus und Chromatinverdichtungen an der Kernmembran enthält. Die B-Spermatogonien verlieren den Kontakt zur Basallamina und können dadurch eine weiter zum Lumen gerichtete Position innerhalb des Tubulus einnehmen (Clermont 1963, 1966, 1972; Rowley et al., 1971). Die Zellen bleiben jedoch nach Rowley (1971) mindestens noch über einen dünnen Stiel mit der Basallamina verbunden. Ihre Gestalt erscheint dadurch im mikroskopischen Bild manchmal birnenförmig.



**Abb. 1.02:** Schematische Darstellung der Spermatogonientypen des Menschen. Abbildungen nach Clermont (1972).  
Von links nach rechts: A-pale-, A-dark-, B-Spermatogonie.



Abbildung 1.03 zeigt die elektronenmikroskopische Kernstruktur dieser Spermato gonientypen.



**Abb. 1.03:** Elektronenmikroskopische Darstellungen von Zellkernen der unterschiedlichen Spermato gonientypen. Abbildungen nach Schulze (1981). Links, A dark-; Mitte, A pale-; rechts, B-Spermato gonie.

Rowley et al. (1971) und Schulze (1978) beschrieben aufgrund elektronenmikroskopischer Untersuchungen zwei weitere A-Spermato gonientypen des Menschen, „A long“ bzw. „A cloudy“.

Bei der Ratte wurden zusätzlich *intermediate-type* Spermato gonien, Übergangsformen zwischen A- und B-Spermato gonien, identifiziert (Clermont, 1972).

In Studien an Rhesusaffen von Hermann et al. (2009; 2010) wird die Möglichkeit diskutiert, dass die nukleären Phänotypen der A dark- und A pale-Spermato gonien mit bestimmten Stadien des Zellzyklus (G0 vs. G1/S/G2/M) und nicht mit unterschiedlichen Stammzellpopulationen korrelieren.

## 1.4 Stammzellen

Stammzellen besitzen Differenzierungspotential für spezifische Zelltypen. Entsprechend der Ausdehnung dieses Potentials unterscheidet man zwischen Toti-, Pluri-, Multi- und Unipotenz. Nach der Befruchtung sind alle Zellen einer Zygote totipotent. Neben ihrem Potential alle Zellen des Organismus bilden zu können, besitzen sie zusätzlich die Fähigkeit zur Bildung der Embryonalhülle. Pluripotent sind die Zellen der inneren Zellmasse. Sie sind in der Lage, alle Zellen, also alle drei Keimblätter (Ekto-, Meso- und Endoderm) eines Embryos hervorzubringen, haben jedoch die Fähigkeit zur Bildung der Embryonalhülle verloren (Strachan & Read, 2005). Embryonale Stammzellen werden als äquivalent zu den Zellen der inneren Zellmasse betrachtet (De Felici et al., 2009). Die Zellen eines jeweiligen Keimblattes besitzen nur noch das Potential für bestimmte Zelltypen. Sie werden als multipotent bezeichnet. Unipotent dagegen sind Zellen, die die Vorläuferzellen lediglich eines Zelltyps darstellen (Strachan & Read, 2005). In diese Gruppe gehören auch die spermatogonialen Stammzellen, die als adulte Stammzellen gelten, da sie im erwachsenen Organismus vorkommen.

Zusätzlich zu ihrem Differenzierungspotential besitzen Stammzellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung (Proliferation der Zelle im gleichen Status; Young, 2011). Für einen pluripotenten Status ist ein bestimmtes Genexpressionsprogramm notwendig, das von bestimmten Transkriptionsfaktoren als Hauptregulatoren ausgeht. Diese *core transcription factors* sind die Proteine Oct4 (Pou5f), Sox2 und Nanog. Sie sind in der Lage durch Selbstregulation (Positivregulation des eigenen Promotors) und durch Regulation untergeordneter Transkriptionsfaktoren den pluripotenten Status der Zelle aufrechtzuerhalten (Young, 2011).

## 1.5 Spermatogoniale Stammzellen

Anhand von Untersuchungen der *Tubuli seminiferi* bei der Ratte *in toto* führten Clermont und Bustos-Obregon (1968) zwei Typen spermatogonialer Stammzellen ein. Diese sind im Pool der A-Spermatogonien enthalten und werden unterschieden in Reservestammzellen (*reserve stem cells*) und sich erneuernde Stammzellen (*renewing stem cells*). Letztere bilden den aktiven Pool der spermatogonialen Stammzellen und werden bei der Ratte aus vier verschiedenen Spermatogonienkategorien gebildet, den A<sub>1</sub>-, A<sub>2</sub>-, A<sub>3</sub>- und A<sub>4</sub>-Spermatogonien. Die seltenen A<sub>0</sub>-Spermatogonien, die als Reservestammzellen klassifiziert wurden, kommen meist einzeln oder paarweise vor und scheinen nicht bzw. kaum aktiv in die Produktion von Spermatozyten bzw. die Erneuerung der spermatogonialen Population involviert zu sein (Clermont & Bustos-Obregon, 1968; Clermont, 1972). Dagegen stellen die *intermediate cells* und die B-Spermatogonien die differenzierenden Spermatogonien dar (Clermont & Bustos-Obregon, 1968).

Der Begriff der Reservestammzellen und der sich erneuernden Stammzellen wurde bei den Primaten auf die A dark- bzw. die A pale-Spermatogonien des Rhesusaffen übertragen, bei dem Mechanismus und Selbsterneuerung von Spermatogonien erstmalig untersucht worden waren (Clermont & Leblond, 1955). Später wurde das Arrangement von A dark- und A pale-Spermatogonien mit einer *whole mount*-Analyse von *Tubuli seminiferi* bei einer anderen Affenspezies (*Cercopithecus aethiops*) untersucht (Clermont, 1969; 1972). Hierbei wurde gezeigt, dass die A dark-Spermatogonien mit ihrer niedrigen proliferativen Aktivität während der Spermatogenese, im Gegensatz zu den kontinuierlich proliferierenden A pale-Spermatogonien, unter normalen Bedingungen nicht zur Produktion der Spermatozyten beitragen (Clermont, 1972; zusammengefasst in Ehmcke & Schlatt, 2006). Die Betrachtung der A dark-Spermatogonien als Reservestammzellen und der A pale-Spermatogonien als sich erneuernde Stammzellen wurde dann auf die Spermatogoniogenese des Menschen ausgeweitet (Clermont, 1972).

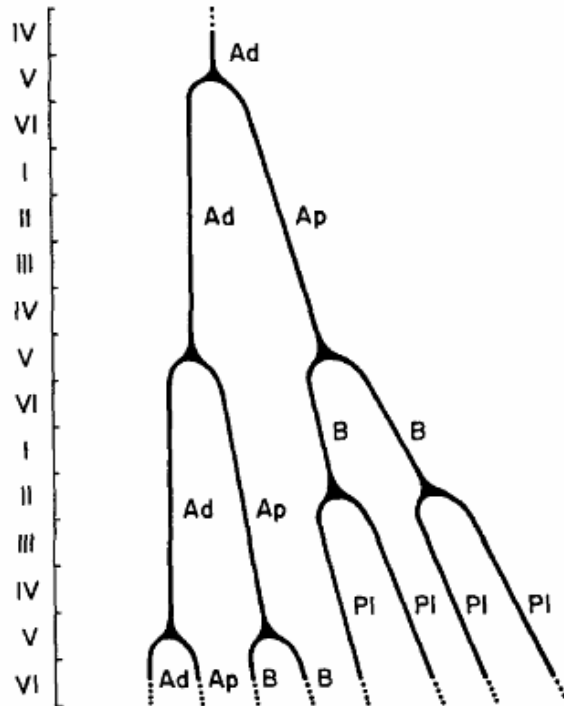
In den letzten Jahren ist es mehrfach gelungen, spermatogoniale Zellen zu isolieren und diese auf einen pluripotenten Status umzuprogrammieren bzw. dedifferenzieren zu lassen (Conrad et al., 2008; Golestaneh et al., 2009; Kossack et al., 2009; Mizrak et al., 2010). Obwohl die isolierten Zellen in der Lage waren, in alle drei Keimblätter zu differenzieren (Conrad et al., 2008; Golestaneh et al., 2009; Kossack et al., 2009; Mizrak et al., 2010), wurde die Bildung extensiver Teratome als ein Merkmal für die Pluripotenz von Zellen lediglich in zwei der genannten Studien erreicht (Conrad et al., 2008; Golestaneh et al., 2009). Da in drei dieser Arbeiten keine Zellselektion über einen spezifischen Spermatogonienmarker vorgenommen wurde (Golestaneh et al., 2009; Kossack et al., 2009; Mizrak et al., 2010) und bei Conrad et al. (2008) zur Zellselektion ein Oberflächenmarker eingesetzt wurde, der zusätzlich auf Sertolizellen exprimiert wird, ist die genaue Herkunft der pluripotenten Zellen nicht geklärt. Hingegen konnten mittels eines spermatogonialen Zelloberflächenmarkers (GPR125) Zellen angereichert werden, bei denen nach 14-tägiger Zellkultur unter Zusatz bestimmter Wachstumsfaktoren die GPR125-Expression erhalten blieb (He et al., 2010). Weiterhin konnten Sadri-Ardekani et al. (2009) die Migration humaner Spermatogonien zur Basallamina der Testes von Nacktmäusen nach Xenotransplantation feststellen. Diese Zellen traten in der Kultur neben *embryonic stem cell-like colonies* (darüber publiziert auch in Mizrak et al., 2010, s.o.) auf und werden von den Autoren als spermatogoniale Stammzellen betrachtet.

## 1.6 Modelle der Spermatogoniogenese

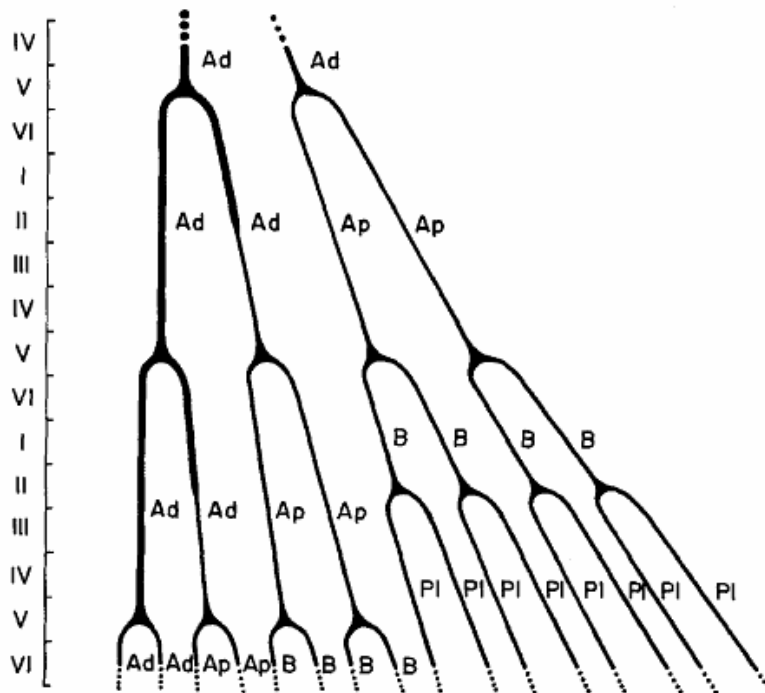
Das erste Modell zur Regeneration, Proliferation und Differenzierung der humanen Spermatogonien wurde 1966 von Clermont aufgrund der von ihm ermittelten Zellraten zwischen A dark- : A pale- : B-Spermatogonien : Preleptotän-Spermatozyten von 1:1:2:4 entworfen. Nach dem einfachen Modell (Abb. 1.04) teilt sich eine A-dark-Spermatogonie in eine A dark- und eine A pale-Spermatogonie (differentielle Mitose). Die A dark-Spermatogonie wird dabei als neue Stammzelle und die A-pale-Spermatogonie als differenzierte Zelle betrachtet. Die A pale-Spermatogonie teilt sich und differenziert in zwei B-Spermatogonien, aus denen vier Präleptotän-Spermatozyten entstehen. Die A dark-Spermatogonie hingegen bringt erneut eine A dark- und eine A pale-Spermatogonie hervor. Dies wird von der A dark-Spermatogonie der nächsten Generation wiederholt (Clermont, 1966).

Durch die Beobachtung, dass A dark- und A pale-Spermatogonien jeweils paarweise auftreten, wurde das Modell modifiziert (Clermont, 1966). Die differentielle Mitose wurde dabei durch äquivalente Mitose ersetzt (Abb. 1.05). Aus jeder A dark-Spermatogonie entstehen hierbei jeweils zwei Spermatogonien des gleichen Zelltyps, A dark-Spermatogonien (linkes Dendro-

gamm) oder A pale-Spermatozoen (rechtes Dendrogramm). Ansonsten stimmt dieses Modell mit dem ersten überein.

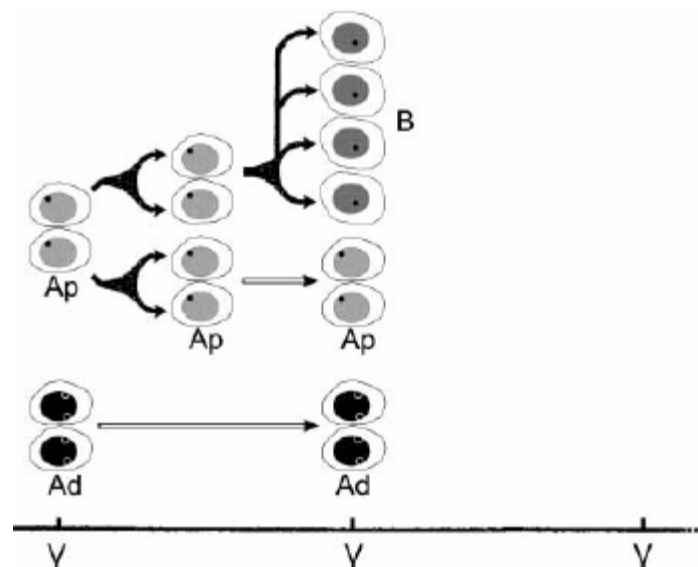


**Abb. 1.04:** Einfaches Modell der humanen Spermatozoenentwicklung von Clermont. Abbildung nach Clermont (1966). Ad, A dark; Ap, A pale; B, B-Spermatozoen; PI, Präleptotän-Spermatozoen.



**Abb. 1.05:** Erweitertes Modell der humanen Spermatozoenentwicklung von Clermont. Abbildung nach Clermont (1966). Ad, A dark; Ap, A pale; B, B-Spermatozoen; PI, Präleptotän-Spermatozoen.

Im Jahre 2006 wurde ein revidiertes Modell der humanen Spermatogonienentwicklung vorgestellt (Ehmcke & Schlatt). Dieses Modell zieht die Initiation der Spermatogenese von einem Paar A pale-Spermatogonien ausgehend in Betracht, geht bei den A dark-Spermatogonien lediglich von einer Selbsterneuerung ohne Zellvermehrung aus und schlägt zusätzlich zur A dark-Selbsterneuerung die Selbsterneuerung von A pale-Spermatogonien vor. Das Modell wurde anhand von Erkenntnissen aus Experimenten am Nicht-Primaten auf die menschliche Spermatogoniogenese adaptiert (Abb. 1.06).



**Abb. 1.06:** Revidiertes Modell der humanen Spermatogoniogenese. Abbildung nach Ehmcke & Schlatt (2006). Ad, A dark; Ap, A pale; B, B-Spermatogonie; untere Linie, Stadien des Spermatozytenzyklus.

Schulze (1981) wirft die Möglichkeit auf, dass es sich bei den A dark- und A pale-Spermatogonien nicht um aufeinanderfolgende Zellgenerationen handelt, da immer wieder binukleäre Zellen mit Zellkernen der beiden verschiedenen A-Spermatogonientypen detektiert werden. Im Gegensatz dazu werden jedoch niemals doppelkernige Spermatogonien gefunden, die neben einem A-Kern auch den Zellkern einer B-Spermatogonie enthalten.

## 1.7 Der fetale Hoden

Die Genitalleiste erscheint beim Menschen als mesodermale Verdickung ungefähr in der vierten bis fünften Schwangerschaftswoche (Pelliniemi et al., 1993; Wartenberg, 1981). Das erste morphologische Zeichen der testikulären Differenzierung ist die Formation der testikulären Stränge, beim Menschen ungefähr zwischen der sechsten und achten Schwangerschaftswoche (Pelliniemi et al., 1993). Die pluripotenten primordialen Keimzellen sind auch die Vorläufer der weiblichen Keimzellen. Im menschlichen Embryo sind diese bereits in der zweiten Schwangerschaftswoche im Epiblasten nachweisbar ([10]). Ihre Migration in die Gonadalleiste dauert human von der vierten Schwangerschaftswoche bis zur fünften Schwangerschaftswoche an. Etwa in der siebenten Schwangerschaftswoche werden die Zellen innerhalb der testikulären Stränge des männlichen Organismus von den differenzierenden Sertolizellen umschlossen (Wartenberg, 1981). Die primordialen Keimzellen differenzieren und werden nun als Gonozyten oder Prespermatogonien bezeichnet, wobei hiermit oft die gleiche Zellpopulation gemeint ist (Gaskell et al., 2004). Wartenberg (1976; 1981) klassifizierte bei den fetalen Keimzellen verschiedene Subpopulationen, die Gonozyten und die Prospermatogonien (Eintritt in das Prospermatogonien-Stadium in der 12. Schwangerschaftswoche). Wartenberg unterteilte die zweite Population einerseits in mitotisch aktive Prospermatogonien, andererseits in sich nicht teilende / ruhende Prospermatogonien sowie in solche Prospermatogonien, die die mitotische Aktivität wieder aufgenommen haben. Holstein et al. (1987) unterschieden Gonozyten (Zellen mit großem Kern und prominentem Nukleolus) aus acht, zehn und 13 Wochen alten Embryos von fetalen Spermatogonien aus 13 und 22 Wochen alten Embryos aufgrund der morphologischen Abweichungen. Fukuda et al. (1975) identifizierten in neun und 30 Wochen alten Feten drei morphologisch verschiedene Keimzelltypen, die sie als Gonozyten, *intermediate cells* und fetale Spermatogonien bezeichneten. Gaskell et al. (2004) fanden ebenfalls drei unterschiedliche fetale Keimzellpopulationen aufgrund verschiedener Morphologien sowie Unterschieden im Expressionsmuster dreier Proteine (OCT4/KIT/MAGE-A4), die sie, ähnlich wie Fukuda, als Gonozyten, *intermediate cells* und Prespermatogonien bezeichneten. Nach dieser Klassifikation gelten einzelne, runde Zellen mit einem hohen nukleär-cytoplasmatischen Ratio, prominentem Nukleolus und dem Expressionsmuster OCT4+/KIT+/MAGE-A4- als Gonozyten, paarweise vorkommende Zellen mit KIT-/MAGE-A4-/OCT4(+)- als *intermediate cells* und sehr große, unregelmäßig begrenzte, gruppenweise an der Peripherie der Hodenstränge auftretende Zellen mit dem Expressionsmuster OCT4-/KIT-/MAGE-A4+, als Prespermatogonien. Die Prespermatogonien arretieren letztendlich in der G0/G1-Phase bis die Spermatogenese in der Pubertät initiiert wird (Burger & de Kretser, 1981; zitiert nach Gjerstorff et al., 2007).

## 1.8 Hodenpathologien und der Johnsen-Score

Der Johnsen-Score (Johnsen, 1970) ist ein Klassifizierungsschema zur Festlegung der Schwere einer Hodenpathologie. Er beschreibt Keimzellreifungsstadien in der Spermatogenese auf einer Scala von 1 (keine Keimzellen und keine Sertolizellen) bis 10 (vollständige Spermatogenese). Die genannte Beschreibungsmethode stellt ein geeignetes Mittel zur Beurteilung der Hodenpathologie dar, da bei zunehmender Degeneration des Keimepithels oftmals sukzessive der jeweils am weitesten ausgereifte Keimzelltyp verschwindet. Nach diesem Beurteilungsschema wurden 50 runden Tubulusquerschnitten ein Score-Wert entsprechend Anzahl und Differenzierungsgrad der Keimzellen zugeordnet (s. Tabelle 1.01). Danach wurde der Mittelwert gebildet, womit der endgültige Johnsen-Score einer Hodenbiopsie festgelegt wurde.

Score 10	komplette Spermatogenese mit vielen Spermatozoen; normale Dicke des Keimepithels; offenes Tubuluslumen
Score 9	viele Spermatozoen; Keimepithel disorganisiert; kleineres bzw. nicht vorhandenes Tubuluslumen
Score 8	wenige Spermatozoen (< 5 – 10 pro Schnitt)
Score 7	keine Spermatozoen; viele Spermatiden
Score 6	keine Spermatozoen; wenige Spermatiden (< 5 - 10)
Score 5	keine Spermatozoen; keine Spermatiden; mehrere oder viele Spermatozyten
Score 4	wenige Spermatozyten (< 5 pro Schnitt); keine Spermatiden; keine Spermatozoen
Score 3	Spermatogonien als einzelne Keimzellen
Score 2	keine Keimzellen; Sertolizellen sind vorhanden
Score 1	keine Zellen im Tubulusschnitt

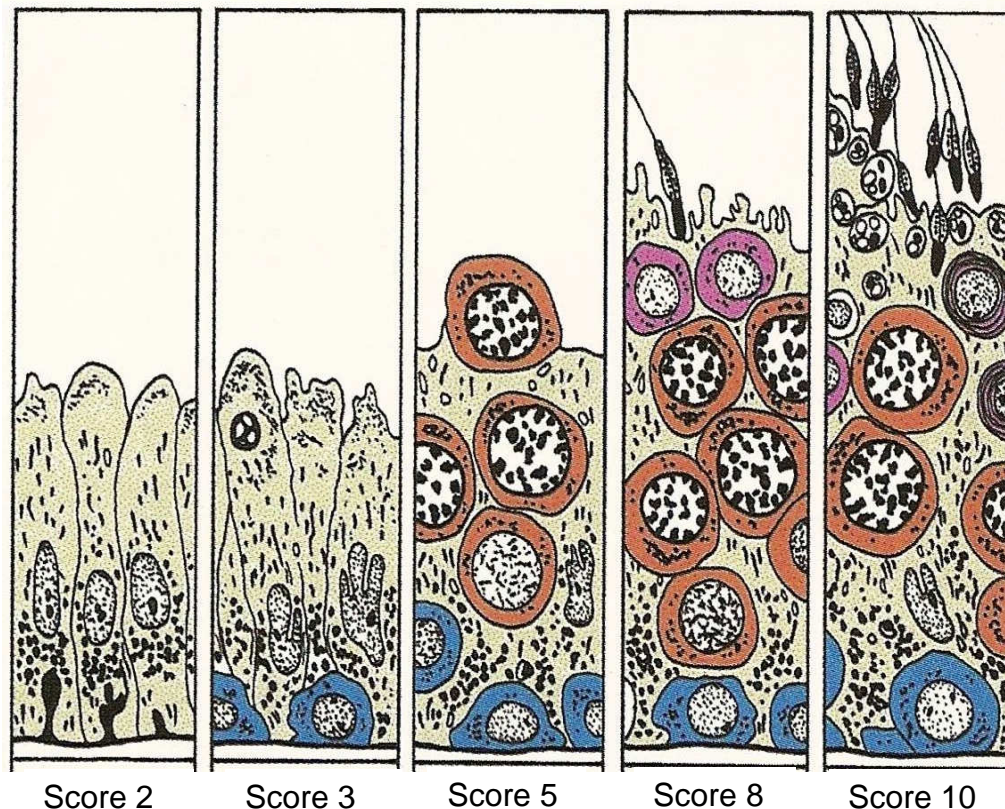
Tab. 1.01: Der Johnsen-Score. Nach Johnsen (1970).

Der Johnsen-Score wurde 1976 von de Kretser & Holstein modifiziert (s. Tab. 1.02). Dieses Beurteilungsschema ordnet jedem Tubulus eines histologischen Schnittpräparates ebenfalls einen entsprechenden Score-Wert zu. Auf die Berechnung des wenig aussagekräftigen Mittelwertes wird dabei jedoch verzichtet.

Score 10	volle Spermatogenese
Score 9	viele reife Spermatiden, disorganisiertes Keimepithel
Score 8	einige reife Spermatiden
Score 7	keine reifen Spermatiden, viele frühe Spermatiden
Score 6	keine reifen Spermatiden, einige frühe Spermatiden
Score 5	keine Spermatiden, viele Spermatozyten
Score 4	keine Spermatiden, einige Spermatozyten
Score 3	Spermatogonien als einzelne Keimzellen
Score 2	keine Keimzellen, nur Sertolizellen ( <i>Sertoli cell-only-Symptomatik</i> )
Score 1	kein Keimepithel

Tab. 1.02: Der modifizierte Johnsen-Score (mJ-Score) nach de Kretser & Holstein (1976).

In Abbildung 1.07 sind die Haupt-Phänotypen des modifizierten Johnsen-Scores (mJ-Scores) zusammengestellt, Sertolizell-Syndrom (mJ-Score 2), Spermatozoen als einziges vorhandenes Keimzellstadium (mJ-Score 3), Meiose-Arrest auf dem Niveau der primären Spermatozyten (mJ-Score 5), Hypospermatogenese (mJ-Score 8) und vollständige Spermatogenese (mJ-Score 10). Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden Hodengewebe mit mJ-Score 2, mJ-Score 3, mJ-Score 5 und mJ-Score 10 untersucht.



**Abb. 1.07:** Der modifizierte Johnsen-Score nach de Kretser & Holstein. Haupt-Phänotypen des Keimepithels. Zeichnung von A.-F. Holstein, entnommen aus Nieschlag (2000).

## 1.9 Der Zellzyklus

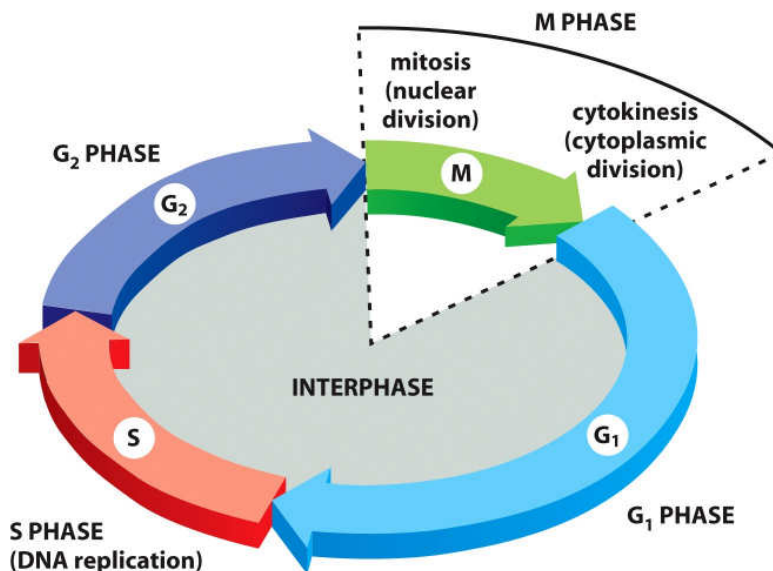
Der Zellzyklus eines Eukaryoten dient der Zellteilung zum Zwecke der mitotischen Proliferation. Dabei entstehen aus einer Mutterzelle mehrere, in der Regel zwei, Tochterzellen. Der Prozess ist mit morphologischen Veränderungen des Zellkerns verbunden. Während des Zellzyklus erfolgt ein periodischer Wechsel zwischen Mitose und Interphase.

Die Mitose ist die Teilung von Kern (Karyokinese) und Cytoplasma einer Zelle (Cytokinese). Sie umfasst zeitlich ca. zehn Prozent des Zellzyklus und verläuft über verschiedene Phasen.

Die Interphase beinhaltet Phasen des Zellwachstums sowie eine Phase der Replikation der DNA. Sie nimmt 90 % der Zeit des gesamten Zellzyklus ein und besteht aus der G1-Phase



(*Gap 1*, *gap* = Lücke zwischen Mitose und S-Phase; Zellwachstum), der S-Phase (Synthese durch DNA-Replikation) und der G<sub>2</sub>-Phase (*Gap 2*, *gap* zwischen S-Phase und Mitose; Zellwachstum). Die Phasen des Zellzyklus sind in Abbildung 1.08 dargestellt.



**Abb. 1.08:** Der Zellzyklus. Die Abbildung wurde entnommen aus Alberts et al. (2008). G<sub>1</sub>-Phase, S-Phase und G<sub>2</sub>-Phase (= Interphase des Zellzyklus), M-Phase (= Mitose).

Innerhalb des Zellzyklus gibt es so genannte Checkpoints, an denen die Entwicklung stoppt und eine Überprüfung eines bestimmten Ist-Zustandes nach jeweils spezifischen Kriterien erfolgt. Im Falle des Nicht-Zutreffens des entsprechend notwendigen Kriteriums kann die Entwicklung der Zelle an diesen Punkten arretiert und der Abbau der Zelle durch Apoptose eingeleitet werden. In der Interphase sind die Chromosomen nicht sichtbar, da sie im Chromatin verteilt sind (Arbeitsform der Chromosomen). Im Gegensatz dazu sind die Chromosomen in der Mitose sichtbar, da sie in ihrer Transportform vorliegen (Alberts, 2008; Campbell, 2000; Strachan & Read, 2005).

Die Mitose wird unterteilt in die Prophase, die Prometaphase, die Metaphase, die Anaphase, die Telophase und die Cytokinese. In der Prophase wird die Mitosespindel aus Fasern, bestehend aus Mikrotubuli und Proteinen, gebildet. Dabei lösen sich die Mikrotubuli des Cytoskeletts der Zelle teilweise auf. In dieser Phase kommt es zum Verschwinden der Nukleoli und zum Sichtbarwerden der Chromosomen. Außerdem rückt das Centrosom auseinander. Centrosomen sind Polkörperchen aus zwei Centriolen mit zylindrischem Aufbau, die jeweils aus neun Mikrotubuli-Tripletts bestehen. Das Centrosom ist die Struktur in der Zelle, von der die Mitosespindel ausgeht.

In der Prometaphase der Mitose kommt es zum Zerfall der Kernhülle. Die Spindelfasern dringen in den Zellkern ein und treten mit den Chromosomen in Kontakt. Die Kinetochorfasern heften sich am Kinetochor an, einer großen, mehrlagigen Proteinstruktur am Centromer der Chromosomen. In der sich anschließenden Metaphase ordnen sich die Chromosomen in der Metaphaseplatte. In der nachfolgenden Anaphase werden die Schwesterchromatiden am Centromer getrennt und zu den entgegengesetzten Zellpolen gezogen. Hierbei wandert das Kinetochor voran. Die Spindelfasern rücken nun weiter auseinander, wodurch es zu einer Verlängerung der Zelle kommt. Am Ende der Anaphase liegt an jedem Pol der Zelle ein gleicher, vollständiger Chromosomensatz vor. In der Telophase erfolgt eine weitere Verlängerung der Zelle durch die Polfasern. Nukleoli und Zellkern werden neu gebildet, wobei für die Entstehung der Kernhülle frühere Fragmente dieser Struktur benutzt werden. Die Chromatinfasern der Chromatiden werden wieder entwunden, was zu einer Entfaltung der Chromatiden zu Chromatin führt.

Der Mitose schließt sich die Cytokinese an, in der das Cytoplasma der beiden Tochterzellen voneinander getrennt wird. Bei Tierzellen kommt es zur Abschnürung einer Teilungsfurche, einem kontraktilen Ring aus Aktinfasern (Alberts et al., 2008; Campbell, 2000, Knippers, 2001; Seyffert, 2003; Strachan & Read, 2005).

## 1.10 Untersuchte Marker humaner Spermatogonien

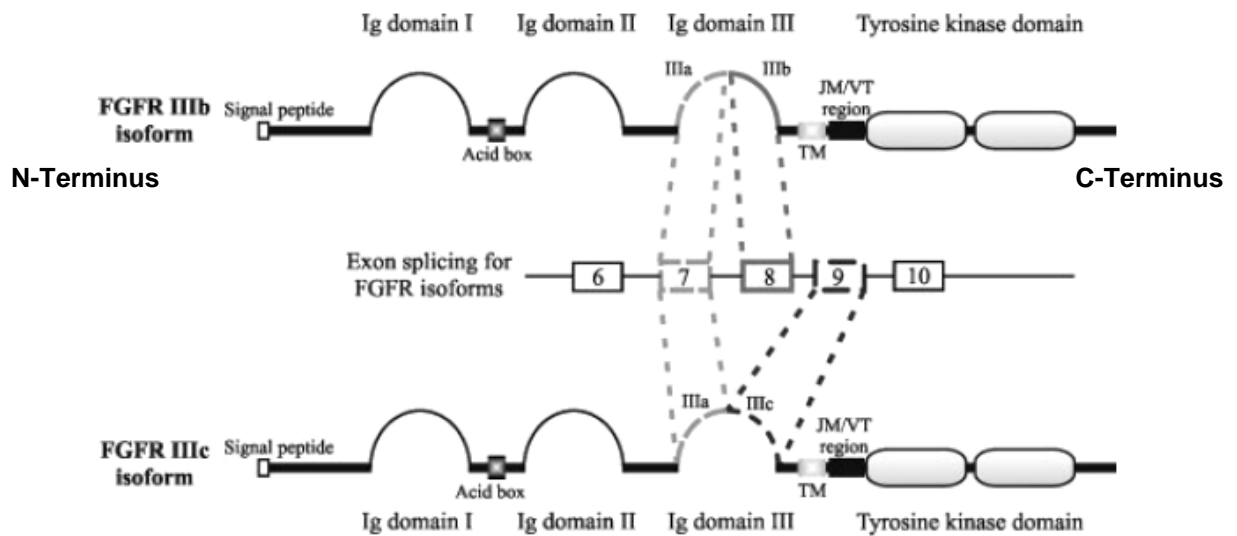
In den folgenden Kapiteln werden die grundlegenden Kenntnisse über die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Marker zusammengefasst.

### 1.10.1 Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor 3

Die Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptoren (*fibroblast growth factor receptors, FGFRs*) gehören zu den *single pass type I*-Membranproteinen sowie zu den Rezeptortyrosinkinasen ([1]<sup>1</sup>; Eswarakumar et al., 2005). Man unterscheidet FGFR1 bis FGFR5 (Cotton et al., 2008) sowie 48 Haupt-Isoformen, generiert durch alternatives Splicen (Polanska et al., 2009). Die Aminosäuresequenz ist innerhalb der multifunktionalen Proteinfamilie sowie evolutionär vom Nematoden bis zum Menschen hoch konserviert (Cotton et al., 2008). Die Abbildung 1.09 illustriert die FGFR-Domänenstruktur der Isoformen IIIb und IIIc.

---

<sup>1</sup> [1]: Internetreferenzen sind wie folgt gekennzeichnet: [...]; Übersicht Internetreferenzen s. Abschnitt 7 im Anschluss an die Literaturliste



**Abb. 1.09:** FGFR-Domänenstruktur und Isoformen. Abbildung nach Cotton et al. (2008). Ig = Immunglobulin-ähnliche Domäne; JM = Juxtamembrandomäne. Die zwei Teile der Tyrosinkinase-Domäne sind bei dem Protein FGFR3 durch 15 Aminosäuren getrennt. Des Weiteren ist ein Rest an der Tyrosinkinase-Domäne phosphorylierbar.

Die FGFR-Proteine sind zusammengesetzt aus einem Signalpeptid am N-terminalen Ende, einer extrazellulären Domäne, die aus drei Immunglobulin-ähnlichen Modulen (Ig) besteht, und einer aus sauren Aminosäuren aufgebauten *acid box* zwischen Ig-Domäne I und II, einer Transmembran-Domäne (TM) sowie einer cytoplasmatischen, zweigeteilten Tyrosinkinase-Domäne am C-Terminus des Proteins (Cotton et al., 2008; Polanska et al., 2009). Isoform IIIb und IIIc unterscheiden sich in der zweiten Hälfte der dritten Ig-Domäne. Diese wird durch alternatives Splicing der FGFR-Transkripte bei Isoform IIIb aus den Exons 7 und 8 und bei Isoform IIIc aus den Exons 7 und 9 erzeugt (Cotton et al., 2008).

FGFRs unterscheiden sich nach Liganden-Affinität und Gewebespezifität. Jeder FGF-Rezeptor kann durch verschiedene FGFs aktiviert werden (Cotton et al., 2008). In der Interaktion der FGFRs mit den jeweiligen Liganden, den Fibroblastenwachstumsfaktoren (*fibroblast growth factors, FGFs*), werden Signalkaskaden angestoßen, die letztendlich in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren münden (Cotton et al., 2008). Der Ablauf der FGF-FGFR-Signalwege ist in Abbildung 1.10 dargestellt.

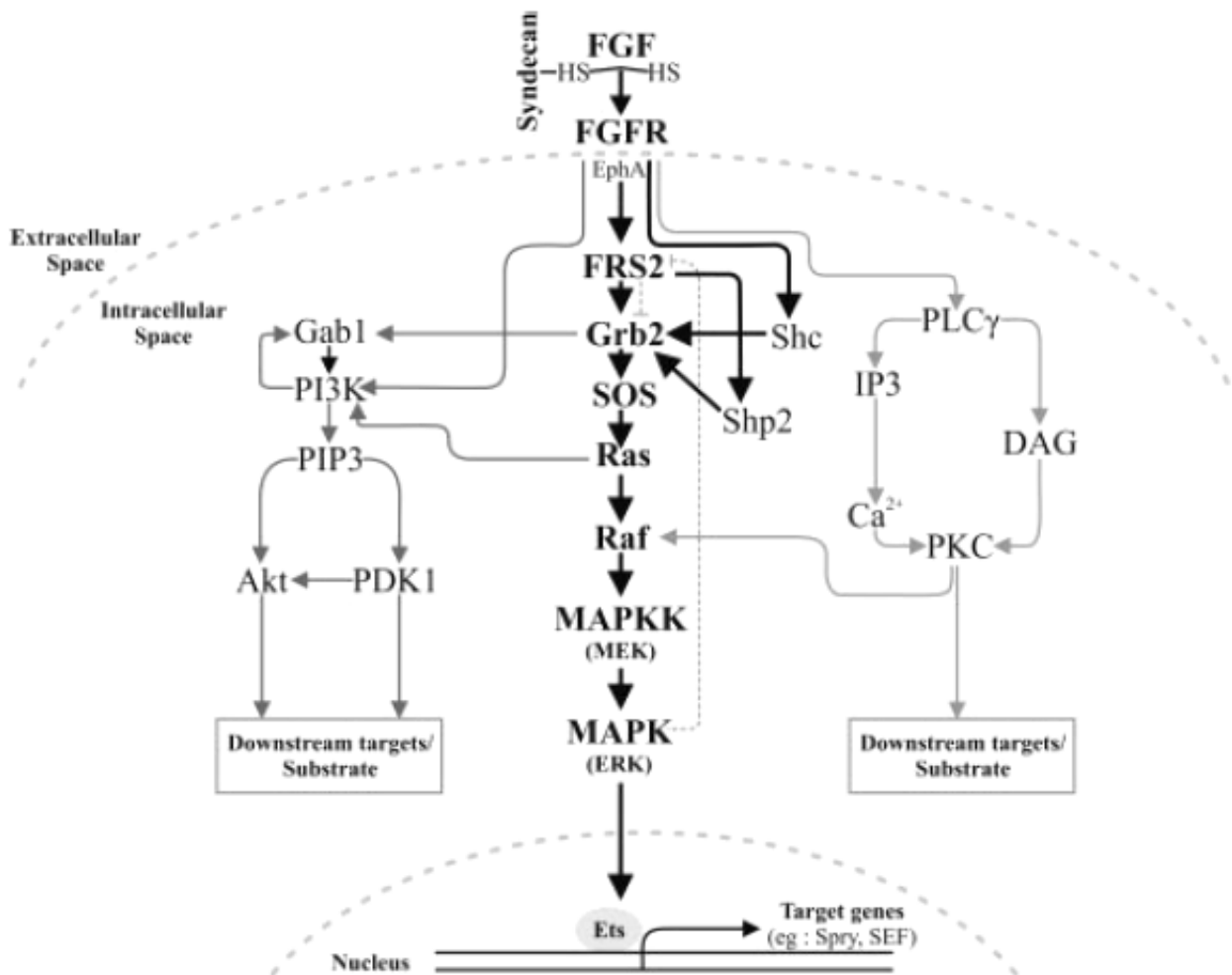


Abb. 1.10: Durch FGFR3 aktivierte intrazelluläre Signalwege. Abbildung nach Cotton et al. (2008).

Die Formation des FGF-Syndecan/Heparinkomplexes führt zur Autophosphorylierung des Rezeptors, wodurch verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert werden. Der Ras/MAPK-Signalweg führt über die Translokation der letzten aktivierten Komponente in den Nucleus zur Phosphorylierung spezifischer Transkriptionsfaktoren der Ets-Familie, wodurch die Expression von FGF-Targetgenen ausgelöst wird. Weitere FGF/FGFR-aktivierte Signalwege sind der PI3K/Akt- sowie der Ca<sup>2+</sup>/PKC-*pathway* (Cotton et al., 2008).

FGFs und FGFRs sind in viele zelluläre Prozesse involviert, wie beispielsweise Proliferation, *cell survival*, Differenzierung, Migration und Apoptose (Cotton et al., 2008; Hôte et al., 2004). Ihre Expression erfolgt in vielen Organen. Die Expression der FGFs und FGFRs in der Testis ist differentiell und dient hier zu Regulation und Erhalt des männlichen Reproduktionssystems (Cotton et al., 2008).

Der Fibroblastenwachstumsfaktorrezeptor 3 (FGFR3; JTK4, CD333; *Cluster of differentiation 333*) wird beim Menschen in vielen Organen, u.a. auch in der Testis, exprimiert ([2]).

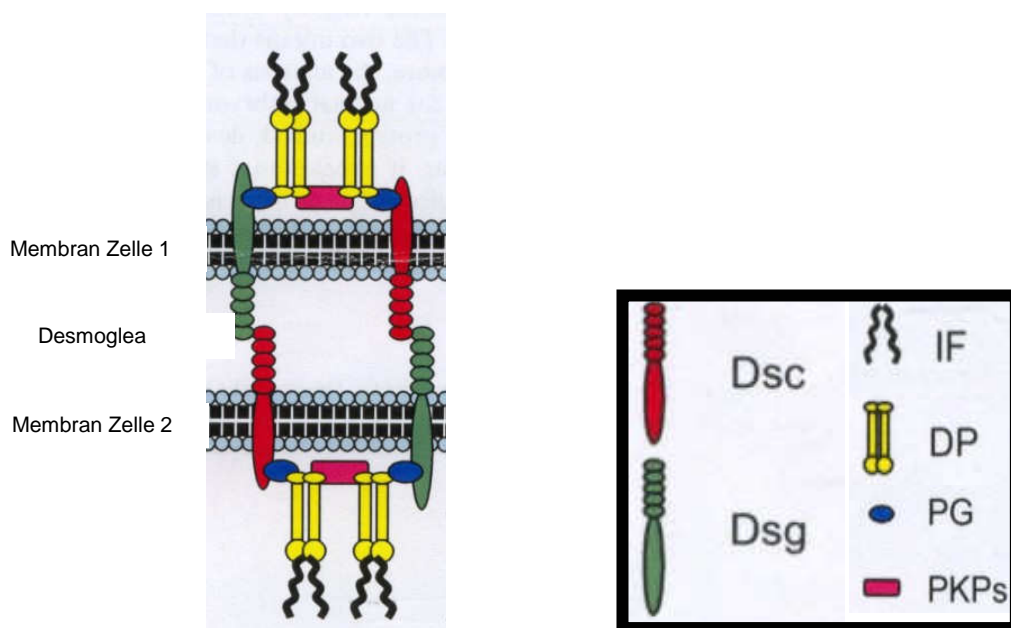
Testisspezifisch ist die Isoform FGFR IIIc (Daten per real-time PCR aus Ratte, Cancilla et al., 2000). FGFR3 stellt den Rezeptor für FGF2 (*bFGF, basic FGF*) und FGF1 (*aFGF, acidic FGF*) dar, wobei FGF1 von der FGFR IIIc-Variante aus klonierter Maus-DNA mit einer höheren Affinität gebunden wird als FGF2 (Ornitz & Leder, 1992).

Die Isoform mit der Ig-Domäne IIIc des FGFR3-Proteins, bei der das Exon 8 herausgespleißt ist, wird in der NCBI-Nomenklatur als Protein-Isoform 1 bezeichnet. Sie geht aus der Transkriptvariante 1 (NM\_000142) hervor. Aus Transkriptvariante 2 (NM\_022965) wird die Protein-Isoform 2 hergestellt, ein solubles Protein, das ohne die Exons 8, 9 und 10 generiert wird. Die Isoform mit der Ig-Domäne IIIb (ohne Exon 9) entspricht der Protein-Isoform 3. Diese wird aus der Transkriptvariante 3 (NM\_001163213) hergestellt ([3]; Stand 09.11.2010).

FGFR3 fungiert beispielsweise als Negativregulator für lineares Knochenwachstum, indem das Chondrozyten-Wachstum inhibiert und die terminale Differenzierung ausgelöst wird (Deng et al., 1996). Auf Grund dessen wird durch eine *gain-of-function* Mutation im FGFR3-Gen, die eine konstitutive Aktivierung des Proteins zur Folge hat ([4]), die Krankheit Achondroplasie hervorgerufen, die häufigste Form des kurzgliedrigen Zwergenvuchses (Martinez-Friaz et al., 1991). Eine solche Mutation (c.1138G>A) führte bei einem Patienten mit Achondroplasie und Klinefelter-Syndrom (Trisomie der Geschlechtschromosomen XXY) zu einer Erhaltung der Fertilität (Fallbeschreibung s. Juul et al, 2007). Deshalb wurde für das Protein FGFR3 ein reverser, also proliferativer bzw. apoptosehemmender, Effekt auf Spermatogonien angenommen. Außerdem scheinen aktivierende Mutationen im FGFR3-Gen, die als spontane Punktmutationen in der Keimbahn entstehen, zu einer klonalen Expansion der mutierten Spermatogonien zu führen (Goriely et al., 2009).

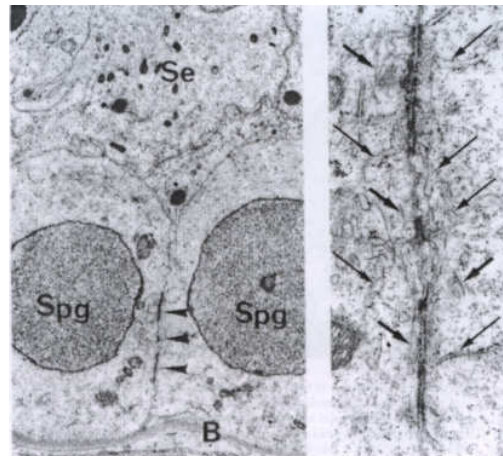
### 1.10.2 DSG2

DSG2 (Desmoglein 2) ist ein kalziumbindendes Transmembran-Glykoprotein, das der Desmoglein-Subfamilie sowie der Cadherin-Zelladhäsionsmolekül-Superfamilie angehört. Desmogleine stellen Komponenten von Desmosomen dar ([3]). Als Desmosomen werden Zell-Zell-Verbindungen (*junctions*) bezeichnet, die in den intermediären Filamenten der Zelle verankert sind. Sie kommen vor allem in Geweben mit starker mechanischer Belastung vor, z.B. im Epithel und im Myokard (Cheng et al., 2005; [3]). Die Lokalisation von Desmogleinen in einem Desmosom kann der schematischen Darstellung in Abbildung 1.11 entnommen werden.



**Abb. 1.11:** Modell eines Desmosoms. Abbildung nach Cheng et al. (2005). Desmosomen bestehen aus desmosomalen Cadherinen (Desmocollinen, Dsc; Desmogleinen, Dsg) und den Plaque-Proteinen Plakoglobin (PG), Plakophilin (PKPs) und Desmoplakin (DP). Desmosomen sind mit den intermediären Filamenten (IF) der Zelle verankert.

Desmosomen und Desmosomen-ähnliche Strukturen gibt es auch im Hoden, u.a. zwischen allen Spermato gonientypen und Sertolizellen sowie zwischen den basalen Spermato gonien, die nicht immer durch Sertolizellen getrennt sind. Desmosomen können zwischen Spermato gonien desselben Klons, welche zusätzlich durch interzelluläre Brücken verbunden sind, vorkommen. Alternativ wurden Desmosomen zwischen Spermato gonien verschiedener Klone detektiert. Meist wurden sie hierbei zwischen Spermato gonien desselben Typs beobachtet, seltener auch, zwischen verschiedenen Spermato gonientypen (Altorfer et al., 1974). Abbildung 1.12 zeigt Desmosomen zwischen zwei Spermato gonien im humanen Hoden.



**Abb. 1.12:** Desmosomen zwischen zwei Spermatogonien. Abbildung nach Altorfer et al. (1974). Links: Spg = Spermatogonien; Se = Sertolizelle; B = Basallamina. Die Pfeile markieren die Desmosomen. Rechts: Detail.

In embryonalen Stammzellen wird DSG2 für die normale Zellproliferation benötigt. Deshalb geht man zusätzlich von Desmosomen-unabhängigen Funktionen des DSG2-Proteins aus (Eshkind et al., 2002). Die Annahme über den Zusammenhang einer DSG2-Expression mit Proliferation, wird dadurch unterstützt, dass Melanosomen, die *in situ* kein DSG2 exprimieren, in Kultur mit der Synthese dieses Proteins beginnen. Außerdem wurde DSG2 bei einer Untergruppe von Nävi und primären Melanomen detektiert (Rickelt et al., 2008), sowie des Weiteren bei zwei Melanom-Zelllinien. Bei den letztgenannten Zellen war das Protein über die gesamte Oberfläche verteilt gefunden worden (Schmitt et al., 2007).

### 1.10.3 UTF1

UTF1 (*Undifferentiated embryonic cell Transcription Factor 1*) wurde erstmalig 1998 von Okuda et al. als transkriptionaler Koaktivator beschrieben, der vor allem in pluripotenten embryonalen Stammzellen exprimiert wird. Im gleichen Jahr wurden zwei evolutionär konservierte Domänen des UTF1-Proteins (C1 und C2; C2 enthält einen Leucin *zipper*) identifiziert, die für die Aktivierung des DNA-Bindeproteins ATF-2 durch Brückenbildung zwischen ATF-2 und basaler Transkriptionsmaschinerie essentiell sind (Fukushima et al., 1998). Van den Boom et al. (2007) fanden in embryonalen Stammzellen der Maus eine enge Chromatinassoziation des Proteins. Nishimoto und seine Arbeitsgruppe wiesen nach, dass in embryonalen Stammzellen der Maus die UTF1-Expression synergistisch durch OCT4 und SOX2 reguliert wird. OCT4 bindet dabei an eine andere Octamer-Sequenz in der regulatorischen Region des *Utf1*-Locus, das SOX2-Protein hingegen an das Sox-bindende Element von *Utf1* (Nishimoto et al., 1999; 2005). Neben Okuda und Fukushima beschrieb Nishimoto die aktivierenden Eigenschaften von UTF1 mit Hilfe von Überexpressionsexperimenten bei der Maus (Nishimoto et al., 2005). Hierbei ergab sich

zum einen, dass UTF1 eine schnelle zelluläre Proliferation induziert. Aufgrund eines Effektes auf die Teratom-Formation bei Nacktmäusen ergab sich weiterhin, dass das Protein tumorigene Eigenschaften besitzt. Zusätzlich zu seiner aktivierenden Eigenschaft kann UTF1 in Abwesenheit von ATF-2 in embryonalen Stammzellen auch als transkriptionaler Repressor fungieren (Fukushima et al., 1999). Van den Boom et al. (2007) beschrieben UTF1 ebenfalls als transkriptional reprimierend, da nach *Utf1*-Knockdown mittels siRNA in embryonalen Maus-Stammzellen sowie einer Karzinom-Zelllinie eine Verspätung bzw. Blockade in der zellulären Differenzierung festgestellt wurde.

Bei der Ratte wurde UTF1 in einer A-spermatogonialen Subpopulation an PLZF-positiven Zellen der Typen A single, A paired sowie in kurzen Ketten von A aligned Zellen gefunden (van Bragt et al., 2008). Kristensen et al. (2008) untersuchten die UTF1-Expression in humanem Hodengewebe. Detektiert wurde das Protein hier fetal bis zur 14. Schwangerschaftswoche, d.h. vor dem Eintritt der Keimzellen in den mitotischen Arrest, danach postnatal in Spermatogonien ab dem vierten Lebensmonat sowie in Spermatogonien des adulten männlichen Organismus. Wang et al. (2010) beobachteten UTF1 ebenfalls in Spermatogonien im Hoden des erwachsenen Mannes.

### 1.10.4 SPOC1

SPOC1 (*Survival time associated PHD-finger protein in Ovarian Cancer 1*; PHF13; *PHD finger protein 13*) wird in stark proliferierenden Zellen hoch exprimiert. Die Expression erfolgt physiologisch in der Testis in Spermatogonien und weiterhin in Ovarial-Carcinom-Zellen, wobei hier ein höheres Expressionslevel mit einer kürzeren Überlebenszeit assoziiert ist (Mohrmann et al., 2005). Auf einem geringeren Level wird SPOC1 ubiquitär in allen Geweben exprimiert (Kinkley et al., 2009).

Das Protein besitzt eine einzelne C-terminale PHD- (*plant homeo domain*; erstmalig gefunden in einem Protein bei *Arabidopsis thaliana*) oder LAP-Domäne und eine zweiteilige Kernlokalisierungssequenz (Mohrmann et al., 2005; Kinkley et al., 2009). Die PHD-Domäne ist ein kurzes Sequenz-Motiv, bestehend aus 50 bis 80 Aminosäuren mit einem charakteristischen Cys<sub>4</sub>-His-Cys<sub>3</sub>-Muster (Mohrmann et al., 2005).

In den meisten Phasen des Zellzyklus weist SPOC1 eine enge Chromatinassoziation auf. Erhöhte SPOC1-Expressionslevel sowie eine verstärkte Chromatinassoziation sind in der späten G<sub>2</sub>- sowie in der M-Phase zu verzeichnen. In der S-Phase erfolgt der Übergang in die soluble Fraktion. In der Mitose selbst wurde ebenfalls ein dynamisches Verhalten des SPOC1-Proteins bezüglich seiner Chromatinassoziation detektiert. Während das Protein in der Prophase chromatinassoziiert vorliegt, ist es in der Metaphase sowie der frühen Anaphase in löslicher Form zu



finden. Von der Mitte bis zur späten Anaphase und in der Telophase ist das Protein erneut chromatinassoziiert anzutreffen (Kinkley et al., 2009).

### 1.10.5 DMRT1

DMRT1 (*Doublesex and Mab-3 Related Transcription factor 1*; *mab* = *Male ABnormal*) ist ein Transkriptionsregulator der männlichen Differenzierung (Krentz et al., 2009; Matson et al., 2010; Murphy et al., 2010). Das Gen befindet sich beim Menschen in einem Bereich auf Chromosom 9, der mit XY-Geschlechtsumkehr assoziiert ist (Raymond et al., 1998). Hemizygotie des Genlocus kann zu testikulärer Dysfunktion oder Feminisierung führen ([3]).

Die mRNA wird vor der Geschlechtsdifferenzierung embryonal ausschließlich in der Genitalleiste früher XX- und XY-Embryonen exprimiert (Daten aus Maus; Raymond et al., 1999). Außerdem ist DMRT1 notwendig für die postnatale Differenzierung von Keimzellen und Sertolizellen (Daten aus Maus; Raymond et al., 2000). Im adulten menschlichen Organismus kommt das Protein physiologischerweise nur in der Testis vor (Raymond et al., 1998).

Das DMRT1-Protein besitzt ein DNA-bindendes Motiv, das von Raymond et al. (1998) als DM-Domäne bezeichnet wurde. Diese stellt ein Zinkfinger-ähnliches Motiv dar ([3]).

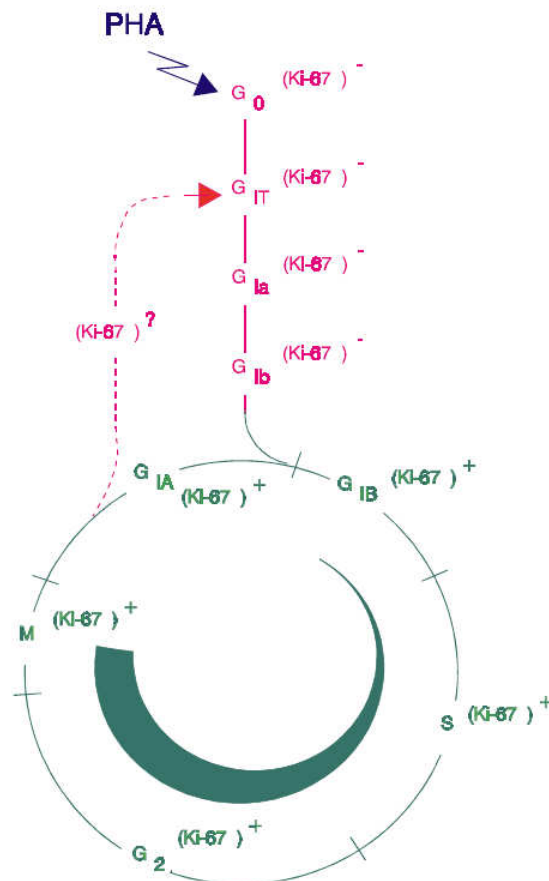
Mutationen im *DMRT1*-Gen können zu verschiedenen Arten an testikulären Karzinomen führen (Looijenga et al., 2006; Krentz et al., 2009; Turnbull et al., 2010).

DMRT1 reguliert die Transkription bifunktional, d.h. einige Gene werden aktiviert, andere reprimiert (Studien an Maus-Testis; Krentz et al., 2009; Murphy et al., 2010). So findet beispielsweise durch DMRT1 eine indirekte Aktivierung des GDNF-Korezeptors *Ret* und eine direkte Repression des Pluripotenz-Regulators *Sox2* statt (Krentz et al., 2009). Murphy et al. bewiesen 2010 experimentell, dass bei der Maus DMRT1 an den *Utf1*-Promotor bindet. Lei et al. (2007; 2009) detektierten DMRT1 in der Maus postnatal in proliferierenden Spermato gonien und Sertolizellen. Matson et al. (2010) sahen das Protein in differenzierenden Maus-Spermato gonien.

### 1.10.6 Der Proliferationsmarker Ki-67

Das Ki-67-Antigen (MKI67, *antigen identified by monoclonal antibody Ki-67*) wurde von Gerdes et al. (1983) mit Hilfe eines monoklonalen Maus-Antikörpers gegen ein humanes nukleäres Antigen in einer Zelllinie aus einem Hodgkin-Lymphom identifiziert (Yerushalmi et al., 2010). Das Protein wurde nur in proliferierenden Zellen nachgewiesen, weshalb auf einen Zusammenhang mit der Zellproliferation geschlossen wurde (Gerdes et al., 1983). Die genaue Rolle des Ki-67-Proteins bei der Zellteilung ist bisher nicht geklärt (Yerushalmi et al., 2010). Es ist während des gesamten Zellzyklus (G1-, S-, G2- und M-Phase) nachweisbar, nicht aber in der G0-Phase

(Gerdes et al., 1984; Duchrow, 2003; [5]; s. Abb. 1.13). Die Nachweisbarkeit in der G1-Phase hängt davon ab, ob es sich um den ersten (Nachweisbarkeit erst in später G1-Phase) oder einen folgenden Zellzyklus bei permanent proliferierenden Zellen (Nachweisbarkeit bereits in früher G1-Phase) handelt (Gerdes et al., 1984; Duchrow, 2003; [5]).

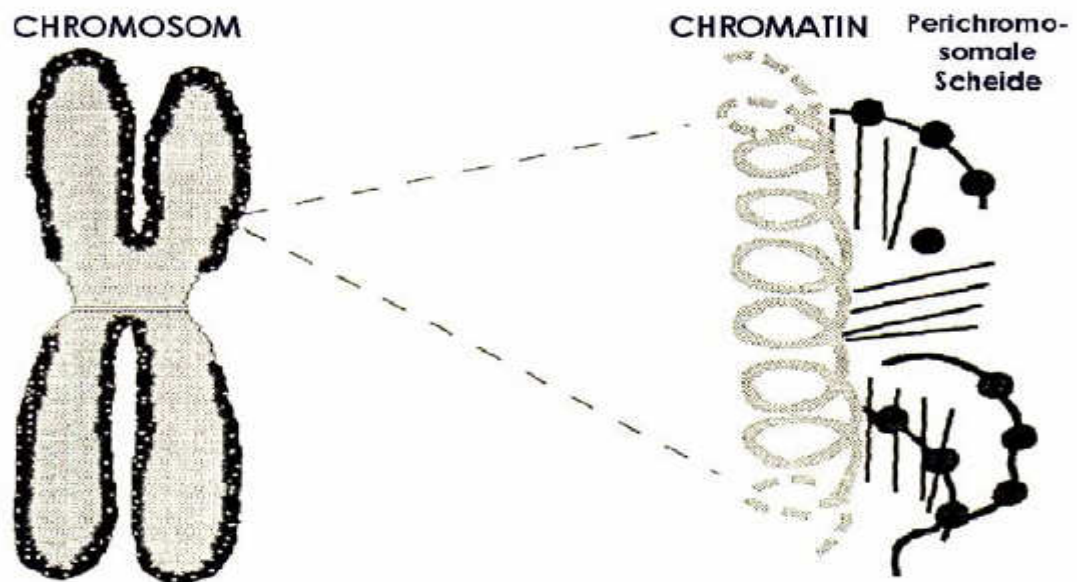


**Abb. 1.13:** Ki-67 im Zellzyklus. Expression in durch Phytohaemagglutinin (PHA) zur Proliferation stimulierten T-Lymphozyten. Abbildung nach Duchrow (2003). G<sub>1a</sub>/b, frühe G<sub>1</sub>-Phasen; G<sub>1B</sub>, späte G<sub>1</sub>-Phase.

In der G<sub>1</sub>-Phase befindet sich das Ki-67-Protein über das Nukleoplasma verteilt in vielen einzelnen Foki, die mit der Kernmembran verbunden sind, während es sich in der S- und der G<sub>2</sub>-Phase in den Nukleoli befindet (Kill, 1996). In der S- und in der G<sub>2</sub>-Phase kommt es zur Bildung von größeren Foki, die sich mit den Nukleoli überlappen, und zur Entstehung der heterochromatischen Regionen (Starborg et al., 1996). Die Konzentration des Proteins nimmt während der S-Phase zu und erreicht sein Maximum in der G<sub>2</sub>- und M-Phase. In der Prophase der Mitose findet man das Ki-67-Protein über den Kern verteilt in einem mit dem Chromatin assoziierten Netz. Ein wirkliches Netz erscheint dann in der Metaphase der Mitose. Dieses bildet interdigitierende Fibrillen um die Chromosomen aus und wird während Ana- und Telophase zu-

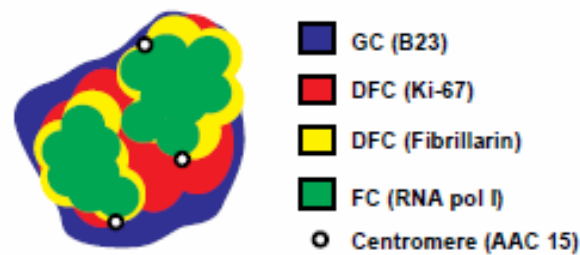
nehmend granulär. In der späten Telophase aggregiert das Netz zu Foki, die sich mit den entstehenden Nukleoli der Tochterzellen verbinden. In der Meta- und Anaphase ist das Ki-67-Protein vorwiegend in den kortikalen Regionen der Chromosomen anzutreffen. Dort entstehen später die prä-nukleolären Körperchen und die Nukleoli (Duchrow, 2003; [5]).

Während der Mitose ist jedes Chromosom durch die perichromosomale Scheide umschlossen, die das gesamte Chromosom, ausgenommen die Centromere, wie ein Handschuh umgibt (Abb. 1.14). Diese enthält neben nukleären auch nukleolare Proteine, wie z.B. das Ki-67-Protein und das Protein B23, sowie Ribonukleoproteine (Hernandez-Verdun & Gautier, 1994; Duchrow, 2003).



**Abb. 1.14:** Schematische Darstellung der perichromosomalen Scheide. Abbildung nach Duchrow (2003).

Innerhalb der Nukleoli ist das Ki-67-Protein in der dichten fibrillären Komponente anzutreffen (Kill, 1996). Nukleoli sind sowohl bei ruhenden, als auch bei proliferierenden Zellen aus drei Regionen aufgebaut, der fibrillären Komponente, der dichten fibrillären Komponente und der granulären Komponente (Abb. 1.15). Die fibrilläre Komponente, die sich im Nukleolusinneren befindet, enthält das r-Chromatin, eine tandemartige, mit Histonen assoziierte rDNA. Weiterhin sind die an der Transkription der rDNA beteiligten Proteine, z.B. die RNA-Polymerase I sowie die Topoisomerase I, enthalten. Die fibrilläre Komponente des Nukleolus wird von außen von der dichten fibrillären Komponente umringt. Dort erfolgt der Zusammenbau der Präribosomen. Die fast reifen Ribosomen werden danach über die granuläre Komponente des Nukleolus in das Cytoplasma entlassen (Duchrow, 2003; [5]).



**Abb. 1.15:** Schematischer Aufbau eines Nucleolus. Abbildung nach Kill (1996). GC, granuläre Komponente; DFC, dichte fibrilläre Komponente; FC, fibrilläre Komponente.

In der Spermatozoenbildung des Menschen wurde das Ki-67-Protein in Zellkernen von proliferierenden Spermatozoen detektiert (Steger et al., 1998).

### 1.10.7 Der Nucleolusmarker C23

Der Nucleolusmarker C23 (Nucleolin, NCL) ist ein nicht-ribosomales nucleoläres Phosphoprotein und RNA-Bindeprotein, das in Synthese und Reifung von Ribosomen involviert ist ([3]; Johansson et al., 2010). Im Nucleolus ist es hauptsächlich in der dichten fibrillären Komponente lokalisiert (s. dazu auch Abschnitt 1.10.6 und Abbildung 1.15; [3]). C23 ist das Substrat für verschiedene Kinasen. Die Phosphorylierung an Serin- bzw. Threoninresten des Proteins wirkt funktionsbestimmend für das Protein und reguliert seine Lokalisation im Zellzyklus (Johansson et al., 2010).

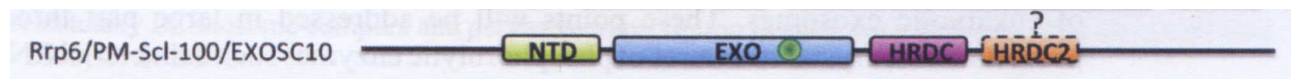
### 1.10.8 RBM3

Das Protein RBM3 (*RNA Binding Motif protein 3*) ist ein RNA-Bindeprotein, das die Genexpression auf der Ebene der Translation reguliert (Leonart, 2010). Es interagiert mit den translatierenden Ribosomen, indem es mit der großen ribosomalen Untereinheit (60 S) assoziiert (Dresios et al., 2005). Die Expression dieses sogenannten *cold shock proteins*, dessen Gen auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, wird bei einer Temperatur von 32 °C sowie bei niedrigem Sauerstoffgehalt (Hypoxie) induziert. RBM3 wird beim Menschen in vielen Organen exprimiert ([2]), wobei es in der Regel cytoplasmatisch vorkommt. Eine Ausnahme bilden die Spermatozoen, die eine Kernmarkierung zeigen (Uhlén et al., 2008). In den Sertolizellen adulter Mäuse wird das Protein konstitutiv exprimiert (Leonart, 2010). Funktionell wurde ein Zusammenhang des Proteins mit der Zellproliferation nachgewiesen, da einerseits RBM3 in neuronalen Zellen als mit Ki-67 koexprimiert detektiert wurde, andererseits die Aufregulierung des Proteins im Zusammenhang mit hämatopoetischer Proliferation in CD34+-Zellen gezeigt wurde. Außerdem wurde durch Inhibition von RBM3 in Prostata-Zelllinien eine Reduktion der Zellproliferation er-

zielt (Lleonart, 2010). Neben der Funktion als RNA-Bindeprotein wurde durch elektronische Annotation eine nukleotidbindende Eigenschaft des Proteins abgeleitet ([4]; [6]).

### 1.10.9 EXOSC10

Das Protein EXOSC10 (*Exosome component 10*; RRP6), eine 3'-5'-Exoribonuklease, stellt eine eukaryotische Exosomkomponente dar. Es besitzt eine N-terminale Domäne (NTD), eine Exoribonuklease-Domäne (EXO) sowie eine C-terminale HRDC-Domäne (*Homology to RNase D*; s. Abb. 1.16). Die Exoribonuklease-Domäne besteht aus einem DEDD-Y *active site* Aminosäure-Motiv, das auch häufig in DNA- und RNA-Nukleasen vorkommt, die die Degradation von DNA und RNA katalysieren, sowie einer Helikase. EXOSC10 ist mit dem Grundgerüst des Exosoms assoziiert (Januszyk & Lima, 2010).



**Abb. 1.16:** Domänenstruktur von EXOSC10. Abbildung nach Januszyk & Lima (2010), NTD, N-terminale Domäne; EXO, Exoribonuklease-Domäne; HRDC, *Homology to RNase D*, grüner Kreis, 3' to 5' hydrolytic exoribonucleolytic active site.

Das RNA-Exosom ist eine evolutionär sehr alte Struktur. Es ist in Archaea konserviert und besitzt Homologe innerhalb der Bakterien (Chlebowski et al., 2010). Es stellt einen Multiproteinkomplex mit Ribonuklease-Aktivität dar und besteht bei Eukaryoten aus neun individuell kodierten, evolutionär verwandten Untereinheiten (Exo9), die durch Oligomerisierung (3 Proteine oben und 6 Proteine unten) eine fassartige Struktur mit zentraler Pore bilden (Chlebowski et al, 2010; Januszyk & Lima, 2010). Die Zentralpore kann einzelsträngige RNA aufnehmen (Januszyk & Lima, 2010). Das RNA-Exosom spielt im eukaryotischen Organismus eine entscheidende Rolle bei der Prozessierung und Degradierung aller bekannten RNA-Klassen, einschließlich nicht kodierender RNAs (Butler & Mitchell, 2010; Chlebowski et al., 2010; Januszyk & Lima, 2010; Mitchell & Tollervy, 2010). Seine katalytische Aktivität erreicht es bei Mensch und Hefe durch die akzessorischen Untereinheiten Rrp44 (Dis3) und Rrp6 (EXOSC10; Chlebowski et al., 2010). Über den Abbau nicht kodierender am Gen-Silencing beteiligter RNAs durch den Exosom-Komplex wird das RNA-Exosom auch als indirekter Regulator des Heterochromatins verstanden (Coy & Vasiljeva, 2010).

Das Protein EXOSC10, sofern mit dem exosomalen Komplex assoziiert, ist beim Menschen in Cytoplasma, Nukleoplasma und im Nukleolus (dort angereichert) lokalisiert (Chlebowski et al., 2010). Versuche mit *Saccharomyces cerevisiae* zeigten, dass während der Meiose akkumulierende nicht kodierende RNAs (MUTs, meiotische, unannotierte Transkripte) beim vegetativen

Wachstum Ziele des EXOSC10-Homologs Rrp6 darstellen und dass Rrp6 auf posttranslationalem Level reguliert wird (Lardenois et al., 2010).

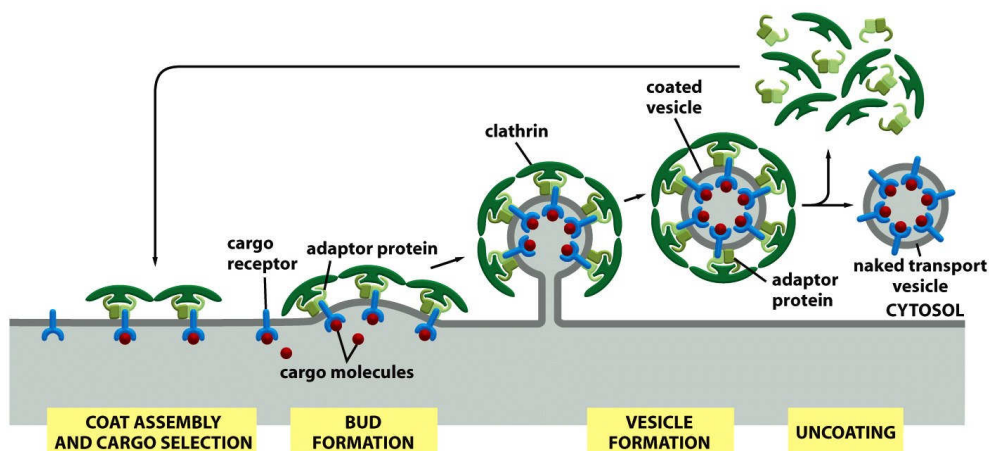
### 1.10.10 SNAP91

Das synaptosomal-assoziierte Protein SNAP91 (*SyNaptosomal-Associated Protein, 91 kDa homolog (mouse); clathrin coat assembly protein AP180; clathrin assembly protein AP-3*) stellt als cytosolisches Heterotetramer ein Adaptorprotein zwischen äußeren Zielmembranen und dem Clathrin der Stachelsaumvesikel (*clathrin coated vesicles*) dar. Auf diese Weise wirkt es beim *protein sorting* über endo- und lysosomale Sortierpfade mit. Eine der großen Untereinheiten des Heterotetramers ( $\delta$ -Adaptin) bindet dabei an die Zielmembran, während die andere große Untereinheit ( $\beta$ 3-Adaptin) an Clathrin bindet. Die mittelgroße Untereinheit ( $\mu$ 3) übernimmt die Frachterkennung über Tyrosin-basierte Sortiersignale im cytoplasmatischen Teil der Frachtproteine. Die kleine Untereinheit ( $\sigma$ 3) dient der Stabilisierung des Gesamtkomplexes (Nakatsu & Ohno, 2003).



**Abb. 1.17:** Schematischer Aufbau der Proteinstruktur des SNAP91-Proteins (AP-3). Abbildung nach Odorizzi et al. (1998). Untereinheiten und Molekulargewicht.

Die Abbildung 1.18 illustriert schematisch den Proteintransport über Clathrinvesikel, die für den Transfer von Proteinen von der Plasmamembran und zwischen Endosomen und dem Golgi-Apparat zuständig sind (Alberts et al., 2008).



**Abb. 1.18:** Entstehung eines Clathrinvesikels zum Transport von Frachtproteinen. Die Abbildung wurde entnommen aus Alberts et al. (2008).

Bei Ratten wurde SNAP91 als Marker für spermatogoniale Stammzellen eingesetzt (Hamra et al., 2005).

#### **1.10.11 CBL (C-CBL, CBL2)**

Murines *Cbl* (Cas-Br-M [*murine*] *ecotropic retroviral transforming sequence*) wurde 1989 als Homolog zur Gensequenz *v-Cbl* des murinen Cas NS-1 Retrovirus entdeckt, das bei der Maus myeloide Leukämie und Lymphome verursacht. Das Protein stellt ein Mitglied der RING-Finger-Ubiquitinligasen (E3) dar. Als negativer Regulator bewirkt es Ubiquitinylierung und Degradierung aktivierter Tyrosinkinasen. Als multifunktionales Adaptorprotein greift es positiv steuernd in Signaltransduktionsprozesse ein (Kales et al., 2010). Bei der Maus wird *Cbl* stark in Testis und Thymus exprimiert (Langdon et al., 1989), beim Menschen ist die stärkste CBL-Expression in der Testis anzutreffen ([2]).

#### **1.10.12 c-Kit**

c-Kit (KIT, CD117), Zelloberflächenrezeptor-Tyrosinkinase und Transmembran-Glykoprotein, wurde zuerst als zelluläres Homolog des *v-kit*-Onkogens des felines Sarkom-Virus HZ4 beschrieben (Yarden et al., 1987). Ein Protein namens *stem cell factor* (SCF) stellt den Liganden des Rezeptors c-Kit dar (Geissler et al., 1991). Innerhalb der Spermatogonese erfüllt das SCF-c-Kit-System verschiedene Funktionen. Einerseits erfolgt hiermit die Regulation von Migration, Proliferation und Apoptose der primordialen Keimzellen während der fetalen gonadalen Entwicklung. Andererseits wird durch dieses System die spermatogoniale Proliferation im adulten männlichen Organismus reguliert. In Mausmutanten mit abnormaler SCF-/c-Kit-Genexpression wurden Spermatogenesestörungen verschiedenen Typs festgestellt (Mauduit et al., 1999). In der adulten Testis ist die c-Kit-Expression eine notwendige Voraussetzung für die Differenzierung von Spermatogonien (Ogawa et al., 2000). Das c-Kit-Protein wird deshalb als Marker für differenzierende Spermatogonien betrachtet (Yoshinaga et al., 1991; Rossi et al., 2000).

#### **1.10.13 UCHL1/PGP9.5**

Das Protein UCHL1 (*Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1* [*ubiquitin thiolesterase*]; PGP9.5 [*protein gene product 9.5*]) wurde 1981 als gehirnspezifisches Protein entdeckt. Es handelt sich hierbei um ein evolutionär hoch konserviertes Protein, das in Neuronen und neuroendokrinen Zellen von Vertebraten fünf bis zehn Prozent des cytoplasmatischen Proteinanteils darstellt. Ein

kleiner Teil des Proteins liegt membrangebunden vor. Außerdem kommt es in humanen Oozyten und Spermatozoen vor. Funktionell stellt UCHL1 eine C-terminale Hydrolase dar, die durch Hydrolyse Ubiquitin von polyubiquitinierten Proteinen entfernt (Day & Thompson, 2010) und dieses durch seine zusätzliche Ligaseaktivität an Zielproteine heftet (*in vitro*-Experiment, Liu et al., 2002). UCHL1 ist ein etablierter Marker für porcine und bovine A-Spermatozoen (Frankenhuis et al., 1982; Luo et al., 2009; Herrid et al., 2007).

#### 1.10.14 Übersicht der untersuchten Marker

Die Tabelle 1.03 fasst die wichtigsten Funktionen der untersuchten Marker sowie deren Lokalisation in der Zelle zusammen.

Marker	Funktion / Marker	Proteinklasse	Lokalisation
FGFR3	Wachstumsfaktor-Rezeptor	Rezeptortyrosinkinase	<i>single pass type I</i> -Membranprotein
DSG2	Desmosomen-Komponente	Cadherin-Zelladhäsionsmolekül	kalziumbindendes Transmembran-Glykoprotein
UTF1	transkriptionaler Kofaktor	Leucin <i>zipper</i>	Zellkern
SPOC1	Transkriptionsfaktor	PHD <i>zinc finger</i>	Zellkern
DMRT1	Transkriptionsfaktor	<i>Zinc finger</i> -ähnlich	Zellkern
KI-67	Proliferationsmarker	unbekannt	Zellkern -> Nukleolus / Chromosomen
C23	Nukleolusmarker	Phospho-Protein und RNA-Bindeprotein	Zellkern -> Nukleolus
RBM3	RNA-Bindeprotein	Glycin-reiches RNA-Bindeprotein	Cytoplasma / Zellkern (in Spermatozoen)
EXOSC10	Komponente des RNA-Exosoms	3'-5'-Exoribonuklease	Zellkern / Cytoplasma
SNAP91	Adaptorprotein für Clathrinvesikel	unbekannt	Cytoplasma
CBL	Ubiquitinligase / Negativregulator für Tyrosinkinasen	RING-Finger-Ubiquitinligase	Cytoplasma
KIT	Differenzierungsmarker für Spermatozoen	Rezeptortyrosinkinase	Transmembran-Glykoprotein
UCHL1	Ubiquitinhydrolase / -ligase	Ubiquitinhydrolase / -ligase	vorwiegend Cytoplasma

Tab. 1.03: Zusammenfassung der untersuchten Marker. Für Referenzen s. Kapitel zu den einzelnen Proteinen.



## **1.11 Zielsetzung der Doktorarbeit**

Ziel dieser Doktorarbeit ist die Identifizierung und die Validierung spezifischer Marker für humane Spermatogonien. Durch weitere molekulare Analysen sollen spermatogoniale Zellen bzw. potentielle Subpopulationen näher beschrieben werden, vor allem in Bezug auf eine mögliche Identifikation spermatogonialer Stammzellen. Diese stellen die Grundlage für eine lebenslange Spermatogenese im männlichen Organismus dar. Therapeutisch eingesetzt könnten sie einerseits zur Behandlung männlicher Fertilitätsstörungen dienen und andererseits Ausgangszellen für eine Restitution der Spermatogenese nach einer Bestrahlung und / oder einer Chemotherapie sein. Weiterhin sind die spermatogonialen Stammzellen eine potentielle Quelle zur Gewinnung von Zellmaterial mit Stammzellpotential für die regenerative Medizin. Die Umsetzung solcher therapeutischen Möglichkeiten setzt die umfassende Charakterisierung und eine erfolgreiche Isolierung dieses Zelltyps voraus. Mittels eines Zellselektionsverfahrens soll versucht werden, Spermatogonien mit Stammzellcharakter zu isolieren.

## 2 Materialien, Methoden, Computerprogramme

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Betaine monohydrate	Fluka BioChemika
Borsäure	Merck
Bouinsche Lösung	Sigma-Aldrich Co.
Chloroform	Merck
D(+)-Glucose, wasserfrei	Merck
D-(+)-Trehalose dihydrate	Sigma-Aldrich Co.
Dako Faramount Aqueous Mounting Medium	Dako
Dako Pen (für Immunhistochemie)	Dako
Dako Fluorescent Mounting Medium	Dako
Dako Target Retrieval Solution	Dako
DAPI	AppliChem
DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium, 1x	Gibco-Invitrogen
DMEM/F-12 (1:1)	Gibco-Invitrogen
dNTP Mix, 10 mM Solutions	Sigma-Aldrich Co.
DRAQ5	Alexis Biochemicals
Essigsäure, 100%	Carl Roth GmbH + Co. KG
Ethanol, 99 %, vergällt mit Methylethylketon	Walter CMP GmbH & Co. KG
Ethanol, absolut	Merck
Formaldehydlösung, min. 37%, säurefrei	Merck
Hämalaunlösung, sauer nach Mayer	Carl Roth GmbH + Co. KG
HBSS, Hanks' Balanced Salt Solution, 1x	Gibco-Invitrogen
HPLC-Wasser	J.T.Baker
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG
NaCl	Merck
Natronlauge, 45%	Carl Roth GmbH + Co. KG
Oligodesoxyribonukleotide (Primer) *	MWG
Oligo(dt) <sub>12-18</sub> Primer (0,5 µg/µl)	Invitrogen
Paraformaldehyd	Merck
peqGOLD RNAPure™	peqLab Biotechnologie GmbH
Phosphate buffered saline, pH 7,4	Sigma-Aldrich Co.
Poly-L-Lysine Solution	Sigma-Aldrich Co.
RNALater	Ambion
Salzsäure, 6 mol/l	Carl Roth GmbH + Co. KG
Saccharose	Merck
Tri-Natriumphosphat-Dodecahydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG
Triton X-100	Roche
Trizma base	Sigma-Aldrich Co.
Tween 20	Sigma-Aldrich Co.
Xylol	Carl Roth GmbH + Co. KG

\* Die für diese Studie verwendeten Primer sind in Abschnitt 2.1.6 aufgeführt.

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Cell Strainer, 70 µm Porengröße	BD Falcon / BD Biosciences
Deckgläschen	Menzel-Gläser
Färbereinsatz	Carl Roth GmbH + Co. KG
Färbekasten nach Hellendahl	Carl Roth GmbH + Co. KG
Färbeschale	Carl Roth GmbH + Co. KG
Färbetrog	Carl Roth GmbH + Co. KG
Falcon Röhrchen, 15 ml; 50 ml	Greiner Bio-one
Light Cycler Capillaries, 20 µl	Roche
MS Columns (Selektionssäulen für MACS)	Miltenyi Biotec
Mikroskopierschere spitz, gebogen	Carl Roth GmbH + Co. KG
Objektträger Polylysine Slides	Thermo Scientific
Objektträger Cytoslide für Cytospin	Shandon
Objektträger Superfrost Ultra Plus	Thermo Scientific
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
Pipettenspitzen	Gilson; Biozym; Sarstedt
Safe-Lock Tubes, 0,5 ml; 1,5 ml	Eppendorf AG
Single Cytofunnel für Cytospin	Shandon
Uhrglasschalen, 8 mm	Carl Roth GmbH + Co. KG
Uhrmacherpinzetten	Dumont
24-well nunclon surface Platten für Zellkultur	Nunc A/S

### 2.1.3 Geräte

Bioanalyser 2100	Agilent
Brutschrank Function Line	Heraeus Instruments
Brutschrank Hera Cell	Heraeus Instruments
Cytospin 3	Shandon
Fluoreszenzmikroskop Axiophot	Zeiss
Fluoreszenzmikroskop Biozero (BZ series)	Keyence
Heizrührer IkaMag RH	IKA Labor Technik
Konfokalmikroskop Axiovert 200 M mit Confocor 2	Zeiss
LightCycler	Roche
MACS MultiStand (Metallständer für MACS-Separation)	Miltenyi Biotec
Magnetrührer KMO2 basic	IKA Labor Technik
Mikroskop Axiovert 100	Zeiss
Mikroskopkamera AxioCam ICc3	Zeiss
Mikrowelle De Lux M686	Miele
MiniMACS Separation Unit (Magnet für MACS)	Miltenyi Biotec
Minishaker MS2 S8	IKA Labor Technik
PCR-Cycler TGradient	Biometra
pH Meter MultiCal	WTW
Photometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech
Pipetten (Pipetman; Reference)	Gilson; Eppendorf
Schüttelplattform	Biometra
Sicherheitswerkbank Hera Safe	Heraeus Instruments
Techne Hybridiser Oven HB-1D	Hi Tech Trader
Thermomixer compact	Eppendorf
Ultra-Turrax Micra-D8	Art-Labor Technik
Vortexer VF2	IKA Labor Technik
Waagen (Sartorius handy; laboratory)	Sartorius
Zentrifugen 5415R; 5417R	Eppendorf
Zentrifuge Megafuge 2.0R	Heraeus Instruments

### 2.1.4 Reaktions-Kits, Enzyme und biologische Substanzen

Agilent DNA 1000 Kit	Agilent Technologies
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies
Collagenase D	Roche
Fetal Bovine Serum	Invitrogen
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
RNeasy@Mini Kit	Qiagen
SuperScript™ II RNase H Reverse Transcriptase	Invitrogen
SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix für qRT-PCR	Invitrogen
SYBR®Premix ExTaq	Takara Bio Inc.

### 2.1.5 Puffer und Lösungen

1 x TBS	30 ml 5 M NaCl 100 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5 ad 1000 ml mit Aqua dest.
1 x TBS-T	1 x TBS 10 % Tween20
0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0	57,7 ml 1 M Na <sub>2</sub> HPO 42,3 ml 1 M NaH <sub>2</sub> PO ad 1000 ml Aqua dest.
Modified Davidson's Fluid (mDF)	30 % 37-40 % Formaldehyd 15 % Ethanol 5 % Eisessig
4 % PAF + 10 % Saccharose	4 g PAF + 86 ml PBS, unter Abzug erhitzen; Zugabe von 1 N NaOH bis PAF gelöst; + 10 g Saccharose
Blockierungspuffer für IHC	1 x TBS-Puffer + 2 % normales Ziegen Serum + 0,1 % Tween
auto MACS™ Running Buffer (Miltenyi) pH = 7,2	BSA; EDTA; PBS; 0,09 % Azide
Collagenase D	100 mg gelöst in 100 ml HBSS

### 2.1.6 Oligodesoxyribonukleotide (Primer)

Gen	Primernamen	Sequenz	Größe (bp)
DDX4	DDX4_F	TTGGGAAGCAGAAATCAACC	240
	DDX4_R	AAACCACCCATTGTGGATGT	
DSG2	DSG2_F	ACAGGTTACGCTTTGGATGC	197
	DSG2_R	TTCAGGGTATTGGGCTCATC	
ECAT8	ECAT8_F	TCCAGGTTGCTTCTGGGTTA	225
	ECAT8_R	TCTGCGGAAGACGTAATTGA	
ESX1	ESX1_2_F	TGCACAGCTTTATCGACAGC	203
	ESX1_2_R	TTCCGCTTCTGTTCCGTAAT	
FGFR3	FGFR3_2_F	GCCGTGAATTCAGTTGGTTC	172
	FGFR3_2_R	CGTCGCTGGGTAAACAAAAT	
LIN28B	LIN28B_2_F	GCAGAAGATCACTCCGTTCC	235
	LIN28B_2_R	GGCTTCCCTCTCGGTTTATC	
MSI2	MSI2_2_F	AAGGTGGAAGATGCAATGCT	182
	MSI2_2_R	CCAGGTGGGAACATGACTTC	
PIWIL2	PIWIL2_F	ATCTGGTACGCAAGGACAGG	176
	PIWIL2_R	TCTGCTGATACCACCTGCTG	
SOX2	SOX2_2_F	AGTCTCCAAGCGACGAAAAA	189
	SOX2_2_R	TTTACGTTTGCAACTGTCC	
SPOC1	SPOC1_2_F	CCGGAACATGGACTCTGACT	156
	SPOC1_2_R	GGGAGTTCCTCCTTCGGATA	
UTF1	UTF1_F	GAAGCTCATGGGGCTGCT	192
	UTF1_2_R	CTGAAGCGGAGCGTCCAG	
S27	S27a_forw	CCAGGATAAGGAAGGAATTCCTCCTG	296
	S27a_rev	CCAGCACCATTCATCAGAAGG	

**Tab. 2.01:** Verwendete Primer. Alle Primer, mit Ausnahme des Primers für das Normalisierungsgen S27, wurden für diese Studie entworfen. Der S27-Primer stammt aus der Publikation von Spiess et al., 2004.

### 2.1.7 Primärantikörper für Immunhistochemie / Immunfluoreszenz

Antigen	Firma	Code	Spezies	Klonalität	Verdünnung
C23	Santa Cruz Biotechnology, USA	sc-8031	Maus	monoklonal	1:100
CBL	Santa Cruz Biotechnology, USA	sc-1651	Maus	monoklonal	1:10
c-Kit	Dako, Deutschland	A4502	Kaninchen	polyklonal	1:200
DMRT1	Atlas Antibodies AB, Schweden	HPA027850	Kaninchen	polyklonal	1:1200
DSG2	Atlas Antibodies AB, Schweden	HPA004896	Kaninchen	polyklonal	1:50
EXOSC10	Abcam, UK	ab50558	Kaninchen	polyklonal	1:50 / 1:100
FGFR3	Santa Cruz Biotechnology, USA	sc-13121	Maus	monoklonal	1:10
FGFR3	Cell Signaling Technology, USA	#4574	Kaninchen	monoklonal	1:100
Ki-67 (Klon MIB-1)*	Dako, Deutschland	M7240	Maus	monoklonal	1:10
LAMP1	Abcam; UK	ab24170	Kaninchen	polyklonal	1:200
PGP9.5	Dako, Deutschland	Z5116	Kaninchen	polyklonal	1:500
Rab4A	Santa Cruz Biotechnology, USA	sc-312	Kaninchen	polyklonal	1:200 / 1:500
Rab11	Cell Signaling Technology, USA	#3539	Kaninchen	monoklonal	1:100
RBM3	Atlas Antibodies AB, Schweden	HPA003624	Kaninchen	polyklonal	1:350
SNAP91 (AP-3)	Santa Cruz Biotechnology, USA	sc-25552	Kaninchen	polyklonal	1:50
SPOC1	Dr. Elisabeth Kremmer, München		Ratte	monoklonal	1:5 / 1:10 / unverdünnt
UTF1	Chemicon, USA	MAB4337	Maus	monoklonal	1:200

**Tab. 2.02:** Verwendete Primärantikörper. \* paraffingängiges Homolog gegen das humane native KI-67-Epitop. Hierbei handelt es sich um ein rekombinantes Peptid aus bakteriell exprimiertem und humanem Protein (Cattoretti et al., 1992; Key et al., 1993; Duchrow, 2003).

### 2.1.8 Sekundärantikörper, Kits und biologische Substanzen für Immunhistochemie, Immunfluoreszenz und MACS-Selektion

ABC Staining System sc-2017 (anti-mouse)	Santa Cruz
goat anti-rat IgG; goat anti-rabbit IgG	Santa Cruz
Anti-Mouse IgG2a+b Microbeads	Miltenyi Biotec
Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse	Invitrogen
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit; anti-rat	Invitrogen
Alexa Fluor 555 goat anti-mouse; anti-rat	Invitrogen
Alexa Fluor 555 donkey anti-rabbit	Invitrogen
Alexa Fluor 647 goat anti-rabbit	Invitrogen
Dako Dual Endogenous Enzyme Block	Dako
Dako EnVision+ System-HRP Labelled Polymer, anti-mouse; anti-rabbit	Dako
Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System	Dako
Negative Control Rabbit Immunoglobulin Fraction	Dako

### 2.1.9 Gewebeproben

Für diese Arbeit wurden Biopsien von Reiskorngröße (entspricht ca. 30 mg) verwendet, die vorher in der Abteilung Andrologie des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf, Leiter Prof. Dr. Wolfgang Schulze, aus dem Hoden adulter Patienten entnommen worden waren. Die Beurteilung des Gewebezustandes sowie die Festlegung des jeweiligen modifizierten Johnsen-Scores (mJ-Score) erfolgte anschließend durch lichtmikroskopische Beurteilung mittels test-TESE (*testicular spermatozoa extraction*) und gefärbten Semidünnschnitt-Präparaten (Methode beschrieben in Jezek et al., 1998; Schulze et al., 1999).

Die Studie wurde unter den Nummern OB/X/2000 und WF-007/11 von der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg genehmigt.

Für die real-time RT-PCR wurden Gewebeproben der vier Haupt-Phänotypen des mJ-Scores (Scores 2, 3, 5 und 10) benutzt. Hierbei handelte es sich pro Transkript jeweils um acht Gewebe mit qualitativ und quantitativ vollständiger Spermato genese (mJ-Score 10), acht Gewebe mit Arrest auf dem Stadium der Meiose (mJ-Score 5), drei Gewebe mit Spermato gonien als einzigem Keimzelltyp (mJ-Score 3) sowie 8 Gewebe mit Sertolizell-Syndrom (mJ-Score 2). Da es sich bei mJ-Score 3 um eine sehr seltene Testispathologie handelt, konnten hier lediglich drei Gewebe untersucht werden.

Für die Experimente zur Immunhistochemie / Immunfluoreszenz wurden adulte Hodengewebe von insgesamt 24 normogonadotrophen Patienten mit obstruktiver Azoospermie sowie fünf fetale Gewebe (s.u.) verwendet. Nicht jedes Gewebe wurde für alle Färbungen eingesetzt. Die fetalen Gewebe stammen von Aborten, die für diagnostische Zwecke in der Gewebebank der *University of Zagreb Medical School* gesammelt und aufbewahrt wurden. Verwendet wurden fetale



Gewebe folgenden Alters: Schwangerschaftswoche 19 (n=2), Woche 22 (n=1), Woche 24 (n=1) und Woche 28 (n=1). Diese Studie wurde durch das Ethikkomitee *der University of Zagreb Medical School* (No. 04-1130-2006) zugelassen. Das Alter der Feten wurde abgeleitet vom gestationalen Alter (z.B. Zeit nach dem ersten Tag der letzten Periode), ergänzt mit physiologischen Daten (z.B. Gewicht und Länge des Feten, Organgewicht, etc.).

Für die Immunzytochemie-Experimente dienten Gewebeproben aus dem Hoden von drei, für die *whole mount*-Analysen von sechs und für die MACS-Selektion von vier adulten Patienten, jeweils mit vollständiger Spermatogenese. Die Kurzzeitkultur wurde mit Hodengewebe eines Patienten mit normaler Spermatogenese durchgeführt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Auswertung der Mikroarray-Daten zum Filtern spermatogonienspezifischer Gene

Durch Vergleich von Affymetrix-Mikroarray-Daten aus Hoden-Gewebeproben mit mJ-Score 3 und mJ-Score 2 wurden spermatogonienspezifische Gene aus einer Gesamtanzahl von 55.000 untersuchten Genorten gefiltert. Dazu wurde die frei verfügbare Computersoftware TIGR MeV benutzt. Hierzu wurden zunächst die in einer txt-Datei gespeicherten Expressionsdaten (zur Basis 2 logarithmierte Fluoreszenzintensitätswerte) in das Programm geladen. Danach wurde ein hierarchisches Clustering durchgeführt, um ähnliche Strukturen darzustellen. Der anschließende t-Test (*overall alpha / critical p-value*, mit  $p = 0,05$ ) diente zur Ermittlung der mit einer hohen statistischen Signifikanz exprimierten Gene. Die 200 mit der höchsten Signifikanz differentiell exprimierten Gene wurden erneut hierarchisch geclustert (nach Proben und Genen), um ähnliche Expressionsprofile durch die einzelnen Proben zu detektieren.

Die *principal component*-Analyse (PCA; Pearson, 1901) wurde eingesetzt, um nach Reduktion des großen Datensatzes (Expressionsdaten aller untersuchten Gene), die Verteilung der Proben nach drei Hauptkomponenten (bezogen auf drei Achsen im dreidimensionalen Raum) und Nebenkomponten (weitere Effekte) darzustellen. Für die PCA verwendet das Computerprogramm die Gene mit der größten Trennleistung. Als Zentralwert diente der Median.

### 2.2.2 RNA-Isolation

Für die Bestätigung der Daten aus der Mikroarray-Analyse mittels real-time RT-PCR wurde zunächst die Gesamt-RNA mit Hilfe von RNAPure und Chloroform aus den humanen Gewebeproben isoliert. Hierbei handelt es sich um eine Modifikation der Methode nach Chomczynski & Sacchi (1987). RNAPure enthält Guanidinisothiocyanat (GITC), ein chaotropes Salz, das die Auflösung der geordneten Wasserstoffbrücken in Wasser bewirkt und damit die hydrophoben Effekte der hydrophoben Aminosäuren im Wasser verstärkt. Dieses führt zur Proteindenaturierung und damit auch zur Zellyse. Außerdem wirkt GITC als starker Inhibitor von Ribonukleasen (RNasen). Weiterhin in RNAPure enthalten ist Phenol.

In einem 15 ml-Röhrchen wurden 3 ml RNAPure-Reagenz vorgelegt. Das in diese Lösung gegebene Gewebe wurde 30 s lang mit Hilfe des Ultra-Turrax homogenisiert. Nach Zugabe von 600  $\mu$ l Chloroform zur Phasentrennung, wurde für 30 s kräftig geschüttelt und danach für 30 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert. In der oberen wässrigen Phase befinden sich nun die RNA, in der Interphase die DNA und in der unteren (Phenol-)phase die Proteine. Der Überstand (ca. 1500  $\mu$ l) wurde in ein neues 15 ml-Röhchen mit 1,5 ml Isopropanol überführt. Isopropanol bewirkt die Präzipitierung der RNA. Hierzu wurde für eine Stunde die Reaktionstemperatur auf

-20 °C abgesenkt. Nach einer weiteren Zentrifugation (1 h, 4000 rpm) bei 4 °C wurde der Überstand abgossen, das Pellet in 100 µl RNase-freiem HPLC-Wasser gelöst und mit Hilfe des RNeasy®Mini Kit nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Hierbei wird die selektive Bindungseigenschaft der RNA an eine Silikagel-Membran in Kombination mit der Mikrosäulenzentrifugationstechnik ausgenutzt. Die aufgereinigte Gesamt-RNA wurde anschließend in 30 µl RNase-freies Wasser aufgenommen. Danach erfolgten eine photometrische RNA-Konzentrationsmessung sowie die elektrophoretische Qualitätsbestimmung der RNA im Bioanalyzer. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

Für diese Arbeit wurden auch im Vorfeld isolierte RNAs verwendet (Feig, 2007; Feig et al., 2007).

### **2.2.3 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration**

Zur photometrischen Bestimmung der RNA-Konzentration wurde die RNA-Lösung im Verhältnis 1:50 mit Phosphatpuffer verdünnt. Die Extinktionsmessung dieser Lösung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm, da hier Nukleinsäuren ihre höchste Absorption zeigen. Für die Absorption der Nukleinsäuren sind die aromatischen Ringe der Basen verantwortlich. Eine Absorption (260 nm – 320 nm) von 1 entspricht einer RNA-Konzentration von ungefähr 40 µg/ml. Weiterhin wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm (Absorptionsmaximum der Proteine) gemessen. Durch Berechnung des Verhältnisses 260 nm / 280 nm ist es möglich, den Reinheitsgrad der RNA zu ermitteln. Eine RNA-Probe, gemessen in Phosphatpuffer, gilt bei einem Quotienten von 2,1 bis 2,3 als rein. Je niedriger der Wert, desto größer ist der Anteil an Proteinen. Aus der RNA-Lösung wurden Arbeitslösungen mit einer Endkonzentration von 1 µg/µl hergestellt.

### **2.2.4 Bestimmung von Integrität und Reinheit der RNA am Bioanalyzer**

Mit Hilfe des Agilent RNA 6000 Nano Kits für den Bioanalyzer 2100 wurden Integrität und Reinheit der RNA bestimmt. Das Messprinzip beruht auf einer Kapillarelektrophorese mit paralleler Detektion des in die RNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes *PicoGreen*, dessen Fluoreszenz laserinduziert wird. Für diese Analyse wurde ein Chip mit einem Fluoreszenzfarbstoffgemisch beladen. Die RNA-Proben wurden für 2 min bei 70 °C in dünnwandigen 0,5 ml PCR-Tubes im Thermocycler mit Deckelheizung denaturiert. Dies dient der Dissoziation fragmentierter rRNAs und RNA-Aggregate sowie der Destabilisierung von RNA-Sekundärstrukturen. Jeweils 1 µl der denaturierten RNA-Proben, die anschließend auf dem Chip mit einem Marker gemischt wurden, wurden in die entsprechenden Vertiefungen (*Wells*) gefüllt. Zusätzlich wurde

ein Größenstandard (*Ladder*) in die rechte untere Kammer des Chips pipettiert. Durch Starten des Gerätelaufs bewegen sich die Proben im elektrischen Feld über in Glas eingezogene Kapillaren in einen Separationskanal, wo die Auftrennung im Polymer des Gels mit Hilfe des Molekularsiebeffektes nach Fragmentgröße erfolgt. Detektiert werden die aufgetrennten RNA-Fragmente mittels Fluoreszenzdetektor. Weiterhin werden die Laufzeiten der Fragmente ermittelt. Daraus wird ein Elektropherogramm als Fluoreszenzmessung über die Zeit erstellt, außerdem wird eine gelähnliche Darstellung kreiert. Die Qualität der RNA wird anhand des RIN-Wertes (*RNA integrity number*) bestimmt, der mit Hilfe der Agilent-Software und einem speziellen Algorithmus aus dem Densitogramm berechnet wird. Die Bandbreite der Werte liegt dabei zwischen 1 (RNA ist vollständig degradiert) und 10 (optimale Qualität). Die Bioanalyzer-Technik liefert eine zuverlässigere Aussage über die RNA-Qualität als der 260 nm / 280 nm-Quotient, da das gesamte Densitogramm einer Probe in die Beurteilung einfließt (Mueller et al., 2004).

### 2.2.5 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mittels der Kits SuperScript™ II RNase H Reverse Transcriptase bzw. SuperScript® III First Strand Synthesis SuperMix für qRT-PCR nach den Angaben des Herstellers unter Benutzung der PCR-Maschine TGradient durchgeführt. Das Pipettierschema für das Kit SuperScript™ II RNase H Reverse Transcriptase ist in Tabelle 2.04 dargestellt.

Reagenz	Menge [ $\mu$ l]
Oligo(dt) <sub>12-18</sub> (0,5 $\mu$ g/ $\mu$ l)	1
dNTP-Mix (10 mM)	1
RNA (1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	1 - 3
HPLC-Wasser	7 - 9
Menge Gesamtansatz	12

Tab. 2.04: Ansatz 1 zur cDNA-Synthese.

Nach 5 min Inkubationszeit bei 65 °C zur Linearisierung der einzelsträngigen RNA wurde der Mix zum Abkühlen auf Eis gestellt. Nach kurzer Zentrifugation wurden 4  $\mu$ l 5 x First-Strand Buffer sowie 2  $\mu$ l 0,1 M DTT (Dithiothreitol) hinzugegeben. DTT wirkt durch Reduktion von Disulfidbrücken inhibierend auf RNasen (Chen et al., 2004). Nach 2 min Inkubation bei 42 °C wurde 1  $\mu$ l SuperScript™ II RNase H Reverse Transcriptase (200 U/ $\mu$ l) zu dem Gemisch hinzupipettiert. Danach folgten 50 min Inkubation im Thermocycler bei 42 °C zur reversen Transkription sowie zur Degradierung von mRNA in den RNA/DNA-Hybriden mittels der RNase H-Aktivität der reversen Transkriptase. Eine weitere Inkubation von 15 min bei 70 °C wurde zur Inaktivie-

rung der Reaktion durchgeführt. Die cDNA wurde mit 81 µl HPLC-Wasser auf ein Endvolumen von 100 µl gebracht und auf diese Weise für den Einsatz in die real-time RT-PCR vorbereitet. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

Das Pipettierschema für das Kit SuperScript® III First Strand Synthesis SuperMix für qRT-PCR ist in Tabelle 2.05 dargestellt. Dieses Kit wurde zur Vermeidung bzw. Minimierung von RNA-Sekundärstrukturen (reverse Transkription bei höherer Temperatur) für die cDNA-Herstellung mit nachfolgender Amplifikation der UTF1-Transkripte eingesetzt.

Reagenz	Menge [µl]
2 x RT Reaction Mix	10
RT Enzyme Mix	2
RNA (1 µg/µl)	x
HPLC-Wasser	ad 20 µl
Menge Gesamtansatz	20

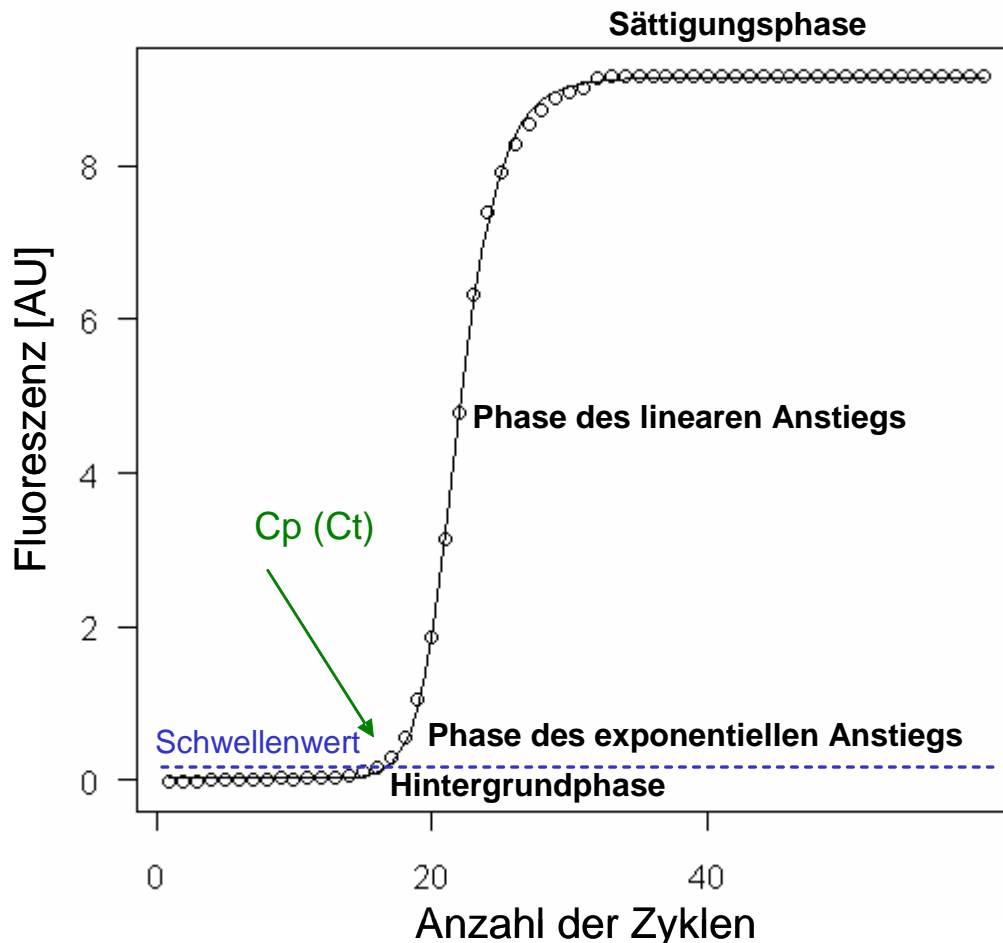
Tab. 2.05: Ansatz 2 zur cDNA-Synthese.

Nach sorgfältigem Mischen wurde der Mix zuerst für 10 min bei 25 °C und danach für 30 min bei 60 °C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion folgt eine Inkubation von 5 min bei 85 °C. Anschließend wurde das Gemisch auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von RNase H erfolgten 20 min Inkubationszeit bei 37 °C. Die cDNA wurde durch Hin zufügen von 80 µl HPLC-Wasser auf ein Endvolumen von 100 µl gebracht.

### 2.2.6 Real-time RT-PCR

Die quantitative real-time RT-PCR ist eine Weiterentwicklung der Polymerasekettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*; Mullis et al., 1986). Dabei wird die Konzentration eines Fluoreszenzfarbstoffes (hier SYBR Green I), der bei der Amplifikation in die doppelsträngige DNA interkaliert, über einen Fluoreszenzdetektor gemessen. Die Reaktionszyklen werden in Echtzeit verfolgt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die quantitative real-time PCR am LightCycler durchgeführt. Die Fluoreszenz wird nach jeder Elongationsphase gemessen, da zu diesem Zeitpunkt die maximal amplifizierte Menge an doppelsträngiger DNA vorliegt. Der gemessene Fluoreszenzanstieg ist zur Menge der Amplifikate proportional. Die Anregung des Fluorophors erfolgt über eine blaue LED (*light emitting diode*) bei einer Wellenlänge von 470 nm, die Emission nach Interkalierung des Farbstoffes in die Doppelstrang-DNA bei 521 nm. Die geringe Hintergrundfluoreszenz der freien Farbstoffmoleküle wird vom Fluoreszenzsignal abgezogen. Die gemess-

sene Fluoreszenz wird mittels LightCycler-Software graphisch gegen die Anzahl der Zyklen dargestellt. Die Phasen der Amplifikation sind in Abbildung 2.01 dargestellt.



**Abb. 2.01:** Phasen der PCR, dargestellt mittels Fluoreszenzmessung während einer real-time PCR. Die Abbildung wurde mit Hilfe des qPCR package (Spiess et al., 2008) erstellt und stellt eine übliche im Rahmen dieser Arbeit erstellte Amplifikationskurve dar. Cp = *crossing point*; Ct = *cycle threshold*.

Die Fluoreszenz der amplifizierten Transkripte tritt erst aus der Hintergrundfluoreszenz hervor, nachdem der *cycle threshold* (Ct) bzw. der *crossing point* (Cp) überschritten wird. Die PCR-Reaktion geht danach in die exponentielle Phase. Ct bzw. Cp können mit verschiedenen Methoden berechnet werden. Am Ct bzw. Cp befindet sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA. Dieser Punkt, der einer bestimmten Anzahl an PCR-Zyklen entspricht, kann deshalb zu vergleichenden Aussagen über die Ausgangsmenge von Transkripten herangezogen werden. In der Phase des exponentiellen Anstiegs (log-Phase; s. Abb. 2.01) verläuft die PCR-Amplifikation am effizientesten. Die erste Ableitung der Funktion stellt in diesem Bereich eine Gerade dar, während die erste Ableitung der Amplifikationskurve im linearen

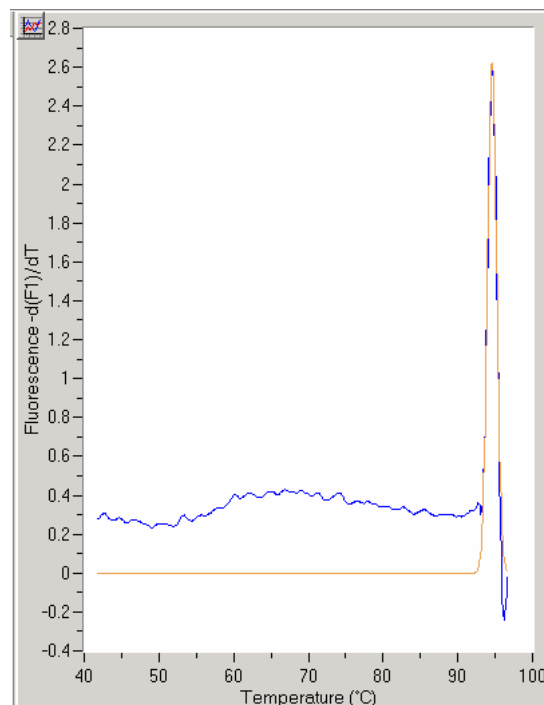
Bereich eine abfallende Kurve ist. In der Sättigungsphase kommt es zur Limitierung der Reaktionskomponenten und somit immer mehr zur Erschöpfung der PCR-Reaktion.

Das Ergebnis einer real-time PCR wird stark durch äußere Bedingungen beeinflusst, wie z.B. eine schwankende Effektivität der reversen Transkription, Unterschiede zwischen verschiedenen PCR-Läufen oder eine nicht einheitliche Effizienz.

Zur Korrektur experimenteller Schwankungen wird ein nicht reguliertes, ubiquitär und homogen exprimiertes Haushaltsgen als Referenz benutzt. Die Expression des Zielgens wird mit dessen Hilfe normalisiert. In dieser Arbeit wurde das Gen für das mitochondriale ribosomale Protein S27 als Referenz zur Normalisierung benutzt (Lee et al., 2002).

Innerhalb eines Laufes können Unterschiede in der Effizienz der einzelnen PCR-Reaktionen durch Einbeziehung unterschiedlicher Effizienzwerte in die Berechnung, beispielsweise als Gruppen-Mittelwert (Pfaffl et al., 2002) oder auch durch das Einbeziehen der individuellen Effizienzen für jede Probe (Spiess et al., 2008), ausgeglichen werden.

Im Anschluss an einen PCR-Lauf wurde die Spezifität des PCR-Produktes mit einer Schmelzpunkt-Analyse am LightCycler ermittelt. Dabei wurde die doppelsträngige DNA durch eine schrittweise Temperaturerhöhung in einem zuvor eingestellten Bereich (40 °C bis 99 °C) aufgeschmolzen. Der Schmelzpunkt entspricht dem Fluoreszenzmaximum. Hier liegt die Hälfte der DNA doppelsträngig vor. Er ist abhängig von Länge und Sequenz des Amplifikates. Eine typische Schmelzkurve für ein einzelnes PCR-Produkt ist in Abbildung 2.02 dargestellt. Beim Vorhandensein mehrerer Schmelzpeaks liegen unspezifische Produkte oder Primerdimere vor. Nach Größenbestimmung eines PCR-Produktes und Zuordnung eines entsprechenden Schmelzwertes kann letzterer zur Bestimmung der Spezifität eines PCR-Produktes verwendet werden.



**Abb. 2.02:** Schmelzpunkt-Analyse eines PCR-Produktes. Darstellung mittels Fluoreszenzmessung nach einem real-time PCR-Lauf am Lightcycler. Die Schmelzkurve des Produktes ist in Blau dargestellt, die durch die Software angeglichen, geglättete Kurve, die zur besseren Bestimmung des Peakwertes dient, in Orange. Der einzelne Schmelzpeak zeigt das Vorhandensein eines einzigen PCR-Produktes.

In dieser Arbeit diente die quantitative real-time PCR zur Validierung der im Vorfeld durchgeführten Mikroarray-Analyse. Das Experiment wurde mit Hilfe des Kits SYBR®Premix ExTaq durchgeführt. Das Pipettierschema dazu ist in Tabelle 2.06 abgebildet.

Reagenz	Menge [ $\mu$ l]
SYBR Green ExTaq 2x	10
F-Primer (10 pM/ $\mu$ l)	0,8
R-Primer (10 pM/ $\mu$ l)	0,8
Template	2
HPLC-Wasser	6,4
Menge Gesamtansatz	20

**Tab. 2.06:** Ansatz real-time PCR.

Der gesamte Ansatz wurde jeweils in den Kopf einer Lightcycler-Kapillare pipettiert und danach kurz in die Kapillare hinein zentrifugiert. Diese wurde dann verschlossen und in das Karussell des Lightcyclers eingesetzt. Danach wurde das Gerät mit dem entsprechenden Programm gestartet. In Tabelle 2.07 sind die Bedingungen für die real-time PCR aufgeführt.



	Temperatur [°C]	Zeit [s]
30 - 60 Zyklen		
Denaturierung	95	10
Annealing	60	20
Elongation	72	30

Tab. 2.07: Bedingungen real-time PCR.

Aufgrund des GC-reichen Templates des UTF1-Transkriptes war es nötig, für diese Reaktion andere Bedingungen zu wählen. Diese sind in Tabelle 2.08 aufgelistet.

	Temperatur [°C]	Zeit [s]
30 - 60 Zyklen		
Denaturierung	95	10
Annealing	64	10
Elongation	80	30

Tab. 2.08: Bedingungen real-time PCR für UTF1.

Zur Reduktion unspezifischer PCR-Produkte wurde diese Reaktion zusätzlich unter Zugabe von Betain durchgeführt (Frackman et al., 1998; Musso et al., 2006; gewählte Betain-Endkonzentration hier 1,7 M).

Nach der Amplifikation wurde der Inhalt der Kapillaren mittels Zentrifugation in ein Eppendorf-Röhrchen überführt. Die Größe des amplifizierten Fragmentes wurde im Bioanalyser bestimmt. Bei erwarteter Fragmentgröße erfolgte die Aufreinigung des PCR-Produktes mit Hilfe des QIA®quick PCR Purification Kits bzw. des High Pure PCR Product Purification Kits, jeweils nach dem Protokoll des Herstellers. Danach wurden die Proben sequenziert (Firma MWG).

### 2.2.7 Auswertung der real-time RT-PCR-Ergebnisse

Die Quantifizierung der Ausgangs-Transkriptmengen und die Berechnung der Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Score-Gruppen (= Ratios) erfolgte unter Verwendung der *crossing points* (vgl. Abb. 2.01) sowie unter Einbeziehung der unterschiedlichen Reaktionseffizienzen mit der „*Window-of-linearity-Methode*“ nach Ramakers (Ramakers et al., 2003; s. Abb. 2.03). Dabei wird die Amplifikationskurve zunächst logarithmiert. In dem nun (aus dem vormaligen log-Bereich mit der besten Amplifikationseffizienz resultierenden) linearen Bereich werden dann unter Auswahl von mindestens vier bis höchstens sechs Datenpunkten (*sliding window*) die Regressionskoeffizienten für die entsprechenden Abschnitte der Funktion berech-

net. Damit wird der Bereich mit der besten Effizienz erfasst. Die Steigung der Funktion ergibt entlogarithmiert den Effizienzwert, mit dem die Ratios rechnerisch ermittelt werden können.

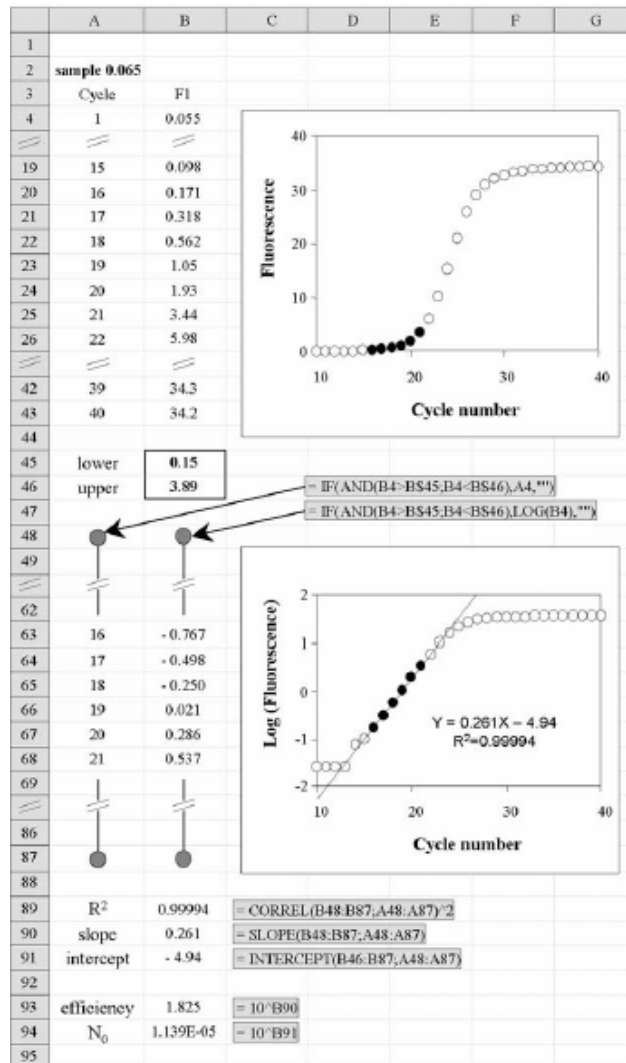


Abb. 2.03: „Window-of-linearity-Methode“ nach Ramakers. Diese Abbildung wurde der Publikation von Ramakers et al. (2003) entnommen.

Die Kalkulation der Ratios wurde mit dem Computerprogramm *qPCR package* (Spiess et al., 2008) durchgeführt, das auf der Oberfläche der R-Software läuft. R ist ein unter einem Dialekt der Programmiersprache S arbeitendes Statistikprogramm. Um die Fluoreszenzdaten des LightCyclers in R zu transferieren, wurden diese zuerst in eine Exceltabelle kopiert und dann mit Hilfe des qPCR-Paketes nach R importiert. Unter Verwendung der Batch-Funktion wurden für jede Probe aus den Rohdaten des LightCyclers die PCR-Effizienz und der *crossing point* kalkuliert. Danach erfolgte die Berechnung der Expressionsratios anhand der nachfolgend aufgeführten Formel.

$$\text{Ratio RT-PCR} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta\text{CP Zielgen (Kontrolle - Probe)}}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta\text{CP Referenzgen (Kontrolle - Probe)}}$$

mit: *CP = crossing point*

*E = Effizienz (berechnet mit Methode „Window-of-linearity“ und den individuellen Effizienzen für jede einzelne Probe im PCR-Lauf)*

*Probe = verschiedene Testispathologien (mJ-Score 3 bzw. mJ-Score 5) bzw. Hodengewebe mit vollständiger Spermatogenese (mJ-Score 10)*

*Kontrolle = somatisches Gewebe (= Testisgewebe ohne Keimzellen = mJ-Score 2 = Sertolizell-Syndrom) bzw. anderer jeweils niedrigerer mJ-Score*

Parallel dazu wurde die Ratioberechnung mit der REST-Software (*relative expression software tool*, Pfaffl et al., 2002) durchgeführt. Dabei wurde mit den gemittelten PCR-Effizienzen der für die Berechnung verwendeten Patientengruppen, jedoch jeweils einzeln für Zielgen und Referenzgen, gearbeitet.

### **2.2.8 Fixierung der Gewebeproben für Expressionsstudien auf Proteinebene**

Die Gewebeproben wurden für sechs bis acht Stunden in mDF fixiert (Latendresse et al., 2002). Die Fixierung der fetalen Gewebe war mittels Bouinscher Lösung im Vorfeld dieser Studie durchgeführt worden.

Bei der Fixierung histologischer Präparate sind grundsätzlich zwei Methoden zu unterscheiden, die Fixierung durch Präzipitation sowie die Fixierung mit kreuzvernetzenden Reagenzien. Organische Lösungsmittel, wie Alkohol oder Aceton, entfernen die Lipide, dehydrieren die Zellen und präzipitieren die Proteine. Unter Anwendung kreuzvernetzender Reagenzien (z.B. Paraformaldehyd, Formaldehyd) entstehen intramolekulare Brücken, meist durch freie Aminosäuren. Bei der zweiten Fixierungsmethode wird die Zellarchitektur besser erhalten, jedoch die Antigenität der Epitope reduziert ([7]). In dieser Studie wurden zwei sowohl kreuzvernetzende als auch präzipitierende Fixierungslösungen verwendet.

### **2.2.9 Immunhistochemie / Immunfluoreszenz**

Die fixierten Gewebeproben wurden in Paraffin eingebettet, in einer Dicke von 5 µm mikrotomgeschnitten und auf Superfrost Ultra Plus-Objektträger aufgezogen (Dermatologikum Hamburg). Danach erfolgte die Entparaffinierung in einer absteigenden Alkoholreihe mit anschließender

Spülung. Die einzelnen Arbeitsschritte mit den entsprechenden Inkubationszeiten sind im Folgenden aufgelistet:

- Xylol (2x) -> 5 min,
- Ethanol absolut vergällt -> 5 min,
- Ethanol absolut unvergällt -> 5 min,
- Ethanol 96 % -> 5 min,
- Ethanol 70 % -> 5 min,
- Ethanol 50 % -> 5 min,
- Aqua dest. -> 2 min,
- 1 x TBS-Puffer -> 5 min (Tischschüttler).

Danach wurde durch Erhitzen in der Mikrowelle ein Antigen Retrieval zur Rekonstituierung der potentiell durch die Prozedur beschädigten Strukturen der Protein-Epitope durchgeführt. Dies ist notwendig, wenn durch die Fixierung Proteine über Methylenbrücken quervernetzt wurden und einige Epitope für die entsprechenden Antikörper dann nicht mehr zugänglich sind (D'Amico et al., 2009). In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Retrieval-Methoden angewandt, entweder das Antigen Retrieval mit 0,005 M Borsäure (pH = 8,5) oder das Antigen Retrieval mit Dako Target Retrieval Solution (Citrat-Puffer; pH = 6). Bei der Auswahl der Retrieval-Technik wurden die Empfehlungen der Hersteller der Primär-Antikörper beachtet. Die einzelnen Arbeitsschritte beim Antigen Retrieval waren:

- Erhitzen in der Mikrowelle bei 600 Watt (1x) -> 2 min,
- Erhitzen in der Mikrowelle bei 300 Watt (5x) -> 2 min,
- Belassen der Objektträger in Färbeküvette bei geschlossenem Deckel -> 10 min,
- Abkühlung der Objektträger in der Lösung bei geöffnetem Deckel der Färbeküvette.

Die anschließende Spülung (Tischschüttler) setzte sich folgendermaßen zusammen:

- 1 x TBS-Puffer mit 0,05 % Tween (2x) -> 10 min,
- 1 x TBS-Puffer (1x) -> 10 min.

Tween bewirkt als Detergenz die Permeabilisierung der Zellen, um den Antikörpern Zugang zu intrazellulären Zielantigenen zu ermöglichen.

Als nächster Arbeitsschritt wurde eine zehnmündige Blockierung endogener Peroxidasen in der feuchten Kammer (Enzymblockierungsreagenz von Dako) durchgeführt. Um ein Verlaufen der Lösung auf dem Objektträger zu verhindern, wurde zuvor ein Areal um das Schnittpräparat mit einem Fettstift abgegrenzt. Nach einer weiteren Spülung mit TBS-Puffer (siehe oben) folgte eine

einstündige Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen mit Blockierungspuffer (feuchte Kammer, Raumtemperatur). Da die meisten verwendeten Zweit-Antikörper in Ziegen generiert wurden, enthielt die Blockierungs-Lösung 2 % normales Ziegenserum.

Die Gewebeschnitte wurden über Nacht bei 4 °C mit dem Primär-Antikörper inkubiert. Nach erneuter Spülung mit TBS folgte die Detektion des Antikörpers. Hierzu wurde das Dako EnVision+ System-HRP bzw. das ABC Staining System von Santa Cruz eingesetzt, wobei nach den jeweiligen Herstellerprotokollen gearbeitet wurde. Bei Verwendung des Dako-Systems wurden die Präparate zuerst für 40 min mit dem Meerrettichperoxidase-gelabelten Polymer des Sekundär-Antikörpers inkubiert (feuchte Kammer, Raumtemperatur). Die Verdünnungen des jeweiligen Antikörpers, die Spezies, in der der Antikörper generiert wurde, sowie dessen Klonalität sind in Tabelle 2.02, Abschnitt 2.17 zusammengefasst. Nach einer weiteren Spülung mit TBS erfolgte die Entwicklung der Farbreaktion mittels Diaminobenzidin (DAB), das als Substrat für die Meerrettichperoxidase fungiert. In Anwesenheit von Peroxidase und Wasserstoffperoxid (im Substratpuffer enthalten) polymerisiert es zu einem wasserunlöslichen braunen Reaktionsprodukt (Heyderman, 1979).

Das Santa-Cruz-System benötigt einen Inkubationsschritt mehr als das Dako-System. Das Reaktionsprinzip ist gleich, der Sekundär-Antikörper von Santa Cruz muss jedoch zuerst über eine Biotin-Avidin-Bindung mit der Peroxidase verbunden werden, bevor die Entwicklung der Farbreaktion erfolgen kann. Da Avidin mehrere Bindungsstellen für Biotin besitzt, wird auf diese Weise ebenfalls eine Signalverstärkung hervorgerufen.

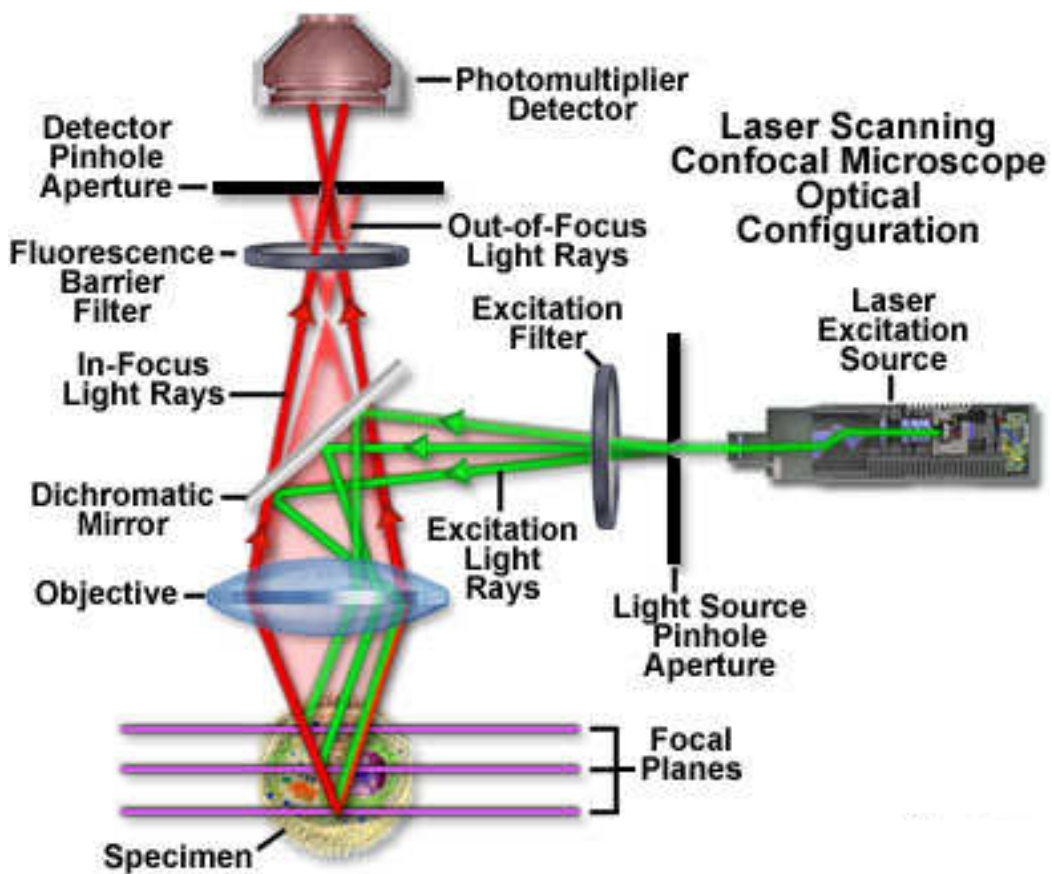
Die Entwicklungszeit für die Peroxidase-Farbreaktion wurde in beiden Detektionssystemen für jeden Antikörper individuell bestimmt und lag jeweils zwischen 15 s und 10 min. Als Negativkontrolle diente *negative control rabbit immunoglobulin fraction* (Dako), bzw. es wurde anstelle des Primär-Antikörpers TBS-Puffer pipettiert. Für nicht-nukleäre Antigene wurde eine Kerngegenfärbung für 30 s mit 1:2-verdünnter, filtrierter, saurer Hämalaunlösung nach Mayer durchgeführt. Die Präparate wurden mit wasserlöslichem Einbettmedium eingedeckt, mit Nagellack versiegelt, anschließend am Lichtmikroskop visualisiert sowie mit einer Zeiss AxioCam und der AxioVision-Software (Carl Zeiss) fotografiert und digitalisiert.

Für die Immunfluoreszenz wurde bis zur Inkubation mit dem Erst-Antikörper nach dem gleichen Protokoll gearbeitet. Für Doppel- bzw. Dreifachmarkierungen wurde ein Gemisch mit den jeweiligen Antikörper-Verdünnungen hergestellt, mit dem über Nacht inkubiert wurde. Zur Detektion der Primär-Antikörper wurden mit Alexa-Fluorochromen markierte Sekundär-Antikörper als Reaktionsgemisch in der Verdünnung 1:200 eingesetzt und die Präparate für eine Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Als DNA-Farbstoff zur Anfärbung der Zellkerne aller Zellen dienten Dapi sowie für Nicht-Dreifach-Färbungen DRAQ5. Nach Inkubation

mit dem Fluorophor wurden die Präparate im Dunkeln gespült (schwarze Kammer), danach mit Dako Fluorescent Mounting Medium eingedeckt und unter Lichtabschluss bei 4 °C gelagert.

### 2.2.10 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Bei der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie werden die zu detektierenden Fluorophore mit Lasern, die lediglich Licht einer spezifischen Wellenlänge erzeugen, zur Fluoreszenz angeregt.



**Abb. 2.04:** Prinzip der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie. Die Abbildung wurde dem Artikel „Live-Cell Imaging Techniques“ der Firma Zeiss (Carl Zeiss MicroImaging, MicroImaging Online Campus) entnommen [<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/livecellimaging/techniques.html>].

Der Anregungsstrahl des Lasers trifft dabei über einen Lichtleiter auf den Farbteiler (dichroitischer Spiegel), der das Anregungslicht reflektiert und über das Mikroskop-Objektiv zum Präparat weiterleitet. Die Detektion, die spezifisch zur Emissions-Wellenlänge des Fluorochroms ist, erfolgt auf umgekehrtem Weg über den Detektionsstrahlengang des Mikroskops. Das emittierte Licht fällt hier ebenfalls auf den dichroitischen Spiegel, der jedoch für das emittierte Licht transparent ist und wird danach über die konfokale Lochblende (*Pinhole*) zum Photomultiplikator geleitet. Mit Hilfe des *Pinholes* wird das nicht aus der Fokusebene stammende Licht und somit

jegliche Hintergrundfluoreszenz ausgeblendet. Die dadurch verursachte Schwächung des Lichtsignals wird mittels des Photomultiplikators (*photomultiplier*) wieder ausgeglichen. Der Grad der Verstärkung kann durch den Bediener variiert werden. Der Photomultiplikator dient gleichzeitig als Detektor der am jeweiligen Probenort reflektierten Photonen. Die Fluoreszenzsignale werden an den Computer weitergegeben und dort in Form von Pixeln in einer Graphik gespeichert. In jeder Zeile eines Bildes sind das beispielsweise 512 oder 1024 Pixel, je nach vorher eingestelltem Format.

Der Scanner ist die Abtasteinheit des konfokalen Systems. Er bewegt den fokussierten Laserstrahl linienweise über das Objekt bis das komplette Bild einer Fokusebene erstellt ist. Um ein dreidimensionales Bild zu generieren, kann der Scanner auch in Z-Richtung bewegt werden und damit zur Generierung eines Z-Stapels benutzt werden.

In dieser Arbeit wurde mit einem inversen Mikroskop mit Plan-Neofluar-Objektiven mit 10-, 20- und 40-facher Vergrößerung sowie einem Apochromat-Objektiv mit 63-facher Vergrößerung gearbeitet. Das *Pinhole* wurde für jeden Detektionskanal und jedes Objektiv auf 1 *Airy Unit* eingestellt. Zur Systemsteuerung diente die LSM/FCS-Software (Carl Zeiss). Die Visualisierung der Fluorochrome erfolgte durch Anregung mit folgenden Lasern: Argon/2-Laser für Alexa 488; Helium/Neon 1-Laser (543 nm) für Alexa 555 sowie Helium/Neon 2-Laser (633 nm) für Alexa 647. Zur Visualisierung der Kontrollen wurden jeweils die gleichen Systemeinstellungen wie für die Proben benutzt. Die Fotos wurden mit der Mikroskop-Digitalkamera Zeiss AxioCam aufgenommen und dokumentiert.

### **2.2.11 Immunzytochemie an isolierten Keimzellen**

Für die Immunzytochemie wurden reiskorngroße Gewebeproben in ca. 1 ml DMEM/F-12 transferiert. Nach Entnahme von ungefähr 0,7 ml Kulturmedium aus dem Originalröhrchen wurden die Proben mit 0,5 ml Kollagenase D (Konzentration 1 mg/ml) versetzt und zum Verdau für ca. sechzig bis neunzig Minuten bei 32 °C in den Brutschrank gestellt. Zwischendurch wurde geschüttelt und der jeweilige Verdauungszustand geprüft. Danach wurden die Gewebestückchen in Uhrglasschälchen mit 1 ml auf 32 °C vorgewärmter Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) überführt und mittels Uhrmacherpinzetten sowie einer spitzen Mikroskopierschere zerkleinert. Nach fünf Minuten Sedimentationszeit wurde der größte Teil der Flüssigkeit abpipettiert und das Sediment in ein 0,5 ml Eppendorf-Gefäß mit 100 µl HBSS überführt. Dieses wurde danach mit Hilfe eines Ministößels (*pellet pestle*) zerquetscht bzw. zerrieben. Um größere Zellaggregate zu entfernen, wurde die Suspension anschließend über einen *Cell Strainer* filtriert und für kurze Zeit zum Zweck der Sedimentation stehengelassen bzw. für zehn Minuten bei 300 g zentrifu-

giert. Dann wurden Sediment und Überstand durch Pipettieren getrennt und die Zellen mittels Sedimentation mit dem Zellpräparationssystem Cytospin auf Objektträger aufgebracht. Dazu wurden mit Poly-L-Lysin-Lösung in der Verdünnung 1:10 beschichtete Superfrost Ultra Plus-Objektträger bzw. kommerzielle mit Polylysin beschichtete Objektträger oder *cytoslides* (für Cytospin) verwendet. Pro Kammer wurden 10 - 40 µl Zellsuspension ad 350 µl Fixationslösung (4 % PAF + 10 % Saccharose) eingefüllt. Danach wurden die Zellen für vier Minuten bei 800 rpm auf die Objektträger transferiert, luftgetrocknet und anschließend für die Immunzytochemie bzw. Immunzytofluoreszenz eingesetzt. Dabei wurde nach dem gleichen Protokoll wie bei der Immunhistochemie bzw. Immunfluoreszenz gearbeitet. Einziger Unterschied war der Einsatz von 0,1 % Triton X-100 zur Permeabilisierung der Zellen anstelle von 10 % Tween.

### **2.2.12 Kurzzeitkultur von Keimzellen**

Die Kurzzeitkultur erfolgte für vier Stunden im Brutschrank bei 34 °C. Dazu wurden die Gewebeproben bis zur Filtration durch das Filtrationssieb ebenso aufbereitet wie für die Immunzytochemie beschrieben (s. Abschnitt 2.2.11). Danach wurden die ca. 2 ml der Zell-Zellkulturmedium-Suspension für zehn Minuten bei 300 g zentrifugiert. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurde die Suspension immer wieder auf 34 °C erwärmt, um eine Schädigung der Zellen zu minimieren. Nach der Zentrifugation wurde das Sediment einschließlich Restflüssigkeit (Volumen von ca. 400 µl) zusammen mit 2 ml DMEM/F-12 und 10 % FCS kultiviert. Nach dieser Zeit wurden sowohl der Bodensatz der Petrischale als auch ein mittels Zentrifugation (2 min bei 800 rpm) aus dem Überstand der Flüssigkeit gewonnenes Sediment für eine Cytospin-Präparation verwendet (s. Abschnitt 2.2.11). Im Anschluss wurde eine Immunzytofluoreszenz-Markierung durchgeführt. Die Präparate wurden am konfokalen Mikroskop visualisiert und mit der Mikroskop-Digitalkamera Zeiss AxioCam fotografiert.

### **2.2.13 Magnetic-activated cell sorting (MACS)**

Reiskorngroße Gewebeproben wurden unmittelbar nach Entnahme in ca. 1 ml DMEM transferiert. Anschließend wurde das Medium vollständig entfernt, das Gewebe mit 1 ml Kollagenase D (Konzentration 1 mg/ml) versetzt und zum Verdau für ca. 60 min bei 32 °C in den Brutschrank gestellt. Dann wurde die Probe in Uhrglasschälchen mit 1 ml auf 37 °C vorgewärmtem DMEM überführt, mittels Uhrmacherpinzetten zerpfückt und sehr fein mit einer spitzen Mikroskopierschere homogenisiert. Es folgte eine Zentrifugation (5 min, 300 g) zur Reduktion des Überstandes auf ca. 500 µl. Nach Filtration durch einen Zellstrainer (Porengröße 30 µm) wurde aus der Zellsuspension durch Zentrifugation (10 min, 300 g) ein Sediment gewonnen. Bei der anschlie-

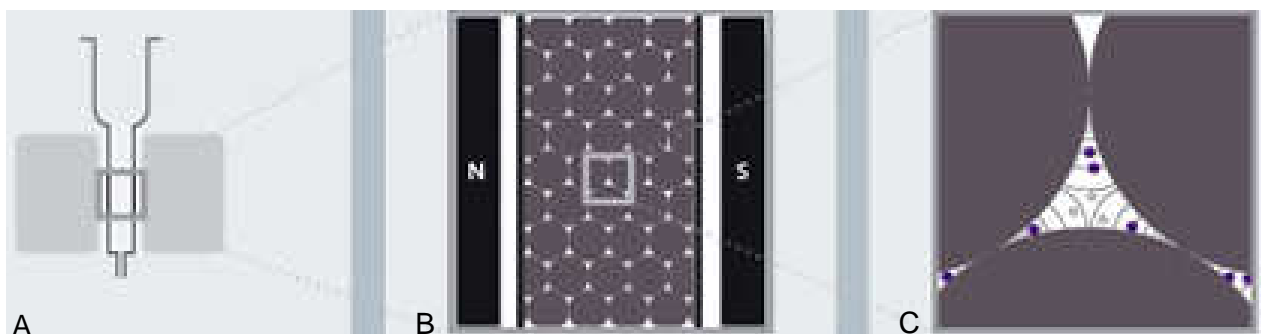


Bei der Zählung in einer Zählkammer (Neubauer *improved*) wurden nur die größeren runden Keimzellen und keine Erythrozyten bzw. (runden oder elongierten) Spermatozoen berücksichtigt. Die Zellanzahl wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl} = [\text{gezählte Zellen} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10 (\text{konstanter Faktor})] / \text{Anzahl gezählte Eckquadrate}$$

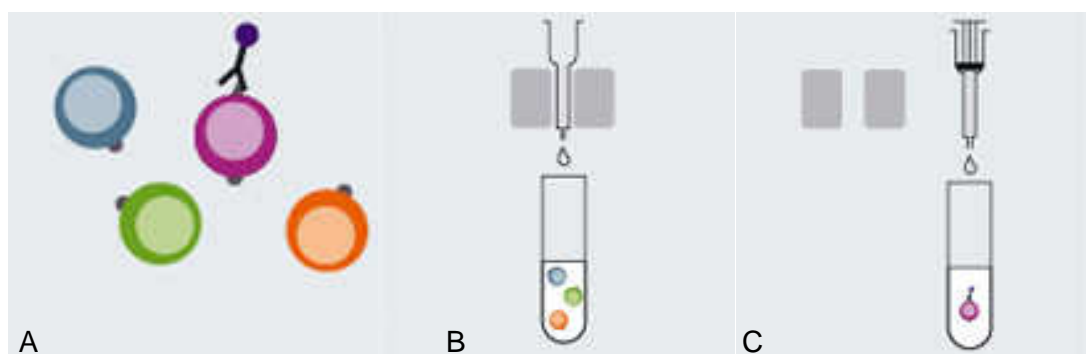
Die Bindung des FGFR3-Erstantikörpers für die Magnetselektion erfolgte während einer vierstündigen Inkubation. Dazu wurden 30 µl Antikörper-Lösung und 270 µl Zellsuspension in DMEM in 24-well-Platten unter Zusatz von 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Suspension in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert und der Überstand durch eine zehnmünütige Zentrifugation bei 300 g gewonnen. Die Zellen wurden anschließend mittels Zentrifugation (1 min 30 s, 800 g) in 1 ml auto MACS Running Buffer (Miltenyi) gewaschen. Nach Resuspendierung des Zellpellets in 80 µl MACS-Puffer wurde die Suspension mit 20 µl des an Magnetpartikel gekoppelten Sekundärantikörpers (anti-mouse IgG2a+b Microbeads) inkubiert (15 min, 4 °C). Die Microbeads, biotinylierte Dextran-Aggregate mit einem Ferrit-Mikrokristall-Kern von 4 - 5 nm Durchmesser und einer Gesamtgröße von 50 nm, sind superparamagnetische Partikel (Miltenyi et al., 1990).

Im Anschluss an die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper wurden die Zellen erneut gewaschen und in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Vor der Magnetselektion wurden zuerst 50 µl von der Zellsuspension abpipettiert und als „Vorher-Fraktion“ deklariert. Danach wurde eine Selektionssäule in den MiniMACS-Separator, eine Art Hufeisenmagnet, eingeklemmt. Durch das Einbringen der Säule in das starke Magnetfeld dieses Hufeisenmagneten wird in der Säulenmatrix aus Stahlkugeln ein hochgradientes Magnetfeld erzeugt, das die mit magnetischen Partikeln beladenen Zellen zurückhält. Abb. 2.05 zeigt eine MACS-Selektionssäule schematisch.



**Abb. 2.05:** Aufbau einer MACS-Selektionssäule. Abbildung verändert nach [8]. A, MACS-Säule mit MiniMACS-Separator; B, Detail aus A, Stahlmatrix der MACS-Säule, in der nach Platzierung im MACS-Separator ein starkes Magnetfeld erzeugt wird; C, Detail aus B, mit Magnetpartikeln gelabelte Zellen werden durch das Magnetfeld in der Säulenmatrix festgehalten.

Der erste Schritt der Magnetselektion war das Spülen der Säule mit 500 µl MACS-Puffer zum Auffüllen des Totvolumens. Dann wurde die Zellsuspension eingefüllt und die durchlaufende „Negativ“-Fraktion aufgefangen. Die mit magnetischen Partikeln beladenen Zellen verbleiben in der Säulenmatrix. Diese Zellfraktion wurde dann zunächst durch dreifaches Spülen der Säule mit jeweils 0,5 µl MACS-Puffer aufgereinigt. Unter Zugabe von 1 ml MACS-Puffer, gleichzeitiger Entfernung der Säule aus dem starken Magnetfeld des Hufeisenmagneten und Absenken des zuvor eingeführten Säulenstempels wurde anschließend die verbliebene Zellfraktion („Positiv“-Fraktion) gewonnen. Das Herausdrücken der Zellsuspension mit dem Stempel war notwendig, da bei der MACS-Methode aufgrund des für die Säulenmatrix verwendeten Materials nach dem Prinzip des Ferromagnetismus gearbeitet wird. Ein Ferromagnet behält, im Gegensatz zu einem Paramagneten, nach der Entfernung des äußeren Magnetfeldes einen Teil seiner Magnetisierung, weshalb bei der Zellgewinnung zusätzlich mechanische Kraft eingesetzt werden muss, um die Haftungskräfte des Restmagnetfeldes zu überwinden. Abbildung 2.06 zeigt das Prinzip der MACS-Selektion.



**Abb. 2.06:** Prinzip der MACS-Selektion. Abbildung verändert nach [8]. A, mit Magnetpartikeln gelabelte und ungelabelte Zellen; B, Depletierung der ungelabelten Zellen („Negativ“-Fraktion); C, Gewinnung der gelabelten Zellen („Positiv“-Fraktion) durch Entfernung der Selektionssäule aus dem Hufeisenmagneten und Durchdrücken des Säulenstempels.

Nach einer weiteren Zellzählung wurde das Volumen der Zellsuspensionen auf eine für die Cytospin-Zellpräparation geeignete Zellmenge eingeeengt. Danach wurden die Zellen mittels Antikörper in einer Immunperoxidase-Färbung markiert.

#### 2.2.14 Gesamtpräparation von *Tubuli seminiferi* (whole mount)

Zur Isolierung einzelner *Tubuli seminiferi* aus dem humanen Hoden wurde eine sogenannte *whole mount*-Präparation durchgeführt. Die Gewebe wurden wie in Abschnitt 2.2.11 beschrieben verdaut. Einzelne Tubuli wurden dann für vier Stunden bei 4 °C in mDF fixiert und danach in PBS gelagert. Anschließend wurde nach dem Protokoll von Ehmcke und Schlatt (2008) ver-

fahren. Ein sogenanntes HCl-Retrieval, eine anschließende komplette Dehydrierung mittels aufsteigender Alkoholreihe sowie eine darauf folgende Rehydrierung mit einer absteigenden Alkoholreihe (s. Ehmcke & Schlatt, 2008) sollten die Auflösung der Basallamina der *Tubuli seminiferi* bewirken. Hiermit sollte die Diffusion der nachträglich eingesetzten Antikörper bzw. Färbelösungen erleichtert werden. Die Markierung der jeweiligen Protein-Epitope mit Antikörpern erfolgte wie im Abschnitt 2.2.9 für die histologischen Schnittpräparate beschrieben, allerdings in vierfachtem Volumen (200 µl). Danach wurden die gestreckten Tubuli auf Objektträger gelegt und mit Hilfe von Dako Fluorescent Mounting Medium eingedeckt. Die Auswertung wurde am Konfokalmikroskop durchgeführt. Mit Hilfe des Computerprogrammes Zeiss LSM Image Browser wurden aus Aufnahmen in Z-Richtung 3D-Bilder konstruiert.

## 2.3 Computerprogramme

Im Rahmen dieser Doktorarbeit Arbeit wurden die nachfolgend aufgelisteten Computerprogramme verwendet:

1. qPCR package (Auswertung der real-time PCR), <http://www.dr-spiess.de>
2. REST-Software (Auswertung der real-time PCR), <http://www.gene-quantification.de>
3. GraphPad Prism-Software (Grafikprogramm; Erstellung Bland-Altman-Plots), <http://www.graphpad.com>
4. TIGR MeV (Software zur Auswertung der Mikroarray-Daten), <http://www.tm4.org/mev/>
5. Computersoftware SPSS (Statistisches Berechnungsprogramm)
6. AxioVision-Software, Carl Zeiss (Software für Mikroskopkamera)
7. BZ Observation Application, Keyence (Software für Mikroskopkamera)
8. LSM/FCS-Software, Carl Zeiss (Software für Mikroskopkamera)
9. Zeiss LSM Image Browser, Carl Zeiss (Konstruktion von 3D-Bildern)
10. Corel Draw (Grafik-Design-Software; Erstellung der Grafiken zur Spermato gonienentwicklung)

### 3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die Rohdaten einer zuvor durchgeführten Mikroarray-Analyse erneut ausgewertet und mittels real-time RT-PCR sowie Immunhistochemie validiert. Die Rohdaten sind in Spiess et al., 2007 veröffentlicht. Ziel war es, spermatogonien-spezifische Gene zu detektieren bzw. diese auf Proteinebene zu bestätigen. Im nächsten Schritt erfolgten Koexpressionsanalysen mit bekannten Markern zur Charakterisierung der Spermatogonien. Darüber hinaus wurde der Versuch unternommen, die Protein-Marker einzelnen spermatogonialen Subpopulationen zuzuordnen. Mit Hilfe des in dieser Studie identifizierten spermatogonialen Oberflächenmarkers FGFR3 sowie magnetassoziiertes Zellisolation (MACS) wurden erfolgreich Zellen isoliert, die die Stammzellpopulation innerhalb der Gesamtpopulation der Spermatogonien darstellen könnten. Untersuchungen an vollständigen Hodenkanälchen dienten der Beurteilung von Kloneigenschaften.

#### 3.1 Untersuchungen spermatogonien-spezifischer Expressionsmuster auf mRNA-Ebene

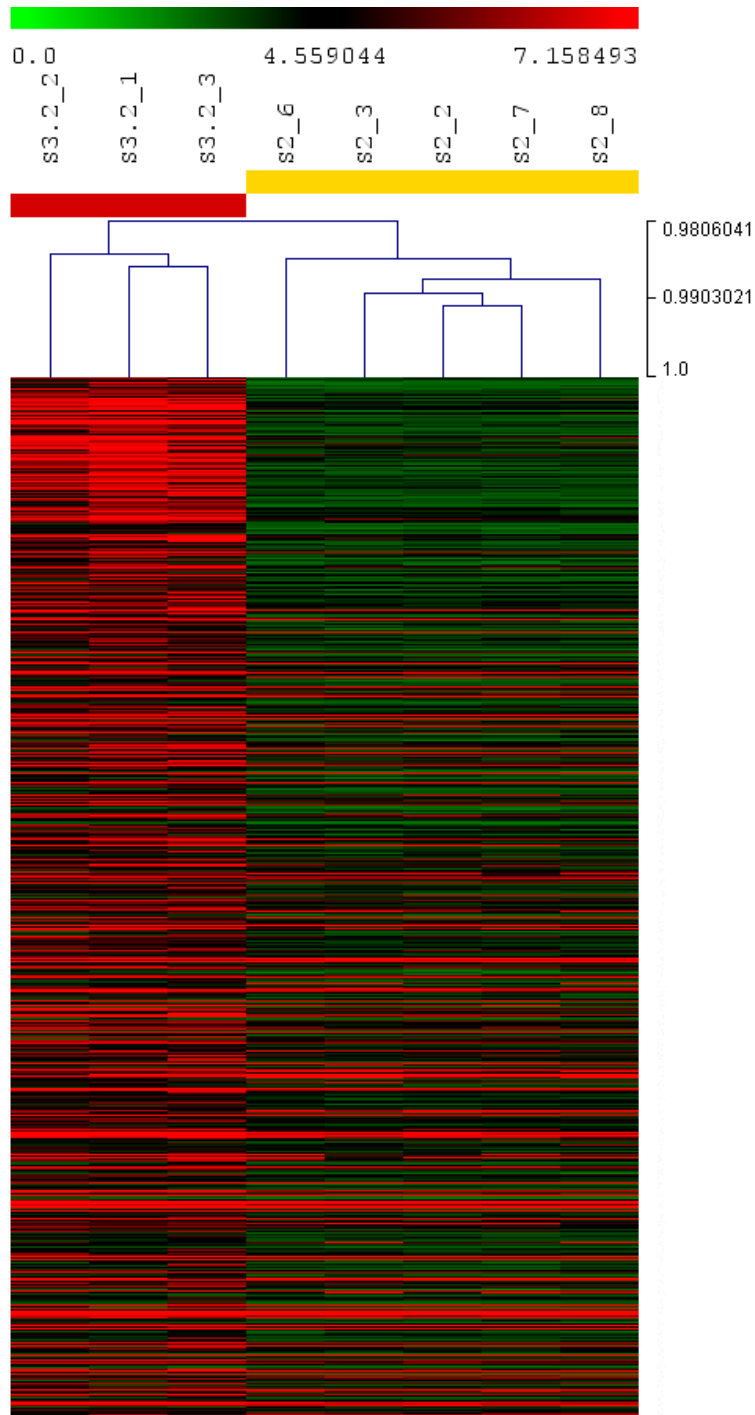
##### 3.1.1 Filtern der Mikroarray-Daten

Um spermatogonien-spezifische Gene zu detektieren, wurde eine Mikroarray-Analyse ausgewertet, die das globale Expressionsmuster von Sertolizell-Syndrom-Patientengewebe (mJ-Score 2) mit dem von Hodengewebe vergleicht, deren einziger Keimzelltyp die Spermatogonien darstellen (mJ-Score 3). Dadurch war es möglich, die spezifische Genexpression humaner Spermatogonien im Gewebekontext zu untersuchen. Hierbei zeigte sich, dass die Proben entsprechend ihrer jeweiligen Score-Zugehörigkeit clustern.

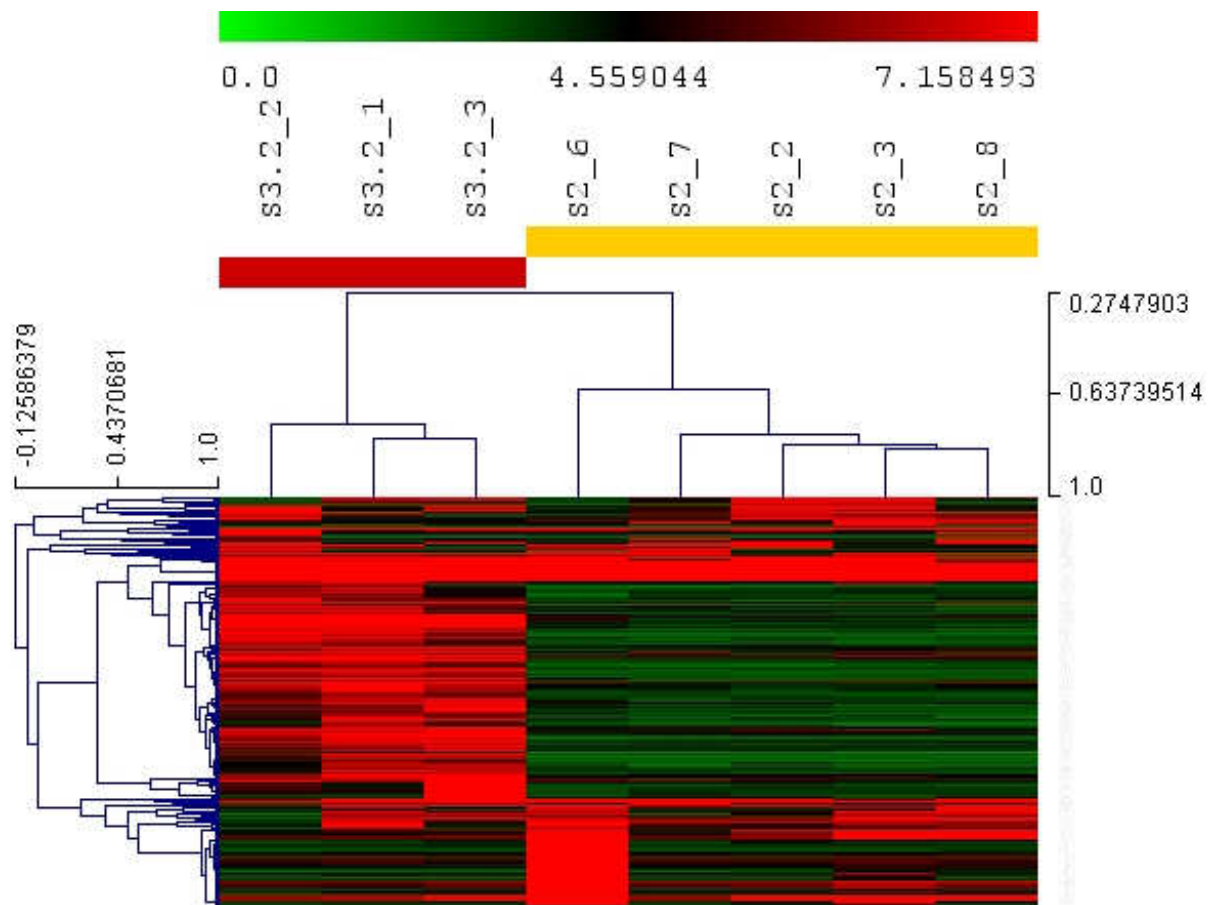
Abb. 3.01 zeigt die nach Proben geclusterte Heatmap auf der Basis aller 55.000 Gene. Aufregulierte Gene sind in Rot, abregulierte Gene in Grün dargestellt. Score 3-Proben sind in Rot und Score 2-Proben in Gelb markiert (s. Hierarchiebaum oben).

Ein im Anschluss an die erste Clusteranalyse durchgeführter t-Test zwischen den Score-Gruppen diente zum Filtern differentiell exprimierter Gene. Abb. 3.02 zeigt die Heatmap dieser Clusteranalyse auf der Grundlage der 200 Gene mit der höchsten statistischen Signifikanz. Dies kann als graphische Darstellung des t-Tests betrachtet werden. Die Methode spiegelt nicht unbedingt die interne Datenstruktur wider, da zur Clusteranalyse nicht mehr alle Gene verwendet wurden. Der linke Hierarchiebaum zeigt die Ähnlichkeit der Genexpressionsverläufe zwischen den Einzelproben. Die Proben clustern auch hier nach ihrer Score-Zugehörigkeit (oberer Hierar-

chiebaum), wobei auffällt, dass Probe S2\_6 sich von den übrigen Proben mit mJ-Score 2 am stärksten unterscheidet.

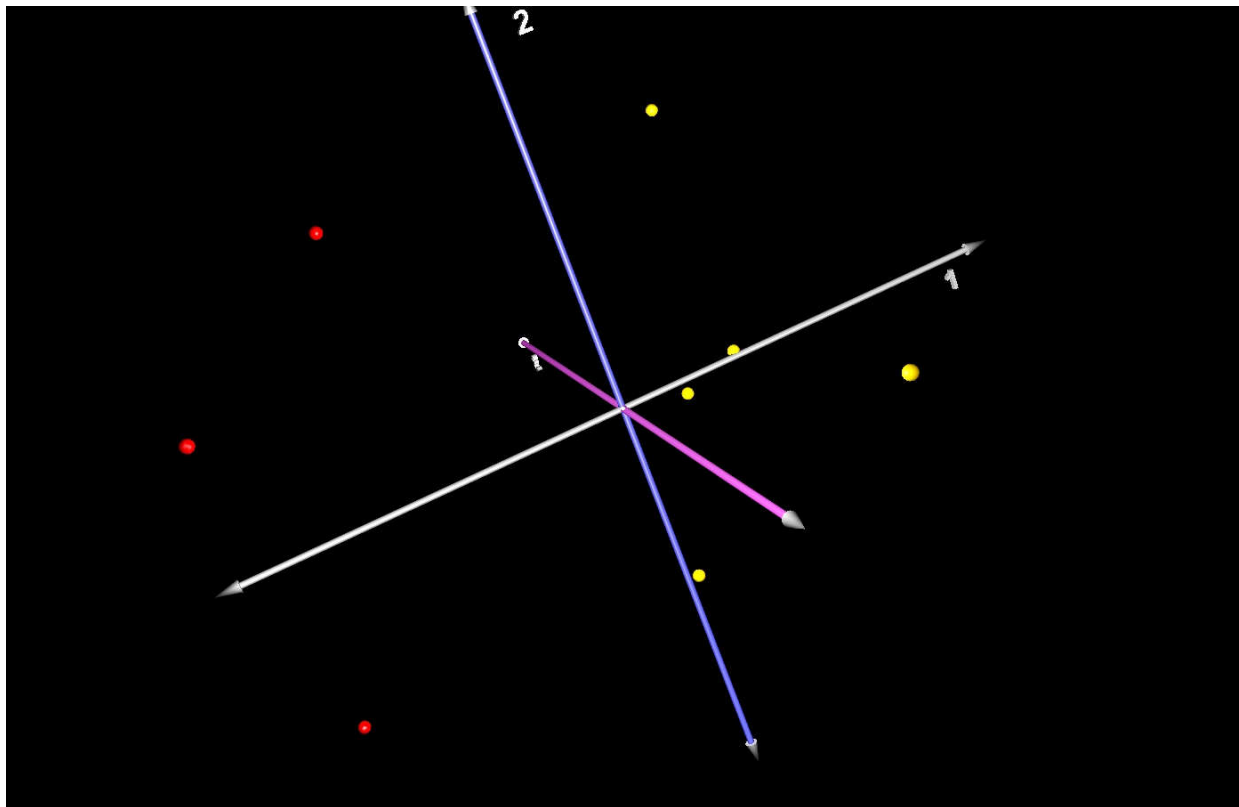


**Abb. 3.01:** Clusteranalyse der Mikroarray-Daten unter Verwendung aller Gene. Heatmap. Aufregulierte Gene, rot; abregulierte Gene, grün. Screen Shot des oberen Teils der Darstellung der Computer-Software TIGR MeV. Die Proben clustern nach ihrer Score-Zugehörigkeit (rot = Score 3; gelb = Score 2).



**Abb. 3.02:** Clusteranalyse nach den 200 signifikantesten Genen. Clustering nach der Ähnlichkeit der Proben (oberer Hierarchiebaum; rot = Score 3, gelb = Score 2) und nach der Ähnlichkeit der Genexpressionsverläufe (linker Hierarchiebaum). Darstellung der 200 signifikantesten Gene.

Im Unterschied zur hierarchischen Clusteranalyse mit anschließendem t-Test gehen in die *principal component*-Analyse (PCA), bei der die Proben im dreidimensionalen Raum dargestellt werden, alle Gene und somit alle Unterschiede in der Genexpression ein. Der Datensatz wird dabei auf die Hauptvarianzen reduziert. Letztendlich zur Analyse verwendet werden die Gene mit der größten Trennleistung. Abb. 3.03 zeigt die Verteilung der Scoregruppen. Die Proben clustern entsprechend ihrer Score-Zugehörigkeit entlang der 1. Hauptkomponente.



**Abb. 3.03:** Principal component analysis. Verteilung der Proben im dreidimensionalen Raum. 1 = 1. Hauptkomponente, 2 = 2. Hauptkomponente, 3 = 3. Hauptkomponente; rot, Score 3-Proben; gelb, Score 2-Proben. Die Proben clustern nach ihrer Score-Zugehörigkeit.

Einige dieser differentiell exprimierten Gene wurden mittels real-time RT-PCR und / oder Immunhistochemie (s. Abschnitte 3.1.2 bzw. 3.2.1) validiert.

### 3.1.2 Validierung der Mikroarray-Analyse mittels real-time RT-PCR

Zur Bestätigung der Mikroarray-Analyse wurden spermato gonien spezifische Gene ausgewählt, die für die Aufklärung des Mechanismus der Spermato gonio genese von Relevanz sein könnten und somit speziell Aufschluss auf die Subpopulation der spermato gonialen Stammzellen geben. Dies waren zum einen Gene mit bedeutender Rolle für die Spermato gonienfunktion und zum anderem bekannte Pluripotenzgene, die außerdem in der Mikroarray-Analyse mit hoher statistischer Signifikanz zwischen mJ-Score 2- und mJ-Score 3-Proben differentiell exprimiert waren. In dieser Validierung wurden zwei Methoden verglichen, die die gleiche Ebene der Genexpression (mRNA) betrachten.

Die Validierung erfolgte mit Hilfe der Berechnung von Ratiowerten als Verhältnis der Genexpression zwischen den unterschiedlichen Gewebszuständen (Hodenpathologie = mJ-Score). Dabei wurden zunächst Hodengewebe mit Sertolizell-Syndrom (mJ-Score 2) und Gewebe mit der sel-

tenen Hodenpathologie, bei der Spermatogonien als einziger Keimzelltyp vorkommen (mJ-Score 3), berücksichtigt. Die so erhaltenen Ergebnisse mussten durch einen Vergleich mit Hodengewebe validiert werden, das eine qualitativ und quantitativ normale Spermatogenese aufwies (mJ-Score 10). Zusätzlich wurden Proben untersucht, in denen neben Spermatogonien auch Spermatozyten im Keimepithel gefunden wurden (mJ-Score 5).

Zunächst wurden aus den Ergebnissen der real-time RT-PCR Genexpressions-Ratios mit zwei verschiedenen Berechnungsmethoden erstellt (*qPCR package*; Spiess et al., 2008 vs. REST-Software; Pfaffl et al., 2002). Diese wurden mit den entsprechenden Ratiowerten aus der Mikroarray-Analyse verglichen. Die aus den Daten der Mikroarray-Analyse und der real-time RT-PCR berechneten Ratiowerte wurden anschließend verglichen (s. Tab. 3.01).

### 3.1.2.1 Validierung der Mikroarray-Analyse mittels real-time RT-PCR zur Detektion spermatogonienspezifischer Gene

Gen	A 2/3	R 2/3	Rest 2/3	A 2/5	R 2/5	Rest 2/5	A 2/10	R 2/10	Rest 2/10
FGFR3	9.81	17.17	9.73	47.28	47.03	19.37	33.61	50.63	24.76
ESX1	4.34	k.A.	k.A.	26.52	k.A.	k.A.	15.69	k.A.	k.A.
PIWIL2	3.34	3.00	5.56	14.98	17.14	28.76	12.53	19.27	30.43
ECAT8 *	2.40	2.46	2.09	10.51	30.92	21.25	7.89	45.66	40.77
KSP37	3.95	0.13	0.04	0.39	0.42	0.15	0.22	0.65	0.29
LIN28B **	2.18	2.26	2.3	13.14	10.21	11.37	11.21	21.69	19.07
DDX4	14.60	21.46	26.31	164.55	118.91	122.72	235.18	217.72	282.56
MSI2 *	2.98	2.02	1.06	0.93	2.81	1.12	0.95	1.43	0.83
SPOC1 **	1.12	1.91	1.08	1.66	5.11	3.52	1.17	4.38	4.18
UTF1 *	1.56	k.A.	k.A.	3.32	k.A.	k.A.	2.28	k.A.	k.A.
DSG2*	3.07	2.98	2.78	5.75	3.06	5.42	3.87	5.05	7.16
SOX2 **	0.87	0.27	0.39	0.10	0.42	0.48	0.16	0.37	0.57

**Tab. 3.01:** Ratiowerte der Genexpression zwischen mJ-Score 2-, mJ-Score 3-, mJ-Score 5- und mJ-Score 10-Patienten. Gegenübergestellt sind die Ergebnisse aus der Mikroarray-Analyse (A) sowie die mittels real-time RT-PCR-Validierung erhaltenen Werte, die einerseits mit dem *qPCR package* (R; Spiess et al., 2008) und andererseits mit der REST-Software (Rest; Pfaffl et al., 2002) berechnet wurden. Alle Ratios wurden aus dem Mittelwert der Replikate abgeleitet. Die Ratiowerte für die Mikroarray-Daten erfolgte nach der Formel  $2^{(\text{Mittelwert höherer Score} - \text{Mittelwert niedrigerer Score})}$ . \* markiert Gene, detektiert in der Mikroarray-Analyse mit statistischer Signifikanz unterhalb der 1000-er Grenze; \*\* im Mikroarray nicht als differentiell exprimiert gefiltert; k.A. = keine Angabe, hier konnten keine Expressionsratios berechnet werden.

In Tabelle 3.01 sind die Expressionsratios von Patientengeweben mit homogener Testispathologie (mJ-Score 2, 3 und 5) sowie normaler Spermatogenese (mJ-Score 10) dargestellt, be-



rechnet jeweils als Ratio zwischen zwei Scores (vgl. Spaltenbeschriftung). Werte  $> 1$  bedeuten einen Expressionsanstieg zum jeweils höheren Score. Werte  $< 1$  zeigen einen entsprechenden Expressionsabfall an. Der Expressionsanstieg von mJ-Score 2 (Sertolizell-Syndrom) nach mJ-Score 3 bzw. mJ-Score 5 ist vor allem durch das Hinzukommen von Keimzellen zu erklären.

Die mit den zwei verschiedenen Auswertungsmethoden berechneten Expressionsratios aus der real-time RT-PCR weisen größtenteils eine gute Übereinstimmung auf. Die Richtung der Expressionsänderung (Erhöhung oder Abnahme) bzw. keine Expressionsänderung bei Werten um die Zahl „1“ zwischen den unterschiedlichen untersuchten Zuständen stellt sich mit beiden Berechnungsmethoden einheitlich dar. Detektiert wurden Unterschiede in der Höhe zwischen sich entsprechenden Expressionsratios (vgl. Tab. 3.01). Dies ist einerseits durch die verschiedenen Berechnungsmodi der verwendeten Computerprogramme und andererseits durch kleine Unterschiede in den Eingangsparametern zu erklären. Beispielsweise besteht durch die Option der Verwendung von Einzeleffizienzen jeder Probe bei der Berechnung mit dem *qPCR package* eine sehr gute Möglichkeit, experimentell bedingte Ungenauigkeiten letztendlich wieder herauszurechnen. Im Gegensatz dazu kann bei der REST-Software lediglich mit einer gemittelten PCR-Effizienz zwischen zwei verwendeten verschiedenen Patientengruppen gerechnet werden.

Insgesamt war eine gute Übereinstimmung zwischen den Expressionsratios aus der Mikroarray-Analyse („A“) und den Expressionsratios aus der real-time RT-PCR („R“ bzw. „Rest“) festzustellen.

Die Richtung der Expressionsänderung zwischen Score 2 und Score 3 durch Hinzukommen bzw. Wegfall von Transkripten stimmt in fast allen Fällen überein. Eine Ausnahme bildete das Gen KSP37, das in der Mikroarray-Analyse eine Erhöhung und in der real-time RT-PCR eine Abnahme zeigte. Das SPOC1-Transkript zeigte lediglich bei der Ratioberechnung mit dem qPCR-Paket in der real-time RT-PCR eine Expressionsänderung an.

Die Richtung der Expressionsänderung war bei den Ratios zwischen Score 2 und Score 5 ebenfalls in fast allen Fällen übereinstimmend. Allerdings wurde das MSI2-Transkript nur bei der real-time RT-PCR-Auswertung mit dem qPCR-Paket als differentiell angezeigt. Die anderen beiden Werte zeigten keine Änderung in der Expression an. Die Expressionsänderung von FGFR3 wurde sowohl anhand der Mikroarray-Daten sowie der PCR-Auswertung mit dem qPCR-Paket mit einem hohen, sehr gut übereinstimmenden Expressionsratio von 47 angezeigt; der Rest-Wert war dagegen mit 19 deutlich niedriger.

Bei den Ratios zwischen Score 2 und Score 10 war die Richtung der Expressionsänderung in allen Fällen übereinstimmend. Die Transkripte ECAT8 sowie SPOC1 zeigten in den Mikroarray-

Daten keinen (SPOC1) bzw. einen wesentlich geringeren (ECAT8) Expressionsanstieg im Vergleich zu den PCR-Daten an. Möglicherweise waren die auf den Mikroarray-Chips gebundenen Oligonukleotid-Targets nicht ausreichend spezifisch.

Die Berechnungen der Expressionsratios aus den Daten der real-time RT-PCR erfolgten für die Scores 2, 5 und 10 mit RNA-Proben aus Patientengruppen von einer Gruppenstärke mit jeweils acht, für Score 3 mit RNA-Proben von drei Patienten. Ausnahmefälle, bei denen die Berechnung der Ratios mit einer reduzierten Probenanzahl durchgeführt wurde, sind im Folgenden gesondert aufgeführt.

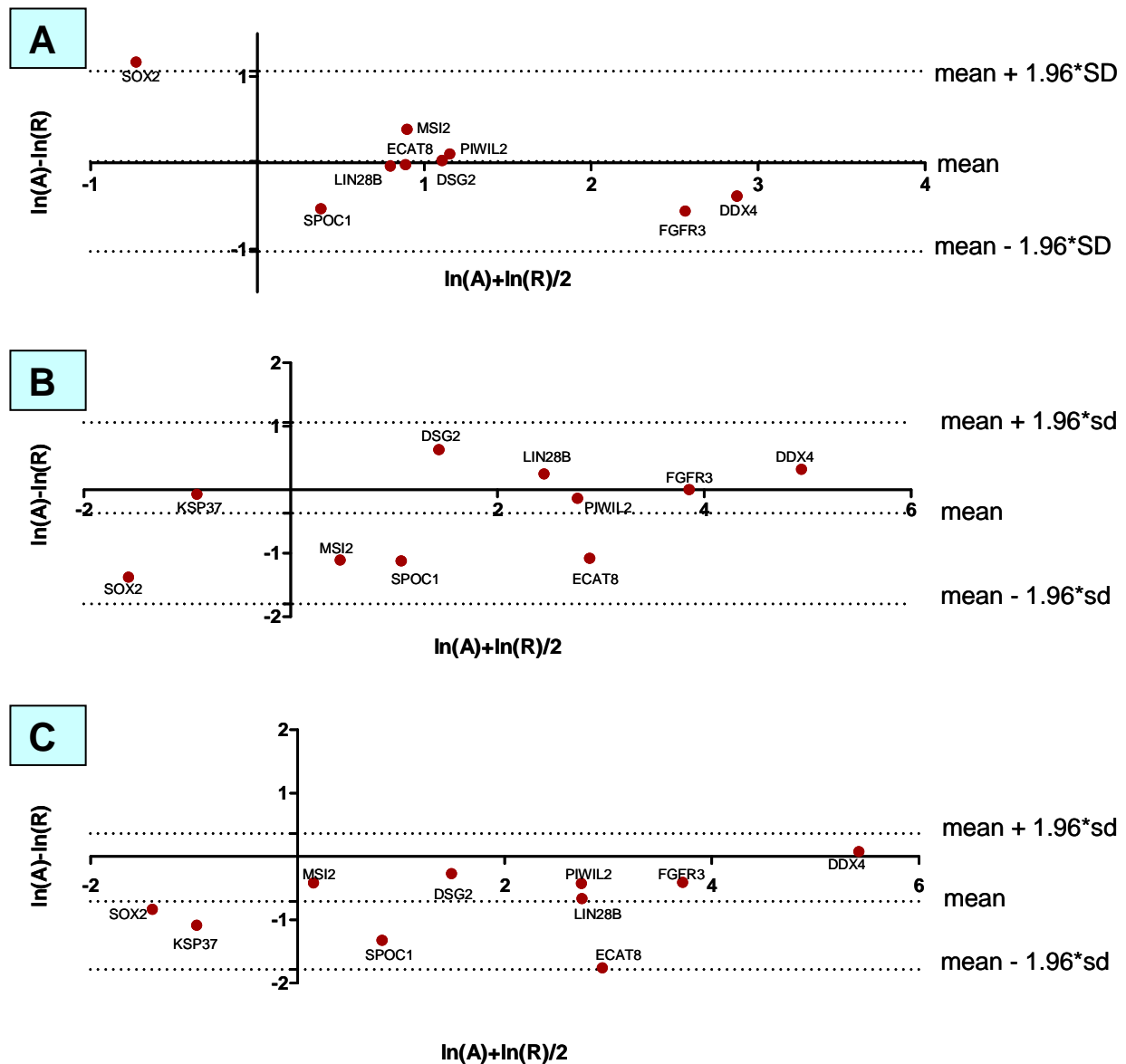
Die Berechnung der Ratios für DSG2 erfolgte für die Gewebeproben mit Score 2, 5 und 10 bei jeweils sieben Patienten. Für die Score 5- und die Score 10-Proben wurden anfänglich nur sieben Gewebe eingesetzt, da die RT-PCR für dieses Transkript erst nachträglich geplant wurde und die entsprechenden RNAs bzw. cDNAs zu diesem Zeitpunkt bereits aufgebraucht waren. Die Score 2-Proben bestanden ursprünglich aus acht Geweben. Ein Gewebe musste jedoch im Nachhinein herausgenommen, da hier kein spezifisches PCR-Produkt amplifiziert werden konnte.

Für die Berechnung der SOX2-Ratios wurden die Daten von lediglich sechs Score 10-Patienten verwendet. Die Daten der zwei anderen Proben konnten aufgrund zu schlechter PCR-Effizienzen nicht benutzt werden.

Da bei einigen Patienten aus der Score-2-Kohorte die ESX1- sowie die UTF1-Expressionslevel unterhalb der Detektionsgrenze lagen, konnten für diese Transkripte keine Ratios berechnet werden.

#### **3.1.2.2 Vergleich der Genexpressions-Ratios mit Bland-Altman-Plot**

Für den Vergleich der Genexpressions-Ratios aus Mikroarray-Analyse und real-time RT-PCR wurde der Bland-Altman-Plot eingesetzt (Abb. 3.04). Hierbei handelt es sich um eine statistische Methode zur Bewertung der Konkordanz zwischen zwei Methoden (Bland & Altman, 1986; 1999). Zur Berechnung wurden die mittels *qPCR package* (Spiess et al., 2008; mit „R“ gekennzeichnete Spalten in Tabelle 3.01) erstellten real-time PCR-Daten benutzt. Gerechnet wurde jeweils mit den logarithmierten Daten, um die Differenzen zwischen höheren und niedrigeren Ratiowerten anzugleichen (Bland & Altman, 1999).



**Abb. 3.04:** Bland-Altman-Plot zum Vergleich der Genexpressions-Ratios zwischen Mikroarray-Analyse (A) und real-time RT-PCR (R). Ratios zwischen mJ-Score 2 und mJ-Score 3 (A), mJ-Score 2 und mJ-Score 5 (B) sowie mJ-Score 2 und mJ-Score 10 (C). Die Abszisse zeigt den experimentell erstellten Mittelwert (s. Tabellenspalte „ln(A+lnR)/2“ der Tabellen A01 bis A03 im Anhang), die Ordinate zeigt die Differenz der Ratiowerte (s. Tabellenspalte „lnA-lnR“). Die obere und die untere gepunktete Linie stellen das experimentell ermittelte 95 %-Intervall aus der gemittelten Ratio-Differenz der log transformierten Werte  $\pm 1,96$  Standardabweichung dar. Für weitere Berechnungen s. Anhang. Die Abbildung wurde mit der GraphPad Prism-Software erstellt.

Für die Genexpressionsratios zwischen mJ-Score 2 und 3 konnten neun von zehn, für die Ratios zwischen mJ-Score 2 und 5 bzw. mJ-Score 2 und 10 konnten alle zehn der in der Mikroarray-Analyse ermittelten Expressionsratios per real-time RT-PCR bestätigt werden (Abb. 3.04 A, B bzw. C). Alle Gene befinden sich, mit Ausnahme des SOX2-Transkriptes des Ratios zwischen mJ-Score 2 und 3, in einem engen 95 %-Konfidenzintervall (2,08 für Ratio 2/3; 2,86 für Ratio 2/5 und 2,14 für Ratio 2/10). Dies signalisiert eine gute Übereinstimmung zwi-

schen beiden experimentellen Methoden sowie eine hohe Validität der Ergebnisse. Der für SOX2 als Differenz der logarithmierten Ratiowerte berechnete  $\gamma$ -Wert befindet sich bei dem Expressionsratio zwischen mJ-Score 2 und 3 geringfügig außerhalb des oberen 95 %-Intervalls (s. Abb. 3.04 A). Dagegen wurde das für das Gen KSP37 ermittelte Expressionsratio zwischen Score 2 und Score 3 nicht als spermatogonien-spezifisch validiert, da hier ein Ratio von 3,94 aus der Mikroarray-Analyse einem Ratio von 0,13 bzw. 0,04 Ratio aus der real-time RT-PCR gegenüberstand. Deshalb wurden letztere Daten nicht für die graphische Darstellung verwendet.

## **3.2 Untersuchungen der Expression spermatogonien-spezifischer Marker auf Proteinebene**

### **3.2.1 Validierung der Mikroarray-Analyse mittels Immunhistochemie und Immunfluoreszenz**

Aufgrund von Genregulationsmechanismen auf verschiedenen Ebenen (Transkription, Translation, Protein) geben Aussagen über den Gehalt einer bestimmten mRNA in einer Zelle nicht zwangsläufig Auskunft über Menge bzw. Vorhandensein des entsprechenden Proteins. Um die auf mRNA-Ebene erzielten Ergebnisse auf der Ebene der Proteinexpression zu bestätigen, wurde für einige Transkripte eine Immunhistochemie bzw. Immunfluoreszenz durchgeführt. Dazu wurden FGFR3, DSG2, UTF1, CBL, SNAP91 und SPOC1 ausgewählt. Für alle Marker wurde die Expression in Spermatogonien auf Proteinebene bestätigt. In den folgenden Abschnitten werden die Details für jedes Marker-Protein gesondert beschrieben. Die Untersuchungen wurden jeweils an Hodengewebe durchgeführt, die eine qualitativ und quantitativ normale Spermatogenese aufwiesen, wie es für Gewebe von Patienten mit Verschluss-Azoospermie in der Regel der Fall ist.

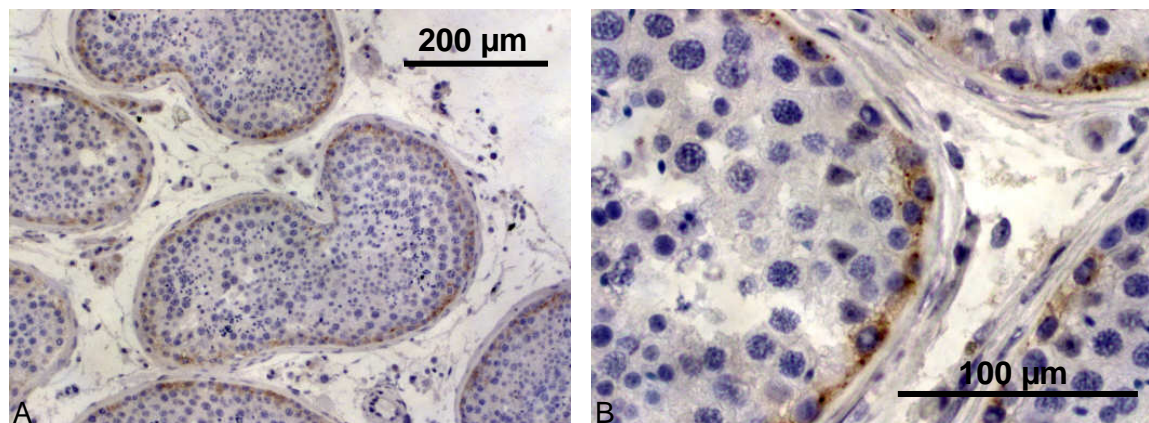
#### **3.2.1.1 Fibroblastenwachstumsfaktor (FGFR3)**

Die Immunreaktivität des FGFR3-Antikörpers (Abb. 3.05, braune Färbung) war überwiegend auf direkt der Basallamina aufliegende Spermatogonien beschränkt. Das Protein wurde sowohl in A dark-Spermatogonien<sup>2</sup> als auch in A pale-Spermatogonien detektiert (s. Abb. 3.06), wobei die Zelloberfläche und / oder cytoplasmatische Vesikel dieser Zellen markiert waren (Abb. 3.07). Um die Spezifität der FGFR3-Vesikel-Markierung zu bestätigen, wurden in einer Doppelmarkierung zwei Antikörper gegen das FGFR3-Protein, ein monoklonaler Maus-Antikörper und ein

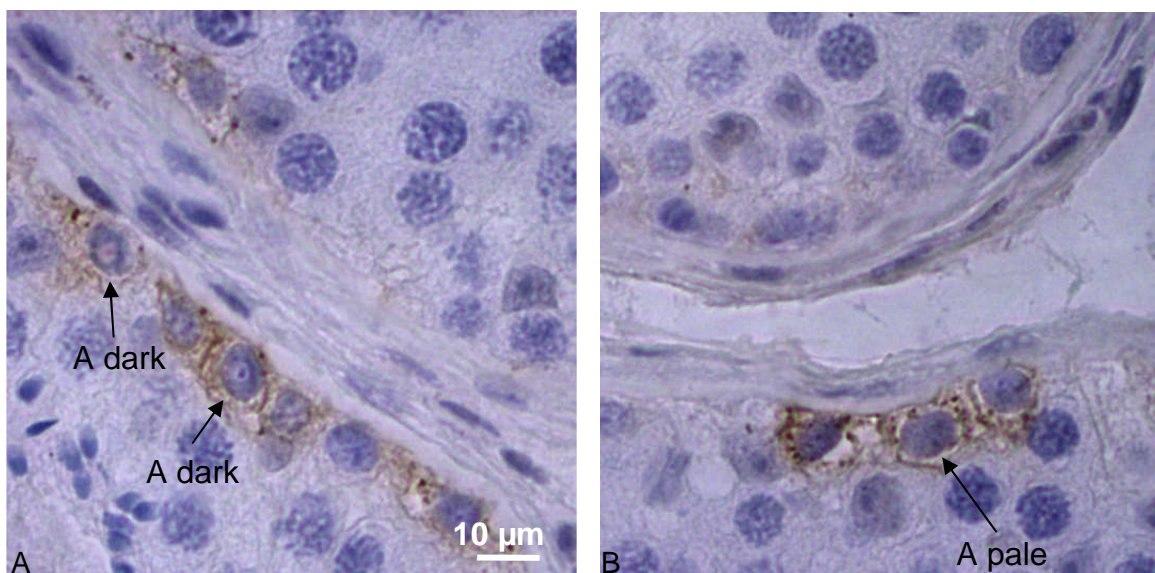
---

<sup>2</sup> zur Beschreibung der Morphologie der Spermatogonientypen s. Abschnitt 1.3.

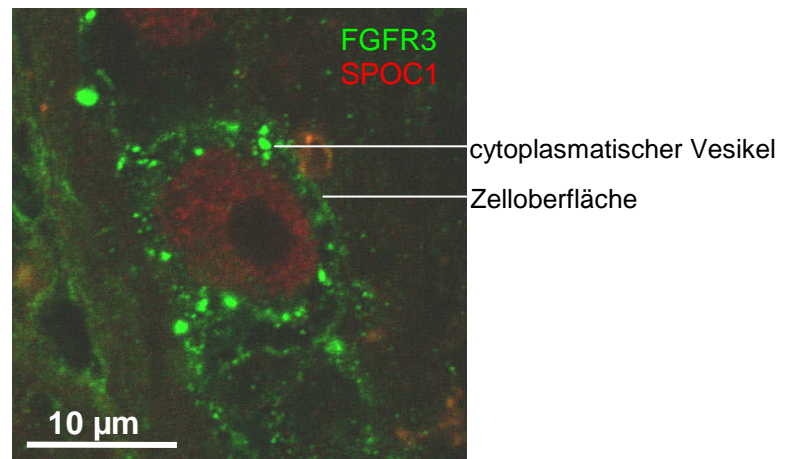
monoklonaler Kaninchen-Antikörper, eingesetzt. Beide Antikörper riefen eine Markierung der gleichen cytoplasmatischen Kompartimente hervor. Abbildung 3.08 B vs. C zeigt diese Kolo-kalisation in einer A-dark- und in einer A-pale-Spermatogonie. Die Identität der cytoplasmatischen FGFR3-Vesikel konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht eindeutig geklärt werden. Es wurde lediglich eine begrenzte partielle Kolo-kalisation mit den Markern RAB11 (Marker für Recycling-Endosomen), RAB4A (früher endosomaler Marker) sowie LAMP1 (lysosomaler Marker) festgestellt (nicht abgebildet).



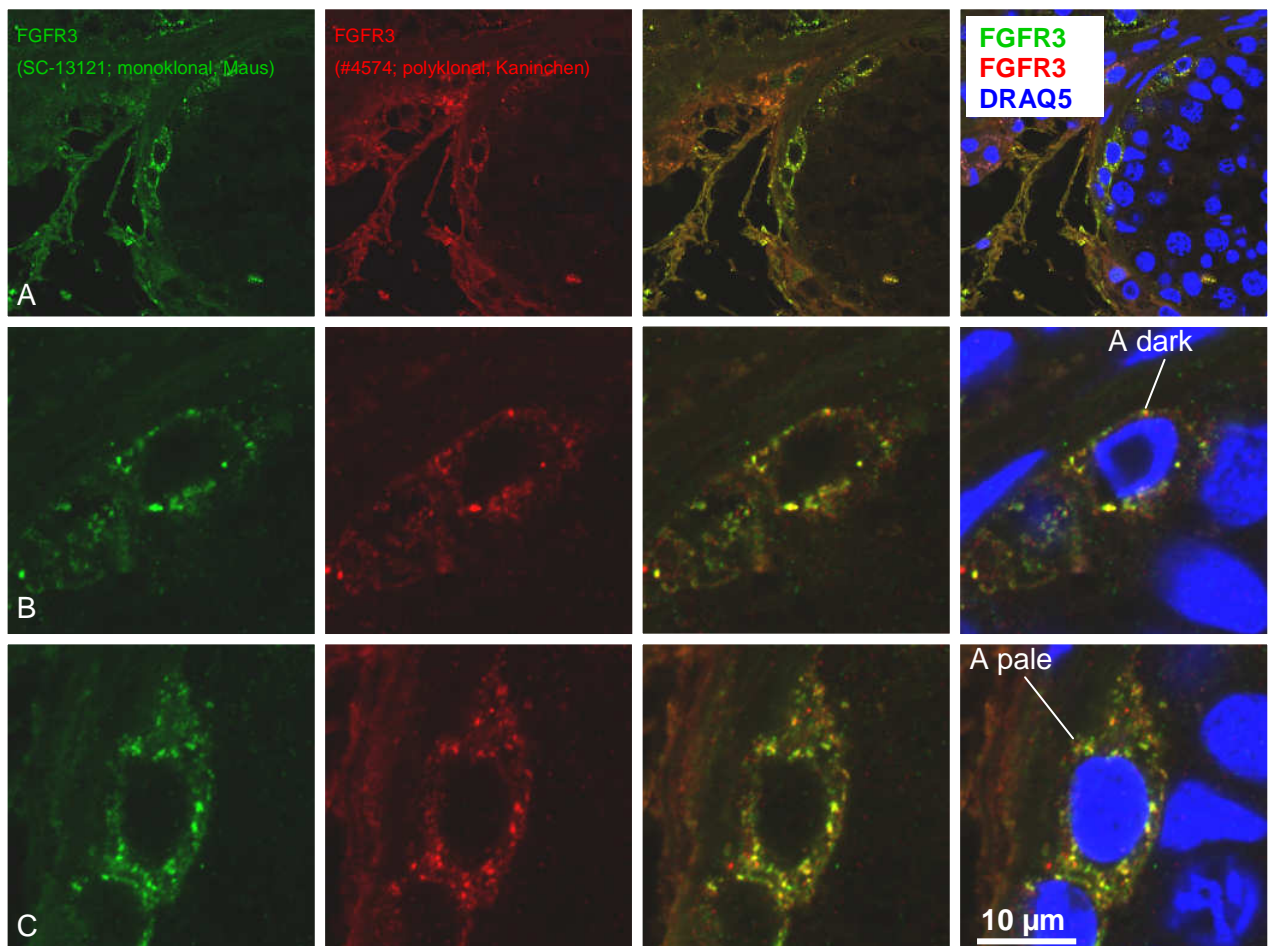
**Abb. 3.05:** Immunhistochemie gegen ein Epitop des Proteins FGFR3. Verwendet wurde ein monoklonaler Maus-Antikörper. Kern-gegenfärbung mit Mayers Hämalaun. A, Übersicht; B, Detail.



**Abb. 3.06:** FGFR3-Expression in den unterschiedlichen Spermatogonientypen mittels Immunhistochemie. Kerngegenfärbung mit Mayers Hämalaun. A, A-dark-Spermatogonien (Pfeile); B, A-pale-Spermatogonie (Pfeil).



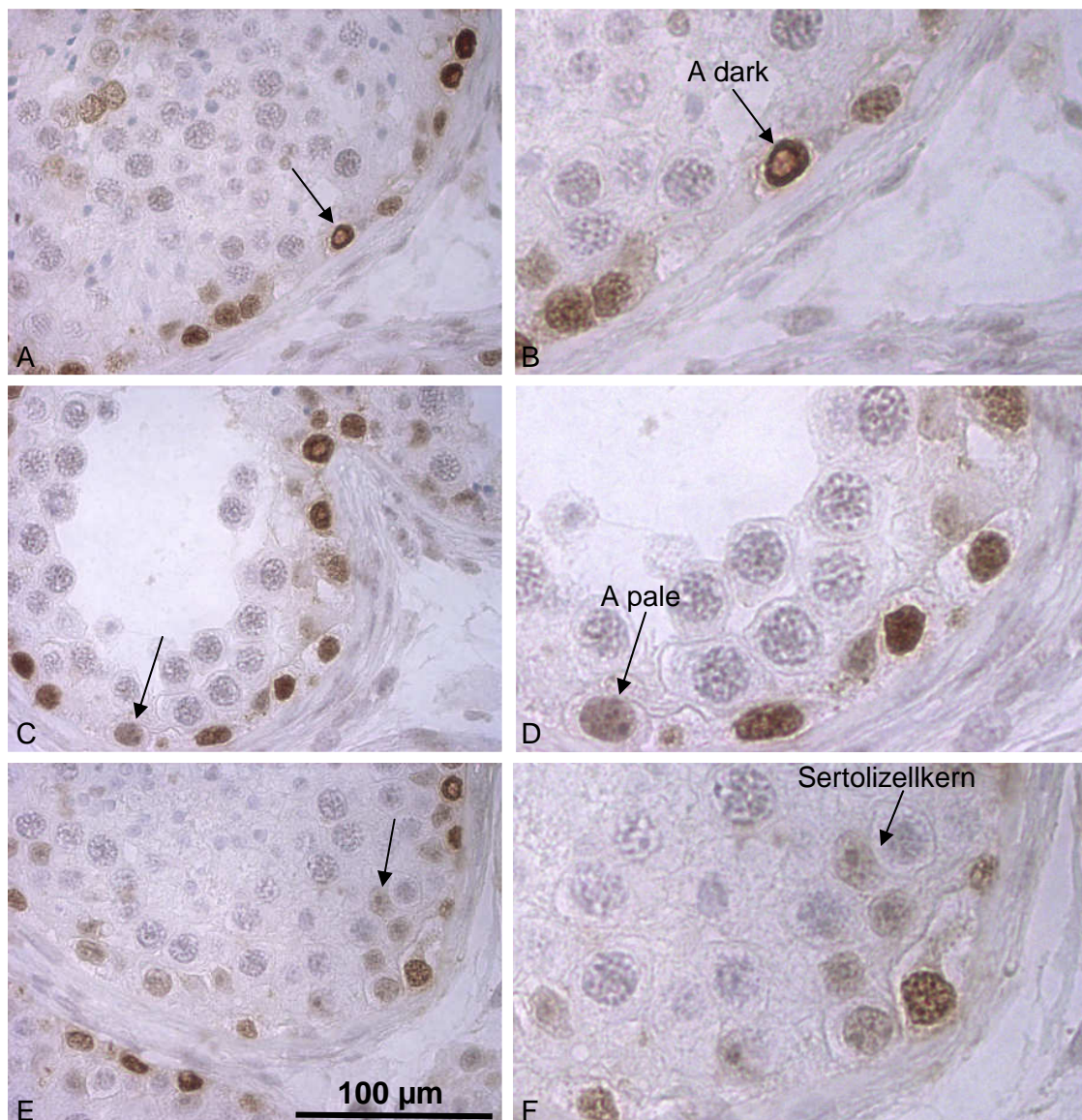
**Abb. 3.07:** FGFR3-Expressionsmuster in Spermatogonien mittels Immunfluoreszenz. Kernmarkierung mit SPOC1 (s. Abschnitt 3.2.1.3). A-dark-Spermatogonie.



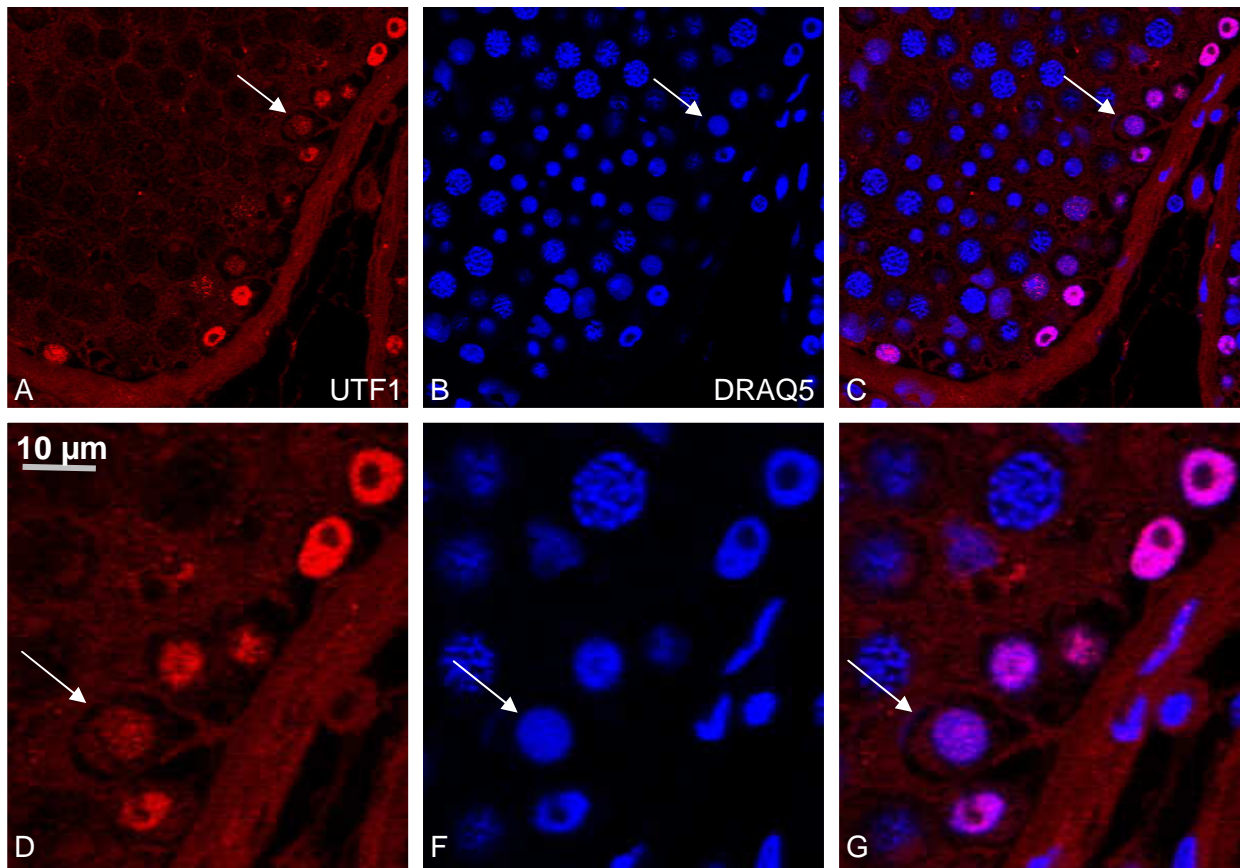
**Abb. 3.08:** Kolokalisation von FGFR3 mit zwei verschiedenen Antikörpern. Kernmarkierung mit DNA-Farbstoff DRAQ5. Zeile A, Überblick; Zeilen B und C, Details. Beide Antikörper markieren die gleichen Kompartimente im Cytoplasma (gelb als Mischfarbe) einer A-dark-Spermatogonie (B) und einer A-pale-Spermatogonie (C).

### 3.2.1.2 UTF1

Der UTF1-Antikörper markierte das Chromatin im Zellkern vorwiegend direkt an der Basallamina lokalisierter Spermatogonien (s. Abb. 3.09, braune Markierung). Unter den markierten Zellen waren sowohl Zellen des Spermatogionentyps A dark (Abb. 3.09 A, B) als auch des Typs A pale (Abb. 3.09 C, D). Einige Sertolizellkerne waren ebenfalls leicht mit UTF1 markiert (Pfeil in Abb. 3.09 E, F). Bei der Sertolizellkern-Markierung kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um eine unspezifische Färbung des Hintergrunds handelt. Selten waren rundkernige Zellen schwächer mit UTF1 angefärbt, bei denen es sich um B-Spermatogonien handeln könnte (s. Abb. 3.10, Pfeil).



**Abb. 3.09:** UTF1-Immunhistochemie. Verwendet wurde ein monoklonaler Maus-Antikörper. Kerngegenfärbung mit Mayers Hämalaun. A, C, E, Übersichten; B, D, F, Details. Die Pfeile markieren eine A dark-Spermatogonie (A, B), eine A pale-Spermatogonie (C, D) bzw. einen leicht UTF1-markierten Sertolizellkern (E, F).

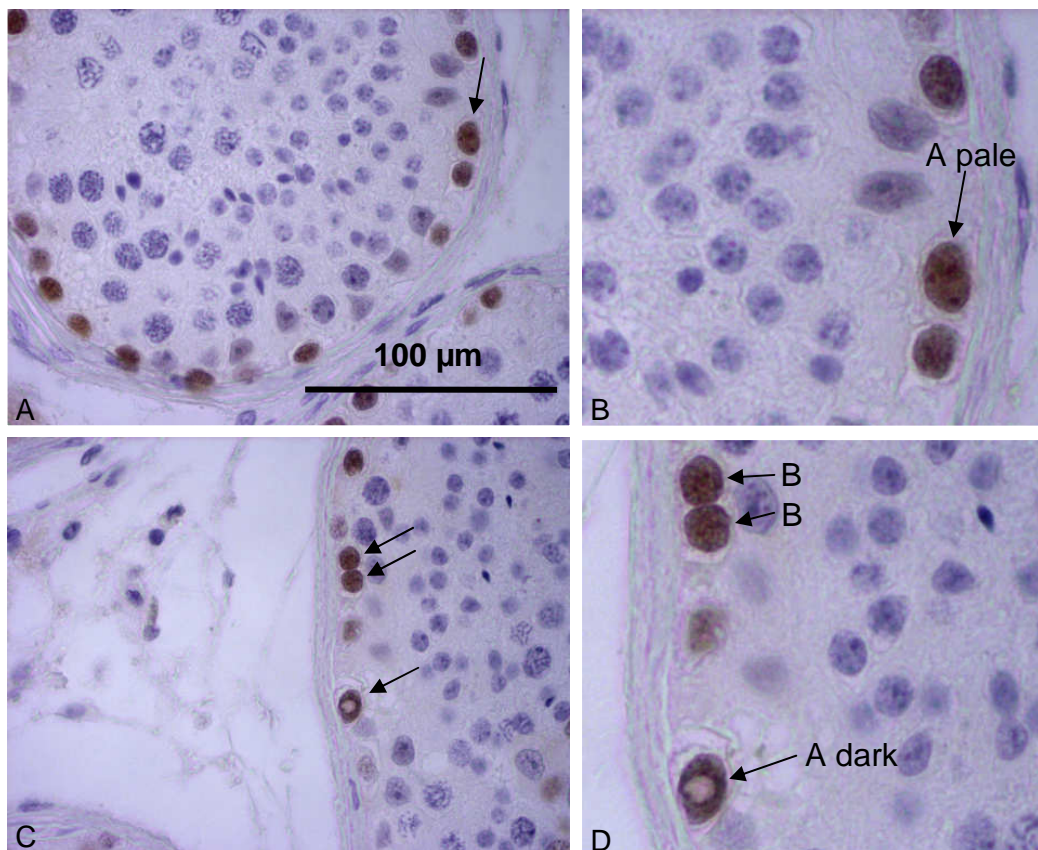


**Abb. 3.10:** UTF1-Immunfluoreszenzmarkierung. A, B, C, Übersichten; D, E, F, Details. A, D, UTF1-Markierung; B, F, DNA-Färbung mit DRAQ5; C, G, Überlagerung. Die Pfeile markieren eine schwach UTF1-positive B-Spermatogonie. Der Zelltyp ist erkennbar an der „Birnenform“. Die Zelle hält über einen „Stiel“ weiterhin Kontakt zur Basallamina (vgl. dazu auch morphologische Beschreibung von B-Spermatogonien in Kapitel 1.3, vorletzter Abschnitt).



### 3.2.1.3 SPOC1

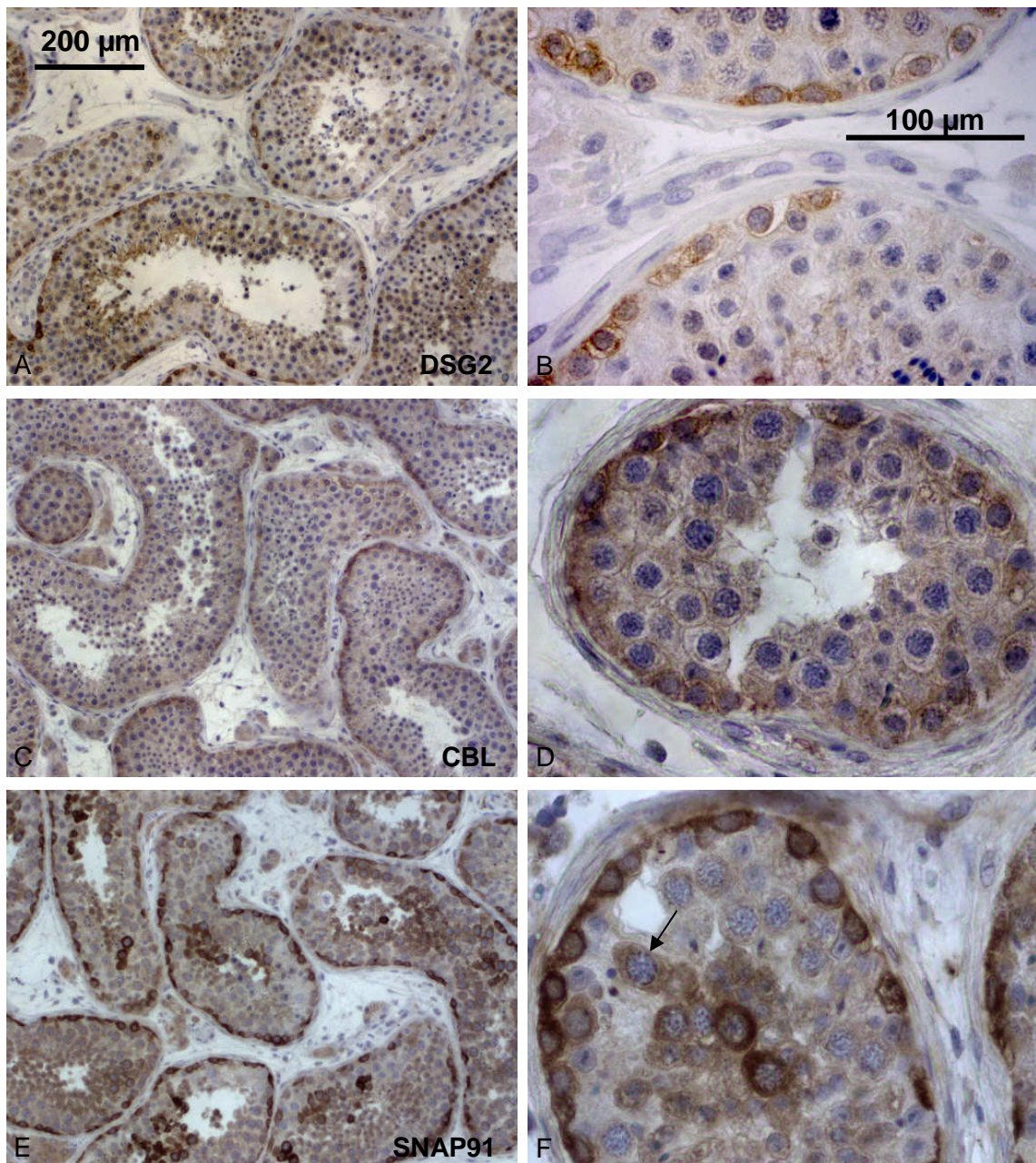
SPOC1 ist ein weiterer Chromatin-assoziiertes Marker. Obwohl aus den Mikroarray-Daten nicht ersichtlich (s. Tab. 3.01), wird SPOC1 im menschlichen Hoden spermatogonienspezifisch exprimiert. Dieser Marker wurde im Zellkern von A pale-Spermatogonien (Abb. 3.11 A, B, Pfeil), A dark-Spermatogonien (Abb. 3.11 C, D, unterer Pfeil) und in B-Spermatogonien; Abb. 3.11 C, D, obere Pfeile) detektiert.



**Abb. 3.11:** SPOC1-Immunhistochemie. Verwendet wurde ein monoklonaler Ratten-Antikörper (Hybridoma-Überstand). Kerngegenfärbung mit Mayers Hämalaun. A, C, Übersichten; B, D, Details. Die Pfeile markieren Spermatogonien des Typs A pale (A, B), B (C, D; oben) und A dark (C, D; unten).

### 3.2.1.4 Desmoglein 2 (DSG2), CBL, SNAP91

DSG2, CBL und SNAP91 werden im Cytoplasma und / oder auf der Zellmembran von Spermatogonien exprimiert (braune Markierung, Abb. 3.12). SNAP91 kommt zusätzlich im Cytoplasma von primären Spermatozyten vor (Pfeil in 3.12 F).



**Abb. 3.12:** Immunhistochemie gegen Epitope der Proteine DSG2, CBL bzw. SNAP91. Verwendet wurden polyklonale Kaninchen-Antikörper (DSG2, SNAP91) und ein monoklonaler Maus-Antikörper (CBL). Kernegegenfärbung mit Mayers Hämalaun. A, C, E, Übersicht; B, D, F, stärkere Vergrößerung.

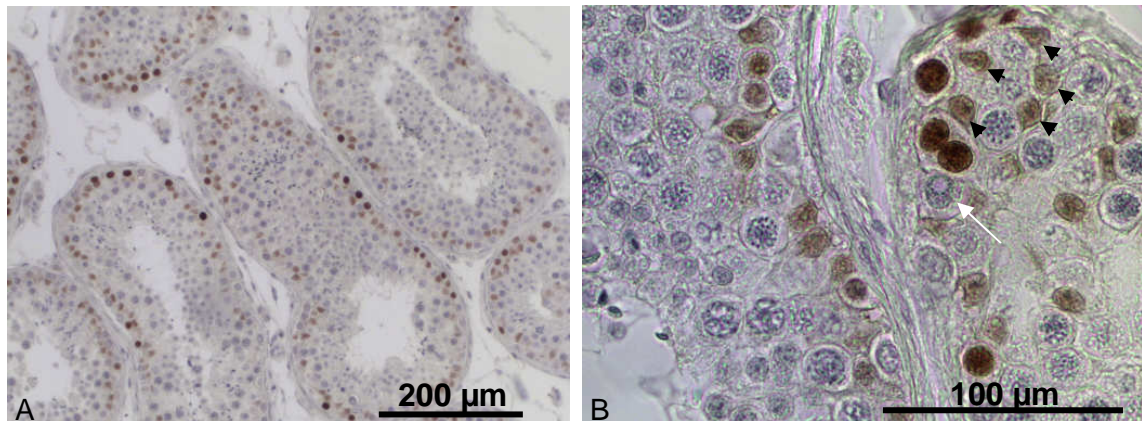
### **3.2.2 Immunhistochemie und Immunfluoreszenz weiterer spermatogonien-spezifischer Marker**

Zu einer näheren Charakterisierung und Unterscheidung der Spermatogonien wurden weitere immunhisto- und immunfluoreszenzchemische Experimente mit den Markern DMRT1, EXOSC10, KI-67, KIT und RBM3 durchgeführt (s. Abschnitte 3.2.2.1 bis 3.2.2.5).

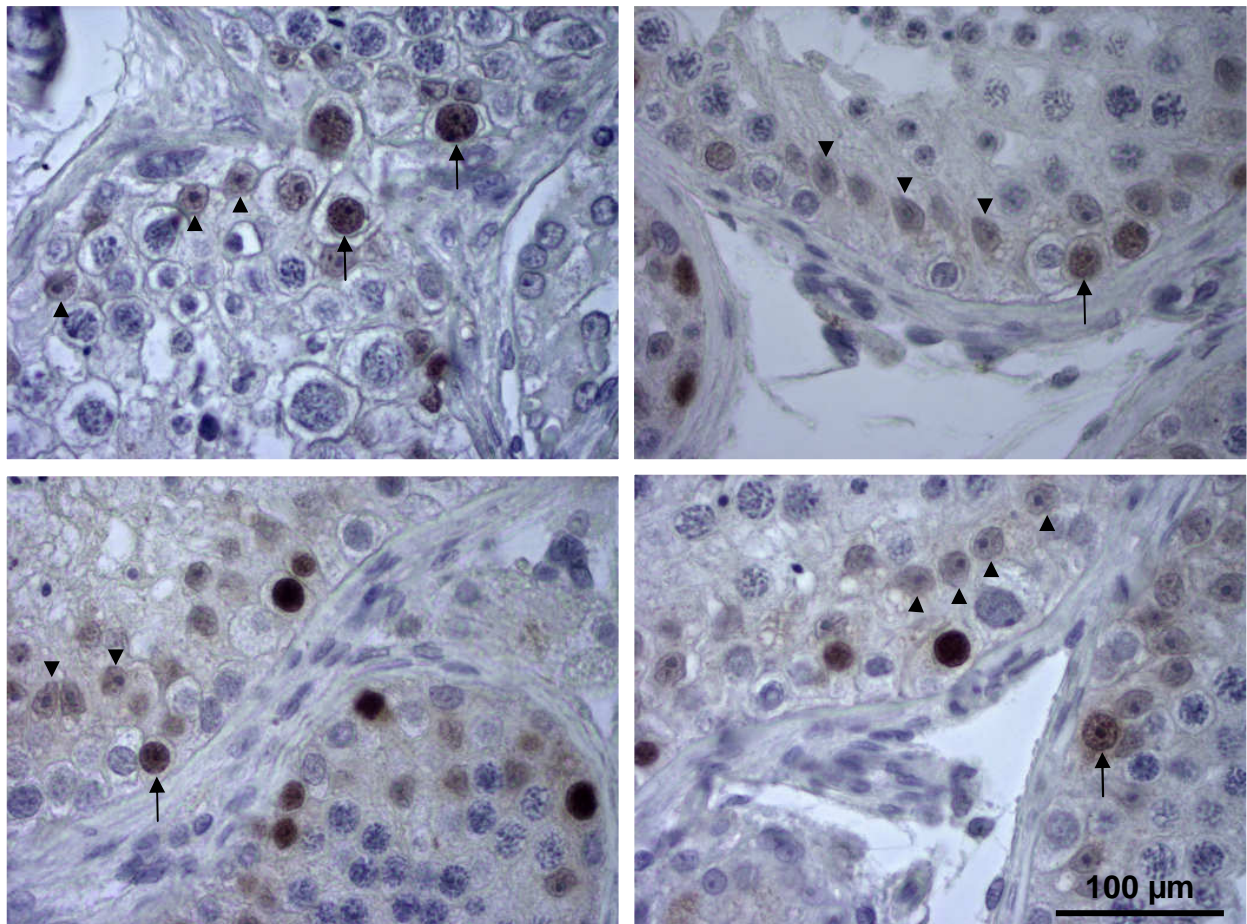
#### **3.2.2.1 DMRT1**

Das Protein DMRT1 wurde im Zellkern einer Subpopulation von Spermatogonien detektiert (s. dunkelbraune Markierung in Abb. 3.13 A, B). Zusätzlich wurden Sertolizellkerne (schwächer) angefärbt (Pfeilspitzen in Abb. 3.13 B und Abb. 3.14). Die Expression in Sertolizellen erklärt, warum DMRT1 in der Mikroarray-Analyse nicht als spermatogonien-spezifisch exprimiert detektiert werden konnte. Der geringere Anteil der DMRT1-positiven Spermatogonien verschwindet neben der häufigeren Expression in den Sertolizellkernen. Deshalb wurde im Mikroarray für DMRT1 ein somatisches Expressionsprofil angezeigt. DMRT1 wurde in verschiedenen Spermatogonientypen detektiert. Die Expression des Proteins in B-Spermatogonien wurde mittels Immunhistochemie-Experimenten und einer Kerngegenfärbung mit Mayers Hämalaun-Lösung zur Darstellung der bei diesem Zelltyp zentral im Zellkern lokalisierten Nukleoli nachgewiesen (s. Pfeile in Abb. 3.14).

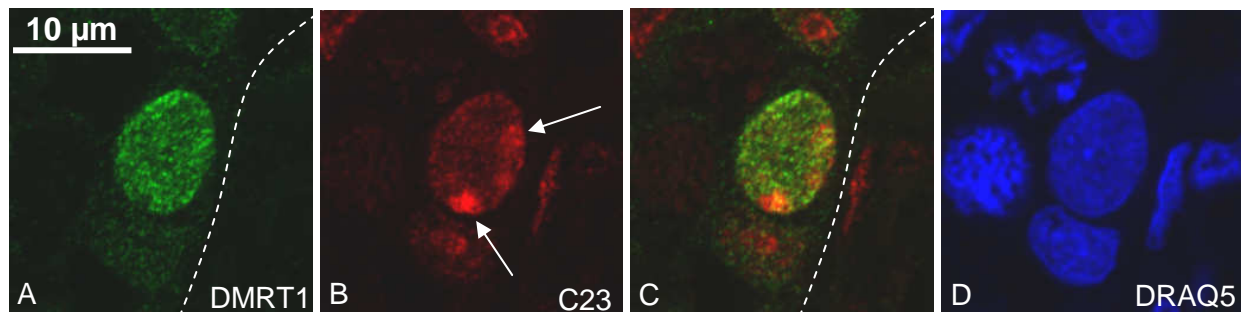
Mittels Immunfluoreszenz und Doppelmarkierung mit dem Nukleolusmarker C23 konnte bewiesen werden, dass DMRT1 auch in A pale-Spermatogonien (peripher im Kern gelegene Nukleoli, keine „Vakuole“) vorkommt (s. Abb. 3.15). Außerdem wurde durch eine DMRT1-Immunfluoreszenzmarkierung, kombiniert mit einer Kernfärbung mit Mayers Hämalaun zur Detektion in der Lichtmikroskopie, die DMRT1-Expression sowohl in A pale-Spermatogonien als auch in B-Spermatogonien nachgewiesen (nicht abgebildet). DMRT1 wurde zusätzlich in sich in der Mitose befindlichen Spermatogonien detektiert (s. Abb. 3.16). Das Protein liegt hierbei nicht den Chromosomen auf, sondern verteilt über das gesamte Cytoplasma vor (Abb. 3.16 C). In A dark-Spermatogonien wurde DMRT1 dagegen nicht detektiert (weißer Pfeil in Abb. 3.13).



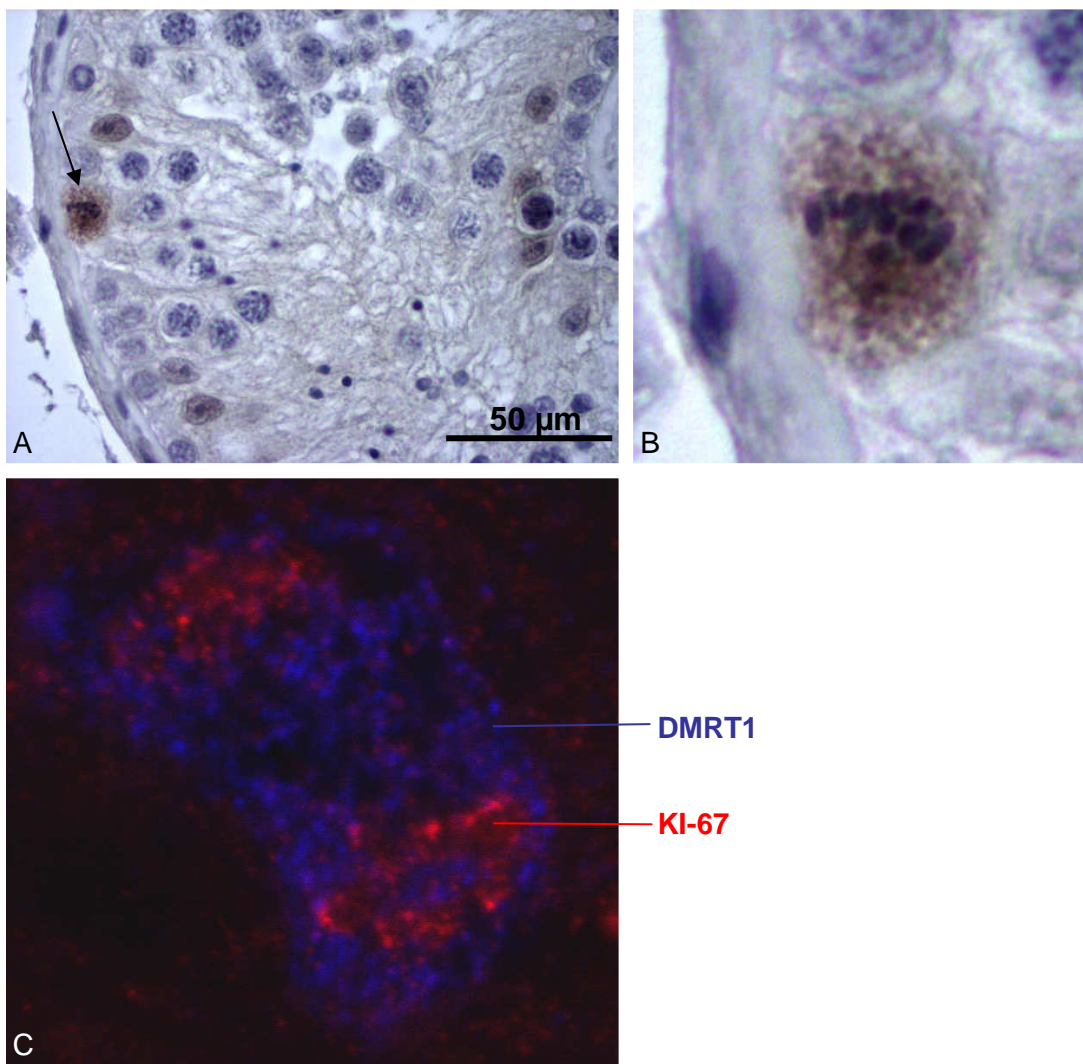
**Abb. 3.13:** DMRT1-Immunhistochemie. Verwendet wurde ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper. Kerngegenfärbung mit Mayers Hämalaun. A, Übersicht; B, stärkere Vergrößerung. DMRT1-Expression in Spermatogonien (dunkelbraun) und Sertolizellkernen (hellbraun, Pfeilspitzen). DMRT1 wurde nicht in A dark-Spermatogonien detektiert (weißer Pfeil).



**Abb. 3.14:** Immunhistochemischer Nachweis der DMRT1-Expression in B-Spermatogonien. DMRT1-positive B-Spermatogonienkerne (braun) sind mit Pfeilen, die schwächer DMRT1-positiven Sertolizellkerne sind mit Pfeilspitzen markiert. Alle DMRT1-negativen Zellkerne erscheinen aufgrund der Kerngegenfärbung mit Mayers Hämalaun blau.



**Abb. 3.15:** Nachweis der DMRT1-Expression in A pale-Spermatogonien mittels Immunfluoreszenz. A, DMRT1-Markierung (grün); B, Nukleolusmarkierung mit C23 (rot, Pfeile); C, Überlagerung von DMRT1 und C23; D, DNA-Markierung mit DRAQ5 (blau). Die gestrichelte Linie demonstriert den Verlauf der Basallamina.



**Abb. 3.16:** DMRT1-Expression während der Mitose. A, B, Metaphase dargestellt mittels Immunhistochemie und Mayers Hämalaun-Färbung; C, Anaphase dargestellt mittels Immunfluoreszenz. KI-67 markiert als „Coating“-Protein die Chromosomen.

Mittels Immunhistochemie und Kerngegenfärbung mit Mayers Hämalaun-Lösung, bei der die Nukleoli der Zellen innerhalb der Zellkerne angefärbt werden, konnte die DMRT1-Expression in

B-Spermatogonien nachgewiesen werden. Ein eindeutiger Nachweis von DMRT1 in A pale-Spermatogonien wurde mit dieser Methode jedoch nicht erbracht. Ursächlich dafür könnte sein, dass eine zu starke DMRT1-Expression in diesen Zellen die gleichzeitige Detektion der mit Mayers Hämalaun angefärbten Nukleoli unmöglich macht, da diese eventuell durch eine zu starke Braunfärbung der Peroxidasereaktion verdeckt sein könnten.

Mit der Immunfluoreszenzchemie konnte die DMRT1-Expression fast ausschließlich in A pale-Spermatogonien und kaum bzw. nicht in B-Spermatogonien bewiesen werden. Dies könnte damit zusammenhängen, dass der Nukleolusmarker C23 nur in Nukleoli von A-Spermatogonien und nicht in Nukleoli der B-Spermatogonien exprimiert wird. Ein solches Expressionsverhalten von C23 ist bislang aber noch nicht bekannt.

#### 3.2.2.2 EXOSC10

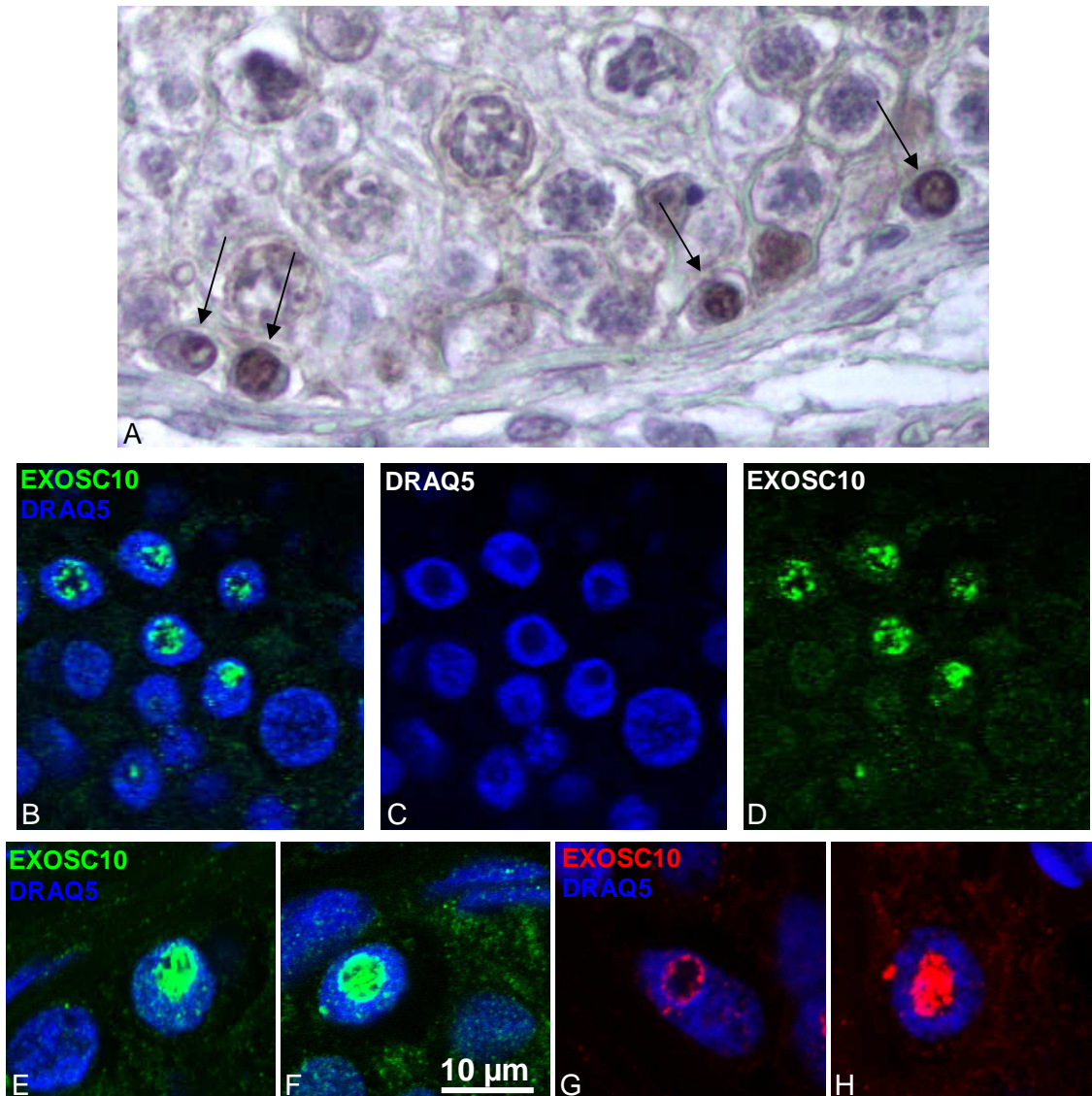
Wie DMRT1 wurde EXOSC10 in der Mikroarray-Analyse nicht als spermatogonien-spezifischer Marker detektiert. Grund hierfür ist wahrscheinlich seine Regulation auf posttranslationalem Level, die aus der Literatur bekannt ist (s. dazu Abschnitt 1.10.9). Die EXOSC10-Transkriptmenge verändert sich dagegen nicht.

Die mit dem EXOSC10-Antikörper am auffälligsten angefärbten Strukturen in den *Tubuli seminiferi* des humanen Hodens waren die „Vakuolen“ der A dark-Spermatogonien (s. Abb. 3.17). EXOSC10 kommt jedoch auch in den Zellkernen anderer Spermatogonientypen vor. Neben beinahe allen gefärbten A dark-Spermatogonien wurden sowohl markierte als auch unmarkierte A pale- und B-Spermatogonien detektiert (Abb. 3.18). Die Abbildung 3.19 zeigt die verschiedenen in Spermatogonien-Zellkernen detektierten EXOSC10-Muster. Neben der Lokalisation in der A dark-„Vakuole“ (Abb. 3.19 A, B) wurde das Protein auch in „Löchern“<sup>3</sup> zwischen verdichtetem Chromatin (Abb. 3.19 C, D) oder aber diffus verteilt in Zellkernen mit insgesamt aufgelockertem Chromatin (Abb. 3.19 E, F) beobachtet. In vielen Spermatogonien wurde EXOSC10 in den Nukleoli detektiert. Abbildung 3.20 zeigt die Koexpression von EXOSC10 mit dem Nukleolusmarker C23. Selten jedoch wurde EXOSC10 in den Nukleoli proliferierender Spermatogonien detektiert. Die Abbildung 3.21 zeigt einen dieser seltenen Fälle. Außerdem waren ge-

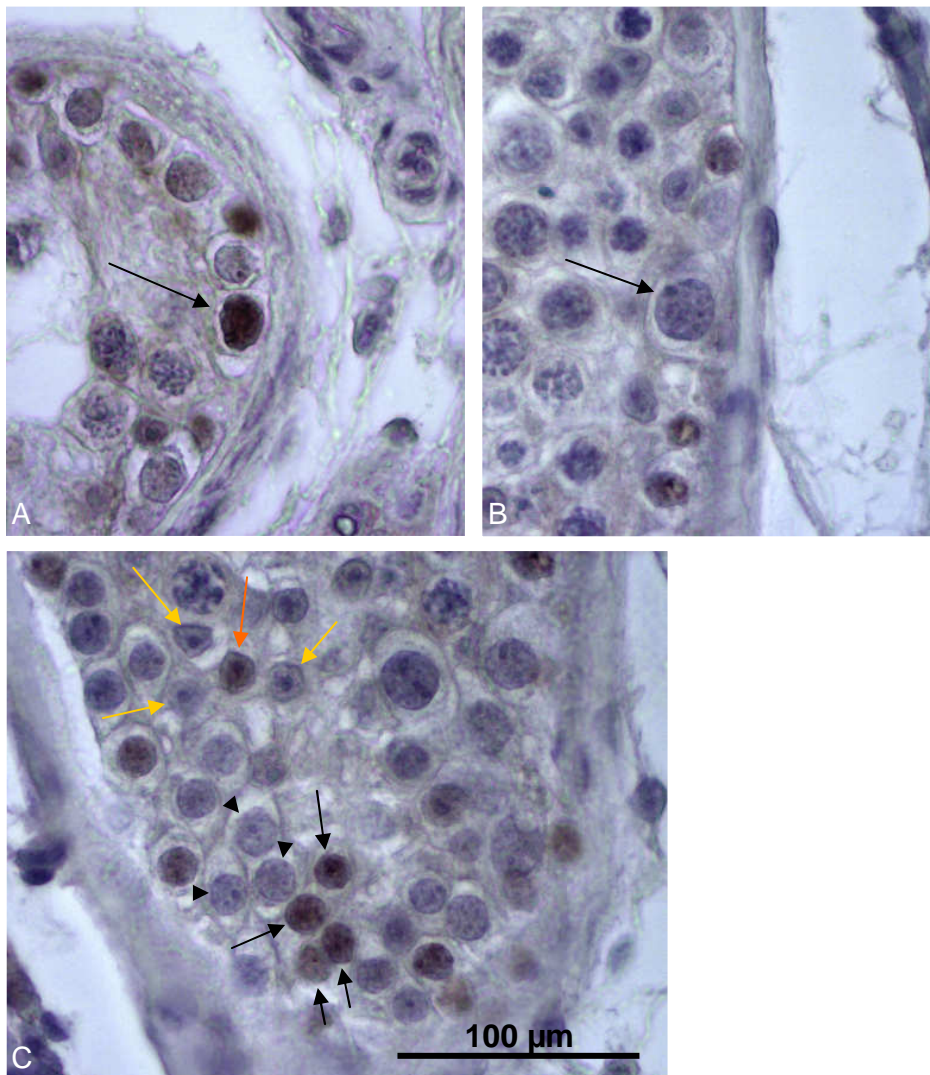
---

<sup>3</sup> Die mit dem DNA-Farbstoff DRAQ5 in den Spermatogonien-Zellkernen detektierten „Löcher“ könnten auch mit DRAQ5 nicht angefärbte Nukleoli darstellen. Bei DRAQ5 handelt es sich um einen DNA-Interkalator, der durch Histon-Interaktion einen verändernden Einfluss auf die Chromatinstruktur nehmen kann und nach Akkumulation von Histonen im Nukleolus diese anfärbt bzw. anderenfalls nicht anfärbt. Solche Verhaltensweisen wurden bei lebenden HeLa-Zellen abhängig von Färbezeit und verwendeter Konzentration beobachtet (Wojcik & Dobrucki, 2008).

legentlich einige schwach markierte Sertolizellkerne zu finden (orangefarbener Pfeil in Abb. 3.18 C). Es ist nicht auszuschließen, dass es sich dabei um eine unspezifische Färbung handelt.

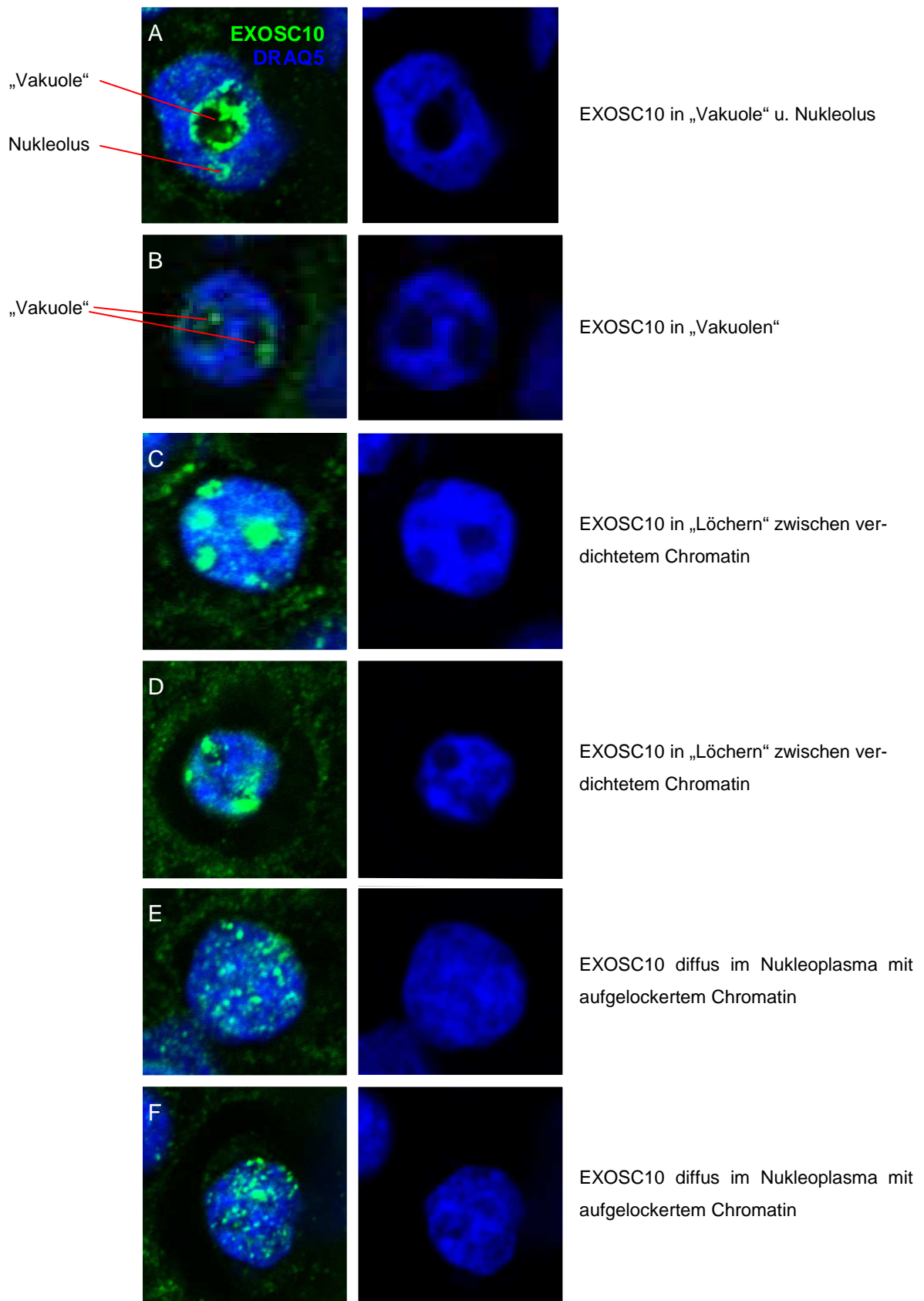


**Abb. 3.17:** EXOSC10 in der „Vakuole“ von A dark-Spermato gonien. A, Immunhistochemie und Kerngegenfärbung mit Mayers Hämalaun; B, E bis H, EXOSC10-Immunfluoreszenz und DNA-Färbung mit DRAQ5; C, DNA-Färbung mit DRAQ5; EXOSC10-Immunfluoreszenz.

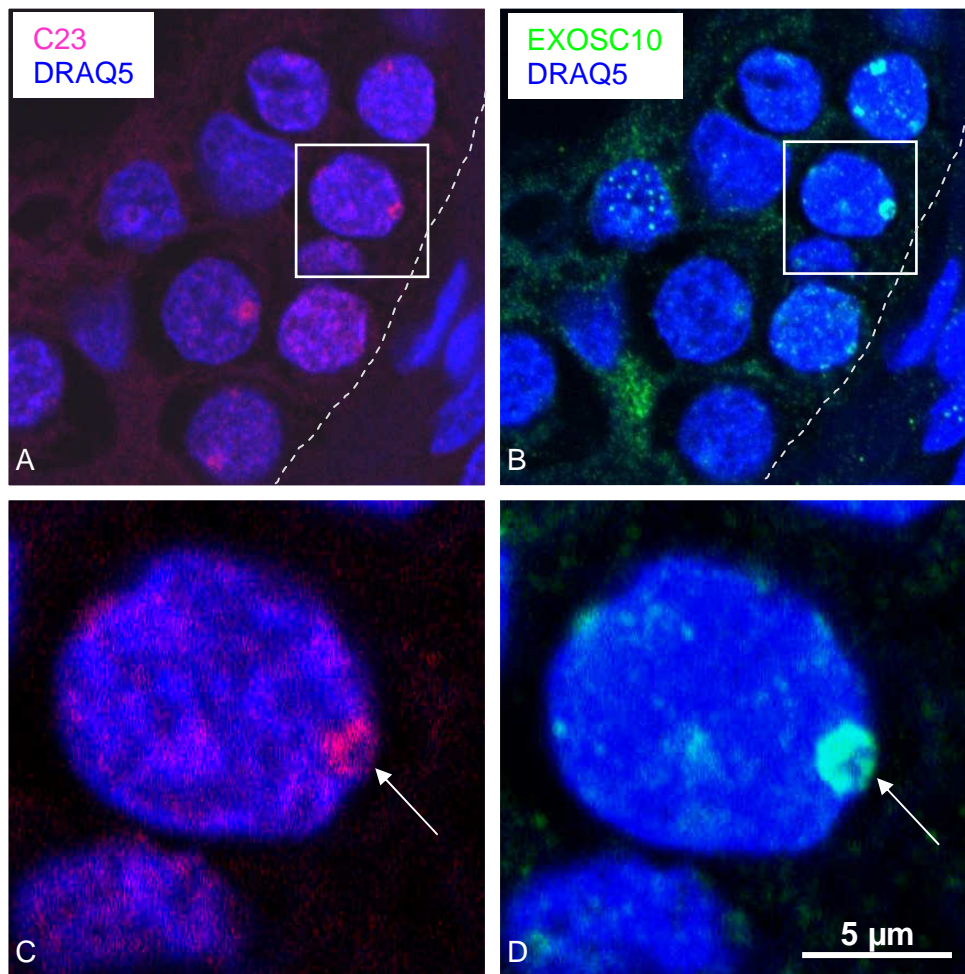


**Abb. 3.18:** EXOSC10-Expression in A pale- und B-Spermatogonien sowie Sertolizellkernen. Immunhistochemie und Kerngegenfärbung mit Mayers Hämalan. A, EXOSC10-positive A pale-Spermatogonie (Pfeil); B, EXOSC10-negative A pale-Spermatogonie (Pfeil); C, EXOSC10-positive (Pfeile schwarz) und EXOSC10-negative (Pfeilspitzen schwarz) B-Spermatogonien; EXOSC10-positiver Sertolizellkern (Pfeil orange) und EXOSC10-negative Sertolizellkerne (Pfeile gelb).

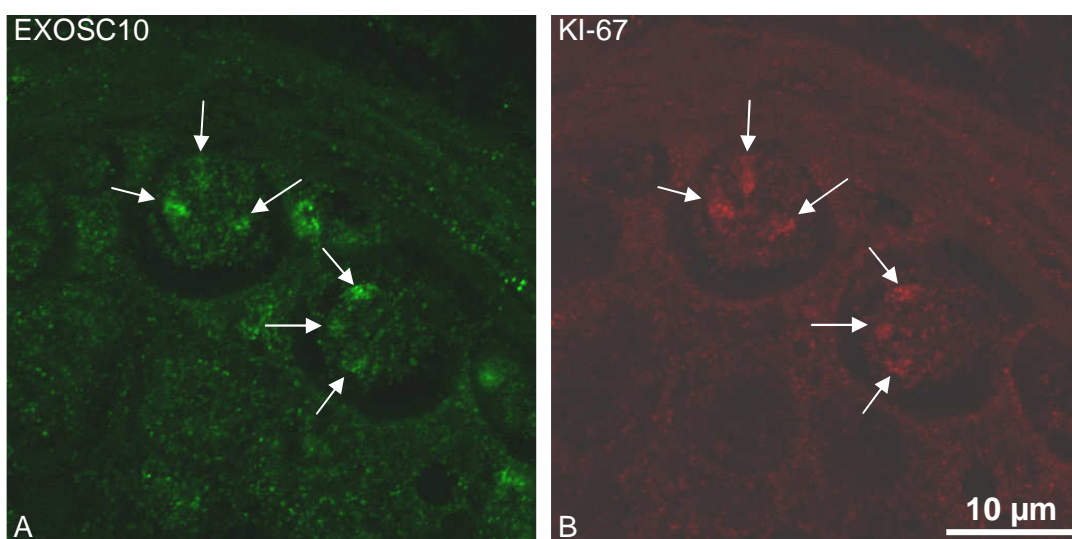




**Abb. 3.19:** Verschiedene EXOSC10-Expressionsmuster in Spermato gonien-Zellkernen. Immunfluoreszenz, DNA-Färbung mit DRAQ5. Zur Beschreibung s. Seite 73.



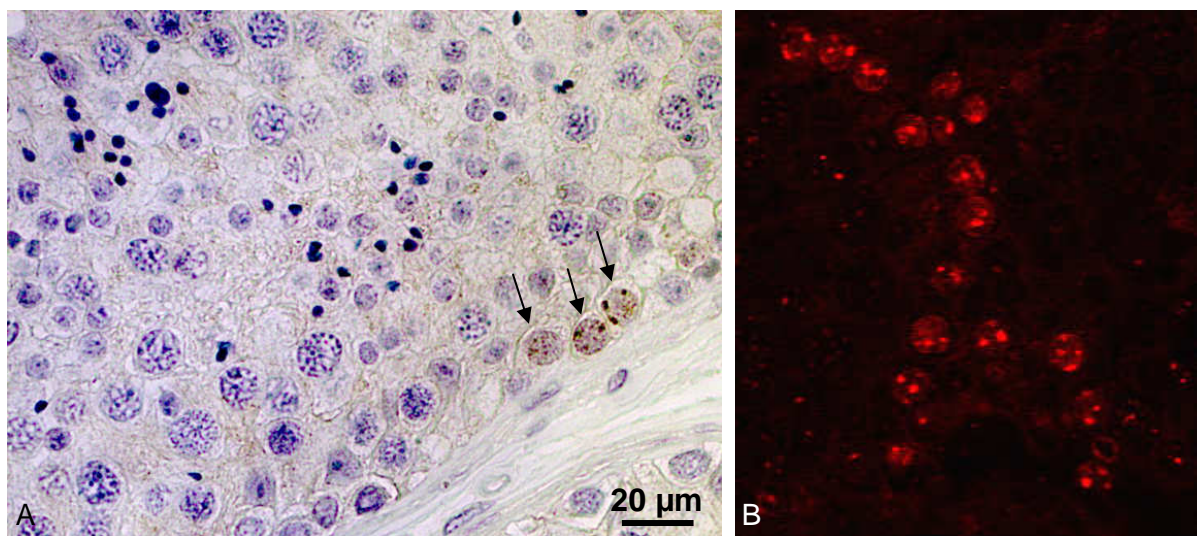
**Abb. 3.20:** Kolokalisation von EXOSC10 mit Nukleolusmarker C23 in Nukleoli von Spermato gonien. DNA-Färbung mit DRAQ5. A, B, Übersicht; C, D, Detail aus A bzw. B (Quadrat). A, C23; B, EXOSC10. Die Pfeile markieren einen sowohl mit EXOSC10 als auch mit C23 angefärbten Nukleolus. In den oberen Bildern ist der Verlauf der Basallamina gestrichelt eingezeichnet.



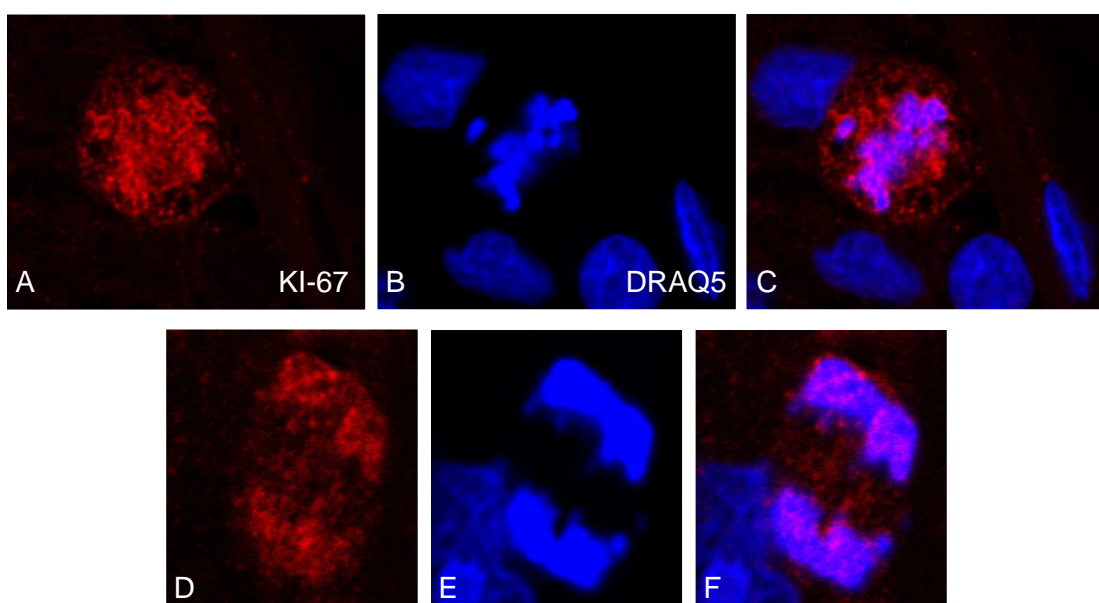
**Abb. 3.21:** Kolokalisation von EXOSC10 mit Proliferationsmarker KI-67. A, EXOSC10; B, KI-67. Die Pfeile markieren Nukleoli mit EXOSC10-/KI-67-Koexpression. Hierbei handelt es sich um ein selten beobachtetes Expressionsmuster.

### 3.2.2.3 Der Proliferationsmarker KI-67

Der Proliferationsmarker KI-67, der spezifisch im Zellkern von proliferierenden Zellen exprimiert wird, markiert im Hoden proliferierende Spermatogonien (Abb. 3.22). Er wurde in dieser Arbeit zur Bestimmung des zellulären Subtyps von Spermatogonien eingesetzt. Abbildung 3.22 B zeigt ein typisches KI-67-Expressionsmuster spermatogoniale Zellen mit angefärbten Nukleoli und Heterochromatinklumpen, angelagert an das Kernkörperchen oder die Kernmembran. Die Abbildung 3.23 illustriert die KI-67-Markierung der Chromosomenoberfläche während der Mitose.

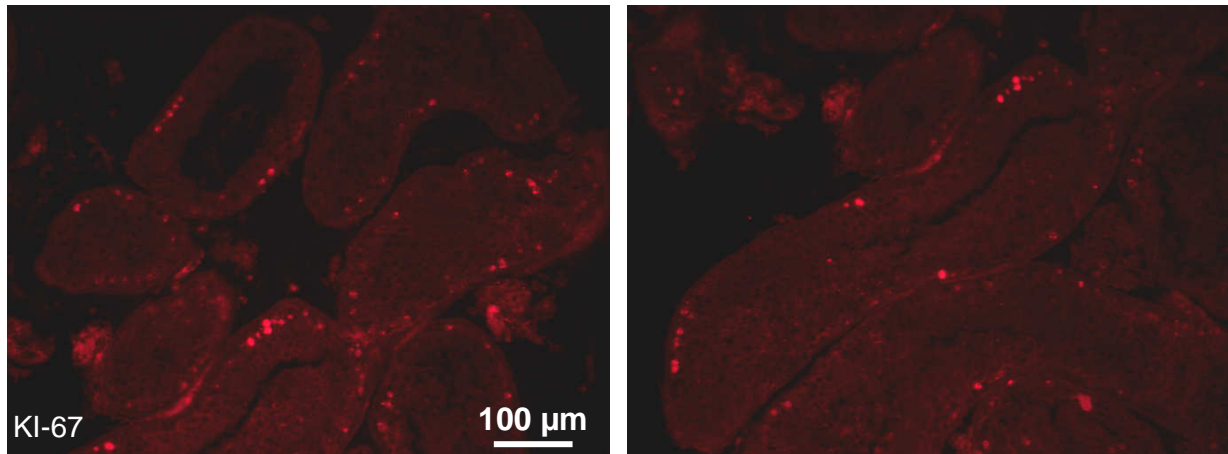


**Abb. 3.22:** KI-67-Markierung proliferierender Spermatogonien. Verwendet wurde ein monoklonaler Maus-Antikörper. Kerngegenfärbung mit Mayer's Hämalaun. A, Immunhistochemie (Pfeile, Zellkerne proliferierender Spermatogonien); B, Immunfluoreszenz (KI-67 färbt die Nukleoli und das Heterochromatin in Zellkernen proliferierender Spermatogonien).



**Abb. 3.23:** KI-67-Expression in Spermatogonien während der Mitose. A, D, KI-67; B, E, DRAQ5; C, F, Überlagerung. Metaphase (A, B, C) und Anaphase (D, E, F).

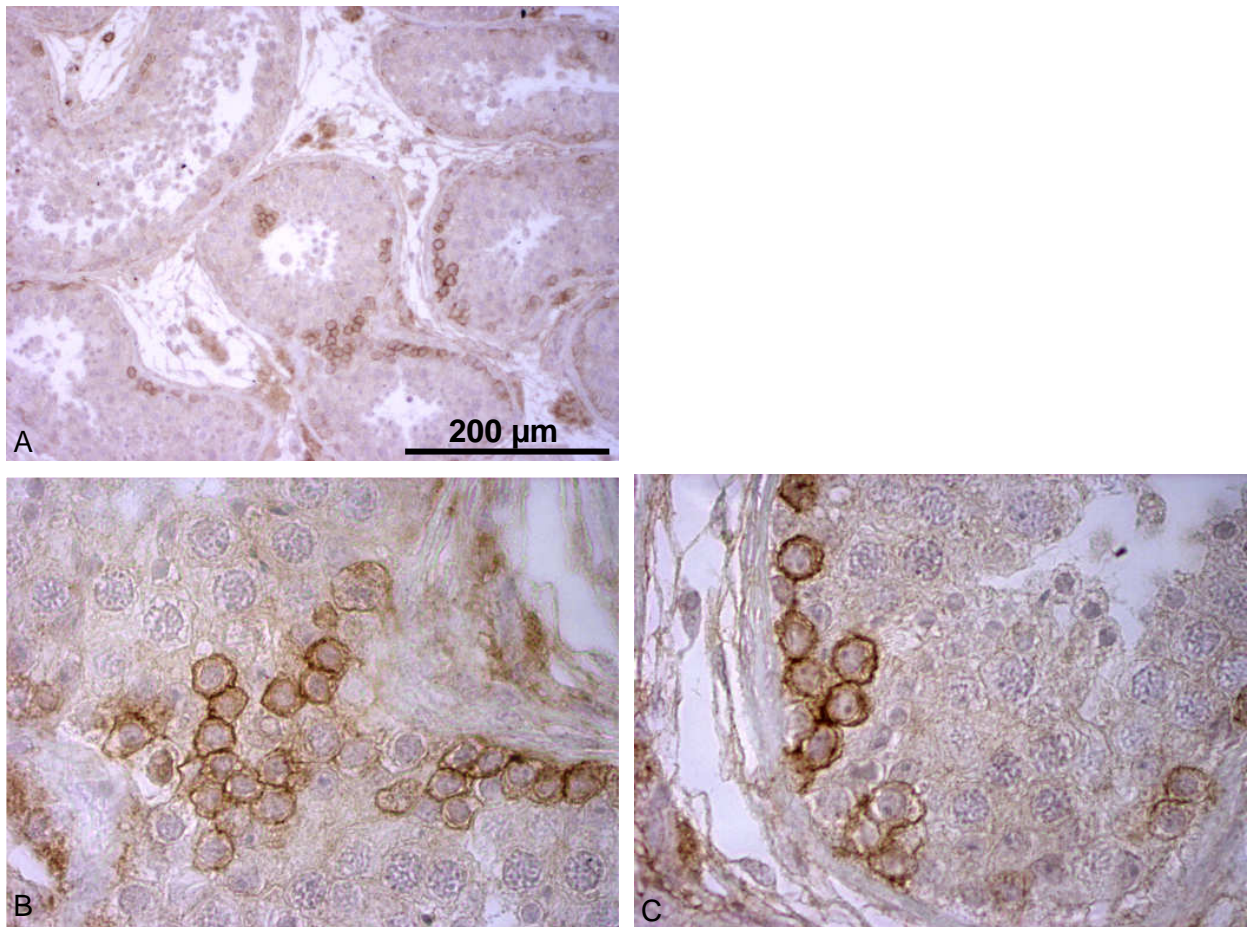
Die Anzahl der KI-67-positiven Zellen variierte von Tubulus zu Tubulus. Neben solchen *Tubuli seminiferi*, die zahlreiche KI-67-positive Zellen enthielten, gab es Tubuli, bei denen nur wenige bis keine Zellen markiert waren. Das Ergebnis eines Immunfluoreszenzchemie-Experimentes mit anschließender Auswertung am Fluoreszenzmikroskop (s. Abbildung 3.24) veranschaulicht die unterschiedlichen Häufigkeiten KI-67-positiver Zellen in verschiedenen Bereichen eines histologischen Schnittpräparates.



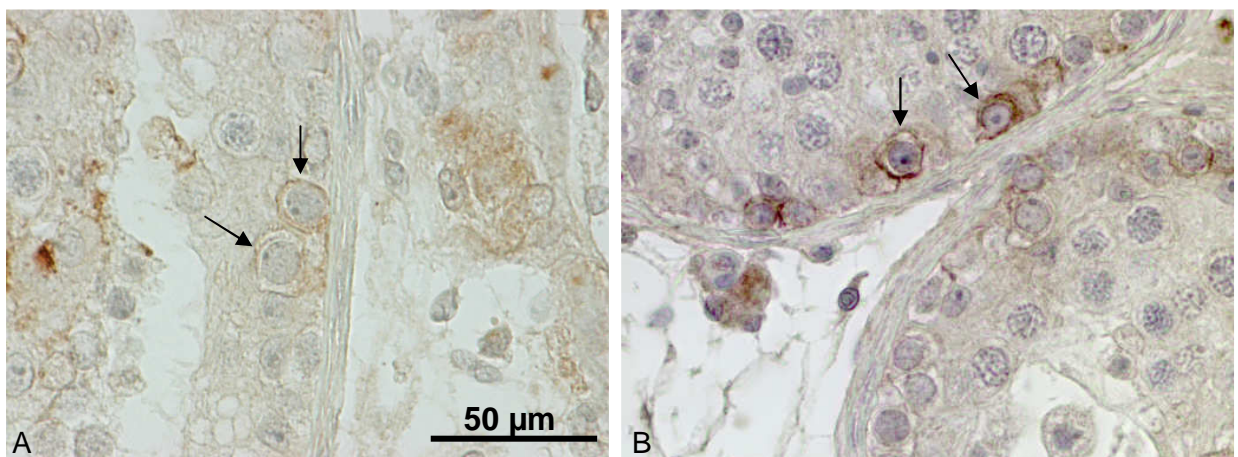
**Abb. 3.24:** KI-67-Immunfluoreszenz-Markierung dargestellt mit Fluoreszenzmikroskopie. Rot leuchtende, KI-67-positive Zellkerne repräsentieren die unterschiedlichen Häufigkeiten proliferierender Spermatogonien in einem histologischen Hoden-Schnittpräparat.

### 3.2.2.4 KIT

Der aus der Literatur als Differenzierungsmarker von Stammzellen bekannte Oberflächenmarker KIT (van Dijk et al., 2000) wurde benutzt, um differenzierende Spermatogonien darzustellen. Dabei zeigte sich, dass die KIT-positive spermatogoniale Subpopulation seltener aus Einzelzellen besteht, sondern überwiegend aus Zellen in kleineren Gruppen (Paare oder Vierergruppen) sowie aus Zellen, die in größeren Gruppen zusammenliegen. Bei der letztgenannten Möglichkeit erschien die Markierung im histologischen Schnittpräparat wabenförmig (s. Abb. 3.25). Die KIT-positiven Zellen konnten den Spermatogonientypen A pale (Abb. 3.26 A) und B (Abb. 3.26 B) zugeordnet werden. A dark-Spermatogonien waren stets KIT-negativ.

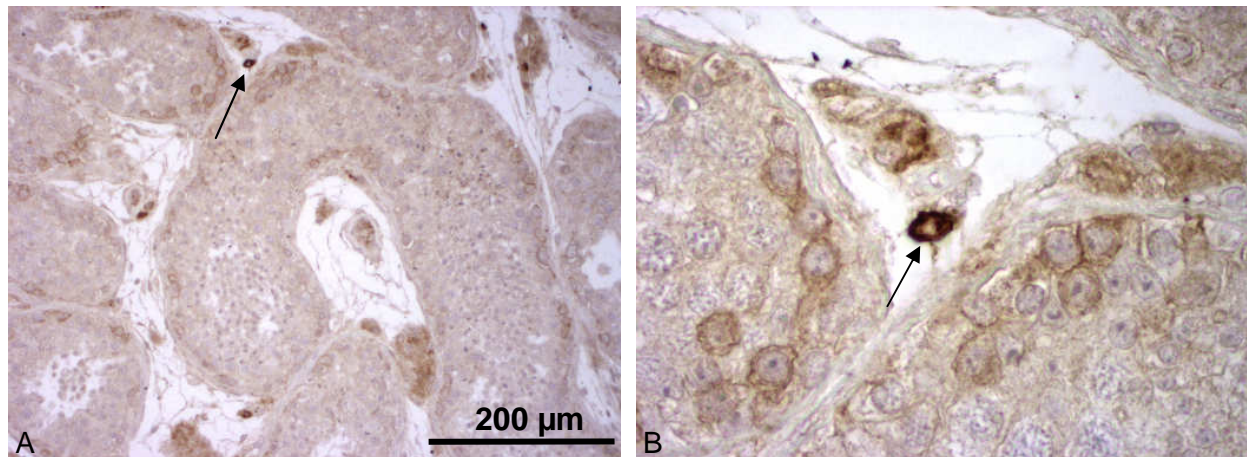


**Abb. 3.25:** KIT-Expression in Spermato gonien mittels Immunhistochemie. Verwendet wurde ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper. Kerngegenfärbung mit Mayers Hämalan. A, Übersicht; B, C, Details. Die starke Proteinexpression auf der Oberfläche gruppierter Spermato gonien lässt die Markierung wabenförmig erscheinen.



**Abb. 3.26:** Immunhistochemie gegen ein Epitop des Proteins KIT und KIT-Expression in verschiedenen Spermato gonientypen. Kerngegenfärbung mit Mayers Hämalan. A, KIT Expression in A pale-Spermato gonien (Pfeile); B, KIT-Expression in B-Spermato gonien (Pfeile).

Die KIT-Expression in Mastzellen (Abb. 3.27) spricht für die Spezifität des verwendeten Antikörpers. KIT wird in Mastzellen stärker exprimiert als in Spermatogonien. Die Expression des Proteins in interstitiellen Zellen der humanen Testis, vor allem die starke Expression in Mastzellen, erklärt, warum KIT in der Mikroarray-Analyse ebenfalls nicht als spermatogonien-spezifischer Marker detektiert wurde.

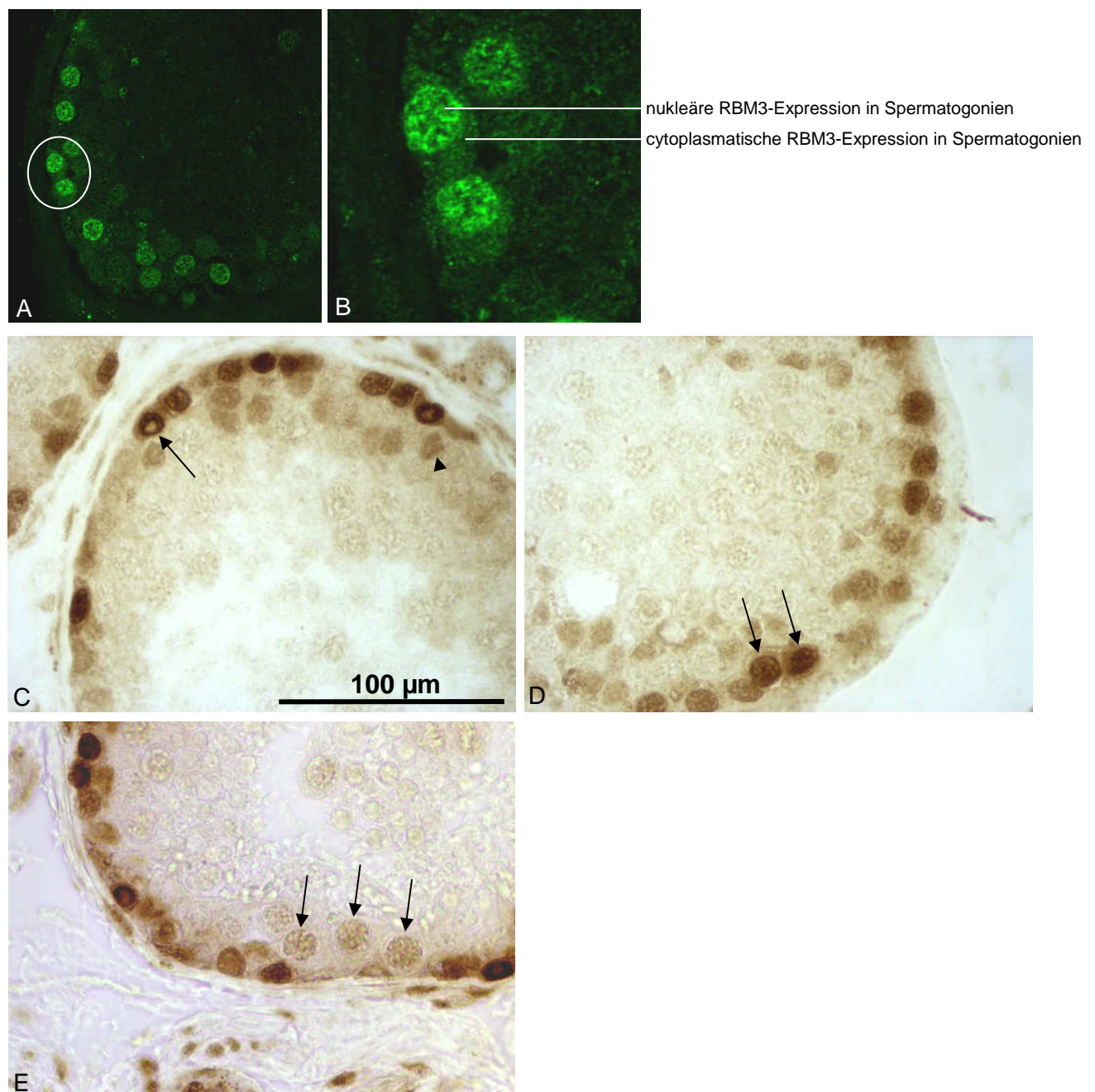


**Abb. 3.27:** KIT-Expression in Mastzellen. Immunhistochemie und Kerngegenfärbung mit Mayers Hämalaun. A, Übersicht; B, Detail. Die Pfeile markieren eine Mastzelle mit starker KIT-Expression.

### 3.2.2.5 RBM3

Das RBM3-Protein konnte durch die Mikroarray-Analyse gleichfalls nicht als spermatogonien-spezifisch detektiert werden. Grund hierfür könnten unspezifische Oligonukleotide sein. Da das Protein jedoch im Humanen Proteinatlas ([9]; Uhlén et al., 2005) als spermatogonien-spezifisch annotiert wird, wurde es dennoch in die Analyse auf Proteinebene einbezogen.

Der RBM3-Antikörper markierte in Spermatogonien zusätzlich zum Chromatin des Zellkerns meist auch das Cytoplasma, wobei die cytoplasmatische Expression oft schwächer als die Kernexpression war (s. Abb. 3.28 A, B). RBM3 wurde sowohl in Spermatogonien mit einer „Vakuole“ (A dark-Spermatogonien) als auch in Spermatogonien ohne nukleäre „Vakuole“ beobachtet (A pale- bzw. B-Spermatogonien; Pfeile in Abb. 3.28 C bzw. D). Außerdem wird das Protein schwach in einigen Zellkernen von Spermatozyten (Pfeile in Abb. 3.28 E) und einigen Sertolizellkernen exprimiert (Pfeilspitze in Abb. 3.28 C).

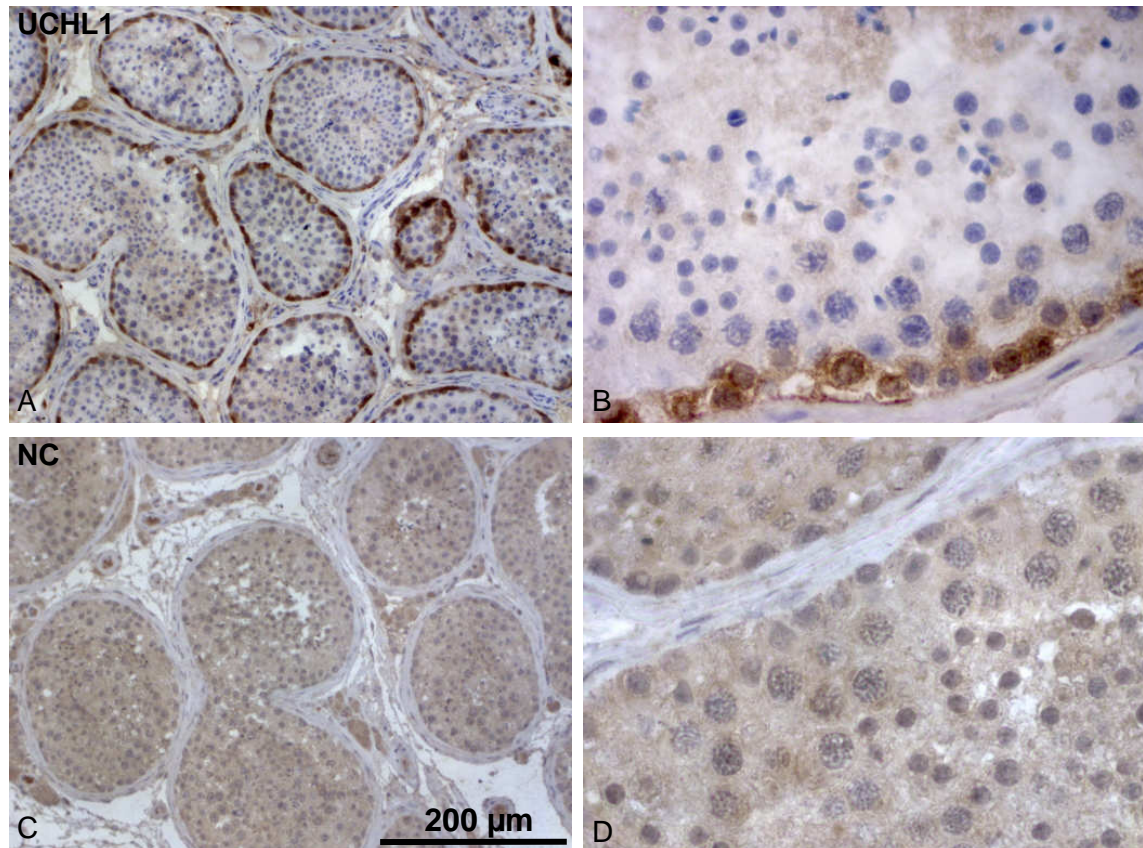


**Abb. 3.28:** RBM3-Expression im männlichen Keimepithel. Verwendet wurde ein monoklonaler Maus-Antikörper. A, B, Immunfluoreszenz; C, D, E, Immunhistochemie. A, B, Stärkere RBM3-Expression im Zellkern und schwächere RBM3-Expression im Cytoplasma von Spermato gonien; RBM3-Expression in A dark-Spermato gonien (Pfeil in C), in Sertolizellkernen (Pfeilspitze in C), in Spermato gonien ohne nukleäre „Vakuole“ (Pfeile in D) sowie in Spermatozyten-Zellkernen (Pfeile in E).

### 3.2.2.6 Kontrollen

Als Positivkontrolle fungierte in den Immunhistochemie- und den Immunfluoreszenz-Experimenten ein polyklonaler Antikörper gegen UCHL1 (Abb. 3.29 A, B). Dieses Protein wird im humanen Hoden in Spermato gonien (vorwiegend cytoplasmatisch) exprimiert. Zusätzlich kommt das Protein in diesem Gewebe in Leydigzellen und Nervenfasern vor.

Normales Kaninchenserum diente dementsprechend als Negativkontrolle. Erwartungsgemäß wurde keine spermatogonien-spezifische Färbung detektiert, wenn der primäre Antikörper durch das Normalserum ersetzt wurde (Abb. 3.29 C, D).

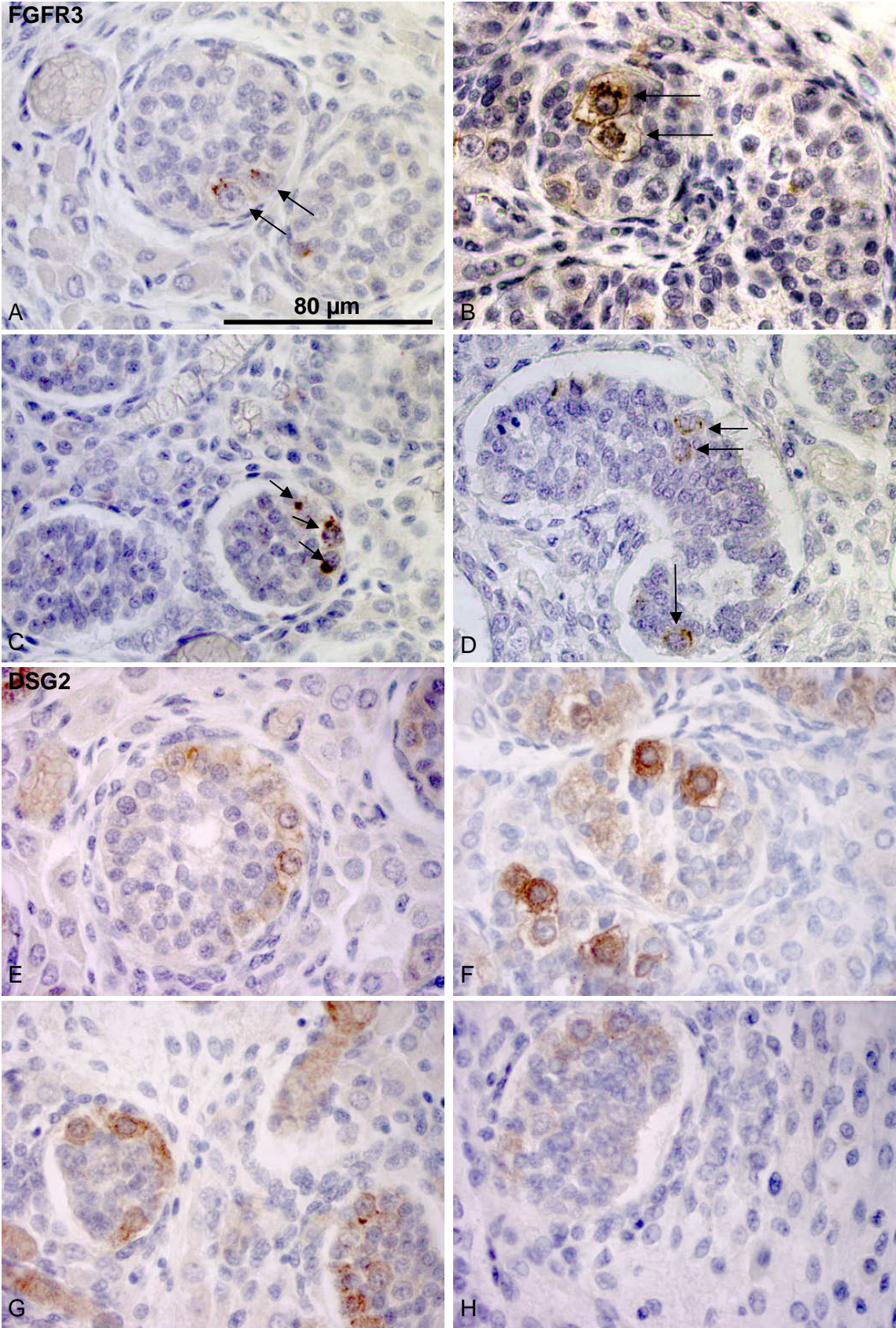


**Abb. 3.29:** Kontrollen für die Immunhistochemie und die Immunfluoreszenz. Darstellung mittels IHC. Verwendet wurde ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen ein Epitop des Proteins UCHL1 (= Positivkontrolle; A, B) bzw. *die negative control rabbit immunoglobulin fraction (solid-phase-absorbed, NC; C, D)* der Firma Dako. Kerngegenfärbung mit Mayers Hämalaun.

### 3.2.2.7 Expression ausgewählter Markerproteine in fetalem Hodengewebe

Um entwicklungsgeschichtliche Daten über die verwendeten spermatogonialen Zelloberflächenmarker FGFR3 und DSG2 zu erhalten, wurden diese zusätzlich an fetalen Hodengeweben verschiedenen Alters (19., 22., 24., 28. Schwangerschaftswoche) getestet. Hierbei ergab sich, dass die getesteten Marker bereits während der Fetalentwicklung in den Vorläuferzellen der Spermatogonien exprimiert werden (Abb. 3.30). Ein zeitlicher Verlauf der Expression konnte wegen in zu geringer Anzahl verfügbaren Fetalgewebes nicht ermittelt werden. Der Marker UCHL1, der als Positivkontrolle fungierte, wird ebenfalls bereits während der Fetalentwicklung exprimiert (nicht abgebildet).

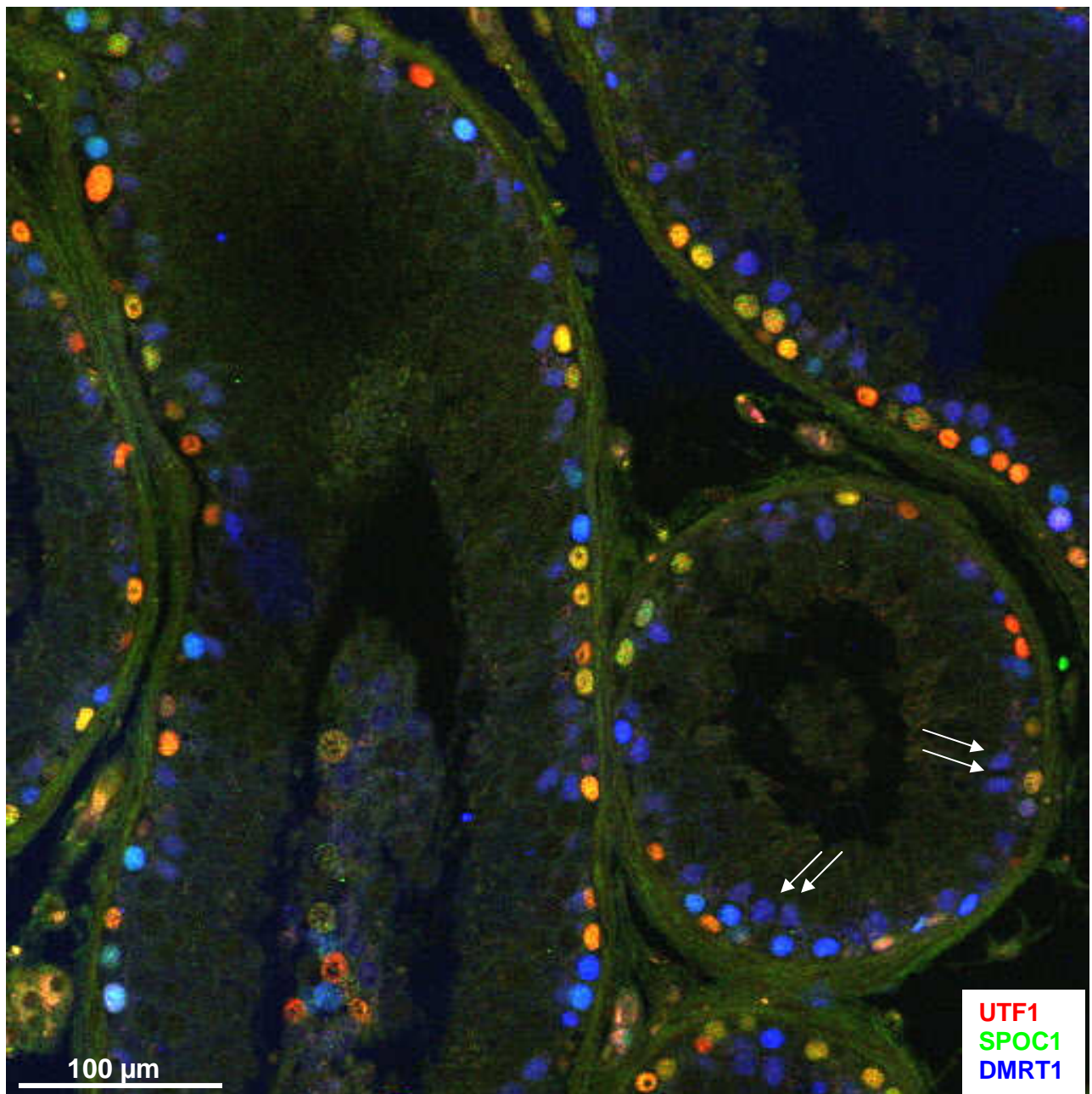




**Abb. 3.30:** Immunhistochemie an fetalem Hodengewebe. Kerngegenfärbung mit Mayers Hämalaun. A, B, C, D, FGFR3-positive fetale Keimzellen (Pfeile); E, F, G, H, DSG2-positive fetale Keimzellen (braun gefärbte Zellen). Jeweils 19., 22., 24., 28. Schwangerschaftswoche.

### 3.2.3 Die Heterogenität der adulten Spermatogonien bezüglich der UTF1-, SPOC1- und DMRT1-Expression

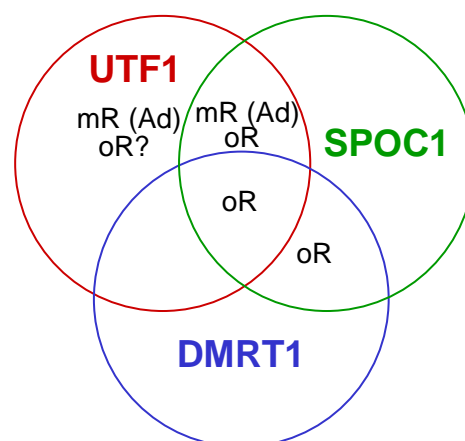
Zur genaueren Charakterisierung der Genexpression der Spermatogonien folgte eine Untersuchung zur Kolo-kalisation verschiedener Marker mit Hilfe der Immunfluoreszenzmarkierung. Zunächst wurden drei chromatinassoziierte Marker (UTF1, SPOC1, DMRT1) durch Triple-Immunfluoreszenz erfasst (Abb. 3.31).



**Abb. 3.31:** Ko-Immunfluoreszenzfärbung für die drei in Spermatogonienkernen exprimierte Proteine UTF1, SPOC1 und DMRT1 auf adultem Hodengewebe. UTF1 ist in Rot, SPOC1 in Grün und DMRT1 in Blau markiert. Die Sertolizellkerne erscheinen in mattem Blauton (Pfeile).

Hierbei ergab sich, dass die Kernexpression der Proteine UTF1, SPOC1 und DMRT1 innerhalb der Spermatogonienpopulation sehr heterogen ist. Die vielen unterschiedlichen Mischfarben (s. Abb. 3.31) repräsentieren die verschiedenen Kombinationen der Expressionsmuster der Spermatogonien bezogen auf die drei verwendeten Marker. Es besteht keine einfache Korrelation mit der klassischen A dark- und A pale-Morphologie. In den beiden Zelltypen findet sich ein Spektrum an Gelb- und Orange-Mischtönen. Dies zeigt die unterschiedlichen Abstufungen in den Expressionsstärken der Marker UTF1 (rot) und SPOC1 (grün) bei den Zellen ohne DMRT1-Expression. Die blaue Farbe des DMRT1-Markers überdeckt ein potentiell vorhandenes Rot sowie die Farbe Grün fast vollständig, so dass man in den DMRT1-positiven Zellen anhand eines Dreifach-Mischbildes nur schwer eine Aussage über die UTF1- bzw. SPOC1-Expression treffen kann. Dazu wurden stattdessen die Einzelkanal-Bilder zu Rate gezogen. DMRT1 färbt neben den Spermatogonien auch Sertolizellkerne an. Die DMRT1-Expression in Sertolizellen ist in der Literatur beschrieben (Lei et al. 2007; 2009). Wie aus Abb. 3.31 erkennbar, erscheinen die Sertolizellkerne in einem eher matten Blauton (Pfeile) im Gegensatz zu den leuchtend blauen Spermatogonien-Zellkernen.

Das Venn-Diagramm in Abbildung 3.32 beschreibt die verschiedenen innerhalb der Spermatogonienpopulation detektierten UTF1-/SPOC1-/DMRT1-Expressionsmuster (s. dazu auch Kapitel 3.2.4.1). Die Einteilung der Zelltypen erfolgte hier in spermatogoniale Zellen mit nukleärer Zone der Rarefaktion<sup>4</sup> („Vakuole“) entsprechend den A dark-Spermatogonien bzw. in spermatogoniale Zellen ohne nukleäre Rarefaktionszone. In der zweiten Kategorie wurden A pale- und B-Spermatogonien zusammengefasst, da sie ohne Nukleolusmarker nur schwer zu unterscheiden waren.



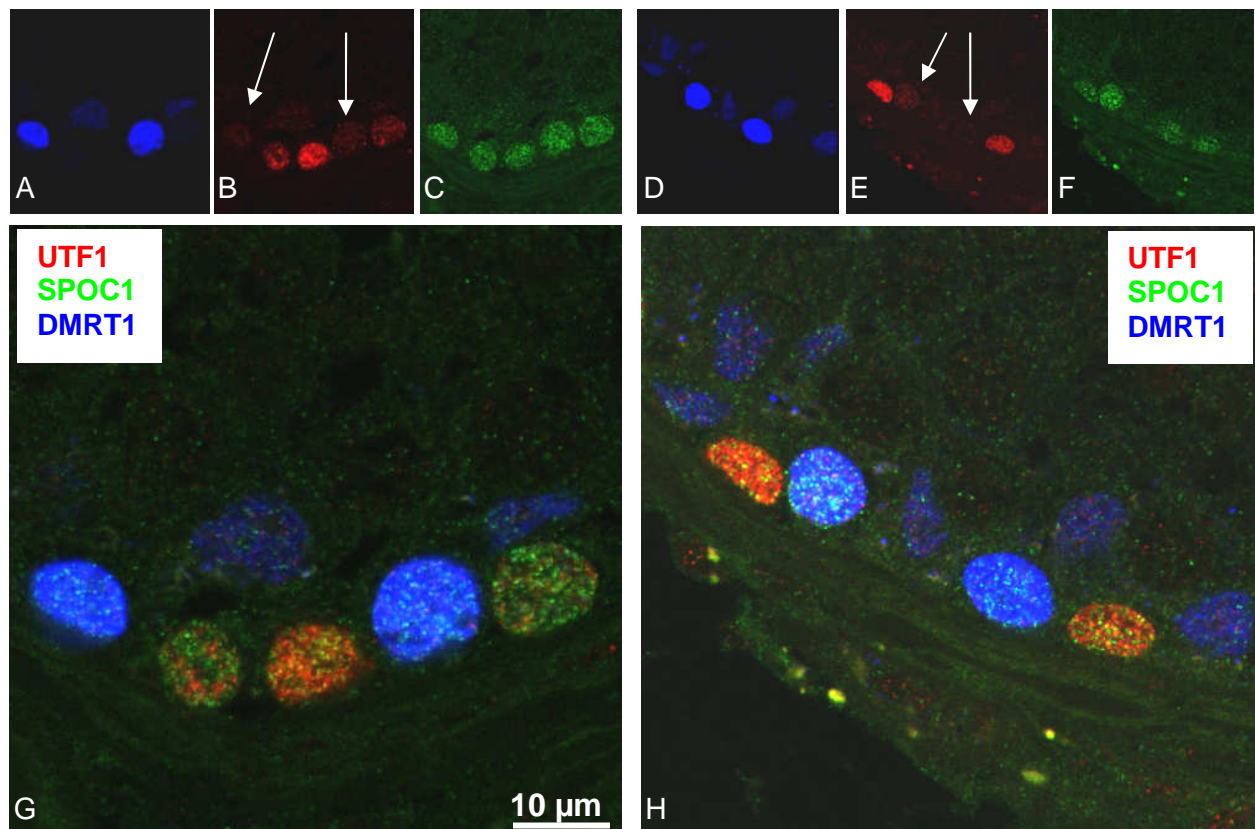
**Abb. 3.32:** Venn-Diagramm der UTF1-/SPOC1-/DMRT1-Expressionsmuster in adulten Hodenschnittpräparaten. mR: Spermatogonien mit nukleärer Verdünnungszone = A dark-Spermatogonien (Ad); oR: Spermatogonien ohne nukleäre Verdünnungszone = A pale- bzw. B-Spermatogonien; oR?: die in der „UTF1-only“-Zellpopulation detektierten Zellen ohne nukleäre Verdünnungszone könnten sowohl A dark-Spermatogonien mit nicht angeschnittener „Vakuole“ als auch A pale-Spermatogonien darstellen.

<sup>4</sup> zur Beschreibung der nukleären Rarefaktionszone der A dark-Spermatogonien s. auch Abschnitt 1.3

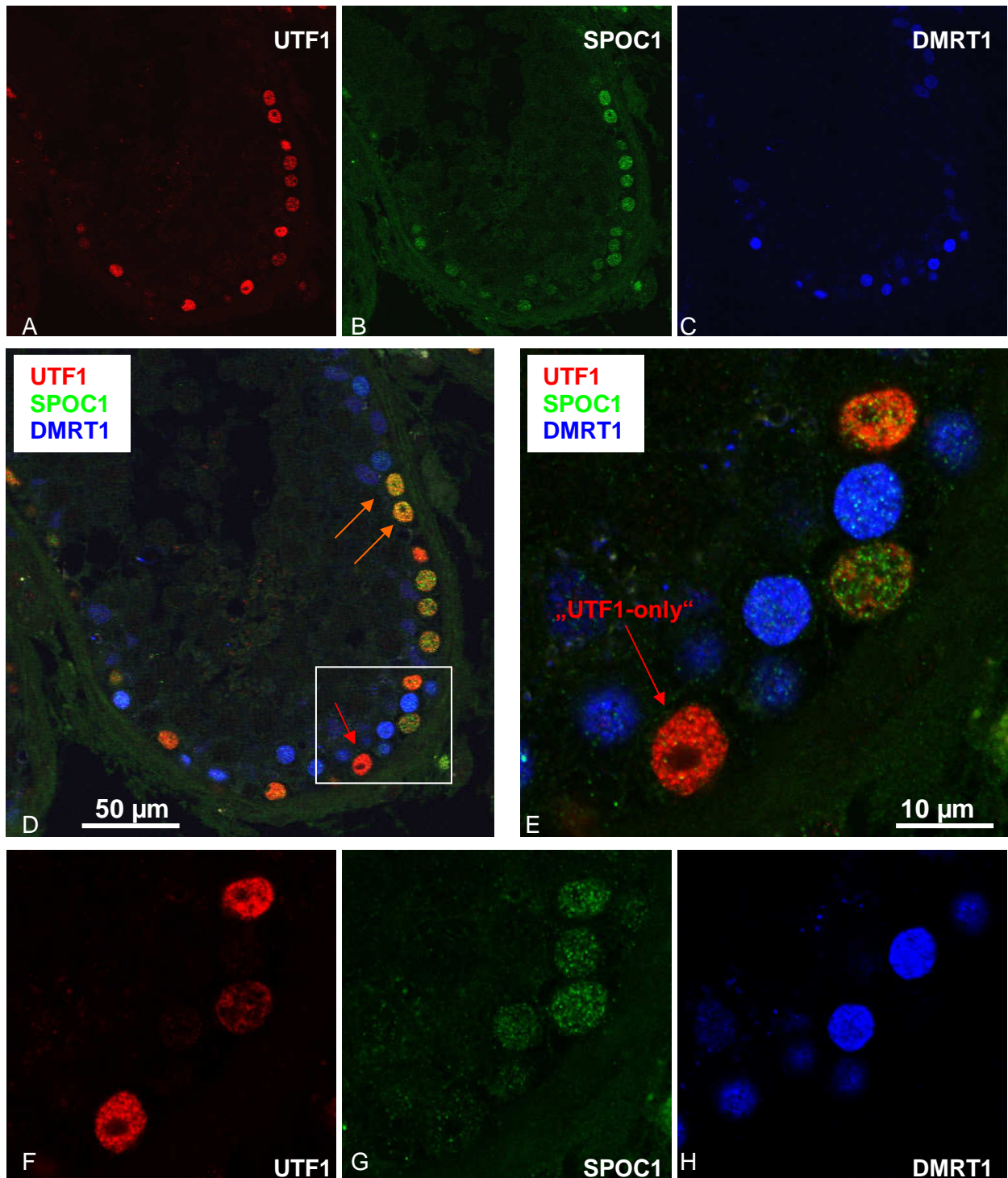
### 3.2.4 Untersuchungen zur Wechselwirkung verschiedener Marker

#### 3.2.4.1 DMRT1 und UTF1 schließen sich weitgehend aus

Bei der Immunfluoreszenz-Dreifachmarkierung mit DMRT1, UTF1 und SPOC1 wurde festgestellt, dass sich die DMRT1-Expression und die UTF1-Expression weitgehend ausschließen (Abb. 3.33 A vs. B; D vs. E bzw. Überlagerungen in G und H sowie Abb. 3.34). In den meisten DMRT1-positiven Spermatogonien wurde keine bzw. eine sehr minimale UTF1-Markierung detektiert. Lediglich bei einem geringen Anteil der DMRT1-positiven Zellen war neben der SPOC1-Expression auch eine UTF1-Expression vorhanden (nicht abgebildet). SPOC1 wurde in diesem Experiment verwendet, um alle UTF1-positiven und / oder DMRT1-positiven Zellkerne zu markieren und damit die Identifikation der spermatogonialen Zellen zu erleichtern (Abb. 3.33 C, F und Abb. 3.34 B, G). A dark-Spermatogonien waren immer DMRT1-negativ (Abb. 3.34 D, orangefarbene Pfeile). Ein kleiner Anteil dieser A dark-Spermatogonien war zusätzlich SPOC1-negativ (Abb. 3.34 D, E; rote Pfeile). Dieses molekulare Erscheinungsbild wurde hier hinsichtlich der verwendeten Marker als „UTF1-only“-Phänotyp bezeichnet (s. dazu auch Abb. 3.32).



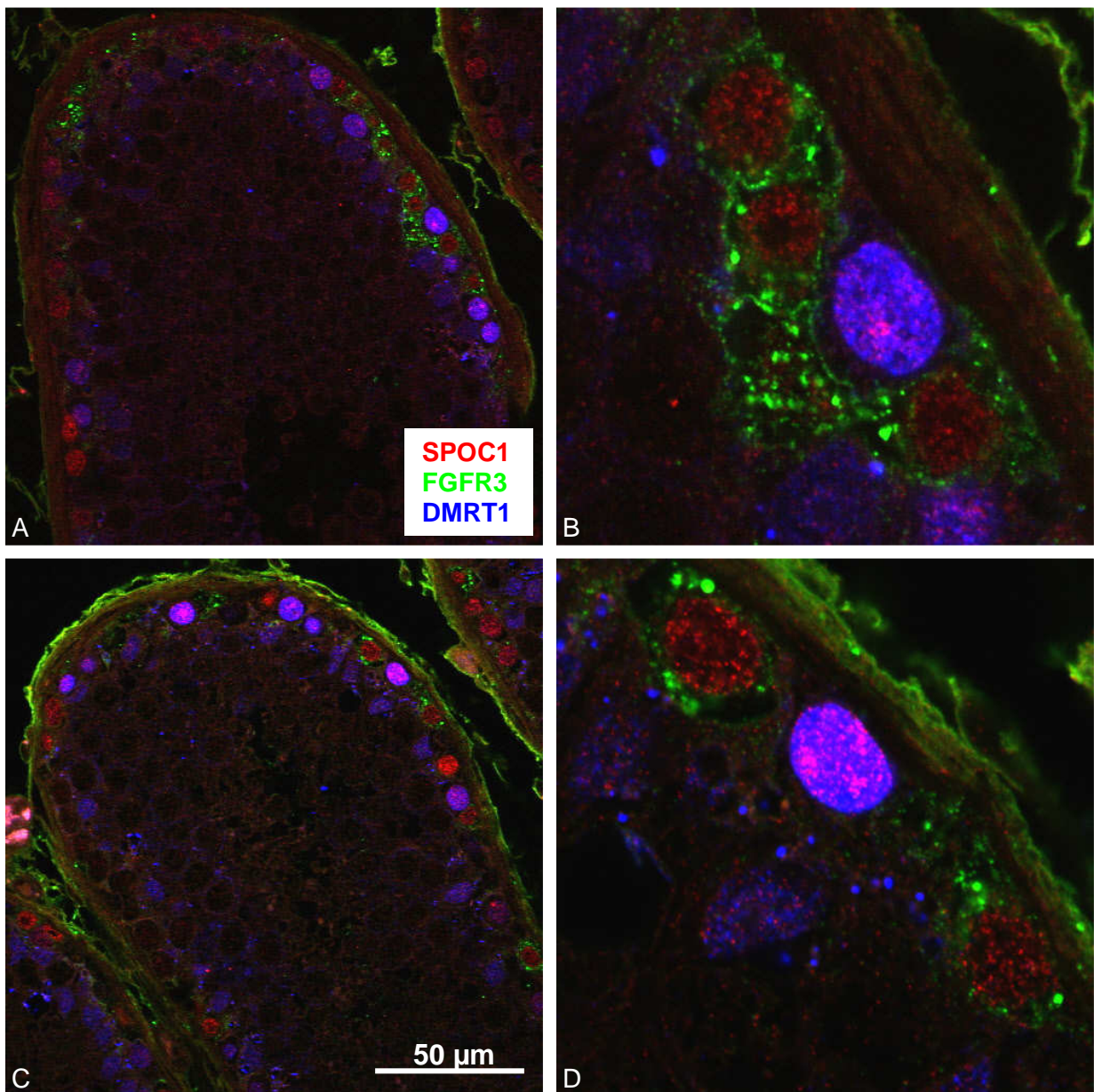
**Abb. 3.33:** Immunfluoreszenz-Dreifachmarkierung für UTF1, SPOC1 und DMRT1. A, D, DMRT1; B, E, UTF1; C, F, SPOC1; G, H, Farbüberlagerung. Die DMRT1-positiven Spermatogonien sind weitgehend UTF1-negativ (Pfeile).



**Abb. 3.34:** Immunfluoreszenz-Dreifachmarkierung für UTF1, SPOC1 und DMRT1. A, B, C, *Tubulus seminiferus* mit den verschiedenen Markern; D, Farbüberlagerung; E, Detail aus D in Farbüberlagerung (Quadrat); F, G, H, Detail in Einzelkanälen. A dunkle Spermato gonien zeigen keine DMRT1-Expression (orangefarbene Pfeile), in einigen Fällen zusätzlich keine SPOC1-Expression („UTF1-only“-Phänotyp; rote Pfeile).

### 3.2.4.2 DMRT1- und FGFR3-Expression schließen sich gegenseitig aus

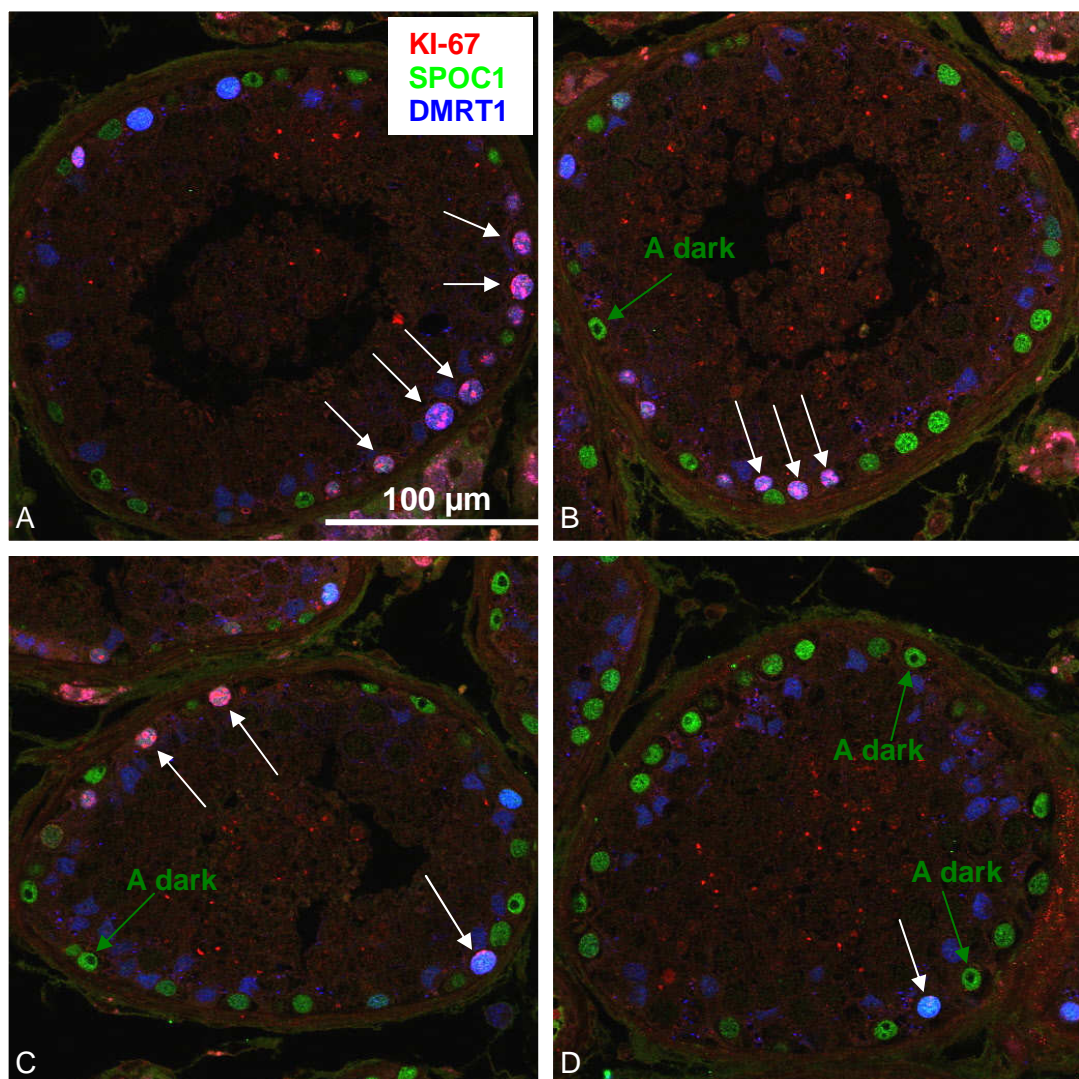
Die Immunfluoreszenz-Dreifachmarkierung mit DMRT1, FGFR3 und SPOC1 ergab keine Überschneidungen zwischen DMRT1-positiven Zellen (blaue Zellkerne in Abb. 3.35) und Spermato gonien mit cytoplasmatischen FGFR3-Vesikeln (grün). Die SPOC1-Markierung der Zellkerne wurde zur Identifizierung der Spermato gonien-Zellkerne eingesetzt. Die SPOC1-Markierung wurde hier im Unterschied zu den in den vorherigen Abschnitten erläuterten Experimenten in Rot vorgenommen.



**Abb. 3.35:** Immunfluoreszenz-Dreifachmarkierung für SPOC1, FGFR3 und DMRT1. A, C, Überblick; B, D, Details. Farbüberlagerung aus SPOC1 (rot), FGFR3 (grün), DMRT1 (blau). Zwischen der Expression von DMRT1 und der FGFR3-Vesikelmarkierung in Spermato gonien gibt es keine Überschneidungen.

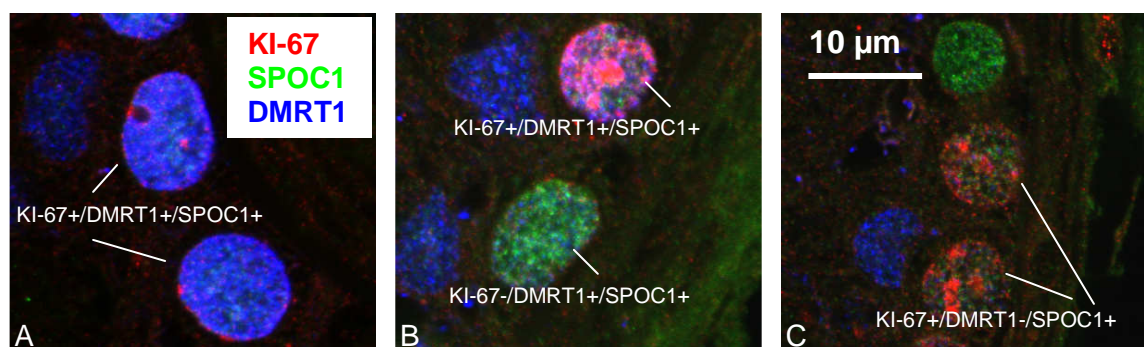
### 3.2.4.3 Koexpression von DMRT1 und KI-67

DMRT1 und der Proliferationsmarker KI-67 erwiesen sich in einer Subpopulation von Spermatogonien als weitgehend koexprimiert (blaue Zellkerne mit magentafarbenen Punkten in Abb. 3.36). Dies bedeutet, dass DMRT1 vorwiegend in proliferierenden Spermatogonien exprimiert wird. Die Anzahl der proliferierenden DMRT1-positiven Spermatogonien (DMRT1+/KI-67+) variierte von Tubulus zu Tubulus. Neben *Tubuli seminiferi* mit mehreren dieser im Zellkern doppelt positiven Zellen (Abb. 3.36 A, B, C), gab es Tubuli, bei denen nur wenige (Abb. 3.36 D) oder keine Zellen markiert waren.



**Abb. 3.36:** Immunfluoreszenz-Dreifachmarkierung für KI-67, SPOC1 und DMRT1. Die Anzahl der KI-67+/DMRT1+ Spermatogonien pro Tubulus ist unterschiedlich. Die weißen Pfeile markieren diesen Expressionstyp beispielhaft. Die grünen Pfeile zeigen Beispiele von A dark-Spermatogonien mit dem ausschließlichen molekularem Phänotyp DMRT1-/KI-67-/SPOC1+.

Neben dem oben genannten häufigsten Expressionstyp KI-67+/DMRT1+ (s. Abb. 3.37 A und B, oben), traten auch die Expressionsmuster KI-67-/DMRT1+ (DMRT1-positive nicht proliferierende Spermatogonien; s. Abb. 3.37 B, unten) sowie KI-67+/DMRT1- (DMRT1-negative proliferierende Spermatogonien; s. Abb. 3.37 C) auf. Diese molekularen Phänotypen wurden jedoch seltener beobachtet. A dark-Spermatogonien waren stets DMRT1- und KI-67-negativ (s. Abb. 3.36 B, C, D; grüne Pfeile). Der SPOC1-Antikörper (grüne Markierung) wurde in der Immunfluoreszenzfärbung mit DMRT1 und KI-67 SPOC1 zur Identifizierung der Spermatogonien-Zellkerne eingesetzt. Hiermit wurden alle DMRT1-positiven und / oder KI-67-positiven Spermatogonien angefärbt.

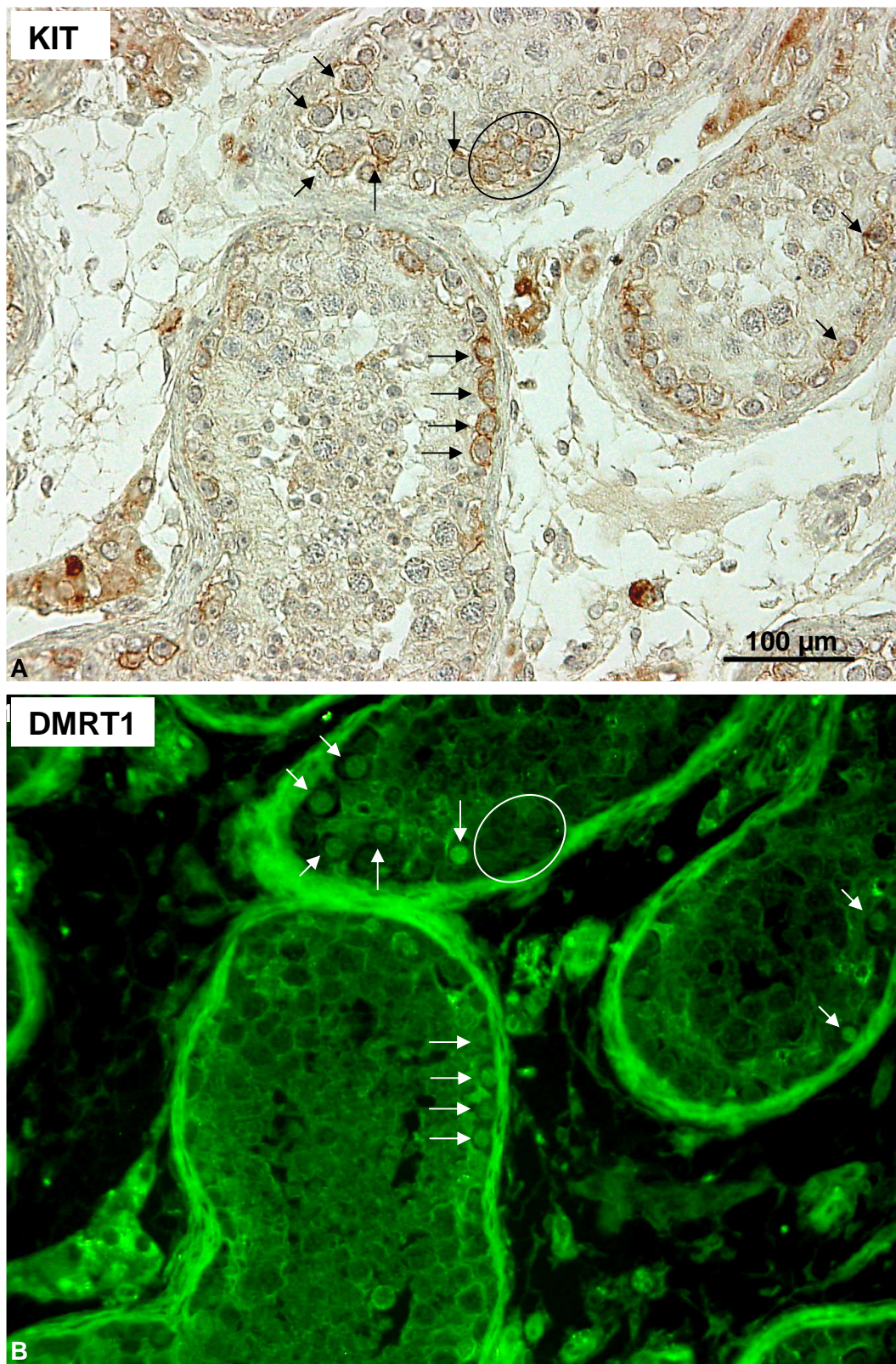


**Abb. 3.37:** KI-67-/DMRT1-/SPOC1-Expressionstypen von Spermatogonien. A, häufigster Expressionstyp **KI-67+/DMRT1+/SPOC1+**; B, häufigster Expressionstyp (obere Zelle) neben einer Zelle mit der selteneren Variante **KI-67-/DMRT1+/SPOC1+**; C, seltene Expressionsvariante **KI-67+/DMRT1-/SPOC1+**.

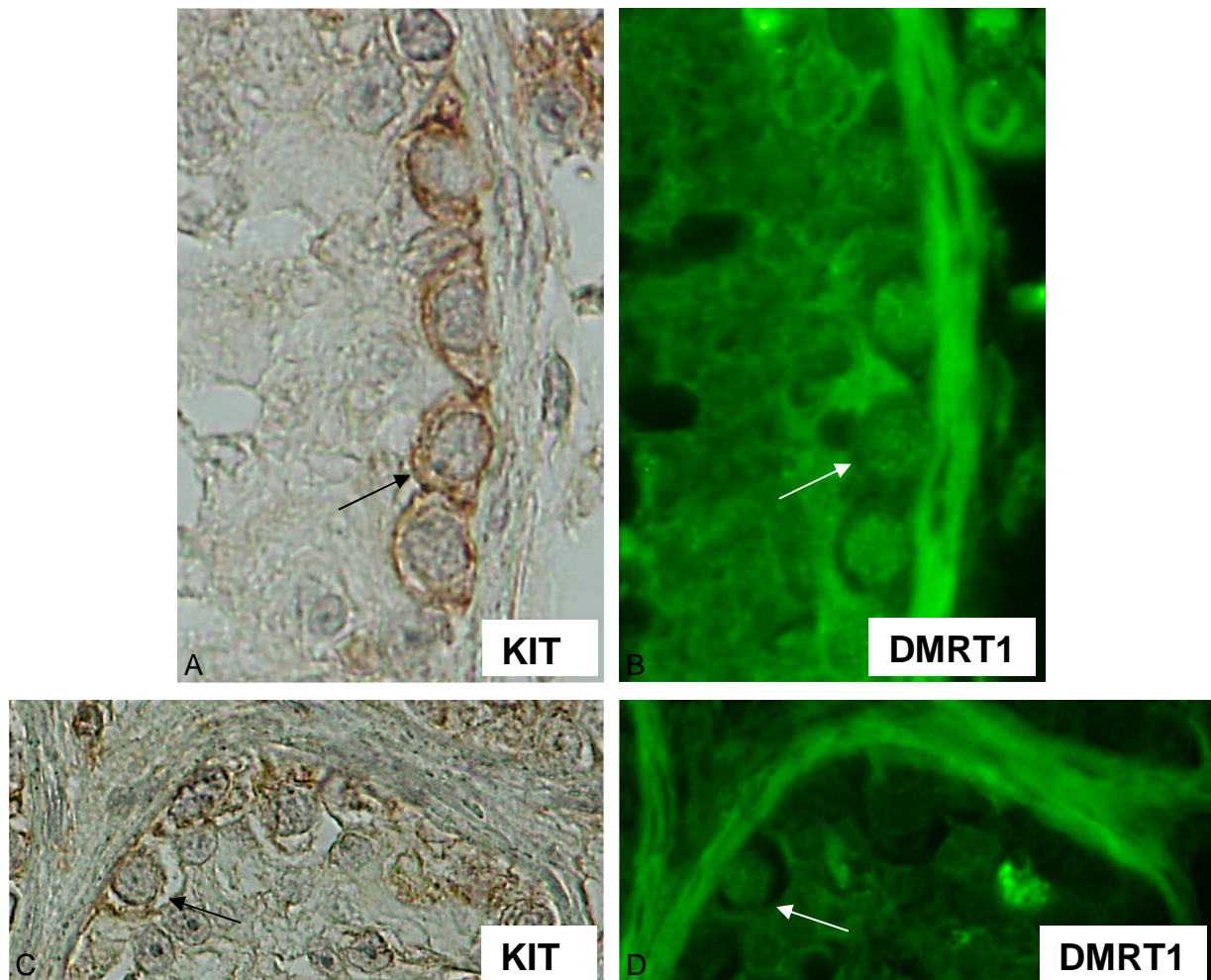
#### 3.2.4.4 DMRT1-/KIT-Koexpression kommt in verschiedenen Spermatogionientypen vor

Mittels KIT-Immunhistochemie-/DMRT1-Immunfluoreszenz-Doppelfärbung sollte herausgefunden werden, ob beide Marker in den gleichen Zellen vorkommen. Diese beiden Methoden wurden miteinander kombiniert, weil die Tatsache, dass in beiden Fällen polyklonale Kaninchen-Antikörper eingesetzt wurden, keine Doppel-Immunfluoreszenz erlaubte. Hierbei wurde beobachtet, dass DMRT1 im Zellkern von KIT-positiven Zellen exprimiert wird (s. Abb. 3.38). Die kleinen, in Gruppen zusammen liegenden deutlich KIT-positiven Zellen waren jedoch DMRT1-negativ (Abb. 3.38, eingerahmte Zellen). Die Intensität der KIT-Expression variierte in den DMRT1-positiven Zellen von schwach bis stark. Eine schwächere bis mittlere KIT-Expression wurde häufiger beobachtet. Die DMRT1-/KIT-Koexpression wurde sowohl in A pale- (Abb. 3.39 A, B) als auch in B-Spermatogonien (Abb. 3.39 C, D) detektiert.





**Abb. 3.38:** DMRT1-/KIT-Koexpression in Spermatogonien. A, KIT-Expression dargestellt mittels Immunhistochemie; B, DMRT1-Expression dargestellt mittels Immunfluoreszenz. Die DMRT1-positiven Spermatogonien (weiße Pfeile) sind auch KIT-positiv (schwarze Pfeile). Die stark KIT-positiven, kleineren Zellen in größeren Klonen (ovale Markierung) sind DMRT1-negativ.



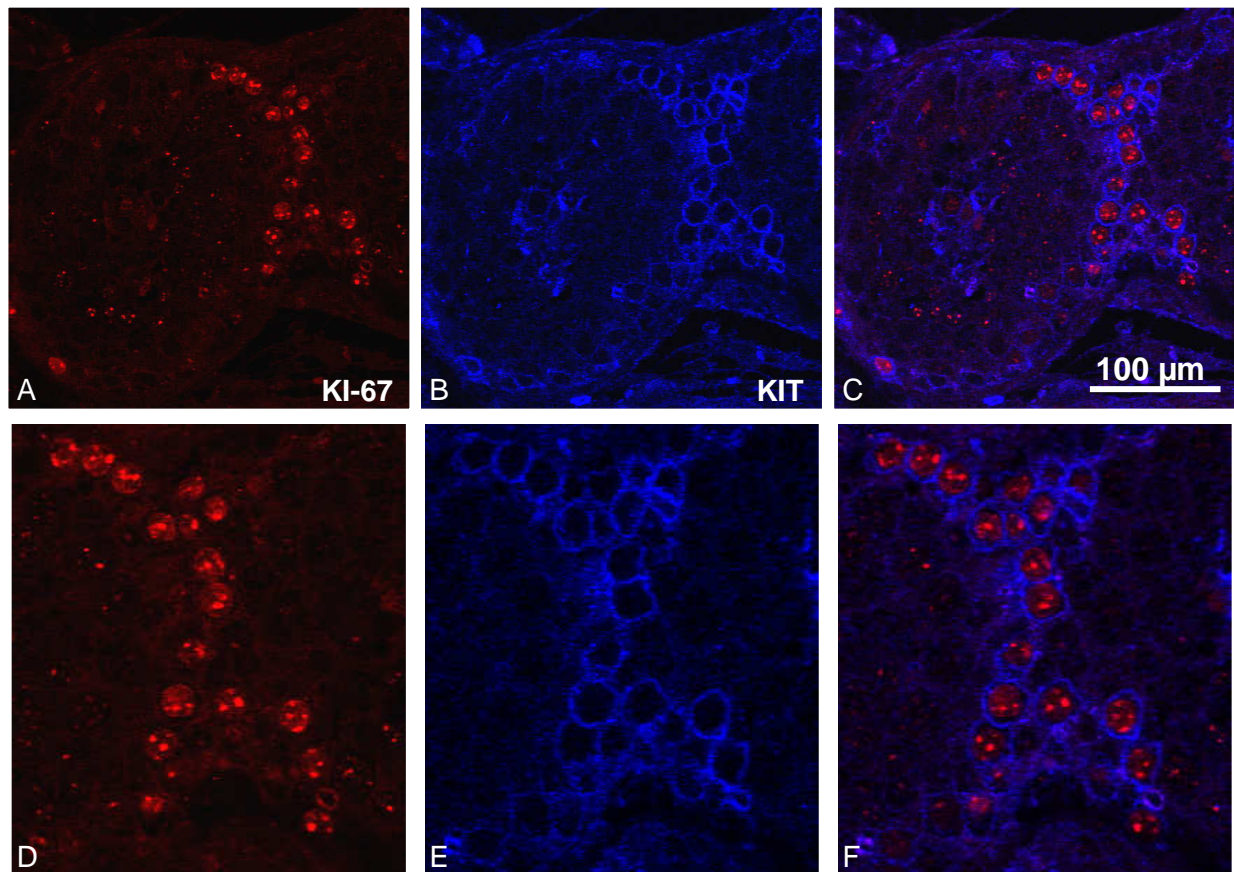
**Abb. 3.39:** DMRT1-/KIT-Koexpression in verschiedenen Spermatogonientypen. DMRT1-/KIT-Koexpression in A pale-Spermatogonien (A, B) und B-Spermatogonien (C, D). A, C, KIT-Expression dargestellt mittels Immunhistochemie; B, D, DMRT1-Expression dargestellt mittels Immunfluoreszenz. Die Pfeile markieren eine KIT-/DMRT1-positive A pale-Spermatogonie mit peripherem Nukleolus (A, B) bzw. eine KIT-/DMRT1-positive B-Spermatogonie mit zentralem Nukleolus (C, D).

### 3.2.4.5 Koexpression von KIT und KI-67

KIT- und KI-67-Expression scheinen in der Mehrzahl der Spermatogonien miteinander einherzugehen (s. Abb. 3.40). Die in größeren Gruppen vorkommenden kleinen Zellen mit starker KIT-Markierung (wabenförmiges Erscheinungsbild der KIT-Expression<sup>5</sup>) sind KI-67-positiv (Abb. 3.40). Einige KIT-positive Zellen ohne KI-67-Kernmarkierung wurden zusätzlich detektiert (nicht abgebildet). Bei diesen Zellen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der Nukleolus nicht angeschnitten war und die Zelle deswegen KI-67-negativ erschien. In einem

<sup>5</sup> s. dazu auch Abb. 3.25 in Abschnitt 3.2.2.4

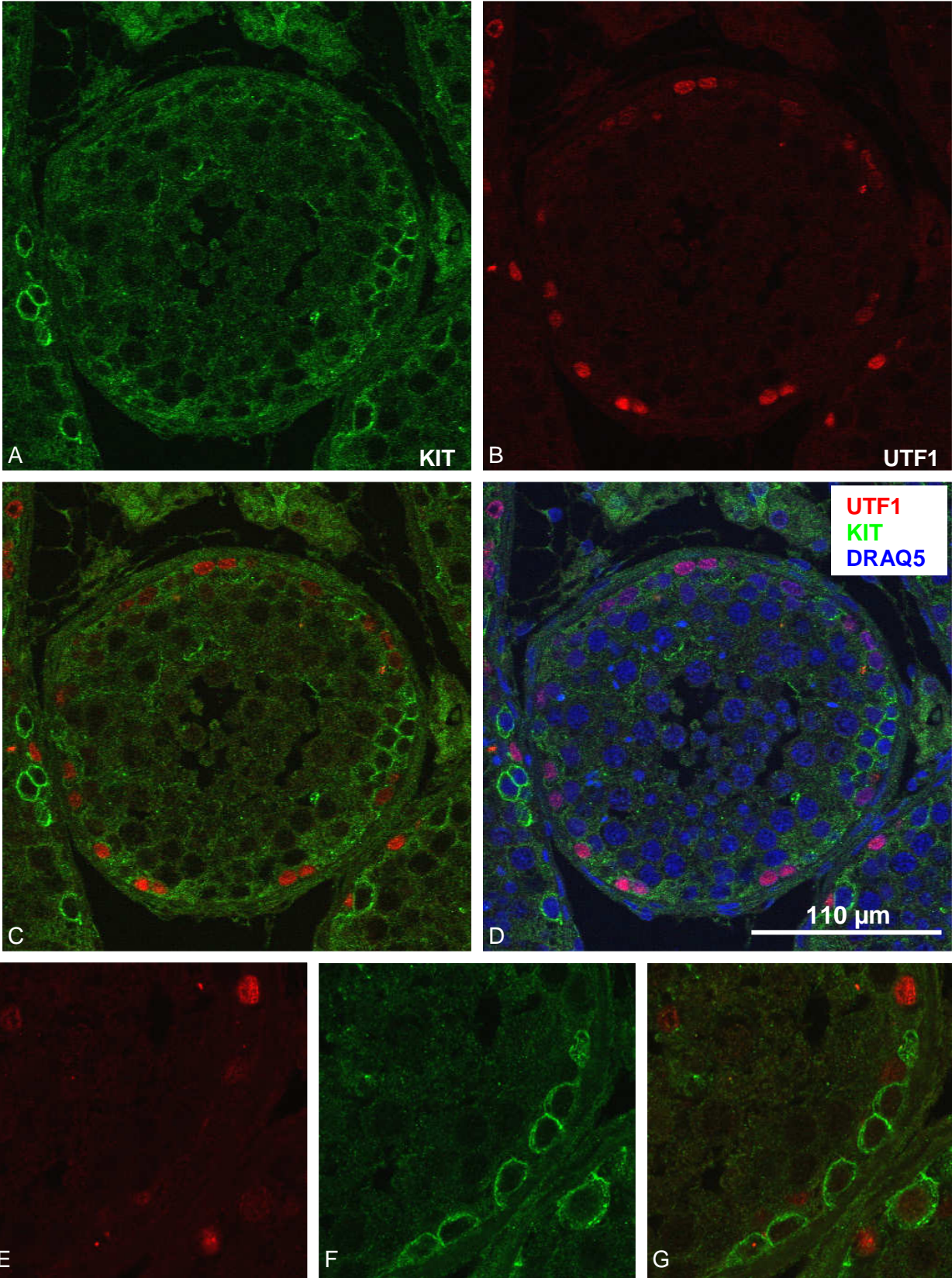
Fall wurde eine ausschließlich KI-67-positive Spermatogonie ohne KIT-Expression beobachtet (nicht gezeigt).



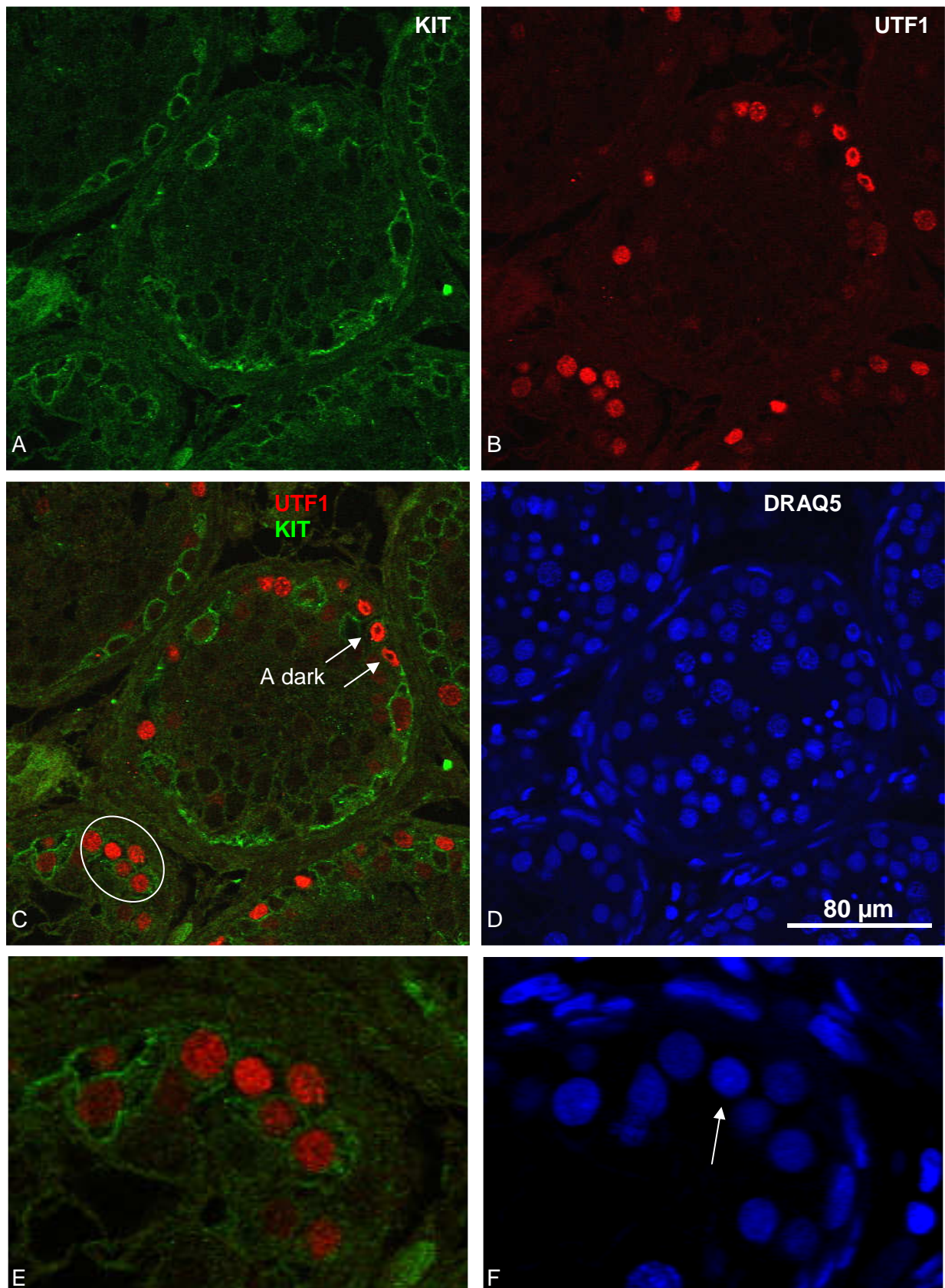
**Abb. 3.40:** KIT-/KI-67-Doppel-Immunfluoreszenz in Spermatogonien. A, B, C, Übersicht; D, E, F, Detail. A, D, KI-67; B, E, KIT; C, F, Überlagerung.

#### 3.2.4.6 KIT und UTF1 schließen sich weitgehend aus

Die Mehrzahl Spermatogonien mit starker KIT-Expression exprimieren kein bzw. wenig UTF1 (Abb. 3.41). Einige Zellen exprimieren beide Marker (Abb. 3.42, eingekreiste Zellen). In einem Fall einer UTF1-/KIT-exprimierenden Zelle ließ sich in der DNA-Färbung mit DRAQ5 ein zentraler Nukleolus erkennen (s. Pfeil in Abb. 3.42 F). Diese Zelle wurde dementsprechend als B-Spermatogonie identifiziert. Bei den anderen doppelt positiven Spermatogonien konnte der Zelltyp nicht bestimmt werden. Allerdings waren A dark-Spermatogonien stets KIT-negativ (s. Pfeile in Abb. 3.42 C).



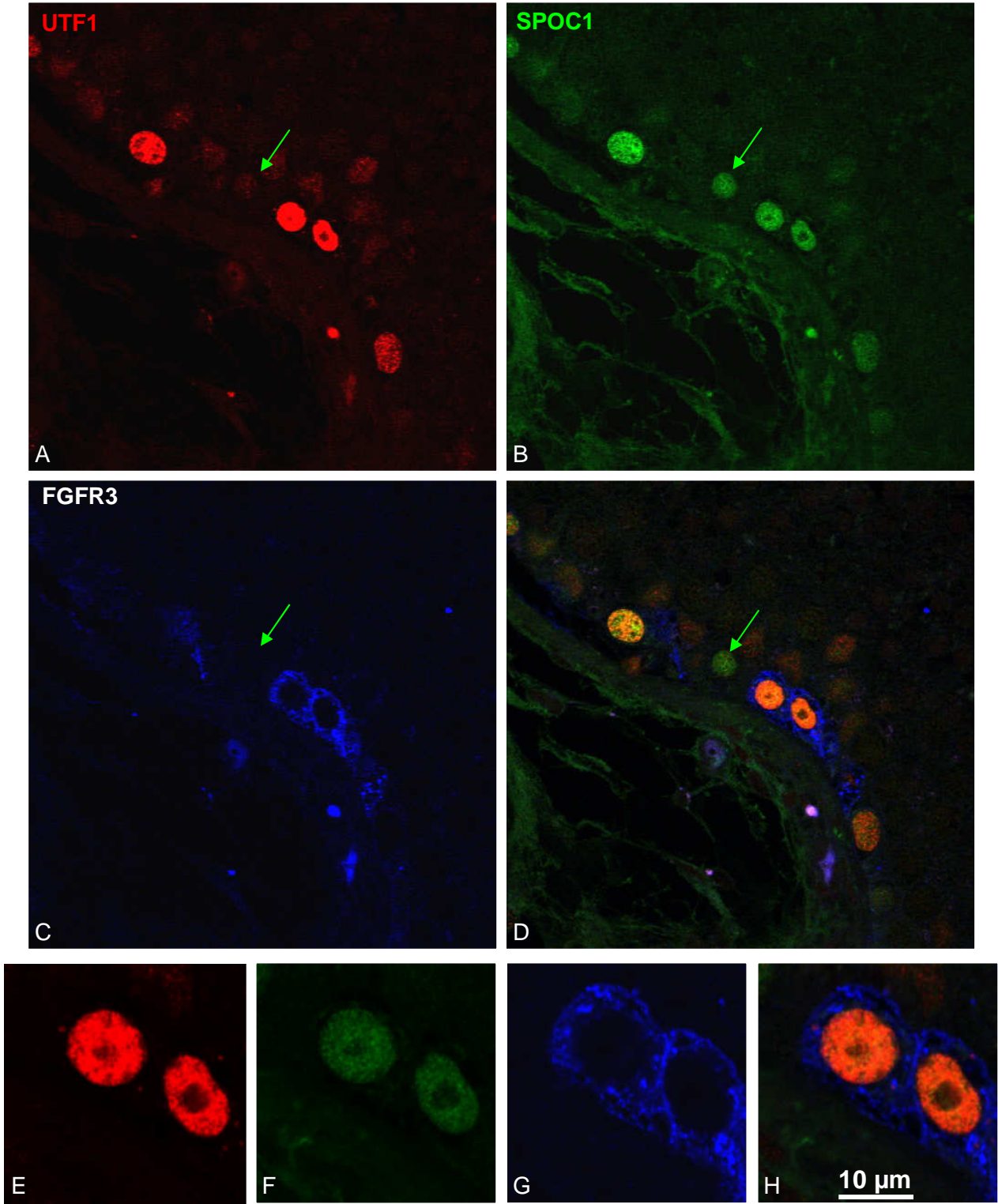
**Abb. 3.41:** UTF1 und KIT in Spermatogonien (I). A, B, Tubulusquerschnitt, Übersicht, KIT- bzw. UTF1-Markierung; C, Überlagerung beider Marker; D, Überlagerung beider Marker mit DNA-Farbstoff DRAQ5; E, F, G, zusätzliches Detailfoto.



**Abb. 3.42:** UTF1 und KIT in Spermato gonien (II). A, B, Tubulusquerschnitt, Übersicht, KIT- bzw. UTF1-Markierung; C, Überlagerung beider Marker; D, DNA-Farbstoff DRAQ5; E, F, Detail aus C bzw. D. Die Pfeile in C markieren A dark-Spermato gonien (stets KIT-negativ), der Pfeil in F einen mit DRAQ5 markierten zentralen Nukleolus einer B-Spermato gonie.

#### **3.2.4.7 Spermatogonien mit vielen cytoplasmatischen FGFR3-Vesikeln bilden eine Subpopulation der UTF1-positiven Zellen**

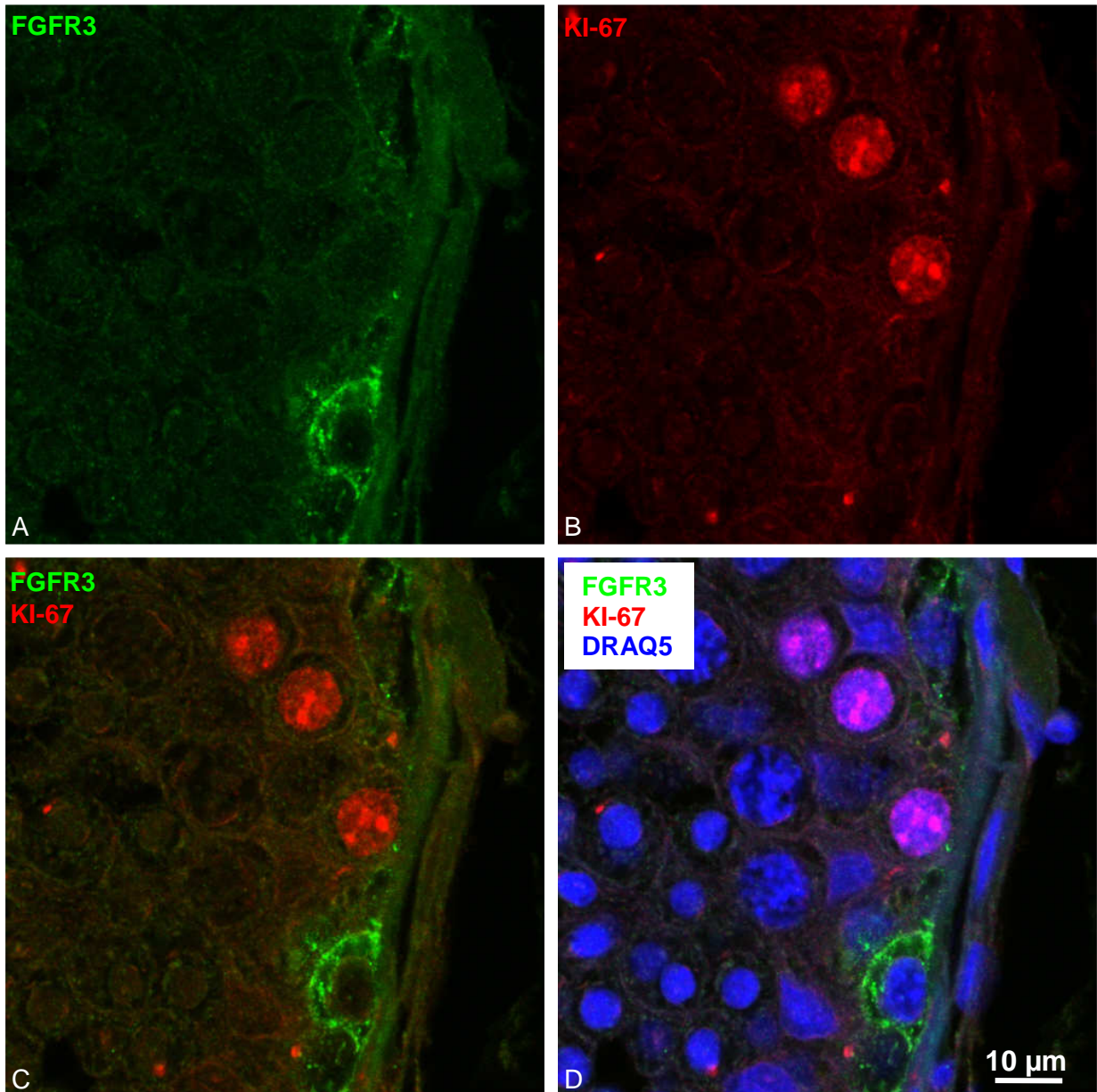
Das Ergebnis der Dreifach-Fluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen Epitope der Proteine UTF1, FGFR3 und SPOC1 zeigt, dass Spermatogonien mit vielen cytoplasmatischen FGFR3-Vesikeln (hier blau markiert) eine Subpopulation der UTF1-positiven Zellen darstellen. Bei diesen Zellen war das Verhältnis der Rot-/Grün-Fluoreszenz meist stark zu UTF1 (rot) im Vergleich zu SPOC1 (grün) verschoben (s. Abb. 3.43). In dieser Subpopulation waren Spermatogonien mit und ohne nukleäre Rarefaktionszone (A dark-„Vakuole“) vertreten. Die hier beschriebenen Spermatogonien ohne nukleäre Zone der Rarefaktion waren jedoch immer unmittelbar an der Basallamina lokalisiert. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass es sich um A pale-Spermatogonien handelt. Zellen mit SPOC1-Markierung aber ohne UTF1-Expression im Zellkern wiesen keine FGFR3-Vesikelfärbung auf (Abb. 3.43 D; grüner Pfeil). Die SPOC1-Färbung der Zellkerne diente in diesem Experiment erneut zur Identifizierung der spermatogonialen Zellen.



**Abb. 3.43:** Immunfluoreszenz-Dreifachmarkierung für UTF1, SPOC1 und FGFR3. A, B, C, D, Überblick; E, F, G, H, Detail. A, UTF1; B, SPOC1; C, FGFR3; D, Überlagerung. Der grüne Pfeil markiert eine Spermato gonie des molekularen Phänotyps UTF1+/SPOC1+/FGFR3-.

### 3.2.4.8 FGFR3- und KI-67-Markierung schließen sich gegenseitig aus

Die FGFR3- und die KI-67-Markierung wurden, ähnlich wie FGFR3 und DMRT1 (s. Kapitel 3.2.4.2), stets in unterschiedlichen Spermatogonien-Populationen detektiert (s. Abb. 3.44). Daraus kann geschlossen werden, dass FGFR3-exprimierende Spermatogonien selten oder gar nicht proliferieren.

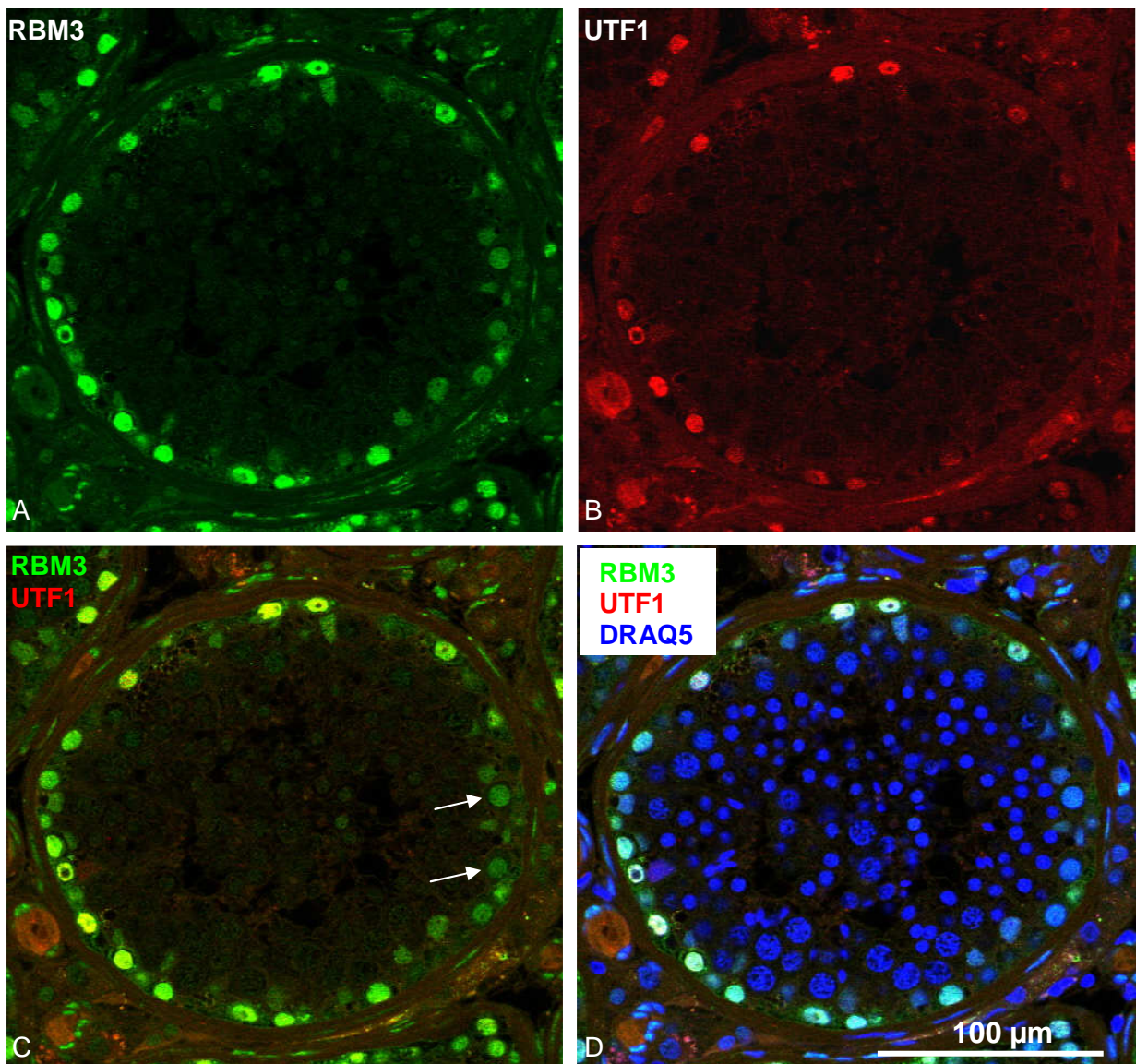


**Abb. 3.44:** Immunfluoreszenzmarkierung für FGFR3 und KI-67. A, FGFR3; B, KI-67; C, Überlagerung der FGFR3- und der KI-67-Markierung; D, Überlagerung mit DNA-Farbstoff DRAQ5. Zwischen der DMRT1-Expression und der FGFR3-Expression gibt es keine Überschneidungen.



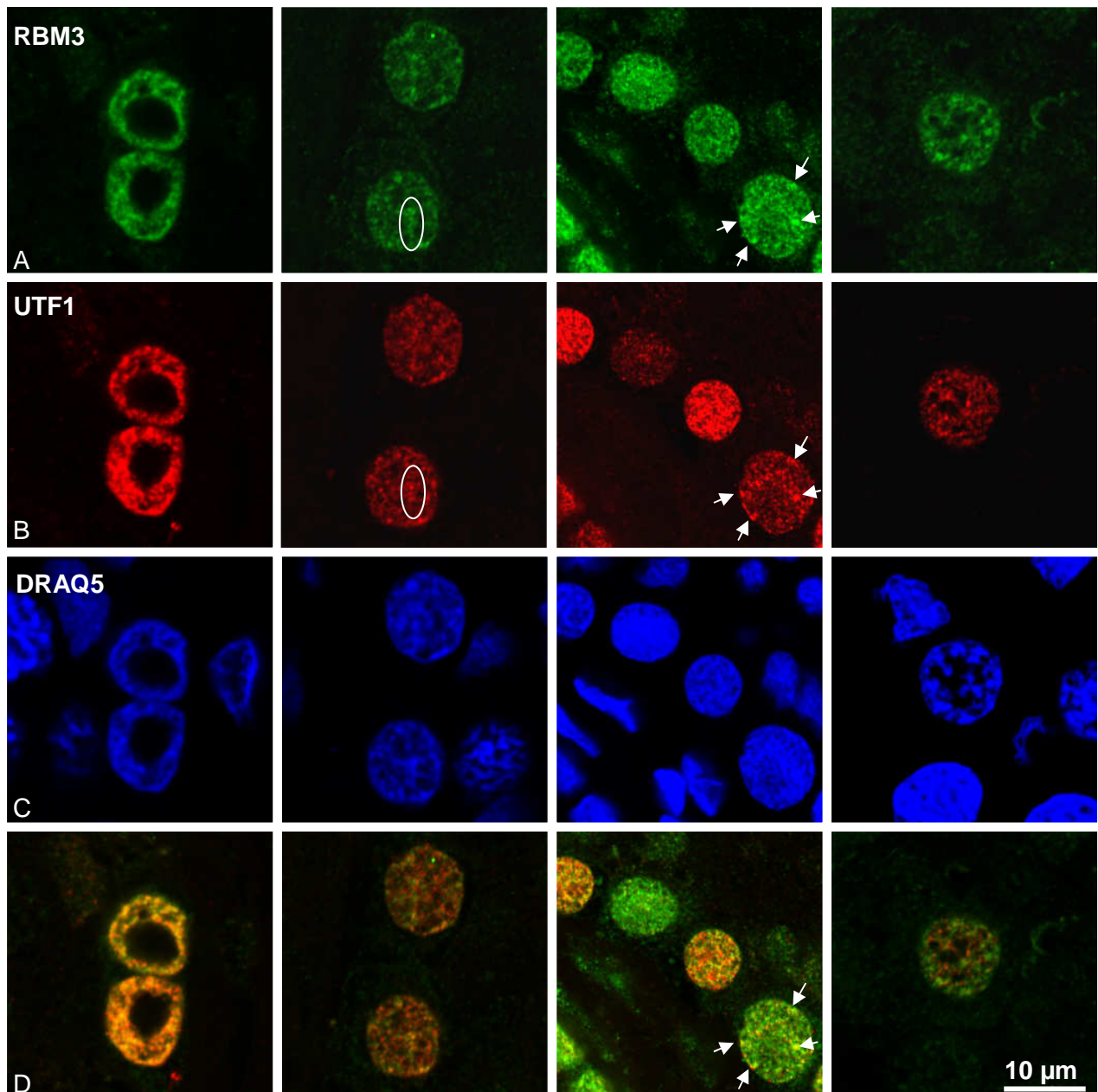
### 3.2.4.9 UTF1 und RBM3 sind kolokalisierte Kernmarker

Wie auch das Protein UTF1 ist RBM3 ein Marker von Spermatogonien-Kernen. Allerdings wird RBM3 in einer höheren Anzahl an Spermatogonien exprimiert als UTF1 (s. Abb. 3.45 A vs. Abb. 3.45 B). Exklusiv RBM3-positive Zellen befanden sich häufiger in einer weiter luminal gelegenen Position in den *Tubuli seminiferi* (Pfeile in Abb. 3.45 C) als Zellen die beide Marker enthielten (Zellkerne in gelb-hellgrüner Mischfarbe in Abb. 3.45 C).



**Abb. 3.45:** RBM3- und UTF1-Koexpression in Spermatogonien. A, RBM3; B, UTF1; C, Überlagerung von RBM3 und UTF1; D, Überlagerung mit DNA-Farbstoff DRAQ5. Die Pfeile markieren Beispiele für Zellkerne mit RBM3- aber ohne UTF1-Expression.

Auch wurde beobachtet, dass das RBM3-Protein im Chromatin von Spermatogonien unmittelbar mit dem UTF1-Protein koexprimiert wird (s. Markierungen in Abb. 3.46; Zeile A und Zeile B). Dieses Färbungsmuster hat eine große Ähnlichkeit mit der Färbung des DNA-Farbstoffes DRAQ5 (s. Abb. 3.46; Zeile C). Neben der Funktion von RBM3 als RNA-Bindeprotein (s. dazu Abschnitt 1.10.8) könnte mit dieser Kolo-kalisation zusätzlich eine DNA-bindende Eigenschaft des RBM3-Proteins in Spermatogonien angezeigt werden.



**Abb. 3.46:** RBM3/UTF1-Koexpression in Zellkernen von Spermatogonien. Zeile A, RBM3; Zeile B, UTF1; Zeile C, DNA-Farbstoff DRAQ5; Zeile D, Überlagerung von RBM3 und UTF1. Einige der mit den Antikörpern markierten auffällig ähnlichen Strukturen sind in der Abbildung gekennzeichnet. Diese Strukturen werden oftmals in der Rot-Grün-Überlagerung (Zeile D) als mischfarbig gelb dargestellt.

### 3.2.4.10 Zusammenfassung der Proteinexpressionsdaten

Die folgenden Tabellen fassen die Daten der Proteinexpression zusammen, die mit Hilfe der Immunhistochemie- und Immunfluoreszenz-Experimente ermittelt wurden. Tab. 3.02 zeigt die Expression der verschiedenen Marker in den unterschiedlichen Spermatogonientypen. Hierbei wurden die Spermatogonien in solche mit und ohne nukleäre Rarefaktionszone (A dark-„Vakuole“) unterteilt und den fetalen Keimzellen gegenübergestellt. Tab. 3.03 spezifiziert die oben genannten Expressionsdaten hinsichtlich des zellulären Kompartiments. Tab. 3.04 illustriert verschiedene Koexpressionstypen der Spermatogonien.

Marker	SPG mit nukleärer Zone der Rarefaktion	SPG ohne nukleäre Zone der Rarefaktion	fetale Keimzellen (19. - 28. SW)
CBL	x	x	n.t.
KIT	negativ	x	n.t.
DMRT1	negativ	x	n.t.
DSG2	x	x	x
EXOSC10	x	x	n.t.
FGFR3	x	x	x
RBM3	x	x	n.t.
SNAP91	x	x	n.t.
SPOC1	x	x	n.t.
UCHL1	x	x	x
UTF1	x	x	n.t.

Tab. 3.02: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Proteinexpression bezogen auf morphologisch definierte Spermatogonientypen. SPG, Spermatogonien; SPG mit nukleärer Zone der Rarefaktion = A-dark-Spermatogonien; SPG ohne nukleäre Zone der Rarefaktion = A-pale- und B-Spermatogonien; x, Expression beobachtet; n.t., nicht getestet; SW, Schwangerschaftswoche.

Marker	Zelloberfläche / Cytoplasma	Zellkern -> Art der Markierung
C23	-	Nukleoli und Nukleoplasma
CBL	x	-
KIT	x	-
DMRT1	-	Chromatin
DSG2	x	-
EXOSC10	-	unterschiedlich entsprechend Spermatogonientyp (s. Abschnitt 3.2.2.2)
FGFR3	x	-
KI-67	-	Nukleoli und Heterochromatin
RBM3	x	Chromatin
SNAP91	x	-
SPOC1	-	Chromatin / speckles
UTF1	-	Chromatin

Tab. 3.03: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Proteinexpression bzgl. des spermatogonialen zellulären Kompartiments. x, vorhandene Expression; -, keine Expression.

Marker	Ausschluss	weitgehender Ausschluss	Koexpression
DMRT1	FGFR3	UTF1	KI-67 KIT
KI-67	FGFR3		DMRT1 KIT
FGFR3	DMRT1 KI-67		UTF1
UTF1		DMRT1 KIT	FGFR3
KIT		UTF1	DMRT1* KI-67

**Tab. 3.04:** Zusammenfassung der Ergebnisse der Protein-Koexpressionsanalysen. Ausschluss: zwischen den Markern wurde keine Überschneidung detektiert; weitgehender Ausschluss: einige Zellen mit sich überschneidendem Expressionsprofil wurden detektiert; Koexpression: unterschiedliche Ausmaße (zur genaueren Beschreibung s. entsprechende Einzelkapitel); \* KIT-positive Zellen in großen Klonen (wabenhörmiges Erscheinungsbild der Markierung) zeigten keine Koexpression mit DMRT1.

### 3.2.5 Immunfluoreszenzmarkierung in Gesamtpräparationen (*whole mount*) von *Tubuli seminiferi*

Proliferation und Differenzierung von Spermatogonien gehen mit klonaler Vermehrung einher. Innerhalb eines Zellklons verläuft die Entwicklung der Zellen synchron (van Alphen et al., 1988; Ehmcke et al., 2005). Innerhalb der Klone sind die Zellen über cytoplasmatische Brücken miteinander verbunden (Dym & Fawcett, 1971).

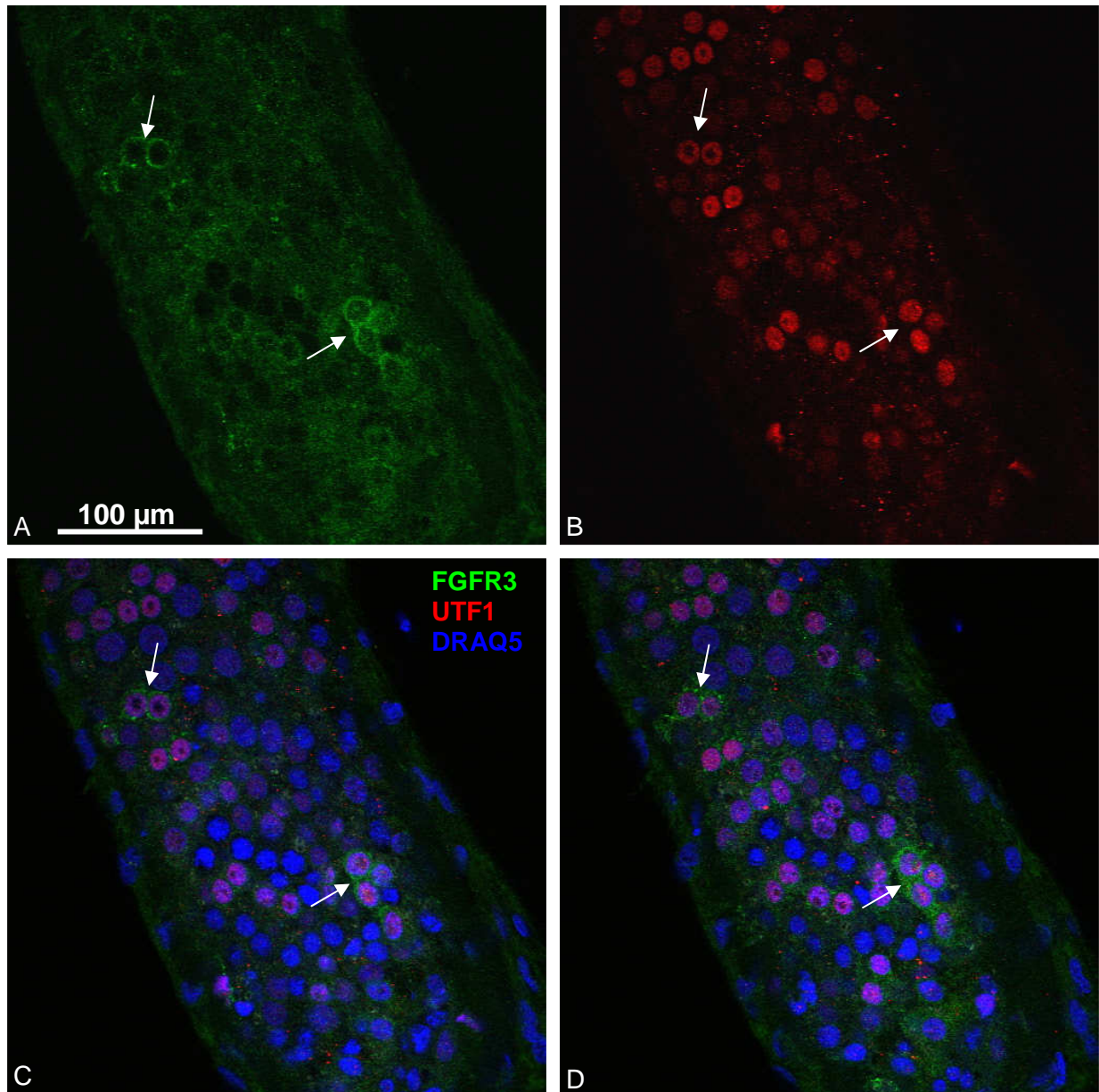
Zur Aufklärung des Mechanismus der humanen Spermatogoniogenese ist es sinnvoll, die Größen spermatogonialer Klone mit bestimmtem molekularem Expressionsmuster zu bestimmen. Dazu wurden in dieser Arbeit vollständige Hodenkanälchen präpariert und mittels Immunfluoreszenz hinsichtlich der Expression von spermatogonienspezifischen Proteinen untersucht (sogenannte *whole mount*-Technik). Die Klongröße liefert einen Anhaltspunkt dafür, ob es sich bei den Zellen mit der entsprechenden Markerexpression eher um frühe oder späte Entwicklungsstadien der Spermatogoniogenese handelt.

Um potentielle Unterschiede zwischen FGFR3- bzw. KIT-positiven Spermatogonienklonen zu detektieren, wurden nacheinander die spermatogonialen Zelloberflächenmarker FGFR3 und KIT eingesetzt. Der Einsatz von Zelloberflächenmarkern ist nötig, um die Klongrenzen der über Cytoplasmabrücken verbundenen Zellen eines Klons erkennen zu können. Außerdem sind Zelloberflächenproteine ein geeignetes Werkzeug, um die entsprechende Zellpopulation später isolieren zu können.

Zuerst wurde FGFR3 zusammen mit dem spermatogonialen Chromatinmarker UTF1 und dem DNA-Farbstoff DRAQ5 eingesetzt. DRAQ5 sollte durch die Anfärbung aller Zellkerne die Orientierung im Tubulus erleichtern. Die FGFR3-Markierung (grün) erlaubte tatsächlich eine Bestim-

mung der Klongrößen, obwohl die Zellgrenzen durch die starke Markierung cytoplasmatischer Vesikel<sup>6</sup> verwischt wurden.

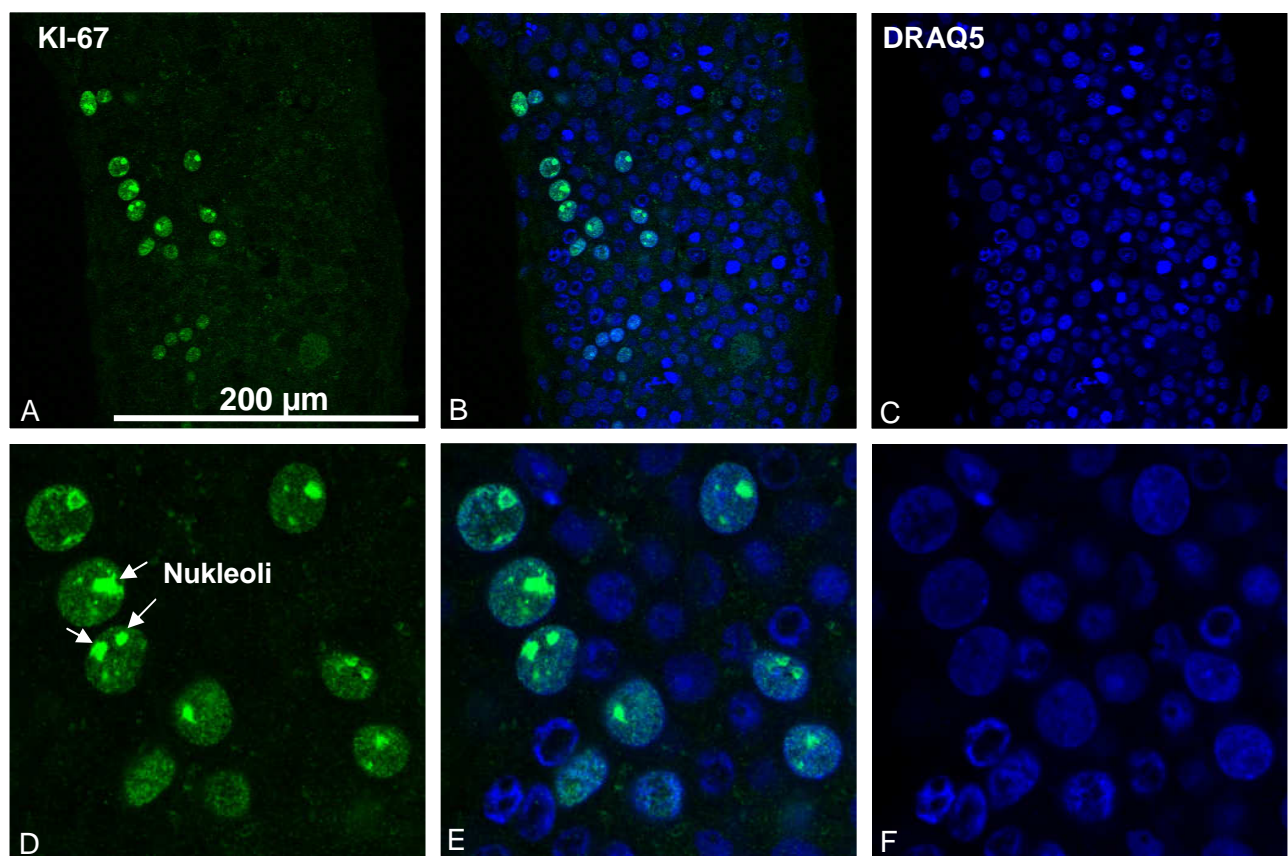
Eine starke FGFR3-Markierung wurde in kleineren Zellklonen (Zweier- und Viererklone) detektiert (s. Abb. 3.47). Ob FGFR3 auch bei größeren Spermatogonienklonen vorkommt, konnte an dieser Stelle aufgrund der geringen Anzahl an untersuchten Proben und zu weniger gut markierter Stellen im *whole mount*-Präparat nicht geklärt werden.



**Abb. 3.47:** *Whole mount*-Präparation (I). A, FGFR3; B, UTF1; C, D, 2 verschiedene Ebenen eines Z-Stapels eines optischen Schnittes; Pfeile, spermatogonialer Klon aus (mindestens) 2 Zellen (A-dark-Spermatogonien, oberer Pfeil) bzw. 4 Zellen (unterer Pfeil).

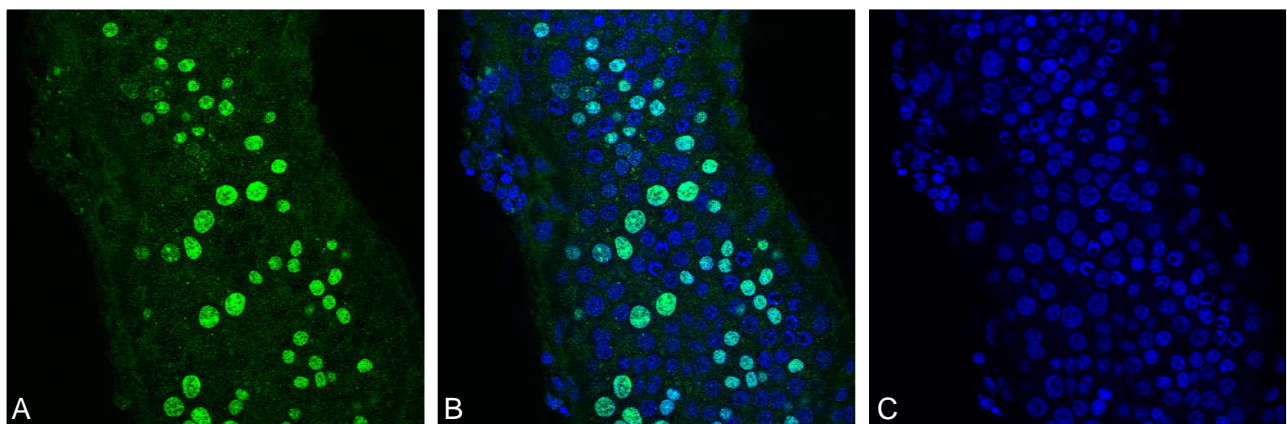
<sup>6</sup> siehe Abb. 3.07 in Abschnitt 3.2.1.1

Zur Detektion proliferierender Spermatogonien und zur Beurteilung der Klongröße wurde zunächst der Proliferationsmarker KI-67 zusammen mit dem DNA-Farbstoff DRAQ5 eingesetzt. Abbildung 3.48 zeigt einen Tubulusabschnitt in zwei unterschiedlichen Vergrößerungen. Die Pfeile (Abb. 3.48 D) deuten auf mit KI-67 markierte Nukleoli hin. In der *whole mount*-Analyse gibt die Lokalisation der Nukleoli innerhalb des Zellkerns im Unterschied zu einem histologischen Schnittpräparat nicht zwangsläufig Rückschluss auf den spermatogonialen Subtyp. Eine scheinbar zentrale Position eines Nukleolus im Zellkern kann in diesem Falle auch ein peripher an der „oberen“ Seite der Kernmembran anheftendes Kernkörperchen darstellen. Aus diesem Grund konnte hier nicht zwischen A pale- und B-Spermatogonien unterschieden werden.



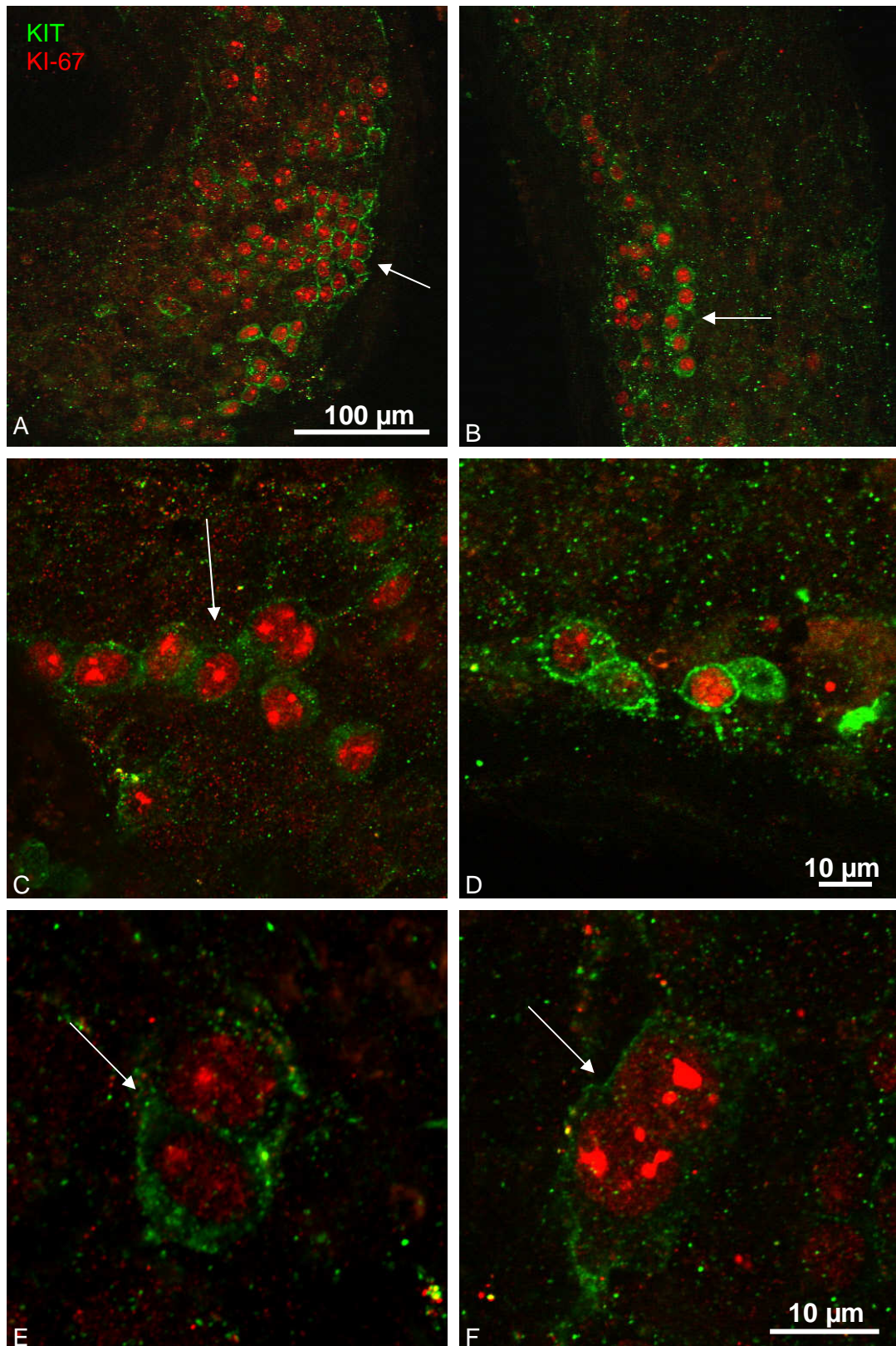
**Abb. 3.48:** *Whole mount*-Präparation (II). Optischer Schnitt durch einen *Tubulus seminiferus*. A, B, C, Überblick; D, E, F, Detail; A, D, KI-67; B, E, Überlagerung; C, F, DNA-Färbung mit DRAQ5. Die Pfeile verweisen beispielhaft auf mit KI-67 markierte Nukleoli spermatogonialer Zellen.

Der Proliferationsmarker KI-67 wurde sowohl in Zellen mit großen Kernen als auch in Zellen mit kleinen Kernen detektiert (Abb. 3.49). Nach Roosen-Runge und Barlow (1953) kann dies bedeuten, dass es sich bei den großen Zellen um frühere und bei den kleineren Zellen um spätere Spermatogonienstadien handelt, da die Spermatogonien durch die Zellteilungen immer kleiner werden. Dabei entstehen aus einer großen Zelle  $n^2$  kleine Zellen (Roosen-Runge & Barlow, 1953). Der Abb. 3.49 kann ferner entnommen werden, dass die Anzahl an kleinkernigen Zellen die Anzahl der großkernigen Zellen deutlich überschreitet, was dafür spricht, dass es größere Klone mit späten Stadien und kleinere Klone mit frühen Stadien gibt.



**Abb. 3.49:** *Whole mount*-Präparation (III). KI-67 in Spermatogonien mit größeren und in Spermatogonien mit kleineren Zellkernen. A, KI-67; B, Überlagerung; C, DNA-Färbung mit DRAQ5.

Aufgrund der unzureichenden Erkennbarkeit der Begrenzungen der KI-67-positiven Spermatogonienklone ohne gleichzeitigen Einsatz eines Zelloberflächenmarkers wurde im Folgenden eine Doppelmarkierung von KI-67 und KIT durchgeführt. In diesem Versuch wurden KIT-positive Zellklone großer und mittlerer Ausdehnung, aber auch Zweierklone detektiert (s. Abb. 3.50). Eine Bestimmung der maximalen Größe der Spermatogonienklone war mit Hilfe der KIT-Oberflächenmarkierung nicht möglich, da diese zu schwach war, um jede markierte Zelle zu detektieren und teilweise in der Hintergrundfluoreszenz verschwand. Auch ist es mit der optischen Detektionstechnik (Z-Stapel mit einer bestimmten optischen Dicke eines jeden Fotos) schwierig, jede Cytoplasmabrücke abzubilden.



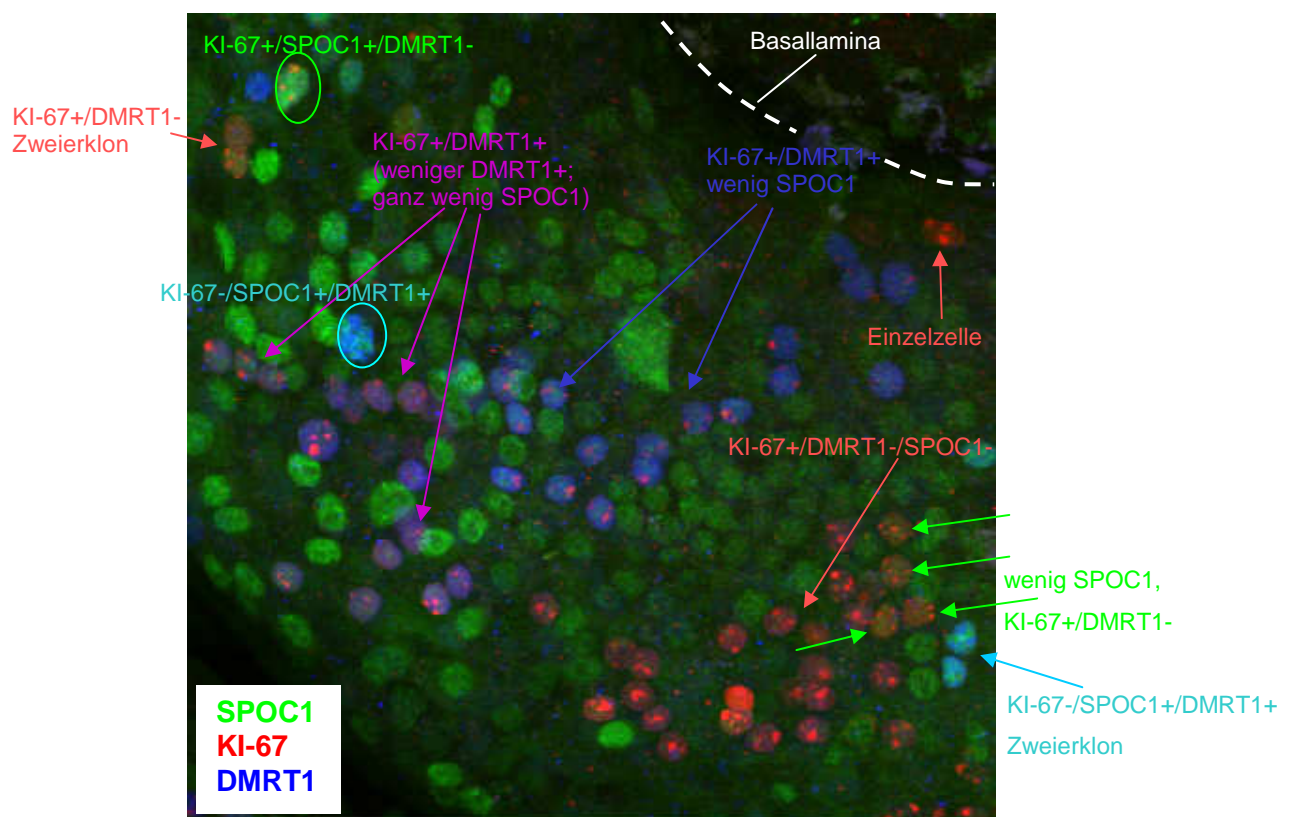
**Abb. 3.50:** *Whole mount*-Präparation (IV). KIT und KI-67 in spermatogonialen Klonen verschiedener Größe. A, größerer Klon (Pfeil) neben kleineren Klonen; B, C, Klone mittlerer Größe (Pfeile); D, zwei Zweierklone oder ein Viererklon; E, F, Zweierklone (Pfeile).



Dass bei der Oberflächenmarkierung mit KIT größere Klone als bei der Oberflächenmarkierung mit FGFR3 (Zweier- oder Viererklone) beobachtet wurden, könnte darauf hindeuten, dass KIT im Unterschied zu FGFR3 auch spätere Spermatogonienstadien markiert. FGFR3 scheint demnach eher frühere Spermatogonienstadien zu markieren, was bedeuten könnte, dass FGFR3 die Stammzellpopulation der Spermatogonien markiert.

Die gemeinsame Betrachtung FGFR3- und KIT-positiver Spermatogonienklone in einer Tubulus-Gesamtpräparation konnte nicht durchgeführt werden, da die versuchte Doppelmarkierung mit FGFR3 und KIT kein Ergebnis lieferte.

Um anhand verschiedener Expressionsstärken mehrerer Spermatogonien-Marker und daraus resultierenden verschiedenen Mischfarben im Fluoreszenzbild die Erkennung von Klonzugehörigkeiten proliferierender spermatogonialer Zellen zu erleichtern, wurden im Anschluss zusätzlich zur KI-67-Markierung die Marker SPOC1 und DMRT1 eingesetzt (Abb. 3.51). SPOC1 diente dabei als universeller Spermatogonienmarker und DMRT1 als Marker für eine spermatogoniale Subpopulation.



**Abb. 3.51:** *Whole mount*-Präparation (V). Überlagerung einer Immunfluoreszenz-Dreifachmarkierung mit den Markern KI-67 (rot), SPOC1 (grün), DMRT1 (blau). Gleiche Mischfarben von nebeneinander lokalisierten Zellen stellen mögliche klonale Zusammenhänge dar (s. Beschriftungen und Pfeile im Bild). SPOC1 und DMRT1 scheinen hier in der Expressionsstärke zu korrelieren.

Die Pfeile in Abb. 3.51 markieren Spermatogonien mit gleichen Expressionsmustern bzgl. der Marker KI-67, DMRT1 und SPOC1. Diese Zellen könnten potentiell jeweils einen Spermatogonienklon, mehrere Klone mit dem gleichen Expressionsmuster bzw. mehrere Spermatogonien-Generationen oder aber auch verschiedene Stadien des Zellzyklus darstellen. Weiterhin markiert sind in Abb. 3.51 größere Spermatogonien mit ovalen Zellkernen und den Expressionsmustern KI-67+/SPOC1+/DMRT1- (ovale Markierung, hellgrün, oben links) bzw. KI-67-/SPOC1+/DMRT1+ (ovale Markierung, hellblau, Mitte links). Bei diesen Zellen könnte es sich aufgrund der Kernmorphologie um A pale-Spermatogonien handeln.

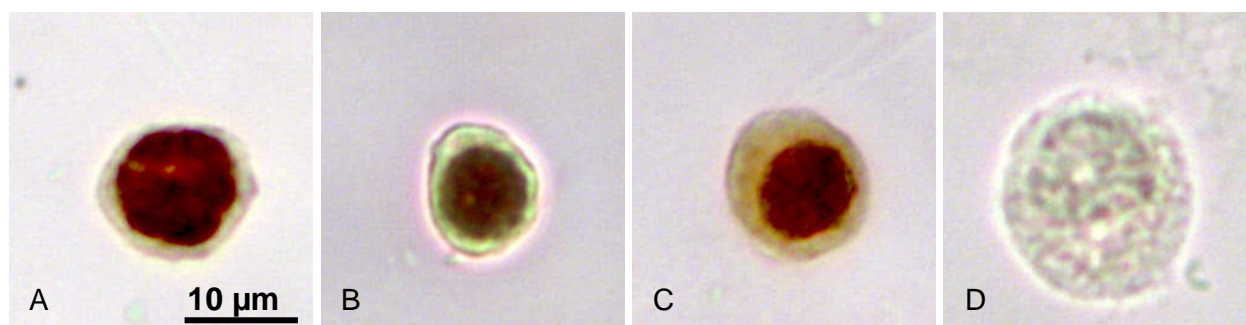
### 3.2.6 Untersuchungen und Experimente mit vereinzelt Keimzellen

#### 3.2.6.1 Immunzytochemie mit UTF1

Als Vorbereitung für eine Spermatogonien-Kultur wurde der Kernmarker UTF1 auch zur Markierung von Zellkernen isolierter Spermatogonien eingesetzt.

UTF1 markiert eine ähnliche spermatogoniale Subpopulation wie FGFR3 (s. Abschnitt 3.2.4.7). Die Überlappung ist aber unvollständig. Aus den *whole mount*-Analysen ergab sich, dass die FGFR3-positiven Zellen einen Teil der potentiellen Stammzellpopulation der Spermatogonien darstellen. Dies gilt demnach auch für die UTF1-positiven Zellen.

Mit diesem Experiment sollte untersucht werden, ob UTF1-positive Keimzellen mit Hilfe eines Zellsedimentationsverfahrens aus mit Kollagenase verdauten und homogenisierten Hoden-Gewebeproben ohne spezifische Selektionsmethode isoliert und mittels anschließender Immunzytochemie detektiert werden können. Das Experiment zeigte, dass dies möglich ist. Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelte es sich bei den isolierten Zellen um Spermatogonien. Abbildung 3.52 zeigt UTF1-positive Keimzellen mit einer Kerngröße von ca. 10 µm neben einem unmarkierten, größeren Spermatozyten-Zellkern.

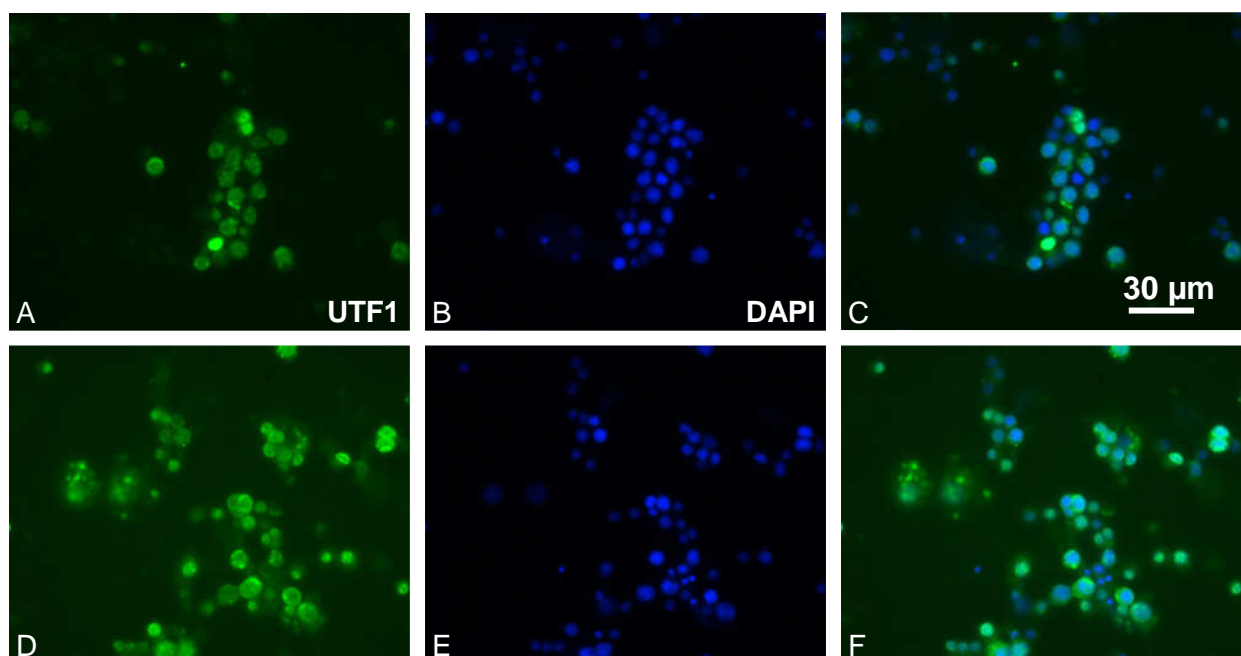


**Abb. 3.52:** UTF1-Immunhistochemie auf PAF-fixierten menschlichen Keimzellen. A, B, C, Zellkernmarkierung in kleineren Keimzellen; D, Spermatozyt ohne UTF1-Markierung.

### 3.2.6.2 Kurzzeitkultur zur Trennung der Keimzellen von somatischen Zellen

Eine Kurzzeitkultur wurde angesetzt, um zu zeigen, ob sich unter den gewählten Bedingungen Keimzellen von somatischen Zellen trennen lassen. Da die somatischen Zellen häufig adhärent wachsen, wurde erwartet, dass sie am Boden der Kulturschale anheften, während die Keimzellen im Nährmedium in Suspension verbleiben.

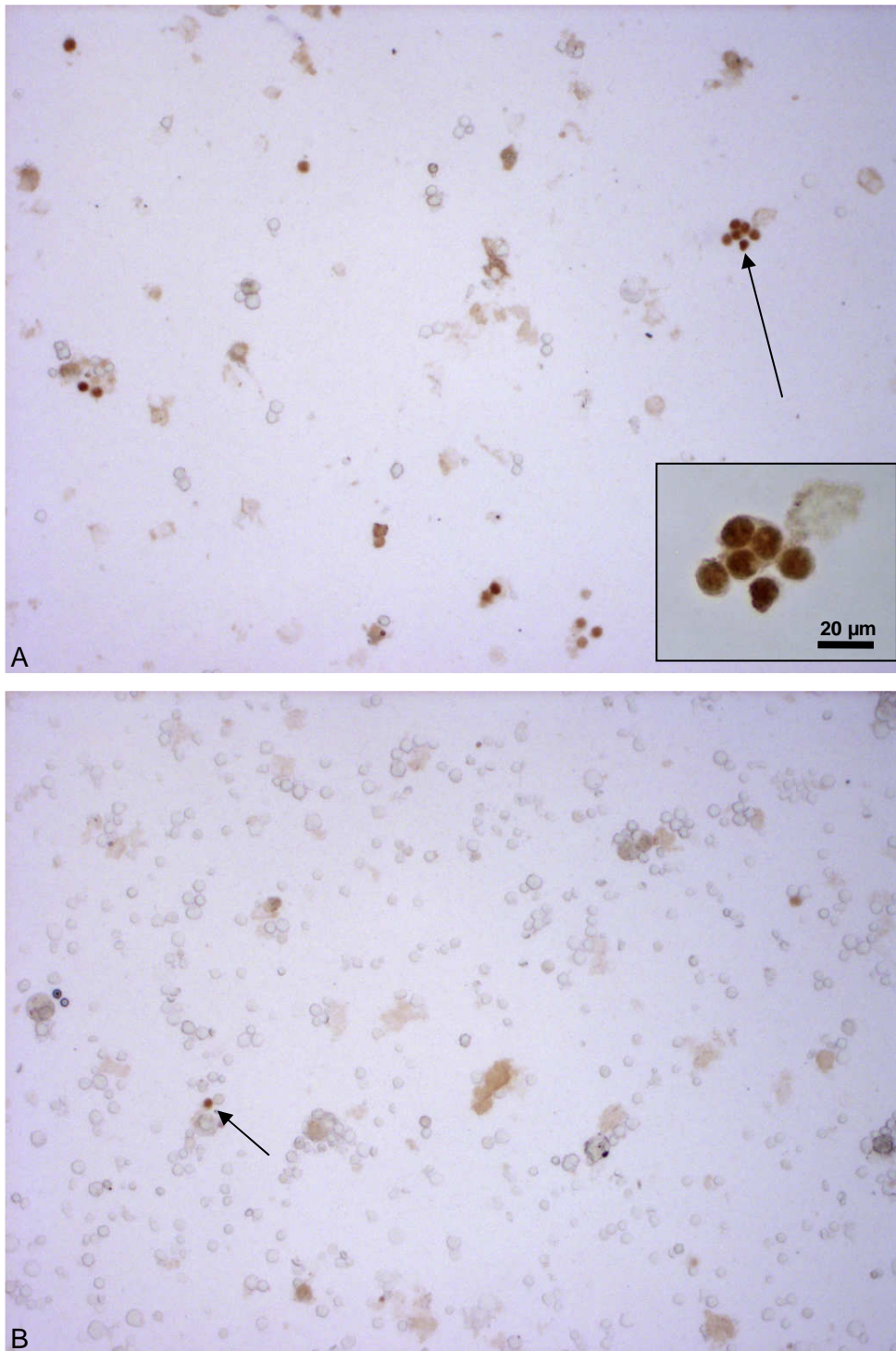
Der Effekt wurde nach vierstündiger Kulturzeit jedoch nicht erreicht. Dies kann damit zusammenhängen, dass in die Zellkulturschale keine entsprechende Beschichtung aufgebracht wurde oder die Kulturzeit zu kurz war, um ein Anheften der Sertolizellen am Boden der Kulturschale zu ermöglichen. Während im Überstand des Zellkulturmediums traubenförmige Keimzellexplante und Keimzellen im Sertolizellverband, ebenfalls in Trauben, beobachtet wurden, befanden sich am Boden der Petrischale lediglich einzelne Keimzellen. Deshalb wurde zur Analyse der Zellen einerseits der Bodensatz aus der Zellkulturschale verwendet und andererseits mittels Zentrifugation des Überstandes ein Sediment hergestellt. Im Sediment wurden weniger Zellen nachgewiesen als im Bodensatz der Zellkulturschale. Dies kann durch Sedimentation der Zellen während der Kulturzeit erklärt werden. Ein Teil der isolierten Zellen konnte in einem sich anschließenden Immunzytochemie-Experiment mit dem Spermatogonienmarker UTF1 markiert werden (s. Abb. 3.53).



**Abb. 3.53:** UTF1-Immunfluoreszenz an isolierten, PAF-fixierten menschlichen Keimzellen nach Kurzzeitkultur. A, D, UTF1-Markierung; B, E, Markierung mit DNA-Farbstoff DAPI ; C, F, Farbüberlagerung.

### 3.2.6.3 MACS-Selektion

Um „undifferenzierte“ Spermatogonien (Expressionsmuster FGFR3+/UTF1+) zu isolieren und gleichzeitig anzureichern, wurde der spermatogoniale Zelloberflächenmarker FGFR3 eingesetzt.



**Abb. 3.54:** Immunzytochemie MACS-selektierter Zellen. A, „Positiv“-Fraktion; B, „Negativ“-Fraktion; Pfeil in A, Inset; Pfeil in B, einzelne UTF1-positive Zelle innerhalb der „Negativ“-Fraktion.

Aufgrund der Daten aus der Literatur und der eigenen Ergebnisse erschienen FGFR3 sowie der chromatinassoziierte Marker UTF1 besonders geeignet, diese potentielle Stammzellpopulation der Spermatogonien zu markieren und anzureichern. Da UTF1 in den durchgeführten Experimenten eine weitgehende Kolo-kalisation mit FGFR3 zeigte, wurde es zur Markierung von Zellkernen isolierter Spermatogonien benutzt, die zuvor mit einem magnetassoziierten Zellselektionsverfahren (MACS = magnetic-activated cell sorting) über FGFR3 isoliert worden waren. Die Isolation der Keimzellen erfolgte dabei über die Bindung des FGFR3-Proteins auf der Zelloberfläche durch einen FGFR3-Antikörper und einen an magnetische Partikel gekoppelten Sekundär-Antikörper. Mit Hilfe dieser magnetischen Partikel konnten die oberflächenmarkierten Zellen über eine sich in einem Magnetfeld befindliche Selektionssäule isoliert werden.

Die MACS-Selektion ergab maximal eine 15-fache Anreicherung UTF1-positiver Zellen. Insgesamt waren in der „Positiv“-Fraktion etwa 18% UTF1-positive Zellen vorhanden (s. Abb. 3.54 A). Sowohl in der Gesamtpräparation („Vorher“-Fraktion) als auch in der „Negativ“-Fraktion (s. Abb. 3.54 B) wurden ca. 1% UTF1-positive Zellen detektiert.

Die in diesem Experiment erzielte 15-fache Anreicherung UTF1-positiver Zellen stellt noch keine optimale Anreicherungsquote dar, ist jedoch vor allem mit der geringen Anzahl der bisher durchgeführten Versuche zu begründen. Eine solche Methode, durchzuführen mit einer sehr limitierten Menge an Untersuchungsmaterial (2 Proben, jeweils ca. 30 µg aus linkem und rechtem Hoden des Patienten), setzt eine langwierigere Optimierungsphase voraus, die aus Zeitgründen im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht vollendet werden konnte. Das grundlegende Ziel, Spermatogonien mit dem monoklonalen Maus-Antikörper gegen das humane Protein FGFR3 zu isolieren und UTF1-positive Spermatogonien anzureichern, konnte jedoch erreicht werden.

Die geringe Menge der eingesetzten Biopate hatte zur Folge, dass das Probenmaterial sehr schonend behandelt werden musste. Aus diesem Grund wurde auf exzessiven enzymatischen Verdau verzichtet. Dadurch sollten weitere Materialverluste, z.B. durch Zerstörung des für die Selektion notwendigen FGFR3-Rezeptors auf der Zelloberfläche, weitestgehend minimiert werden. Die Folge dessen war jedoch, dass keine ausschließliche Einzelzellsuspension erhalten wurde. Da sich die zu selektierenden Keimzellen aber im Verband mit somatischen Zellen und putativ FGFR3-negativen Keimzellen befinden, gelangten nicht ausschließlich für den FGFR3-Rezeptor positive Zellen in die „Positiv“-Fraktion. Dies setzt entweder die Anreicherungsquote automatisch herab bzw. verhindert die Selektion zu großer Zellverbände mit nur wenigen positiven Zellen. Zum anderem wurden durch die gewählte Strategie aber vermutlich nicht alle Zellen von der Basallamina der *Tubuli seminiferi* abgelöst und standen letztendlich nicht zur Selektion

zur Verfügung. Eine Optimierung der Methode sollte durch längeren enzymatischen Verdau, die Verwendung anderer Enzyme und / oder die Kombination verschiedener Enzyme versucht werden.

Die Überprüfung der positiv selektierten Zellen war in dem durchgeführten Experiment nur indirekt möglich, wodurch eine schlechtere Anreicherungsquote angezeigt wird (Selektion mit FGFR3-Antikörper und Überprüfung der positiv selektierten Zellen mit UTF1-Antikörper). Wegen der geringen isolierten bzw. selektierten Zellmenge konnte die Anreicherung in der Probe nicht mit einem FACS-Gerät überprüft werden. Anstelle dessen musste die Immunzytochemie als indirekte Kontrollmethode fungieren. Hierbei war es nicht möglich, den gleichen Antikörper wie in der Selektion einzusetzen, da die Bindungsstellen für den Sekundärantikörper bereits besetzt waren.

Zur Optimierung der Zellselektion könnte zur Anreicherung spermatogoniale Zellen zusätzlich die Methode des differentiellen Plattierens eingesetzt werden (Hamra et al., 2002; 2004; 2008). Hierbei werden die Zellen zunächst auf einer Kollagenmatrix ausgesät. Die Zellen, die nicht an diese Oberfläche binden, werden anschließend auf mit Laminin beschichtete Zellkulturschalen verbracht. Laminin, der Ligand des extrazellulären Matrixprotein Integrin alpha 6 (ITGA6, CD49f), befindet sich auf der Zelloberfläche von Spermatogonien (Hamra et al., 2004). Somit kann mit der Laminin-Selektion die spermatogoniale Zellpopulation angereichert werden. Nachteil des Verfahrens ist jedoch, dass sich dieser Rezeptor auch auf der Oberfläche von Sertolizellen befindet (He et al., 2010). Deshalb müsste sich an die Methode des differentiellen Plattierens ein ausschließlich spermatogoniale Zellen erfassendes Isolationsverfahren, z.B. das im Rahmen dieser Doktorarbeit bereits eingesetzte MACS-Verfahren, anschließen.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Die real-time RT-PCR bestätigt wichtige durch Mikroarray-Analyse identifizierte spermatogonienexprimierte RNAs**

Aus der Mikroarray-Analyse wurden spermatogonien-spezifische Gene zur Validierung ausgewählt, die für die Aufklärung des Mechanismus der Spermatogoniogenese von Relevanz sein könnten und somit speziell Aufschluss auf die spermatogoniale Subpopulation der spermatogonialen Stammzellen geben. Dies waren zum einen Gene mit bedeutender Rolle für die Spermatogonienfunktion und zum anderen bekannte Pluripotenzgene aus anderen Stammzell-Systemen.

Der Vergleich der Genexpressionsratios zwischen Mikroarray-Analyse und real-time RT-PCR lieferte eine gute Übereinstimmung, wie aus den graphischen Darstellungen per Bland-Altman-Plot in Abschnitt 3.1.2.2 ersichtlich ist. Mit Ausnahme von KSP37, das deshalb nicht in graphische Darstellung implementiert wurde, waren sowohl alle Ratiodifferenzen als auch das experimentell ermittelte 95 %-Intervall klein. Dies bestätigt die hohe Zuverlässigkeit der Daten aus der verwendeten Mikroarray-Analyse. Qualitative Unterschiede in der Höhe der Expressionsratios werden vielfach in der größeren Sensitivität der real-time RT-PCR im Vergleich zur Mikroarray-Analyse begründet sein.

### **4.2 Die spermatogonien-spezifische Expression wichtiger Marker-Proteine wird durch Immunfärbung bestätigt**

Um die bereits auf mRNA-Ebene validierten Daten hinsichtlich ihrer Zuverlässigkeit weiterhin zu erhärten, wurde eine Validierung auf Proteinebene durchgeführt. Die Validierung auf Proteinebene war im Hodengewebe besonders wichtig, da während der Spermatogenese viele Regulationsprozesse posttranskriptional ablaufen. Durch diese zweite Validierung konnten verschiedene Ebenen der Genexpression verglichen werden. Mittels Immunhistochemie ist zwar kein direkter quantitativer Vergleich der Daten möglich. Die Methode ist dennoch ein gutes Werkzeug zur qualitativen Analyse der Proteinexpression, da die Expression der Marker einzelnen Zellen oder Zelltypen zugeordnet werden kann. Gleichzeitig können Koexpressionsprofile mit verschiedenen Markern einzelne Zellpopulationen näher beschreiben.

Durch Immunfärbungen wurde die Expression der Protein-Marker in verschiedenen Spermatogonientypen detektiert. Außerdem wurden verschiedene Subtypen der Spermatogonien diskriminiert. Während die Proteine CBL, DSG2, EXOSC10, RBM3, SNAP91, SPOC1, UCHL1 und

UTF1 hinsichtlich ihrer Expression in Spermatogonien nicht zwischen Spermatogonien mit und ohne nukleäre Rarefaktionszone (A dark-„Vakuole“) unterschieden, wurden die Proteine DMRT1 und KIT lediglich in Spermatogonien ohne Rarefaktionszone detektiert (s. Tab. 3.02, Abschnitt 3.2.4.10). In diese Kategorie fallen die Zelltypen A pale und B. Spermatogonien mit Rarefaktionszone, also A dark, waren dagegen DMRT1- und KIT-negativ.

Da bei der Verwendung von Zellkernmarkern in der Immunhistochemie sowie bei allen Immunfluoreszenz-Experimenten die Lokalisation der Nukleoli ohne gleichzeitige Verwendung von Nukleolusmarkern nur teilweise bzw. nicht erkennbar war, konnten die Spermatogonien nur bei entsprechenden Mehrfachmarkierungen in A pale- und B-Spermatogonien unterteilt werden. Deshalb wurde an einigen Stellen auf eine solche nähere Eingrenzung des markierten Spermatogonientyps verzichtet.

Mit Hilfe von Mehrfachmarkierungen konnten bestimmte Marker als koexprimiert bzw. als sich vollständig bzw. weitgehend ausschließend bestätigt werden (s. Tab. 3.04, Abschnitt 3.2.4.10). Im Folgenden werden diese Ergebnisse diskutiert.

### **4.2.1 FGFR3 und UTF1 als potentielle Marker für spermatogoniale Stammzellen**

Spermatogonien mit vielen FGFR3-Vesikeln (s. dazu auch Abb. 3.07 in Abschnitt 3.2.1.1) stellen eine Subpopulation der UTF1-positiven Spermatogonien dar (s. Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung mit FGFR3 und UTF1, Abschnitt 3.2.4.7). FGFR3 wurde ausschließlich, UTF1 vorwiegend in Zellen detektiert, die der *Lamina propria* unmittelbar aufliegen, entsprechend den spermatogonialen Subtypen A dark und A pale (s. Abb. 3.06 bzw. Abb. 3.09, Abschnitte 3.2.1.1 bzw. 3.2.1.2). In der *whole mount*-Analyse wurde FGFR3 in Zweier- und Viererklonen detektiert (s. Abb. 3.47, Abschnitt 3.2.5). Die hier beobachtete geringe Größe der FGFR3-positiven Klone deutet ebenfalls auf ein früheres Entwicklungsstadium der Spermatogonien hin, im Unterschied zu den oft größeren Klonen aus KIT-positiven Spermatogonien. Der Hinweis auf ein frühes Spermatogonienstadium, der markierte zelluläre Subtyp und die basale Lokalisation im Samenkanälchen sind ein Indiz dafür, dass es sich bei den FGFR3- bzw. den UTF1-positiven Spermatogonien um die Stammzellpopulation dieser Zellen handeln könnte. Diese Erkenntnisse stehen im Einklang mit den in der Literatur publizierten Daten über die beiden Marker, die im Folgenden diskutiert werden.

UTF1 wird vor allem in pluripotenten embryonalen Stammzellen exprimiert (Okuda et al., 1998). Die UTF1-Expression in embryonalen Stammzellen der Maus wird durch OCT4 reguliert (Nishimoto et al., 1999; 2005). Bei der Ratte wurde UTF1 in einer spermatogonialen Subpopulation von PLZF-positiven Zellen der Typen A single, A paired sowie in kurzen Ketten von A aligned



gefunden (van Bragt et al., 2008). Diesen sogenannten „undifferenzierten“ Spermatogonien wird Stammzellcharakter zugesprochen.

Fibroblastenwachstumsfaktoren, die Liganden der FGFRs, kontrollieren eine Vielzahl von Entwicklungsprozessen, darunter Proliferation, Überleben, Wanderung und Differenzierung von Zellen. Vor allem hat der FGF-Signalweg große Bedeutung für die Pluripotenzkontrolle verschiedener Stammzellen (Lanner & Rossant, 2010). Der Nachweis von entsprechenden Rezeptoren auf menschlichen Spermatogonien ist ein Hinweis auf deren Stammzellcharakter. FGF2, ein bekannter Ligand für FGFR3 (Cotton et al., 2008), wird in der Kultur humaner embryonaler Stammzellen eingesetzt. Unter bestimmten Bedingungen bewirkt er dabei die Proliferation der undifferenzierten Zellen, erkennbar an der Expression von Pluripotenzfaktoren. FGF2 trägt somit zur Selbsterhaltung dieser pluripotenten Zellen bei (Vallier et al., 2005; Wang et al., 2005a, b; Xu et al., 2005a, b). Eine ähnliche Funktion könnte dieser Wachstumsfaktor auch in Spermatogonien ausüben.

Die in der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung markierte UTF1-Population ist größer als die FGFR3-Population (s. Abschnitt 3.2.4.7). Diese Beobachtung spricht dafür, dass FGFR3 in einem kürzeren Zeitfenster als UTF1 exprimiert wird. Hierfür spricht außerdem, dass FGFR3 lediglich in Zellen detektiert wurde, die innerhalb der *Tubuli seminiferi* unmittelbar an der Basallamina lokalisiert sind, UTF1 jedoch zusätzlich in putativen B-Spermatogonien (rundkernige Zellen mit zusätzlicher KIT-Expression, s. Abschnitt 3.2.4.6 und Abb. 3.42). Außerdem wurden keine Überschneidungen in der Expression von FGFR3 mit DMRT1, jedoch leichte Überschneidungen von UTF1 mit DMRT1 und KIT (s. unten) detektiert.

Dass FGFR3 bereits im fetalen Hodengewebe (ab 19. Schwangerschaftswoche, für Immunhistochemie-Ergebnisse s. Abschnitt 3.2.2.7) nach dem Eintritt der Zellen in den mitotischen Arrest exprimiert wird, könnte weiterhin für die FGFR3-Expression in einer weitgehend mitotisch inaktiven Zellpopulation sprechen.

Ein eindeutiger Beweis dafür, dass es sich bei den FGFR3- und den UTF1-positiven Spermatogonien um die Stammzellpopulation handelt, müsste durch eine Xenotransplantation dieser Zellen in die Testes von infertilen Nagern erbracht werden. Dieser Versuchsansatz stellt bislang den einzigen funktionellen Assay für spermatogoniale Stammzellen in einer testikulären Zellpopulation dar. Ein solcher Versuch wurde unter Verwendung anderer Stammzellmarker, z.B. PLZF, bereits erfolgreich von Sadri-Ardekani et al. (2009) durchgeführt. In einer Zellkultur erzeugte Kolonien aus enzymverdaulichem humanem Hodengewebe mit PLZF-Expression waren nach Xenotransplantation in der Lage, innerhalb der *Tubuli seminiferi* der Versuchstiere zur Basallamina zu migrieren und nachfolgend dort zu kolonialisieren.

#### 4.2.2 Die Rolle von DMRT1 in der humanen Spermatogeniogenese

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde DMRT1 in einer Subpopulation von A pale- und B-Spermatogonien detektiert, nicht jedoch in A dark-Spermatogonien (s. Abschnitt 3.2.2.1). Im Folgenden werden die Ergebnisse aus den eigenen Koexpressionsanalysen im Hinblick auf mögliche funktionelle Zusammenhänge des DMRT1-Proteins mit der Expression anderer Proteine diskutiert. Matson et al. (2010) zeigten anhand eines konditionellen *Dmrt1*-Knockouts in der Maus, dass dieses Protein den unkontrollierten Eintritt von Spermatogonien in die Meiose verhindert. Sie interpretierten ihr Ergebnis dahingehend, dass DMRT1 innerhalb der Spermatogenese für die Transition von der proliferativen in die meiotische Phase verantwortlich ist (Matson et al., 2010; zusammengefasst in Don et al., 2011).

Bei den DMRT1-positiven A pale- und B-Spermatogonien im humanen Hoden könnte es sich demnach überwiegend um Zellen am Übergang von der mitotischen zur meiotischen Phase handeln. Diese Aussage wird durch das Ergebnis aus der Doppelmarkierung mit dem Differenzierungsmarker KIT gestützt (s. Abschnitt 3.2.4.4), in der doppelt positive A pale- und B-Spermatogonien beobachtet wurden. KIT (ohne DMRT1-Expression) wurde in diesem Experiment außerdem in kleineren Zellen und in größeren Zellklonen detektiert. Dabei könnte es sich um solche Spermatogonien handeln, bei denen der Pfad der Differenzierung bereits festgelegt ist. Das Maus-Homologe DMRT1 wird ebenfalls in A- und B-Spermatogonien beobachtet (Matson et al., 2010). Hier scheint jedoch ein größerer Anteil an Spermatogonien markiert gewesen zu sein als bei der vorliegenden Arbeit, bei der lediglich eine Subpopulation dieser Zellen DMRT1-positiv ist. Dieser Unterschied kann durch artspezifische Differenzen zwischen Maus und Mensch erklärt werden.

Zusätzlich wurde DMRT1 in mitotischen Spermatogonien des Menschen detektiert (s. Abb. 3.16 in Abschnitt 3.2.2.1). Hiermit könnte ein weiterer funktioneller Aspekt des DMRT1-Proteins während der Mitose angezeigt werden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass das Protein vor der Mitose gebraucht, jedoch nach vollendeter Funktion noch nicht abgebaut wurde oder aber vor der Mitose gebraucht wurde und nach der Mitose erneut benötigt wird und deshalb zwischenzeitlich nicht degradiert wird.

Eine Rolle von DMRT1 als Transkriptionsfaktor wurde von Krentz et al. (2009) sowie von Murphy et al. (2010) bei der Maus gezeigt. Die Interaktion zwischen dem DMRT1-Protein und dem *Utf1*-Gen bei der Maus wurde experimentell anhand der Bindungsfähigkeit von DMRT1 an den *Utf1*-Promotor bewiesen. Außerdem wurde bei einem konditionellen Knockout von *Dmrt1* in Keimzellen der Maus eine Aufregulation von UTF1 detektiert (Murphy et al., 2010). In der vorliegenden Doktorarbeit wurde ebenfalls der Hinweis auf eine mögliche Wechselwirkung von DMRT1 mit UTF1 gefunden. Abschnitt 3.2.4.1 stellt dar, dass sich die Proteinexpression von

DMRT1 und UTF1 in humanen Spermatogonien weitgehend reziprok verhält (s. dazu auch Tab. 3.04 in Abschnitt 3.2.4.10). Nur bei einem geringen Anteil der DMRT1-positiven Spermatogonien wurde eine UTF1-Expression beobachtet. DMRT1 wurde jedoch in keinem Fall in Spermatogonien mit vielen FGFR3-Vesikeln detektiert (s. dazu Abschnitt 3.2.4.2 und Tab. 3.04 in Abschnitt 3.2.4.10). DMRT1 scheint danach nicht in der spermatogonialen Subpopulation, die aufgrund der hier gewonnenen Erkenntnisse die potentielle spermatogoniale Stammzellpopulation darstellen könnte, exprimiert zu werden.

DMRT1 wurde vorwiegend in proliferierenden, d.h. KI-67-positiven, Spermatogonien detektiert (s. Abschnitt 3.2.4.3 und Tab. 3.04 in Abschnitt 3.2.4.10). Dies stimmt mit den Ergebnissen von Lei et al. (2007) überein, die das Protein in der Maus ebenfalls in proliferierenden Spermatogonien beobachtet hatten. Bei den wenigen DMRT1-positiven Spermatogonien ohne KI-67-Expression könnte es sich um nicht proliferierende, differenzierende B-Spermatogonien handeln. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass bei diesen Spermatogonien ein nicht angeschnittener und somit nicht detektierbarer, putativer mit KI-67 gefärbter Nukleolus das Proliferationsverhalten dieser Spermatogonien verdeckt.

Über mögliche funktionelle Aspekte des DMRT1-Proteins während der spermatogonialen Entwicklung lässt sich also zusammenfassend folgendes sagen: DMRT1 wird nicht in der potentiellen spermatogonialen Stammzellpopulation, aber in differenzierenden, KIT-positiven und proliferierenden Spermatogonien exprimiert. Weiterhin könnte das Protein eine Funktion während der spermatogonialen Mitose ausüben. In humanen A dark-Spermatogonien wird das Protein nicht exprimiert.

### **4.2.3 Die Rolle des spermatogonialen Differenzierungsmarkers KIT**

Der spermatogoniale Differenzierungsmarker c-Kit (Ogawa et al., 2000; Rossi et al., 2000) wurde in A pale- und B-Spermatogonien detektiert, nicht jedoch in A dark-Spermatogonien. In DMRT1-positiven Spermatogonien wurde eine schwache bis mittelstarke KIT-Expression beobachtet. Die kleineren KIT-positiven Zellen, die in ausgedehnteren Klonen vorkommen, sind jedoch DMRT1-negativ (s. Abschnitt 3.2.4.4). Letztgenannte Ergebnisse wurden bereits im Abschnitt 4.2.1.1 diskutiert.

Die meisten der KIT-positiven Spermatogonien exprimieren kein UTF1 (s. Abschnitt 3.2.4.6 und Tab. 3.04 in Abschnitt 3.2.4.10). Dies korreliert mit der Klassifizierung von c-Kit als Differenzierungsmarker von Spermatogonien (Ogawa et al., 2000; Rossi et al., 2000) und UTF1 als Pluripotenzmarker embryonaler Stammzellen (Okuda et al., 1998) und passt außerdem zu den in dieser Doktorarbeit gewonnenen Ergebnissen über die UTF1-Expression in potentiellen spermatogonialen Stammzellen (s.o.).

Bei der Mehrzahl der KIT-positiven Spermatogonien scheint es sich um proliferierende Zellen zu handeln, wie die Koexpression mit Proliferationsmarker KI-67 belegt (s. Abschnitt 3.2.4.5 und Tab. 3.04 in Abschnitt 3.2.4.10). Bei den selten vorkommenden KIT-positiven, aber KI-67-negativen Zellen könnte das Proliferationsverhalten durch einen nicht angeschnittenen Nukleolus maskiert sein.

#### **4.2.4 EXOSC10**

EXOSC10 ist ein klares Beispiel für die Regulation der Genexpression auf posttranskriptionaler Ebene. EXOSC10 wurde in der Mikroarray-Analyse nicht als spermatogonien-spezifisch erkannt, weil die mRNA keine deutlichen stadienspezifischen Mengenunterschiede in den Keimzellen zeigt. Das Protein fand sich jedoch überwiegend in Spermatogonien. Es wurde in den Zellkernen verschiedener Spermatogonientypen, jedoch nicht in allen A pale- und B-Spermatogonien detektiert (s. Abschnitt 3.2.2.2). Die auffälligsten Strukturen mit EXOSC10-Markierung im humanen Hoden sind die „Vakuolen“ in den Zellkernen der A dark-Spermatogonien. Diese „Vakuolen“ wurden von Clermont (1963; 1966; 1972), Tres & Solari (1968) und Rowley et al. (1971) als „Kavität“, „klarer Raum ohne scharfe Begrenzung mit 1 – 3 µm Durchmesser“ bzw. „Region der Rarefaktion“ im Sinne einer Verdünnungszone bezeichnet. Nach Clermont zeigte dieser Bereich im A dark-Spermatogonienkern die Präsenz schwach eosinophilen (1966) bzw. blass gefärbten Materials (1972). Tres & Solari (1968) sahen in dieser Region keine Chromatinfibrillen, aber eine blasse fibrilläre Matrix mit homogen verteilter Granula und verdichteter Peripherie. Paniagua et al. (1986) vermuteten, dass es sich um eine Nukleolus-ähnliche Struktur handelt. Bisher konnte die „vakuolenähnliche Struktur“ (Clermont, 1966) im A dark-Spermatogonien-Zellkern jedoch noch keiner spezifischen Substanz zugeordnet werden. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde erstmalig ein Protein identifiziert, das sich innerhalb dieser Rarefaktionszone befindet. Bei dem Protein EXOSC10 handelt es sich um eine eukaryotische Exosomkomponente, die, assoziiert mit dem Exosom-Grundgerüst, als 3'-5'-Exoribonuklease fungiert (Januszyk & Lima, 2010; zum RNA-Exosom s. auch Abschnitt 1.10.9 der Einleitung). Es ist bekannt, dass das EXOSC10-Protein beim Menschen sowohl als Komponente des nukleären Exosoms als auch des cytoplasmatischen Exosoms vorkommt (Chlebowski et al., 2010). Falls EXOSC10 innerhalb der Rarefaktionszone ebenfalls assoziiert mit dem Grundgerüst des RNA-Exosoms vorkäme, könnte dies bedeuten, dass sich in das nukleäre RNA-Exosom bei A dark-Spermatogonien innerhalb der „Vakuole“ befindet. Somit könnte diese Rarefaktionszone einen Ort von RNA-Degradierung und / oder -Prozessierung aller bekannten RNA-Klassen, inklusive nicht kodierender RNAs darstellen (zur Funktion des RNA-Exosoms s. Abschnitt 1.10.9

der Einleitung sowie Butler & Mitchell, 2010; Chlebowski et al., 2010; Januszyk & Lima, 2010; Mitchell & Tollervey, 2010).

Die A dark-„Vakuole“ könnte jedoch auch ein Speicherort für das Protein EXOSC10 sein, das seine Funktion erst in späteren Spermatogonienstadien erfüllt. Dafür spricht, dass neben dem Vorhandensein des Proteins innerhalb der „Vakuole“ dieses weiterhin in Spermatogonien-Zellkernen mit aufgelockerter Chromatinstruktur detektiert wurde. Möglicherweise stellen die vielfältigen Expressionsmuster (s. dazu Abb. 3.19 in Abschnitt 3.2.2.2) eine Umwandlung ruhender in proliferative Spermatogonien-Zellkerne dar. Eine mögliche Umwandlung von A dark- in A pale-Spermatogonien ist bereits 1986 von van Alphen & de Rooij in *Macaca mulatta* beschrieben worden, die in röntgenbestrahlten Hoden zuerst eine Abnahme der A pale-Spermatogonien und danach die erneute Zunahme dieses Zelltyps bei gleichzeitig abnehmender Anzahl an A dark-Spermatogonien festgestellt hatten. Wie aus den hier gewonnenen Ergebnissen geschlossen werden kann, könnte eine Transition von A dark-Spermatogonien über A cloudy- in A pale-Spermatogonien erfolgen und mit einer Auflockerung der kompakten Chromatinstruktur des A dark -Zellkerns mit nur einer „Vakuole“ zu einem aufgelockerterem Zellkern eines funktionellen Zustandes einhergehen. Mit einem solchen strukturellen Umbau könnte die beobachtete Umverteilung des EXOSC10-Proteins in Spermatogonien-Zellkernen verbunden sein.

EXOSC10 wurde des Weiteren in Nukleoli detektiert. In manchen Spermatogonien war das Protein ausschließlich in den Nukleoli zu finden (Kokalisation mit C23; s. Abb. 3.20 in Abschnitt 3.2.2.2). Selten beobachtet wurde dagegen die deutliche EXOSC10-Markierung von Nukleoli proliferierender Spermatogonien (Kokalisation mit KI-67; s. Abb. 3.21 in Abschnitt 3.2.2.2). Dies könnte einen funktionellen Aspekt des EXOSC10-Proteins beim Übergang von nicht-prolierenden in proliferierende Spermatogonien widerspiegeln.

Eine vom Kernexosom unabhängige Funktion, der Zusammenhang mit der zellzyklusabhängigen Lokalisation der Expression, wurde für das EXOSC10-Homolog dRrp6 aus *Drosophila melanogaster* angenommen (Graham et al., 2009). Auch im Falle der humanen Spermatogoniogenese könnten die EXOSC10-positiven Spermatogonien (vs. den EXOSC10-negativen Spermatogonien bzw. den KI-67-positiven Zellen) verschiedene Stadien des Zellzyklus der Spermatogonientypen A pale sowie B darstellen, da sowohl ovale als auch runde EXOSC10-positive Spermatogonien-Zellkerne neben KI-67-positiven A pale- und B-Spermatogonien detektiert wurden (nicht explizit abgebildet).

Eine Immunfluoreszenz-Mehrfachmarkierung mit Antikörpern gegen andere Komponenten des RNA-Exosoms könnte die Funktion des Proteins EXOSC10 in der A dark-„Vakuole“ aufklären.

Im Falle der Kolo­kalisierung der Proteine kann damit herausgefunden werden, ob es sich bei der Rarefaktionszone der A dark-Spermatogonien um ein nukleäres RNA-Exosom oder eher um einen Speicherort des EXOSC10-Proteins handelt.

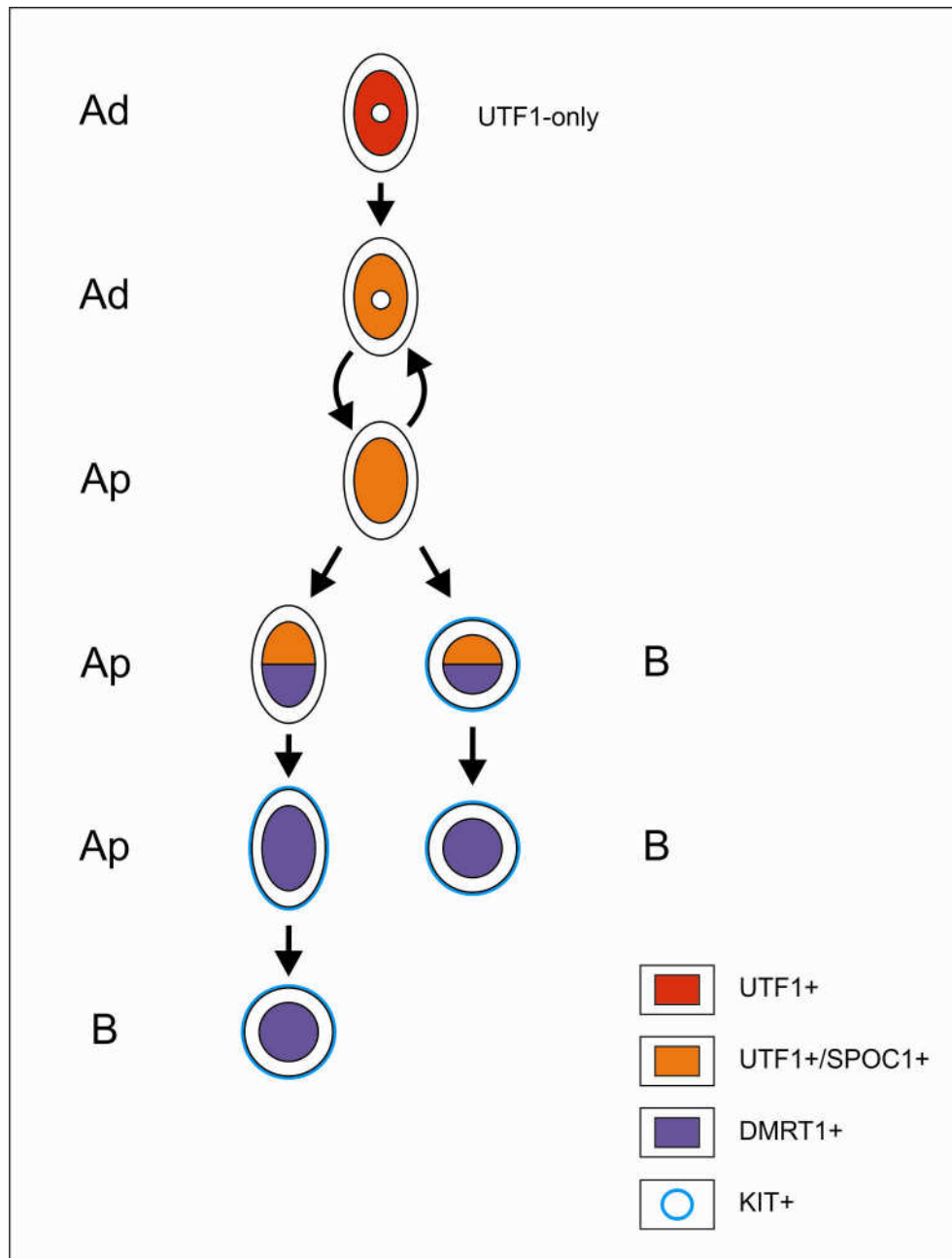
#### 4.2.5 Hypothesen zur Interpretation der generierten Daten

Das Schema in Abbildung 4.01 zeigt den Verlauf der Spermatogonienentwicklung von A dark-Spermatogonien über A pale- in B-Spermatogonien. Hierbei wurden die verschiedenen UTF1-/SPOC1-/DMRT1-Expressionsmuster zugrunde gelegt, als sich kontinuierlich verändernd betrachtet und in eine zeitliche Reihenfolge gebracht. Zellteilungsvorgänge bleiben bei dieser Art der Darstellung unberücksichtigt. KIT, als bekannter Differenzierungsmarker, wurde auf der Grundlage der durchgeführten Doppelmarkierungen mit UTF1 und DMRT1 in die Abbildung integriert.

Ausgegangen wird von einer A dark-Spermatogonie mit „ausschließlicher“ UTF1-Expression („UTF1-only“-Zelle, = oberste Zelle der Abbildung). Hierbei handelt es sich um einen sehr selten beobachteten Expressionstyp (s. hierzu auch Abb. 3.34 in Abschnitt 3.2.4.1). Neben diesem Expressionsmuster der A dark-Spermatogonien wurde (häufiger) die gleichzeitige Expression der Marker UTF1 und SPOC1 festgestellt (s. Abb. 4.01, 2. Zelle von oben). Dieses Muster trat auch in A pale-Spermatogonien auf (s. Abb. 4.01, 3. Zelle von oben). Die Pfeile zwischen der UTF1-positiven / SPOC1-positiven A dark-Spermatogonie und der UTF1-positiven / SPOC1-positiven A pale-Spermatogonie signalisieren die mögliche Umwandlung dieser Zelltypen ineinander (s. dazu auch Abschnitt 4.2.1.3 sowie Beschreibung zum Schema 4.02).

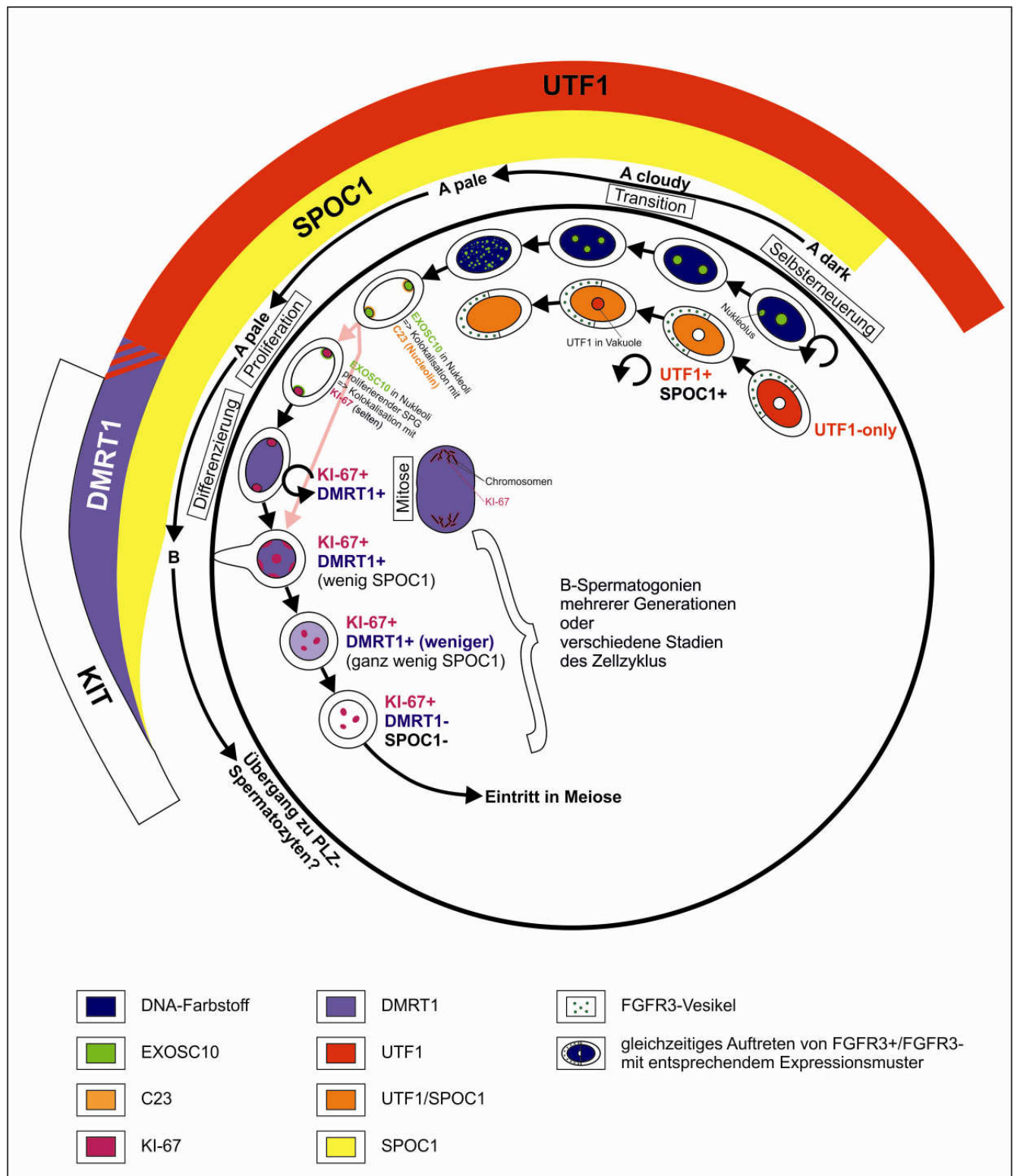
DMRT1-positive Spermatogonien waren meist UTF1-negativ. Nur in seltenen Fällen wurde neben der DMRT1-Expression auch eine UTF1-Expression beobachtet. Meistens war die UTF1-Menge in diesen Zellkernen aber gering. DMRT1-positive Zellen waren innerhalb der *Tubuli seminiferi* häufiger in weiter luminal gelegener Position zu finden (= Merkmal von B-Spermatogonien) im Vergleich zu den fast immer dicht an der Basallamina lokalisierten UTF1-positiven Zellen.

Sehr selten auftretende rundkernige UTF1-positive Zellen könnten B-Spermatogonien darstellen (s. Pfeil in Abb. 3.10; Abschnitt 3.2.1.2). Dazu werden auch die UTF1+/KIT+ Spermatogonien gerechnet (s. ovale Markierung in Abb. 3.42; Abschnitt 3.2.4.6). Aufgrund der UTF1-Expression in diesen Zellen kann vermutet werden, dass es, unabhängig von dem in Abb. 4.01 dargestellten Entwicklungspfad (links) auch eine direkte Entwicklung von A pale- zu B-Spermatogonien gibt. Dieser Weg würde ohne vorheriges „Abschalten“ der DMRT1-Expression vonstatten gehen (s. Abb. 4.01, rechter Entwicklungspfad).



**Abb. 4.01:** Schema der humanen Spermato gonien-Entwicklung bezogen auf die Expression der Marker UTF1, SPOC1, DMRT1 und KIT. Darstellung eines angenommenen chronologischen Verlaufs in der Entwicklung von A dark-Spermato gonien (Ad) über A pale- (Ap) zu B-Spermato gonien ohne Berücksichtigung zwischengeschalteter Zellteilungsschritte. Klongrößen wurden ebenfalls nicht berücksichtigt.

Das Schema in Abbildung 4.02 (s. nächste Seite) soll einen Überblick über die in dieser Arbeit ermittelten Daten zur Proteinexpression von Spermato gonien liefern sowie einen möglichen Gesamtzusammenhang darstellen. Hierbei bleiben zwischengeschaltete Zellteilungsvorgänge und die daraus resultierende Anzahl von Spermato gonien eines entsprechenden Expressionstyps unberücksichtigt.



**Abb. 4.02:** Gesamtschema der humanen Spermatogonienentwicklung bzgl. aller untersuchten Marker. Darstellung der Spermatogonienentwicklung (von oben rechts nach unten links) ausgehend von A dark-Spermatogonien über A cloudy- und A pale- zu B-Spermatogonien innerhalb eines *Tubulus seminiferus*. Die 2 parallelen Achsen des Übergangs von A dark- zu A pale-Spermatogonien (oben rechts) sind bezogen auf unterschiedliche Marker (EXOSC10 bzw. UTF1/SPOC1) und symbolisieren die gleiche Entwicklungsrichtung.



Das komplexe Schema bezieht sich auf die Expression der Proteine UTF1, SPOC1, DMRT1 und KIT (s. Expressionsverläufe, außen), die Umverteilung des Proteins EXOSC10 in verschiedene Kompartimente des Spermatogonien-Zellkerns (Zellen in oberer Reihe, von rechts beginnend) und auf das Erscheinen des Proliferationsmarkers KI-67 in unterschiedlichen Spermatogonientypen (pinkfarbene Nukleolus-Markierung in Zellen, im Schema am linken Tubulusrand eingezeichnet). Die Darstellung schließt die Fähigkeit zur Selbsterneuerung von A dark- und A pale-Spermatogonien ein (Ringpfeile).

Ausgehend von A dark-Spermatogonien mit einer EXOSC10-Lokalisation innerhalb der Rarefaktionszone könnte eine Transition dieser Zellen zu A pale mit einer Umverteilung des Proteins in verschiedene nukleäre Komponenten einhergehen. Dieser Weg der Zellumwandlung würde über Spermatogonien des Zelltyps „A cloudy“ mit einer EXOSC10-Expression in mehreren „Vakuolen“ zu A pale-Spermatogonien mit EXOSC10-Expression innerhalb von Nukleoli verlaufen (s. Zellen in oberer Reihe des Schemas, von rechts beginnend). Die EXOSC10-Lokalisation in den Nukleoli von Spermatogonien wurde per Kolokalisationsanalyse mit dem Nukleolusmarker C23 bewiesen (obere Reihe, 5. Zelle von rechts). Das EXOSC10-Protein wurde jedoch kaum in den Nukleoli proliferierender Zellen (KI-67+; 6. Zelle von rechts) detektiert.

Die meisten KI-67-positiven Spermatogonien exprimieren zusätzlich das DMRT1-Protein und werden hier als differenzierende Spermatogonien betrachtet (s. blaue Zellen am linken Rand). Der Expressionstyp KI-67+/DMRT1+ tritt sowohl bei A pale- als auch bei B-Spermatogonien auf. Diese doppelte Markierung wurde gleichfalls bei mitotischen Zellen beobachtet, was auf einen zusätzlichen funktionellen Aspekt von DMRT1 während der spermatogonialen Mitose hindeutet. In der *whole mount*-Analyse (s. Abschnitt 3.2.5) wurden in proliferierenden, putativen B-Spermatogonien drei verschiedene Expressionsmuster mit jeweils abnehmender Expressionsstärke der Proteine DMRT1 und SPOC1 beobachtet. Die Zellen sind in Schema 4.02 mit einer geschweiften Klammer (s. links unten) markiert. In Abb. 3.51 sind die entsprechenden Zellgruppen mit Pfeilen gekennzeichnet (blau, lila und orangefarbener Pfeil rechts unten). Diese Zellen könnten entgegen der klassischen Interpretation, die von nur einer Generation an B-Spermatogonien beim Menschen ausgeht (zusammengefasst in de Rooij & Russell, 2000), B-Spermatogonien verschiedener Generationen oder aber auch unterschiedliche Stadien des Zellzyklus darstellen. Wann hierbei der Übergang zu den Preleptotän-Spermatozyten mit anschließendem Eintritt der Zellen in die Meiose erfolgt, konnte aus den generierten Daten nicht abgeleitet werden.

Der Differenzierungsmarker KIT wurde in DMRT1-positiven Spermatogonien detektiert (s. weißen Expressionsbalken links). Zusätzlich wurde eine KIT-Expression in kleinen Zellen

festgestellt, die in größeren Zellverbänden vorkommen (s. eingekreiste Zellen in Abb. 3.38 A in Abschnitt 3.2.4.4). Diese DMRT1-negativen Zellen könnten die letzte im Schema abgebildeten Zelle repräsentieren (s. Abb. 4.02, unten links). Die genauere Einordnung der KIT-Expression bzgl. der DMRT1-/SPOC1-/UTF1-Expression ist in Schema 4.01 beschrieben.

Das Schema 4.02 berücksichtigt weiterhin die Entwicklung von A dark- zu A pale-Spermatogonien bezogen auf die UTF1-/SPOC1-Expression (untere Parallelreihe, von rechts oben beginnend; s. hierzu auch ausführlichere Darstellung in Abb. 4.01). Die „UTF1-only“-A-dark-Spermatogonie geht in eine gleichzeitig UTF1- und SPOC1-exprimierende Zelle über. Bei einigen mit dem DNA-Farbstoff als A dark-Spermatogonien erscheinenden Zellen wurde UTF1 innerhalb der Rarefaktionszone detektiert (orangefarbene Zelle mit rot ausgefüllter Rarefaktionszone im Schema; nicht im Ergebnisteil abgebildet). Demnach könnte auch anhand der UTF1-Markierung ein Übergangszustand zwischen A dark- und A pale-Spermatogonien detektiert worden sein (eventuell Übergang von A dark zu A cloudy). UTF1-/SPOC1-positive Zellen traten mit und ohne FGFR3-Vesikel in ihrem Cytoplasma auf. Diese Vesikel waren überwiegend bei Zellen mit einem hohen UTF1-Anteil im Vergleich zum SPOC1-Anteil im Zellkern zu finden. Die FGFR3-Vesikel könnten die sich selbsterneuernden spermatogonialen Stammzellen kennzeichnen.

## 5 Ausblick

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde eine humane spermatogoniale Subpopulation identifiziert, die als Kandidat für die spermatogonialen Stammzellen betrachtet werden kann. Dabei handelt es sich sehr wahrscheinlich um einen Zelltyp mit dem Expressionsmuster UTF1+/FGFR3+/DMRT1-/KIT-. Durch Optimierung des Isolationsprotokolls sollte in Zukunft versucht werden, eine bessere Anreicherungsquote der UTF1-positiven Spermatogonien zu erzielen. Danach können die Zellen in Kultur genommen werden, einhergehend mit der Entwicklung und Etablierung eines optimalen Kultursystems. Zu berücksichtigen sind dabei die Daten aus den aktuellen Publikationen zur Kultivierung humaner Spermatogonien (veröffentlicht in: Conrad et al., 2008; Golestaneh et al., 2009; Kossack et al., 2009; Sadri-Ardekani et al., 2009; He et al., 2010; Mizrak et al., 2010). Ob es sich bei den FGFR3-/UTF1-positiven Spermatogonien tatsächlich um die Stammzellpopulation dieser Zellen handelt, müsste mittels Xenotransplantation, beispielsweise in infertile Mauslinien, getestet werden (s. hierzu auch Transplantationsversuch von Sadri-Ardekani et al., 2009).

Durch weitere Gesamtpräparationen von *Tubuli seminiferi (whole mount)* und anschließende Immunfluoreszenzfärbung mit cytoplasmatischen Spermatogonienmarkern sollte versucht werden, die genauen Klongrößen von Spermatogonien mit bestimmten Proteinexpressionsmustern bzw. der einzelnen spermatogonialen Subtypen zu bestimmen. Weitere Hinweise auf die funktionelle Bedeutung der in dieser Arbeit verwendeten Marker könnte die Testung dieser mittels Immunhistochemie / Immunfluoreszenz an verschiedenen Testispathologien (z.B. mJ-Scores 3 und 5) erbringen. Mit diesen Methoden könnte der Mechanismus der humanen Spermatogoniogenese aufgeklärt werden.

Eine erfolgreiche Inkulturnahme humaner spermatogonialer Stammzellen und die Aufklärung der Spermatogoniogenese könnten weitere Grundlagen, Erkenntnisse und Möglichkeiten für die Behandlung männlicher Fertilitätsstörungen, die Restitution der Spermatogenese nach einer Radiatio und / oder Chemotherapie und die regenerative Medizin liefern.

## 6 Zusammenfassung

Spermatogonien sind die frühesten Vorläuferzellen der Spermatozoen im adulten männlichen Organismus. Sie umfassen eine adulte Population mit Stammzell-Eigenschaften. Diese bilden durch ständige Selbsterneuerung und Differenzierung den Ausgangspunkt für eine lebenslange Spermatogenese im erwachsenen männlichen Organismus.

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden durch die Auswertung von Mikroarray-Daten und deren Validierung auf mRNA- und Proteinebene spermatogonien-spezifische Gene identifiziert. Zusätzlich wurden mittels Immunhistochemie weitere Spermatogonien-Marker untersucht. Mit Immun-Mehrfachfärbungen wurden anschließend verschiedene Marker-Kombinationen getestet, um Erkenntnisse über den molekularen Phänotyp verschiedener Subpopulationen und über die bislang noch nicht identifizierten spermatogonialen Stammzellen zu gewinnen. Hierbei zeigte sich eine unerwartete Heterogenität der Spermatogonien in Bezug auf die exprimierten Marker und keine einfache Korrelation des molekularen Phänotyps mit der bereits in den 1960- und 1970er Jahren festgelegten morphologischen Zelltypisierung. Neben einer Vielzahl an koexprimierten bzw. überlappenden Markern wurden einige sich hinsichtlich ihrer Expression ausschließende Marker detektiert.

Als gute Kandidaten für die Subpopulation der adulten Stammzellen innerhalb der gesamten Spermatogonienpopulation wurden Zellen mit dem molekularen Phänotyp UTF1+/FGFR3+/DMRT1-/KIT- ermittelt. Die folgenden Ergebnisse dieser Arbeit liefern Argumente für UTF1 und FGFR3 als humane spermatogoniale Stammzellmarker: FGFR3 wurde niemals in proliferierenden Spermatogonien gefunden. Auch kam dieser Marker nicht zusammen mit DMRT1 vor. DMRT1 wurde als weitgehend mit dem Differenzierungsmarker KIT koexprimiert gefunden und könnte in der humanen Spermatogoniogenese funktionell eine ähnliche Rolle wie KIT spielen. UTF1 wurde kaum in differenzierenden, KIT-positiven Spermatogonien detektiert und war nur in seltenen Fällen als mit DMRT1 koexprimiert zu finden. Dagegen wurde FGFR3 in einer Subpopulation der UTF1-positiven Spermatogonien beobachtet. Untersuchungen an fetalem Testisgewebe zeigten außerdem, dass FGFR3 im humanen Hoden bereits von fetalen Keimzellen exprimiert wird.

Spermatogoniale Stammzellen sind näher an der *Lamina propria* gelegen bzw. sitzen dieser direkt auf. Hierbei handelt es sich um eine Subpopulation der spermatogonialen Zelltypen A dark und A pale. Hingegen stellen die B-Spermatogonien eine differenzierte Form der Spermatogonien dar. Diese nehmen innerhalb der *Tubuli seminiferi* eine von der Basallamina weiter entfernte Position ein. Die in dieser Arbeit identifizierten molekularen Marker FGFR3 und UTF1

wurden größtenteils in Zellen detektiert, die sich unmittelbar an der *Lamina propria* befinden, also in „früheren“, „undifferenzierteren“ Zellen. Dagegen wurden DMRT1 und KIT niemals in A dark-Spermatogonien detektiert, aber oftmals in Zellen, die weiter von der Basallamina entfernt lokalisiert waren.

Die humanen A dark-Spermatogonien enthalten innerhalb des nukleären Chromatins eine vakuolenähnliche Struktur (Rarefaktionszone), von der man weiß, dass sie sich nicht mit DNA-Farbstoffen, jedoch schwach mit Eosin anfärben lässt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte der A dark-„Vakuole“ erstmalig eine Substanz, das Protein EXOSC10, zugeordnet werden. Dieses Protein stellt eine bekannte eukaryotische Exosomkomponente dar. Für die A dark-Spermatogonien könnte dies bedeuten, dass sich das nukleäre RNA-Exosom innerhalb der „vakuolen“-ähnlichen Struktur dieses Zelltyps befindet. Andererseits könnte die A dark-„Vakuole“ auch ein Speicherort für das Protein EXOSC10 sein. Gleichzeitig deutete sich ein funktioneller Zusammenhang des EXOSC10-Proteins mit der Umwandlung von ruhenden in proliferierende Spermatogonien an.

Aufgrund der klonalen Vermehrung sollten „undifferenziertere“ Spermatogonien in kleinen Klonen und „differenzierte“ auch in größeren Klonen vorkommen. Die Tatsache, dass FGFR3 in der *whole mount*-Analyse ausschließlich in Zweier- und Viererklonen detektiert wurde, unterstützt die oben aufgeführte Argumentation hinsichtlich einer potentiellen Stammzellfunktion dieses Proteins. Hingegen wurde der Differenzierungsmarker KIT auch in größeren Zellklonen, also „späteren“ Entwicklungsstadien von Spermatogonien, beobachtet.

Der im Rahmen dieser Studie detektierte spermatogoniale Oberflächenmarker FGFR3 diente deshalb abschließend zur Isolierung der FGFR3-positiven spermatogonialen Subpopulation. Hiermit wurde die Grundlage für die Kultivierung dieser Zellpopulation gelegt.

## 7 Literatur, Quellen aus dem Internet

- Alberts et al., 2008, *Molecular biology of the cell*, 5. Auflage, Garland Science New York, USA; Abington, UK.
- Altorfer et al., 1974, Desmosomes in human seminiferous epithelium, *B Cell Path* 16: 181 – 194.
- Amann R.P., 2008, The cycle of the seminiferous epithelium: a need to revisit? *J Androl* 29: 469 – 487.
- Bland & Altman, 1986, Statistical Methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement, *Lancet* i: 307 – 310.
- Bland & Altman, 1999, Measuring agreement in method comparison studies, *Stat Methods Med Res* 8: 135 – 160.
- Branca A., 1924, Les canalicules testiculaires et la spermatogénèse de l'homme. (Étude cytologique.) *Arch Zool exp* 62: 53 – 252.
- Burger & de Kretser, 1981, *The testis*, 2<sup>nd</sup> ed., Raven Press New York.
- Butler & Mitchell, 2010, Rrp6, Rrp47 and cofactors of the nuclear exosome, *Adv Exp Med Biol* 702: 91 – 104.
- Campbell N. A., 2000, *Biologie*, 2. korrigierter Nachdruck, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Cancilla et al., 2000, Discrete cell- and stage-specific localization of fibroblast growth factors and receptor expression during testis development, *J Endocrinol* 164: 149 – 159.
- Cattoretti et al., 1992, Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections, *J Pathol* 168 (4): 357 – 363.
- Chen et al., 2004, RNase activity requires formation of disulfide bonds and is regulated by the redox state, *Plant Mol Biol* 55 (1): 83 –96.
- Cheng et al., 2005, Desmosomal cell adhesion in mammalian development, *Eur J Cell Biol* 84: 215 – 213.
- Chlebowski et al., 2010, Catalytic properties of the eukaryotic exosome, *Adv Exp Med Biol* 702: 63 – 78.
- Chomczynski & Sacchi, 1987, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal Biochem* 162: 156 – 159.
- Clermont & Leblond, 1955, Spermiogenesis of man, monkey, ram and other mammals as shown by the “periodic acid-Schiff” technique, *Am J Anat* 96: 229 – 253.
- Clermont Y., 1963, The Cycle of the seminiferous epithelium in man, *Am J Anat* 112: 35 – 51.
- Clermont Y., 1966, Renewal of spermatogonia in man, *Am J Anat* 118: 509 – 524.
- Clermont & Bustos-Obregon, 1968, Re-examination of spermatogonial renewal in the rat by means of semiferous tubules mounted “in toto”, *Am J Anat* 122 (2): 237 – 247.

- Clermont, Y., 1969, Two classes of spermatogonial stem cells in the monkey (*Cercopithecus aethiops*), *Am J Anat* 126: 57 – 72.
- Clermont, Y., 1972, Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal, *Physiol Rev* 52 (1): 198 – 236.
- Conrad et al., 2008, Generation of pluripotent stem cells from adult human testis, *Nat* 456: 344 - 349.
- Cotton et al., 2008, Cellular signaling by fibroblast growth factors (FGFs) and their receptors (FGFRs) in male reproduction, *Endocr Rev* 29 (2): 193 – 216.
- Coy & Vasiljewa, 2010, The exosome and heterochromatin, multilevel regulation of gene silencing, *Adv Exp Med Biol* 702: 105 – 121.
- D'Amico et al., 2009, State of the art in antigen retrieval for immunohistochemistry, *J Immunol Methods* 341: 1 – 18.
- Day & Thompson, 2010, UCHL1 (PGP9.5): Neuronal biomarker and ubiquitin system protein, *Prog Neurobiol* 90: 327 – 362.
- De Felici et al., 2009, In or out stemness: comparing growth factor signalling in mouse embryonic stem cells and primordial germ cells, *Curr Stem Cell Res Ther* 4 (2): 87 – 97.
- de Jong et al., 2008, Differential expression of SOX17 and SOX2 in germ cells and stem cells has biological and clinical implications, *J Pathol* 215: 21 – 30.
- de Kretser & Holstein, 1976, Testicular biopsy and abnormal germ cell, Hafez, ESE (ed), *Human semen and fertility regulation in men*, Mosby St. Louis: 332 – 343.
- Deng et al., 1996, Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth, *Cell* 84 (6): 911 – 921.
- de Rooij & Russell, 2000, All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask, *J Androl* 21 (6): 776 – 798.
- Don et al., 2011, DMRT1 at the border between mitoses and meiosis, *Asian J Androl* 13: 189 – 190.
- Dresios et al., 2005, Cold stress-induced protein Rbm3 binds 60S ribosomal subunits, alters microRNA levels, and enhances global protein synthesis, *PNAS* 102 (6): 1865 – 1870.
- Duchrow, M., 2003, Klonierung, Charakterisierung und Funktionsanalyse des proliferationsassoziierten Ki-67 Antigens, *Kumulative Habilitationsschrift*, Lübeck.
- Dym & Fawcett, 1971, Further observations on the number of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis, *Biol Reprod* 4: 195 – 215.
- Ehmcke et al., 2005, Clonal organization of proliferating spermatogonial stem cells in adult males of two species of non-human primates, *Macaca mulatta* and *Callithrix jacchus*, *Biol Reprod* 72: 293 – 300.
- Ehmcke & Schlatt, 2006, A revised model for spermatogonial expansion in man: lessons from non-human primates, *Reprod* 132: 673 – 680.

- Ehmcke & Schlatt, 2008, Identification and characterization of spermatogonial subtypes and their expansion in whole mounts and tissue sections from primate testes, *Methods Mol Biol* 450 (1): 109 – 118.
- Eshkind et al., 2002, Loss of desmoglein 2 suggests essential functions for early embryonic development and proliferation of embryonal stem cells, *Eur J Cell Biol* 81 (11): 592 – 598.
- Eswarakumar et al., 2005, Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors, *Cytokine Growth Factor Rev* 16: 139 – 149.
- Feig, C., 2007, Anwendung der Mikroarray-Technologie für eine globale Charakterisierung der Spermatogenese des Menschen und seiner Pathologien, Dissertation, Hamburg.
- Feig et al., 2007, A new paradigm for profiling testicular gene expression during normal and disturbed human spermatogenesis, *Mol Hum Reprod* 13 (1): 33 – 43.
- Frackman et al., 1998, Betaine and DMSO: Enhancing agents for PCR, *Promega Notes* 65: 27.
- Frankenhuis et al., 1982, Spermatogenesis in the boar, *Vet Q* 4 (2): 57 – 61.
- Fukuda et al., 1975, Ultrastructure of developing germ cells in the fetal human testis, *Cell Tiss Res* 161: 55 – 70.
- Fukushima et al., 1998, Characterization of functional domains of an embryonic stem cell coactivator UTF1 which are conserved and essential for potentiation of ATF-2 activity, *J Biol Chem* 273 (40): 25840 – 25849.
- Fukushima et al., 1999, Carboxy-terminally truncated form of a coactivator UTF1 stimulates transcription from a variety of gene promoters through the TATA box, *Biochem Biophys Res Commun* 258: 519 – 523.
- Gaskell et al., 2004, Immunohistochemical profiling of germ cells within the human fetal testis: Identification of three subpopulations, *Biol Reprod* 71: 2012 – 2021.
- Geissler et al., 1991, Stem cell factor (SCF), a novel hematopoietic growth factor and ligand for c-kit tyrosine kinase receptor, maps on human chromosome 12 between 12q14.3 and 12qter, *Somat Cell Mol Genet* 17 (2): 207 – 214.
- Gerdes et al., 1983, Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation, *Int J Cancer* 31: 13 – 20.
- Gerdes et al., 1984, Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67, *J Immunol* 133: 1710 – 1715.
- Gjerstorff et al., 2007, MAGE-A1, GAGE and NY-ESO-1 cancer / testis antigen expression during human gonadal development, *Hum Reprod* 22 (4): 953 – 960.
- Golestaneh et al., 2009, Pluripotent stem cells derived from adult human testes, *Stem Cells Dev* 18 (8): 1115 – 1126.
- Goriely et al., 2009, Activating mutations in *FGFR3* and *HRAS* reveal a shared genetic origin for congenital disorders and testicular tumors, *Nat Genet* 41 (11): 1247 – 1252.



- Graham et al., 2009, Core exosome-independent Rrp6 in cell cycle progression, *Mol Biol Cell* 20: 2242 – 2253.
- Hamra et al., 2002, Production of transgenic rats by lentiviral transduction of male germ-line stem cells, *PNAS* 99 (23): 14931 – 14936.
- Hamra et al., 2004, Defining the spermatogonial stem cell, *Dev Biol* 269: 393 – 410.
- Hamra et al., 2005, Self renewal, expansion, and transfection of rat spermatogonial stem cells in culture, *PNAS* 102 (48): 17430 – 17435.
- Hamra et al., 2008, Isolating highly pure rat spermatogonial stem cells in culture, *Methods Mol Biol* 450: 163 – 179.
- He et al., 2010, Isolation, characterization, and culture of human spermatogonia, *Biol Reprod* 82: 363 – 372.
- Hermann et al., 2009, Molecular dissection of the male germ cell lineage identifies putative spermatogonial stem cells in rhesus macaques, *Hum Reprod* 24 (7): 1704 – 1716.
- Hermann et al., 2010, Spermatogonial stem cells in higher primates: are there differences from those in rodents? *Reprod* 139: 479 – 493.
- Hernandez-Verdun & Gautier, 1994, The chromosome periphery during mitosis, *Bioessays* 16 (3): 179 – 185.
- Herrid et al., 2007, Characterization of germ cells from pre-pubertal bull calves in preparation for germ cell transplantation, *Cell Tissue Res* 330: 321 – 329.
- Heyderman, E., 1979, Immunoperoxidase technique in histopathology: applications, methods, and controls, *J Clin Path* 32: 971 – 978.
- Holstein et al., 1987, Morphology of normal and malignant germ cells, *Int J Androl* 10: 1 – 18.
- Hôte et al., 2004, Cell responses to FGFR3 signalling: growth, differentiation and apoptosis, *Exp Cell Res* 304: 417 – 431.
- Januszyk & Lima, 2010, Structural components and architectures of RNA exosomes, *Adv Exp Med Biol* 702: 9 – 28.
- Jezek et al., 1998, Successful testicular sperm extraction (TESE) in spite of high serum follicle stimulating hormone and azoospermia: correlation between testicular morphology, TESE results, semen analysis and serum hormone values in 103 infertile men, *Hum Reprod* 13 (5): 1230 – 1234.
- Johansson et al., 2010, Phosphorylated nucleolin interacts with translationally controlled tumor protein during mitosis and with Oct4 during interphase in ES cells, *Plos One* 5 (10): e13678.
- Johnsen S., 1970, Testicular biopsy score count – a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males, *Hormones* 1: 2 – 25.
- Juul et al., 2007, Preserved fertility in a non-mosaic Klinefelter patient with a mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene: Case report, *Hum Reprod* 22 (7): 1907 – 1911.

- Kales et al., 2010, Cbl and human myeloid neoplasms: the Cbl oncogene comes of age, *Cancer Res* 70: 4789 – 4794.
- Key et al., 1993, New Ki-67-equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope, *Lab Invest* 68 (6): 629 – 636.
- Kill, I. R., 1996, Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus – evidence for a fibrillar-deficient region of the dense fibrillar component, *J Cell Sci* 109: 1253 – 1263.
- Kinkley et al., 2009, SPOC1: a novel PHD-containing protein modulating chromatin structure and mitotic chromosome condensation, *J Cell Sci* 122: 2946 – 2956.
- Knippers, R., 2001, *Molekulare Genetik*, 8. neu bearbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- Kossack et al., 2009, Isolation and characterization of pluripotent human spermatogonial stem cell-derived cells, *Stem Cells* 27 (1): 138 – 149.
- Krentz et al., 2009, The DM domain protein DMRT1 is a dose-sensitive regulator of fetal germ cell proliferation and pluripotency, *PNAS* 106 (52): 22323 – 22328.
- Kristensen et al., 2008, Presumed pluripotency markers UTF-1 and REX-1 are expressed in human adult testes and germ cell neoplasms, *Hum Reprod* 23 (4): 775 – 782.
- Langdon et al., 1989, The c-cbl proto-oncogene is preferentially expressed in thymus and testis tissue and encodes a nuclear protein, *J Virol* 63 (12): 5420 – 5424.
- Lanner & Rossant, 2010, The role of FGF/Erk signalling in pluripotent cells, *Dev* 137: 3351 – 3360.
- Lardenois et al., 2010, Execution of the meiotic noncoding RNA expression program and the onset of gametogenesis in yeast require the conserved exosome subunit Rps6, *PNAS* 108 (3): 1058 – 1063.
- Latendresse et al., 2002, Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid, *Toxicol Pathol* 30: 524.
- Lee et al., 2002, Control genes and variability: Absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies, *Genome Res* 12: 292 – 297.
- Lei et al., 2007, Sex-specific differences in mouse DMRT1 expression are both cell type- and stage-dependent during gonad development, *Biol Reprod* 77 (3): 466 – 475.
- Lei et al., 2009, Distinct transcriptional mechanisms direct expression of the rat *Dmrt1* promoter in Sertoli cells and germ cells of transgenic mice, *Biol Reprod* 81: 118 – 125.
- Liu et al., 2002, The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility, *Cell* 111: 209 – 218.
- Lleonart, M. E., 2010, A new generation of proto-oncogenes: cold-inducible RNA binding proteins, *Biochim Biophys Acta* 1805: 43 – 52.

- Looijenga et al., 2006, Genomic and expression profiling of human spermatocytic seminomas: primary spermatocyte as tumorigenic precursor and DMRT1 as candidate chromosome 9 gene, *Cancer Res* 66 (1): 290 – 301.
- Luo et al., 2009, Asymmetric distribution of UCH-L1 in spermatogonia is associated with maintenance and differentiation of spermatogonial stem cells, *J Cell Physiol* 220: 460 – 468.
- Martinez-Friaz et al., 1991, Epidemiological aspects of Mendelian syndromes in a Spanish population sample: I. Autosomal dominant malformation syndromes, *Am J Med Genet* 38: 622 – 625.
- Matson et al., 2010, The mammalian doublesex homolog DMRT1 is a transcriptional gatekeeper that controls the mitosis versus meiosis decision in male germ cells, *Dev Cell* 19: 612 – 624.
- Mauduit et al., 1999, Stem cell factor/c-kit system in spermatogenesis; *Hum Reprod* 5 (5): 535 – 545.
- Miltenyi et al., 1990, High gradient magnetic cell separation with MACS, *Cytometry* 11: 231 – 238.
- Mitchell & Tollervey, 2010, Finding the exosome, *Adv Exp Med Biol* 702: 1 – 8.
- Mizrak et al., 2010, Embryonic stem cell-like cells derived from adult human testis, *Hum Reprod* 25 (1): 158 – 167.
- Mohrmann et al., 2005, SPOC1, a novel PHD-finger protein: association with residual disease and survival in ovarian cancer, *Int J Cancer* 116: 545 – 554.
- Mueller et al., 2004, RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA Quality Control, Agilent Technologies.
- Mullis et al., 1986, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 (1): 263 – 273.
- Murphy et al., 2010, Genome-wide analysis of DNA binding and transcriptional regulation by the mammalian doublesex homolog DMRT1 in the juvenile testis, *PNAS* 107 (30): 13360 – 13365.
- Musso et al., 2006, Betaine, Dimethyl Sulfoxide, and 7-Deaza-dGTP, a powerful mixture for amplification of GC-rich DNA sequences, *JMD* 8 (5): 544 – 550.
- Nakatsu & Ohno, 2003, Adaptor protein complexes as the key regulators of protein sorting in the post-golgi network, *Cell Struct Funct* 28: 419 – 429.
- Nieschlag, E., 2000, *Andrologie, Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*, 2. Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- Nieschlag E., Behre H.M., Nieschlag S., 2009, *Andrologie, Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*, 3. Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg.

- Nishimoto et al., 1999, The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox2, *Mol Cell Biol* 19 (8): 5053 – 5065.
- Nishimoto et al., 2005, Oct-3/4 maintains the proliferative embryonic stem cell state via specific binding to a variant octamer sequence in the regulatory region of the UTF1 locus, *Mol Cell Biol* 25 (12): 5084 – 5094.
- Odorizzi et al., 1998, The AP-3 complex: a coat of many colours, *Trends Cell Biol* 8: 282 – 288.
- Ogawa et al., 2000, Transplantation of male germ line stem cells restores fertility in infertile mice, *Nat Med* 6: 29 – 34.
- Okuda et al., 1998, UTF1, a novel transcriptional coactivator expressed in pluripotent embryonic stem cells and extra-embryonic cells, *EMBO J* 17 (7): 2019 – 2032.
- Ornitz & Leder, 1992, Ligand Specificity and heparin dependence of fibroblast growth factor receptors 1 and 3, *J Biol Chem* 267 (23): 16305 – 16311.
- Paniagua et al., 1986, Ultrastructural observations on nucleoli and related structures during human spermatogenesis, *Anat Embryol* 174: 301 – 306.
- Pearson, K., 1901, On lines and planes of closest fit to systems of points in space, *Phil Mag* 2 (6): 559 – 572.
- Pelliniemi et al., 1993, Embryological and prenatal development and function of Sertoli cells, Russel L.D., Griswold M.D. (eds), *The Sertoli cell*, Cache River Press, Illinois: 87 – 113.
- Pfaffl et al., 2002, Relative expression software tool (REST©) for group wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR, *Nucleic Acids Res* 30 (9): E 36.
- Polanska et al., 2009, Extracellular interactome of the FGF receptor-ligand system: complexities and the relative simplicity of the worm, *Dev Dyn* 238: 277 – 293.
- Ramakers et al., 2003, Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data, *Neurosci Lett* 339: 62 – 66.
- Raymond et al., 1998, Evidence of evolutionary conservation of sex-determining genes, *Nat* 391: 691 – 695.
- Raymond et al., 1999, Expression of DMRT1 in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development, *Dev Biol* 215: 208 – 220.
- Raymond et al., 2000, Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation, *Genes Dev* 14: 2587 – 2595.
- Rickelt et al., 2008, Subtypes of melanozytes and melanoma cells distinguished by their intercellular contacts: heterotypic adherens junctions, adhesive associations, and dispersed desmoglein 2 glycoproteins, *Cell Tissue Res* 334: 401 – 422.
- Roosen-Runge & Barlow, 1953, Quantitative studies on human spermatogenesis, *Amer J Anat* 93 (2): 143 – 169.

- Rossi et al., 2000, Role of c-kit in mammalian spermatogenesis, *J Endocrinol Invest* 23 (9): 609 – 615.
- Rowley et al., 1971, The ultrastructure of four types of human spermatogonia, *Z Zellforsch* 112: 139 – 157.
- Sadri-Ardekani et al., 2009, Propagation of human spermatogonial stem cells in vitro, *JAMA* 302 (19): 2127 – 2134.
- Schmitt et al., 2007, Homo- and heterotypic cell contacts in malignant melanoma cells and Desmoglein 2 as a novel solitary surface glycoprotein, *J Invest Dermatol* 127: 2191 – 2206.
- Schulze, W., 1978, Licht- und elektronenmikroskopische Studien an den A-Spermatogonien von Männern mit intakter Spermatogenese und bei Patienten nach Behandlung mit Antandrogenen, *Andrologia* 10: 307 – 320.
- Schulze W., 1981, Normal and abnormal spermatogonia in the human testis, *Fortschritte der Andrologie* 7: 33 – 45.
- Schulze W. et al., 1999, Testicular sperm extraction: comprehensive analysis with simultaneously performed histology in 1418 biopsies from 766 subfertile men, *Hum Reprod* 14 (Suppl 1): 82 – 96.
- Seyffert, W., 2003, *Lehrbuch der Genetik*, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin.
- Spiess et al., 2004, Trehalose is a potent PCR enhancer: lowering of DNA melting temperature and thermal stabilization of Taq polymerase by the disaccharide trehalose, 2004, *Clin Chem* 50: 1256 – 1259.
- Spiess et al., 2007, Cross-platform gene expression signature of human spermatogenic failure reveals inflammatory-like response, *Hum Reprod* 22: 2936 – 2946.
- Spiess et al., 2008, Highly accurate sigmoidal fitting of real-time PCR data by introducing a parameter for asymmetry, *BMC Bioinformatics* 9: 221.
- Starborg et al., 1996, The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression, *J Cell Sci* 109: 143 – 153.
- Steger et al., 1998, The proliferation of spermatogonia in normal and pathological human seminiferous epithelium: an immunohistochemical study using monoclonal antibodies against Ki-67 protein and proliferating cell nuclear antigen, *Mol Hum Reprod* 4 (3): 227 – 233.
- Strachan & Read, 2005, *Molekulare Humangenetik*, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Tres & Solari, 1968, The ultrastructure of the nuclei and the behaviour of the sex chromosomes of human spermatogonia, *Z Zellforsch* 91: 75 - 89.

- Turnbull et al., 2010, Variants near DMRT1, TERT and ATF7IP are associated with testicular germ cell cancer, *Nat Genet* 42 (7): 604 – 608.
- Uhlén et al., 2005, A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics, *Mol Cell Proteomics* 4 (12): 1920 - 1932.
- Uhlén et al., 2008, RBM3 as a marker for breast cancer prognosis, European Patent Application EP2090890.
- Vallier et al., 2005, Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells, *J Cell Sci* 118 (19): 4495 – 4509.
- van Alphen & de Rooij, 1986, Depletion of the seminiferous epithelium of the rhesus monkey, *Macaca mulatta*, after X-irradiation, *Br J Cancer* 53 (Suppl. VII): 102 – 104.
- van Alphen et al., 1988, Repopulation of the seminiferous epithelium of the rhesus monkey after X irradiation, *Radiat Res* 113: 487 – 500.
- van Bragt et al., 2008, Expression of the pluripotency marker UTF1 is restricted to a subpopulation of early A spermatogonia in rat testis, *Reprod* 136: 33 - 40.
- van den Boom et al., 2007, UTF1 is a chromatin-associated protein involved in ES cell differentiation, *J Cell Biol* 178: 913 – 924.
- van Dijk et al., 2000, Stem cell factor induces phosphatidylinositol 3'-kinase-dependent Lyn/Tec/Dok-1 complex formation in hematopoietic cells, *Blood* 96: 3406 – 3413.
- Wang et al., 2005a, Human embryonic stem cells maintained in the absence of mouse embryonic fibroblasts or conditioned media are capable of hematopoietic development, *Blood* 105: 4598 – 4603.
- Wang et al., 2005b, Noggin and bFGF cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers, *Biochem Biophys Res Commun* 330: 934 – 942.
- Wang et al., 2010, Expression of UTF1 in primary and metastatic testicular germ cell tumors, *Anat Pathol* 134: 604 – 612.
- Wartenberg H., 1976, Comparative cytomorphologic aspects of the male germ cells, especially of the "Gonia", *Andrologia* 8 (2): 117 – 130.
- Wartenberg, 1981, Differentiation and development of the testes, In: *The testis* (Burger H., de Kretser D.M., eds), 2<sup>nd</sup> ed., Raven Press New York: 39 – 80.
- Weinbauer et al., 2009, Biopsie und Histologie der Hoden, In: *Andrologie, Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes* (Nieschlag E., Behre H.M., Nieschlag S., eds), 3. Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg: 16 – 56.
- Wojcik & Dobrucki, 2008, Interaction of a DNA intercalator DRAQ5, and a minor groove binder SYTO17, with chromatin in live cells – influence on chromatin organization and histone-DNA interactions, *Cytometry A*: 73A: 555 – 562.
- Xu et al., 2005a, Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium, *Stem Cells* 23: 315 – 323.

Xu et al., 2005b, Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells, *Nat Methods* 2 (3): 185 – 190.

Yarden et al., 1987, Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand, *EMBO J* 6 (11): 3341 – 3351.

Yerushalmi et al., 2010, Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential, *Lancet Oncol* 11: 174 – 183.

Yoshinaga et al., 1991, Role of c-kit in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function, *Dev* 113: 689 – 699.

Young, R. A., 2011, Control of the embryonic stem cell state, *Cell* 144: 940 – 954.

Zeiss (Firma Carl Zeiss), Live-cell imaging techniques, Carl Zeiss MicroImaging, MicroImaging Online Campus, [<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/livecellimaging/techniques.html>].

[1] <http://www.uniprot.org>

[2] <http://biogps.gnf.org>

[3] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

[4] <http://www.expasy.org>

[5] [http://www.travedsl.de/~micduc/ki67\\_uebersicht.html](http://www.travedsl.de/~micduc/ki67_uebersicht.html); *Die Ki-67-Seite*

[6] <http://www.ebi.ac.uk/interpro>

[7] <http://www.ihcworld.com>

[8] <http://www.miltenyibiotec.com>

[9] <http://www.proteinatlas.org>

[10] <http://www.embryology.ch>

## 8 Anhang

### Berechnungen zur Erstellung der Bland-Altman-Plots

Gen	A 2-3	R 2-3	A 2-3 (ln)	R 2-3 (ln)	lnA-lnR	(lnA+lnR)/2
FGFR3	9.8149	17.1720	2.28390164	2.84328015	-0.55937851	2.56359089
PIWIL2	3.3352	3.0040	1.20453265	1.09994473	0.10458791	1.15223869
ECAT8	2.4036	2.4567	0.87696761	0.89881899	-0.02185137	0.88789330
LIN28B	2.1773	2.2599	0.77808558	0.81532056	-0.03723499	0.79670307
DDX4	14.5983	21.4579	2.68090508	3.06609288	-0.38518779	2.87349898
MSI2	2.9762	2.0181	1.09064732	0.70215647	0.38849084	0.89640190
SPOC1	1.1218	1.9091	0.11493454	0.64663193	-0.53169739	0.38078323
DSG2	3.0669	2.9811	1.12066728	1.09229236	0.02837492	1.10647982
SOX2	0.8666	0.2696	-0.14317777	-1.31081590	1.16763813	-0.72699683
mean					0.01708242	
SD					0.53259523	
SD*1.96					1.04388665	
mean+1.96*SD					1.06096907	
mean-1.96*SD					-1.02680423	

Tab. A01: Vergleich der Genexpressionsratios zwischen mJ-Score 2 und 3.

Gen	A 2-5	R 2-5	A 2-5 (ln)	R 2-5 (ln)	lnA-lnR	(lnA+lnR)/2
FGFR3	47.2803	47.0314	3.85609372	3.85081546	0.00527825	3.85345459
PIWIL2	14.9778	17.1419	2.7065691	2.84152576	-0.13495665	2.77404743
ECAT8	10.5137	30.9187	2.35267917	3.43136118	-1.07868201	2.89202017
KSP37	0.3899	0.4181	-0.94186498	-0.87203464	-0.06983034	-0.90694981
LIN28B	13.1372	10.2121	2.5754479	2.32357329	0.25187461	2.4495106
DDX4	164.5548	118.907	5.10324365	4.77834167	0.32490197	4.94079266
MSI2	0.9268	2.8062	-0.07601749	1.03183125	-1.10784874	0.47790688
SPOC1	1.6627	5.1096	0.50844279	1.63112112	-1.12267834	1.06978196
DSG2	5.7467	3.059	1.74862578	1.11808807	0.63053771	1.43335692
SOX2	0.1047	0.4156	-2.25665616	-0.87803202	-1.37862414	-1.56734409
mean					-0.36800277	
SD					0.72933241	
SD*1.96					1.42949152	
mean+1.96*SD					1.06148875	
mean-1.96*SD					-1.79749429	

Tab. A02: Vergleich der Genexpressionsratios zwischen mJ-Score 2 und 5.



Gen	A 2-10	R 2-10	A 2-10 (ln)	R 2-10 (ln)	lnA-lnR	(lnA+lnR)/2
<b>FGFR3</b>	33.6094	50.6306	3.51480579	3.92455614	-0.40975035	3.71968096
<b>PIWIL2</b>	12.5312	19.1719	2.52822153	2.95344567	-0.42522413	2.7408336
<b>ECAT8</b>	7.8944	45.6637	2.06615365	3.82130367	-1.75515002	2.94372866
<b>KSP37</b>	0.2193	0.65	-1.51731462	-0.43078292	-1.08653171	-0.97404877
<b>LIN28B</b>	11.2082	21.6901	2.41664565	3.07685594	-0.66021028	2.74675079
<b>DDX4</b>	235.183	217.7188	5.46036393	5.38320432	0.07715961	5.42178413
<b>MSI2</b>	0.9469	1.433	-0.05456179	0.35977015	-0.41433194	0.15260418
<b>SPOC1</b>	1.1695	4.3787	0.15657631	1.47675188	-1.32017557	0.81666409
<b>DSG2</b>	3.867	5.0493	1.35247901	1.61924962	-0.26677061	1.48586432
<b>SOX2</b>	0.1624	0.3735	-1.81769285	-0.98483727	-0.83285558	-1.40126506
<b>mean</b>					-0.70938406	
<b>SD</b>					0.54759443	
<b>SD*1.96</b>					1.07328508	
<b>mean+1.96*SD</b>					0.36390103	
<b>mean-1.96*SD</b>					-1.78266914	

Tab. A03: Vergleich der Genexpressionsratios zwischen mJ-Score 2 und 10.

## **Danksagung**

Ich möchte mich bedanken

bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Schulze für die Auswahl des spannenden Themas sowie seine freundliche und allzeit geduldige Unterstützung, vor allem bei der Bereitstellung der humanen Hodengewebe,

bei Frau Prof. Dr. Christiane Kirchhoff für die gute wissenschaftliche Betreuung, die ausführlichen und interessanten thematischen Diskussionen sowie ihren großen persönlichen Einsatz im Zusammenhang mit der Verlängerung des DFG-Projektes,

bei Frau Prof. Dr. Iris Bruchhaus für die bereitwillige Übernahme der Korrektur,

bei Herrn Dr. Andrej-Nikolai Spiess für seine ständige Diskussionsbereitschaft, seine Anregungen und guten Ideen, sein Engagement bzgl. des Spermatogonienprojektes und das Korrekturlesen dieser Arbeit,

bei allen genannten sowie den bisher ungenannten Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Andrologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf für das nette, familiäre Arbeitsklima,

bei Herrn Prof. Dr. Hans Will und Frau Dr. Hannah Staeger sowie der gesamten Arbeitsgruppe der Abteilung Virologie des Heinrich-Pette-Institutes Hamburg für die gerätetechnische Unterstützung, die Hilfe bei der Dateninterpretation und die zeitaufwändige Betreuung beim konfokalen Mikroskopieren,

bei Herrn Stefan Ficke für die Einarbeitung in die Immunhistochemie-Experimente,

bei Herrn Dr. Rudolph Reimer aus der Abteilung Elektronenmikroskopie des Heinrich-Pette-Institutes Hamburg für die gerätetechnische Unterstützung,

bei Frau Dr. Elisabeth Kremmer vom Helmholtz Zentrum München für die Überlassung des SPOC1-Antikörpers,

bei Herrn Prof. Dr. Michael Primig von der Universität Rennes für die Überlassung von Antikörpern und die interessanten Diskussionen,

bei Herrn Dr. Markus Geißen aus der Klinik für Gefäßmedizin des Universitären Herzzentrums Hamburg für die gerätetechnische Unterstützung,

bei Herrn Prof. Dr. Volker Steinkraus und seinen Mitarbeiterinnen aus dem Dermatologikum Hamburg für die Aufbereitung des humanen Hodengewebes sowie

bei den Patienten der Andrologie für die Zurverfügungstellung von Hodenbiopsien zu Forschungszwecken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dipl.-Ing. Alexander von Kopylow und Frau Dipl.-Biol. Anja Winkler für die Plausibilitätskontrolle und das Lesen dieser Doktorarbeit sowie die moralische Unterstützung.

Kathrein von Kopylow, im August 2011