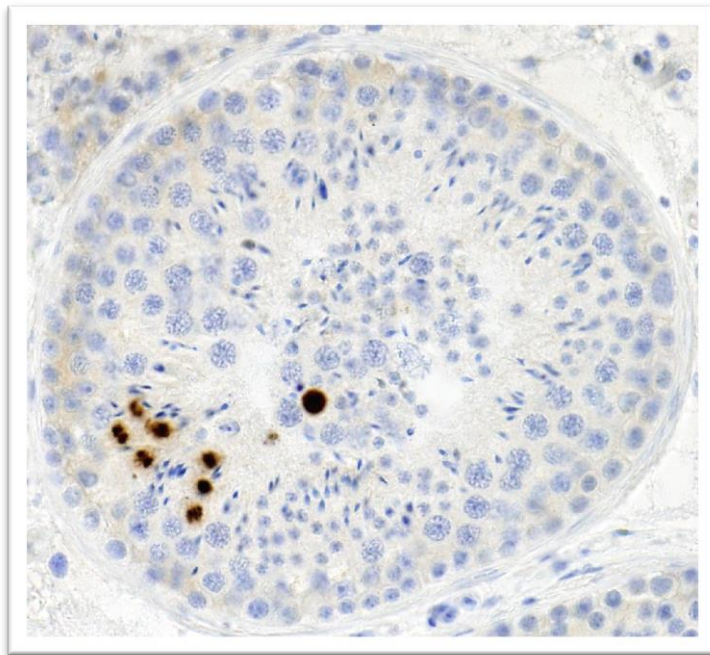


Immunhistochemische Analyse
der späten Stadien der Spermatogenese
zur Klassifikation infertiler
Patienten



Anna Elisabeth Hentrich

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Immunhistochemische Analyse
der späten Stadien der Spermatogenese
zur Klassifikation infertiler
Patienten

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Anna Elisabeth Hentrich
aus Zwickau

Gießen 2015

Aus dem Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Justus-Liebig-Universität Gießen

Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. Hans-Rudolf Tinneberg

Gutachter: PD Dr. L. Konrad

Gutachter: Prof. Dr. A. Meinhardt

Tag der Disputation: 02.11.2015

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Aufbau des Hodens..... | 1 |
| 1.2 | Zellen des Keimepithels | 2 |
| 1.2.1 | Sertoli-Zellen..... | 3 |
| 1.2.2 | Keimzellen | 3 |
| 1.3 | Spermatogenese..... | 5 |
| 1.3.1 | Normaler Ablauf der Spermatogenese | 5 |
| 1.3.2 | Stadien der Spermatogenese..... | 7 |
| 1.3.3 | Störungen und Evaluation der Spermatogenese | 8 |
| 1.4 | Markerproteine für testikuläre Zelltypen..... | 10 |
| 1.4.1 | Smad3 | 10 |
| 1.4.2 | CREM-1 | 11 |
| 1.4.3 | Histone..... | 12 |
| 1.5 | Wozu die Quantifizierung der verschiedenen Keimzellstadien?..... | 13 |
| 1.6 | Zielsetzung der Arbeit | 13 |
| 2 | Material und Methoden..... | 15 |
| 2.1 | Biopsien | 15 |
| 2.1.1 | Biopsien von humanen Hoden | 15 |
| 2.1.2 | Biopsien von Hoden der Ratte und der Maus | 16 |
| 2.1.3 | Herstellung von Paraffinschnitten..... | 16 |
| 2.2 | Immunhistochemie | 16 |
| 2.2.1 | Immunhistochemische Färbung mit dem EnVision™ Detektionssystem | 16 |
| 2.2.2 | Durchführung der EnVision™ Methodik (DAKO) | 17 |
| 2.3 | Auszählung der detektierten Zellen | 20 |
| 2.4 | Dokumentation der Ergebnisse | 21 |
| 2.5 | Untersuchung der Anti – Histon - Antikörper | 21 |
| 2.6 | Verwendete Materialien..... | 21 |
| 3 | Ergebnisse | 24 |
| 3.1 | Ergebnisse der immunhistochemischen Markersuche..... | 25 |
| 3.1.1 | UTF-1 als Marker für Spermatogoniensubtypen | 25 |
| 3.1.2 | Androgenrezeptor als Marker für Sertoli-Zellen | 25 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.1.3 | Smad3 als Marker für Spermatozyten | 25 |
| 3.1.4 | Histon H3Serin10-P als Marker für meiotische Teilungen der Spermatozyten | 30 |
| 3.1.5 | CREM-1 als Differenzierungsmarker für runde Spermatiden | 33 |
| 3.2 | Quantifizierung von Sertoli-Zellen und Keimzellen an humanen Hodenbiopsien..... | 36 |
| 3.2.1 | Auswertung der Hodenbiopsien | 36 |
| 3.2.2 | Kategorisierung der Spermatogenesedefekte der infertilen Patienten ... | 38 |
| 3.3 | Vergleichende Auswertung der Patienten mit normaler Spermatogenese oder Spermatozytenarrest zu Patienten mit Hypospermatogenese..... | 42 |
| 3.3.1 | Auswertung der Immunhistochemie der Hypospermatogenese im Vergleich | 42 |
| 3.3.2 | Kategorisierung der normalen Spermatogenese, Spermatozytenarrest und Hypospermatogenese im Vergleich | 44 |
| 3.4 | Weitere immunhistochemische Untersuchungen mit Histonen | 45 |
| 3.4.1 | Acetylierte Histone | 46 |
| 3.4.2 | Methylierte Histone | 55 |
| 3.4.3 | Phosphorylierte Histone | 59 |
| 4 | Diskussion..... | 60 |
| 4.1 | Immunhistochemische Markersuche | 60 |
| 4.2 | Lokalisation von Smad3 | 60 |
| 4.3 | Proteinlokalisierung von phosphoryliertem Histon H3 an der Position Serin 10 (H3Ser10-P) | 62 |
| 4.4 | Proteinlokalisierung von CREM-1 | 64 |
| 4.5 | Quantifizierung von Sertoli-Zellen und Keimzellen bei humanen Hodenbiopsien..... | 66 |
| 4.6 | Interpretation der Histonergebnisse..... | 68 |
| 4.6.1 | Acetylierte Histone | 68 |
| 4.6.2 | Methylierte Histone | 71 |
| 5 | Zusammenfassung..... | 75 |
| 6 | Summary..... | 77 |
| 7 | Abkürzungsverzeichnis | 78 |
| 8 | Tabellen- und Abbildungsverzeichnis | 80 |
| 9 | Literaturverzeichnis | 83 |

| | | |
|----|---------------------------------|----|
| 10 | Publikationsverzeichnis..... | 89 |
| 11 | Erklärung zur Dissertation..... | 90 |
| 12 | Danksagung | 91 |

1 Einleitung

Infertilität ist definiert als Ausbleiben einer Schwangerschaft trotz ungeschützten Geschlechtsverkehrs innerhalb eines Jahres (Nieschlag et al., 2009). Nach WHO-Daten liegt die Ursache zu 39% bei der Frau, zu 20% beim Mann, zu 26% bei beiden und ist zu 15% ungeklärt. Schätzungen gehen davon aus, dass bis zu 15% aller deutschen Paare infertil sind, insgesamt bleiben ca. 3-4% aller Paare nach reproduktionsmedizinischer Behandlung ungewollt kinderlos (Nieschlag et al., 2009).

Im Laufe ihres Lebens sind circa 7% aller Männer mit Problemen ihrer Zeugungsfähigkeit konfrontiert. Die Prävalenz der Infertilität beim Mann liegt somit höher als die des Diabetes Mellitus, welcher gerne als Volkskrankheit bezeichnet wird (Nieschlag et al., 2009). Für den Mangel an Spermien im Ejakulat kann eine Störung im Spermientransport durch Obstruktion oder eine Störung bei der Keimzellreifung verantwortlich sein.

Um die Infertilität eines Paares diagnostizieren zu können, ist es wichtig, beide Partner zu untersuchen. Eine entscheidende Rolle spielt dabei die Anamnese und körperliche Untersuchung. Zur Diagnostik des Mannes gehören weiterhin die Bestimmung der Laborparameter FSH, LH und Testosteron sowie eine Sonographie des Hodens und eine Untersuchung des Ejakulates (Schultheiss, 2005). Eine Indikation zur Hodenbiopsie ist nach den Richtlinien der „European Association of Urology“ (EAU) nur therapeutisch zur Gewinnung von Spermien oder diagnostisch zum Ausschluss intraepithelialer Neoplasien zu stellen (Bergmann, 2005; näheres s. Material und Methoden). Die Biopsie erlaubt eine histologische Beurteilung mit Klassifikation und Evaluierung der Spermatogenese.

1.1 Aufbau des Hodens

Der Hoden ist ein paarig angelegtes männliches Geschlechtsorgan, welcher sowohl für die Produktion von Spermien (Spermatogenese) als auch für die Synthese von männlichen Geschlechtshormonen wie Testosteron (Steroidogenese) verantwortlich ist (Welsch, 2010). Der Hoden ist von einer Bindegewebsschicht, der Tunica albuginea, umgeben, von der Bindegewebssepten das Organinnere durchziehen und den Hoden in ca. 250-300 Hodenläppchen (Lobuli) unterteilen. Im bindegewebigen Interstitium befinden sich die Testosteron-produzierenden Leydig-Zellen, Makrophagen, Gefäße und Nervenfasern. Zwischen den bindegewebigen Anteilen befindet sich das tubuläre

Kompartiment (Weinbauer et al., 2009). Jedes Läppchen enthält ca. 1-3 spiralgig verlaufende Samenkanälchen (Tubuli seminiferi), in denen die Spermatogenese stattfindet. Jedes Samenkanälchen ist ca. 30-80 cm lang und von einer Lamina propria umgeben, welche eine Basallamina, Kollagenfasern und Peritubulärzellen enthält (Welsch, 2010). Bei diesen Zellen handelt es sich um Myofibroblasten mit der Fähigkeit zu spontanen Kontraktionen, durch die die reifen Spermien an den Ausgang der Samenkanälchen transportiert werden (Weinbauer et al., 2009). Die Spermien münden in das Rete testis und anschließend in die Ductuli efferentes im Nebenhoden (Welsch, 2010). Insgesamt ist beim humanen Hoden 22-32 Meter pro cm^3 keimtragendes Epithel vorhanden. Bei der Maus sind es ca. 16-26 Meter pro cm^3 und bei der Ratte ca. 11 Meter pro cm^3 (Kerr et al., 2006).

1.2 Zellen des Keimepithels

Im Keimepithel der Samenkanälchen befinden sich Sertoli-Zellen und Keimzellen.

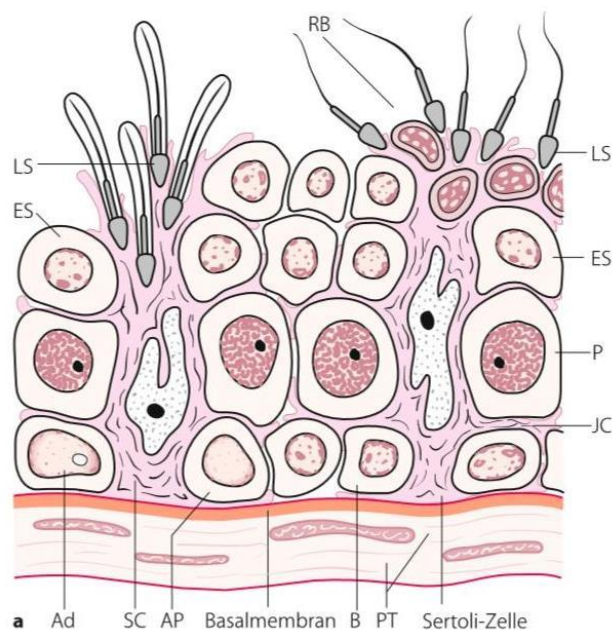


Abbildung 1 zeigt den Aufbau des Keimepithels. Die Tubuluswand ist aus einer Basallamina und Peritubulärzellen (PT) aufgebaut. RB = Residualkörperchen, LS = elongierte Spermatozoen, ES = runde Spermatozoen, P = Spermatozyte, Ad = A dark – Spermatogonie, AP = A pale – Spermatogonie, B = B – Spermatogonie, SC = Sertoli-Zelle, JC = Zell-Zell-Kontakte zwischen den Sertoli-Zellen, die die Blut-Hoden-Schranke ausbilden (Weinbauer et al., 2009).

1.2.1 Sertoli-Zellen

Bei den Sertoli-Zellen handelt es sich um die Zellen, die auf der Basallamina aufsitzen, sich bis zum Lumen des Tubulus erstrecken (Abb.1) und eine Stützfunktion für die Keimzellen haben (Welsch, 2010). Die Keimzellen differenzieren sich entlang der Zellkörper. Die Sertoli-Zellen bilden untereinander Zell-Zell-Kontakte aus (tight junctions), wodurch eine Abgrenzung in ein basales und adluminales Kompartiment erfolgt (Welsch, 2010). Im basalen Kompartiment befinden sich die Stammzellen und frühen Keimzellen. Diese Abgrenzung wird als Blut-Hoden-Schranke bezeichnet und dient zur Ausbildung eines abgeschlossenen Milieus, durch welches die Spermienentwicklung ablaufen kann und die haploiden Zellen vor dem Immunsystem geschützt sind (Bergmann, 2005). Des Weiteren sind die Sertoli-Zellen für die Ernährung der Keimzellen und für die Phagozytose von abgestorbenen Zellen oder von Zytoplasmaanteilen verantwortlich. Die Sertoli-Zellen besitzen als einzige Zellen im Keimepithel Rezeptoren für Testosteron und FSH und triggern dadurch ebenso wie durch die eigene Sekretion vieler Faktoren die Spermatogenese (Bergmann, 2005). Jeder Sertoli-Zelle kann je nach Spezies eine bestimmte Anzahl an Keimzellen zugeordnet werden; diese Anzahl ist höchstwahrscheinlich ein Maß für die Quantität der Spermatogenese (Johnson et al., 2008).

1.2.2 Keimzellen

Basal im Tubulus liegend, befinden sich die Spermatogonien (Abb.1), von denen ein Teil mitotisch aktiv ist (Bergmann, 2005). Ein anderer Teil der Spermatogonien stellt den Stammzellpool der Keimzellen dar (Clermont, 1963). Im menschlichen Hoden können drei verschiedene Subtypen unterschieden werden: A_{dark} , A_{pale} - und B-Spermatogonien (Abb.1 und 2).

Die A_{dark} - Spermatogonien weisen einen dunklen Zellkern mit hellen Vakuolen auf und stellen nach heutigen Erkenntnissen den Hauptteil des Stammzellpools dar. A_{dark} - Spermatogonien zeigen keine bis geringe Proliferationsaktivität (Weinbauer et al., 2009). Die A_{pale} sind durch ihren milchglasartigen Kern charakterisiert (Clermont, 1963). Aus einer A_{pale} - Spermatogonie entwickelt sich durch mitotische Teilung jeweils eine neue A_{pale} - Spermatogonie; aus der anderen Tochterzelle differenziert sich eine Typ B - Spermatogonie, welche einen Zellkern mit feinen Chromatingranula aufweist (Clermont, 1963). Im Ratten- und Maushoden finden sich mehr Spermatogonienstadien als im menschlichen Hoden. Davon zählen A_s als Stammzellen und die proliferierenden Spermatogonien A_{pr} und A_{ai} zu den undifferenzierten Spermatogonien. Zu den

differenzierten Spermatogonien gehören die sechs Generationen A1, A2, A3, A4, Intermediär- und B-Spermatogonien (de Rooij und Russell, 2000; Hermo et al., 2010). Spermatogonien zeigen bei ihrer mitotischen Teilung eine unvollständige Zytokinese, wodurch die Zellen über Interzellularbrücken in Kontakt bleiben und die Zellklone sich synchron differenzieren können (Bergmann, 2005). Aus Typ B-Spermatogonien entwickeln sich durch Meiose primäre Spermatozyten (Hermo et al., 2010), welche einen großen Zellkern aufweisen und sich weiter luminal befinden als die Spermatogonien (Abb.1 und 2). Je nach der Kondensation der Chromosomen und dem jeweiligen Zellstadium können Spermatozyten in präleptotän, leptotän, zygotän, pachytän und diplotän unterschieden werden (Hermo et al., 2010; Abb. 2). Nach der ersten Reduktionsteilung liegen sekundäre Spermatozyten vor, welche durch die zweite Reifeteilung zu runden Spermatisden werden (Welsch, 2010). Diese runden Spermatisden sind teilungsinaktiv und differenzieren sich im Laufe der Spermiogenese durch Umwandlung über elongierte Spermatisden zu Spermatozoen (Bergmann, 2005). Während dieser Differenzierungsschritte nimmt das Zytoplasma der Zellen immer mehr ab und der Zellkern verändert sich von rund zu elongiert. Die Spermatozoen werden ins Lumen des Tubulus abgegeben und werden durch die Kontraktionen der Peritubulärzellen über das Rete testis in den Nebenhoden transportiert und dort gespeichert (Welsch, 2010).

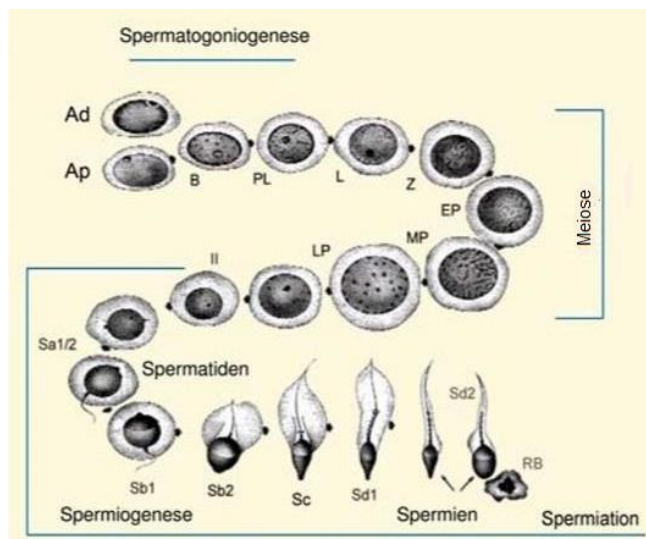


Abbildung 2 zeigt schematisch die Keimzelltypen in den aufeinander folgenden Entwicklungsstufen. Ad = A_{dark}, Ap= A_{pale}, B= Typ B-Spermatogonien, PL = präleptotäne, L = leptotäne, z= zygotäne, EP = frühe pachytäne, MP = mittlere pachytäne, LP = späte pachytäne primäre Spermatozyten, II = 2. Meiotische Reifeteilung, Sa1- Sd2 = Spermiogenesestadien der Spermatisden, RB = Residualkörperchen (Weinbauer et al., 2009).

1.3 Spermatogenese

1.3.1 Normaler Ablauf der Spermatogenese

Als Spermatogenese wird die Keimzellentwicklung von basal nach adluminal im Tubulus bezeichnet, an deren Ende haploide Spermatozoen in das Tubuluslumen abgegeben werden (Welsch, 2010). Beim Menschen dauert dieser Prozess etwa 74 Tage. Die Spermatogenese gliedert sich in vier Phasen (Weinbauer et al., 2009):

1. die mitotische Proliferation und Differenzierung der Spermatogonien
2. die meiotische Reifeteilung der Spermatozyten
3. die Differenzierung der haploiden Spermatischen zu Spermatozoen (Spermiogenese)
4. die Freisetzung der Spermatozoen in das Tubuluslumen (Spermiation)

Bei den diploiden Spermatogonien handelt es sich vom Chromosomengehalt her um normale Körperzellen mit 46 Chromosomen. Der DNA-Gehalt kann mit $2n2C$ angegeben werden (n = Chromosom, C = Chromatid; Bergmann, 2005). Die A_{dark} -Spermatogonien stellen den größten Stammzellpool dar. Die meisten A_{pale} -Spermatogonien sind mitotisch aktiv und erneuern sowohl den Pool der A_{pale} -Spermatogonien, differenzieren sich aber auch zu Typ B-Spermatogonien weiter (Weinbauer et al., 2009). Diese wiederum entwickeln sich zu präleptotänen Spermatozyten, welche mit der Verdopplung des DNA-Gehaltes beginnen, sodass jeweils zwei Chromatiden vorliegen. Primäre Spermatozyten besitzen einen DNA-Gehalt von $2n4C$. Die Prophase der primären Spermatozyten dauert beim Menschen ca. drei Wochen (Bergmann, 2005). Innerhalb dieser Zeit entwickeln sich die leptotänen Spermatozyten durch Annäherung der Chromosomen zu zygotänen Spermatozyten, welche das Stadium der Chromosomenpaarung darstellen (Clermont, 1963). Im Stadium der pachytänen Spermatozyten liegt die typische Konfiguration der verkürzten und verdickten Chromosomen vor, während die diplotänen Spermatozyten das Stadium des Crossing-overs, also das Austauschen von maternalen und paternalen Anteilen repräsentieren (Clermont, 1963). Während der ersten Metaphase der Meiose befinden sich die Chromosomen in der Äquatorialebene, um während der Anaphase getrennt zu werden. Diese erste Reifeteilung bringt aus einer primären Spermatozyte zwei sekundäre Spermatozyten mit einem haploiden Chromosomensatz von 23 Chromosomen mit jeweils zwei Chromatiden hervor. Der DNA-Gehalt beträgt $1n2C$. Das Stadium der sekundären Spermatozyten dauert nur etwa 1-2 Tage, sodass diese Zellen selten beobachtet werden können (Weinbauer et al., 2009). Die

sekundären Spermatozyten teilen sich ohne vorherige Verdopplung ihres DNA-Gehaltes erneut, sodass letztendlich zwei haploide runde Spermatisden mit $1n1C$ vorliegen. Runde Spermatisden sind teilungsinaktive Zellen und differenzieren sich im Rahmen der Spermio-genese in 12 Schritten zu Spermatozoen (Clermont, 1963; Weinbauer et al., 2009). Die Spermio-genese beinhaltet die Kondensation des Zellkernes auf 10% seines ursprünglichen Volumens durch den Austausch von Histamin durch Protamin (Bergmann, 2005). Des Weiteren bilden sich aus dem Golgi - Apparat das Akrosom, - welches proteolytische Enzyme zur Zerstörung der Eizellhaut sezerniert - und eine Geißel zur Fortbewegung. Schlussendlich schnürt sich das überschüssige Zytoplasma als Residualkörperchen ab und wird von den Sertoli-Zellen abgebaut (Bergmann, 2005). Die Spermatozoen werden in das Tubuluslumen abgegeben und passiv durch Kontraktion der Peritubulärzellen über das Rete testis in den Nebenhoden transportiert.

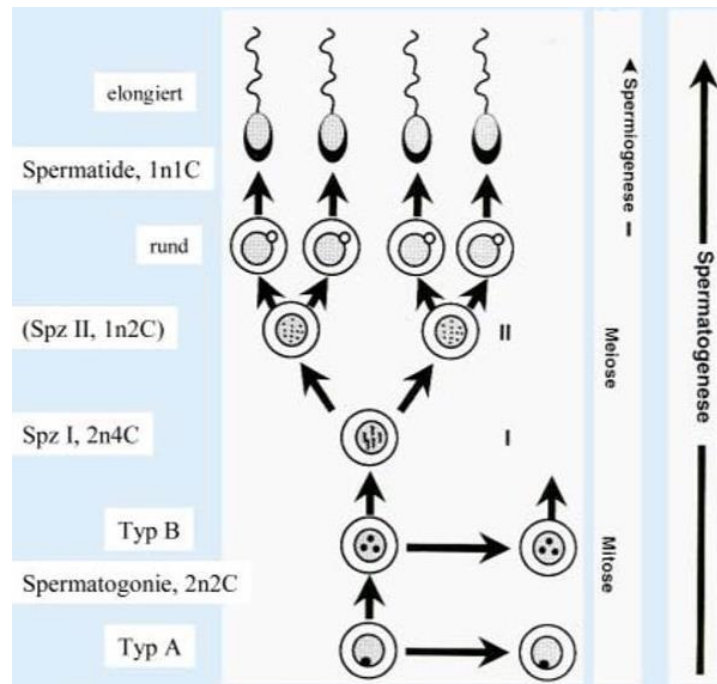


Abbildung 3 zeigt graphisch den Ablauf der Spermato-genese mit Angabe des DNA - Gehaltes. Spz I = primäre Spermatozyte, Spz II = sekundäre Spermatozyte (Bergmann, 2005).

1.3.2 Stadien der Spermatogenese

Der Ablauf der Spermatogenese wird in verschiedene Stadien unterteilt, welche durch das Auftreten unterschiedlicher Zelltypen definiert sind. Nach Clermont (1963) existieren beim Mann 6 Stadien (Abb.4), bei der Ratte 14 und bei der Maus 12 (Hermo et al., 2010).

Die zeitliche Abfolge aller Stadien ergibt einen Spermatogenesezyklus. Dieser Zyklus dauert beim Menschen etwa 16 Tage, eine komplette Differenzierung von einer Spermatogonie bis zu den Spermatozoen benötigt daher mindestens 4 Zyklen (Weinbauer et al., 2009). Die Zykluslänge variiert zwischen den Spezies. Räumlich dargestellt verläuft die Spermatogenese in Wellen, welche im humanen Hoden helikal und im Hoden von Ratte und Maus longitudinal angeordnet sind (Amann, 2008). Aus dieser Anordnung ergibt sich die Besonderheit, dass in einem Querschnitt eines humanen Tubulus, im Gegensatz zu dem eines Nagers, mehrere Stadien sichtbar sind. Dies wird als *multi-stage arrangement* bezeichnet (Bergmann, 2005).

Im Folgenden werden die Stadien beim Menschen näher beschrieben:

Stadium I ist durch das Auftreten von zwei Generationen Spermatiden (runde und elongierte), sowie das Vorliegen von primären pachytänen Spermatozyten und Spermatogonien der Typen A und B definiert.

Im Stadium II finden sich die gleichen Zellarten wie in Stadium I, charakterisierend ist hier das Auftreten von Residualkörperchen und der Abschluss der Spermiogenese der elongierten Spermatiden.

Stadium III weist nur noch eine Generation Spermatiden auf, deren Zellkerne mit der Kondensation beginnen. Des Weiteren finden sich pachytäne und präleptotäne Spermatozyten, da die Typ B Spermatogonien in die Meiose eingetreten sind. Zusätzlich liegen A-Spermatogonien vor.

Stadium IV zeigt die Elongation der runden Spermatiden, sowie pachytäne und leptotäne Spermatozyten und A-Spermatogonien.

Im Stadium V haben sich die leptotänen zu zygotänen Spermatozyten weiterentwickelt, am Ende dieses Stadium findet die erste meiotische Reifeteilung der primären Spermatozyten statt.

Im Stadium VI sind sowohl primäre als auch sekundäre Spermatozyten aufzufinden, welche schnell in die 2. Reifeteilung eintreten. Daneben finden sich A-Spermatogonien und elongierte Spermatiden. Auf Stadium VI folgt erneut Stadium I.

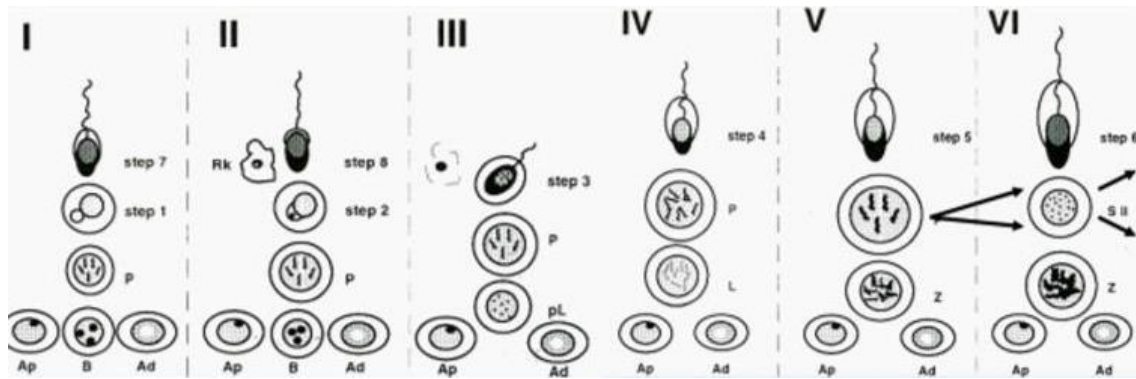


Abbildung 4 zeigt graphisch die Stadien I-VI der Spermatogenese mit den charakterisierenden Zellen. Ap = A pale -, Ad = A dark-, B = Typ B-Spermatogonien, pL = präleptotäne, L = Leptotäne, Z = Zygotäne, P = Pachytäne Spermatozyten. SII = sekundäre Spermatozyten, Spermatozyten Step 1-8, Residualkörperchen (Bergmann, 2005).

1.3.3 Störungen und Evaluation der Spermatogenese

Störungen im Ablauf der Spermatogenese können zu Infertilität führen. Da bei einer Ejakulatanalyse keine Unterscheidung zwischen einer Schädigung im Ablauf der Spermatogenese und einer Schädigung der Samenwege möglich ist, kann die sichere Beurteilung der Spermatogenese nur allein histologisch auf der Basis einer Hodenbiopsie erfolgen. Nach den Richtlinien der „European Association of Urology“ (EAU) darf eine Indikation zur Hodenbiopsie nur unter folgenden Voraussetzungen gestellt werden: therapeutisch zur testikulären Spermienextraktion (TESE) bei obstruktiver Azoospermie (OA) oder nicht-obstruktiver Azoospermie (NOA), diagnostisch zum Ausschluss einer intraepithelialen Neoplasie oder therapeutisch bei Patienten mit Klinefelter-Syndrom (Bergmann und Kliesch, 2009).

Weisen die meisten Tubuli einer Hodenbiopsie mindestens eines der sechs Stadien der Spermatogenese nach Clermont (1963) auf, so geht man histologisch von einer qualitativ und quantitativ intakten normalen Spermatogenese aus (Bergmann und Kliesch, 2009). Eine qualitativ intakte Spermatogenese weisen auch Patienten mit einer Hypospermatogenese auf. Diese ist definiert als das Vorliegen einer verminderten Anzahl an elongierten Spermatozyten und einer unvollständigen Zusammensetzung des Keimzellepithels (Bergmann und Kliesch, 2009). Weitere Defekte der Spermatogenese können sich durch Arrest auf unterschiedlichen Stufen der Spermatogenese bemerkbar machen. Beim vollständigen Fehlen von Keimzellen

spricht man von einem *Sertoli-Cell-Only-Syndrom* (SCO). In den meisten Biopsien findet sich eine „bunte Atrophie“ (Bergmann und Kliesch, 2009). Dies bezeichnet das Vorliegen unterschiedlicher Spermatogenesedefekte in nebeneinander liegenden Tubuli einer Biopsie (Bergmann, 2005).

Zur Evaluation der Spermatogenese führte Johnson (1970) eine score-count Analyse ein. Dieser Score bewertet jeden einzelnen Tubulus einer Biopsie und bestimmt über verschiedene Parameter eine Summe, welche in einen Score umgerechnet werden kann. Somit wird eine Korrelation zwischen der Histologie und der Spermiedichte bei Patienten mit Oligozoospermie (Bergmann und Kliesch, 2009) ermöglicht. Dies ist allerdings nach den Richtlinien der EAU keine Indikation zur Hodenbiopsie. Der Score nach Bergmann und Kliesch (1998) wertet hingegen den Prozentsatz der Tubuli aus, die elongierte Spermatoziden aufweisen. Dadurch lassen sich die Erfolgsaussichten einer TESE bestimmen (Bergmann und Kliesch, 2009).

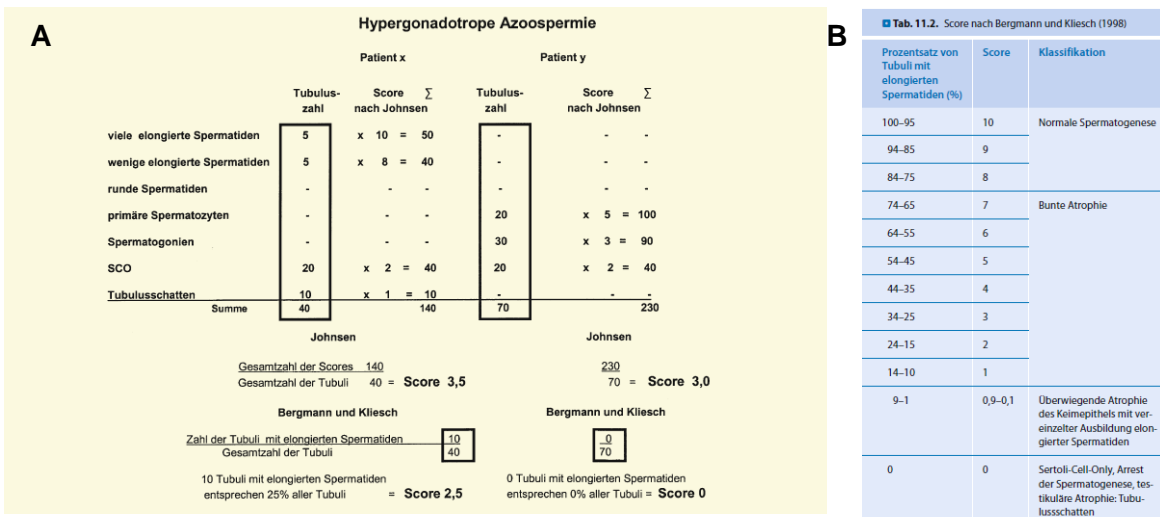


Abbildung 5A zeigt anhand zweier Patienten beispielhaft die Anwendung der Score-Evaluation nach Johnson (1970) und nach Bergmann und Kliesch (2009). Bergmann und Kliesch werten den Prozentsatz der Tubuli aus, die elongierte Spermatoziden enthalten. Johnson hingegen wertet jeden Tubulus einzeln aus und rechnet aus einer über verschiedene Parameter gebildeten Summe den Score aus.

Abbildung 5B zeigt die Umrechnung der Prozentzahlen in den Score (Bergmann und Kliesch, 2009).

1.4 Markerproteine für testikuläre Zelltypen

Im Folgenden werden die einzelnen Antikörper, welche bei der Suche nach geeigneten Zellmarkern eingesetzt wurden, kurz vorgestellt.

1.4.1 Smad3

Smad3 gehört als ein Protein der Smad-Familie mit zu den wichtigsten Mediatoren im Signalweg der TGF-beta - Familie. *Transforming growth factor - β s* (TGF- β s) zählen zu den Zytokinen und spielen eine wichtige Rolle in der Proliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose. Nach Bindung der TGF- β s an den TGF- β Typ I- oder Typ II-Rezeptor auf der Zelloberfläche werden durch die Serin-Threonin-Kinase-Aktivität des TGF- β Typ I- Rezeptors Smad2 und Smad3 phosphoryliert und dadurch aktiviert (Kretzschmar und Massagué, 1998). Smad 2 und Smad3 sind regulär im Zytoplasma der Zellen lokalisiert. Nach der Aktivierung bilden sie zusammen mit Smad4 als Co-Smad einen Komplex, welcher in den Zellkern wandert und dort, nach vorheriger Bindung an DNA-Bindungsfaktoren, an die DNA bindet (Kretzschmar und Massagué, 1998). Dadurch wird die Transkription spezifischer Gene aktiviert (Heldin et al., 1997).

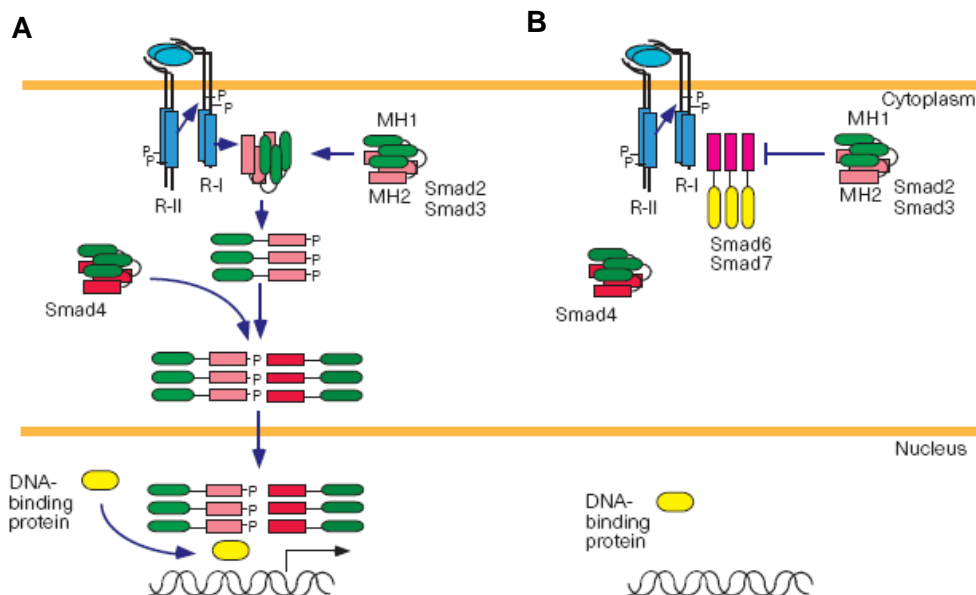


Abbildung 6A zeigt die Signalkaskade des TGF- β Signalweges durch die Smad-Proteine. Nach Bindung an die Rezeptoren auf der Zelloberfläche werden Smad2 und Smad3 phosphoryliert und bilden zusammen mit Smad4 einen Komplex. Dieser wandert in den Zellkern und bindet dort gemeinsam mit einem DNA-Bindungsprotein an die DNA und aktiviert die Transkription spezifischer Gene. In **B** ist eine inhibitorische Signalkaskade mit Hilfe von Smad6 und Smad7 dargestellt (Heldin et al., 1997).

Es gibt insgesamt bisher acht Smad-Proteine, die in drei verschiedene Klassen unterteilt werden. Smad3 gehört zur Klasse der Rezeptor-aktivierten Smads (R-Smad) (Shi und Massagué, 2003). Des Weiteren gibt es noch *common mediator Smads* (Co-Smads, dazu gehört Smad4) und inhibierende Smads (I-Smads; Brown et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Smad3 im Rahmen der Spermatogenese untersucht, da die Transkription einzelner Gene durch die verschiedenen Differenzierungsstadien stark reguliert wird und damit auch die Aktivität von Smad3 variiert. Daher besteht die Möglichkeit, dass Smad3 sich als Markerprotein eignet.

1.4.2 CREM-1

Der *cAMP-response-element modulator*, kurz CREM-1, ist ein Protein, welches als Transkriptionsfaktor während der Signalkaskade von cAMP eine Rolle bei der Expression Hoden-spezifischer Gene einnimmt (Kimmins et al., 2004). Nach der Bindung an Rezeptoren auf der Zelloberfläche wird, über ein G-Protein vermittelt, ATP in zyklisches AMP (cAMP) umgewandelt, welches wiederum die Proteinkinase A aktiviert. Durch die Konformationsänderung kann dieser Komplex dann in den Zellkern gelangen und dort Transkriptionsaktivatoren, wie z.B. CREM-1, aktivieren, welche dann an spezifische Promotoren auf den zugehörigen Genen binden und die Transkription initiieren (Behr und Weinbauer, 2001). Die Expression der CREM-Gene, dazu gehören z.B. Protamin 1 und 2, kann auf verschiedenen Ebenen reguliert werden: auf der Ebene der Transkription, durch verändertes Spleissen; auf Transkriptionsebene, durch Anlagerung alternativer Polyadenylierungen oder auf der Ebene der Translationsinitiierung (Behr und Weinbauer, 2001). Aktuell sind viele verschiedene Spleiß-Varianten von CREM-1 bekannt und es wurde auch bereits mehrfach ein Zusammenhang zwischen verändertem Spleissen von CREM-1 und Infertilität bei gestörter Spermatogenese nachgewiesen (Blocher et al., 2003).

CREM-1 nimmt im Laufe der Spermatogenese einen Wechsel in seiner Funktion vor: ist das Protein anfangs ein Repressor, so nimmt es in der postmeiotischen Phase der Keimzellendifferenzierung eine Rolle als Aktivator an (Vouk et al., 2005). Es wird angenommen, dass die Funktion von CREM-1 während der postmeiotischen Keimzellendifferenzierung in den Veränderungen, wie dem Histamin-Protamin-Austausch oder der Formation des Akrosoms liegt (Sassone-Corsi, 2002). Auf Grund dieser unterschiedlichen Funktionen im Laufe der Spermatogenese, wurde im Rahmen dieser

Arbeit die Expression von CREM-1 auf seine Tauglichkeit als stadienspezifischer Marker untersucht.

1.4.3 Histone

Histone sind Proteine mit einem hohen Anteil positiv geladener Aminosäuren, die an die negativ geladene DNA binden können (Passarge, 2004). Ein Oktamer, bestehend aus je zwei Histonen H2A, H2B, H3 und H4, bildet zusammen mit der DNA einen Komplex, welcher Nukleosom genannt wird. Nukleosomen sind zur Bildung des Chromatins essentiell. Direkt an die DNA bindet das Histon 1 als sogenanntes „linker-Histon“. Je nachdem, wie weit die DNA kondensiert ist, wird die Bindung von Transkriptionsfaktoren oder von anderen Proteinen an die DNA gesteuert (Johnson, 2000). Des Weiteren spielen Histone eine Rolle bei der DNA-Reparatur. Eine Möglichkeit, die Genexpression zu beeinflussen, liegt in der Acetylierung oder Methylierung von Lysin oder Arginin, der Phosphorylierung von Serin oder Threonin oder der Ubiquitinierung der Histone (Kimmins und Sassone-Corsi, 2005). Der Einfluss der Histone auf die Genexpression, ob Aktivierung oder Stilllegung, wird mit der Histon-Code-Hypothese zusammengefasst (Jenuwein, 2001).

Durch Anlagerung einer Acetylgruppe an einem Histon-Protein nimmt die positive Ladung ab, sodass die Bindung an die DNA schwächer wird und die Transkriptionsfaktoren besser an die DNA binden können (Hazzouri und Pivot-Pajot, 2000). Die Acetylierung nimmt daher in der frühen Spermatogenese während der Steigerung der Genexpression zur Differenzierung der Stammzellen eine wichtige Rolle ein; ebenso wie die Hyperacetylierung postmeiotischer Zellen im Rahmen der Spermio-genese (Hazzouri und Pivot-Pajot, 2000). Da die Acetylierung der Histone einen Einfluss auf die Differenzierungsschritte der Spermatogenese hat, wurde die Expression der acetylierten Antikörper H3K9, H4K5, H4K8 und H4K16 auf ihre Tauglichkeit als stadienspezifische Keimzell-Marker untersucht.

Der Methylierung wird ein Zusammenhang mit ruhenden Genen und dem Heterochromatin zugesprochen. Methylierte Histone sind besonders während der Meiose zu finden (Boissonnas et al., 2013) und wurden daher in der vorliegenden Arbeit als Marker getestet. Ausgewählt wurden die Antikörper gegen dimethyliertes Histon H3K9 und trimethyliertes H3K9.

Die Phosphorylierung der Histone, insbesondere Histon H3 an der Stelle Serin 10, wird mit der Chromosomenkondensation während der Meiose in Zusammenhang gebracht

(Hendzel et al., 1997). Da dies ein sehr stadienspezifischer Vorgang ist, wurde die Expression des Proteins H3Serin10-P auf seine Verwendbarkeit als Marker untersucht.

1.5 Wozu die Quantifizierung der verschiedenen Keimzellstadien?

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe immunhistochemischer Marker die Auszählung verschiedener Zellarten an humanen Hodenbiopsien durchgeführt. Im Vergleich zu sonst durchgeführten Zählungen an Hämatoxylin-gefärbten Schnitten, sollten die Marker eine präzisere Einteilung der Keimzellstadien ermöglichen und ungenaue Zählungen bei Übergangsstadien minimieren. Ebenso sollte durch die Markierung ein Rückschluss darauf gezogen werden, ob innerhalb der Keimzellstadien Unterschiede im Differenzierungsgrad bestehen. Durch eventuelle Abweichungen in der Lokalisation der Antikörper könnte gegebenenfalls auf einen Zusammenhang zu den Defekten im Ablauf der Spermatogenese geschlossen werden. Des Weiteren wird eine Vergleichbarkeit zwischen drei verschiedenen Patientengruppen erreicht, welche statistisch validiert werden konnte.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Da in der Literatur die Proteine teils mit sehr unterschiedlicher Lokalisation oder noch gar nicht beschrieben wurden, sollte mit dieser Arbeit die Expression der Proteine Smad3, CREM-1, H3Serin10-P und einiger Histone an Ratten-, Maus und humanem Hoden ermittelt werden. Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung von Antikörpern, welche als stadien- und zellspezifische Marker der Spermatogenese fungieren können. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf den späten Stadien der Spermatogenese. Definiert wurde ein Marker über eine eindeutige Lokalisation innerhalb des Tubulus und einer übereinstimmenden Expression in den drei Spezies Ratte, Maus und Mensch. Die Auswahl der Antikörper erfolgte – wie oben beschrieben – zuerst anhand der wissenschaftlichen Erkenntnisse über die Funktion der Proteine im Ablauf der Spermatogenese, sodass sich daraus ein möglicher Hinweis auf eine Stadienspezifität ableiten lassen sollte.

Mit Hilfe der Antikörper sollten sich die Zellzahlen der unterschiedlichen Spermatogenesestadien quantifizieren lassen, sodass Vergleiche zwischen den drei histologischen Patientengruppen normale Spermatogenese, Spermatozytenarrest und

Hypospermatogenese ermöglicht werden. In der Literatur ist ein Zusammenhang zwischen fehlerhaft ablaufender Meiose und Infertilität bereits bekannt (Ferguson et al., 2007). Die Ermittlung weiterer Hinweise auf vorliegende Mitose- oder Meiosedefekte oder eine Zellzahlminderung in den Sertoli-Zellen oder Stammzellen stellte eine weitere Hypothese dieser Arbeit dar. Durch die Bestimmung der Unterschiede in den Zelltypen sollte eine präzisere Unterteilung der Infertilität der Patientengruppen möglich sein. Hierzu wurden vergleichend noch Ergebnisse über die frühen Stadien der Spermatogenese von Herrn Martin Wolter hinzugezogen, die ebenfalls im Rahmen einer Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe erhoben wurden.

2 Material und Methoden

2.1 Biopsien

2.1.1 Biopsien von humanen Hoden

Die Indikation zur Hodenbiopsie ergab sich nach den Richtlinien der „European Association of Urology“ durch normogonadotrope obstruktive Azoospermie oder nicht-obstruktive Azoospermie (Bergmann und Kliesch, 2009). Insgesamt wurden für die vorliegende Arbeit 66 Biopsien aus der Hodendatenbank Gießen unter Zustimmung der Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität Gießen (75/00 und 56/05) verwendet. Diese wurden alle im Zeitraum zwischen 2004 und 2009 unter Vollnarkose durch die „No-touch“-Technik, d.h. ohne Traumatisierung des Gewebes, entnommen. Die Biopsieentnahme erfolgte nach der „EAU Guidelines on Male Infertility 2002“ und umfasste Biopsien an drei verschiedenen Lokalisationen jedes Hodens unter Berücksichtigung der Gefäßversorgung (Bergmann und Kliesch, 2009). Zwei Biopsien wurden zur Gewinnung von Spermien und zur Lagerung benötigt, die dritte wurde in Bouin-Lösung fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Danach wurden je ca. 4 µm dicke Schnitte auf Objektträger gezogen und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Histologisch wurden die Biopsien anhand des vorliegenden Befundes der Tubuli in verschiedene Klassifikationen unterteilt. Wiesen die Mehrzahl der Tubuli mindestens eines der 6 Spermatogenesestadien nach Clermont (1963) auf, so wurde von einer histologisch normalen Spermatogenese ausgegangen (NSP). Eine weitere in dieser Arbeit verwendete Klassifikation war der Spermatozytenarrest (SZA), bei dem sich ein Arrest der Spermatogenese hauptsächlich auf der Stufe der primären Spermatozyten finden lässt. Die weitere histologische Auswertung erfolgte nach dem Score-System von Bergmann und Kliesch (1998), welches den Prozentsatz der Tubuli, die elongierte Spermatozyten aufweisen, ermittelt. Ein Score von 10 entspricht somit 100% der Tubuli mit elongierten Spermatozyten (Bergmann und Kliesch, 2009).

Die NSP-Patienten der vorliegenden Arbeit wiesen einen mittleren Score von 9,9 (Range 9-10) auf, wobei beim Score von 8-10 von einer normalen Spermatogenese ausgegangen werden kann. Im Durchschnitt waren die Patienten 38 Jahre alt, was sich in einer Verteilung von 19-52 widerspiegelt. Die Patienten mit SZA wiesen einen mittleren Score von 0,3 (Range 0-5) auf und waren durchschnittlich 34 Jahre alt bei einer Altersspanne von 24-56.

2.1.2 Biopsien von Hoden der Ratte und der Maus

Bei der vorliegenden Arbeit wurden für die immunhistochemischen Experimente Ratten (Sprague-Dawley) und C57 Black J6 Mäuse (Jackson) nach Genehmigung durch das RP der Justus-Liebig-Universität Gießen verwendet. Die Hoden wurden nach Entnahme für 24-72 Stunden in Bouin-Lösung fixiert und anschließend 3 Tage in 70%igem Alkohol gewaschen. Die Einbettung erfolgte nach folgendem Schema mit dem Einbeter Leica TP1050 (Tab.1):

Tabelle 1: Protokoll des Paraffineinbettungsautomaten.

| Arbeitsschritte | Wdh. | Zeit | Material | Temperatur |
|------------------------|-------------|-------------|-----------------|-------------------|
| 1. Entwässerung | 1x | 2 Std. | 80% Ethanol | RT |
| | 1x | 2 Std. | 96% Ethanol | RT |
| | 3x | 3 Std. | 100% Ethanol | RT |
| 2. Klären | 1x | 1 Std. | Xylol | RT |
| | 2x | 45 Min. | Xylol | RT |
| 3. Einbettung | 3x | 40 Min. | Paraffin | 59°C |

RT: Raumtemperatur; Wdh.: Wiederholung

Herstellung der Bouin-Lösung:

Stammlösung: 500 mL Pikrinsäure (Fluka 80456) + 167mL Formaldehyd 37%

Bouinlösung: 30 mL Stammlösung + 1,5mL Essigsäure 100%

2.1.3 Herstellung von Paraffinschnitten

Es wurden mit einem Schlittenmikrotom jeweils 5 µm dicke Schnitte der Biopsien hergestellt. Die Schnitte wurden in einem Wasserbad aufgefangen und mit Hilfe eines Pinsels getrennt. Danach wurden sie durch Eintauchen der Objektträger in das Wasserbad auf diese aufgezogen und kurz in ein weiteres Wasserbad getaucht, damit sich die Schnitte strecken konnten. Anschließend wurden die präparierten Proben über Nacht bei 37°C im Inkubator getrocknet.

2.2 Immunhistochemie

2.2.1 Immunhistochemische Färbung mit dem EnVision™ Detektionssystem

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die immunhistochemische Färbung mit Hilfe des EnVision™ Detektionssystems von DAKO, welches auf der markierten Polymer-Methode basiert (Abb.7).

Diese Methodik gehört zur Gruppe der indirekten Immunhistochemie und beruht in Schritt 1 auf der Bindung eines spezifischen primären Antikörpers, z.B. aus der Maus oder dem Kaninchen, an ein Antigen der Gewebeprobe. Schritt 2 besteht aus der Zugabe eines spezifisch gegen die Tierspezies des Primärantikörpers gerichteten sekundären Antikörpers (z.B. aus Ziege hergestellter Anti-Maus- oder Anti-Kaninchen-Antikörper), an den ein mit HRP-markiertes Polymer gebunden ist. HRP bezeichnet eine aus Meerrettich gewonnene Peroxidase, die als Enzym eingesetzt wird. Abschließend wird mit Hilfe des Substratchromogens DAB, welches durch Wasserstoffperoxid mit der Peroxidase reagiert, eine bräunliche Färbung an der Stelle, an der der primäre Antikörper gebunden hat, sichtbar gemacht (Abb.7).

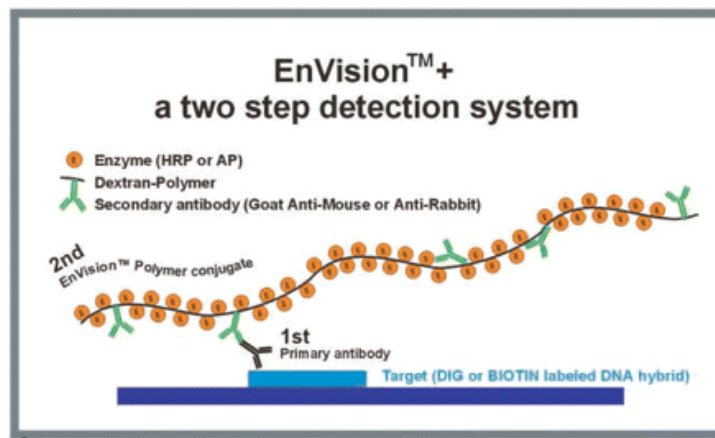


Abbildung 7 Darstellung der EnVision™ Methodik von DAKO (Wiedorn et al., 2001).

2.2.2 Durchführung der EnVision™ Methodik (DAKO)

Die Versuche wurden, bis auf die Inkubation des primären Antikörpers, bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Arbeit mit den Antikörpern erfolgte auf Eis, die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte für 30 min bei 37°C im Inkubator.

Die Herstellung des 0,02 M PBS-Puffers erfolgte durch Zugabe von 4 PBS-Tabletten, welche jeweils 0,14 M Natriumchlorid, 0,01 M Phosphat-Puffer (PO_4^{3-}) und 0,03 M Kaliumchlorid enthielten, zu 1000mL destilliertem Wasser.

2.2.2.1 Entparaffinieren der Präparate

Die 5 µm dicken Schnitten wurden unter dem Abzug zuerst drei Mal je 20 min in ein Bad mit NeoClear, einem Xylol-Ersatz für die Mikroskopie, gegeben und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe mit vergälltem Alkohol weiter entparaffiniert. Dabei gab es je zwei Bäder mit 100%, 96% und 70% in denen die Schnitte jeweils 5 min verblieben. Zum Abschluss wurde für 5 min mit Aqua dest. unter Schütteln gespült.

2.2.2.2 Demaskierung von Epitopen

Die Freilegung von Epitopen erfolgte in heißem Citratpuffer mit einem pH von 6,0. In einem Dampfgerar wurden die Präparate 20 min bei 100°C demaskiert.

Die Zubereitung des Citratpuffers:

Stammlösung B: 29,41 g Natriumcitrat in 1000mL Aqua dest. gelöst – ergibt 0,1 M

Stammlösung A: 21,01 g Zitronensäure in 1000mL Aqua dest. gelöst – ergibt 0,1 M

25 mL der Stammlösung B wurden mit 270 mL Aqua dest. aufgefüllt und anschließend mit Stammlösung A auf pH 6,0 eingestellt.

2.2.2.3 Blockierungen von unspezifischen Bindungen

Nach 20-minütiger Abkühlung wurden die Präparate drei Mal je 5 min unter Schütteln mit 0,02 M PBS gespült. Die Enzymaktivität der endogenen Peroxidase wurde anschließend 30 min mit 3%-iger Wasserstoffperoxidlösung geblockt, um unspezifische Nebenreaktionen mit dem Chromogen und somit falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden. Die Wasserstoffperoxidlösung wurde aus 48,5 mL eiskaltem Methanol und 1,5 mL 30%igem H₂O₂ hergestellt.

Anschließend wurden wieder drei Waschgänge für jeweils 5min mit 0,02 M PBS-Puffer durchgeführt. Vor Auftragung des primären Antikörpers wurde nochmals für 20 min unter Schütteln mit 1,5% BSA-Puffer geblockt, um freie Proteinbindungsstellen an der Oberfläche zu sättigen und somit unspezifische Reaktionen zu reduzieren. Die Herstellung erfolgte durch Lösung von 1 g BSA in 70 mL PBS-Puffer. Dem BSA-Puffer wurden 21 µL Triton-X100 zugegeben, um die Membranpermeabilität und somit den Zugang zum Zytoplasma zu erhöhen.

2.2.2.4 Immunreaktionen

Bevor die humanen Gewebe verwendet wurden, wurde die optimale Verdünnung des primären Antikörpers im Rahmen einer Verdünnungsreihe zuerst an den beiden Tierspezies Ratte und Maus getestet. Optimale Verdünnung beschreibt in diesem Zusammenhang das Verhältnis aus stärkstem Signal bei geringstem Hintergrund. Die verwendeten Verdünnungen waren zuerst 1:100 und 1:200, anschließend noch falls nötig 1:50 bzw. 1:300, 1:400 und 1:500.

So ergab sich für den Androgenrezeptor eine Konzentration von 1:50, für UTF-1 1:200, für Smad3 und H3Ser10-P 1:400 und für CREM-1 1:100 (Tab. 2). Nach Einstellung der jeweiligen Konzentration wurden jeweils einzelne Schnitte von Ratte und Maus und insgesamt 66 Schnitte humanen Gewebes gefärbt.

Der primäre Antikörper wurde auf Eis mit Diluentpuffer in der benötigten Konzentration angesetzt, wobei pro Schnitt mit etwa 100 µl Antikörperlösung gerechnet wurde.

Anschließend wurden die Objektträger mit den Präparaten vorsichtig getrocknet und das Gewebe mit einem PAP-Pen eingekreist. Nach Pipettieren der Antikörperlösung auf das Gewebe wurden die Schnitte für 30 min bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Alternativ konnte die Inkubation auch über Nacht bei 4°C im Kühlschrank erfolgen. Die Inkubation fand, ebenso wie die des sekundären Antikörpers, in einer mit feuchtem Zellstoff ausgelegten Inkubationskammer statt. Die Negativkontrolle erfolgte durch reines Auftragen des Diluentpuffers. Anschließend wurde der Antikörper auf Zellstoff ablaufen gelassen und für drei Waschgänge mit 0,02 M PBS-Puffer für 5 min unter Schütteln gespült.

Die Auftragung des sekundären Antikörpers war der nächste Schritt. Dieser wurde gebrauchsfertig bei 4°C gelagert und wurde komplementär zur Spezies des primären Antikörpers aufgetragen. Das Gemisch des sekundären Antikörpers EnVision™+ Dual Link System-HRP enthält ein mit HRP-markiertes Polymer aus Ziegen-Anti-Maus-Ig bzw. Ziegen-Anti-Kaninchen-Ig. Für den Androgenrezeptor, Smad3, H3Ser10P und CREM-1 wurde der sekundäre Antikörper aus Kaninchen, für UTF-1 der aus Maus verwendet (Tab.2). Die Inkubation erfolgte 30 min bei Raumtemperatur oder alternativ bei 4°C über Nacht. Anschließend wurde erneut drei Mal für jeweils 5 min mit 0,02 M PBS-Puffer gespült.

Die abschließende Färbereaktion mit dem Substratchromogen DAB fand im Dunkeln unter dem Abzug mit zwischenzeitlicher mikroskopischer Kontrolle des Färbegrads statt. Nach Einstellung der optimalen Färbezeit wurde diese dann für alle Schnitte angewandt. Für den Androgenrezeptor ergaben sich 55“, für UTF-1 1‘40“ und für Smad3 1‘. H3Ser10-P wurde nach 1‘30“ und CREM-1 nach 3‘ abgestoppt, was durch Spülung mit Aqua dest. erfolgte (Tab.2). Dem schlossen sich drei Waschgänge mit jeweils 5 min in Aqua dest. unter Schütteln an.

Zur besseren Unterscheidung zwischen gefärbten und ungefärbten Zellen wurden die Schnitte mit Shandon instant Hämatoxylin, welches die Zellkerne blau anfärbt, für 7 sec. gegengefärbt und anschließend unter fließendem Leitungswasser in einer Küvette für 10 min gebläut.

Die Objektträger wurden abschließend mit verflüssigter Kaiser's Glyceringelatine eingedeckt, wofür 24x26 mm große und 0,13-0,17 mm dicke Objektträgergläschen verwendet wurden.

2.3 Auszählung der detektierten Zellen

Die Auswertung der humanen Biopsien erfolgte an einem inversen Mikroskop in einer Vergrößerung, in der die Zellstrukturen gut als spezifische Färbung erkennbar waren. Dies bedeutet beim AR 25fache, bei UTF-1 25fache-, bei Smad3 25fache, bei H3Ser10P 16fache und bei CREM-1 25fache Vergrößerung. Pro Biopsie war eine Mindestanzahl von 10 Tubuli notwendig, wobei jeweils nur quer angeschnittene Tubuli gezählt wurden. Insgesamt wurden bei Smad3 bei den Patienten mit NSP im Mittelwert $22,7 \pm 9,4$ Tubuli gezählt mit einer Range von 10-51. Ebenfalls bei Smad3 bei den Patienten mit SZA wurden $29,4 \pm 13,9$ (10-72) Tubuli gezählt. Bei CREM-1 wurden durchschnittlich bei NSP $22,8 \pm 9,5$ Tubuli (12-46) und bei SZA $30,7 \pm 13,1$ Tubuli (14-74) gezählt. Für H3Ser10-P ergaben sich bei NSP $18,68 \pm 11,88$ Tubuli (10-42) und bei SZA $37,81 \pm 16,47$ Tubuli (10-71).

Die Signifikanzprüfung von den Ergebnissen der Serienfärbung erfolgte nach dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben, wobei $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant angenommen wurde. Hierfür wurden die ermittelten Daten mit GraphPad InStat 3 jeweils für NSP versus HYP, NSP versus SZA und HYP versus SZA ausgewertet. Mit Hilfe von GraphPad Prism 6 wurde eine Grenzwertoptimierungskurve (Receiver Operating Characteristic-Analyse) erstellt, anhand derer der beste diagnostische Grenzwert (Cut-Off) für die jeweiligen Testreihen ermittelt werden konnte. Dieser Cut-Off legte letztendlich fest, ob es sich um ein Zelldefizit (unterhalb des Cut-Offs) oder um kein Defizit (oberhalb des Cut-Offs) handelte.

Je nach Zelltypen, bei denen ein Defizit vorlag, konnten die Patienten insgesamt in vier Gruppen unterschieden werden:

- Patienten, mit einem **Defizit im Stammzellpool** oder in der Mitose – dieser umfasst Sertoli-Zellen und Spermatogonien, die durch den AR und UTF-1 erfasst werden,
- Patienten mit einem **Defizit in den meiotischen Teilungen** – dazu wurden Spermatozyten durch Smad3 und H3Ser10P und Spermatischen durch CREM-1 gezählt - sowie,
- Patienten, die in beiden Bereichen einen Zellmangel aufwiesen, sowie,
- die vierte Gruppe, die Patienten umfasste, die in keinem Bereich einen Zellmangel aufwies.

2.4 Dokumentation der Ergebnisse

Die fotografische Dokumentation erfolgte an einem inversen Mikroskop, dem Olympus FSX100, in Kombination mit der Olympus FSX-BSW Software. Ausgewählte Präparate, die die Variabilität der Patienten (exemplarisch) darstellten, wurden jeweils in 20facher und 40facher Vergrößerung fotografiert. Die Bearbeitung erfolgte mit Adobe Photoshop CS4.

2.5 Untersuchung der Anti – Histon - Antikörper

Die immunhistochemischen Versuche an den in Tab. 3 aufgeführten Antikörpern wurden nach oben vorgestelltem Protokoll der EnVision™ Methodik (DAKO) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte ebenfalls an einem inversen Mikroskop, mit welchem die Schnitte untersucht wurden. Bei der Beurteilung, ob eine Färbung vorlag, wurde keine weitere Differenzierung der Färbeintensität vorgenommen. Die fotografische Dokumentation erfolgte wie in 2.4. beschrieben, jedoch zusätzlich noch in 25facher Vergrößerung.

2.6 Verwendete Materialien

Im Folgenden sind die Firmen der verwendeten Materialien aufgeführt.

- *Chemikalien:*

Pikrinsäure der Firma Fluka 80456

Formaldehyd (37%), MERCK, Darmstadt

Essigsäure (100%), MERCK, Darmstadt

PBS-Tabletten Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt

Xylol, MERCK, Darmstadt

Alkohol, ROTH, Dautphetal-Buchenau

Natriumcitrat, MERCK, Darmstadt

Zitronensäure, MERCK, Darmstadt

Methanol, SIGMA-ALDRICH, München (St.Louis, USA)

Wasserstoffperoxid, ROTH, Dautphetal-Buchenau

Albumin Fraktion V proteasefrei von ROTH, Dautphetal-Buchenau

Triton X-100, MERCK, Darmstadt

DAKO Real Antibody Diluentpuffer, Hamburg

Shandon instant Hämatoxylin, Thermo fisher scientific, Schwerte

Kaiser's Glyceringelatine, MERCK, Darmstadt

- Primäre Antikörper:

Tabelle 2 Daten der verwendeten primären Antikörper

| Antikörper | primärer AK | Zeit | Art | Spezies | Nummer | Firma |
|-------------------|-----------------|-------|-----|---------|------------|-----------------------------|
| Anti-UTF-1 | 1:200 | 1'40" | m | M | 5G10.2 | Millipore |
| AR sc-816 | 1:50 (human) | 55" | p | K | N-20:sc-81 | Santa Cruz Biotechnology |
| | 1:100 (R/M) | | | | | |
| H3Ser10-P | 1:400 | 1'30" | p | K | AB-208 | EnoGene |
| Smad3 | 1:400 (human/R) | 1' | p | K | 06-570 | Millipore |
| | 1:300 (M) | | | | | |
| CREM-1 | 1:100 | 3' | p | K | X12:sc-44 | Santa Cruz Biotechnology |

M=Maus, R=Ratte, m=monoclonal, p=polyclonal, Zeit=Färbedauer

Tabelle 3 Bezugsquellen und Färbeprotokoll der Anti-Histon-Antikörper

| Anti-körper | Art | Spezies | Klon | Firma | Verdünnung | Färbezeit |
|---------------------|-----|---------|----------|-----------|------------|-------------|
| H3K9ac | p | K | Ab10812 | abcam | 1:50 | 1'45" |
| H4K5ac | p | K | Ab61236 | abcam | 1:250 | 2' |
| H4K8ac | p | K | Ab 15823 | abcam | 1:100 | Ratte 25" |
| | | | | | 1:250 | Human/M 25" |
| H4K16ac | pl | K | Ab61240 | abcam | 1:100 | 2'30" |
| H3K9me 2 | m | M | Ab1220 | abcam | 1:50 | 4' |
| H3K9me 3 | p | K | Ab6001 | abcam | 1:800 | 15" |
| H3Ser10-P | p | K | 06-570 | Millipore | 1:400 | 1'30" |

p=polyclonal, m=monoclonal, K=Kaninchen, M=Maus

- *Sekundäre Antikörper:*

DAKO Envision +Dual Link System-HRP: Ziegen-Anti-Maus-Ig bzw. Ziegen-Anti-Kaninchen-Ig, Hamburg, Germany

- *Chromogen:*

DAKO liquid DAB +Substrate Chromogen System, Hamburg

- *Geräte und Zubehör:*

Schlittenmikrotom RM 2235, Leica, Nussloch

SuperFrost Plus Objektträger, R.Langensbrinck, Emmerdingen

Inkubator Function line, Heraeus, Hanau

Gourmetgarer Dampf-plus, Braun, Kronberg

PAP-Pen, DAKO, Hamburg

Objektträgergläser, R.Langensbrinck, Emmerdingen

Mikroskop Dialux 20, Esselte Leitz, Stuttgart

Olympus FSX100, Hamburg

Olympus FSX-BSW Software, Hamburg

Einbettautomat Leica TP 1050

3 Ergebnisse

Auf der Suche nach stadienspezifischen Markern der Spermatogenese wurden verschiedene Antikörper jeweils an Ratten- und Maushoden getestet und auf das bestmögliche Verhältnis von stärkstem Signal bei schwächstem Hintergrund eingestellt. Nur die Antikörper mit einer eindeutigen Lokalisation innerhalb des Tubulus und einer Übereinstimmung der Proteinlokalisierung am gleichen Zelltyp bei beiden Spezies wurden für weitere Untersuchungen an humanen Hodenbiopsien verwendet. Diese Patientenbiopsien waren anhand der histologischen Klassifikation von Bergmann und Kliesch (2009) in normale Spermatogenese (NSP), Spermatozytenarrest (SZA) und Hypospermatogenese (HYP) eingeteilt.

Mithilfe dieser Antikörper wurden die Zellzahlen der verschiedenen Spermatogenesestadien und der Sertoli-Zellen bestimmt und diesbezüglich die Patientengruppen NSP, SZA und HYP miteinander verglichen. Dadurch sollte eine präzisere Unterteilung der Spermatogenesedefekte der Patienten vorgenommen werden.

Anhand der o.g. Voraussetzungen zeigten sich fünf Antikörper als geeignet: UTF-1 als Marker für spermatogoniale Subtypen, der Androgenrezeptor für Sertoli-Zellen, Smad3 für Spermatozyten, H3Ser10-P für meiotische Teilungen und CREM-1 für runde Spermatisden. Im Folgenden liegt der Schwerpunkt auf den späten Stadien der Spermatogenese, beginnend bei den Spermatozyten. Weitere Details zu den Antikörpern UTF-1 und AR werden in Rahmen der Doktorarbeit von Herrn M. Wolter dargestellt. Weitere getestete Antikörper, die unter der Gruppe „Histone“ zusammengefasst wurden, sind im Kapitel 3.4 näher erläutert.

3.1 Ergebnisse der immunhistochemischen Markersuche

3.1.1 UTF-1 als Marker für Spermatogoniensubtypen

Zur Detektion von Spermatogoniensubtypen, inklusive des Stammzellpools, wurde der Transkriptionsfaktor UTF-1 verwendet. UTF-1 zeigte in beiden Tierspezies Kernfärbungen in wenigen Sertoli-Zellen und in Spermatogonien vom Typ A.

Im humanen Gewebe waren nur Spermatogonien der Subtypen A1 (=dark), A2 (=pale) und vereinzelt des Typs B markiert. Die weiteren Auswertungen der humanen Hodenbiopsien sind im Rahmen der Dissertation von Herrn M. Wolter detailliert erläutert.

3.1.2 Androgenrezeptor als Marker für Sertoli-Zellen

Der Androgenrezeptor gehört zur Klasse der nukleären Steroidhormonrezeptoren und wirkt hauptsächlich als Transkriptionsfaktor (Heemers und Tindall, 2007). In den Sertoli-Zellen findet die Umwandlung von Testosteron in Östradiol und Dihydrotestosteron zur Entwicklung und Differenzierung der Keimzellen zu Spermien statt.

Der Androgenrezeptor zeigte übereinstimmend bei Ratte, Maus und Mensch eine Kernfärbung der Sertoli-Zellen. Darüber hinaus waren im Interstitium Leydigzellen, Peritubulärzellen und Gefäßmuskelzellen nukleär angefärbt.

Die Abbildungen und die statistischen Auswertungen der humanen Hodenbiopsien mit Angabe von Zellzahlen finden sich in der Doktorarbeit von M. Wolter.

3.1.3 Smad3 als Marker für Spermatozyten

Die Smad-Proteine sind die wichtigsten Mediatoren im Signalweg der TGF-beta Familie. TGF-betas gehören zu den Zytokinen und spielen eine wichtige Rolle in der Proliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose durch direkte Bindung an die DNA, zusammen mit Transkriptionsfaktoren, und Aktivierung der Transkription spezifischer Gene (Heldin et al., 1997). Es gibt acht verschiedene Smad-Proteine, die in drei Unterklassen unterteilt werden können. Smad3 gehört zur Klasse der Rezeptor-aktivierten Smads (Shi und Massagué, 2003).

In den Versuchen bei Ratte und Maus zeigten sich Lokalisationen von Smad3 im Zytoplasma der primären pachytänen Spermatozyten, der elongierten Spermatiden und der Spermatozoen (Abb. 8 und 9).

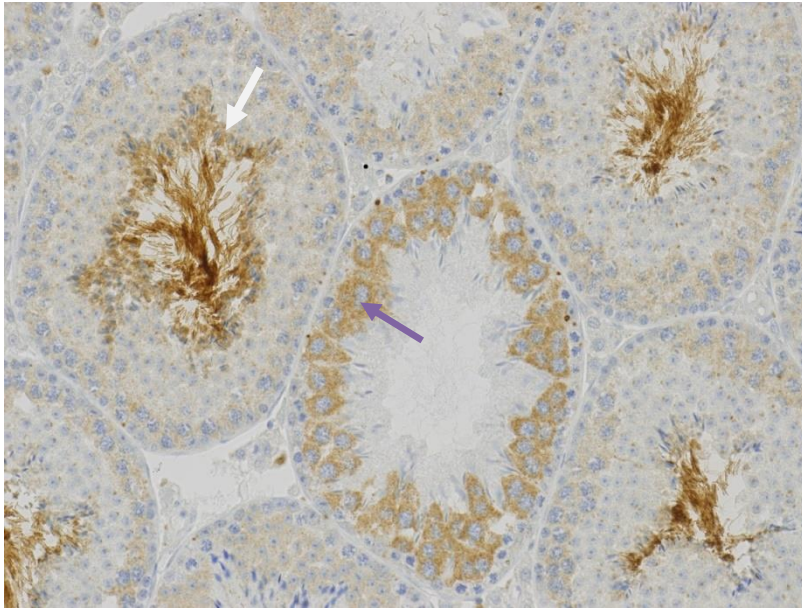


Abbildung 8 Nachweis von Smad3 an einem adulten Maushoden. Der Bildausschnitt zeigt die unterschiedlich stark ausgeprägte, weil stadienabhängige Färbung des Zytoplasmas von Spermatozyten. Die stärkste Färbung weisen pachytäne Spermatozyten auf (lilauer Pfeil). Des Weiteren ist die Färbung der elongierten Spermatiden und Spermatozoen erkennbar (weißer Pfeil). Primärvergrößerung 20fach

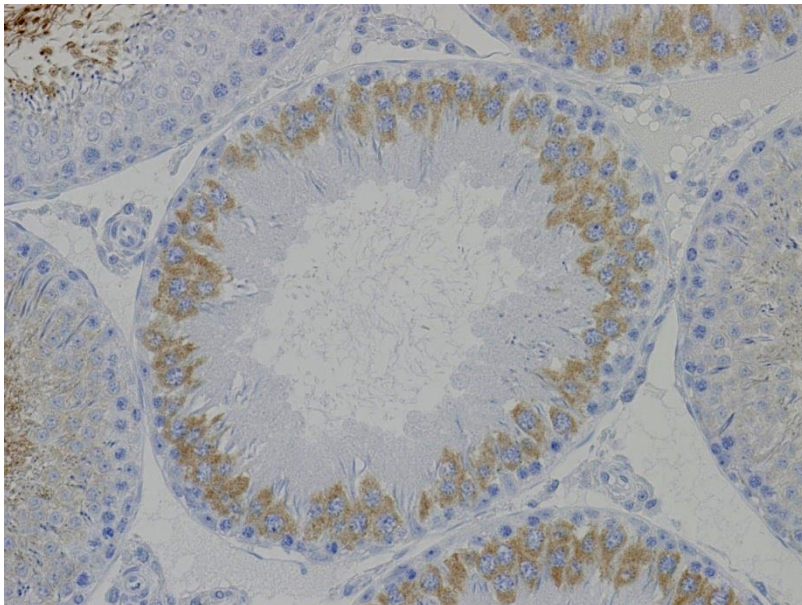


Abbildung 9 zeigt einen Ausschnitt eines adulten Rattenhodens. Dargestellt sind Smad3-positive Spermatozyten. Im linken oberen Rand sind noch einige Spermatozoen bzw. elongierte Spermatiden angeschnitten. Primärvergrößerung 20fach

Bei den humanen Biopsien war Smad3 ebenfalls im Zytoplasma der Spermatozyten lokalisiert. Dabei war eine Stadienabhängigkeit in der Intensität der Färbung zu erkennen – die pachytänen Spermatozyten färbten sich am intensivsten, schwach waren späte zygotäne Spermatozyten im Stadium VI angefärbt. Vereinzelt waren frühe runde Spermatiden (nicht dargestellt) und bei Patienten der Gruppe NSP elongierte Spermatiden angefärbt sichtbar, was aber nur sehr selten vorkam (nicht dargestellt). Des Weiteren waren in einzelnen Tubuli blasse nukleäre Färbungen der Spermatogonien (Abb. 10A, 10B und 11) sowie vereinzelt schwache perinukleäre Färbungen der Sertoli-Zellen erkennbar (Abb. 10B). Diese zeigten bei der Auswertung jedoch keine Korrelation, sodass keine weiteren Untersuchungen dazu stattfanden.

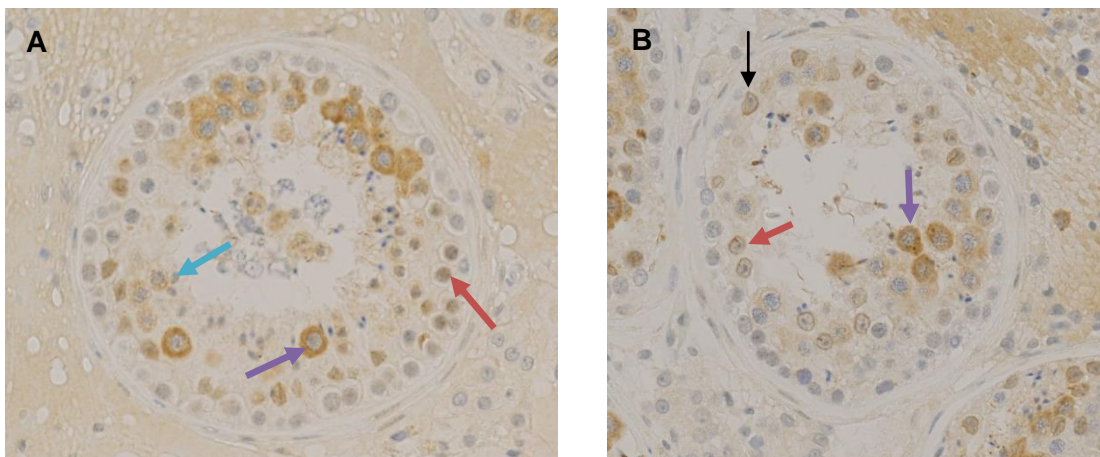


Abbildung 10 A und B zeigt jeweils einen humanen Hoden von unterschiedlichen Patienten mit NSP. Smad3 ist in den Spermatozyten zytoplasmatisch exprimiert, besonders intensiv in den pachytänen Spermatozyten (lilane Pfeile). Mit einem hellblauen Pfeil sind späte zygotäne Spermatozyten markiert. In Bild A und B sind mit roten Pfeilen die nukleären Färbungen der Spermatogonien markiert, sowie in Bild B mit schwarzem Pfeil die perinukleäre Färbung der Sertoli-Zellen. Dies ist aber keine typische Färbung, die meisten Biopsien zeigten lediglich die pachytänen Spermatozyten angefärbt (s. Abb. 11, 12, 13). Unklar bleibt die Ursache, eventuell kann es sich um ein Problem der Fixierung in einzelnen Biopsien handeln.

Im Durchschnitt zeigten sich ca. 16 Smad3-positive Zellen. Tubulus A zeigt 16 angefärbte Spermatozyten und Tubulus B 12 Smad3-positive Spermatozyten. Primärvergrößerung 20fach

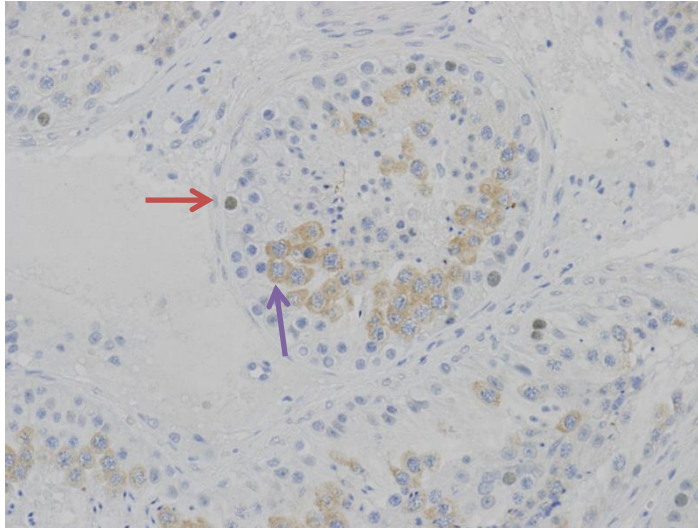


Abbildung 11 zeigt einen humanen Hoden eines Patienten mit NSP. In diesem Tubulus ist eine nukleäre Lokalisation von Smad3 in einer Spermatogonie (roter Pfeil) und die zytoplasmatische Färbung besonders der pachytänen Spermatozyten (lilauer Pfeil) sichtbar. Primärvergrößerung 20fach

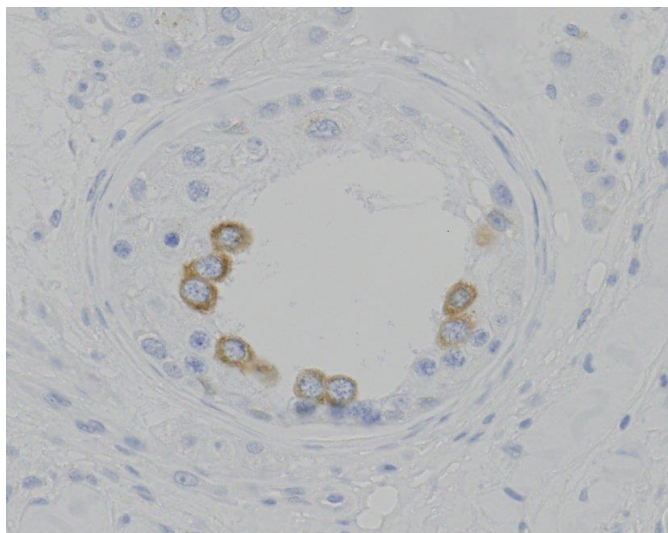


Abbildung 12 zeigt einen humanen Hoden eines Patienten mit SZA. Aufgrund der fehlenden Differenzierung ab dem Spermatozytenstadium sind knapp 80% weniger Zellen gefärbt als bei NSP. Dieser Tubulus zeigt 8 Smad3 positive Spermatozyten und liegt damit deutlich über dem SZA-Durchschnitt von 2,6. Primärvergrößerung 20fach

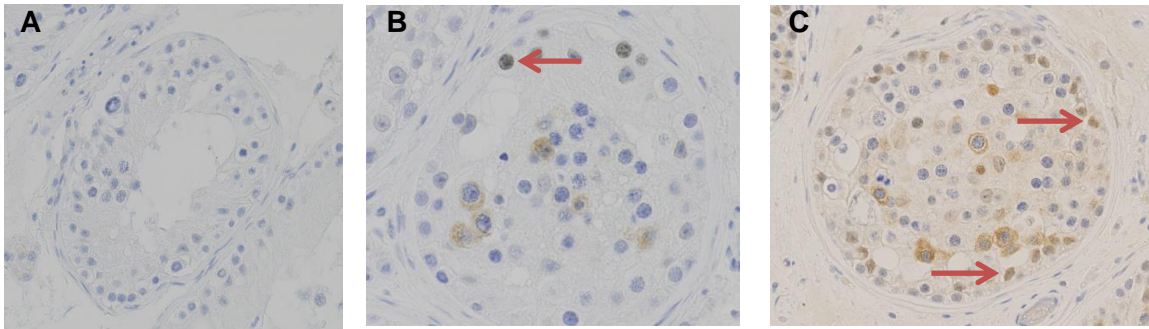


Abbildung 13 A-C zeigen drei verschiedene humane Hoden von Patienten mit SZA und demonstrieren die Variabilität bei der Anzahl von Smad3-positiven Spermatozyten bei dieser Patientengruppe. Auch stellt sich in Abb. 13B und C die nukleäre Färbung der Spermatogonien dar (rote Pfeile). Primärvergrößerung 20fach

Ausgewertet wurden insgesamt 66 Biopsien von humanen Hoden, je 33 der Klassifikation NSP und SZA. Die Zählungen ergaben $16,3 \pm 1$ Smad3-positive Spermatozyten pro Tubulus bei NSP, SZA zeigte hingegen mit 6-fach weniger Zellen nur $2,6 \pm 0,5$ Smad3 positive Spermatozyten pro Tubulus. Dies entspricht einer Abnahme um 84% und war mit $p=0,001$ signifikant.

Im Vergleich von NSP zur Patientengruppe HYP zeigte sich mit 8,3 Smad3-positiven Spermatozyten pro Tubulus eine signifikante Abnahme um 49% ($p=0,001$). SZA zu HYP waren ebenfalls signifikant ($p=0,001$). Die Daten dieser Patientengruppe wurden von Herrn M. Wolter erhoben.

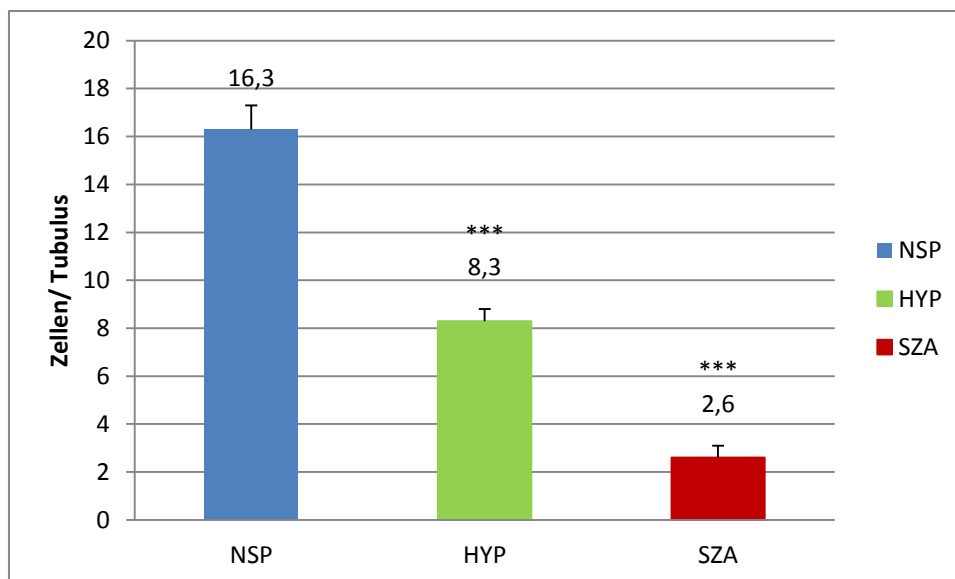


Abbildung 14 zeigt die Anzahl der Smad3-positiven Spermatozyten in NSP, SZA und HYP. Die Unterschiede zwischen NSP und SZA als auch von NSP zu HYP waren statistisch signifikant mit $p=0,001$ (***). Die Daten der HYP-Gruppe wurden von Herrn M. Wolter erhoben.

3.1.4 Histon H3Serin10-P als Marker für meiotische Teilungen der Spermatozyten

Zwischen der Phosphorylierung des Histons H3 an der Position Serin10 und der Kondensation des Chromatins während der Mitose und der Meiose besteht in allen Organismen ein enger Zusammenhang (Prigent und Dimitrov, 2003). Aufgrund dieses Hintergrundes eignete sich der Antikörper H3Serin10-P als Marker für meiotische Zellteilungen, die bei der Spermatogenese während des Stadiums der Spermatozyten stattfinden.

So zeigte die immunhistochemische Untersuchung von Ratten- und Maushoden eine Kernlokalisierung der Spermatozyten, die sich in der späten diplotänen Phase der Meiose oder der Diakinese, in der die RNA-Synthese endet und sich die Kernhülle auflöst, befanden (Abb. 15 und 16). Bei einigen Zellen waren deutlich die kondensierten Chromosomen zu erkennen. Darüber hinaus war H3Ser10-P deutlich schwächer auch in elongierten Spermatischen lokalisiert.

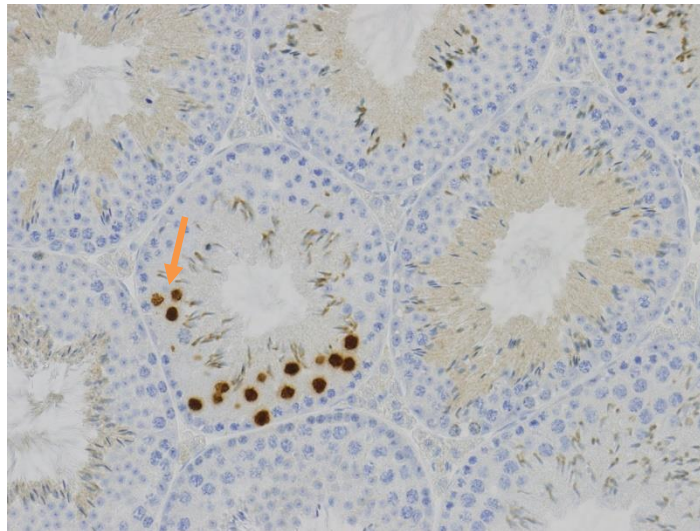


Abbildung 15 - Dargestellt ist ein adulter Maushoden, an dem H3Ser10-P nachgewiesen wurde. Der Bildausschnitt zeigt mehrere positive Kerne der Spermatozyten sowie deutlich schwächer dargestellte elongierte Spermatischen. Die Pfeilmarkierung weist exemplarisch auf eine Zelle, deren kondensierte Chromosomenstruktur gut erkennbar ist. Primärvergrößerung 20fach.

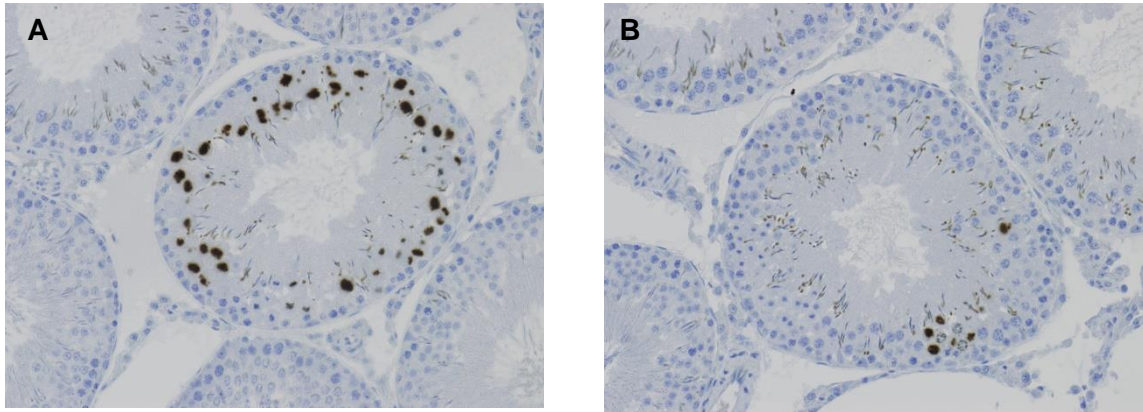


Abbildung 16 A und B zeigen verschiedene Ausschnitte eines adulten Rattenhodens. Tubulus **A** zeigt viele meiotische Teilungen, was aber nur in wenigen Tubuli vorkam. Ebenso ist die schwächere Färbung der elongierten Spermatiden erkennbar. In Tubulus **B** sind weniger meiotische Teilungen angefärbt, dieser Tubulus spiegelt eher die durchschnittliche Anzahl wider. Insgesamt wird durch beide Abbildungen die Variabilität der Anzahl der meiotischen Teilungen innerhalb der verschiedenen Tubuli gezeigt. Primärvergrößerung 20fach

Bei humanen Hoden wurden ebenfalls die kondensierten Chromosomen in den Kernen der diplotänen Spermatozyten im Stadium VI angefärbt; teilweise waren kondensierte Chromosome sichtbar, welche sich in der Äquatorialebene befanden (Abb. 18).

Die Färbung dieses Antikörpers war sehr deutlich und damit dessen Auszählung kaum von unklaren Färbegrenzen abhängig.

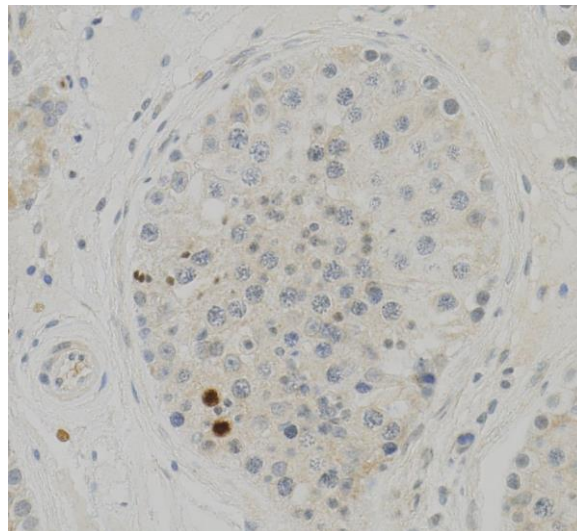


Abbildung 17 zeigt einen humanen Hoden eines Patienten mit NSP. Der Bildausschnitt beinhaltet einen Tubulus mit zwei Spermatozyten, die sich in der meiotischen Teilung befinden und daher H3Ser10-P-positiv sind. Primärvergrößerung 20fach

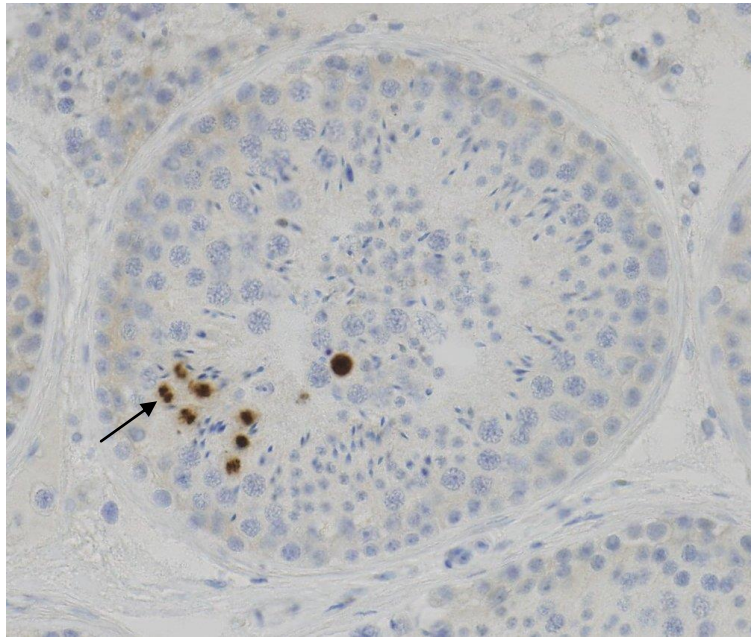


Abbildung 18 zeigt einen humanen Hoden eines Patienten mit NSP. Dieser Ausschnitt weist gut erkennbare Teilungen der Chromosomen in der Äquatorialebene auf (Pfeil). Im Vergleich zu Abb. 17 zeigt dieser Tubulus mit 8 meiotischen Teilungen mehr H3Ser10-P-positive Zellen. Insgesamt ergab sich ein Durchschnitt von 1,06 meiotischen Teilungen pro Tubulus der Patientengruppe NSP. Primärvergrößerung 20fach

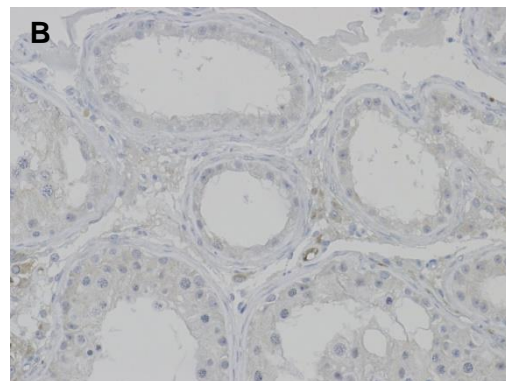
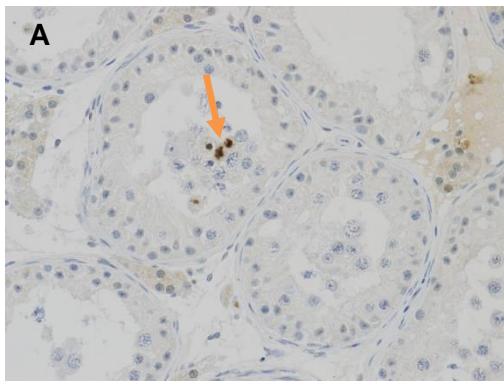


Abbildung 19 A und B zeigen einen humanen Hoden eines Patienten mit SZA. Abb. **A** zeigt drei meiotische Teilungen (Pfeil), Abb. **B** hingegen keine. Durchschnittlich wurden 0,2 meiotische Teilungen pro Tubulus angefärbt, dies sind rund 80% weniger als bei Patienten mit NSP. Primärvergrößerung 20fach

Insgesamt wurden 66 humane Hodenbiopsien gefärbt, wovon jeweils 33 der Kategorie NSP oder SZA zugeordnet waren. Die Auszählung der Tubuli ergab $1,06 \pm 0,1$ meiotische Teilungen pro Tubulus bei NSP und $0,2 \pm 0,03$ meiotische Teilungen pro Tubulus bei SZA. Dies entspricht einer signifikanten Abnahme um 80% zwischen den beiden Gruppen mit $p=0,001$.

Im Vergleich von NSP mit der Patientengruppe HYP, welche aus 44 Biopsien bestand, ergab sich eine nicht signifikante Abnahme um 3%, SZA zu HYP war mit $p=0,001$ dagegen signifikant. Die Analysen der HYP-Patienten wurden von Herrn M. Wolter durchgeführt.

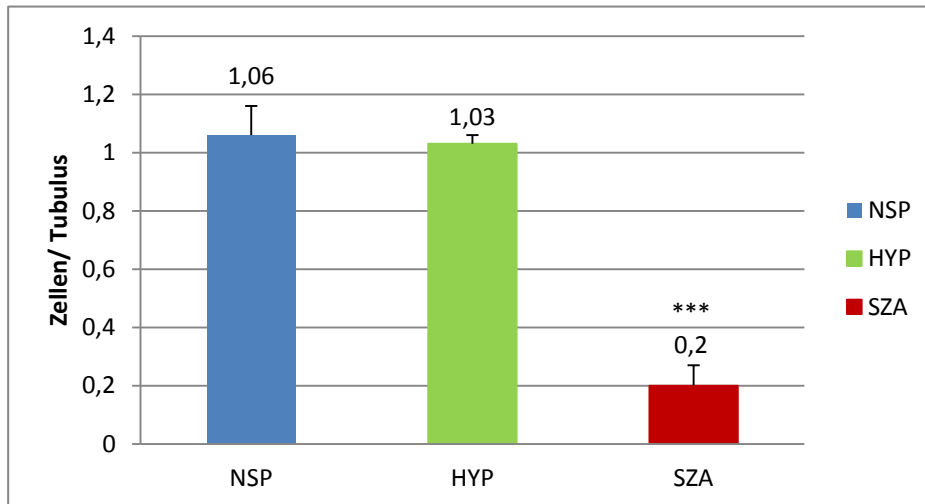


Abbildung 20 stellt die Anzahl der H3Ser10-P-positiven meiotischen Teilungen als Mittelwert mit Angabe des SEM dar. Im Vergleich zwischen NSP zu SZA ergab sich eine signifikante Abnahme (***) $p= 0,001$ um 80%, der Vergleich von HYP zu SZA ergab eine ebenfalls signifikante Abnahme mit $p= 0,001$. NSP zu HYP waren nicht signifikant.

Die Daten der Patientengruppe HYP wurden vergleichsweise aus der Doktorarbeit von Herrn Martin Wolter hinzugezogen.

3.1.5 CREM-1 als Differenzierungsmarker für runde Spermatozoen

Der *cAMP response element modulator* (CREM-1) spielt eine wichtige Rolle als Transkriptionsfaktor - insbesondere in der post-meiotischen Phase während der Differenzierung von runden zu elongierten Spermatozoen. Hierbei werden *Transitions-Proteine* und *Protamine* transkribiert, welche zur DNA-Kompaktierung und zur Veränderung des Nukleus (z.B. Akrosomenformation) beitragen. Diese Expression wird über eine Signalkaskade gesteuert, in der CREM eine entscheidende Rolle als Aktivator einnimmt (Kimmins et al., 2004). Somit wurde CREM-1 als Differenzierungsmarker für runde Spermatozoen ausgewählt.

Es zeigte sich eine eindeutige nukleäre Lokalisation von CREM-1 in den runden Spermatozoen bei allen drei Spezies (Abb. 21-23).

Ratte und Maus zeigten zudem eine Lokalisation von CREM-1 in einzelnen frühen elongierten Spermatischen (nicht dargestellt).

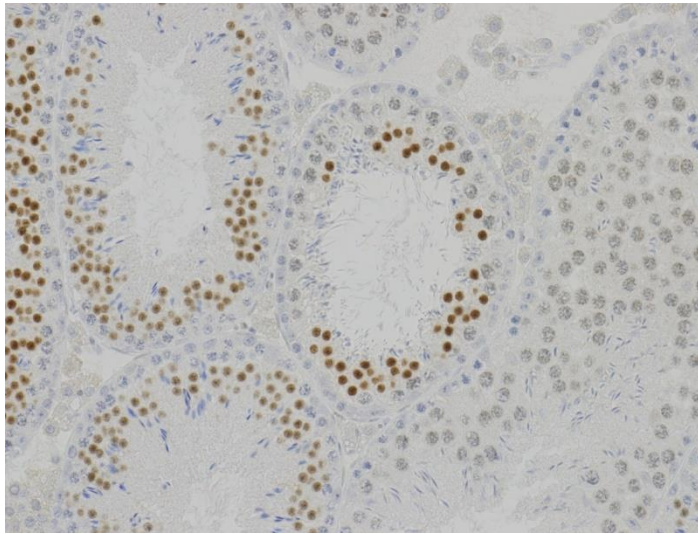


Abbildung 21 zeigt einen adulten Mauhoden, bei dem CREM-1 nachgewiesen wurde. Der Bildausschnitt zeigt mehrere Tubuli mit nukleärer CREM-1 Lokalisation in den runden Spermatischen. Die Intensität der Färbung variierte stark. Primärvergrößerung 20fach

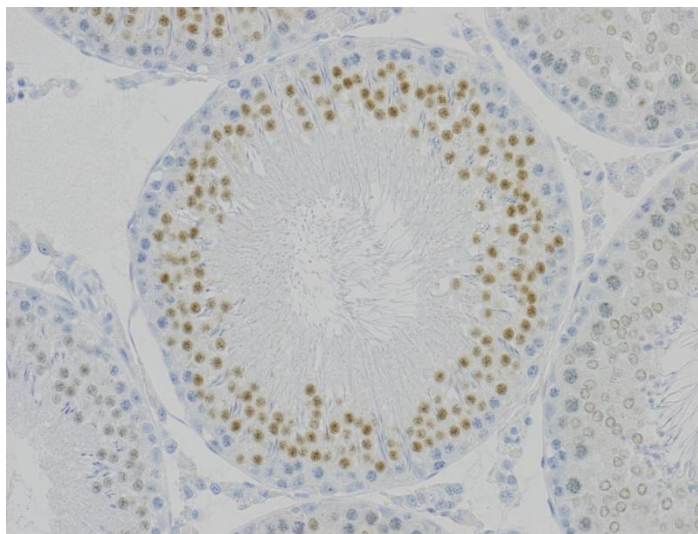


Abbildung 22 zeigt einen adulten Rattenhoden mit nukleärer Färbung der CREM-1 positiven runden Spermatischen. Primärvergrößerung 20fach

Beim Menschen ist CREM-1 ebenfalls in den Kernen der runden Spermatischen exprimiert (Abb. 12). Die Intensität der Färbung variierte innerhalb eines Tubulus zwischen den verschiedenen runden Spermatischen stark (Abb. 23). Für die Auswertung der humanen Hodenbiopsien wurde wiederum auf je 33 Biopsien der Kategorien NSP und SZA zurückgegriffen. Die Auszählung ergab $20,4 \pm 1,4$ CREM-1 positive runde

Spermatiden pro Tubulus bei NSP und $0,6 \pm 0,2$ runde Spermatiden pro Tubulus bei SZA (Abb. 24). Dies entspricht einer signifikanten Abnahme von 96% mit $p=0,001$. Im Vergleich von NSP zu den Patienten der Gruppe HYP von Herrn M. Wolter gab es eine nicht signifikante Abnahme von 9%, im Vergleich zu SZA war dies wiederum mit $p=0,001$ signifikant.

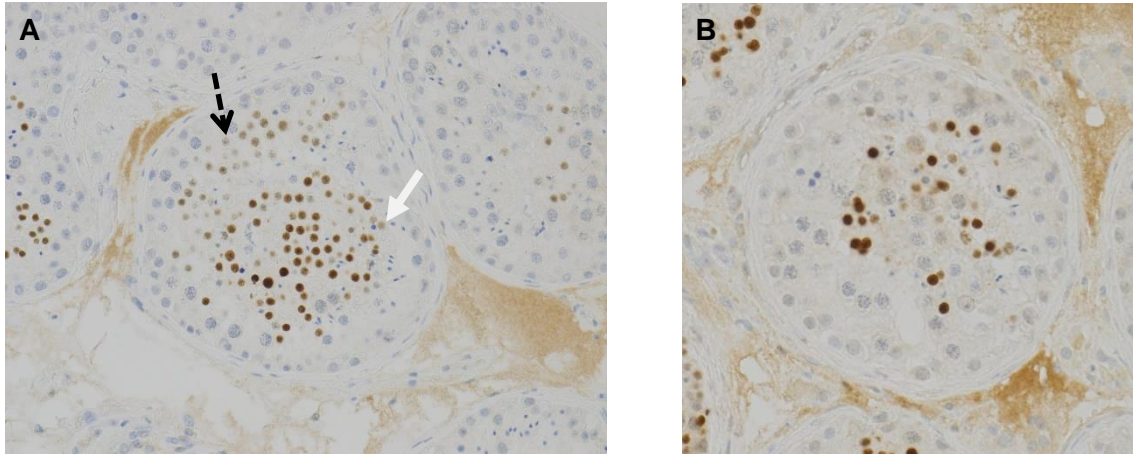


Abbildung 23 A und B zeigen einen humanen Hoden eines Patienten mit NSP. CREM-1 ist in den Kernen der runden Spermatiden zu finden. Tubulus **A** zeigt 60 CREM-1 positive Spermatiden bei einem Durchschnittswert von 20,4 gefärbten Spermatiden/Tubulus bei NSP, Tubulus **B** zeigt hingegen 25 CREM-1 positive Spermatiden. Anhand dieser Abbildungen sieht man die Variabilität der Färbeintensität. Der schwarze gestrichelte Pfeil zeigt beispielhaft auf eine Zelle, die zu schwach gefärbt war und nicht gezählt wurde, der weiße Pfeil zeigt auf eine, die noch gewertet wurde. Primärvergrößerung 20fach

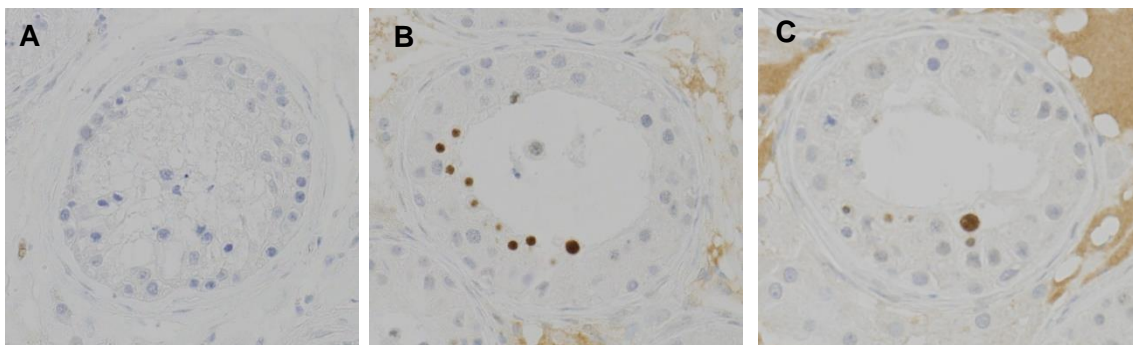


Abbildung 24 A - C zeigen Ausschnitte von Hoden von Patienten mit SZA. Im Vergleich zu NSP waren rund 96% weniger CREM-1-positive Spermatiden zu finden, durchschnittlich nur 0,6 Spermatiden pro Tubulus. Es sind unterschiedliche Verteilungen der Färbungen dargestellt – von keiner Färbung (**A**) bis zu mehreren Zellen (**B**). Im Vergleich zu Abb. 23 ist eine deutliche Abnahme erkennbar. Primärvergrößerung 20fach

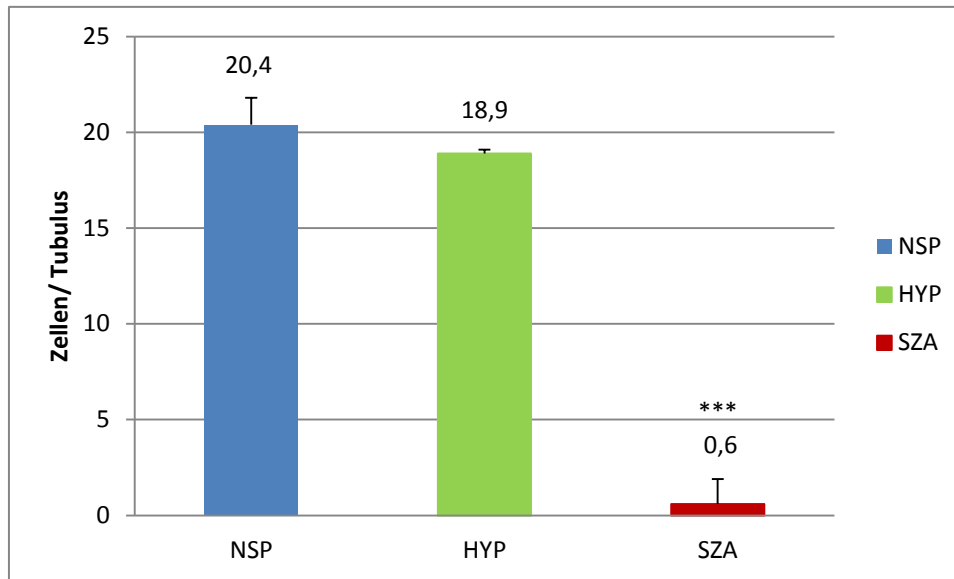


Abbildung 25 zeigt die Verteilung der Anzahl der CREM-1-positiven Spermatiden zusammen mit der Angabe des SEMs. Die Zellzahlabnahme um 96% im Vergleich zwischen NSP zu SZA war mit $p=0,001$ (***) signifikant, ebenso der Vergleich von HYP zu SZA ($p=0,001$). NSP zu HYP war mit einer Abnahme um 9% nicht signifikant. Die Daten der HYP-Patienten wurden von Herrn M. Wolter erhoben.

3.2 Quantifizierung von Sertoli-Zellen und Keimzellen an humanen Hodenbiopsien

3.2.1 Auswertung der Hodenbiopsien

Bei den Patienten mit der klinischen Diagnose „Infertilität“ und der histologischen Unterscheidung in normale Spermatogenese (NSP) und Spermatozytenarrest (SZA) wurden die immunhistochemischen Färbungen der Hodenbiopsien genauer untersucht. Mithilfe der Charakterisierung der verschiedenen Zelltypen mit spezifischen Antikörpern für Proteinmarker wurden diese Zellen ausgezählt, wobei eine Mindestanzahl von 10 Tubuli pro Biopsie als untere Grenze festgelegt wurde. Weitere Ergebnisse zu den Versuchen, welche mit Hilfe der Antikörper gegen den Androgenrezeptor und UTF-1 die frühen Stadien der Spermatogenese betreffen, finden sich in der Dissertation von Herrn Martin Wolter. Seine Untersuchungen umfassten des Weiteren die Ergebnisse der HYP-Patienten als weitere Vergleichsgruppe. Sowohl in der Dissertation von Herrn M. Wolter als auch in der vorliegenden Arbeit werden die jeweiligen Ergebnisse vergleichend zusammengeführt, ausgewertet und interpretiert.

Die Sertoli-Zellen wurden mit Hilfe des Androgenrezeptors angefärbt. Anhand dieser Zählungen zeigten sich durchschnittlich 19,7 positive Sertoli-Zellen pro Tubulus bei NSP und 14,5 bei SZA (Abb. 26). Dies entspricht einem signifikanten Unterschied ($p=0,001$) von 26,6%. Die Spermatogonien wurden mit 20,3 pro Tubulus bei NSP und 11,1 bei SZA gezählt, was eine Differenz von 45,3% ergibt. Aufgrund dieser unerwarteten Ergebnisse, dass bei SZA-Patienten sowohl die Spermatogonien als auch die Sertoli-Zellen vor dem eigentlichen Arrest reduziert waren, wurden zusätzlich noch die spermatogonialen Stammzellen A dark und A pale und die mitotisch aktiven Spermatogonien Typ B mit Hilfe von UTF-1 ausgezählt. Dieses ergab mit einer Signifikanz von $p=0,001$ eine Differenz von 68,5% von NSP zu SZA. In Zahlen bedeutet dies 7,4 UTF-1-positive Spermatogonien pro Tubulus bei NSP und 2,1 bei SZA (Abb. 26). Die SEM-Werte sind in Abb. 26 und Tab. 4 dargestellt. Zusammenfassend wurden die drei Zelltypen Sertoli-Zellen, Spermatogonien und spermatogoniale Subtypen als Stammzellpool bezeichnet.

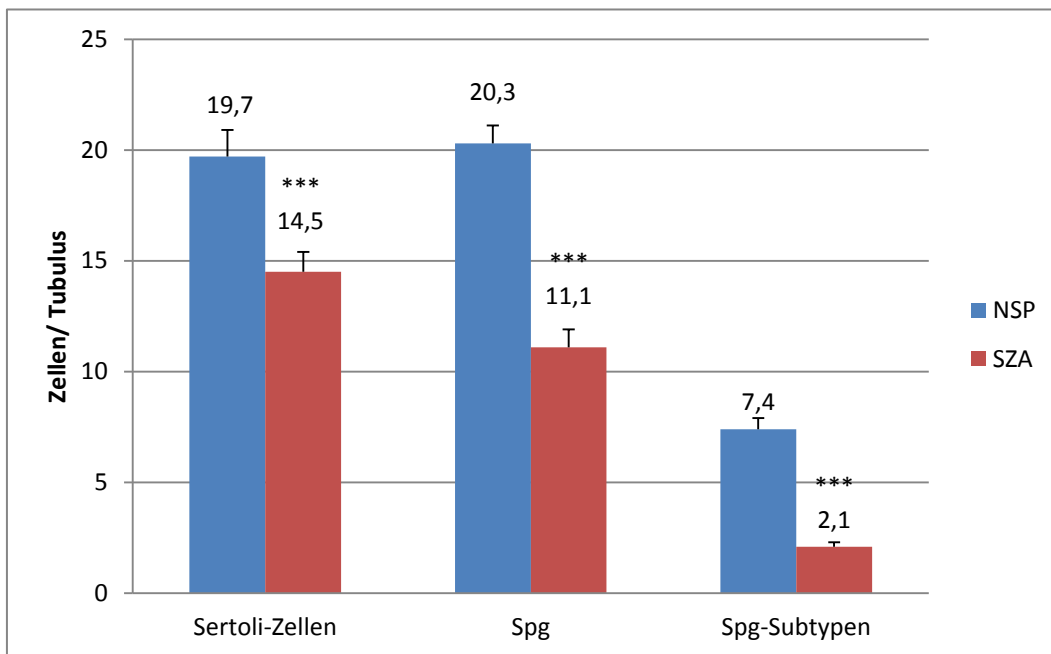


Abbildung 26 zeigt anschaulich die Unterschiede zwischen NSP und SZA im Stammzellpool mit Angabe des SEMs. Die Abnahme bei den Sertoli-Zellen betrug zwischen NSP und SZA 26,6%, bei den Spermatogonien 45,3% und bei den spermatogonialen Subtypen 68,5%. Die Vergleiche von NSP zu SZA waren in allen drei Zelllinien mit $p=0,001$ signifikant.

Die weiteren Auswertungen betrafen jene Zelltypen (Spermatozyten und Spermatischen), die während der Spermatogenese dem Stadium der meiotischen Reifung zugeteilt werden können. Es wurden 16,3 Smad3-positive Spermatozyten pro Tubulus bei NSP und 2,6 bei SZA gezählt, was eine Abnahme von 84% bedeutet (Abb. 27). Wurden nur die meiotischen Teilungen der Spermatozyten anhand von H3Ser10-P gezählt, zeigten

sich 1,06 positive Zellen pro Tubulus bei NSP und 0,2 bei SZA. Dies entspricht einer Reduktion um 80%. Die deutlichste Abnahme zeigte sich mit 96% bei der Auszählung der Spermatiden mit 20,4 CREM-1-positiven Spermatiden pro Tubulus bei NSP und 0,6 bei SZA (Abb. 27). Alle Vergleiche waren mit $p=0,001$ signifikant (Tab. 4).

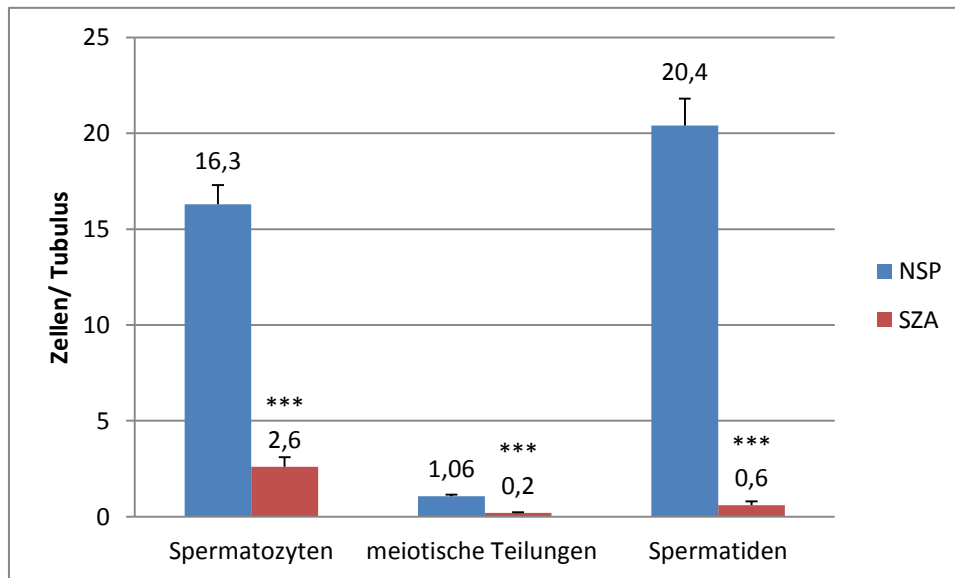


Abbildung 27 stellt die Vergleiche zwischen NSP und SZA bei den Meiose-Defekten mit Angabe des SEMs dar. Alle Vergleiche waren mit $p=0,001$ signifikant. Die Zellzahldifferenz zwischen NSP und SZA betrug bei den Spermatozyten 84%, bei den meiotischen Teilungen 80% und bei den runden Spermatiden 96%.

Tabelle 4 Auswertung der Keim- und Sertoli-Zellen infertiler Patienten

| | SZ | | Spg | | SSZ | | Spc | | m.T. | | Spd | |
|--------------------|------|------|-------|------|-------|-----|-------|-----|-------|------|-------|-----|
| | NSP | SZA | NSP | SZA | NSP | SZA | NSP | SZA | NSP | SZA | NSP | SZA |
| Mittelwerte | 19,7 | 14,5 | 20,3 | 11,1 | 7,4 | 2,1 | 16,3 | 2,6 | 1,06 | 0,2 | 20,4 | 0,6 |
| SEM | 1,2 | 0,9 | 0,8 | 0,8 | 0,5 | 0,2 | 1 | 0,5 | 0,1 | 0,03 | 1,4 | 0,2 |
| N | 33 | 33 | 33 | 33 | 33 | 33 | 33 | 33 | 33 | 33 | 33 | 33 |
| p NSP/SZA | 0,05 | | 0,001 | | 0,001 | | 0,001 | | 0,001 | | 0,001 | |

n=Biopsieanzahl, SZ=Sertoli-Zellen, Spg=Spermatogonien, SSZ=spermatogoniale Stammzellen, Spc=Spermatozyten, m.T.=meiotische Teilungen, Spd=Spermatiden.

3.2.2 Kategorisierung der Spermatogenesedefekte der infertilen Patienten

Anhand der Auswertung der Hodenbiopsien (s. 2.3) sollte es durch eine Kategorisierung der Patienten in Gruppen möglich sein, die Defizite der Patienten besser beurteilen und interpretieren zu können. Die Einteilung, ob ein Defizit vorlag,

erfolgte anhand der ermittelten Zellzahlen pro Tubulus. Lagen diese Zahlen unterhalb des festgelegten Cut-offs der jeweiligen Zellart, so wurde dies als Defizit gewertet (Tab. 5). Für eine Zellzahl unterhalb des Cut-offs wurde eine 1 vergeben, lag kein Defizit vor, wurde eine 0 vergeben. Für jeden Patienten wurde die Summe der jeweiligen Defizite gebildet.

Tabelle 5 Auswertung der Zellzahlen der Patientengruppen NSP und SZA

| | SZ | Spg | SSZ | Spc | m. T. | Spd |
|----------------|------------|------------|------------|------------|--------------|------------|
| NSP | 19,7 ± 1,2 | 20,1 ± 0,8 | 7,4 ± 0,5 | 16,3 ± 1 | 1,06 ± 0,1 | 20,4 ± 1,4 |
| SZA | 14,5 ± 0,9 | 11,1 ± 0,8 | 2,1 ± 0,2 | 2,6 ± 0,5 | 0,2 ± 0,03 | 0,6 ± 0,2 |
| Cut-off | 16 | 16 | 3,75 | 8,6 | 0,51 | 10,9 |

SZ=Sertoli-Zellen, Spg=Spermatogonien, SSZ=spermatogoniale Stammzellen, Spc=Spermatozyten, m.T.=meiotische Teilungen, Spd=Spermatiden, Angabe des MW ± SEM

Die Zuordnung zu den Gruppen erfolgte anhand der Reifestadien der Spermatogenese. Insgesamt wurden vier Gruppen gebildet. Zur ersten Gruppe, dem Stammzellpool, wurden die Spermatogonien und deren Subtypen, aber auch die Sertoli-Zellen gezählt. Patienten fielen in diese Gruppe, wenn sie in einer oder mehreren dieser drei Zellarten eine Zellzahl unterhalb des Cut-offs aufwiesen. Zur Gruppe der Meiose-Defekte wurden Patienten zusammengefasst, die bei mindestens einer Zellzahl von den Spermatozyten, meiotischen Teilungen oder den Spermatiden einen Defekt aufwiesen. In die dritte Gruppe wurden jene Patienten eingeteilt, die sowohl in Gruppe 1 als auch in Gruppe 2 ein Defizit zeigten. Es können aber auch innerhalb des Stammzellpools oder der Meiose-Defekte in mehreren Zelltypen Defekte vorgelegen haben, sodass eine Gewichtung in überwiegend Stammzellpool oder Meiose-Defekt vorgenommen werden konnte. In eine weitere Gruppe wurden nur jene Patienten aufgenommen, die keinen Defekt in einer der Zellarten hatten.

Zur besseren Übersicht sind nachfolgend die möglichen Gruppen aufgelistet:

1. Ein Defekt im Stammzellpool umfasste eine Zellzahlabnahme in den Sertoli-Zellen, spermatogonialen Stammzellen und/ oder den Spermatogonien.
2. Einen Meiose-Defekt konnten Spermatozyten, meiotische Teilungen und/ oder Spermatiden aufweisen.
3. Die Patienten innerhalb der dritten Gruppe wiesen sowohl einen Defekt innerhalb des Stammzellpools als auch im Ablauf der Meiose in mindestens einer Zellart auf.

4. In einer weiteren Gruppe wurden jene Patienten zusammengefasst, bei denen kein Defekt in den ersten beiden Gruppen festgestellt werden konnte. Die Summe der Defekte lag daher bei 0.

Zum besseren Verständnis folgen zwei Beispiele:

Bei Patient A handelte es sich um einen Patienten mit NSP. In der Auswertung zeigte er die folgenden Zellzahlen (in Klammern sind die jeweiligen Cut-offs angegeben):

| SZ | Spg | SSZ | Spc | m. T. | Spd |
|-----------|------------|------------|------------|--------------|------------|
| 20,8 (16) | 16,3 (16) | 3,2 (3,75) | 30,9 (8,6) | 1,41 (0,51) | 39 (10,9) |
| 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |

SZ=Sertoli-Zellen, Spg=Spermatogonien, SSZ=spermatogoniale Stammzellen, Spc=Spermatozyten, m.T.= meiotische Teilungen, Spd=Spermatiden

Die Klassifikation ergab, dass bis auf die spermatogonialen Stammzellen alle Werte oberhalb des Cut-offs lagen. Somit ergab sich also in den Stammzellen ein Defizit, die Summe der Probleme im Stammzellpool lag daher bei 1. Somit wurde dieser Patient in die Gruppe der Defekte im Stammzellpool eingeordnet.

Patient B gehörte der Gruppe der SZA-Patienten an. In der Auszählung ergaben sich die folgenden Zellzahlen (in Klammern Angabe der jeweiligen Cut-offs):

| SZ | Spg | SSZ | Spc | m. T. | Spd |
|-----------|------------|------------|------------|--------------|--------------|
| 23,8 (16) | 22,3 (16) | 3,3 (3,75) | 3,19 (8,6) | 0,083 (0,51) | 0,714 (10,9) |
| 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |

SC=Sertoli-Zellen, Spg=Spermatogonien, SSC=spermatogoniale Stammzellen, Spc=Spermatozyten, m.T.=meiotische Teilungen, Spd=Spermatiden

Bei Auswertung dieser Zahlen lagen die Werte der Sertoli-Zellen, der spermatogonialen Stammzellen und der Spermatiden oberhalb des Cut-offs (Vergabe einer 0). Die Werte der spermatogonialen Stammzellen, Spermatozyten, meiotischen Teilungen und Spermatiden waren unterhalb des Cut-offs (Vergabe einer 1). Somit lag in vier Zelltypen jeweils ein Defizit vor. Bei der Zuordnung der Defizite zu den Gruppen stellte sich heraus, dass die spermatogonialen Stammzellen in die Gruppe des Stammzellpools fielen, die Spermatozyten, meiotische Teilungen und Spermatiden aber in die Gruppe der Meiose-Defekte. Bei diesem Patienten lagen also sowohl im Stammzellpool als auch im Ablauf der Meiose Defekte vor, wodurch der Patient B der dritten Gruppe zugeordnet wurde. Da jedes Defizit mit einer 1 gewertet wurde, lag die

Summe der Probleme insgesamt bei 4, wobei allerdings drei Punkte aus der Gruppe der Meiose-Defekte und ein Punkt aus dem Stammzellpool stammten. Die Gewichtung lag daher auf der Seite der Meiose.

Bei der Kategorisierung aller Patienten zeigte sich, dass nur Patienten mit normaler Spermatogenese (NSP) keine Defizite hatten, das heißt, dass die Zellzahlen aller Patientenbiopsien während der Spermatogenese jeweils über dem Cut-off lagen. Patienten mit Spermatozytenarrest (SZA) wiesen hingegen immer einen Mangel auf - entweder im Stammzellpool oder in der Meiose oder in beiden Bereichen (Abb. 28).

15 Patienten mit NSP, d.h. 45% aller NSP-Patienten gehörten jener Gruppe an, die keinerlei Defizite aufwies. Mit 11 Patienten fielen 33% der NSP-Patienten der Gruppe mit einem Defizit im Stammzellpool zu, d.h. die Meiose lief weitestgehend normal ab, obwohl die Ausgangszellzahl vermindert war. Einen qualitativen Defekt im Ablauf der Spermatogenese, also eine Zugehörigkeit zur Gruppe mit Meiose-Defekt, zeigten nur fünf Patienten mit NSP. Zur Gruppe 3 mit einem Defizit sowohl im Stammzellpool als auch in der Meiose, gehörten zwei Patienten.

Im Gegensatz dazu wiesen bei den SZA-Patienten die meisten Patienten (58%) einen Defekt sowohl im Stammzellpool als auch im Ablauf der Meiose auf. Nur 12 Patienten wiesen ein alleiniges Defizit in der Meiose auf, welches sich auf Grund der histologischen Klassifikation als Spermatozytenarrest vermuten ließ. Bei zwei Patienten lag das Defizit im Stammzellpool allein. Es gab keinen Patienten mit SZA ohne Defizit.

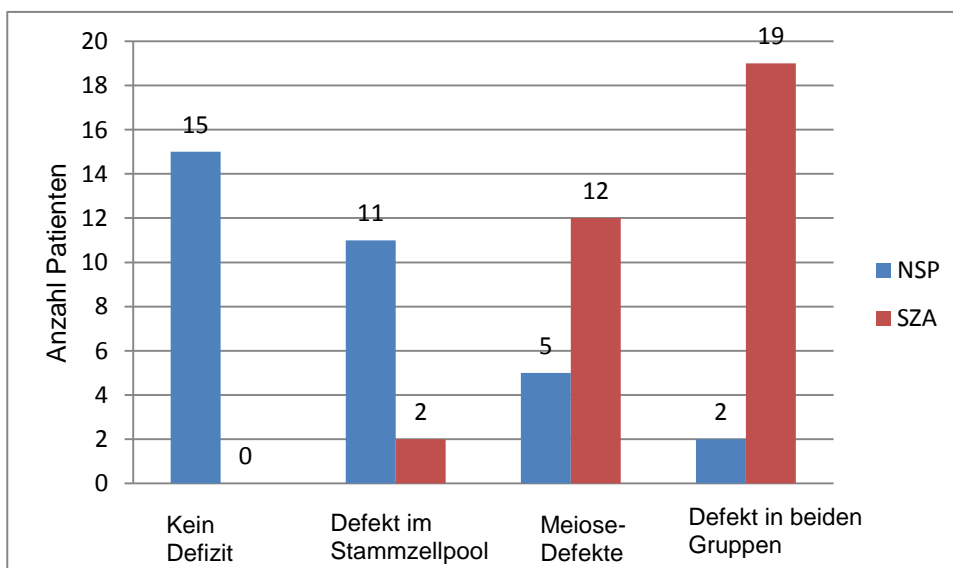


Abbildung 28 zeigt die Verteilung der Zellzahldefizite der Patienten mit NSP und SZA zu den Gruppen. Als Defizite wurden die Zellzahlen gewertet, die unterhalb des Cut-offs lagen.

3.3 Vergleichende Auswertung der Patienten mit normaler Spermatogenese oder Spermatozytenarrest zu Patienten mit Hypospermatogenese

3.3.1 Auswertung der Immunhistochemie der Hypospermatogenese im Vergleich

Nach gleichen Färbeprotokollen wie die Biopsien mit Klassifikation NSP und SZA wurden 44 Patientenproben mit der Klassifikation Hypospermatogenese (HYP) nach Bergmann und Kliesch (2009) mit den Antikörpern UTF-1, AR, Smad3, H3Ser10-P und CREM-1 angefärbt. Diese Arbeit und die folgende Auswertung wurde von Herrn Martin Wolter durchgeführt (genaue Zellzahlangabe vgl. die Dissertation von M. Wolter) und in der vorliegenden Arbeit vergleichsweise hinzugezogen. Die Hypospermatogenese bezeichnet definitionsgemäß eine qualitativ intakte Spermatogenese, aber mit reduzierter Zahl der Keimzellen im Vergleich zu NSP.

Vergleichend mit den hier vorliegenden Auswertungen der NSP-Patienten zeigte sich, dass die Zahl der Sertoli-Zellen gleich war, die Spermatogonien aber um 23,6% reduziert waren (Abb. 29). Die UTF-1-positiven Spermatogonien zeigten eine Reduktion um 10,3%. Die Spermatozyten waren um 49% reduziert, wobei die Anzahl der meiotischen Teilungen nur um 3% geringer war (Abb. 29). Die Spermatischen-Anzahl unterschied sich um 9%. Zusammenfassend war die Reduktion der Spermatogonien und der Spermatozyten mit $p=0,001$ signifikant (Tab. 6).

Die HYP ordneten sich im Vergleich zu NSP und SZA immer zwischen diesen beiden Patientengruppen an – aber deutlich näher an den NSP. Die vergleichenden Abnahmewerte zu SZA waren in allen Zellarten mit $p=0,001$ signifikant (Tab. 6).

Tabelle 6 Statistische Auswertung aller drei Zelltypen für die Patientengruppen.

| | SZ | | | Spg | | | Spermatogoniale Stammzellen | | |
|--------------------|-------|------|------|-------|------|-------|-----------------------------|-----|-----|
| | NSP | HYP | SZA | NSP | HYP | SZA | NSP | HYP | SZA |
| Mittelwerte | 19,7 | 19,7 | 14,5 | 20,3 | 15,5 | 11,15 | 7,4 | 6,7 | 2,1 |
| SEM | 1,2 | 0,7 | 0,9 | 0,8 | 0,6 | 0,8 | 0,5 | 0,4 | 0,2 |
| n | 33 | 44 | 33 | 33 | 44 | 33 | 33 | 44 | 33 |
| p NSP/SZA | 0,05 | | | 0,001 | | | 0,001 | | |
| p NSP/HYP | ns | | | 0,001 | | | ns | | |
| p HYP/SZA | 0,001 | | | 0,001 | | | 0,001 | | |

| | Spc | | | m. T. | | | Spd | | |
|-------------------|-------|-----|-----|-------|------|------|-------|------|-----|
| | NSP | HYP | SZA | NSP | HYP | SZA | NSP | HYP | SZA |
| Mittelwert | 16,3 | 8,3 | 2,6 | 1,06 | 1,03 | 0,2 | 20,4 | 18,9 | 0,6 |
| SEM | 1 | 0,5 | 0,5 | 0,1 | 0,07 | 0,03 | 1,4 | 1,3 | 0,2 |
| n | 33 | 44 | 33 | 33 | 44 | 33 | 33 | 44 | 33 |
| p NSP/SZA | 0,001 | | | 0,001 | | | 0,001 | | |
| p NSP/HYP | 0,001 | | | ns | | | ns | | |
| p HYP/SZA | 0,001 | | | 0,001 | | | 0,001 | | |

SZ=Sertoli-Zellen, Spg=Spermatogonien, Spc=Spermatozyten, m.T.=meiotische Teilungen, Spd=Spermatiden, n= Anzahl der Patientenbiospien, ns= nicht signifikant, SEM=standard error of the mean

Die Daten der HYP-Patienten von Herrn M. Wolter wurden vergleichend hinzugezogen.

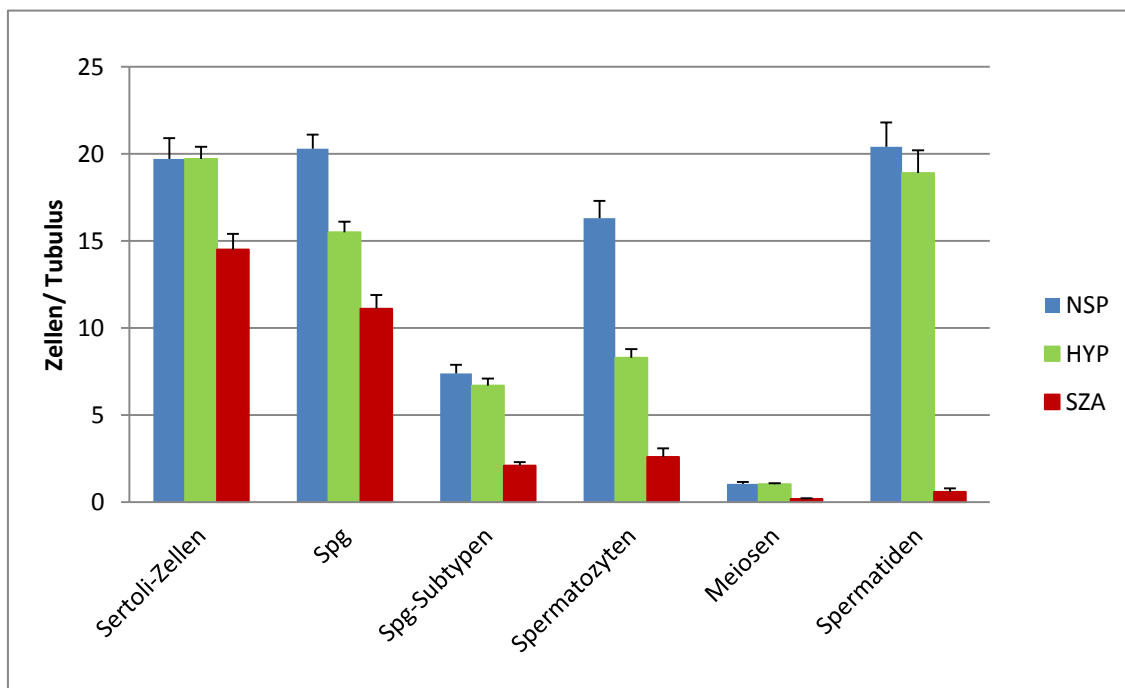


Abbildung 29 zeigt graphisch die Zellzahlverteilung vergleichend zwischen den drei Patientengruppen NSP, HYP und SZA mit Angabe des SEMs. Im Vergleich von NSP zu HYP war nur die Abnahme der Spermatogonien und Spermatozyten mit $p=0,001$ signifikant. Im Vergleich von HYP zu SZA zeigten alle Zellen mit $p=0,001$ eine signifikante Abnahme. Vgl. Kapitel 3.2.1 für die Vergleiche von NSP zu SZA. Die Daten für die frühen Stadien der Spermatogenese und der HYP-Patienten wurden von Herrn M. Wolter erhoben.

3.3.2 Kategorisierung der normalen Spermatogenese, Spermatozytenarrest und Hypospermatogenese im Vergleich

Die Kategorisierung erfolgte, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, anhand der Reifestadien der Spermatogenese unter Berücksichtigung eines Cut-offs und beinhaltete letztendlich vier Gruppen: Stammzellpool, Meiose-Defekte, Defekt in Gruppe 1 und 2 und Defekte in keiner Gruppe. Die Werte der Vergleichsgruppe HYP sowie der frühen Stadien der Spermatogenese wurden im Rahmen der Dissertation von Herrn M. Wolter erhoben und in der vorliegenden Arbeit vergleichend hinzugezogen.

Gab es bei SZA keinen Patienten und bei NSP 15 Patienten ohne Defekt, zeigte HYP 11 Patienten ohne Spermatogenesedefizit (Abb. 30). Annähernd gleich viele – nämlich 12 Patienten - konnten dem Stammzellpool der Gruppe 1 zugeordnet werden, womit die HYP-Patienten gegenüber NSP (11 Patienten) und SZA (2 Patienten) die meisten Patienten in dieser Gruppe aufwiesen. Dies war auch bei der Gruppe 2 mit Meiose-Defekten der Fall. Mit 13 Patienten bildeten die HYP ebenfalls wieder eine annähernd gleich große Gruppe, die größer war als bei SZA (12 Patienten) und NSP (5 Patienten). Die meisten Fälle in Gruppe 3 (Meiosedefekte) wiesen deutlich die SZA mit 19 Patienten auf. Bei HYP konnten 8 Patienten und bei NSP zwei Patienten dieser Gruppe zugeordnet werden. Die Verteilung der HYP ist also, wie in Abb. 30 dargestellt, sehr gleichmäßig auf die vier verschiedenen Gruppen, ohne dass ein Defizit besonders hervorsticht. Im Gegensatz zu der rein quantitativen Analyse der Zellzahlen, bei der die HYP zu den NSP immer sehr ähnliche oder zumindest meist nicht signifikant abweichende Zahlen aufwiesen, zeigten sich bei der Kategorisierung deutliche Unterschiede zwischen NSP und HYP. Wiesen die NSP-Patienten doch zumeist Defekte in der Gruppe 1 oder keine Defekte (Gruppe 4) auf, waren die HYP in allen Gruppen vertreten. Im Gegensatz zu den NSP waren also auch deutlich mehr Meiose-Defekte zu verzeichnen, was sich anhand der signifikanten Abnahme bei der Spermatozytenanzahl vermuten ließ (Abb. 30).

Die Ergebnisse zeigen zudem, wie in Kapitel 3.2.2 bereits beschrieben, dass die meisten Patienten mit SZA sowohl im Stammzellpool als auch im Ablauf der Meiose einen Defekt aufwiesen, sodass sowohl die Anzahl der spermatogonialen Stammzellen als auch die Zellteilungsrate der Spermatozyten vermindert war. In weiteren von M. Borgers durchgeführten Versuchen konnte die Hypothese gestützt werden, dass eine Verminderung der spermatogonialen Stammzellen durch eine normale oder gesteigerte Meioserate der Spermatozyten ausgeglichen werden kann (vgl. Borgers et al., 2014).

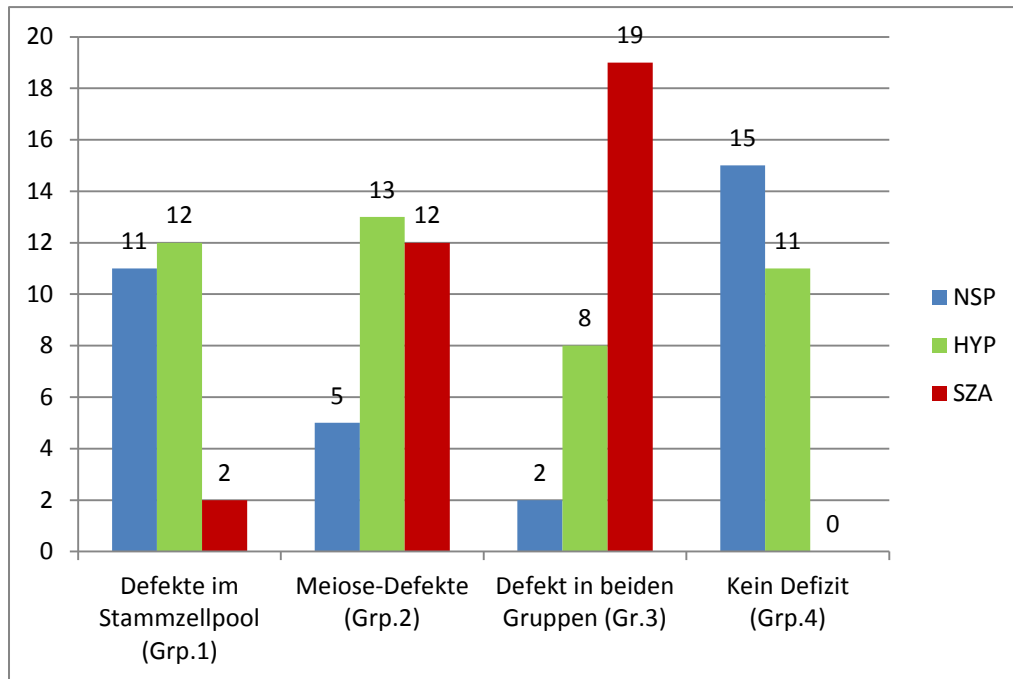


Abbildung 30 zeigt graphisch die Verteilung der Patienten der drei verschiedenen Klassifikationen der Spermatogenese (NSP, HYP, SZA) auf die vier Kategorien. Die Hauptgruppe bei den Patienten mit SZA bildet die Gruppe 3 mit Defiziten im Stammzellpool und den meiotischen Teilungen, bei HYP ist die Verteilung auf die Gruppen relativ gleichmäßig, wobei die Gruppe 3 mit beiden Defiziten die kleinste Gruppe bildet. Bei den Patienten mit NSP liegt die Hauptverteilung bei keinem Defizit und im Stammzellpool. Die Daten der HYP-Patienten wurden von Herrn M. Wolter erhoben.

3.4 Weitere immunhistochemische Untersuchungen mit Histonen

Histone sind Proteine, die an die DNA binden können (Passarge, 2004). Durch Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung oder der Ubiquitinierung der Histone bestehen mehrere Möglichkeiten, die Genexpression zu beeinflussen (Kimmins und Sassone-Corsi, 2005).

Die Acetylierung beeinflusst die Genexpression positiv, da die Transkriptionsfaktoren besser an die DNA binden können (Hazzouri und Pivot-Pajot et al., 2000). Während der frühen Spermatogenese spielt die Acetylierung durch Steigerung der Genexpression zur Differenzierung der Stammzellen eine große Rolle und wurde daher in dieser Arbeit zur Suche nach potentiellen Markern genutzt.

Die Methylierung hingegen charakterisiert das Heterochromatin mit ruhenden Genen und ist in der Meiose besonders stark ausgeprägt (Boissonnas et al., 2013). Daher

wurden Antikörper für die vorliegende Arbeit ausgewählt, um die während der Spermatogenese ablaufende Meiose detektieren zu können.

Die Phosphorylierung an Histon H3 steht in engem Zusammenhang mit der Zellteilung im Stadium der diplotänen Spermatozyten während der Meiose (Prigent und Dimitrov, 2003).

Zielsetzung war die Detektion von Histonen oder Histon-Modifikationen, die die Subtypen der Keimzellen markieren und damit z.B. den genauen Zeitpunkt des Eintritts in die Meiose anzeigen oder sogar bedingen. In nachfolgenden Untersuchungen wurden jeweils an den drei Spezies Ratte, Maus und Mensch immunhistochemische Färbungen der Hoden vorgenommen.

3.4.1 Acetylierte Histone

3.4.1.1 Acetyliertes Histon H3K9

Der Antikörper H3K9ac zeigte im Rattenhoden deutliche nukleäre Färbungen der späten Spermogonien bzw. frühen Spermatozyten sowie der elongierten Spermatischen. Des Weiteren waren die Zellkerne der Gefäßzellen sowie die Peritubulärzellen angefärbt (Abb. 31).

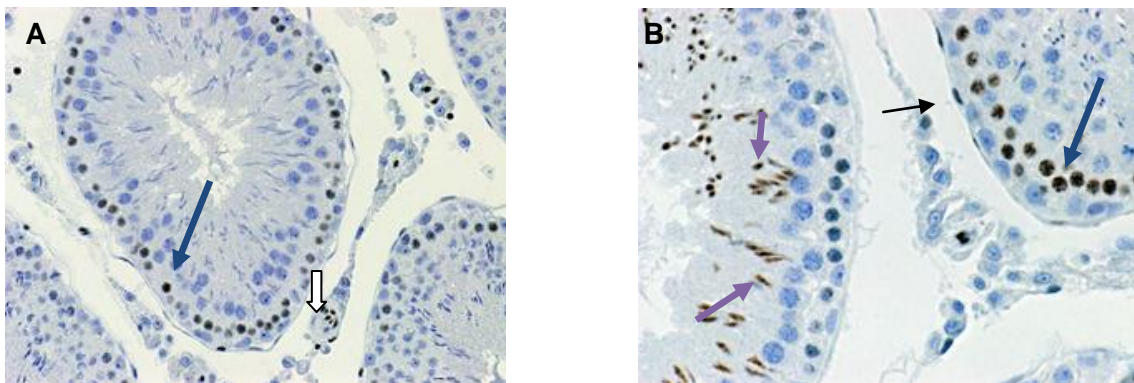


Abbildung 31 A und B zeigt jeweils einen Rattenhoden, der exemplarisch die Lokalisation des AK H3K9ac zeigt. Die blauen Pfeile deuten auf frühe Spermatozyten, lilane Pfeile auf elongierte Spermatischen. Der weiße Pfeil zeigt auf eine Gefäßzelle, der schwarze auf eine Peritubulärzelle. Abb.30 A ist in 25facher Vergrößerung, Abb.30 B in 40facher Vergrößerung dargestellt.

Bei der Maus zeigten sich nukleäre Färbungen der Spermogonien, die stadienabhängig waren, sowie der runden Spermatischen im Übergang zu elongierten Spermatischen (Abb. 32). Ebenfalls waren die Gefäßzellen und vereinzelt die Peritubulärzellen angefärbt.

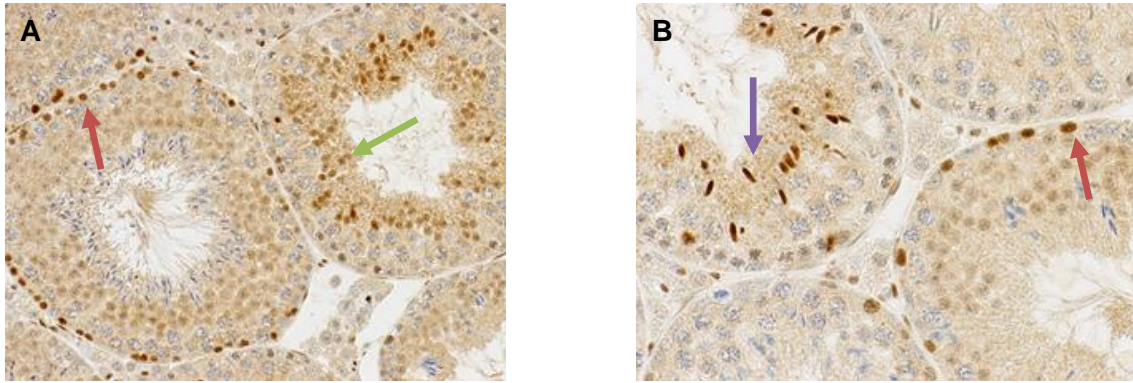


Abbildung 32 A und B zeigen Ausschnitte eines Maushodens, welcher die Lokalisation von H3K9ac zeigt. Die roten Pfeile zeigen auf Spermatogonien, der grüne Pfeil auf eine (späte) runde Spermatide, der lila auf eine elongierte Spermatide. Primärvergrößerung in A 25fach, in B 40fach.

Beim humanen Hoden stellten sich Spermatogonien, frühe Spermatozyten, späte runde Spermatiden sowie elongierte Spermatiden dar (Abb. 33). Ebenfalls waren auch Gefäßzellkerne und grenzwertig Peritubulärzellen angefärbt.

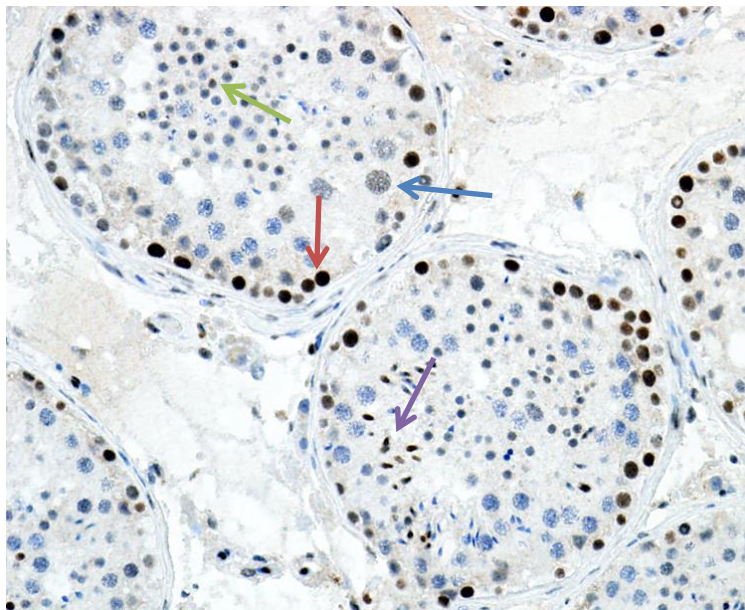


Abbildung 33 zeigt einen humanen Hoden eines Patienten mit NSP. H3K9ac detektierte die Spermatogonien (rot), vereinzelt die frühen Spermatozyten (blau) sowie elongierte Spermatiden (lila) bzw. späte runde (grün). Primärvergrößerung 20fach.

Vergleichend stimmen die Spezies somit in den Färbungen der Spermatogonien, elongierten Spermatiden, den Gefäßzellen und den Peritubulärzellen überein (Tab. 7). Ratte und Mensch zeigen des Weiteren die frühen Spermatozyten angefärbt, bei Maus und Mensch färben sich zudem bereits die späten runden Spermatiden an.

Tabelle 7 Lokalisation des acetylierten H3K9.

| | SZ | Spg | Spc | rd. Spd | el. Spd | Spz | PC | LC | Gefäße |
|-------|----|-----|-----|------------|------------|-----|----|----|--------|
| human | -- | ++ | + | + | ++ | -- | + | -- | + |
| rat | -- | ++ | + | -- | ++ | -- | + | -- | + |
| m | -- | ++ | -- | + | ++ | -- | + | -- | + |

-- = keine Färbung, + = leichte Färbung, ++ = starke Färbung

SZ=Sertoli-Zellen, Spg=Spermatogonien, Spc=Spermatozyten, rd. Spd=runde Spermatiden, el. Spd=elongierte Spermatiden, Spz=Spermatozoen, PC=Peritubulärzellen, LC=Leydigzellen

3.4.1.2 Acetyliertes Histon H4K5

Der Antikörper gegen H4K5ac detektierte bei den immunhistochemischen Färbungen an Rattenhoden alle Stadien der Spermatogenese, ebenso die Peritubulärzellen und die Gefäßzellen (Abb. 34). Die Lokalisation war jeweils nukleär.

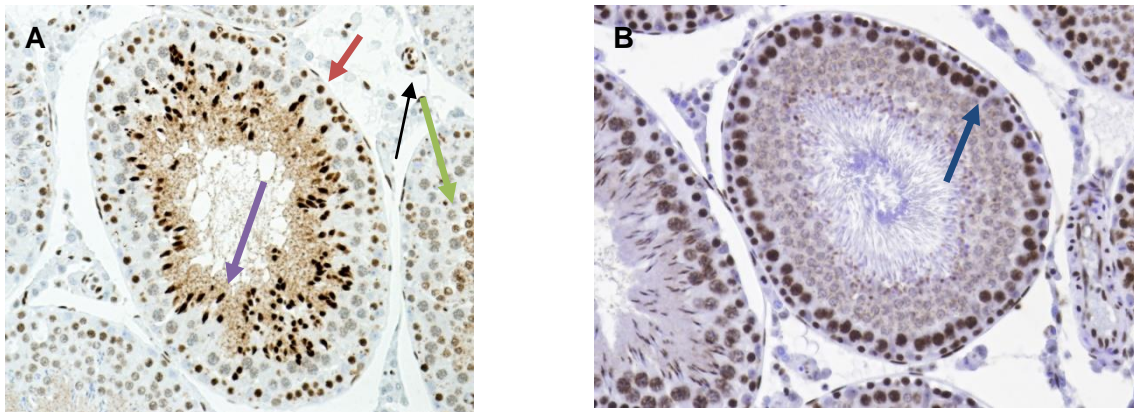


Abbildung 34 A und B zeigen jeweils die H4K5ac Expression im Rattenhoden. Der rote Pfeil zeigt auf eine Spermatogonie, blau auf eine frühe Spermatozyte, grün auf eine runde Spermatide, lila auf eine elongierte Spermatide. Der schwarze Pfeil markiert ein Gefäß. Primärvergrößerung 20fach.

Bei dem adulten Maushoden stellten sich Spermatogonien, Spermatozyten und elongierte Spermatiden nukleär angefärbt dar (Abb. 35). Auch Leydigzellen und Gefäße waren positiv (nicht abgebildet).

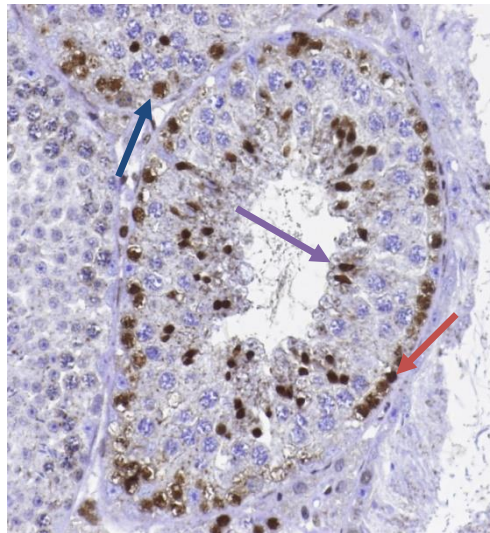


Abbildung 35 zeigt die Lokalisationen von H4K5ac in einem Maushoden. Der rote Pfeil weist auf eine Spermatogonie, blau auf eine Spermatozyte und lila auf eine elongierte Spermatide. Primärvergrößerung 25fach.

Der humane Hoden zeigte Färbungen aller Spermatogenesestadien, wobei die Spermatozyten stadienspezifisch waren. Des Weiteren waren Peritubulärzellen, Leydigzellen und Gefäße angefärbt.

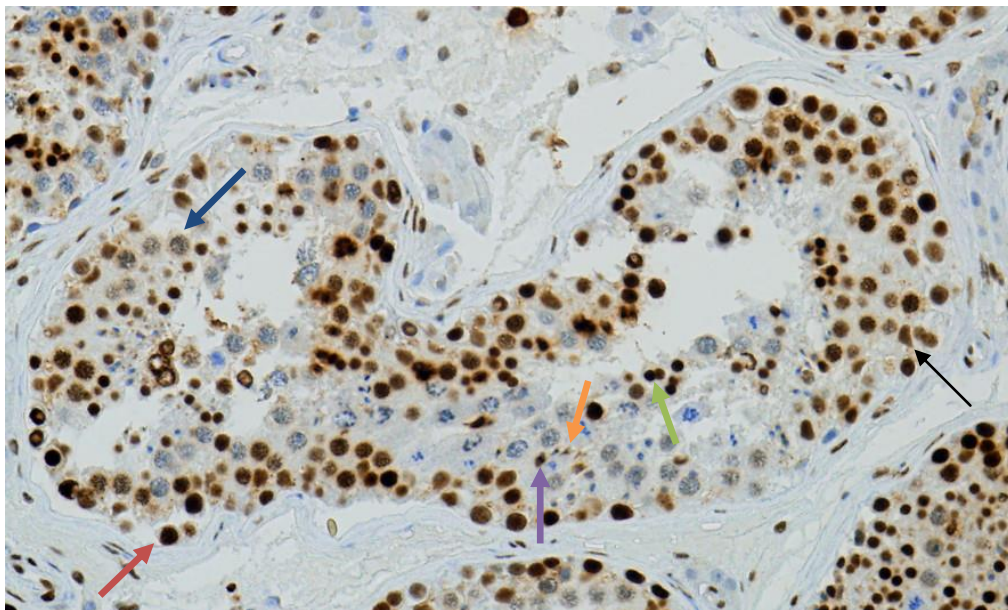


Abbildung 36 zeigt einen humanen Hoden eines Patienten mit NSP. H4K5ac ist in allen Spermatogenesestadien exprimiert, bei Spermatozyten eher stadienspezifisch, so sind im obigen Bild einige pachytäne Spermatozyten nicht angefärbt. Der rote Pfeil zeigt auf eine Spermatogonie, blau auf eine Spermatozyte, grün auf eine runde Spermatide, lila auf eine elongierte Spermatide und orange auf eine Spermatozoe. Vereinzelt waren auch Sertoli-Zellen nukleär angefärbt (schwarzer Pfeil). Primärvergrößerung 25fach.

Vergleichend stimmen in allen drei Spezies die Färbungen der Spermatogonien, die Expression in den Spermatozyten (stadienspezifisch) und elongierten Spermatischen, sowie auch in den Gefäßen überein (Tab. 8). Ratte und Mensch zeigen beide die Expression von H4K5ac in allen Spermatogenesestadien, die Maus ist in den runden Spermatischen und Spermatozoen negativ. Bei Maus und Mensch sind ebenfalls noch die Leydigzellen angefärbt.

Tabelle 8 zeigt in der Übersicht die Expression von H4K5ac in den drei Spezies.

| | Sz | Spg | Spc | rd. Spd | el. Spd | Spz | PC | LC | Gefäße |
|-------|----|-----|-----|---------|---------|-----|----|----|--------|
| human | + | ++ | + | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| rat | -- | ++ | + | ++ | ++ | ++ | ++ | -- | ++ |
| m | -- | ++ | + | -- | ++ | -- | -- | ++ | ++ |

-- =keine Färbung, + =stadienspezifische Färbung, ++ =positive Färbung
 SZ=Sertoli-Zellen, Spg=Spermatogonien, Spc=Spermatozyten, rd. Spd=runde Spermatischen, el. Spd=elongierte Spermatischen, Spz=Spermatozoen, PC=Peritubulärzellen, LC=Leydigzellen

3.4.1.3 Acetyliertes Histon H4K8

Der Antikörper H4K8ac stellte sich in den Färbungen am adulten Rattenhoden in Spermatogonien, vereinzelt frühen Spermatozyten, runden Spermatischen und elongierten Spermatischen positiv dar, ebenso in Peritubulärzellen und Gefäßen (Abb. 37).

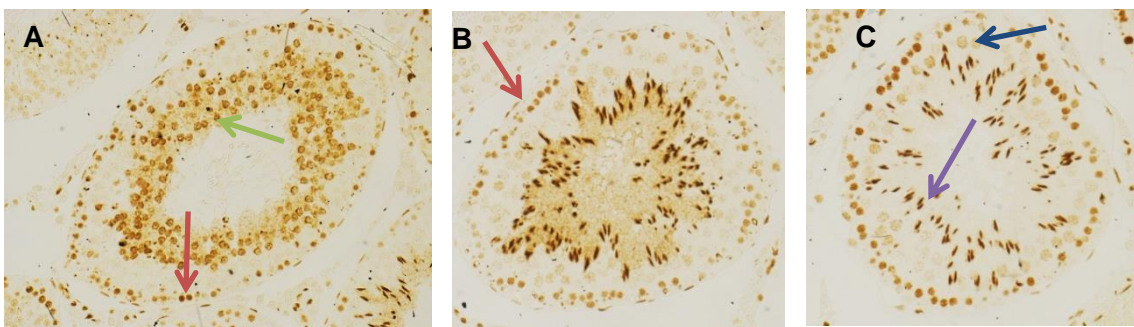


Abbildung 37 A - C zeigen in drei quer angeschnittenen Tubuli eines Rattenhodens die Lokalisation des H4K8ac. Die roten Pfeile zeigen auf Spermatogonien, der blaue auf eine Spermatozyte, grün auf eine runde Spermatische und lila auf eine elongierte Spermatische. Primärvergrößerung 20fach.

Am Maushoden zeigten sich die Spermatogonien stadienspezifisch angefärbt, vereinzelt auch frühe Spermatozyten. Des Weiteren waren runde Spermatischen nukleär und elongierte Spermatischen positiv markiert (Abb. 38).

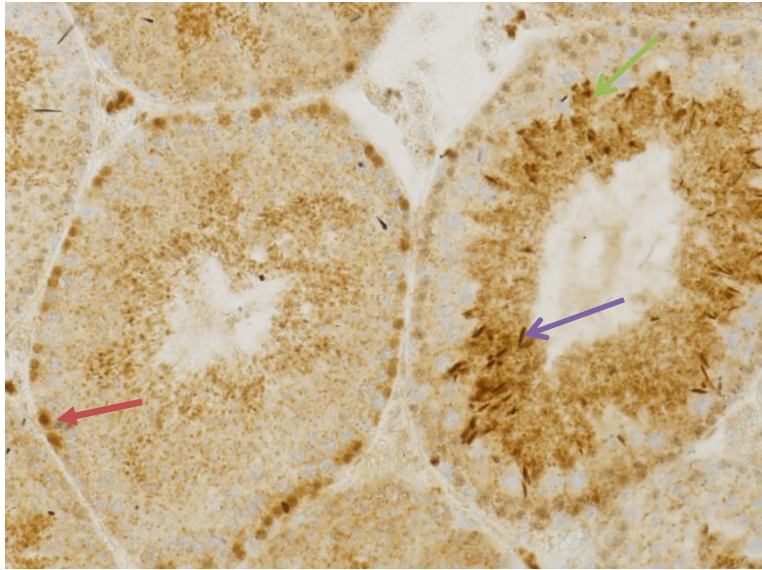


Abbildung 38 zeigt in 20facher Primärvergrößerung die Expression von H4K8ac in den Spermatogonien (roter Pfeil), runden Spermatiden (grüner Pfeil) und elongierten Spermatiden (lilane Pfeil) im Maushoden.

Die Lokalisation von H4K8ac am humanen Hoden war in den Spermatogonien, frühen Spermatozyten und runden Spermatiden. Ebenfalls waren Sertoli-Zellen, Peritubulärzellen und Gefäße angefärbt (Abb. 39).

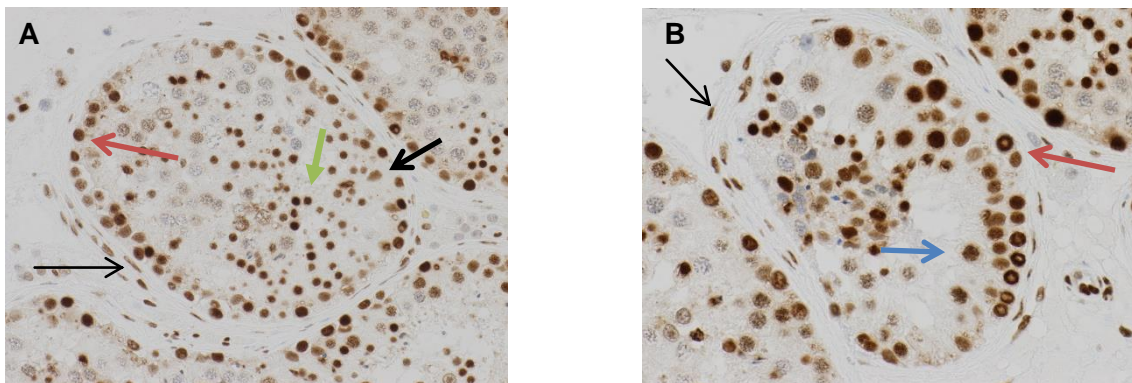


Abbildung 39 A und B zeigen einen Hoden eines Patienten mit NSP. H4K8ac färbt die Spermatogonien (rote Pfeile), die Spermatozyten stadienabhängig (blau) sowie die runden Spermatiden (grün) an. Des Weiteren sind Sertoli-Zellen (dicker schwarzer Pfeil) und Peritubulärzellen sichtbar (dünner schwarzer Pfeil). Primärvergrößerung 25fach.

Zusammenfassend färbt der Antikörper gegen H4K8ac in allen drei Spezies insbesondere die Stadien der frühen Spermatogenese an. Zusätzlich sind die runden Spermatiden einheitlich detektiert. Im Ratten- und Maushoden sind weitergehend noch die elongierten Spermatiden erfasst, beim Menschen hingegen noch Sertoli-Zellen.

Tabelle 9 zeigt die Expression von H4K8ac in allen drei Spezies.

| | SZ | Spg | Spc | rd. Spd | el. Spd | Spz | PC | LC | Gefäße |
|-------|----|-----|-----|---------|---------|-----|----|----|--------|
| human | + | ++ | + | ++ | -- | -- | + | -- | -- |
| rat | -- | ++ | + | ++ | ++ | -- | + | -- | + |
| m | -- | ++ | + | ++ | ++ | -- | -- | -- | -- |

-- =keine Färbung, + =stadienspezifische oder schwache Färbung, ++ = positive Färbung
 SZ=Sertoli-Zellen, Spg=Spermatogonien, Spc=Spermatozyten, rd. Spd=runde Spermatozyten, el. Spd=elongierte Spermatozyten, Spz=Spermatozoen, PC=Peritubulärzellen, LC=Leydigzellen

3.4.1.4 Acetyliertes Histon H4K16

Der Antikörper gegen Histon H4K16ac detektierte im adulten Rattenhoden in vereinzelt Tubuli stadienabhängig die späten Spermatogonien im Übergang zu frühen Spermatozyten und die späten runden Spermatozyten im Übergang zu elongierten Spermatozyten (Abb. 40). Des Weiteren waren deutlich die elongierten Spermatozyten und Residualkörperchen sichtbar. Bei den Residualkörperchen handelt es sich um nicht mehr benötigte Zytoplasmaanteile, die während der Spermio-genese abgeschnürt werden. Auch Gefäße (Abb. 40) und sehr vereinzelt Peritubulärzellen (nicht abgebildet) zeigten sich angefärbt.

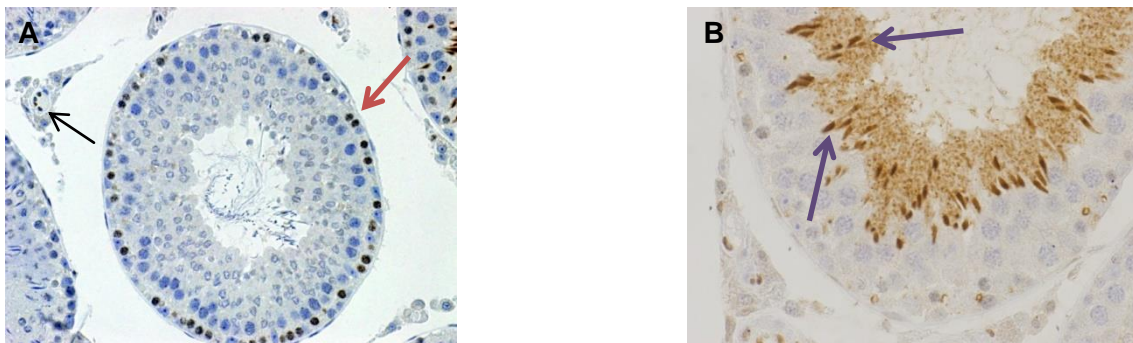


Abbildung 40 A und B zeigen jeweils einen Tubulus eines adulten Rattenhodens. Der rote Pfeil zeigt auf eine Spermatogonie, lila auf eine elongierte Spermatozyte, schwarz auf ein Gefäß. Der runde Pfeil deutet auf ein Residualkörperchen. Primärvergrößerung im linken Bild 25fach, rechts 40fach.

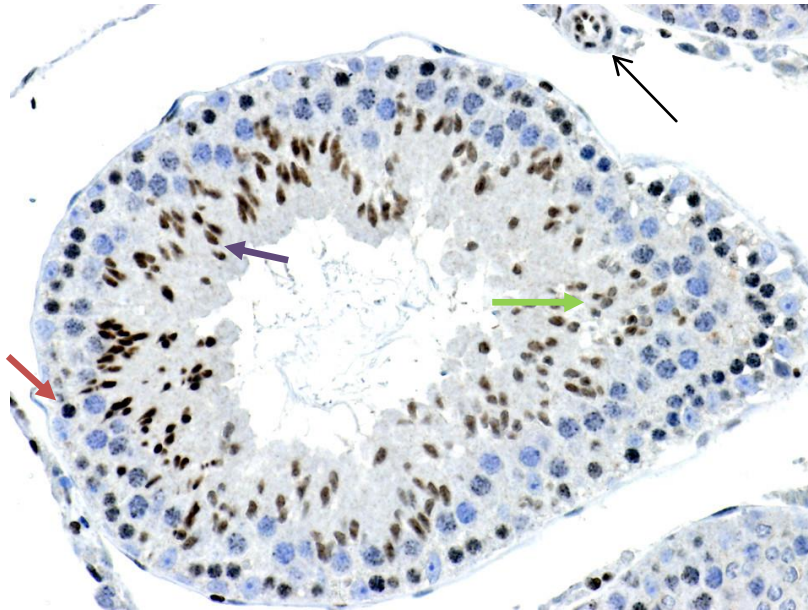


Abbildung 41 zeigt einen Tubulus des adulten Rattenhodens, in dem neben den elongierten Spermatisden (lilaneer Pfeil) auch Spermatogonien (rot) und späte runde Spermatisden (grün) durch H4K16ac detektiert wurden. Der schwarze Pfeil zeigt auf ein Gefäß. Primärvergrößerung 25fach.

Bei der Maus zeigten sich in den adulten Hoden ebenfalls die elongierten Spermatisden angefärbt (Abb. 42). Des Weiteren waren Residualkörperchen und auch vereinzelte Spermatogonien nukleär schwach angefärbt sichtbar (nicht abgebildet).

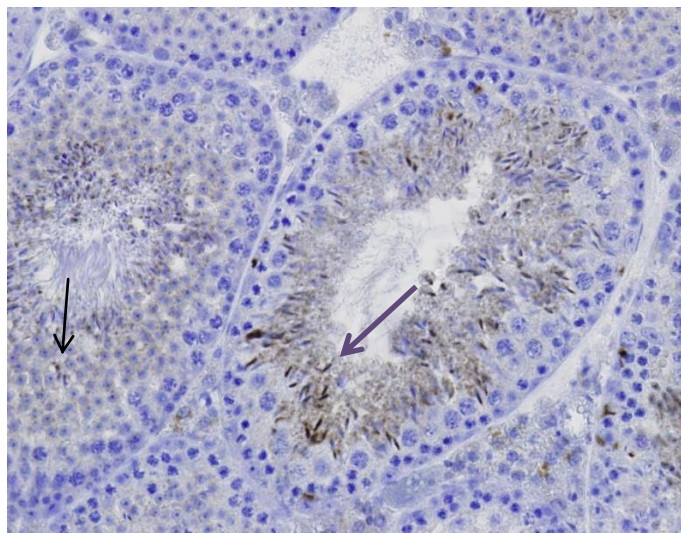


Abbildung 42 zeigt einen Ausschnitt eines adulten Maushodens. Im rechten Tubulus sind die elongierten Spermatisden (lila) dargestellt. Im angeschnittenen Tubulus links im Bild sind einige Residualkörperchen (schwarz) erkennbar. Primärvergrößerung 20fach.

Beim humanen Hoden zeigten sich mit H4K16ac nukleäre Lokalisationen in den Spermatogonien, in den Spermatozyten stadienspezifisch und in den runden Spermatischen (Abb. 43). Ebenso waren Sertoli-Zellen zytoplasmatisch gefärbt. Des Weiteren waren Residualkörperchen, Leydigzellen und vereinzelt Peritubulärzellen schwach gefärbt.

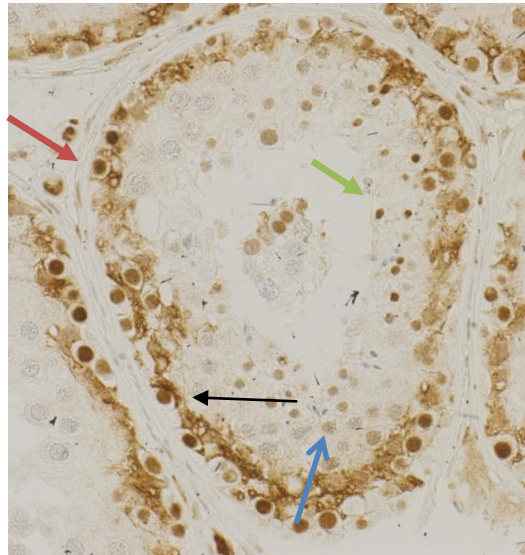


Abbildung 43 zeigt einen Hoden eines Patienten mit NSP. Der rote Pfeil markiert die nukleär angefärbten Spermatogonien, blau eine Spermatozyte, grün zeigt auf eine Spermatische. Der schwarzen Pfeil markiert die zytoplasmatische Färbung einer Sertoli-Zelle. Primärvergrößerung 25fach.

Zusammenfassend ist der Nachweis von H4K16ac zwischen den drei Spezies sehr variierend (Tab. 10). Eine Gemeinsamkeit in allen drei Spezies liegt nicht vor, allerdings stimmen Ratte und Maus in den elongierten Spermatischen überein und es ist möglich, dass in den humanen Schnitten keine elongierten Spd angeschnitten waren. Ratte und Mensch stimmen dahingehend überein, dass in beiden mit den Färbungen der Spermatogonien auch schon frühe Stadien der Spermatogenese durch H4K16 detektierbar sind. Im Maushoden konnten nur vereinzelt schwach die Spermatogonien detektiert werden. Die Färbung der Sertoli-Zellen tritt hingegen nur beim humanen Hoden auf.

Tabelle 10 Lokalisation von H4K16ac in den Spezies Ratte, Maus und Mensch.

| | SZ | Spg | Spc | rd. Spd | el. Spd | Spz | PC | LC | Gefäße |
|-------|-------|-----|-----|---------|---------|-----|----|----|--------|
| human | + cyt | ++ | + | + | -- | -- | + | + | -- |
| rat | -- | ++ | + | + | ++ | -- | + | -- | + |
| m | -- | + | -- | -- | ++ | -- | -- | -- | -- |

-- =keine Färbung, + =stadienspezifische oder schwächere Färbung, ++ =positive Färbung
 SZ=Sertoli-Zellen, Spg=Spermatogonien, Spc=Spermatozyten, rd. Spd=runde Spermatozyten, el. Spd=elongierte Spermatozyten, Spz=Spermatozoen, PC=Peritubulärzellen, LC=Leydigzellen

3.4.2 Methylierte Histone

3.4.2.1 Dimethyliertes Histon H3K9

Die immunhistochemischen Untersuchungen mit dem Antikörper gegen H3K9me2 ergaben Kernfärbungen der Spermatogonien und frühen Spermatozyten beim adulten Rattenhoden. Dabei waren in einigen Zellen deutlich die Chromosomenstrukturen erkennbar (Abb. 44A). Zusätzlich zeigten sich vereinzelt Peritubulärzellen, Gefäße und Makrophagen angefärbt (nicht dargestellt).

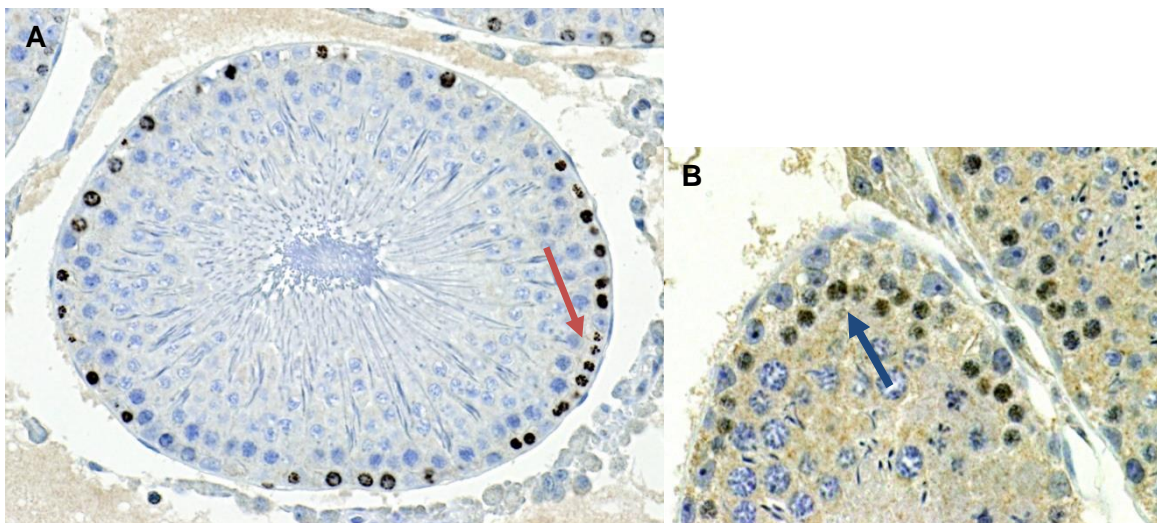


Abbildung 44 A und B zeigen einen mit H3K9m2 angefärbten Rattenhoden. Der rote Pfeil markiert beispielhaft die erkennbaren Chromosomen der angefärbten Spermatogonien. In **B** sind neben den Spermatogonien auch die lepto- bzw. zygotänen Spermatozyten (blauer Pfeil) erkennbar. Primärvergrößerung 25fach.

Für den Maushoden ergaben sich folgende Ergebnisse: Es waren Spermatogonien, frühe Spermatozyten mit Meiosen und elongierte Spermatozyten angefärbt (Abb. 45). Ebenfalls waren die Peritubulärzellen grenzwertig positiv.

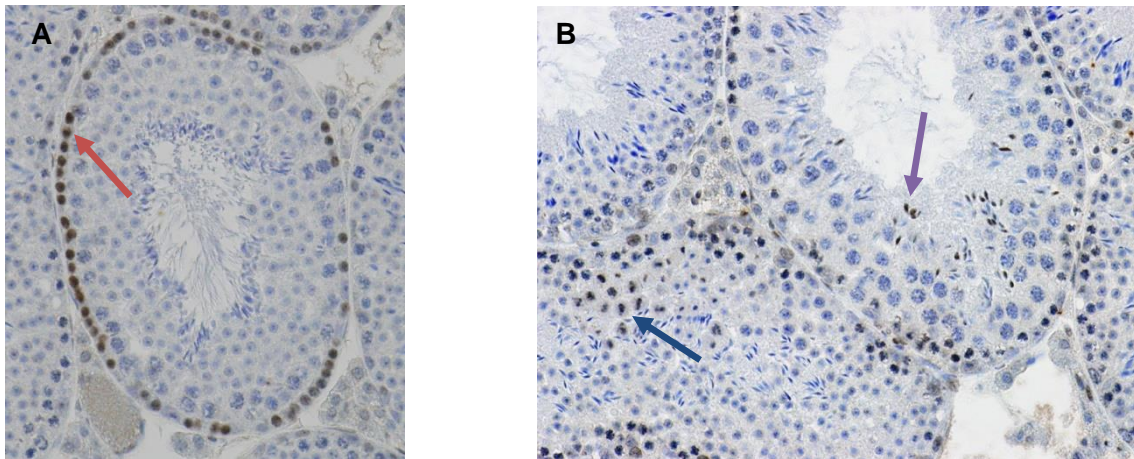


Abbildung 45 A und B Nachweis von H3K9me2 am adulten Maushoden. In **A** sind die Spermatogonien-Färbungen dargestellt (roter Pfeil), in **B** markiert der lila Pfeil eine elongierte Spermatide, der blaue Pfeil zeigt auf eine Meiosefigur während der Diakinese. Primärvergrößerung 25fach.

Im menschlichen Hoden färbten sich Spermatogonien sowie der Übergang von runden zu elongierten Spermatiden an (Abb. 46A). Grenzwertig waren ebenfalls die Meiosen der frühen Spermatozyten markiert (Abb. 46B). Des Weiteren waren Sertoli-Zellen und Peritubulärzellen angefärbt erkennbar.

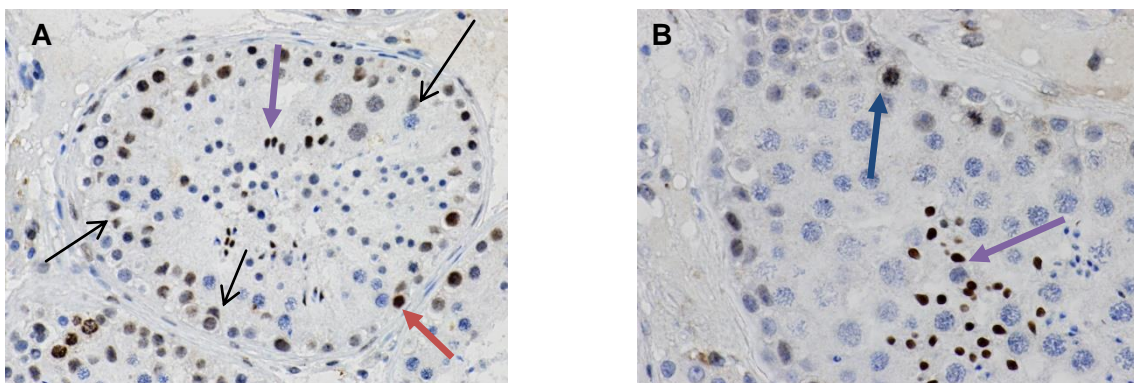


Abbildung 46 A und B zeigen einen Hoden eines Patienten mit NSP. In **A** ist mit einem roten Pfeil eine Spermatogonie markiert, mit lila eine elongierte Spermatide. Die schwarzen Pfeile zeigen auf Sertoli-Zellen. In **B** zeigt der blaue Pfeil auf eine Meiosefigur, lila auf eine elongierte Spermatide. A 25fache und B 40fache Primärvergrößerung.

Übereinstimmend färben sich bei allen drei Spezies die Kerne der Spermatogonien und der Spermatozyten stadienabhängig an. Beim Menschen und der Maus färben sich zudem noch die elongierten Spermatiden an.

Tabelle 11 Expression von H3K9m2 in allen Spezies

| | SZ | Spg | Spc | rd. Spd | el. Spd | Spz | PC | LC | Gefäße |
|-------|----|-----|-----|------------|------------|-----|----|----|-------------|
| human | + | ++ | + | -- | + | -- | + | -- | -- |
| rat | -- | ++ | + | -- | -- | -- | + | -- | Makrophagen |
| m | -- | ++ | + | -- | + | -- | + | -- | -- |

-- =keine Färbung, + =stadienspezifische oder schwächere Färbung, ++ =positive Färbung
 SZ=Sertoli-Zellen, Spg=Spermatogonien, Spc=Spermatozyten, rd. Spd=runde Spermatiden, el. Spd=elongierte Spermatiden, Spz=Spermatozoen, PC=Peritubulärzellen, LC=Leydigzellen

3.4.2.2 Trimethyliertes Histon H3K9

Der Antikörper ist gegen das Histon 3 gerichtet, welches an der Stelle des Lysins 9 trimethyliert ist.

Der Antikörper gegen H3K9me3 zeigte am adulten Ratten- und Maushoden nukleäre Färbungen der Spermatogonien (stadienspezifisch) und der frühen Spermatozyten (Abb. 47A) sowie Färbungen der elongierten Spermatiden (Abb. 48). Des Weiteren war H3K9me3 im Rattenhoden zytoplasmatisch in runden Spermatiden (Abb. 47A) und im Maushoden zytoplasmatisch in Spermatozyten exprimiert (Abb. 47B), ebenso in Gefäßen und Peritubulärzellen.

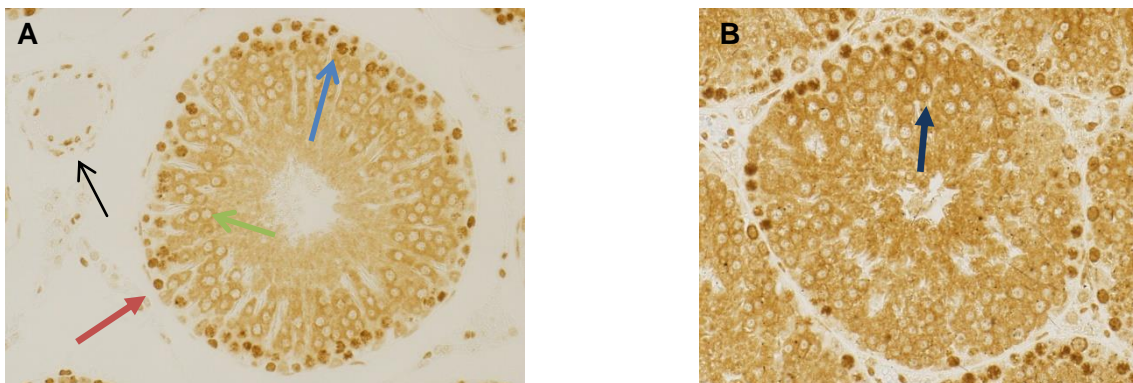


Abbildung 47 A und B zeigt die Lokalisation von H3K9me3 in Ratten- (A) und Maushoden (B). Die roten Pfeile weisen auf Spermatogonien, der hellblaue auf eine Spermatozyte, grün auf die zytoplasmatische Färbung der runden Spermatiden. Der dunkelblaue Pfeil in B markiert die zytoplasmatische Färbung der Spermatozyten. Der schwarze Pfeil deutet auf ein Gefäß. Primärvergrößerung 20fach.

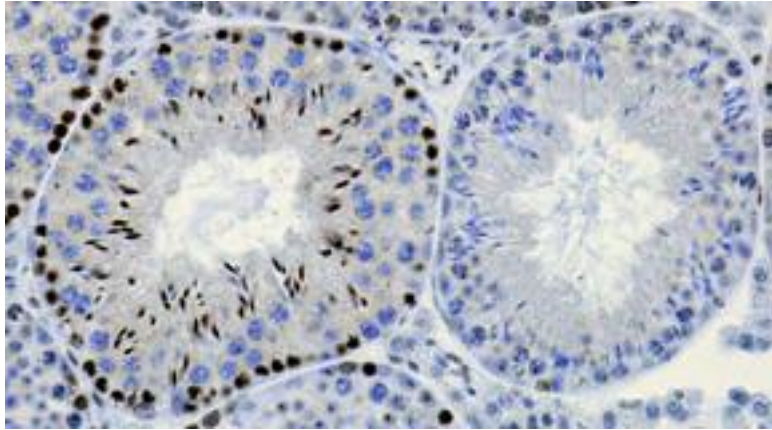


Abbildung 48 zeigt am Beispiel des Maushodens die Lokalisation von trimethyliertem H3K9 in Spermatogonien und elongierten Spermatiden. Primärvergrößerung 20fach.

Beim humanen Hoden färbten sich ebenfalls die Spermatogonien nukleär an. Des Weiteren waren die Spermatozyten stadienabhängig zytoplasmatisch oder nukleär und die runden Spermatiden nukleär positiv markiert (Abb. 49). Ebenfalls ist H3K9me3 in Sertoli-Zellen, Peritubulärzellen und Gefäßen exprimiert.

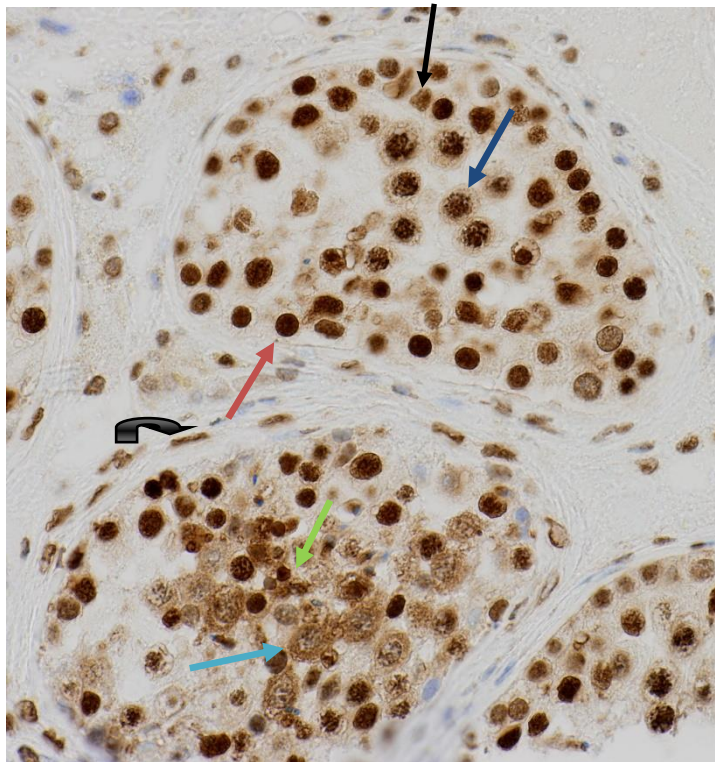


Abbildung 49 zeigt zwei querangeschnittene Tubuli eines Hodens eines Patienten mit NSP. Angefärbt zeigen sich nukleär Spermatogonien (roter Pfeil) und runde Spermatiden (grüner Pfeil). Die Spermatozyten sind sowohl zytoplasmatisch im unteren Tubulus (hellblau) als auch nukleär im oberen Tubulus markiert (dunkelblauer Pfeil). Der schwarze Pfeil weist auf eine Sertoli-Zelle, der runde Pfeil auf eine Peritubulärzelle. Primärvergrößerung 25fach.

Vergleichend stimmen somit die Lokalisation von H3K9me3 in allen drei Spezies in den Spermatogonien, den Spermatozyten und den runden Spermatischen überein, wobei die Expression bei Maus und Mensch in den Spermatozyten und bei der Ratte in den Spermatischen zytoplasmatisch ist.

Tabelle 12 Lokalisation von H3K9me3 im Hoden der Ratte, der Maus und des Menschen

| | SZ | Spg | Spc | rd. Spd | el. Spd | Spz | PC | LC | Gefäße |
|--------------|----|-----|------------|---------|---------|-----|----|----|--------|
| human | + | ++ | + und cyto | + | -- | -- | + | -- | + |
| rat | -- | ++ | + | cyto | + | -- | + | -- | -- |
| m | -- | ++ | cyto | + | + | -- | -- | -- | -- |

-- =keine Färbung, + =vereinzelte Färbung, ++ =positive Färbung, cyto =zytoplasmatisch
 SZ=Sertoli-Zellen, Spg=Spermatogonien, Spc=Spermatozyten, rd. Spd=runde Spermatischen, el. Spd=elongierte Spermatischen, Spz=Spermatozoen, PC=Peritubulärzellen, LC=Leydigzellen

3.4.3 Phosphorylierte Histone

3.4.3.1 Phosphoryliertes Histon H3Serin10

Dieser Antikörper erfüllte die Voraussetzungen um als Marker fungieren zu können.

Die genauen Färbeergebnisse siehe daher in Kapitel 3.1.4.

4 Diskussion

4.1 Immunhistochemische Markersuche

Ziel dieser Arbeit war die Suche und Etablierung von Antikörpern, für die stadien- und zellspezifische Charakterisierung von distinkten Zellen der Spermatogenese und von Sertoli-Zellen. In dieser Arbeit konnten insgesamt fünf Proteine mit einer eindeutigen Lokalisation innerhalb des Tubulus bestimmt werden: UTF-1 für Spermatogonien, der Androgenrezeptor für Sertoli-Zellen, Smad3 für Spermatozyten, H3Ser10-P für meiotische Teilungen der Spermatozyten und CREM-1 für Spermatischen. Diese Proteine zeigten zudem eine Übereinstimmung in der Lokalisation zwischen den drei Spezies Ratte, Maus und Mensch.

Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag auf den späten Stadien der Spermatogenese und beschäftigte sich daher mit den letzten drei genannten Antikörpern intensiver. Weitere Details zu den Antikörpern gegen UTF-1 und gegen den Androgenrezeptor können in der Dissertation von Herrn M. Wolter nachgelesen werden.

Die Biopsien der infertilen Männer wurden des Weiteren zur Quantifizierung der Zellen der verschiedenen Spermatogenesestadien und der Sertoli-Zellen genutzt, sodass Vergleiche zwischen den unterschiedlichen histologischen Klassifikationen (NSP, SZA und HYP) möglich waren. Zudem konnte bestimmt werden, in welchen Zelltypen die größten Unterschiede lagen, um somit aus diesen Ergebnissen Hinweise auf vorliegende Meiose- oder Mitosedefekte oder eine Zellzahlverminderung im Stammzellpool oder der Sertoli-Zellen zu erhalten. Dadurch sollte eine präzisere Unterteilung der Spermatogenese-Defekte der Patientengruppen möglich sein.

Bei den immunhistochemischen Untersuchungen wurden weitere Antikörper getestet, die sich nicht als Marker eigneten, die aber unter der Gruppe der Histone zusammengefasst und interpretiert wurden.

4.2 Lokalisation von Smad3

Die Smad-Proteine sind die wichtigsten Mediatoren im Signalweg der TGF-beta Familie. Transforming growth factor- β s gehören zu den Zytokinen und spielen eine wichtige Rolle in der Proliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose. Smad2 und Smad3 sind regulär im Zytoplasma der Zellen lokalisiert und sind nach ihrer Aktivierung für die Transkription spezifischer Gene verantwortlich (Heldin et al., 1997).

Es gibt insgesamt bisher acht Smad-Proteine, die in drei verschiedene Unterklassen unterteilt werden. Smad3 gehört zur Klasse der Rezeptor-aktivierten Smads (R-Smad) (Shi und Massagué, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Antikörper gegen Smad3 genutzt, um die Expression von Smad3 im Rahmen der Zelldifferenzierung und Gentranskription im Laufe der Spermatogenese zu untersuchen.

Diese Arbeit zeigte übereinstimmend in allen drei Spezies zytoplasmatische Lokalisationen in den pachytänen Spermatozyten. Die Biopsien des humanen Hodens wiesen zusätzlich noch in den zygotänen Spermatozyten und frühen runden Spermatischen vereinzelt ein positives Signal auf. Patienten aus der Gruppe NSP zeigten - ebenso wie Ratte und Maus - Nachweise in elongierten Spermatischen und vereinzelte, schwache nukleäre Färbungen von Spermogonien. Die fehlende Färbung in der Gruppe SZA lässt sich damit erklären, dass auf Grund des Spermatogenesedefektes ein Mangel an elongierten Spermatischen in der Biopsie vorlag. Die quantitative Auswertung der insgesamt 66 Biopsien ergab bei der Gruppe NSP im Durchschnitt 16,3 Smad3-positive Spermatozyten pro Tubulus und bei SZA 2,6 Spermatozyten pro Tubulus. Dies entspricht einer Abnahme um 84%. Auch die Vergleiche mit der Gruppe HYP ergaben eine signifikante Zellzahlabnahme von 49%.

Vergleichend mit der Literatur sind dort aktuell noch keine Versuche am humanen Hoden beschrieben worden. Die Lokalisation von Smad3 in den pachytänen Spermatozyten im Rattenhoden werden durch Maire et al. (2005) und Xu et al. (2003) ebenfalls beschrieben. Auch die Färbung der Spermatischen war bei Xu et al. (2003) beobachtet worden. Scheinbar spielt Smad3 im Rahmen der Keimzelleifung vom juvenilen zum adulten Rattenhoden eine Rolle, da die Proteinlokalisierung im Laufe der Entwicklung variiert (Xu et al., 2003). Die einzige Konstante war die dauerhaft zu beobachtende Lokalisation in Sertoli-Zellen, teils zytoplasmatisch, teils nukleär. Auch in der Entwicklung des Maushodens variiert die Expression von Smad3, ebenfalls mit konstant Smad3-positiven Sertoli-Zellen (Itman et al., 2011). Die Expression von Smad3 in den pachytänen Spermatozyten wurde im Rahmen der Versuche von Itman et al. (2011) nur bei Maushoden, die 15 Tage alt waren, beobachtet; im adulten Hoden waren lediglich Spermatischen Smad3 positiv.

In der vorliegenden Arbeit konnten jedoch allein bei den humanen Biopsien in einzelnen Tubuli vereinzelte, schwache perinukleäre Färbungen der Sertoli-Zellen nachgewiesen werden. Dies könnte an Speziesunterschieden, Fixierungsproblemen oder der Verwendung eines Antikörpers einer anderen Firma liegen.

Es ist bekannt, dass TGF- β s und Activine von Sertoli-Zellen produziert werden (Xu et al., 2003). Ebenfalls sind in mehreren Studien Zusammenhänge zwischen Smad3 und dem in Sertoli-Zellen lokalisierten Androgenrezeptor (AR) hergestellt worden: Bei

Abnahme der Expression von Smad3 kommt es zu einer Zunahme der Aktivität des AR (Itman et al., 2011). Der AR wirkt über Interaktion mit Smad3 wiederum als Repressor auf TGF- β 1 (Brown et al., 2007). Itman et al. (2011) stellten anhand von knock-out Mäusen aber auch fest, dass bei komplettem Fehlen von Smad3 die Expression des ARs abnimmt. Geht man nun, anhand der Signalkaskade, von der Annahme aus, dass Smad3, wenn es sich im Zellkern befindet, aktiver ist, scheint Smad3 in diesen Stadien in den Sertoli-Zellen eine besonders wichtige Rolle während der Spermatogenese einzunehmen. Xu et al. (2003) stellten fest, dass die nukleäre stadienspezifische Expression von Smad3 in den Sertoli-Zellen dann auftritt, wenn die primären Spermatozyten durch die „tight junctions“ der Sertoli-Zellen wandern.

Abschließend ließ sich in dieser Arbeit die Expression von Smad3 im Laufe der Spermatogenese bei Ratte, Maus und Mensch zeigen. Smad3 konnte auf Grund seiner deutlichen Lokalisation im Zytoplasma der Spermatozyten als Marker verwendet werden.

4.3 Proteinlokalisierung von phosphoryliertem Histon H3 an der Position Serin 10 (H3Ser10-P)

Das Histon H3 gehört zusammen mit den Histonen 2A, 2B und 4 zu einem Komplex, welcher als Oktamer, zusammen mit der DNA, das Nukleosom bildet und somit zur Kondensation der DNA beiträgt. Histone, insbesondere Histon H3, spielen durch Modifikation eine entscheidende Rolle in der Veränderung der DNA-Struktur im Laufe des Zellzyklus (Kimmins und Sassone-Corsi, 2005). Die Phosphorylierung des Histons H3, insbesondere an der Aminosäure Serin an Position 10, wird in Zusammenhang mit der Chromosomenkondensation während der Zellteilung gebracht (Hendzel et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe des Antikörpers H3Ser10-P adulte Hoden von Ratte, Maus und Mensch angefärbt. Übereinstimmend zeigten alle drei Spezies die Lokalisation von H3Ser10-P in den meiotischen Teilungen in späten diplotänen Spermatozyten. Die Anzahl der Färbungen pro Tubulus variierte stark - von keiner Einzigen bis zu 39 (Abb. 19). Vereinzelt konnten in den angefärbten Spermatozyten lichtmikroskopisch die kondensierten Chromosomen in der Äquatorialebene erkannt werden (Abb. 18). Des Weiteren zeigte sich bei Ratte und Maus eine Expression in den elongierten Spermatischen. Vergleichend mit der Literatur finden sich dort wenige

immunhistochemische Untersuchungen am Hoden. Allein am Maushoden führten Nickerson et al. (2007) und Godet et al. (2004) Untersuchungen mit dem auch hier benutzten Antikörper durch, deren Färbungen in den diplotänen Spermatozyten von unserer Arbeit bestätigt werden. Godet et al. (2004) beschreiben sogar die Färbungen bis zur Metaphase II und Anaphase II. Song et al. (2011) und Cobb et al. (1999) führten ebenfalls Färbungen durch, wenn auch der verwendete Antikörper nicht dem in der vorliegenden Arbeit entsprach. Auch sie beschreiben, übereinstimmend mit den in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen, die Lokalisation von H3Ser10-P von sich in der Metaphase I der Meiose befindenden Spermatozyten. Des Weiteren färbten sich die in der Mitose befindlichen Spermatogonien an (Cobb et al., 1999). Auch Untersuchungen an Keimzellen in Zellkultur zeigten den Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung des Histons H3 und den sich in Mitose oder Meiose befindlichen Zellen (Cobb et al., 1999).

Die Rolle der Phosphorylierung während der Zellteilung ist aber aktuell ungeklärt. Es gibt mehrere mögliche Hypothesen, so kann zum einen durch die Anlagerung der Phosphatgruppe lokal die Ladung verändert werden und damit die Bindung des Histons an die DNA. Dadurch wird die Bindung von Proteinen an die DNA ermöglicht. Die zweite Hypothese erwägt, dass durch die Phosphorylierung das Histon selbst zum Liganden bzw. Rezeptor für Proteine wird und somit eine Rolle in der Zellteilung einnimmt. Eine weitere Hypothese geht als „*ready production label*“ davon aus, dass durch die Phosphorylierung die fertigen Chromosomen in der Metaphase markiert werden und somit das Signal gegeben wird, dass sie bereit zur Teilung sind (Prigent und Dimitrov, 2003).

Für die Mitose konnte eine Abhängigkeit der Chromosomenkondensation von der Phosphorylierung von H3Ser10 nachgewiesen werden (Wei et al., 1999). Ob dies ebenfalls für die Meiose gilt, ist unklar. So zeigten einige Versuche, dass die Phosphorylierung im Zellzyklus-Stadium G2 beginnt und durch die Phosphorylierung die Chromosomenkondensation stattfinden kann (van Hooser et al., 1998), doch andere demonstrierten, dass der Hauptteil der Phosphorylierung in der Metaphase stattfindet. Zwar sei eine Beteiligung an der Chromosomenkondensation möglich, aber keine direkte Abhängigkeit vorhanden (Kaszas und Cande, 2000). Da jedoch ein Zusammenhang zum Zellzyklus gegeben scheint (Hans; Dimitrov, 2001), lässt sich vermuten, dass auf biochemischer Ebene Unterschiede, eventuell im Zeitpunkt der Phosphorylierung, zwischen Mitose und Meiose vorliegen (Hans und Dimitrov, 2001).

Die in dieser Arbeit ermittelte Lokalisation von H3Ser10-P in den elongierten Spermatischen in Ratten- und Maushoden findet aktuell noch keine Erwähnung in der Literatur.

Ebenfalls konnte in dieser Arbeit das Protein H3Ser10-P zum ersten Mal als Meiose-Marker am humanen Hoden identifiziert werden (Hentrich et al., 2011). Insgesamt wurden anhand von jeweils 33 Patientenbiopsien der Klassifikation NSP und SZA Auswertungen gemacht. Im Vergleich ergab sich dabei eine Abnahme um 80% in der Anzahl der meiotischen Teilungen pro Tubulus. In Mittelwerten waren dies 1,02 gefärbte Spermatozyten in Meiose bei NSP und 0,2 pro Tubulus bei SZA. Die prozentuale Abnahme in den 44 Biopsien mit HYP im Vergleich zu NSP war mit 3% nicht signifikant. Die Bedeutung der Meiose im Rahmen der Ursachen für Infertilität ist seit längerem bekannt (Ferguson et al., 2007). Im Rahmen der statistischen Auswertung der vorliegenden Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass Patienten mit gestörter Spermatogenese eine herabgesetzte Meioserate, also weniger Zellteilungen der Spermatozyten haben. In der weiterführenden Arbeit von Borgers et al. (2014) konnte des Weiteren ein Zusammenhang zwischen der Meioserate und der Anzahl der Spermatogonien bzw. spermatogonialen Stammzellen hergestellt werden.

4.4 Proteinlokalisierung von CREM-1

Der *cAMP-response-element modulator*, kurz CREM, ist ein Transkriptionsfaktor, der während der Signalkaskade von cAMP eine Rolle bei der Expression Hodenspezifischer Gene spielt (Kimmins et al., 2004).

CREM-1 wechselt im Laufe der Spermatogenese seine Funktion: ist das Protein anfangs ein Repressor, so nimmt es in der postmeiotischen Phase der Keimzellendifferenzierung eine Rolle als Aktivator an (Vouk et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde bei allen drei Spezies das Protein CREM-1 immunhistochemisch in den Zellkernen von runden Spermatisden nachgewiesen. Auch in mehreren anderen publizierten Arbeiten wurden diese Ergebnisse für Maus (Nantel et al., 1996), Ratte (Behr und Weinbauer, 1999) und Mensch (Weinbauer et al., 1998) beschrieben. Bei PCR-Analysen wurde gezeigt, dass die Transkription bereits in den pachytänen Spermatozyten beginnt, die Expression des Proteins aber erst in den runden Spermatisden nachgewiesen werden kann. Die Funktion von CREM-1 während der postmeiotischen Keimzellendifferenzierung ist ungeklärt, aber es scheint sicher, dass CREM-1 eine Rolle in den Veränderungen, wie dem Histamin-Protamin-Austausch oder der Formation des Akrosoms, einnimmt (Sassone-Corsi, 2002). Auch mit Hilfe von knock-out Mäusen konnte dieser Zusammenhang gezeigt werden: Beim Fehlen von CREM-1 kam es zu einem Stopp der Spermatogenese im Stadium der frühen runden Spermatisden und zu einem Anstieg der Apoptose von Keimzellen. Alle Mäuse waren

infertil (Nantel et al., 1996). Auch in Analysen von humanen Hoden konnte dieser Zusammenhang zwischen fehlerhafter Expression von CREM-1 und Infertilität bereits gezeigt werden (Blocher et al., 2003).

Bei der quantitativen Auswertung der insgesamt 66 humanen Biopsien ergaben sich eindeutige Unterschiede zwischen den Patientengruppen NSP und SZA. So nahm die Zahl an CREM-1-positiven runden Spermatozoen um 96% ab. Dies entsprach 20,4 CREM-1-positiven runden Spermatozoen pro Tubulus bei NSP und 0,6 bei SZA. Auch die HYP-Patienten wiesen vergleichend zu NSP eine Abnahme um 9% auf, welche nicht signifikant war.

Zeigten Weinbauer et al. (1998) in ihren Versuchen mit humanen Biopsien mit Spermatozoenarrest, dass nur dann eine Proteinlokalisierung in den runden Spermatozoen nachgewiesen werden konnte, wenn sich in der Biopsie ebenfalls elongierte Spermatozoen befanden, so zeigten wir in der vorliegenden Arbeit CREM-1-positiv runde Spermatozoen bei Patienten mit Spermatozoenarrest. Auch Palermo et al. (2004) widersprachen in ihrem Paper den Ergebnissen von Weinbauer et al. (1998), da auch sie bei Patienten mit Spermatozoenarrest in jedem Zellkern der runden Spermatozoen CREM-1 detektieren konnten. Diese Ergebnisse bestätigten auch Lin et al. (1998), die in ihren Untersuchungen ebenfalls immer dann CREM-1-positiv runde Spermatozoen nachweisen konnten, wenn diese in den Biopsien vorhanden waren. So waren - ebenso wie in einigen Biopsien dieser Arbeit - Patienten mit Spermatozoenarrest CREM-1-negativ. Es ist allerdings unklar, ob die fehlende oder verminderte Detektion von CREM-1 schlicht dem Mangel an Spermatozoen zuzuschreiben war, oder ob - im Gegensatz zu den knock-out Mäusen - ein Mangel an CREM-1 zu einem Arrest auf Ebene der Spermatozoen führte (Lin et al., 1998). Da auch in der vorliegenden Arbeit auf Grund von Spermatozoenreduktion nur einzelne Tubuli innerhalb einer Biopsie Spermatozoen besaßen und davon nur wenige CREM-1-negativ waren, was auch Lin et al. (1998) beobachteten, ist der Spermatozoenmangel definitiv als eine der Ursachen für eine fehlende Detektion anzusehen. Der andere Interpretationsansatz bleibt in weiteren Versuchen dennoch zu beachten.

Abschließend ist festzuhalten, dass die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Experimente zeigen, dass sich CREM-1 in allen untersuchten Spezies hervorragend als spezifischer Marker für runde Spermatozoen eignet.

4.5 Quantifizierung von Sertoli-Zellen und Keimzellen bei humanen Hodenbiopsien

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 66 humane Biopsien der histologischen Klassifikationen NSP und SZA ausgewertet, sowie 44 weitere Biopsien der Kategorie HYP vergleichend hinzugezogen. Nach immunhistochemischer Anfärbung mit Hilfe der als Marker dienenden Antikörper, wurden die einzelnen Spermatogenesestadien lichtmikroskopisch von einer Person quantitativ ausgewertet (s. 2.3). In der Literatur ist die quantitative Datenerhebung von testikulären Zellen bisher nicht einheitlich geregelt. So wurden viele Auswertungen anhand von volumetrischen Analysen (Roosen-Runge et al., 1957) oder durch Auszählungen der Zellzahlen pro Unit Tubuluslänge (Zukerman et al., 1978) vorgenommen. Andere werteten die Anzahl der Keimzellen pro Zahl der Sertoli-Zellen aus, als so genannte Sertoli-Cell-Ratio (Skakkebaek et al., 1973). Da wir in unserer Arbeit aber auch untersucht haben, ob die Anzahl der Sertoli-Zellen zwischen den Patientengruppen variiert und in der Literatur auch eine Abhängigkeit der Anzahl der Spermatogonien von den Sertoli-Zellen diskutiert wird (Johnson et al., 2008), eignet sich diese Auswertungsmethode für die vorliegende Arbeit nicht. Eine vergleichbare Auswertung, wie sie in der vorliegenden Arbeit angewandt wurde, ist bei Matsuda et al. (1996) beschrieben. Dort wurden pro Patient alle Zellen in 10-20 querangeschnittenen Tubuli lichtmikroskopisch ausgezählt.

Um die eigenen Ergebnisse besser kategorisieren zu können, wurde für die vorliegende Arbeit ein neues Klassifikationssystem der Spermatogenesedefekte eingeführt. Dieses umfasste insgesamt vier Gruppen. Die Spermatogenesestadien wurden in den sogenannten Stammzellpool – welcher Spermatogonien, spermatogoniale Stammzellen und Sertoli-Zellen umfasste – und in den Pool der Meiose-Defekte unterteilt. Zu letzterem wurden die Spermatozyten, die meiotischen Teilungen und die Spermatisden gezählt. Zwei weitere Gruppen erfassten jene Patienten, die zum einen in beiden Gruppen Defekte oder zum anderen keinerlei Defekte vorweisen konnten.

Wie auf Grund der histologischen Klassifikation in Spermatozytenarrest bereits zu erwarten war, wiesen 36% der Patienten mit SZA einen Defekt in der Meiose auf. Dieser Zusammenhang zwischen meiotischen Fehlern und Infertilität ist seit längerem in der Literatur bekannt (Aarabi et al., 2006). Die Bandbreite der möglichen Ursachen scheint sehr vielfältig, von synaptischen Anomalien über ungepaarte Regionen oder Defekten in DNA - Reparaturgenen wurden bis dato viele Möglichkeiten in der Literatur aufgezeigt (Terribas et al., 2010).

Mit 29% fielen die meisten Patienten mit HYP ebenfalls in diese Gruppe. Eine neue Erkenntnis dieser Arbeit war allerdings, dass unter den Patienten mit NSP nur 15% der Patienten einen Defekt in der Meiose aufwiesen. Der Großteil der Patienten mit NSP konnte mit 45% der Gruppe 4, also kein Zellzahlmangel, zugeordnet werden. Bei dem Kollektiv der HYP waren es immerhin 25% und bei SZA fiel kein Patient in diese Kategorie.

Es konnte ebenso nachgewiesen werden, dass 33% der Patienten mit NSP bereits einen Mangel im Stammzellpool hatten. So war die Ausgangszellzahl in den Spermatogonien, spermatogonialen Stammzellen oder den Sertoli-Zellen bereits vermindert. In der Literatur ist seit einigen Jahren eine Abhängigkeit der Anzahl der Spermatogonien bzw. der Spermienproduktion pro Tag von der Anzahl der Sertoli-Zellen diskutiert worden (Johnson et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit liegt die Ursache der Infertilität in der Obstruktion, daher ist dieser Zusammenhang im Hinblick auf unsere Ergebnisse zu vernachlässigen. Eine weitere Erklärung kann aber im Ablauf der Mitose liegen. Im Vergleich der Patientengruppen wiesen sowohl SZA als auch HYP zu NSP eine signifikante Verminderung der Spermatogonienanzahl auf. Bereits Zukerman et al. (1978) wiesen eine Korrelation zwischen einer geringen Anzahl an Spermatogonien und einer geringen Zahl an Spermien nach. Auch die reduzierte Zahl der Spermatogonien bei Patienten mit SZA konnte durch Steger et al. (1998) belegt werden.

Ein Vergleich unserer Ergebnisse der spermatogonialen Stammzellen zwischen NSP, HYP und SZA zeigte erstaunlicherweise, dass bei SZA diese bereits signifikant vermindert waren. Unserer Kenntnis nach war diese Beobachtung bis dato noch nicht in der Literatur zu finden. Insgesamt fielen 6% der Patienten mit SZA und 27% der Patienten mit HYP in die Gruppe des Stammzellpools.

Die größte Überraschung innerhalb der neuen Kategorisierung bildete die Gruppe 3, welche sowohl Defekte des Stammzellpools als auch Defekte der Meiose beinhaltete. In diese fielen 18% des Kollektivs mit HYP und 6% mit NSP. Den größten Anteil machte mit 58% die Gruppe mit SZA aus. Diese Auswertung, dass Patienten mit einem Arrest auf Meiose-Ebene zum größten Teil zusätzlich ein Problem in vorhergehenden Spermatogenesestadien hatten, war bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt. Durch unser neu eingeführtes Kategorisierungssystem konnte eine neue Interpretationsmöglichkeit von Biopsien infertiler Männer geschaffen werden und die Rolle der Sertoli-Zellen und Spermatogonien im Hinblick auf Infertilität neu beleuchtet werden. Vielleicht gibt es eine Möglichkeit, über eine Stimulation der Sertoli-Zellen mit Testosteron über den Androgenrezeptor die Anzahl der Keimzellen zu erhöhen.

4.6 Interpretation der Histonergebnisse

4.6.1 Acetylierte Histone

Während der Spermatogenese haben die Veränderungen der Kondensation der DNA besondere Bedeutung: zuerst für die Mitose, dann für die Meiose und zuletzt für die Spermio-genese mit Veränderung der Kernmorphologie bis hin zu den Spermatozoen.

Die Acetylierung der Histone beeinflusst die Genexpression positiv, da die Transkriptionsfaktoren besser an die DNA binden können (Boissonnas et al., 2013). Wichtig ist die Acetylierung auch zur DNA Replikation (Kuo und Allis, 1998).

Die Acetylierung von Histon H3 und besonders H4 in postmeiotischen Zellen scheint eine entscheidende Rolle bei der Umwandlung von Histamin zur Protamin während der Spermio-genese zu haben, da in elongierten Spermatischen die Transkription nahe zu vollständig gestoppt wird (Hazzouri und Pivot-Pajot et al., 2000). In Maus- und humanen Hoden wurde ein Zusammenhang zwischen der Hyperacetylierung von H4 in elongierten Spermatischen und Infertilität entdeckt (Rathke et al., 2013).

Um die Rolle der Acetylierung auf die Keimzellen während der Spermatogenese zu untersuchen, wurden acetylierte Antikörper gegen Histon H3 bzw. Histon H4 in dieser Arbeit auf der Suche nach geeigneten Spermatogenesemarkern eingesetzt.

Der Antikörper gegen acetyliertes Histon H3K9 weist im humanen Hoden Spermato-gonien nach. Da Spermato-gonien mitotisch aktive Zellen sind (Steilmann et al., 2011), ist daher ein Verbindung zu der mitotischen Zellteilung wahrscheinlich. Ebenfalls ist H3K9ac in den frühen Spermatozyten lokalisiert, welches einen Zusammenhang von H3K9ac zu den frühen Schritten der Meiose vermuten lässt (Steilmann et al., 2011). Des Weiteren waren auch postmeiotische Zellen mit den späten runden bzw. elongierten Spermatischen angefärbt. Diese Ergebnisse stimmen mit den von Steilmann et al. (2011) erzielten überein. Auch Rathke et al. (2013) beschreiben den Nachweis in elongierten Spermatischen durch H3K9ac an humanem und Maushoden (Rathke et al., 2013). Song et al. (2011) beschreiben am Maushoden nur die Lokalisation an Spermato-gonien, (frühen) Spermatozyten, welche sich bis zur Meiose immer weniger bis gar nicht anfärbten und runde bzw. frühe elongierte Spermatischen. Dies stimmt weitestgehend mit den Färbungen in dieser Arbeit überein, auch wenn die Färbung der Spermatozyten in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden konnte. Dennoch lassen sich auch in der vorliegenden Arbeit die Stadien der aktiven Transkription in Spermato-gonien bis zur Abnahme während der meiotischen Teilungen in Spermatozyten und der anschließenden Zunahme in Spermatischen bis zur erneuten Abnahme auf Grund der extremen Kondensation des Chromatins im Spermienkopf beobachten (Hazzouri und Pivot-Pajot, 2000). Auch die Ergebnisse des

Rattenhodens lassen sich mit dieser Interpretation vereinbaren, denn dort wurden ebenfalls vereinzelte späte Spermatogonien, frühe Spermatozyten und elongierte Spermatiden angefärbt (Hazzouri und Pivot-Pajot et al., 2000).

Die Ergebnisse der Lokalisation von H4K5ac, H4K8ac und H4K16ac sind zusammenfassend im Vergleich mit der Literatur in Tabelle 14 dargestellt.

Bei H4K16ac stellten sich in der vorliegenden Arbeit des Weiteren die Residualkörperchen angefärbt dar. Bei Residualkörperchen handelt es sich um überschüssiges Zytoplasma, welches im Rahmen der Spermiogenese abgeschnürt wird (Behre et al., 2009). Da Histone im Laufe der Spermiogenese zu einem Großteil durch Protamine ersetzt werden, ist eine Abschnürung überflüssig gewordener Histone im Rahmen der Residualkörperchen durchaus vorstellbar, wenn auch eine Färbung der Residualkörperchen in der Literatur nicht erwähnt wurde.

Die Ergebnisse passen zur Histon-Code-Hypothese und zu der darin angenommenen Rolle der Acetylierung. Wiederum sind die Stadien der aktiven Transkription positiv dargestellt. Die fehlende Färbung der elongierten Spermatiden bei H4K8ac und H4K16ac kann durch fehlende elongierte Spermatiden in der angeschnittenen Biopsie erklärt werden, da es sich dabei um infertile Patienten handelte und die Anzahl der elongierten Spermatiden insgesamt vermindert war. Genaueres sollte aber an weiteren Biopsien geklärt werden.

Die in dieser Arbeit beobachtete nukleäre Färbung des Antikörpers H4K8ac der Sertoli-Zellen wird in der Literatur nur von Faure (2003) beobachtet (Tab. 13), wenn auch dort die Färbung mit einem anderen Antikörper gegen Histon H4 durchgeführt wurde. Die Färbung trat abhängig von der histologischen Klassifikation unterschiedlich häufig und unterschiedlich stark innerhalb der Sertoli-Zellen auf, wobei eine deutliche Zunahme in Häufigkeit und Stärke von normaler Spermatogenese bis hin zu *Sertoli-Cell-only*-Patienten sichtbar war. Die Färbung der vorliegenden Arbeit wurde einzig an einem Patienten beispielhaft durchgeführt, der ebenfalls durch eine Obstruktion infertil war, jedoch histologisch nach Bergmann und Kliesch (1998) als „Normale Spermatogenese“ eingestuft worden war. Das Patientenkollektiv müsste für weitere Angaben und Auswertungen über die Häufigkeit der Färbung der Sertoli-Zellen daher in einer weiteren Arbeit vergrößert werden. Diese Stichprobe gab jedoch zumindest einen Hinweis, dass auch bei weiteren histologisch als infertil klassifizierten Patienten ein Zusammenhang zwischen der Acetylierung von Histon H4 und den Sertoli-Zellen vorliegen könnte.

In dieser Arbeit wurde außerdem eine zytoplasmatische Färbung der Sertoli-Zellen an einem anderen Patienten, ebenfalls als NSP eingestuft, mit Hilfe des Antikörpers H4K16ac detektiert (Tab. 13). Dazu wurden in der Literatur bisher keine Angaben

gemacht. Vorstellbar ist aber, unter Annahme der Hypothese einer Beteiligung der Sertoli-Zellen an der Acetylierung der DNA im Laufe der Spermatogenese (Faure, 2003), dass dabei ebenfalls eine Acetylierung, ob an Lysin 8 oder 16, entscheidend ist. Ebenfalls zu klären ist die Frage, ob es sich bei der Acetylierung der Histone der Sertoli-Zellen um einen normalen Vorgang handelt oder ob die beobachtete Färbung im Zusammenhang mit der Infertilität der Patienten zu sehen ist und damit ursächlich sein könnte. Ein Zusammenhang zwischen der Hyperacetylierung von H4 in elongierten Spermatisden und Infertilität wurde bereits nachgewiesen (Sonnack et al., 2002).

Zusammenfassend lässt sich über die in dieser Arbeit getesteten Antikörper gegen acetylierte Histone sagen, dass sich keine Antikörper auf Grund der Expression in mehreren Stadien der Spermatogenese als Marker geeignet zeigten. Allerdings sind alle unsere Ergebnisse im Rahmen der Histon-Code-Hypothese interpretierbar (Boissonnas et al., 2013) und unterstützen die Hypothese damit. Die Grundhypothese, dass die Acetylierung einen positiven Einfluss auf die Genexpression und die DNA-Replikation hat, konnte jedoch durch eine deutliche Lokalisation in den Spermatisden, welche mitotisch aktiv sind, bekräftigt werden. Ebenfalls konnte eine Lokalisation aller Antikörper in den elongierten Spermatisden nachgewiesen werden, was die Acetylierung in postmeiotischen Zellen, welcher Hazzouri und Pivot-Pajot (2000) eine Rolle bei der Umwandlung von Histamin zu Protamin zuschreiben, bestätigt. Insbesondere bei H4K5ac und H4K8ac fällt auf, dass die Acetylierung bei den Spermatozyten deutlich abfällt und bei der Spermio-genese wieder ansteigt. Dies ist als Hinweis auf die Chromosomenkondensation zu Beginn und Ende der Spermatogenese zu werten (Tab. 13).

Tabelle 13 Zusammenfassung des Nachweises acetylierter Histone im Vergleich zur Literatur.

| | SZ | Spg | Spc | rd. Spd | el. Spd | Spz | Übereinstimmung | Abweichung |
|---------------|----|-----|-----|------------|------------|-----|--|-------------------------------|
| H3K9ac | | | | | | | | |
| h | + | ++ | + | + | ++ | -- | Steilmann et al. (2011) und el. Spd bei Rathke et al. (2013) | |
| R | -- | ++ | + | -- | ++ | -- | | |
| M | -- | ++ | -- | + | ++ | -- | Rathke et al. (2013) | Spc bei Song et al. (2011) |

| | SZ | Spg | Spc | rd. Spd | el. Spd | Spz | Übereinstimmung | Abweichung |
|----------------|-----|-----|-----|---------|---------|-----|--|--|
| H4K5ac | | | | | | | | |
| h | -- | ++ | + | ++ | ++ | ++ | Hecht et al. (2008), Spc bei Sonnack et al. (2002) | keine Spc bei Hecht et al. (2008) |
| R | -- | ++ | + | ++ | ++ | ++ | Govin et al. (2007), Meistrich et al. (1992) | |
| M | -- | ++ | + | -- | ++ | -- | Hazzouri und Pivot-Pajot (2000), de Vries et al. (2012), | |
| H4K8ac | | | | | | | | |
| H | + | ++ | + | ++ | -- | -- | Hecht et al. (2008), Spc bei Sonnack et al. (2002), | SZ bei Faure et al. (2003), keine Spc bei Hecht et al. (2008) |
| R | -- | ++ | + | ++ | ++ | -- | Govin et al. (2007), Meistrich et al. (1992) | |
| M | -- | ++ | + | ++ | ++ | -- | Hazzouri und Pivot-Pajot (2000), de Vries et al. (2012) | |
| H4K16ac | | | | | | | | |
| H | zyt | ++ | + | + | -- | -- | Hecht et al. (2008), Sonnack et al. (2002) | |
| R | -- | ++ | + | + | ++ | -- | Govin et al. (2007), Meistrich et al. (1992) | |
| M | -- | + | -- | -- | ++ | -- | Hazzouri und Pivot-Pajot (2000), de Vries et al. (2012) | keine el. Spd bei Govin et al. (2007) und Rathke et al. (2013) |

SZ=Sertoli-Zellen, Spg=Spermatogonien, Spc=Spermatozyten, rd. Spd=runde Spermatiden, el. Spd=elongierte Spermatiden, Spz=Spermatozoen
h=human, R=Ratte, M=Maus, zyt=zytoplasmatisch
-- =keine Färbung, + =vereinzelte Färbung, ++ =positive Färbung

4.6.2 Methylierte Histone

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methylierung anhand von Antikörpern, die gegen di- (H3K9me₂) und trimethyliertes (H3K9me₃) Histon H3K9 gerichtet waren, getestet. Die Methylierung des Histons H3 an der Stelle K9 charakterisiert sowohl ruhende Gene (im Gegensatz zu den acetylierten Histonen) als auch das Heterochromatin und ist in der Meiose besonders stark ausgeprägt (Boissonnas et al., 2013). Daher wurden diese Antikörper als mögliche Marker ausgewählt.

H3K9me2 wies bei allen drei Spezies die Spermatogonien und stadienabhängig die Spermatozyten nach. Die Spermatozyten zeigten bei Maus und Mensch meiotische Figuren. Im Maushoden und humanen Hoden fand sich auch ein Nachweis der elongierten Spermatischen, allein im humanen Hoden auch schwach in den Sertoli-Zellen (Tab. 14). Bei Vergleichen mit der Literatur fanden sich dort nur Angaben zu den Färbungen am Maushoden. Diese stimmen aber mit den Färbungen in den Spermatogonien und den Spermatozyten überein (Payne und Braun, 2006; Tachibana et al., 2007; Liu et al., 2010). Auch wurde in der Literatur eine Stadienabhängigkeit der Spermatozytenfärbung beschrieben, die mit der Prophase der Meiose im Zusammenhang steht. Vor dem Hintergrund des Histon-Codes, wonach die Methylierung mit inaktiven Genen assoziiert ist, werden diese Beobachtungen bestärkt. Während der mitotischen und meiotischen Teilungen befindet sich die DNA in ihrer kompaktesten Form, die Transkription der Gene ist inaktiv. Auch Rathke et al. (2013) assoziieren alle Formen der Methylierung von H3K9 mit inaktivem Chromatin. Des Weiteren wurde auch die Färbung der elongierten Spermatischen bei Peters et al. (2001), Liu et al. (2010) und Rathke et al. (2013) erwähnt.

H3K9me3 befindet sich im perizentrischen Heterochromatin der DNA (Govin et al., 2007). Die Methylierung ist für die Stabilisierung des Genoms von entscheidender Bedeutung (Peters et al., 2001). Die Mono- und Dimethylierung wurde im Euchromatin detektiert (Rice et al., 2003). Bisher ist die unterschiedliche Bedeutung der Methylierungsarten für die Zelldifferenzierung aber noch nicht bekannt (Payne und Braun, 2006).

H3K9me3 wurde in den Zellkernen von Spermatogonien und stadienabhängig in den Spermatozyten aller drei Spezies detektiert. Am humanen Hoden färbten sich die Spermatozyten allerdings teilweise auch zytoplasmatisch an. Des Weiteren wurde eine Färbung der elongierten Spermatischen bei Ratte und Maus und der runden Spermatischen zytoplasmatisch bei der Ratte beobachtet (Tab. 14). Am humanen Hoden färbten sich zusätzlich noch Sertoli-Zellen und runde Spermatischen an. Leider konnte auch bei diesem Antikörper nur der Maushoden mit der Literatur verglichen werden. Payne et al. (2006) beschrieben eine Detektion der Spermatogonien und frühen Spermatozyten und auch bei Liu et al. (2010) existierte eine leichte Färbung der Spermatogonien und frühen Spermatozyten und eine starke Färbung der pachytänen Spermatozyten. Die Färbung der runden und elongierten Spermatischen durch H3K9me3 beschreiben Govin et al. (2007). Während der Hyperacetylierung von Histon H4 (siehe oben) besteht die Trimethylierung dennoch fort, was als Zeichen für die Umorganisation des perizentrischen Heterochromatins während der frühen Spermiogenese angesehen werden kann. Dies passt auch zu den in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen, dass

die Expression von H3K9me2 und H3K9me3 in den elongierten Spermatisden wieder sichtbar bzw. stärker werden. Allein die Färbung der Sertoli-Zellen und die zytoplasmatische Färbung am humanen Hoden bleibt unklar, wobei auch anhand der durchgeführten Versuche nicht zu unterscheiden ist, ob es sich dabei um einen reinen Speziesunterscheid zwischen Mensch und Tier handelt oder ob es einen Zusammenhang zur idiopathischen Infertilität des Patienten gibt.

Der Methylierung der Histone im Laufe der Spermiogenese wird des Weiteren eine Rolle im Ablauf der frühen Embryogenese nach der Befruchtung einer Oozyte zugesprochen (Boissonnas et al., 2013). Auch wird von einem Zusammenhang zwischen der Methylierung der DNA bzw. der Modifikation der Histone und der Infertilität des Mannes ausgegangen (Boissonnas et al., 2013). Dies legt nahe, dass es sich bei Infertilität nicht nur allein um eine Störung im Ablauf der Spermatogenese handeln könnte, sondern es auch durch fehlerhafte DNA-assozierte Modifikationen bei sonst intakter Spermatogenese zu einer Störung der frühen Embryogenese kommt. Dies kann einen Einfluss auf die Durchführung und den Erfolg von assistierten Reproduktionsverfahren haben (Boissonnas et al., 2013). Würde dieser Zusammenhang weiter erforscht, könnten dadurch auf diesem Gebiet eventuell neue Verfahren entwickelt werden oder sich eine Verbesserung in der Effizienz der assistierten Reproduktionsmedizin für infertile Paare ergeben.

Vor dem Hintergrund des Ablaufs der Spermatogenese erlauben die Färbungen beider Antikörper in allen drei Spezies die Herstellung eines Zusammenhanges zwischen inaktiver Genexpression auf Grund von Zellteilungen und der Methylierung der Histone. Anhand der durchgeführten Versuche konnte zudem gezeigt werden, dass die Färbungen in den Spermatisden, Spermatozyten und Spermatisden bei Ratte, Maus und Mensch übereinstimmen. Allerdings war keiner der getesteten Antikörper auf Grund der Lokalisation in mehreren Zellstadien als Marker geeignet.

Tabelle 14 Vergleich der Ergebnisse für die di- und trimethylierten Histone H3K9 mit der Literatur

| | SZ | Spg | Spc | rd. Spd | el. Spd | Spz | stimmt überein mit |
|-----------------|----|-----|-----|---------|---------|-----|--|
| H3K9 me2 | | | | | | | |
| h | + | ++ | + | -- | + | -- | |
| R | -- | ++ | + | -- | -- | -- | |
| M | -- | ++ | + | -- | + | -- | Peters et al. (2001), el. Spd bei Rathke et al. (2013), Spg und Spc bei Liu et al. (2010), Tachibane et al. (2007) und Payne und Braun. (2006) |

| H3K9 me3 | | | | | | |
|----------|----|----|------------------|---|----|----|
| h | + | ++ | + und cyto | + | -- | -- |
| R | -- | ++ | + cyto | + | + | -- |
| M | -- | ++ | cyto | + | + | -- |

Spg und Spc bei Payne und Braun (2001); Liu et al. (2010), rd. und el. Spd bei Govin et al. (2007)

SZ=Sertoli-Zellen, Spg=Spermatogonien, Spc=Spermatozyten, rd. Spd=runde Spermatozyten, el. Spd=elongierte Spermatozyten, Spz=Spermatozoen

h=human, R=Ratte, M=Maus

--=keine Färbung, +=vereinzelte Färbung, ++=positive Färbung

Zusammenfassend war keiner der getesteten Antikörper als Marker geeignet. Die acetylierten Histone zeigten sich im Laufe der Spermatogenese vermehrt in den Stadien, in denen die Genexpression und die DNA-Replikation stattfanden und während des Austausches von Histamin zu Protamin. Die Lokalisationen waren demnach in den Spermatogonien und elongierten Spermatozyten zu finden. Bei den methylierten Histonen fand eine vermehrte Expression in den Spermatogonien und Spermatozyten statt, die mit Fortschreiten der Zelldifferenzierung mehr oder weniger verschwindet. Dies passt zu den Angaben in der Literatur, dass die Methylierung ruhende Gene während der Zellteilung charakterisiert. Zellteilungen finden während der Spermatogenese mit der Mitose in den Spermatogonien und mit der Meiose in den Spermatozyten statt.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Charakterisierung der späten Stadien der Spermatogenese bei infertilen Männern, mit dem Ziel diese genauer klassifizieren zu können. Aus diesem Grund wurden immunhistochemische Untersuchungen mit verschiedenen Antikörpern an den drei Spezies Ratte, Maus und Mensch durchgeführt, um diese auf ihre Verwendbarkeit als stadienspezifische Marker zu testen.

Getestet wurden die Antikörper gegen UTF-1 und den Androgenrezeptor (beide in der Arbeit von Herrn M. Wolter nachzulesen) sowie H3Ser10-P, Smad3, CREM-1 und einige Antikörper aus der Gruppe der Histone.

UTF-1 war dabei als Marker für die spermatogonialen Stammzellen, der Androgenrezeptor für die Spermatogonien, Smad3 für die Spermatozyten, H3Ser10-P für die meiotischen Teilungen und CREM-1 für die runden Spermatisden geeignet.

In der Literatur war bis dahin kein Vergleich zwischen den Lokalisationen der Proteine der Histon-Gruppe der drei Spezies Ratte, Maus und Mensch zu finden. Die Ergebnisse konnten zudem im Rahmen der Histon-Code-Hypothese interpretiert werden und unterstützten die Hypothese: So waren die methylierten Histone in den Stadien der Zellteilung vermehrt exprimiert (Spermatogonien und Spermatozyten) und die Histone während der DNA-Replikation und Genexpression in den Spermatogonien und elongierten Spermatisden acetyliert. Im Gegensatz zu den anderen Antikörpern zeigten sich diese aber nicht als Marker für distinkte Keimzellstadien geeignet.

Die als Marker fungierenden Antikörper wurden in einem nächsten Schritt an humanen Hodenbiopsien verschiedener histologischer Klassifikationen angewandt: insgesamt 33 Biopsien mit normaler Spermatogenese, 33 Biopsien mit Spermatozytenarrest und 44 Biopsien mit Hypospermatogenese (durchgeführt wurden diese HYP-Analysen von M. Wolter). Die Auswertung erfolgte durch die Auszählung von je mindestens zehn querangeschnittenen Tubuli pro Biopsie. Der Vergleich der Zellzahlen zeigte signifikante Abnahmen zwischen den Patientengruppen NSP und SZA bei allen Keimzellstadien und zwischen HYP und SZA ebenfalls in allen Stadien. Zwischen NSP und HYP war nur die Abnahme der Spermatogonien und Spermatozyten statistisch signifikant. Es wurde keine Korrelation zum Alter der Patienten oder der Obstruktion der Samenwege gefunden.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und der Doktorarbeit von Herrn M. Wolter wurde ein neues Klassifikationssystem für infertile Patienten entwickelt. Es fasst die Zellzahlen der spermatogonialen Stammzellen, der Spermatogonien und der Sertoli-Zellen zur Gruppe des Stammzellpools zusammen und die Zellzahlen der

Spermatozyten, meiotischen Teilungen und runden Spermatiden bilden die Gruppe der meiotischen Defekte. Als Defekt wurde eine Zellzahl unterhalb des Cut-offs gewertet.

Die Ergebnisse zeigen, dass die meisten Patienten mit Spermatozytenarrest sowohl im Stammzellpool als auch im Ablauf der Meiose einen Defekt aufwiesen, sodass sowohl die Anzahl der spermatogonialen Stammzellen als auch die Zellteilungsrate der Spermatozyten vermindert war. Die Patienten mit normaler Spermatogenese wiesen größtenteils keinen Defekt auf oder am zweithäufigsten im Stammzellpool. Dies lies die Interpretation zu, dass eine Verminderung der spermatogonialen Stammzellen durch eine normale oder gesteigerte Meioserate der Spermatozyten ausgeglichen werden kann (vgl. Borgers et al., 2014). Die Hypospermatogenese-Patienten zeigten eine gleichmäßige Verteilung zwischen keinem Defekt, Defekt im Stammzellpool oder Meiose-Defekt.

Damit konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals die Verteilung der Defekte im Ablauf der Spermatogenese infertiler Patienten genauer kategorisiert und gezeigt werden, dass bereits die spermatogonialen Stammzellen vermindert waren und nicht ein alleiniger Defekt in der Meiose vorlag.

6 Summary

The aim of the study was to characterize especially the late steps of the spermatogenesis of infertile men, so we used antibodies against UTF-1, AR (results of the doctoral thesis of Mr. M. Wolter) and H3Ser10-P, Smad3, CREM-1 and some antibodies against histones in rats and mice as well as in human testis. UTF-1 could be used as a marker for spermatogonial stem cells, AR for Sertoli cells, Smad3 for spermatocytes, H3Ser10-P for meiotic divisions and CREM-1 for round spermatids. The antibodies against histones were not suitable as markers for distinct germ cell stages but substantiated the thesis of the histone-code: methylation of histones was seen in phases of cell divisions (spermatogonia and spermatocytes) and acetylation was found in stages of high expression and DNA-replication. Thus, our results showed for the first time comparative localizations between rat, mouse and human testis.

As a proof of principle, testis biopsy samples from 33 azoospermic patients with normal spermatogenesis, 33 patients with maturation arrest and 44 patients with hypospermatogenesis were studied and the antibodies were used as markers. To quantify the samples, we counted a minimum of ten tubular cross-sections. The correlations between the patient groups showed significant reductions of every intratubular cell type between NSP and MA and between HYP and MA. Between NSP and HYP only the numbers of spermatogonia and spermatocytes were significantly reduced. No correlation was found with age or obstruction.

For a detailed analysis of the patients, a distinction was made between 'pool of founder cells'-related deficiencies (reduced numbers of Sertoli cells, spermatogonia, and spermatogonial stem cells) and 'meiotic' deficiencies (reduced numbers of spermatocytes, meiotic divisions, and spermatids). A deficiency was defined as a number below the cut-off. Interestingly, patients with maturation arrest showed meiotic deficiencies (36%), while the majority additionally demonstrated deficiencies in the founder pool (58%). In contrast, patients with normal spermatogenesis most often had no deficiencies at all (45%) or founder pool-related deficiencies (33%) but an apparently normal meiosis. Thus, it is possible that the reduction of spermatogonial stem cells is compensated by a normal or increased meiosis (Borgers et al., 2014).

Patients with hypospermatogenesis showed a symmetric distribution between no defect, defect in the founder pool or meiotic defect.

This is the first report showing that besides meiotic defects many infertile patients also face the problem of reduced numbers of Sertoli cells, spermatogonia, and spermatogonial stem cells.

7 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------------|---|
| Abb. | Abbildung |
| Aqua dest. | Aqua destillata |
| AR | Androgenrezeptor |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| C | Chromatid |
| CREM-1 | cAMP response element modulator |
| DAB | 3,3'-Diaminobenzidin |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| EAU | European Association of Urology |
| FSH | Follikelstimulierendes Hormon |
| g | Gramm |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| H3K9ac | Histon H3 acetyliert an der Stelle K9 |
| H3K9me2 | Histon H3 dimethyliert an der Stelle K9 |
| H3K9me3 | Histon H3 trimethyliert an der Stelle K9 |
| H3Ser10-P | Histon H3 phosphoryliert an der Stelle Serin 10 |
| H4K5ac | Histon H4 acetyliert an der Stelle K5 |
| H4K8ac | Histon H4 acetyliert an der Stelle K8 |
| H4K16ac | Histon H4 acetyliert an der Stelle K16 |
| HRP | Horseradish peroxidase |
| HYP | Hypospermatogenese |
| KCl | Kaliumchlorid |
| LH | Luteinisierendes Hormon |
| M | molar |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| µl | Mikroliter |
| m.T. | meiotische Teilungen |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------------|--|
| n | Anzahl der Chromosomen |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NOA | Nicht-obstruktive Azoospermie |
| NSP | normale Spermatogenese |
| OA | obstruktive Azospermie |
| PO ₄ ³⁻ | Phosphat-Anion |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung |
| PC | Peritubulärzellen |
| s. | siehe |
| SCO | Sertoli-cell-only Syndrom |
| SEM | standard error of the mean |
| Spg | Spermatogonien |
| Spc | Spermatozyten |
| Spd | Spermatiden |
| SSZ | spermatogoniale Stammzellen |
| SZ / SC | Sertoli-Zellen |
| SZA | Spermatozytenarrest |
| Tab. | Tabelle |
| TESE | testikuläre Spermienextraktion |
| TGF | transforming growth factor |
| UTF-1 | Undifferentiated Embryonic Cell Transcription Factor 1 |

8 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Protokoll des Paraffineinbettungsautomaten. | 16 |
| Tabelle 2 Daten der verwendeten primären Antikörper | 22 |
| Tabelle 3 Bezugsquellen und Färbeprotokoll der Anti-Histon-Antikörper..... | 22 |
| Tabelle 4 Auswertung der Keim- und Sertoli-Zellen infertiler Patienten..... | 38 |
| Tabelle 5 Auswertung der Zellzahlen der Patientengruppen NSP und SZA | 39 |
| Tabelle 6 Statistische Auswertung aller drei Zelltypen für die Patientengruppen..... | 42 |
| Tabelle 9 zeigt die Expression von H4K8ac in allen drei Spezies. | 52 |
| Tabelle 10 Lokalisation von H4K16ac in den Spezies Ratte, Maus und Mensch..... | 55 |
| Tabelle 12 Lokalisation von H3K9me3 im Hoden der Ratte, der Maus und des Menschen..... | 59 |
| Tabelle 13 Zusammenfassung des Nachweises acetylierter Histone im Vergleich zur Literatur..... | 70 |
| Tabelle 14 Vergleich der Ergebnisse für die di- und trimethylierten Histone H3K9 mit der Literatur..... | 73 |
| | |
| Abbildung 1 Aufbau des Keimepithels | 2 |
| Abbildung 2 Keimzelltypen in den aufeinander folgenden Entwicklungsstufen..... | 4 |
| Abbildung 3 Ablauf der Spermatogenese..... | 6 |
| Abbildung 4 Stadien der humanen Spermatogenese | 8 |
| Abbildung 5 Score-Evaluation nach Johnson (1970) und nach Bergmann und Kliesch (2009)..... | 9 |
| Abbildung 6 a Signalkaskade des TGF- β Signalweges durch die Smad-Proteine.... | 10 |
| Abbildung 7 Darstellung der EnVision™ Methodik von DAKO (Wiedorn et al., 2001) 17 | |
| Abbildung 8 Lokalisation von Smad3 an einem adulten Maushoden..... | 26 |
| Abbildung 9 Lokalisation von Smad3 an einem adulten Rattenhoden..... | 26 |
| Abbildung 10 A/B Expression von Smad3 im humanen Hoden bei Patienten mit NSP | 27 |
| Abbildung 11 Nukleäre Lokalisation von Smad3 im humanen Hoden mit NSP | 28 |
| Abbildung 12 Lokalisation von Smad3 im humanen Hoden mit SZA..... | 28 |
| Abbildung 13 A-C Variabilität der Expression von Smad3 in verschiedenen Hoden von Patienten mit SZA | 29 |
| Abbildung 14 Graphische Darstellung der Anzahl der Smad3-positiven Spermatozyten in NSP, SZA und HYP. | 29 |
| Abbildung 15 Expression von H3Ser10-P im adulten Maushoden | 30 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 16 Verschiedene Ausschnitte eines mit Anti-H3Ser10-P angefärbten Rattenhodens..... | 31 |
| Abbildung 17 Lokalisation von H3Ser10-P in einem humanen Hoden mit NSP..... | 31 |
| Abbildung 18 Expression von H3Ser10-P im humanen Hoden mit NSP und Darstellung der Chromosomen in Äquatorialebene | 32 |
| Abbildung 19 A/B Darstellung von H3Ser10-P bei humanem Hoden mit SZA | 32 |
| Abbildung 20 Graphische Darstellung der H3Ser10P-positiven meiotischen Teilungen von NSP, SZA und HYP | 33 |
| Abbildung 21 Lokalisation von CREM-1 im Maushoden..... | 34 |
| Abbildung 22 Nukleäre Färbung der runden Spermatiden durch CREM-1 am Rattenhoden..... | 34 |
| Abbildung 23 A/B Expression von CREM-1 in humanem Hoden mit NSP | 35 |
| Abbildung 24 A-C Lokalisation von CREM-1 in humanem Hoden mit SZA | 35 |
| Abbildung 25 Verteilung der Anzahl der CREM-1-positiven Spermatiden von Patienten mit NSP, SZA und HYP. | 36 |
| Abbildung 26 Darstellung der Zellzahlunterschiede zwischen NSP und SZA im Stammzellpool..... | 37 |
| Abbildung 27 Vergleiche zwischen NSP und SZA bei den Meiose-Defekten. | 38 |
| Abbildung 28 Verteilung der Zellzahlfdefizite der Patienten mit NSP und SZA..... | 41 |
| Abbildung 29 Graphische Darstellung der Zellzahlen vergleichend zwischen den drei Patientengruppen NSP, HYP und SZA..... | 43 |
| Abbildung 30 Verteilung der Defizite der Patienten der drei verschiedenen Klassifikationen auf die vier Kategorien | 45 |
| Abbildung 31 A/B Lokalisation von H3K9ac im adulten Rattenhoden | 46 |
| Abbildung 32 A/B Expression von H3K9ac im Maushoden..... | 47 |
| Abbildung 33 Darstellung der Färbung von H3K9ac in einem humanen Hoden mit NSP..... | 47 |
| Abbildung 34 A/B Expression von H4K5ac in einem Rattenhoden | 48 |
| Abbildung 35 Lokalisation von H4K5ac im Maushoden..... | 49 |
| Abbildung 36 Expression von H4K5ac in humanem Hoden mit NSP. | 49 |
| Abbildung 37 A-C Darstellung der Lokalisation von H4K8ac im Rattenhoden..... | 50 |
| Abbildung 38 Expression von H4K8ac im adulten Maushoden | 51 |
| Abbildung 39 A/B Lokalisation von H4K8ac im humanen Hoden mit NSP | 51 |
| Abbildung 40 A/B Expression von H4K16ac im adulten Rattenhoden | 52 |
| Abbildung 41 Weitere Lokalisation von H4K16ac im Rattenhoden..... | 53 |
| Abbildung 42 Expression von H4K16ac in Maushoden..... | 53 |
| Abbildung 43 Lokalisation von H4K16ac in humanem Hoden mit NSP. | 54 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 44 A/B H3K9me2-Expression in Rattenhoden | 55 |
| Abbildung 45 A/B Färbung von H3K9me2 am Maushoden..... | 56 |
| Abbildung 46 A/B Expression von H3K9me2 im humanen Hoden mit NSP | 56 |
| Abbildung 47 A/B Lokalisation von H3K9me3 in Rattenhoden..... | 57 |
| Abbildung 48 Lokalisation von H3K9me3 in Maushoden | 58 |
| Abbildung 49 Färbung von H3K9me3 am humanen Hoden mit NSP | 58 |

9 Literaturverzeichnis

- Aarabi, M.; Modarressi, M. H.; Soltanghorae, H., Behjati, R.; Amirjannati, N.; Akhondi, M. M. (2006): Testicular expression of synaptonemal complex protein 3 (SYCP3) messenger ribonucleic acid in 110 patients with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril* **86**,325–331.
- Amann, R. P., (2008): The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? *J Androl* **29**,469–487.
- Bar-Shiva Maymon B; Yogev L, Yavetz H (2003): Spermatogonial proliferation patterns in men with azoospermia of different etiologies. *Fertil Steril* **80**,1175–1180.
- Behr, R.; Weinbauer, G. F. (1999): Germ cell-specific cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element modulator expression in rodent and primate testis is maintained despite gonadotropin deficiency. *Endocrinology* **140**,2746–2754.
- Behr, R.; Weinbauer, G. F. (2001): cAMP response element modulator (CREM): an essential factor for spermatogenesis in primates? *Int J Androl* **24**,126–135.
- Behre, H. M.; Nieschlag, S.; Beier, K. M. (2009): *Andrologie. Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*; Heidelberg, Springer-Medizin-Verlag
- Bergmann, M. (2005): Spermatogenese. *Urologe* **44**,1131–1138.
- Bergmann M.; Kliesch, S. (1998): Hodenbiopsie. In *Andrologie*, Eds Krause, W.; Weidner, W. Stuttgart, Germany: Enke-Verlag. 66–71.
- Bergmann, M.; Kliesch, S. (2009): Biopsie und Histologie der Hoden. In: *Andrologie*. Eds Nieschlag, E.; Behre, H. M.; Nieschlag, S. Berlin, Heidelberg, Springer, 161–172.
- Blocher, S.; Behr, R.; Weinbauer, G. F.; Bergmann, M.; Steger, K. (2003): Different CREM-isoform gene expression between equine and human normal and impaired spermatogenesis. *Theriogenology* **60**,1357–1369.
- Boissonnas, C. C.; Jouannet, P.; Jammes, H. (2013): Epigenetic disorders and male subfertility. *Fertil Steril* **99**,624–631.
- Borgers, M.; Wolter, M., Hentrich, A., Bergmann, M., Stammler, A., Konrad, L. (2014): Role of compensatory meiosis mechanisms in human spermatogenesis. *Reproduction* **148**,315-320.
- Brown, K. A.; Pietenpol, J. A.; Moses, H. L. (2007): A tale of two proteins: Differential roles and regulation of Smad2 and Smad3 in TGF- β signaling. *J Cell Biochem* **101**,9–33.
- Clermont, Y. (1963): The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat* **112**,35–51.

- Cobb, J.; Miyaike, M.; Kikuchi, A.; Handel, M. A. (1999): Meiotic events at the centromeric heterochromatin: histone H3 phosphorylation, topoisomerase II alpha localization and chromosome condensation. *Chromosoma* **108**,412–425.
- de Rooij, D.G; Russell, L. D. (2000): All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl* **21**,776–798.
- Faure, A. K. (2003): Misregulation of histone acetylation in Sertoli cell-only syndrome and testicular cancer. *Mol Hum Reprod* **9**,757–763.
- Ferguson, K. A.; Wong, E. C.; Chow, V.; Nigro, M.; Ma, S. (2007): Abnormal meiotic recombination in infertile men and its association with sperm aneuploidy. *Hum Mol Genet* **16**,2870–2879.
- Godet, M.; Damestoy, A.; Mouradian, S.; Rudkin, B. B.; Durand, P. (2004): Key role for cyclin-dependent kinases in the first and second meiotic divisions of rat spermatocytes. *Biol Reprod* **70**,1147-1152.
- Govin, J.; Escoffier, E.; Rousseaux, S.; Kuhn, L.; Ferro, M.; Thevenon, J.; Catena, R.; Davidson, I.; Garin, J.; Khochbin, S.; Caron, C. (2007): Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *Cell Biol* **176**,283–294.
- Hans, F.; Dimitrov, S. (2001): Histone H3 phosphorylation and cell division. *Oncogene* **20**,3021–3027.
- Hazzouri, M.; Pivot-Pajot, C. (2000): Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone-deacetylases. *Eur J Cell Biol* **79**,950–960.
- Hecht, N.; Behr, R.; Hild, A.; Bergmann, M.; Weidner W.; Steger, K. (2008): The common marmoset (*Callithrix jacchus*) as a model for histone and protamine expression during human spermatogenesis. *Human Reprod* **24**,536-545.
- Heemers, H. V.; Tindall D. J. (2007): Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocrine Rev* **28**,778–808.
- Heldin, C.-H.; Miyazono, K.; ten Dijke, P. (1997): TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* **390**,465–471.
- Hendzel, M. J.; Wei, Y.; Mancini, M. A.; van Hooser, A.; Ranalli, T.; Brinkley, B. R.; Bazett-Jones, D. P.; Allis, C. D. (1997): Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* **106**,348–360.

- Hentrich, A.; Wolter, M.; Szardening-Kirchner, C.; Lüers, G. H.; Bergmann, M.; Kliesch, S.; Konrad, L. (2011): Reduced numbers of Sertoli, germ, and spermatogonial stem cells in impaired spermatogenesis. *Mod Pathol* **24**,1380–1389.
- Hermo, L.; Pelletier, R.-M.; Cyr, D. G.; Smith, C. E. (2010): Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. *Microsc. Res. Tech.* **73**,241–278.
- Itman, C.; Wong, C.; Hunyadi, B.; Ernst, M.; Jans, D. A.; Loveland, K. L. (2011): Smad3 dosage determines androgen responsiveness and sets the pace of postnatal testis development. *Endocrinology* **152**,2076–2089.
- Jenuwein, T. (2001): Translating the histone code. *Science* **293**,1074–1080.
- Johnson, L., (1984): Quantification of the human Sertoli cell population: its distribution, relation to germ cell numbers, and age-related decline. *Biol of Reprod* **31**,785-795.
- Johnson, C. A. (2000): Chromatin modification and disease. *J Med Genet* **37**,905–915.
- Johnson, L.; Thompson, D. L.; Varner, D. D. (2008): Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. *Anim Reprod Sci* **105**,23- 51.
- Kaszas, E.; Cande, W. Z. (2000): Phosphorylation of histone H3 is correlated with changes in the maintenance of sister chromatid cohesion during meiosis in maize, rather than the condensation of the chromatin. *J Cell Sci* **113 (Pt 18)**,3217–3226.
- Kerr, B.; Loveland, K. L.; O'Bryan, M. K.; de Kretser, D. M. (2006): Cytology of the Testis and Intrinsic Control Mechanisms. In: Knobil and Neill's physiology of reproduction (Knobil, Ernst; Neill, Jimmy D. eds.), 3rd ed, Elsevier, Amsterdam, Boston, 827–948.
- Kimmins, S.; Kotaja, N.; Davidson, I.; Sassone-Corsi, P. (2004): Testis-specific transcription mechanisms promoting male germ-cell differentiation. *Reproduction* **128**,5–12.
- Kimmins, S.; Sassone-Corsi, P. (2005): Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature* **434**,583–589.
- Kretzschmar, M.; Massagué, J. (1998): SMADs: mediators and regulators of TGF- β signaling. *Curr Opin Genet Dev* **8**,103–111.
- Kuo, M.-H.; Allis, C. D. (1998): Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *BioEssays* **20**,615–626.
- Lin, W. W.; Lamb, D. J.; Lipshultz L. I.; Kim, E. D. (1998): Absence of cyclic adenosine 3':5' monophosphate responsive element modulator expression at the spermatocyte arrest stage. *Fertil Steril* **69**,533–538.

- Liu, Z.; Zhou, S.; Liao, L.; Chen, X.; Meistrich, M.; Xu, J. (2010): Jmjd1a demethylase-regulated histone modification is essential for cAMP-response element modulator-regulated gene expression and spermatogenesis. *J Biol Chem* **285**,2758–2770.
- Maire, M.; Florin, A.; Kaszas, K.; Regnier, D.; Contard, P.; Tabone, E.; Mauduit, C.; Bars R.; Benahmed, M. (2005): Alteration of transforming growth factor-beta signaling system expression in adult rat germ cells with a chronic apoptotic cell death process after fetal androgen disruption. *Endocrinology* **146**,5135–5143.
- Matsuda, T.; Hiura, Y.; Muguruma, K.; Okuno, H.; Horii, Y.; Yoshida, O. (1996): Quantitative analysis of testicular histology in patients with vas deferens obstruction caused by childhood inguinal herniorrhaphy: comparison to vasectomized men. *J Urol* **155**,564–567.
- Meistrich, M. L.; Trostle-Weige, P. K.; Lin, R.; Allis, C. D.; Bhatnagar, Y. M. (1992): Highly acetylated H4 is associated with histone displacement in rat spermatids. *Mol Reprod Dev* **31**,170-181.
- Nantel, F.; Monaco, L.; Foulkes, N. S.; Masquillier, D.; LeMeur, M.; Henriksen, K.; Dierich, A.; Parvinen, M.; Sassone-Corsi, P. (1996): Spermiogenesis deficiency and germ-cell apoptosis in CREM-mutant mice. *Nature* **380**,159–162.
- Nickerson, H. D.; A. Joshi and D. J. Wolgemuth (2007): Cyclin A1-deficient mice lack histone H3 serine 10 phosphorylation and exhibit altered aurora B dynamics in late prophase of male meiosis. *Dev Biol* **306**,725-735.
- Nieschlag, E. (2009): Aufgaben und Ziele der Andrologie. In: *Andrologie*. (E. Nieschlag, H. M. Behre and S. Nieschlag eds). Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 3–12.
- Palermo, I.; G. Arcidiacono; Barone, N.; Italia, F.; Arizzi, M.; Spera, G.; Bartoloni, G.; Di Mercurio, S.; Vicari, E.; Calogero, A. E. (2004): Normal expression of isoforms activating cyclic adenosine monophosphate responsive element modulator in patients with spermatid maturation arrest. *Fertil Steril* **82 Suppl 3**,1072-1076.
- Passarge, E. (2004): *Taschenatlas der Genetik*. 2nd edn. Thieme, Stuttgart.
- Payne, C.; Braun, R. E. (2006): Histone lysine trimethylation exhibits a distinct perinuclear distribution in Plzf-expressing spermatogonia. *Dev Biol* **293**,461–472.
- Peters, A. H.; O'Carroll, D.; Scherthan, H.; Mechtler, K.; Sauer, S.; Schofer, C.; Weipoltshammer, K.; Pagani, M.; Lachner, M.; Kohlmaier, A.; Opravil, S.; Doyle, M.; Sibilia, M.; Jenuwein, T. (2001): Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* **107**,323–337.
- Prigent, C.; Dimitrov, S. (2003): Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J Cell Sci* **116**,3677–3685.

- Rathke, C.; Baarends, W. M.; Awe, S.; Renkawitz-Pohl, R. (2014): Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1839**, 155–168.
- Rice, J. C.; Briggs, S. D.; Ueberheide, B.; Barber, C. M.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F.; Shinkai, Y.; Allis, C. (2003): Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains. *Mol Cell* **12**,1591–1598.
- Roosen-Runge, E. C.; Marberger, E.; Nelson, W. O. (1957): Quantitative investigations on human testicular biopsies. II. Infertility and other conditions. *Fertil Steril* **8**,203–219.
- Sassone-Corsi, P. (2002): Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science* **296**,2176–2178.
- Schultheiss, D. (2005): Diagnostik der männlichen Infertilität. *Urologe A* **44**,1139-1146.
- Shi, Y.; Massagué, J. (2003): Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**,685–700.
- Skakkebaek, N. E.; Hulten, M.; Jacobsen, P.; Mikkelsen, M. (1973): Quantification of human seminiferous epithelium. *Reproduction* **32**,391–401.
- Song, N.; Liu, J.; An, S.; Nishino, T.; Hishikawa, Y.; Koji, T. (2011): Immunohistochemical analysis of histone H3 modifications in germ cells during mouse spermatogenesis. *Acta Histochem Cytochem* **44**,183–190.
- Sonnack, V.; Failing, K.; Bergmann, M.; Steger, K. (2002): Expression of hyperacetylated histone H4 during normal and impaired human spermatogenesis. *Andrologia* **34**,384–390.
- Steger, K.; Aleithe, I.; Behre, H.; Bergmann, M. (1998): The proliferation of spermatogonia in normal and pathological human seminiferous epithelium and immunohistochemical study using monoclonal antibodies against Ki-67 protein and proliferating cell nuclear antigen. *Mol Hum Reprod* **4**,227-233.
- Steilmann, C.; Paradowska, A.; Bartkuhn, M.; Vieweg, M.; Schuppe, H.-C.; Bergmann, M.; Kliesch, S.; Weidner, W.; Steger, K. (2011): Presence of histone H3 acetylated at lysine 9 in male germ cells and its distribution pattern in the genome of human spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* **23**,997-1011.
- Tachibana, M.; Nozaki, M.; Takeda N.; Shinkai, Y. (2007): Functional dynamics of H3K9 methylation during meiotic prophase progression. *EMBO J* **26**,3346–3359.
- Terribas, E.; Bonache, S.; Garcia-Arevalo, M.; Sanchez, J.; Franco, E.; Bassas, L.; Larriba, S. (2010): Changes in the expression profile of the meiosis-involved mismatch repair genes in impaired human spermatogenesis. *J Androl* **31**,346–357.
- van Hooser, A.; Goodrich, D. W.; Allis, C. D.; Brinkley, B. R.; Mancini, M. A. (1998): Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintenance of mammalian chromosome condensation. *J Cell Sci* **111 (Pt 23)**,3497–3506.

- de Vries, M.; Ramos, L.; Housein, Z.; de Boer, P. (2012): Chromatin remodelling initiation during human spermiogenesis. *Biol Open* **1**,446-457.
- Vouk, K.; Hudler, P.; Strmsnik, L.; Fink, M.; Majdic, G.; Zorn, B.; Lalli, E.; Sassone-Corsi, P.; Debeljak, N.; Komel, R.; Rozman, D. (2005): Combinations of genetic changes in the human cAMP-responsive element modulator gene: a clue towards understanding some forms of male infertility? *Mol Hum Reprod* **11**,567–574.
- Wei, Y.; Yu, L.; Bowen, J.; Gorovsky, M. A.; Allis, C. D. (1999): Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* **97**,99–109.
- Weinbauer, G. F.; Behr, R.; Bergmann, M.; Nieschlag, E. (1998): Testicular cAMP responsive element modulator (CREM) protein is expressed in round spermatids but is absent or reduced in men with round spermatid maturation arrest. *Mol Hum Reprod* **4**,9–15.
- Weinbauer, G. F.; Luetjens, C. M.; Simoni, M.; Nieschlag, E. (2009): Physiologie der Hodenfunktion. In: *Andrologie*. Eds Nieschlag, E.; Behre, H. M.; Nieschlag, S. Berlin, Heidelberg, Springer, pp. 15–61.
- Welsch, U. (2010): *Lehrbuch Histologie*, 3rd edn. Elsevier, Urban & Fischer, München.
- Wiedorn, K. H.; Goldmann, T.; Henne, C.; Kuhl, H.; Vollmer, E. (2001): EnVision+, a new dextran polymer-based signal enhancement technique for in situ hybridization (ISH). *J Histochem Cytochem* **49**,1067–1071.
- Xu, J.; Beyer, A. R.; Walker, W. H.; McGee, E. A. (2003): Developmental and stage-specific expression of Smad2 and Smad3 in rat testis. *J Androl* **24**,192–200.
- Zukerman, Z.; Rodriguez-Rigau, L. J.; Weiss, D. B.; Chowdhury, A. K.; Smith, K. D.; Steinberger, E. (1978): Quantitative analysis of the seminiferous epithelium in human testicular biopsies, and the relation of spermatogenesis to sperm density. *Fertil Steril* **30**,448–455.

10 Publikationsverzeichnis

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Zeitschriften und auf folgenden Kongressen veröffentlicht:

Hentrich, A.; Wolter, M.; Szardening-Kirchner, C.; Lüers, G. H.; Bergmann, M.; Kliesch, S.; Konrad, L. (2011): Reduced numbers of Sertoli, germ, and spermatogonial stem cells in impaired spermatogenesis. *Mod Pathol* **24**,1380–1389.

Borgers, M., Wolter, M.; Hentrich, A.; Bergmann, M.; Stammeler, A.; Konrad, L. (2014): Role of compensatory meiosis mechanisms in human spermatogenesis. *Reproduction* **148**,315-320.

7th European Congress of Andrology (ECA) Berlin (2012)

17th European Testis Workshop, Djurönäset, Stockholm (2012)

11 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus – Liebig - Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert.

Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

12 Danksagung

Ganz herzlichen Dank möchte ich Herrn L. Konrad für die kontinuierlich gute Betreuung sowohl während der Datenerhebung als auch bei der Korrektur dieser Arbeit sagen. Ebenfalls bedanken möchte ich mich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Ein Dank ist an Herrn M. Wolter für die Überlassung der Daten der Patientengruppe HYP gerichtet.

Ein weiterer Dank geht an die Mitarbeiter des Labors der Frauenklinik an der Uniklinik Gießen. Besonderer Dank gilt dabei Cornelia Hof für die Unterstützung bei den immunhistochemischen Versuchen und der Einarbeitung im Labor mit den Materialien und Geräten und Dorina Zoltan für die tatkräftige Unterstützung bei Problemen aller Art und für die Motivation in der gesamten Zeit.

Ein herzliches Dankeschön geht ebenso an Prof. M. Bergmann für die Überlassung der Hodenbiopsien.

Ebenso bedanken möchte ich mich ganz herzlich bei allen, die mich während der Phase der Promotion unterstützt haben, sei es durch Korrekturlesen, Teilung des Erfahrungsschatzes oder aufbauende Worte. Besonderer Dank geht dabei an Philipp Hentrich und Julia Granzow.

