

Journal für

# Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

– Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology –

Andrologie • Embryologie & Biologie • Endokrinologie • Ethik & Recht • Genetik  
Gynäkologie • Kontrazeption • Psychosomatik • Reproduktionsmedizin • Urologie



## **In-vitro-Spermatogenese**

Stukenborg JB, Schlatt S

*J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2009; 6 (5), 195-198*

[www.kup.at/repromedizin](http://www.kup.at/repromedizin)

Online-Datenbank mit Autoren- und Stichwortsuche

Offizielles Organ: AGRBM, BRZ, DVR, DGA, DGGEF, DGRM, D-I-R, EFA, OEGRM, SRBM/DGE

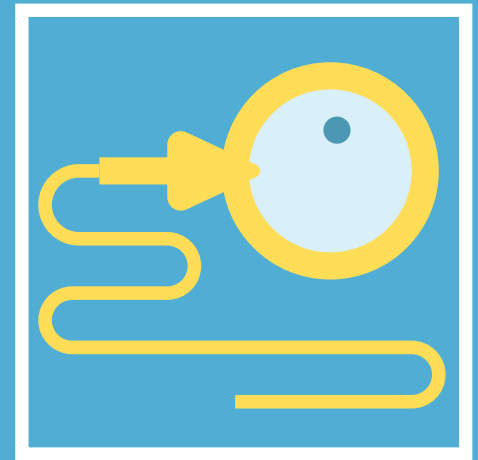
Indexed in EMBASE/Excerpta Medica/Scopus

Krause & Pachernegg GmbH, Verlag für Medizin und Wirtschaft, A-3003 Gablitz

SAVE THE DATE

# 10. DVR-KONGRESS

20.09.-22.09.2023



World Conference Center **BONN**

Prof. Dr. med. Jean-Pierre Allam

PD Dr. rer. nat. Verena Nordhoff

Prof. Dr. med. Nicole Sanger

**BACK TO THE FUTURE**

# In-vitro-Spermatogenese

J. B. Stukenborg, S. Schlatt

In-vitro-Differenzierung und Manipulation testikulärer Keimzellen kann ein essenzieller Bestandteil werden, um das Verständnis der Physiologie prämeiotischer, meiotischer und postmeiotischer Prozesse der männlichen Keimbahn zu verbessern. Experimente mit unterschiedlichen Kulturansätzen und der Einsatz potenziell spermatogenesefördernder Faktoren zeigten jedoch auch die Limitierung dieser Ansätze, da aufgrund fehlender optimaler Kulturbedingungen keine vollständige Spermatogenese in vitro erzielt wurde. Neueste Studien zeigen, dass für einen erfolgreichen Ansatz essenzielle Wachstumsfaktoren und Hormone mit einer strukturgebenden Umgebung, die der Stammzellnische des Hodens ähnlich ist, kombiniert werden müssen. Dieser Übersichtsartikel fokussiert auf experimentellen Ansätzen zur Differenzierung testikulärer Säugerkeimzellen, die eine klinische Option zukünftiger Fertilitätsreserve für präpubertäre Patienten darstellen.

**Schlüsselwörter:** Testis, Keimzeldifferenzierung, Organkultur, Kryokonservierung, Fertilitätsreserve

**In vitro Spermatogenesis.** In vitro differentiation and manipulation of testicular germ cells could become an essential tool to understand the physiology of pre-meiotic, meiotic and post-meiotic processes of the male germline. Experiments using various in vitro conditions were performed, but demonstrated the limitations of all approaches to complete spermatogenesis in vitro, due to a lack of appropriate culture conditions. Current studies indicate that an experimental setting to optimize the spermatogenic progress in vitro needs to combine supporting growth factors and hormones as well as structural components which mimic the testicular stem cell niche. This review focuses on experiments to differentiate mammalian germ cells, which might become a clinical option for fertility preservation in pre-pubertal patients. **J Reproduktionsmed Endokrinol 2009; 6 (5): 195–8.**

**Key words:** testis, germ cell differentiation, organ culture, cryopreservation, fertility

Seit nahezu 100 Jahren sind Untersuchungen zur Physiologie testikulärer Keimzellen ein fester Bestandteil der reproduktionsbiologischen und reproduktionsmedizinischen Forschung. Erste Versuche wurden 1915 von Richard Goldschmidt an testikulären Gewebekulturen des Nachtfalters *Samia cecropia* durchgeführt. Diese Versuche beschrieben erstmalig die Differenzierung früher Spermatozyten über einen Zeitraum von 3 Wochen. Außerdem wurde gezeigt, dass im Gegensatz zu den ersten Teilungen der Spermatogonien eine Vollendung der Meiose mit anschließender Reifung der Spermatozyten innerhalb weniger Tage abgeschlossen werden kann [1]. 2008 beschreiben Kawamoto et al. in einem ähnlichen Ansatz die autonome Differenzierung früher Spermatogonien der Taufliege *Drosophila melanogaster* in motile Spermatozoen in vitro [2].

Ein vergleichbarer Erfolg bei der Differenzierung testikulärer Keimzellen aus Säugern scheint jedoch weitaus schwieriger zu sein, da bis heute keine vollständige Differenzierung in vitro erreicht werden konnte [3, 4]. Eine Übertragung der Versuchsanordnungen auf Gewebekulturen testikulären Gewebes von Säu-

getieren wurde bereits 1920 beschrieben [5]. In diesen Studien wurden Gewebestückchen adulter Kaninchenhoden bis zu einer Woche in einer mit Blutplasma angereicherten Kultur gehalten. Degeneration von Spermatozyten und Spermatozyden traten nach 2–9 Tagen auf. Eine Verbesserung im Bezug auf Überlebensrate und Differenzierung wurde 16 Jahre später von Michailow in der Kultur 10 Tage alter Kaninchenhoden beschrieben [6]. In diesen Versuchen wurden Samenkanälchen (*Tubuli seminiferi*) 70 Tage in Kultur gehalten (Abb. 1). Alle oben genannten Studien zeigten, dass die überlebende Population sich auf undifferenzierte Keimzellen beschränkt. In-vitro-Differenzierung in Organkulturen und damit in einer intakten testikulären Mikroumgebung wurden in den 1960er-Jahren von Anna und Emil Steinberger beschrieben. Ausgehend von undifferenzierten Spermatogonien der Ratte konnte eine Differenzierung bis zu pachytänen Spermatozyten beobachtet werden. Diese Reifung undifferenzierter Spermatogonien bis weit in die Meiose ist auf eine Verbesserung der Kulturbedingungen zurückzuführen. Ein optimaler pH-Wert des Zellkulturmediums von 7,4, eine CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5 %, eine Kulturtemperatur von 35 °C, entsprechend

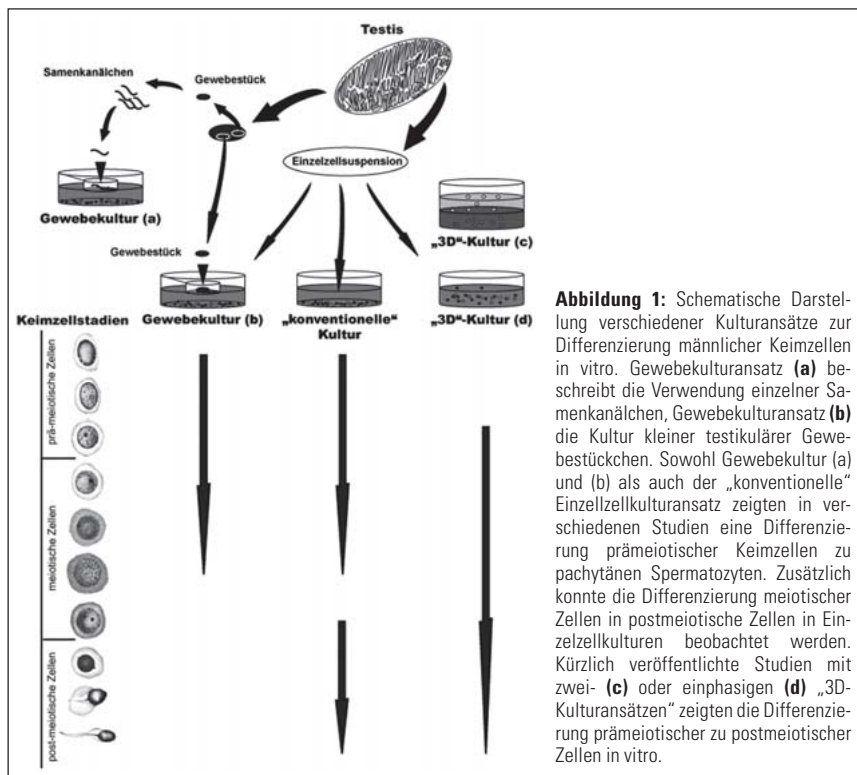
der Temperatur im Scrotalbereich und ein chemisch definiertes Medium ersetzen das bis dato verwendete Blutplasma, was zu besser kontrollierten Kulturbedingungen führte [7, 8]. Die Organkultur humaner testikulärer Keimzellen wurde erstmalig 1967 unter Verwendung dieser Kulturanordnung beschrieben und resultierte in der Differenzierung präleptotäner zu pachytäner Spermatozyten [9].

Sämtliche Organkulturansätze zeigten, dass sich undifferenzierte Keimzellen weit in die Prophase der Meiose differenzieren lassen. Allerdings wurde nie eine vollständige Spermatogenese ausgehend von spermatogonialen Stammzellen erzielt. In späteren Studien wurde der Einfluss unterschiedlicher Hormone und Wachstumsfaktoren nicht nur auf prämeiotische Keimzellproliferation und Differenzierung, sondern auch auf die somatische Komponente testikulärer Gewebe von Nagern untersucht [10, 11]. Die Zugabe von Aktivin und follikelstimulierendem Hormon (FSH) in eine Kultur immaturer testikulärer Fragmente unterstützte die Initiierung der Sertoli-Zellproliferation und Keimzellexpansion während einer Kulturdauer von 3 Tagen. Die Gruppe um Erkillä unter-

Eingegangen: 03.03.2009; akzeptiert nach Revision: 14.08.2009.

Aus dem Department of Women's and Children's Health, Pediatric Endocrinology Unit, Karolinska Institute and University Hospital, Sweden und dem Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie der Universität Münster

**Korrespondenzadresse:** Dr. rer. nat. Jan-Bernd Stukenborg, Department of Women's and Children's Health, Pediatric Endocrinology Unit, Karolinska Institute and University Hospital, S-17176, Sweden; E-Mail: Jan-Bernd.Stukenborg@ki.se



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung verschiedener Kulturansätze zur Differenzierung männlicher Keimzellen in vitro. Gewebekulturansatz (a) beschreibt die Verwendung einzelner Samenkanälchen, Gewebekulturansatz (b) die Kultur kleiner testikulärer Gewebestückchen. Sowohl Gewebekultur (a) und (b) als auch der „konventionelle“ Einzelzellkulturansatz zeigten in verschiedenen Studien eine Differenzierung prämeiotischer Keimzellen zu pachytänen Spermatozyten. Zusätzlich konnte die Differenzierung meiotischer Zellen in postmeiotische Zellen in Einzelzellkulturen beobachtet werden. Kürzlich veröffentlichte Studien mit zwei- (c) oder einphasigen (d) „3D-Kulturansätzen“ zeigten die Differenzierung prämeiotischer zu postmeiotischer Zellen in vitro.

suchte den Einfluss von Testosteron auf humane Tubuli seminiferi in vitro und konnte eine Suppression der Apoptoseaktivität in testikulären Keimzellen zeigen [12].

Auch wenn in Organkulturansätzen einige Differenzierungs- und Wachstumsprozesse im Hodengewebe stattfinden, kommt es in den verwendeten Gewebestückchen zu einer Ischämie und Anoxie. Daraus resultiert eine Unterversorgung des Gewebes. Um diese Effekte zu umgehen, verwendete die Arbeitsgruppe um Dietrich eine Einzelzellsuspension testikulärer Keimzellen anstatt eines Gewebestückchens [13] (Abb. 1). Die Kultur isolierter Keimzellfraktionen wurde danach eine von vielen Gruppen mit unterschiedlichen Fragestellungen verwendete Methodik [13–18]. Die Anreicherung spezifischer Keimzellstadien ist heute ein wichtiger Bestandteil zur Untersuchung der Spermatogenese und ermöglicht eine differenzielle Betrachtung definierter Phasen der Keimzell-differenzierung.

Erfolgreiche Methoden zur Isolierung und Anreicherung von Spermato gonien wie fluoreszenzaktivierte Zellsortierung („fluorescence activated cell sorting“ [FACS]) [14, 15], Schwerkraftsedimen-

tation mit Percoll [16], die „STAPUT-Technik“ [17], magnetisch aktivierte Zellsortierung („magnetic activated cell sorting“ [MACS]) [18–21] und magnetische Sortierung mit Dynabeads [22] wurden bereits in den vergangenen Jahren beschrieben. Für die meisten Aufreinigungsmethoden sind spezifische Zelloberflächenmarker unabdingbar. Spermato goniale Oberflächenmarker wie Gfr $\alpha$ -1 („glial cell line-derived neurotrophic factor [GDNF] family receptor alpha“), Notch-1 („notch superfamily“), c-kit (transmembrane Tyrosin Kinase), CD-9 (Tetraspanin transmembranes Protein),  $\alpha$ -6-integrin und CDH-1 (auch bekannt als E-cadherin) wurden im Nagermodell charakterisiert und anschließend auch bei der Isolation humaner Spermato gonien eingesetzt [21].

Die oben genannten Proteine werden in unterschiedlichen Spermato gonientypen, nicht aber selektiv in spermato gonialen Stammzellen exprimiert. Zurzeit gibt es keinen spezifischen Oberflächenmarker für spermato goniale Stammzellen. Jedoch scheint das Protein Gfr $\alpha$ -1 ein gut geeigneter Oberflächenmarker zu sein, um Subpopulationen von Spermato gonien zu selektieren, die einen hohen Anteil an testikulären Stammzellen enthalten [18–20].

Untersuchungen an Zellfraktionen spermato gonialer Stammzellen und differenzierter Keimzellen aus präpubertärem und maturem Gewebe ergaben, dass Keimzellen aus immatorem Gewebe in vitro besser überleben als Zellen aus adultem Gewebe und dass das Alter des verwendeten Gewebes eine entscheidende Rolle spielt [23, 24]. Demnach empfiehlt es sich, zur Optimierung des verwendeten Kulturansatzes sowohl zur Etablierung einer spermato gonialen Stammzelllinie als auch bei Untersuchungen zur In-vitro-Differenzierung juveniles Gewebe zu verwenden.

In situ regulieren testikuläre somatische Zellen (direkter Kontakt: Sertoli-Zellen; indirekt durch endokrine/parakrine Faktoren: Leydig-Zellen, Makrophagen, peritubuläre Zellen) die Spermatogenese. Um die Rolle somatischer Zellen besser zu verstehen, wurden bei in vitro Experimenten an isolierten Keimzellen entweder Sertoli- und Leydig-Zellen als unterstützende Zellen kokultiviert oder das Kulturmedium mit Wachstumsfaktoren (z. B. „leukaemia inhibiting factor“ [LIF], „glial cell line-derived neurotrophic factor“ [GDNF], „stem cell factor“ [SCF]) angereichert, die von somatischen Zellen im Hoden produziert werden. Es wurde ausgewertet, ob die Kokultur oder die Präsenz von Wachstumsfaktoren zu einer verbesserten Überlebensrate und/oder zur Proliferation der testikulären Keimzellen führte [17, 25].

Viele dieser In-vitro-Untersuchungen zur Physiologie der Keimzellvermehrung und Differenzierung spermato gonialer Subtypen wurden in konventionellen Kulturansätzen durchgeführt (z. B. [26–29]). Jedoch zeigten Analysen von Gewebekulturen und Keimzelltransplantationsexperimenten neben den unterstützenden Effekten somatischer Zellen oder angereicherter Medien die Bedeutung der Stammzellnische für die Kolonisation spermato gonialer Stammzellen. Die Stammzellnische im Säugerhoden wird von somatischen testikulären Zelltypen geformt. Die Lage der testikulären Blutgefäße korreliert mit der Lokalisation der spermato gonialen Stammzellen im Tubulus und impliziert, dass Stammzellnischen nicht zufällig verteilt sind [30]. Konventionelle Zellkulturansätze verwenden gewöhnlich Kulturschalen oder Kulturflaschen, die keine Ausbildung dreidimensionaler



Zellaggregate oder stammzellnischen-ähnlicher Strukturen ermöglichen. Hingegen verbessert die Bereitstellung einer dreidimensionalen Matrix durch die Verwendung gelartiger Materialien die Keimzellprogression [31] und unterstützt die Effizienz meiotischer Prozesse in vitro [19, 32–35].

In unseren Studien zur Keimzellendifferenzierung in vitro haben wir eine Methode, die zuerst als klonaler Assay zur Charakterisierung von Knochenmarkszellen und deren regulierender Faktoren etabliert wurde [36], zur Analyse der klonalen Expansion kultivierter Keimzellen modifiziert (Abb. 1) [19, 35]. Die dreidimensionale Matrix unseres Versuchsansatzes wird durch zwei Agar-Schichten bereitgestellt, einer Gel-Phase (0,35 % Agar) und einer darunterliegenden festen Phase (0,5 % Agar). Der zweiphasige Ansatz des „Soft Agar Culture Systems (SACS)“ erlaubt die Zugabe somatischer testikulärer Zellen und/oder Wachstumsfaktoren ohne die isolierte und angereicherte Keimzellfraktion zu „kontaminieren“.

Während ein direkter zellulärer Kontakt zwischen Keimzellen und Sertoli-Zellen in vivo besteht, scheint dieser für die Proliferation von geringerer, jedoch für die Differenzierung männlicher Keimzellen in vitro von größerer Bedeutung zu sein [19].

In Kulturen testikulärer Keimzellen der Ratte wurde gezeigt, dass der entscheidende Schritt der Differenzierung von mittlerer zu später pachytäner Spermatozyte in vitro die Expression regulierender Proteine ist [37]. Meiotische und postmeiotische Prozesse werden durch die Wirkung von Testosteron und FSH in vitro reguliert. Testosteron und SCF unterstützen zudem die Überlebensrate von Sertoli- und Keimzellen während der Kulturzeit durch eine Inhibierung der Apoptose [38]. Prinzipiell zeigen diese In-vitro-Versuche, dass die Initiierung der Meiose von der Präsenz oder dem Fehlen endokriner und parakriner Faktoren und der Unterstützung durch Sertoli-Zellen [39] abhängt. Diese Faktoren umfassen verschiedene aktivierende intrazelluläre Signalmoleküle, inklusive Vertreter der Bcl-2 Familie, Fas/Fas-Liganden und „tumour necrosis factor alpha-related apoptosis-inducing ligand“ (TRAIL), P53 und „cyclic AMP

responsive element modulator“ (CREM) [40–42]. Übertragen auf unseren Versuchsansatz zeigte die Anreicherung des Kulturmediums mit den obengenannten Hormonen die bereits beschriebenen Wirkungen zur Verbesserung der Überlebensrate und Differenzierung der kultivierten testikulären Zellen. Die Zugabe von LH resultierte in der Produktion von Testosteron, welches für eine intakte Leydig-Zellfraktion innerhalb der Zellpopulation spricht. Unter diesen Kulturbedingungen, bei denen somatische Zellen und Keimzellen in der Agarschicht kleine bis große Aggregate bilden können, durchlaufen prämeiotische Keimzellen die meiotischen und postmeiotischen Entwicklungsstadien und differenzieren vollständig bis zum Stadium elongierter Spermatozyten. Die Dauer der Zellkultur bis zum Auftreten elongierter Spermatozyten betrug ca. 5 Wochen in vitro [35]. Demnach konnte erstmalig in unseren Studien die Differenzierung prämeiotischer Keimzellen in morpholo-

gisch intakte Spermien beschrieben werden.

Auch wenn die verbesserten Kulturbedingungen vielversprechend sind, muss dennoch die Tatsache im Hinterkopf behalten werden, dass es sich bei diesen Studien um experimentelle Ansätze handelt. Weitere Forschungen, gerade im Bereich humaner Keimzellendifferenzierung in vitro, sind dringend erforderlich. Unsere Ergebnisse geben aber Anlass zur Hoffnung, in Zukunft mit innovativen Zellkulturtechniken Spermien aus immaturren Keimzellen gewinnen zu können. Deshalb erscheint es schon jetzt insbesondere bei präpubertären Jungen, die sich einer gonadotoxischen Krebstherapie unterziehen müssen, sinnvoll, mit der Kryokonservierung testikulärer Gewebestückchen von Patienten zu beginnen, um mögliche Erfolge zukünftiger Forschung zur In-vitro-Generierung von Spermien auch für diese Patienten offen zu halten.

### ■ Relevanz für die Praxis

In den vergangenen Jahren wurden neue experimentelle In-vitro-Verfahren zur Erforschung molekularer und zellulärer Mechanismen der Spermatogenese eingesetzt, die mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Entwicklung von Methoden mit klinischer Relevanz führen werden. Diese geben Anlass zur Hoffnung, in Zukunft Zellkulturansätze zur Gewinnung humaner Spermien aus immaturren Keimzellen etablieren zu können.

Unter Berücksichtigung der ethischen Richtlinien sollten diese experimentellen Ansätze und die daraus gewonnenen Erkenntnisse in kontrollierten präklinischen und klinischen Studien vom Nagermodell über den nicht-humanen Primaten auf den Menschen übertragen werden.

Mit der Kryokonservierung humaner testikulärer Biopsien kann in Zentren, die über entsprechende Kryokonservierungsprotokolle und die Möglichkeit zur Lagerung der Gewebeproben verfügen, bereits jetzt begonnen werden, um den Patienten von heute die möglichen Erfolge zukünftiger Forschung zur Generierung von Spermien offen zu halten.

### Literatur:

1. Goldschmidt R. Some experiments on spermatogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1915; 1: 220–2.
2. Kawamoto T, Kawai K, Kodama T, Yokokura T, Niki Y. Autonomous differentiation of *Drosophila* spermatogonia in vitro. *Develop Growth Differ* 2008; 50: 623–32.
3. Wistuba J, Stukenborg JB, Luetjens CM. Mammalian Spermatogenesis. *Func Develop Embryol* 2007; 1: 99–117.
4. Georgiou I, Pardalidis N, Giannakis D, Saito M, Watanabe T, Tsounapi P, Loutradis D, Kanakas N, Karagiannis A, Baltogiannis D, Giotitsas N, Miyagawa I & Sofikitis N. In vitro spermatogenesis as a method to bypass pre-meiotic or post-meiotic barriers blocking the spermatogenic process: genetic and epigenetic implications in assisted reproductive technology. *Andrologia* 2007; 39: 159–76.
5. Champy C. Quelques resultats de la methode de culture des tissus. *Arch Zool Exp Gen* 1920; 60: 461–500.
6. Michailow M. Experimentell-histologische Untersuchungen über die Elemente der Hodenkanälchen. *Z Zellforsch* 1937; 6: 174–201.
7. Steinberger E, Steinberger A, Perloff WH. Initiation of spermatogenesis in vitro. *Endocrinology* 1964; 74: 788–92.
8. Steinberger A, Steinberger E. In vitro culture of rat testicular cells. *Exp Cell Res* 1966; 44: 443–52.
9. Steinberger E. Maintenance of adult human testicular tissue in culture. *Anat Rec* 1967; 157: 327–8.
10. Schlatt S, Zhengwei Y, Meehan T, de Kretser DM, Loveland KL. Application of morphometric techniques to postnatal rat testes in organ culture insights into testis growth. *Cell Tissue Res* 1999; 298: 335–43.
11. Meehan T, Schlatt S, O'Bryan MK, de Kretser DM, Loveland KL. Regulation of germ cell and sertoli cell development by actin follistatin and FSH. *Develop Biol* 2000; 220: 225–37.

12. Erkkilä K, Henriksen K, Hirvonen V, et al. Testosterone regulates apoptosis in adult human seminiferous tubules in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2314–21.
13. Dietrich AJ, Scholten R, Vink AC, Oud JL. Testicular cell suspensions of the mouse in vitro. *Andrologia* 1983; 15: 236–46.
14. Shinohara T, Orwig KE, Avarbock MR, Brinster RL. Spermatogonial stem cell spermatogenesis. *Bioessays* 2000; 22: 423–30.
15. Guan K, Nayernia K, Maier LS, et al. Pluripotency of spermatogonial stem cell from adult mouse testis. *Nature* 2006; 440: 1199–203.
16. Koh KB, Komiya M, Toyama Y, Adachi T, Mori C. Percoll fractionation of adult mouse spermatogonia improves germ cell transplantation. *Asian J Androl* 2004; 6: 93–8.
17. Dirami G, Ravindranath N, Pursel V, Dym M. Effects of stem cell factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor on survival of porcine type A spermatogonia cultured in KSOM. *Biol Reprod* 1999; 61: 225–30.
18. Buageaw A, Sukhwani M, Ben-Yehudah A, et al. GDNF family receptor alpha1 phenotype of spermatogonial stem cells in immature mouse testes. *Biol Reprod* 2005; 73: 1011–6.
19. Stukenborg JB, Wistuba J, Luetjens CM, et al. Coculture of spermatogonia with somatic cells in a novel three-dimensional soft-agar-culture-system. *J Androl* 2008; 29: 312–29.
20. Kokkinaki M, Lee TL, He Z, Jiang J, Golestaneh N, Hofmann MC, Chan WY, Dym M. The molecular signature of spermatogonial Stem/Progenitor cells in the 6-day-old mouse testis. *Biol Reprod* 2009; 80: 707–17.
21. Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, Wiesner T, Just L, Bonin M, Aicher W, Bühring HJ, Mattheus U, Mack A, Wagner HJ, Minger S, Matzkies M, Reppel M, Hescheler J, Sievert KD, Stenzl A, Skutella T. Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature* 2008; 456: 344–9.
22. Hofmann MC, Braydich-Stolle L, Dym M. Isolation of male germ-line stem cells influence of GDNF. *Develop Biol* 2005; 279: 114–24.
23. Creemers LB, den Ouden K, van Pelt AMM, de Rooij DG. Maintenance of adult mouse type A spermatogonia in vitro influence of serum and growth factors and comparison with prepubertal spermatogonial cell culture. *Reproduction* 2002; 124: 791–9.
24. Nagano M, Ryu BY, Brinster CJ, Avarbock MR, Brinster RL. Maintenance of mouse male germ line stem cells in vitro. *Biol Reprod* 2003; 68: 2207–14.
25. Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Growth factor essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 16489–94.
26. de Rooij DG, Grootegoed JA. Spermatogonial stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 694–701.
27. Feng LX, Chen Y, Dettin L, Pera RA, Herr JC, Goldberg E, Dym M. Generation and in vitro differentiation of a spermatogonial cell line. *Science* 2002; 297: 392–5.
28. Izadyar F, den Ouden K, Creemers LB, Posthuma G, Parvinen M, de Rooij DG. Proliferation and differentiation of bovine type A spermatogonia during long-term culture. *Biol Reprod* 2003; 68: 272–81.
29. Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, et al. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod* 2003; 69: 612–6.
30. Yoshida S, Sukeno M, Nabeshima Y. A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. *Science* 2007; 317: 1722–6.
31. Hofmann MC, Narisawa S, Hess RA, Millán JL. Immortalization of germ cells and somatic testicular cells using the SV40 large T antigen. *Exp Cell Res* 1992; 201: 41735.
32. Lee JH, Gye MC, Choi KW, Hong JY, Lee YB, Park DW, Lee SJ, Min CK. In vitro differentiation of germ cells from nonobstructive azoospermic patients using three-dimensional culture in a collagen gel matrix. *Fertil Steril* 2007; 87: 824–33.
33. Lee JH, Kim HJ, Kim H, Lee SJ, Gye MC. In vitro spermatogenesis by three-dimensional culture of rat testicular cells in collagen gel matrix. *Biomaterials* 2006; 27: 2845–53.
34. Chu C, Schmidt JJ, Carnes K, Zhang Z, Kong HJ, Hofmann MC. Three-dimensional synthetic niche components to control germ cell proliferation. *Tissue Eng Part A* 2008.
35. Stukenborg JB, Schlatt S, Simoni S, Yeung CH, Abu Elhija M, Luetjens CM, Huleihel M, Wistuba J. New horizons for in vitro spermatogenesis? An update on novel three-dimensional culture systems as tools for meiotic and postmeiotic differentiation of testicular germ cells. *Mol Hum Reprod* 2009; 15: 521–9.
36. Parent-Massin D. Relevance of clonogenic assays in hematotoxicology. *Cell Biol Toxicol* 2001; 17: 87–94.
37. Perrad M, Hue D, Staub C, Vern YL, Kerboeuf D, Durand P. Development of the meiotic step in testes of pubertal rats comparison between the in vivo situation and under in vitro conditions. *Mol Reprod Dev* 2003; 65: 86–95.
38. Print CG, Loveland KL. Germ cell suicide: New insights into apoptosis during spermatogenesis. *Bioessays* 2000; 22: 423–30.
39. Vigier M, Weiss M, Perrad M, Godet M, Durand P. The effects of FSH and of testosterone on the completion of meiosis and the very early steps of spermatogenesis of the rat in vitro study. *J Mol Endocrinol* 2004; 33: 729–42.
40. Gnassi L, Fabbri A, Spera G. Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis an integrated system with hormones and local environment. *Endocr Rev* 1997; 18: 541–609.
41. Tesarik J, Greco E, Mendoza C. Assisted reproduction with in vitro cultured testicular spermatozoa in cases of severe germ cell apoptosis a pilot study. *Hum Reprod* 2001; 16: 2640–5.
42. Grataroli R, Vindrieux D, Selva J, Felsenheld C, Ruffion A, Decaussin M, Benahmed M. Characterization of tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand and its receptors in the adult human testis. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 123–8.

## 6<sup>th</sup> European Congress of Andrology

29. September–1. October 2010, Athens, Greece

Website: [www.andrology2010.com](http://www.andrology2010.com)

**Contact:** The mastermind group

Astronauton Str, 15125, Amarousion, Greece

Tel: +30 210 6827405 • Fax: +30 210 6827409 • E-Mail: [info@tmg.gr](mailto:info@tmg.gr)

# Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere Rubrik

## [Medizintechnik-Produkte](#)



Neues CRTD Implantat  
Intica 7 HF-T QP von Biotronik



Artis pheno  
Siemens Healthcare Diagnostics GmbH



Philips Azurion:  
Innovative Bildgebungslösung

Aspirator 3  
Labotect GmbH



InControl 1050  
Labotect GmbH

## e-Journal-Abo

Beziehen Sie die elektronischen Ausgaben dieser Zeitschrift hier.

Die Lieferung umfasst 4–5 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Unsere e-Journale stehen als PDF-Datei zur Verfügung und sind auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

## [Bestellung e-Journal-Abo](#)

### Haftungsausschluss

Die in unseren Webseiten publizierten Informationen richten sich **ausschließlich an geprüfte und autorisierte medizinische Berufsgruppen** und entbinden nicht von der ärztlichen Sorgfaltspflicht sowie von einer ausführlichen Patientenaufklärung über therapeutische Optionen und deren Wirkungen bzw. Nebenwirkungen. Die entsprechenden Angaben werden von den Autoren mit der größten Sorgfalt recherchiert und zusammengestellt. Die angegebenen Dosierungen sind im Einzelfall anhand der Fachinformationen zu überprüfen. Weder die Autoren, noch die tragenden Gesellschaften noch der Verlag übernehmen irgendwelche Haftungsansprüche.

Bitte beachten Sie auch diese Seiten:

[Impressum](#)

[Disclaimers & Copyright](#)

[Datenschutzerklärung](#)