

Journal für

Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

– Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology –

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



**22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für
Andrologie e. V. - 29.-31. Oktober 2010, Hamburg**

(Abstracts)

J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2010; 7 (5), 436-450

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

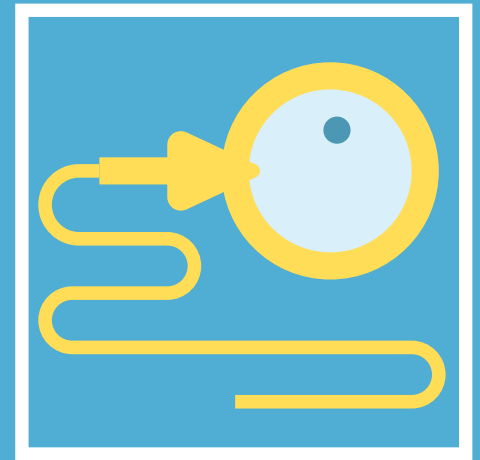
Indexed in EMBASE/Excerpta Medica/Scopus

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

22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Andrologie e. V.

29.–31. 10. 2010, Hamburg

Abstracts*

■ Andrologische Klinik

01

Sonographie des Skrotums: Hodenvolumetrie, Nebenhodengröße und Peak-Flow-Messung der A. testicularis bei Gesunden

A. Pilatz, E. Köhler, F. Wagenlehner, W. Weidner
Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie,
Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen

Fragestellung Es existieren viele sonographische Studien zum akuten Skrotum des Erwachsenen und vereinzelte Untersuchungen auch zu Veränderungen von Hoden und Nebenhoden bei infertilen Männern. Diese sind überwiegend auf Hodenvolumina, den Nachweise von Varikozelen und den Ausschluss von testikulären Veränderungen bei Verdacht auf Hodenkarzinom fokussiert. Systemische Untersuchungen von Nebenhoden und testikulärer Perfusion bei gesunden Männern fehlen.

Methoden Seit 03/2009 wurden 194 gesunde adulte Männer skrotal sonographisch und duplex-sonographisch untersucht, die weder einen pathologischen Skrotalbefund aufwiesen, in der Vorgeschichte nicht skrotal operiert waren, keine Harnwegsinfektion aufwiesen und keine Katheträger waren. Es erfolgte eine beidseitige testikuläre Volumetrie, die Größenmessung des Nebenhodens in der Sagittalebene und eine Peak-Flow-Messung der A. testicularis.

Ergebnisse 194 Patienten (Mittleres Alter: 49,2 Jahre, Altersspanne: 18–87 Jahre) wurden rekrutiert. Die mittleren Hodenvolumina lagen rechts bei 14,6 (4,8–28,0) ml und links bei 13,5 (3,9–25,7) ml ($p < 0,001$). In der Sagittalebene hatte der Nebenhodenkopf rechts eine mittlere Höhe von 11,8 (6,0–22,4) mm und eine Breite von 7,7 (3,9–14,9) mm, der Nebenhodenkopf links eine mittlere Höhe von 11,3 (5,3–18,2) mm und eine Breite von 7,7 (3,2–18,6) mm. Nebenhodenschwanz und -körper waren niemals darstellbar. Der mittlere Peak-Flow in der A. testicularis rechts betrug 8,9 (4,7–19,2) cm

sec und links 8,7 (3,5–17,6) cm/sec. Die Hodengröße korrelierte positiv mit dem Peak-Flow der A. testicularis ($r = 0,232$; $p < 0,001$). Mit steigendem Alter nahm die Hodengröße signifikant ab ($p < 0,05$).

Schlussfolgerungen Die Hodenvolumina bei Gesunden sind links signifikant kleiner als rechts. Die Abnahme der Hodengröße mit dem Alter ist statistisch signifikant, jedoch klinisch wenig relevant. Bei gesunden Kontrollen kann nur der Nebenhodenkopf dargestellt werden. Die ermittelten Normwerte des Peak-Flow in der A. testicularis können eine Hilfe bei der Diagnostik des akuten Skrotums sein (Abb. 1).

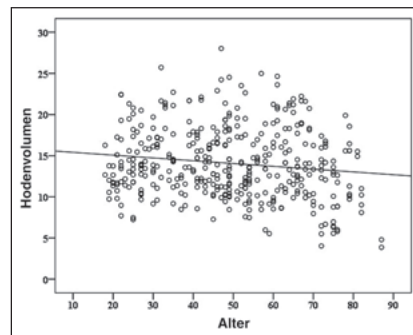


Abbildung 1: A. Pilatz et al. [1]. Hodenvolumen in Abhängigkeit vom Lebensalter

02

Häufigkeit urologischer Vorerkrankungen und -operationen bei Patienten mit Gynäkomastie – eine Untersuchung an 863 jungen Erwachsenen

A. Martinschek¹, B. Evers², C. Sparwasser¹
¹Urologie; ²Chirurgie, Bundeswehrkrankenhaus Ulm

Einleitung Die abnorme Größenzunahme der männlichen Brust tritt im jungen Erwachsenenalter in bis zu 65 %, zumeist passager, auf. Insbesondere ist bei unilateralem Wachstum, schnellem Wachstum und Sekretion ein Malignom auszuschließen, allerdings erreicht die Gynäkomastie auch aufgrund des gestiegenen kosmetisch-ästhetischen Anspruches klinische Relevanz.

Material und Methoden Im Rahmen eines Zeitraums von 2 Jahren wurden 863 Rekruten bezüglich der Brustdrüsengröße untersucht. Diese wurde palpatorisch bei kontrahiertem M. pectoralis bestimmt. Anhand ei-

nes Fragebogens wurden Informationen zu Beschwerden und Vorgeschichte der Probanden erhoben.

Ergebnisse In einem Kollektiv von 863 Probanden mit einem durchschnittlichen Alter von 20,3 (17–27) Jahren wiesen 409 (47,4 %) eine Gynäkomastie, definiert als Brustdrüsendurchmesser von > 2 cm, auf. Die beiden Gruppen unterschieden sich signifikant im Bezug auf das mittlere Körpergewicht (70,5 vs. 82,9 kg), Gewichtsschwankungen (5,3 % vs. 18,8 %) und Diäten (2,0 % vs. 9,3 %) während der Pubertät.

Keine Unterschiede zeigten sich in beiden Gruppen bezüglich des Alkoholkonsums, Drogen- oder Anabolika mißbrauch.

Urologische Diagnosen und Operationen wurden in 6,6 % bzw. 6,9 % (Gynäkomastie) angegeben. Hodenhochstand (4,6 vs. 5,1 %), Varikozelen (0,9 vs. 0,5 %), Entzündungen der Hoden und Nebenhoden (0,4 vs. 1 %), Hodentorsionen (0,4 vs. 0,3 %), Hydrozelen (0,2 vs. 0 %) oder Leistenhernienoperationen (4,0 vs. 2,9 %) kamen in beiden Gruppen gleich häufig vor.

Somatische Beschwerden wurden von 84 Patienten, psychisch-kosmetische Beschwerden von 57 Probanden angegeben. Vermeidung von Schwimmbadbesuchen war in der Gruppe von Patienten mit Gynäkomastie in 16,4 % der Fälle zu verzeichnen.

Diskussion Die Häufigkeit der Gynäkomastie bei jungen Erwachsenen ist mit 47,4 % ein häufiges Krankheitsbild. Urologische Erkrankungen und Voroperationen kommen in beiden Gruppen gleich häufig vor und stellen somit keinen diagnostischen Faktor dar.

03

Die antegrade Sklerosierung nach Tauber als Behandlung der idiopathischen Varikozele im Rahmen einer klinischen Qualitätssicherung

A. Martinschek, S. Sinagowitz, C. Sparwasser
Urologie, Bundeswehrkrankenhaus Ulm

Fragestellung Die antegrade Sklerosierung nach Tauber stellt ein Routineverfahren zur operativen Sanierung einer Varikozele dar. Anhand einiger Daten der in den Jahren 1999–2005 durchgeführten Sklerosierungen sollten die erzielten Ergebnisse bewertet und mit den Ergebnissen in der Literatur verglichen werden. Die Methode soll auf eine mög-

* Begutachtet und zusammengestellt vom Tagungspräsidenten, Prof. Dr. W. Schulze, Hamburg.

Ein alphabetisches Verzeichnis der Erstautoren finden Sie auf Seite 450.

liche „learning curve“ untersucht werden. Des Weiteren wurde nach einer möglichen Beziehung zwischen dem Grad der Varikozele und dem Körpergewicht, der Körpergröße, der Verbesserung des Spermioграмms sowie intraoperativen Komplikationen gesucht.

Methodik Es erfolgte eine retrospektive Auswertung der Patientenakten von Januar 1999 bis April 2005 (n = 201) bezüglich der oben genannten Fragestellung. In 58,2 % der Fälle lag eine Varikozele Grad III, in 40,8 % Grad II vor. Die statistische Auswertung erfolgte deskriptiv.

Ergebnisse Die Größen- und Gewichtsverteilung entspricht einer linksverschobenen Normalverteilung (zwei Drittel der Patienten unter 76 kg). Die Vorstellung erfolgte in 55,2 % der Fälle ohne Beschwerden. 44,8 % beschrieben Symptome. Ein pathologisches Spermioграмm lag präoperativ in 92 % aller Fälle vor.

Etwa jeder 10. Eingriff kann nicht zu Ende geführt werden. Hierbei machen intraoperativ entdeckte Kontraindikationen (45 %, z. B. Abflusstyp II & IV) und technische Schwierigkeiten (55 %, z. B. frustrierte Venenpunktion) jeweils die Hälfte der Gründe aus. Die durchschnittliche Operationsdauer betrug 27 Min. (Range 16–80 Min.), meist (79,8 %) gelang der Eingriff nach Punktion einer Vene. Bei den ausgewerteten Operationen war in der Hälfte der Fälle eine „learning-curve“ (Rückgang der Operationsdauer) zu erkennen. Schwerwiegende postoperative Komplikationen (abakterielle Epididymitis/Hodenatrophie), kamen je einmalig (0,5 %) vor. 56 Patienten stellten sich zu einem Kontrollpermioграмm (2 Monate p. o.) vor. Es kam zu einer Verbesserung der Spermienkonzentration (65,5 %), der Gesamtmotilität (76,4 %), der progressiven Motilität (70,9 %) und der Morphologie (58,2 %). Eine Verbesserung in allen Kategorien erreichen 21,8 %.

Schlussfolgerung Die im Rahmen dieser Untersuchung erhobenen Daten entsprechen bezüglich Häufigkeit, Verteilung, Indikationen und Operationserfolg den Angaben in der Literatur. Das etwas geringere Gewicht der Patienten kann durch eine Selektion wehrdiensttauglicher Männer erklärt werden. Eine Verbesserung der Spermienqualität lässt sich in einem Großteil der Patienten erreichen, obgleich die Anzahl der nachuntersuchten Patienten gering erscheint.

Die Operation eignet sich als „Anfängeroperation“ aufgrund einer erkennbaren „learning-curve“. Die auszubildenden Ärzte werden aufgrund der Verletzlichkeit der feinen Gewebe- und Gefäßstrukturen schon früh zu sorgfältiger Präparation angehalten. Intra- und postoperativ kommt es insgesamt selten zu schwerwiegenden Komplikationen.

■ Ejakulat-Analyse

04

Prädiktiver Wert zweier Spermio-gramme bezüglich der Notwendigkeit einer testikulären Spermienextraktion (TESE) am Tag der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) bei schwerster Oligoasthenoteratospermie (OAT)

R. Bongers¹, V. Nordhoff, A. N. Schüring², M. Zitzmann¹, S. Kliesch¹

¹Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie;

²Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Münster

Fragestellung Für Männer mit schwerstem OAT-Syndrom besteht am Tag der Eizellentnahme für eine ICSI die Möglichkeit der TESE in Bereitschaft, um genügend geeignete Spermien zur Verfügung zu haben, einhergehend mit personellem und finanziellem Aufwand sowie emotionaler Belastung für die Patienten. Daher soll mit klinischen Daten (2 Spermioграмmen) vor dem Beginn einer ICSI-Behandlung die Indikation zur TESE überprüft werden, um unnötige TESE vor der ICSI und TESE-Bereitschaften am Tag der Eizellpunktion abzusichern.

Methoden 2004–2008 wurden retrospektiv von 91 TESE-Bereitschaften Therapie, Spermioграмme, Hormonparameter (FSH 15,3 ± 9,1 U/l), Hodenvolumen, Alter (Männer 35 ± 6, Frauen 32 ± 5 Jahre) und Embryoqualität ausgewertet. Es wurden Korrelation und prädiktiver Wert von 2 Spermioграмmen vor der Eizellentnahme und den Ejakulatwerten am ICSI-Tag sowie Bedeutung und Abhängigkeit von Spermienkonzentration und Motilität für Fertilisation und Schwangerschaftsraten (SS-Raten) untersucht.

Ergebnisse Spermienkonzentration und Motilität der Voruntersuchungen korrelieren mit dem Befund am ICSI-Tag (p = 0,003; p < 0,0001). Die Spermienkonzentration am ICSI-Tag korreliert mit der Anzahl fertilisierter Eizellen (p = 0,058). Bei einer Spermienkonzentration < 0,1 mill/ml (Gruppe 1, G1, n = 49) ist die Vorwärtsmotilität um 12 % geringer (p < 0,0001) als bei einer Spermienkonzentration zwischen 0,1–1 mill/ml (Gruppe 2, G2, n = 32). Die klinische SS-Rate bei G1 war mit 5/44 im Vergleich zu G2 mit 9/23 signifikant niedriger (p = 0,038). Nur 5 TESE (< 0,1 mill/ml) waren am ICSI-Tag nötig.

Schlussfolgerung Nach 2 Ejakulatproben kann die Notwendigkeit einer TESE vorhergesagt und die Therapieindikation gestellt werden: Solange ausreichend motile Spermien im Ejakulat vorhanden sind, besteht keine Indikation zur TESE(-Bereitschaft). Eine Spermienkonzentration < 0,1 mill/ml geht mit niedrigeren klinischen SS-Raten einher. Das Paar kann differenziert über Therapiemöglichkeiten und -chancen vor dem Tag der Eizellentnahme für eine ICSI aufgeklärt werden.

05

Die Entwicklung eines am humanen Ejakulat durchzuführenden einfachen molekularbiologischen Tests als Entscheidungskriterium für eine erfolgreiche IVF-Behandlung

H. Cappallo-Obermann, A.-N. Spiess, W. Schulze
Molekulare Andrologie, Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf

Fragestellung Die Qualität des Spermio-gramms entscheidet darüber, ob eine ICSI- oder IVF-Therapie durchgeführt wird. Die Fertilisationsrate nach IVF-Behandlung liegt mit 51 % deutlich niedriger als nach ICSI-Behandlung (59,62 %, IVF-Register, 2007). Die Suche nach weiteren Entscheidungskriterien, beispielsweise auf molekularer Ebene, soll die Chance auf eine erfolgreiche Therapie des unerwünschten Kinderwunsches erhöhen.

Unser Ziel ist es, im Ejakulat ein oder wenige Markergene für eine erfolgreiche IVF-Behandlung zu finden. Auf dieser Basis soll ein einfach durchzuführender kostengünstiger molekularbiologischer Test als zusätzliche Entscheidungshilfe für das Routinelabor entwickelt werden.

Diese Markergene sollen durch eine globale Genexpressionsprofilanalyse von Zellpopulationen von Ejakulaten gefunden werden.

Methoden RNA wurde aus Pellets von gesamten Ejakulaten mit dem RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen) gewonnen. Kontaminierende genomische DNA wurde dabei über DNA-bindende Säulen abgetrennt. Microarrays (CodeLink Human Whole Genome Bioarray) wurden mit amplifizierter RNA hybridisiert. Genexpressionsprofile wurden mit der TIGR Software ausgewertet.

Ergebnisse 6 Ejakulate mit unterschiedlichen Pathologien sowie unterschiedlichem Anteil und Zusammensetzung an Rundzellen wurden untersucht. In der dreidimensionalen Darstellung einer „Principal Component Analyse“ (PCA) aller Proben zeigte sich ein heterogenes Genexpressionsmuster der Ejakulate im Vergleich zum homogenen Genexpressionsmuster der 3 Hodenbiopsien mit kompletter Spermatogenese (Johnsen-Score 10). Die Ejakulate trennten sich an der ersten und zweiten Hauptachse nach ihrem Anteil an Rundzellen auf, was für einen erheblichen Einfluss der Rundzellen auf die Varianz in der Genexpression spricht. Die Gene, die in Ejakulaten mit geringem bzw. hohem Anteil an Rundzellen am höchsten exprimiert waren, wurden einer Datenbankanalyse (DAVID6.7) unterzogen. In Ejakulaten mit wenigen Rundzellen waren Spermatogenese-Gene überrepräsentiert, während in Ejakulaten mit hohem Anteil an Rundzellen Gene, die den funktionellen Gruppen „Ribosomen“ und „Translation zugeordnet werden, überrepräsentiert waren.

Schlussfolgerung Sowohl Anteil als auch Zusammensetzung an Rundzellen haben ei-

nen großen Einfluss auf die Genexpressionsprofile von Ejakulaten. Wir weiten unsere Analysen auf eine sehr große Anzahl (> 35) von Ejakulaten aus der reproduktionsmedizinischen Praxis aus, um vor dem Hintergrund des durch die Rundzellen verursachten Rauschens in der Genexpression stabile Gene identifizieren zu können, die Marker-gene für den Ferilisierungserfolg in der IVF-Behandlung darstellen und die Grundlage für die Entwicklung eines am Originalejakulat durchzuführenden einfachen molekularbiologischen Test dienen sollen.

■ Ernährung, körperliche Aktivität und Fertilität

06

Möglichkeiten und Grenzen der Beeinflussung im Rahmen der Adipositas therapie

S. Thomas, S. Grunewald, U. Paasch
EAA Zentrum Andrologie, Universität Leipzig

Fragestellung Die Prävalenz der Adipositas ist in den vergangenen 3 Jahrzehnten dramatisch angestiegen. Dies ist mit schwerwiegenden Folgeerkrankungen assoziiert, wobei neue Studien auf den negativen Einfluss der Adipositas auf die männliche Fertilität, möglicherweise durch vermehrten oxidativen Stress, eine Aktivierung der Apoptose-signal-kaskade und DNA-Fragmentationen vermittelt, hinweisen. Inwiefern eine schnelle Gewichtsreduktion durch verminderte Energiezufuhr hilfreich ist, ist derzeit nicht bekannt. Mit der Reduktion der Nahrungszufuhr besteht zudem die Gefahr der Unterversorgung mit wichtigen Nahrungsbestandteilen. Ziel der vorliegenden Metaanalyse war es zu klären, inwiefern eine gezielte Substitution der für die Spermatogenese als relevant eingestuften Spurenelemente, Enzyme und Vitamine eine begleitende Therapieoption bei gezielter Gewichtsreduktion ist.

Methoden Metaanalyse zum Effekt der Substitution von Zink, Carnitin, Folsäure, Selen, Vitamin C, Vitamin E, Coenzym Q10 und langkettigen Fettsäuren auf die Ejakulatqualität

Ergebnisse Durch eine orale Zinktherapie konnte die Spermienzahl erhöht und die Spermienmotilität bei nicht-adipösen verbessert werden, während die Gabe von Carnitin nur zur Steigerung der Spermienmotilität führte. Folsäure wird nach der Studienlage häufig mit der Zinksupplementierung kombiniert, sodass die Einzeleffekte kaum auszumachen sind. Die Gabe von 5-Formyltetrahydrofolat für 3 Monate zeigte jedoch eine Verbesserung der Spermienzahl und Motilität. Möglicherweise korreliert die Folatkonzentration im Seminalplasma von fertilen Männern invers mit dem DNA-Fragmentationsindex. In den wenigen, meist nicht kontrollierten Studien zu Selen wurden kontroverse Ergebnisse publiziert. Unter der

Supplementierung mit Vitamin C stieg die Spermienmotilität und die absolute Zahl normomorpher Spermatozoen, zudem korrelierte dessen Konzentration im Seminalplasma invers mit Spermien-DNA-Schäden. Die Einnahme von 300 mg Vitamin E pro Tag verbesserte die Spermienmotilität und reduzierte die Lipidperoxidation in kontrollierten Studien. Die Aufnahme von Coenzym Q10 wurde in einer placebokontrollierten doppelblinden randomisierten Studie überprüft und die Zunahme der Motilität gezeigt. Dagegen besitzen langkettige Fettsäuren keine positiven Wirkungen auf die Spermienqualität.

Schlussfolgerungen In Ejakulaten übergewichtiger bzw. adipöser Männer finden sich signifikant mehr Spermien mit aktivierter Apoptose-signal-kaskade und DNA-Fragmentationen. Die bisher publizierte Datenlage zur Beeinflussbarkeit dieser Effekte durch Gewichtsreduktion bzw. gezielte Substitution lässt den Schluss zu, dass eine Therapie mit Carnitin, Zink oder Coenzym Q10 eine Option bei Asthenozoospermie sein kann.

Weitere große kontrollierte randomisierte klinische Studien müssen durchgeführt werden, um offene Fragen nach der Menge und Dauer der Supplementierung einzelner Nahrungsergänzungsmittel zu klären und um deren Sicherheit und Wirkung genauer abschätzen zu können. Zum Verständnis des genauen Wirkmechanismus sind zudem Analysen nicht nur der klassischen Spermio-gramm-Parameter sondern auch subzellulärer Signalkaskaden notwendig.

■ Forensik

07

Das männliche Genitale aus forensischer Sicht – ein historischer Rückblick

K. Albrecht¹, D. Breitmeier², D. Schultheiss³

¹Klinik für Urologie, Medizinische Hochschule Hannover; ²Institut für Rechtsmedizin, Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz; ³Urologische Belegabteilung, Evangelisches Krankenhaus, Gießen

Fragestellung Zum Aufgabenspektrum der Gerichtsmedizin gehören die Untersuchung von Verletzungsmustern und deren forensische Bewertung im Rahmen von angeschuldigten Straf- bzw. Sittlichkeitsdelikten oder familienrechtlichen Fragen. Vor diesem Hintergrund wurde auch das männliche Genitale in vergangenen Jahrhunderten Gegenstand rechtskontroverser Diskussionen.

Methoden In der vorgestellten Präsentation wird ein historischer Rückblick über die Feststellung und Bewertung von forensisch wichtigen Befunden am männlichen Genitale gegeben und durch historische Fallbeispiele verdeutlicht.

Ergebnisse Der wesentliche Grundpfeiler einer frühen mediko-legalen Begutachtung des männlichen Genitalorgans findet sich in

den Ausführungen von Paolo Zacchia im Jahr 1652, u. a. mit seiner Unterscheidung zwischen einer Impotentia coeundi et generandi. Eine Verkrümmung des Penis wurde zu Beginn des 18. Jahrhunderts als Hinderungsgrund für eine Heirat angesehen, da eine geschlechtliche Vereinigung so vermutlich nicht erfolgen könne. In der weiterführenden Fachliteratur finden sich Abhandlungen über verschiedene genitale Verletzungsformen und ihre potenzielle Tödlichkeit. Unterschieden werden mussten hierbei u. a. selbstinduzierte Verletzungen, beispielsweise zur Erlangung einer Wehruntauglichkeit in den Weltkriegen des 20. Jahrhunderts. Berichte von Haftinsassen beschrieben beispielsweise Eigenmanipulationen in Form des urethralen Einbringens von zerstoßenen Senfkörnern und Tabak zur Provokation einer Urethritis. Zudem sollte ein Kontakt mit unterschiedlichen Substanzen (z. B. Stechapfel) venerische Krankheiten vortäuschen. Es folgen Veröffentlichungen über die Bewertung potenzieller Vaterschaften und deren Ausschluss bei einem missgebildeten Penis sowie die Darstellung unterschiedlicher Traumata infolge von autoerotischen Unfällen. Die Geschlechtsbestimmung eines nicht-identifizierbaren, faulnisveränderten Leichnams gestaltete sich vor der molekularbiologischen Ära unter bestimmten Umständen schwierig. Zur Identifikation eines männlichen Individuums wurde daher das Aufsuchen des sog. „Schneppfenkopfes“ (Colliculus seminalis) empfohlen.

Schlussfolgerungen Die Begutachtung einer potenziellen Zeugungs- und Begattungsfähigkeit sowie die Bewertung genitaler Verletzungen gehörten seit mehr als 100 Jahren zur Routinetätigkeit des Gerichtsarztes; ein Aufgabenspektrum, welches in der modernen Medizin den spezialisierten Fachabteilungen der Urologie bzw. Andrologie zuzuordnen ist.

■ Genetik in der Andrologie

08

Gibt es eine Korrelation der CAG-Repeatlänge und dem Spermato-genese-status? – Untersuchung der Zellpopulationen im menschlichen Hoden

D. Fietz¹, J. Geyer², S. Kliesch³, J. Gromoll, M. Bergmann¹

¹Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie; ²Institut für Veterinär-Pharmakologie und -Toxikologie, Justus-Liebig-Universität Gießen; ³Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Universitätsklinikum Münster

Fragestellung Der humane Androgenrezeptor (AR) ist ein liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor, der für die Funktion der Sertoli-Zellen und den Erhalt der Spermato-genese verantwortlich ist. Seine Transaktivierungsdomäne enthält eine repetitive Tri-nukleotidsequenz (CAG) mit 9–36 Repeats.

Lange Repeats resultieren in einer geringeren Testosteronsensitivität, die in Zusammenhang mit Infertilität gebracht wird (z. B. [1]) Unsere Untersuchungen sollen zeigen, inwieweit die Länge des CAG-Repeats mit dem histologisch definierten Status der Spermatogenese korreliert.

Methoden Untersuchung wurden Hodenbiopsien von 23 Patienten mit normo- bzw. hypergonadotroper Azoospermie und Androgeninsensitivitätssyndrom (18 von 23). Die CAG-Repeatlänge wurde mittels (RT-) PCR mit anschließender Fragmentlängenanalyse (Lymphozyten DNA) bzw. hochauflösender Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese (Hoden DNA und mRNA der AR exprimierenden Zellen nach Laser-assistierter Mikrodissektion der Keimtubuli und des Interstitiums) bestimmt. Ein Teil der Repeatlängen wurde mittels Sequenzierung bestätigt.

Ergebnisse Alle untersuchten CAG-Repeats befanden sich im physiologischen Bereich von 9–36 Repeats. Mit beiden Methoden ergaben sich Unterschiede in der Bestimmung der CAG-Repeatlänge innerhalb der untersuchten Fraktionen von bis zu 5 Repeats. Bei Patienten mit normaler Spermatogenese (nsp, n = 5) ergaben sich Werte von 17–28 CAGs, bei quantitativ reduzierter Spermatogenese (hyp, n = 5) 20–27 CAGs, bei einem Arrest der Spermatogenese auf der Stufe der primären Spermatozyten (sza, n = 4) 19–24 CAGs, bei einem Arrest der Spermatogenese auf der Stufe der Spermatozoen (sga, n = 5) 17–24 CAGs und bei Patienten mit einem Sertoli-cell-only Syndrom (SCO; n = 4) Werte von 19–24 CAGs. Es ergab sich keine Korrelation mit dem histologischen Befund.

Schlussfolgerung

- Unterschiede in der CAG-Repeatlänge innerhalb der verschiedenen Fraktionen sind bedingt durch Fehler der Polymerasen bei der reversen Transkription der mRNA und der Amplifikation der DNA bzw. cDNA [2].
- Der CAG-Wert der Lymphozyten-DNA repräsentiert den CAG-Wert der Hoden-DNA bzw. der mRNA der Androgenrezeptor exprimierenden Sertoli- und Leydig-Zellen, erlaubt jedoch keine Aussage über den Status der Spermatogenese bzw. von Spermatogenesedefekten.
- Weitere Untersuchungen an Biopsien von Patienten mit unterschiedlich langen Repeats bei histologisch gleichem Befund sollen klären, ob und wenn ja inwieweit ein Zusammenhang zwischen der Androgen- und Estrogenrezeptor-Expression und den Testosteron- und Estrogenwerten im Blut besteht.

Literatur:

1. Huhtaniemi IT, Pye SR, Limer KL et al. Increased Estrogen Rather Than Decreased Androgen Action Is Associated with Longer Androgen Receptor CAG Repeats. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 277–84.
2. Bettencourt C, Santos C, Montiel R, Kay T, Vasconcelos J, Maciel P, Lima M. The (CAG)_n tract of Machado-Joseph Disease gene (ATXN3): a comparison between DNA and mRNA in patients and controls. *Eur J Hum Genet* 2010; 18: 621–3.

09

Unterschiedliche mRNA-Expression von Chromatin-Remodelling-Faktoren in runden Spermatidenreifungsarresten verglichen mit normaler menschlicher Spermatogenese

U. Schagdarsurengin¹, C. Steilmann¹, M. Cavalcanti¹, M. Bergmann², S. Kliesch³, W. Weidner⁴, K. Steger⁴
¹Forschungslabor Urologie, Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie; ²Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und Embryologie, Justus-Liebig-Universität Gießen; ³Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Universitätsklinikum Münster; ⁴Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie, Justus-Liebig-Universität Gießen

Fragestellung Während der menschlichen Spermatogenese finden eine Chromatinkondensation und ein Histon-zu-Protamin-Austausch statt. Dieser Austausch wird durch azetylierte Histone und Chromatin-Remodelling-Faktoren unterstützt. Zum heutigen Zeitpunkt sind 10 Proteinfamilien von solchen Chromatin-Remodelling-Faktoren bekannt. In dieser Studie wurde untersucht, ob ein unterschiedliches Expressionsmuster von diesen Faktoren zwischen normaler Spermatogenese und rundem Spermatidenreifungsarrest existiert, und ob dies einen möglichen Grund für eine defekte Spermatogenese und idiopathische männliche Infertilität darstellen könnte.

Methoden Laser Capture Mikrodissektion wurde verwendet, um Tubuli seminiferi aus Hodenbiopsien mit normaler Spermatogenese und mit rundem Spermatidenreifungsarrest auszuschneiden. Die RNA wurde isoliert, cDNA synthetisiert und danach präamplifiziert. Anschließend wurden PCR-Arrays für Epigenetic Chromatin Remodelling Factors mit 84 Genen durchgeführt.

Ergebnisse Unter Verwendung von hierarchischer Cluster-Analyse wurden 3 Gen-Expressionscluster mit 6 Untergruppen identifiziert. Die Expressionsmuster reichten von wenigen hoch exprimierten Genen in runden Spermatidenreifungsarresten bis zu einer Vielzahl an Genen (74), die in normaler Spermatogenese höher exprimiert waren als in den Arresten. 22 Gene wiesen einen signifikanten Unterschied zwischen normaler Spermatogenese und runden Spermatidenreifungsarresten auf (ein Gen war hochreguliert und 21 Gene waren in den Arresten herunterreguliert).

Schlussfolgerungen Die signifikant unterschiedliche Expression von Chromatin-Remodelling-Faktoren zwischen normaler Spermatogenese und runden Spermatidenreifungsarresten könnte zu fehlerhaften epigenetischen Informationen führen. Abweichende Transkription während der Spermiomentwicklung könnte ein möglicher Grund für den Reifungsarrest in runden Spermatiden darstellen.

10

SOAT-Membrantransporter für sulfatierte Steroidhormone – Expression und zelluläre Lokalisation im humanen Hoden

B. Wapelhorst¹, O. Raabe¹, J. Geyer², B. Döring², S. Kliesch³, M. Bergmann¹

¹Institut für Veterinär-Anatomie; ²Institut für Veterinär-Pharmakologie, Justus-Liebig-Universität Gießen; ³Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Universitätsklinikum Münster

Fragestellung Der humane „sodium-dependent organic anion transporter“ (SOAT) wurde erstmals 2007 kloniert und beschrieben. Der SOAT (SLC10A6) ist funktionell ein hochspezifischer Transporter für sulfatierte Steroide, wie Estronsulfat (E1S), Pregnenolonsulfat (PREGS) und Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS). SOAT mRNA konnte in hohem Maße im menschlichen Hoden nachgewiesen werden [1].

Ziel dieser Arbeit ist es, die Expression des SOAT im humanen Hoden mit intakter und gestörter Spermatogenese auf zellulärer Ebene nachzuweisen.

Methoden

1. Zelluläre Lokalisation von SOAT mRNA im Hoden mittels In-situ-Hybridisierung und RT-PCR nach Laser-assistierter Mikrodissektion (LACP) sowie Proteinachweis durch Immunhistochemie und Western Blot.
2. Quantitative Expression bei normaler und gestörter Spermatogenese mit Hilfe von real-time PCR in Hodenhomogenat und nach LACP

Ergebnisse

1. Nachweis von SOAT mRNA im humanen Hodenhomogenat mittels Real-time PCR, mit einer 678-mal höheren Expression im Hoden als im ZNS, dem Gewebe mit der geringsten SOAT mRNA-Expression [1].
2. Nachweis von SOAT mRNA mittels RT-PCR im humanen Hodenhomogenat mit normaler Spermatogenese oder Sertoli-Cell-only-Syndrom.
3. Nach LACP, Nachweis von SOAT mRNA in Keimzellen und interstitiellen Zellen bei normaler Spermatogenese.
4. Mittels In-situ-Hybridisierung Nachweis von SOAT mRNA in murinen, kaninen und porzinen Spermatozoen und Spermatozyten
5. 2 SOAT-Antikörper, die gegen den C-Terminus des Proteins gerichtet sind und im Western Blot für das Protein auf der spezifischen Höhe von 42 kDa bei Hodenhomogenat bzw. an stabil transfizierten und permeabilisierten SOAT-HEK-Zellen erkennen, zeigen Detektionsmuster in Sertoli-Zellen, Keimzellen und im Gefäßendothel.

Schlussfolgerungen Sowohl die Ergebnisse der RT-PCR am humanen Hoden als auch der In-situ-Hybridisierung bei verschiedenen Haussäugetieren lassen die Vermutung zu, dass der SOAT in den Keimzellen exprimiert wird.

In isolierten Tubuli mit Sertoli-Cell-only-Syndrom konnte mittels RT-PCR keine SOAT-Expression nachgewiesen werden.

Bei den positiven Ergebnissen von interstitiellen Zellen in der RT-PCR kann vermutet werden, dass diese auch durch das im Interstitium liegende Gefäßendothel bewirkt wird. Dies deckt sich mit der Markierung des Gefäßendothels durch beide Antikörper.

Mittels Immunhistochemie alleine ist keine Aussage der zellulären Expression des SOAT zu treffen. Weitergehende Untersuchungen mit Hilfe der RT-PCR nach LACP und In-situ-Hybridisierung werden folgen.

DFG BE 1016/10-1

Literatur:

1. Geyer J, Döring B, Meerkamp K, Ugele B, Bakhiya N, Fernandes CF, Godoy JR, Glatt HR, Petzinger E. Cloning and Functional Characterization of Human Sodium-dependent Organic Anion Transporter (SLC10A6). *J Biol Chem* 2007; 282: 19728–41.

11

Copy Number Variants als neue genetische Ursache von Spermatogenesestörungen und männlicher Infertilität

F. Tüttelmann¹, S. Kliesch², J. Gromoll³, M. Simon², B. Dworniczak¹, P. Wieacker¹, A. Röpke¹

¹Institut für Humangenetik; ²Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Universitätsklinikum Münster; ³Department of Medicine, Endocrinology, Metabolism and Geriatrics, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italien

Fragestellung Copy Number Variants (CNVs) wurden vor Kurzem als neue genomische Veränderungen beschrieben und mittlerweile mit Krankheiten assoziiert. Ob CNVs eine Rolle bei der Entstehung der männlichen Infertilität spielen, wurde bislang nicht untersucht.

Methoden DNA von Männern mit idiopathischer Infertilität (bei denen bekannte Ursachen ausgeschlossen wurden) wurde durch Array CGH mit dem 244A oder 440K (höhere Auflösung) Array Set (Agilent Technologies) untersucht. Bislang wurden 100 Männer mit Normozoospermie (Kontrollen), 85 Patienten mit stark eingeschränkter Spermienzahl (< 5 Mill./ml, OAT) und 37 mit Sertoli-Cell-Only- (SCO-) Syndrom untersucht.

Ergebnisse Während die Gesamtzahl an CNVs zwischen allen Gruppen vergleichbar war, hatten die Patienten mit OAT mehr kleine Deletionen, die mit dem 440K-Array nachgewiesen wurden, als die Kontrollen (11,9 ± 0,6 vs. 9,4 ± 0,6; $p < 0,01$). Außerdem korrelierte die Anzahl der Deletionen negativ mit der Gesamtspermienzahl ($r = -0,22$; $p < 0,05$). Bei den SCO-Patienten waren CNVs auf dem X- und Y-Chromosom im Vergleich mit den anderen Gruppen überrepräsentiert. 2 bzw. 3 CNVs, die nicht bei den Kontrollen gefunden wurden, fanden sich mehrfach bei OAT- bzw. SCO-Patienten. Diese, wie auch weitere CNVs, enthalten

Gene, die für die Spermatogenese relevant sind.

Schlussfolgerung Unsere Daten zeigen erstmals, dass CNVs eine Rolle bei der Entstehung der männlichen Infertilität spielen. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um zu klären, ob einzelne CNVs oder Kombinationen/Muster ursächlich für die Spermatogenesestörung sind.

Unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, Forschergruppe Germ Cell Potential (FOR 1041/TU 298/1-1).

12

Overexpression of Mouse Pxt1 Induces Cell Death

P. Grzmil¹, K. Kaczmarek¹, A. Meinhardt², S. Thoms³, W. Engel¹

¹Institute of Human Genetics, University of Göttingen;

²Department of Anatomy and Cell Biology, Justus-Liebig-University Gießen; ³Department of Pediatrics and Pediatric Neurology, University of Göttingen

Peroxisomal testis specific 1 (Pxt1) is a male germ cell-specific expressed gene which encodes for a peroxisomal protein. The Pxt1 expression starts at the spermatocyte stage of spermatogenesis. To analyze the function of mouse Pxt1 and the consequence of overexpression of this protein in the testis, we have generated transgenic lines with c-MYC-PXT1 fusion protein expressed under the control of hPGK2 promoter. Because transgenic male founders were infertile, female founders were generated to establish transgenic lines. The expression of c-MYC-PXT1 fusion protein was detected first in primary spermatocytes. Histopathological analysis revealed that the infertility of transgenic males is due to increased apoptotic events in germ cells, mainly spermatocytes, and also degeneration of germ cell epithelium. In older animals, Sertoli cell only-like phenotype was observed. These results pointed us to analyse the pro-apoptotic character of PXT1. At the N-terminus of PXT1 we could identify a pro-apoptotic BH3-like domain. Overexpression of the EGFP-PXT1 fusion protein in different cell lines resulted also in apoptosis. These observations raised the question if the observed increased apoptosis is a result of a pro-apoptotic character of PXT1 protein or it is rather the consequence of a secondary effect of the overexpression of this peroxisomal protein which could bind large amount of PEX5P and thus affect the transport of other peroxisomal proteins. It is well known that disrupted transport of protein to peroxisomes can result in cell death. Here we present data supporting the hypothesis that PXT1 acts as a pro-apoptotic factor. This is so far the first evidence that a peroxisomal protein is directly involved in apoptosis.

13

Mouse Ccdc33 Encodes a Peroxisomal Protein which interacts with Pxt1, Germ Cell Specific Peroxisomal Protein 1

K. Wieczerzak, K. Kaczmarek, R. Gebhardt, M. Studencka, J. Mänz, C. Hempelmann, W. Engel, P. Grzmil
Institute of Human Genetics, University of Göttingen

Peroxisomes are ubiquitously present in eukaryotic cells, however, until recently their existence in male germ cells was questionable. We have characterised the first germ cell specific gene encoding for a peroxisomal protein, namely Pxt1. The CCDC33 protein was reported as cancer/testis (CT) antigen. Recently, we found that mouse Ccdc33 is predominantly expressed in the testis and the putative protein encoded by this gene contains two peroxisomal targeting signals type 2. In the testis the expression of Ccdc33 is restricted to germ cells. We have discovered that this gene undergoes alternative splicing to produce at least four different transcripts. Using CCDC33-dsRED fusion protein and site directed mutagenesis technique we could demonstrate that the second PTS2 sequence is functional and responsible for the targeting of CCDC33 to peroxisomes. Similar to Pxt1, the expression of Ccdc33 starts at the primary spermatocyte stage of spermatogenesis suggesting that these two proteins could interact. Using yeast-two-hybrid system we have demonstrated the interaction of mouse PXT1 and CCDC33. Next, we have used mammalian cells to verify this interaction. In HeLa and NIH3T3 cells CCDC33-dsRED fusion protein co-localized with EGFP-PXT1 fusion protein. Moreover bi-fluorescence complementation assay confirmed that both proteins interact. In the cytoplasm of transiently transfected cells both interacting proteins demonstrated punctual pattern, which is characteristic for peroxisomes. Next, we have identified PXT1 and CCDC33 domains responsible for the interaction. Interestingly, in the PXT1 protein only four amino acids build a functional core of the interacting domain. To proof this finding we have introduced the mutation into this sequence and the analysis of the subcellular distribution of both proteins when the interaction is disrupted is now under investigation.

14

Expression der Prostanoidrezeptoren im humanen Hoden bei normaler und gestörter Spermatogenese

A. Pöschke, M. Bergmann
Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie, Justus-Liebig-Universität Gießen

Fragestellung Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, dass Cyclooxygenasen und Prostanoiden als Produkte des Cyclooxygenaseweges an der Pathogenese von Spermatogenesedefekten beteiligt sein kön-

nen. Besonders die über die Cyclooxygenase-2 (COX2) gebildeten Prostaglandine scheinen hier involviert zu sein. Über die Existenz und die Lokalisation der Prostaglandinrezeptoren (PG-Rezeptoren) im humanen Hoden unter normalen physiologischen Bedingungen, aber auch im Zusammenhang mit gestörter Spermatogenese gibt es wenige Literaturangaben. Untersuchungen im Tierrmodell deuten außerdem darauf hin, dass eine erhöhte COX2-Expression die Steroidsynthese beeinflussen kann und zu einer Inhibition der Testosteronproduktion führt. Beim Hamster konnte eine Beteiligung des FP-Rezeptors an dieser Wirkkaskade festgestellt werden, aber auch eine Beteiligung der Thromboxan-Synthase (bei der Maus) wird postuliert. Während es wenige Untersuchungen zur Expression der COX1 und COX2 und des PGF_{2α}-sensitiven FP und PGD₂-sensitiven DP-Rezeptors im humanen Hoden gibt, so ist uns keine Veröffentlichung zur Existenz und des Expressionsmusters der Prostaglandin-E₂ (PGE₂)-sensitiven EP-Rezeptoren (EP1-4) und des Thromboxan-sensitiven TP-Rezeptors bekannt. Unsere Untersuchungen sollen die Frage klären, welche Prostanoidrezeptoren im humanen Hoden vorhanden sind und wo sie lokalisiert sind, um die Bedeutung der EP-Rezeptoren und des TP-Rezeptors für die normale und gestörte Spermatogenese zu klären.

Methoden In humanen Hodengewebepräparaten mit normaler und gestörter Spermatogenese soll die Genexpression der PG-Rezeptoren mittels PCR und die Proteinexpression immunhistochemisch untersucht werden. Zusätzlich soll durch Laser-assistierte Mikrodisektion an Paraffinschnitten ermittelt werden, ob die PG-Rezeptoren eine tubuläre oder interstitielle Lokalisation aufweisen.

Ergebnisse Erste Ergebnisse der PCR aus Hodenhomogenat zeigen, dass alle 4 EP-Rezeptoren sowie der TP-Rezeptor im humanen Hoden mit normaler Spermatogenese exprimiert werden. Auch in Hodenhomogenaten von Patienten mit Spermatozyten- bzw. Spermidenarrest oder beiden Defekten gleichzeitig, sowie in einer Probe eines Patienten mit Hodentumor (Seminom) wurden alle EP-Rezeptoren und der TP-Rezeptor detektiert. Ebenfalls in allen Proben wurde eine Expression von COX1 und COX2 sowie der FP-, DP- und TP-Rezeptoren festgestellt.

Schlussfolgerung Da wir in unseren Versuchen alle PG-Rezeptoren einschließlich der 4 EP-Rezeptoren und des TP-Rezeptors im humanen Hoden nachweisen konnten, ist eine Beteiligung dieser Rezeptoren z.B. an der Regulation der Steroidsynthese über COX2 möglich. Eine detaillierte Analyse der Lokalisation und Expression der PG-Rezeptoren könnte zu einem besseren Verständnis der normalen und gestörten Spermatogenese des Menschen beitragen.

15

Expression of H3K9ac in Male Germ Cells and its Distribution Pattern in the Genome of Human Sperm

A. Paradowska¹, C. Steilmann¹, M. Bartkuhn², H.-C. Schuppe¹, M. Bergmann³, S. Kliescht⁴, W. Weidner¹, K. Steger¹

¹Department of Urology, Pediatric Urology and Andrology; ²Institute for Genetics; ³Department of Veterinary Anatomy, Histology and Embryology, Justus-Liebig University of Gießen; ⁴Department of Andrology, Centre of Reproductive Medicine and Andrology, University of Münster

Introduction During spermatogenesis, approximately 85 % histones are replaced by protamines. It has been proposed that remaining histones might carry essential marks for the establishment of epigenetic information in the offspring and epigenetic abnormalities in the male genome may cause post fertilisation errors. This study aimed to analyze the expression pattern of acetylated histone H3 at lysine 9 during spermatogenesis of fertile and infertile men and the binding pattern to selected genes in semen samples.

Methods Testicular biopsies with normal and impaired spermatogenesis, as well as semen samples from fertile and infertile men were used for immunohistochemistry with an anti-H3K9ac antibody. Chromatin immunoprecipitation was performed with ejaculated sperm DNA. HeLa cells and prostate tissue served as controls. The binding of selected genes was evaluated by semiquantitative and real-time PCR.

Results Immunohistochemistry of H3K9ac demonstrated positive signals in spermatogonia (types A/B), preleptotene, leptotene, zygotene and early pachytene spermatocytes, elongating spermatids (stages III-IV) and ejaculated sperm of fertile and infertile men. H3K9ac was associated with gene promoters (CRAT, G6PD and MCF2L), exons (SOX2, GAPDH, STK11IP, FLNA, PLXNA3, SH3GLB2, CTSD) and intergenic regions (TH) in fertile men and exhibited shifts of the distribution pattern in HeLa cells, prostate tissue and ejaculated sperm of infertile men.

Conclusions H3K9ac is present in male germ cells and might play a role during development of sperm. H3K9ac is associated with specific regions of the sperm genome defining an epigenetic code that could be transmitted to the embryo and might influence gene expression directly after fertilization.

■ Hodentumore

16

Wie bewerten Hodentumorpatienten rückblickend ihre Entscheidung zur Implantation einer Hodenprothese bzw. zum leerbleibenden Skrotalfach?

S. Schmidt, C. Ruf, W. Wagner
Urologie, Bundeswehrkrankenhaus, Hamburg

Fragestellung Wie beurteilen Hodentumorpatienten retrospektiv ihre Entscheidung zur Hodenprotheseneinlage bzw. zum leerbleibenden Skrotalfach?

Methodik 195 Hodentumorpatienten in der Nachsorge wurden anhand eines strukturierter Fragebogens bezüglich ihrer Entscheidung zur Implantation einer Hodenprothese bzw. zum Verzicht auf die Hodenprothese rückblickend befragt. Gefragt wurde nach der Zufriedenheit mit oder ohne Prothese, ob die Entscheidung rückblickend ein zweites Mal getroffen werden würde und ob Probleme mit der Hodenprothese auftraten.

Ergebnisse Das Durchschnittsalter aller Pat. zum Zeitpunkt der Befragung lag bei 35,34 Jahren. Pat. mit (n = 71) Prothese waren durchschnittlich 33,63 J. (21–53), ohne (n = 124) Prothese 36,29 J. (23–52) alt. Die Nachsorgedauer war durchschnittlich 5,71 Jahre (68,55 Monate) und unterschied sich in beiden Gruppen nicht signifikant (69,46 vs. 68,05 Monate Nachsorgedauer). 79 % der Prothesenträger (56 von 71) gegenüber 98 % (121 von 124) der Pat. ohne Prothese waren zufrieden mit ihrer Entscheidung. Bei ihrer Entscheidung sicher bleiben würden 80 % (57 von 71) der Prothesenträger und 75 % (96 von 124) der ohne Prothese. Ihre Entscheidung wahrscheinlich jetzt anders treffen würden 10 % (7 von 71) der Prothesenträger und 9 % (11 von 124) der ohne Prothese. Permanent mehr oder weniger unzufrieden sind 18 % der (13 von 71) der mit Prothese und nur 2 % (3 von 124) der ohne Prothese. Gründe: 6× zu harte Konsistenz der Prothese, 3× subjektiv zu groß, 1× störend beim Sport, 3× unbekannter Grund. Der Frage ohne Prothese würde mir etwas fehlen stimmten 40 von 71 (56 %) zu; allerdings schätzen nur 4 von 124 (3 %) der Pat. mit leerem Skrotalfach mit Prothese wahrscheinlich zufriedener zu sein.

Schlussfolgerung Männer ohne Hodenprothese sind mit der Situation des leeren Skrotalfaches insgesamt zufriedener als Prothesenträger. Allerdings sind die Mehrzahl der Männer in beiden Gruppen nämlich mindestens 80 % sowohl mit als auch ohne Prothese mit ihrer damalig getroffenen Entscheidung zufrieden. Die präoperative Aufklärung vor Semikastration sollte dem Patienten entsprechende Informationen für seine Entscheidungsfindung zukommen lassen.

17

Analyse der Seminom-Zelllinie TCam-2 im Xenotransplantations-Modell

B. Westernströer¹, D. Nettersheim², J. Ehmcke¹, H. Schorle², S. Schlatt¹

¹Institut für Reproduktions- und Regenerationsbiologie, Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie (CeRA), Universitätsklinikum Münster; ²Abteilung Entwicklungspathologie, Institut für Pathologie, Uniklinikum Bonn

Fragestellung Das Carcinoma-in-situ (CIS) des Hodens gilt als die Vorläuferläsion der testikulären Keimzelltumore. Die CIS-Zellen repräsentieren demnach neoplastisch entartete primordiale Keimzellen (embryonale Keimzellen). 1992 wurde erstmals in vitro eine humane Seminom-Zelllinie (TCam-2) generiert, die auch auf molekularer Ebene vergleichbare Eigenschaften primordialis Keimzellen zeigt. In einem ektopischen Xenografting-Experiment durchliefen TCam-2-Zellen eine Transition zu einem embryonalen Karzinom. Hier soll nun geklärt werden, ob TCam-2-Zellen nach intratubulärer Transplantation in den Hoden immundefizienter Nacktmäuse die Fähigkeit besitzen sich wie ein Seminom im Humanhoden zu verhalten.

Methoden In den linken Hoden von 11 Busulfan behandelten Nacktmäusen wurden jeweils 10⁵ TCam-2 Zellen transplantiert. Als Kontrolle wurden 2102EP embryonale Karzinom-Zellen in die Hoden von 6 weiteren Nacktmäusen transplantiert. Die kontralateralen Hoden dienten dabei als zusätzliche Kontrollen. Bei allen 18 Tieren wurde die Transplantation durch die Ductuli efferentes des Hodens vollzogen. Vier und 12 Wochen nach Transplantation wurden die Hoden und Tumoren präpariert. Die Expression spezifischer Marker für testikuläre Keimzelltumore wurde mittels Immunohistochemie und reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) untersucht.

Ergebnisse TCam-2-Zellen zeigen innerhalb von 3 Monaten nach Transplantation in den Maushoden die Fähigkeit zur Tumorentwicklung. Die injizierten TCam-2-Zellen sind im prä-invasiven und invasiven Tumor nachweisbar. Morphologisch ähneln sie CIS-Zellen. Bei den Empfängern von TCam-2-Zellen war nach 6 Wochen noch keine Tumorentwicklung sichtbar. Es waren lediglich einige Hodenkanälchen mit TCam-2-Zellen besiedelt, die die molekularen Marker z. B. OCT 3/4, β -hCG, NANOG, VASA und AP-2y zeigten. 12 Wochen nach Transplantation weisen 3 von 5 Nacktmäusen, die TCam-2-Zellen erhalten haben, Tumore mit einem mittleren Gewicht von 261 mg auf. Zudem fand sich nach 13 Wochen bei einer Maus, die 5 \times 10⁵ TCam-2-Zellen erhalten hatten, makroskopisch ein großer Tumor (4,17 g). Histologisch war nach 12 bzw. 13 Wochen eine Zerstörung des testikulären Parenchyms sichtbar und die TCam-2-Zellen waren morphologisch und anhand molekularer Marker (s. o.) in der Tumormasse zu erkennen. Bei den Kontrollempfängern von

2102 EP-Zellen zeigten sich nach 4 Wochen Tumore mit einem mittleren Gewicht von 850 mg. Histologische und immunohistochemische Aufarbeitung zeigte in allen Tumoren Charakteristika für embryonale Karzinome und Teratome.

Schlussfolgerung Unsere Ergebnisse zeigen, dass durch Xenotransplantation der seminomatösen TCam-2-Zellen ein CIS-Mausmodell generiert werden konnte, dass neue Möglichkeiten eröffnet die Keimzelltumorentstehung und -progression zu untersuchen.

18

De-Differentiation of Sertoli Cells in Co-Culture with Seminoma Cells – New Insights of the Origin of Testicular Intraepithelial Neoplasia (TIN)

C. Fink¹, R. Weigel¹, V. Schumacher², H. Schorle², S. Kranz³, L. Konrad⁴, M. Bergmann¹, R. Brehm⁵

¹Veterinary-Anatomy, Justus-Liebig-University Gießen; ²Department of Paediatrics, Harvard Medical School, Boston, USA; ³Department of Developmental Pathology, University of Bonn Medical School; ⁴Department of Obstetrics and Gynecology, Justus-Liebig-University Gießen; ⁵Institute for Anatomy, University of Veterinary Medicine Hannover

Aims Testicular intraepithelial neoplasia (TIN) is the non-invasive precursor of testicular germ cell tumours (TGCT), the most common cancer in young men. The causes of the disturbed germ cell development into TIN are not known. TIN has been correlated with an impaired status of Sertoli cell differentiation, but it is controversially discussed whether these abnormal Sertoli cells represent prepubertal cells arrested in their normal maturation, being a contributing factor to the development of TIN, or adult-type Sertoli cells that are reverting to a less differentiated state as a consequence of the underlying pathological process. Our purpose is to elucidate if adult-type Sertoli cells may revert to a less differentiated state due to the influence of TGCT cells.

Methods We established co-cultures of an adult human Sertoli cell line (FS1) with a seminoma-like cell line (TCam-2) and studied the changes in the expression pattern of Sertoli cell differentiation markers. The results were compared with the Sertoli cell protein expression in human testicular biopsies showing normal spermatogenesis, varying degrees of TIN, and fetal tubules.

Results De-differentiated Sertoli cells, as labeled with the fetal marker cytokeratin 18 and the pluripotency factor SOX2, were detected on day 14 of co-culture. Additionally, we showed that Sertoli cells in TIN tubules co-express ck18 and androgen receptor, the latter being a marker for adult Sertoli cells.

Conclusions Our data provide first evidence that seminoma cells induce de-differentiation in co-cultured Sertoli cells and suggest that in vivo, the abnormal Sertoli cells

associated with TIN represent adult-type Sertoli cells that are de-differentiating, being rather the consequence than the cause of TIN.

Hormondiagnostik in der Andrologie

19

Subfertilität bei unklarer HCG-Erhöhung

S. Furchert¹, J. Jacobs², T. Böhmer¹, R. Ovenbeck¹, J. Wilisch¹, B. Sadri¹, S. Eckmann¹, T. Pottek¹
¹Urologie, Asklepios Westklinikum Hamburg; ²Endokrinologikum, Hamburg

Keimzelltumore des Hodens sind die häufigste maligne Erkrankung junger Männer. Viele Hodentumorpationen haben eine deutlich eingeschränkte Spermio-genese. Diese Störung kann durch morphologische Veränderungen oder endokrine Einflüsse, z. B. HCG-Produktion, hervorgerufen sein. Selten sind primär extragonadale Keimzelltumore, bei denen eine testikuläre intraepitheliale Neoplasie (TIN) vorkommt. Im folgenden Kasus war die Subfertilität Ausgangspunkt für intensive und invasive Diagnostik.

Wir wollen mit der Darstellung die Bedeutung der erweiterten Hormondiagnostik und genauen körperlichen Untersuchung in der andrologischen Sprechstunde unterstreichen.

Falldarstellung Ein 30-jähriger Patient stellt sich bei unerfülltem Kinderwunsch in der andrologischen Praxis vor. Die Untersuchungen ergeben eine hypogonadotrope Störung mit erhöhten Östradiol- und Testosteronwerten und eine Oligo-Asthenoteratozoospermie. Es liegt eine neu aufgetretene Acne tarda mit Acne papulo-pustulosa und Acne conglobata vor. Auffallend ist jedoch vor allem ein deutlich erhöhter HCG- (Humanes Choriongonadotropin-) Wert (86 U/l) sowie in der sonographischen Untersuchung der Hoden beiderseitig ein sogenanntes Sternkartenphänomen. Ein Hinweis auf einen soliden Keimzelltumor findet sich nicht. Die weiteren Hodentumormarker sind negativ. Hodenbiopsien beweisen beiderseitig TIN.

Mehrfache Bildgebung mittels Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) von Abdomen, Thorax und Neurokranium ergibt keinen sicheren Hinweis auf das Vorliegen eines extragonadalen Keimzelltumors als Ursache der HCG-Erhöhung, wobei ein paraaortaler Lymphknoten in Höhe des linken Nierenunterpols aufgrund seiner geringen Größe unter 1 cm Durchmesser als kontrollbedürftig gewertet wird.

Hinweise auf eine exogene Genese der HCG-Erhöhung, wie z. B. Testosterondoping, ergeben sich nicht.

Bei Kinderwunsch wird zugunsten der Kryokonservierung zunächst auf eine Radiatio der TIN verzichtet. Eine intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) ist erfolgreich.

Sechs Monate später wird – bei unverändertem HCG-Wert – im Verlaufs-MRT der vorbeschriebene Lymphknoten als konstant erachtet.

Im darauffin durchgeführten PET/CT ist keine Aktivität des Lymphknotens nachweisbar. Dennoch wird der Lymphknoten geborgen. Die histopathologische Aufarbeitung ergibt keinen Tumornachweis. Postoperativ fällt der HCG-Wert ab (32 U/l), konsekutiv sinken Serumtestosteron und Östradiol. Der Effekt ist aber nicht stabil, es kommt am 4. Tag zum Wiederanstieg des HCG- und des Testosteron-Wertes, Östradiol sinkt weiter.

Die Hormonwerte des Patienten werden langfristig kontrolliert. Nach Austragung der Schwangerschaft soll die Radiatio der TIN erfolgen.

Zusammenfassung In der Infertilitätsdiagnostik können körperliche Untersuchung und klinische Chemie Hinweise auf einen Keimzelltumor geben. Daher sind eine gewissenhafte körperliche Untersuchung, die Hodensonografie und die Analyse der Gonadotropine und Hodentumormarker unerlässlich. Ggf. muss eine Abklärung mittels Hodenbiopsie erfolgen. Bei Vorliegen einer TIN kann eine okkulte Metastasierung vorliegen. Auch die Erhöhung von Hodentumormarkern ohne entsprechenden testikulären Befund sollte – unter Annahme eines primär extragonadalen Keimzelltumors – bis zum Beweis des Gegenteils als tumorassoziiert angenommen und weiterverfolgt werden.

20

Hypogonadism in Long-Term Survivors with Previous Germ Cell Tumors

F. Gottardo¹, L. Grunwald¹, A. Secker², M. Zitzmann¹, G. Puhse², J. Gromoll¹, S. Kliesch¹

¹Department of Andrology, Centre of Reproductive Medicine and Andrology, University of Muenster;

²Department of Urology, University of Muenster, Münster

Background Testicular cancer survivors are at risk to develop premature reduced Leydig cell function and hypogonadism. Age adjusted ratio is 3.8 and increases with the intensity of treatment. Any studies focus on testosterone levels in testicular cancer patients, but reliable guidelines for the follow-up of signs and symptoms of testosterone deficiency are still lacking.

In this study we considered a population of patients with previous testicular cancer in order to evaluate the prevalence of hypogonadism (defined as testosterone levels lower than 10 nmol/L or LH more than 10 U/L) and to correlate it with the presence of clinical signs (reduced red blood cells count, reduced bone density) or symptoms of testosterone deficiency (evaluated by means of AMS questionnaire and IIEF 25). This collective was compared with patients who underwent bilateral orchiectomy because of synchronous or metachronous tumour and are currently under testosterone substitution.

Materials and Methods We included in the study 152 patients (73 germ cell GCT and 79 non-germ cell tumours NGCT) who were treated because of testicular tumour between 1985 and 2009. The mean age of the patients at the time of the study was 39 ± 8 yrs. 7 patients had undergone bilateral castration and were already under treatment with testosterone. 97/152 (63.8 %) had received adjuvant poly-chemotherapy. The median follow-up was 84 ± 60 months.

Results At the time of presentation 15/152 (9.8 %) patients with unilateral tumour were already diagnosed with hypogonadism and under testosterone substitution. The other 137 patients had never received testosterone treatment before. 15/137 (10.9 %) showed testosterone levels below 10 nmol/L (mean 8.43 ± 1.4 nmol/L) and 22/137 (16 %) showed LH above 10 U/L (mean 14.6 ± 5.6 U/L). When compared with the patients under testosterone substitution (anorchid and monorchid), this group showed significantly lower hemoglobin levels ($p = 0.002$), hematocrit ($p = 0.004$), lower scores in the domain of sexual desire of IIEF15 ($p = 0.002$) and higher AMS scores ($p = 0.002$), but no significant difference in the bone density.

Conclusions Our data suggest that signs and symptoms of clinical hypogonadism in long-term testicular cancer survivors might be far more prevalent than expected. The absence of clear guidelines for the follow-up of these patients may lead to the overlooking of relevant signs and symptoms of hypogonadism and severely impair their quality of life. These data strengthen the need for an improved follow-up of long-term testicular cancer patients even beyond the term of 10 years after treatment.

The study was possible thanks to the financial support of Bayer Vital GmbH 51368 Leverkusen

■ Infektionen

21

Peniskarzinom bei einem HIV-positiven Patienten

A. Potthoff¹, A. Kreuter¹, U. Wieland¹, N. H. Brockmeyer^{1,2}

¹Dermatologie, St. Josef Hospital, Bochum; ²Kompetenznetz HIV/AIDS, Klinik für Dermatologie und Allergologie der Ruhr-Universität Bochum

Hintergrund Neben Veränderungen der zellulären Kontrollmechanismen durch HIV spielen auch andere Viren eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese. Die onkogene Potenz der verschiedenen humanen Papillomvirus- (HPV-) Typen, insbesondere HPV 16 und 18, ist durch umfangreiche Studien, nicht nur beim Zervixkarzinom, sondern auch beim Analkarzinom und Peniskarzinom belegt.

Fallbericht Ein 67-jähriger Patient stellte sich mit einem seit 3 Monaten größtenprogre-

dientem Tumor an der Glans penis vor. Seit 6/2001 war eine HIV-Infektion im Stadium C3 bekannt. Bei dem Patienten erfolgte 7/2001 eine tiefe anteriore Rektumresektion bei Karzinom mit unauffälliger Nachsorge. Bei therapieresistenten Condylomen wurde 2002 eine Zirkumzision durchgeführt. Proktologisch wurde 2008 eine anale intraepitheliale Neoplasie Grad I festgestellt. Aktuell lagen die CD4 Lymphozyten bei 356/μl, die HI-Viruslast lag unter Therapie mit Epivir und Kaletra unter der Nachweisgrenze. Nach histologischer Diagnosesicherung erfolgte eine Penisteilamputation und eine beidseitige Lymphadenektomie bei Peniskarzinom Stadium pT2 pN0, pM0 L0V0 Pn0 UICC Stadium II R0 G2. Es wurden HPV16 nachgewiesen. In der Nachbeobachtungszeit von bisher 6 Monaten traten keine Rezidiv oder Metastasen auf.

Kommentar In einer Studie des Kompetenznetzes HIV/AIDS wurden bei 4,2 % der 263 untersuchten HIV-positiven Männer penile intraepitheliale Neoplasien festgestellt. Fast alle hatten gleichzeitig eine anale intraepitheliale Neoplasie. Der hier vorgestellte Fall ist der erste in Bochum dokumentierte Fall eines invasiven Peniskarzinoms bei einem HIV-positiven Patienten. Das gesteigerte Gesamtüberleben scheint ein Faktor für die erhöhte Inzidenz der HPV-assoziierten Karzinome zu sein, sodass Screeningprogramme analog zum Zervixkarzinom eingeführt werden sollten. Hierzu eignet sich insbesondere die hochauflösende Penis- und Anoskopie in Kombination mit zytologischer Abstrichentnahme. Bisher sind derartige Programme noch nicht flächendeckend etabliert.

22

Male Genital Tuberculosis

E. Kulchavenya

Urogenital Department, Novosibirsk Research TB Inst., Novosibirsk, Russia

Objectives To study the epidemiology and the clinical picture of male genital tuberculosis in Siberia, Russia.

Material 514 patients with genitourinary tuberculosis were enrolled in the study: 414 had kidney tuberculosis only, 100 had genital involvement. The clinical picture and structure of genital tuberculosis were investigated: 42 had tuberculosis of scrotal organs and 58 had tuberculosis of the prostate.

Methods Urinary cultures, urinalysis, 3-glass test, and investigation of the prostate secretion, Mycobacteria culture and susceptibility testing were performed in all 514 patients.

Results 33.6 % of all patients earlier suffered from pulmonary or extrapulmonary tuberculosis and were successfully cured. In 61.9 % nephrotuberculosis was diagnosed alongside with an orchiepididymitis. In 30.9 % of patients bilateral epididymorchitis was diagnosed. Mycobacteriuria was present in 16 (38.1 %) in pts with orchiepididymitis,

all strains drug-sensitive; and in 21 (36.2 %) pts with TB of the prostate, 2 strains drug-resistance. Scrotal fistula were found in 11.9 %. In 66.7 % the symptoms appeared acutely.

Half of the patients with prostate tuberculosis complained of dysuria; 23 (39.6 %) had perineal pain; 34 (58.6 %) had flank pain. Leucocytes in urine were present in 49 (84.5 %) patients, and in prostatic secretion in 45 (77.6 %) patients. Erythrocytes in urine were present in 31 (53.4 %) patients, and in prostatic secretions in 17 (29.3 %) patients.

Conclusions Male genital tuberculosis has no specific pathognomonic signs. Using a special algorithm for the management of patients with prostatitis or epididymitis is recommended.

■ Inflammation

23

Testosterone Supplementation Inhibits the Development of Experimental Autoimmune Orchitis in Rats

M. Fijak¹, E. Schneider¹, G. Schuler², M. Wygrecka³, J. Gromoll⁴, A. Meinhardt¹

¹Department of Anatomy and Cell Biology; ²Clinic for Obstetrics, Gynecology and Andrology of Large and Small Animals; ³Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Justus-Liebig-University Gießen; ⁴Centre of Reproductive Medicine and Andrology, University of Münster

Introduction Rat experimental autoimmune orchitis (EAO) provides a model to study chronic testicular inflammation and immunologically impaired spermatogenesis, which are important aetiological factors in male infertility. Emerging data about an immunosuppressive role of testosterone and reduced testosterone levels found in systemic inflammation as well as in organ-specific orchitis prompted us to perform testosterone supplementation during EAO development.

Materials and Methods 20 days after the first immunization EAO rats and adjuvant control group received s.c. testosterone (T)-implants, which exogenously regulate testosterone levels or no androgen treatment (EAO group). The animals were sacrificed 50 days after first immunization when orchitis is developed.

Results In the EAO group 80 % of animals developed orchitis. Strikingly, in the EAO group treated with low dose T-implants (3 cm long, EAO+T3) only 17 % of animals developed orchitis, whilst in the EAO group supplied with the high dose T-implants (24 cm, EAO+T24) testicular inflammation was reduced to 33 % of animals.

Testosterone replacement therapy during EAO suppressed the accumulation of macrophages in the testicular interstitial space and significantly reduced the number of testicular CD4+ T cells with a strong concomi-

tant increase in the number of regulatory T cells (CD4+CD25+Foxp3+) in the testis compared to EAO only control. Furthermore, the expression of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6 and the chemokine MCP-1 in the testis and the secretion of the Th1 cytokines IFN- γ and IL-2 by mononuclear cells isolated from testicular draining lymph nodes were decreased in testosterone treated EAO groups. In vitro testosterone treatment of naïve T cells induced differentiation of CD4+CD25+Foxp3+ cells and enhanced MCP-1 stimulated chemotaxis of T cells.

Conclusions Our study points to a protective and immunomodulatory effect of testosterone substitution in the development of testicular inflammation and reveals androgens as important factors in the maintenance of immunological balance in the testis.

24

High Prevalence of Silent Inflammatory Reactions in Testes of Azoospermic Men Undergoing Multi-Focal Biopsy for Testicular Sperm Extraction

N. Burkardt¹, T. Haggene², M. Marconi³, A. Pilatz¹, T. Diemer¹, M. Bergmann², W. Weidner¹, H.-C. Schuppe¹

¹Department of Urology, Pediatric Urology and Andrology; ²Institute for Veterinary Anatomy, Histology and Embryology, Justus-Liebig-University Gießen, Germany; ³Department of Urology, University Clinic of Chile, Santiago, Chile

Introduction Infection and inflammation of the reproductive tract are widely accepted as important etiological factors of male infertility. However, most studies focussed on the excurrent ducts and male accessory glands, whereas the immunopathology of the testis received only little attention. Especially subacute or chronic, asymptomatic inflammation of the testis is difficult to diagnose and therefore likely to be neglected. In testicular biopsies obtained from infertile men, the reported prevalence of prominent, although asymptomatic inflammatory infiltrates was approx. 5–16 %. Here, we revisited this issue in a cohort of men with non-obstructive azoospermia.

Patients and Methods The retrospective study comprised 59 patients (aged 25–59 years; median 36) with non-obstructive azoospermia, who underwent multi-focal testicular biopsy (4 sites per testis, including a microscopically assisted approach; bilateral specimens of 51 men available) for histopathological evaluation and testicular sperm extraction (TESE). Tissue specimens were fixed in Bouin's solution, embedded in paraffin, and processed according to routine protocols. Semi-quantitative assessment of spermatogenesis was based on a score count calculating the percentage of tubules revealing elongated spermatids within a given slide. Inflammatory reactions were detected and classified by means of a detailed pattern analysis.

Results None of the patients had reported any symptoms of a genital tract infection or inflammation. In contrast, histopathological evaluation revealed inflammatory reactions in 20/59 men (33.9 %). Lesions were characterised by sparse to dense infiltrates, comprising predominantly lymphocytes in peritubular and/or perivascular localization, distributed focally or multi-focally within the specimens. Moreover, inflammation was associated with damage of adjacent seminiferous tubules, including partial or complete loss of germinal epithelium, thickening of the lamina propria, and complete tubular fibrosis. In 48 % of the affected testes, inflammatory reactions were observed in more than one retrieval site. Detection of inflammatory infiltrates correlated with the overall score count evaluation of spermatogenesis.

Conclusions Our results confirm previous reports that inflammatory reactions frequently occur in testes of infertile men. The high prevalence observed among azoospermic men undergoing multi-focal biopsy for TESE even exceeds data recorded in specimens of the pre-TESE era. As non-invasive diagnostic tools are not yet available, silent testicular inflammation is underestimated as a primary cause or co-factor of male infertility. Future studies should also encourage the search for appropriate therapeutic strategies.

■ Kontrazeption

25

Fertilität und Spermatogenese im nicht-humanen Primatenmodell (*Callithrix jacchus*) unter Testosteronundekanoat (TU) und Norethisteronenanthat (NETE) Behandlung

J. Wistuba¹, C. M. Luetjens², E. Nieschlag¹, J. Ehmecke¹, R. Sandhove-Klaverkamp¹, M. Simon², S. Schlatt¹

¹Institut für Reproduktions- und Regenerationsbiologie, Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Universitätsklinikum Münster; ²Covance Laboratories, Münster, Deutschland; ³Department of Medicine, Endocrinology, Metabolism and Geriatrics, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italien

Fragestellung Zur hormonellen männlichen Kontrazeption werden Kombinationen von Gestagenen und Androgenen eingesetzt. Allerdings fehlen bisher verlässliche experimentelle Daten über mögliche Effekte bei längerfristiger Verwendung. Wir haben daher im Weißbüschelaffen Effekte von TU und NETE auf die Spermatogenese und die Fertilität bei Tieren untersucht, die über unterschiedliche Zeiträume mit TU und NETE behandelt wurden.

Methoden Insgesamt wurden 7 Gruppen männlicher Marmosets (jeweils n = 6) analysiert, denen zuvor TU (25 mg/kg alle 3 Wochen) und NETE (70 mg alle 3 Wochen) für unterschiedliche Zeiträume verabreicht worden war: TU + NETE (6, 12, 24 und 36 Monate), TU und NETE/nur NETE (6 und 24 Monate sowie 16 und 26 Monate) und nur

NETE (18 Monate). Als Endpunkte dienten Hodenvolumen, Serumtestosteron, Hodenhistologie und Fertilität. Letztere ergab sich aus der Anzahl von Nachkommen, die unter der kontrazeptionellen Behandlung gezeugt wurden.

Ergebnisse Es zeigt sich, dass TU und NETE die Spermatogenese und die Fertilität zwar beeinflussen, jedoch in diesem Tiermodell nicht unterdrücken können. Obwohl die Hodenvolumina sinken, bleibt der Serumtestosteronspiegel supraphysiologisch und die histologische Auswertung zeigt milde Effekte von reduzierter Spermatogenese, selten bis zur „bunten“ Atrophie. Ein ähnliches Bild war zu beobachten, wenn nach initialer TU+NETE-Behandlung anschließend nur NETE verabreicht wurde. Eine alleinige Gabe von NETE dagegen senkt auch die Serumtestosteronspiegel, die Tiere bleiben jedoch ebenso grundsätzlich fertil. Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen war die Anzahl der Nachkommen reduziert, wenn die Dauer der kontrazeptiven Behandlung 6 Monate überschritt.

Schlussfolgerung Der Marmoset stellt das einzige Primatenmodell dar, in dem es möglich ist auch die Fertilität als Endpunkt zu analysieren. Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass, obwohl die Hodenvolumina reduziert und die Spermatogenese und die Fertilität beeinflusst werden, kein zuverlässiger kontrazeptiver Effekt in diesem Tiermodell auftritt. Im Gegensatz zu Makaken, die die endokrine Situation des Menschen sehr exakt widerspiegeln, ist die Reproduktion der Weißbüschelaffen hormonell davon deutlich abweichend reguliert und lässt die vollständige Unterdrückung der Fertilität nicht zu, sondern zeigt lediglich abgestufte Effekte, die möglicherweise eine experimentelle Analyse von Subfertilität zulassen. Die Verwendbarkeit des Marmoset in Studien zum Nachweis kontrazeptiver Effektivität von hormonellen Wirkstoffkombinationen für die Anwendung im Menschen ist allerdings als eingeschränkt zu bewerten.

■ Somatische Anteile des Hodens

26

ROS and ROS Handling in Human Testicular Peritubular Cells

G. Kampfer¹, S. Spillner¹, U. Schwarzer², A. Mayerhofer¹

¹Centre for Integrated Protein Science, Anatomy and Cell Biology, Ludwig-Maximilians-University München; ²Practice of Urology and Andrology, Freising

Background and Objectives In previous studies we found that COX2 and PGD2 synthases are present in human testicular biopsies of men suffering from infertility due to impaired spermatogenesis and testicular fibrosis [Frungieri et al., Proc Natl Acad Sci USA 2002; Schell et al., Fert Steril, 2007]. Hence, prostaglandins and their metabolites

are expected to be present. Recently, we found that a prostaglandin D2 metabolite, namely 15-deoxy-delta (12-14)-prostaglandin-J2 (15dPGJ2), induces the generation of reactive oxygen species (ROS) in human testicular peritubular cells (HTPCs), isolated from testicular biopsies of men with normal spermatogenesis (Schell et al., Endocrinology, 2010). Thus, oxidative stress may be a consequence of COX2 expression. In our previous study, ROS generation could be linked to reduced expression of smooth muscle markers and decreased ability of HTPCs to contract. Whether the corresponding cells from biopsies of men with impaired spermatogenesis and testicular fibrosis (HTPC-Fs) may also respond by ROS production is unknown.

Methods Primary cell cultures of HTPCs and HTPC-Fs were used to study ROS production measured with the fluorescent dye, 2', 7'-dichlorofluorescein-diacetate (H2DCFDA). Untreated cells and hydrogen peroxide-stressed cells were examined quantitatively in a fluorometer or qualitatively by fluorescence microscopy. RT-PCR was employed to examine expression of antioxidant enzyme catalase. Western Blots with anti-catalase antibody (Epitomics) complemented the study.

Results HTPCs and HTPC-Fs produced ROS after hydrogen peroxide treatment, but quantitative differences became obvious, namely that the induced ROS levels were higher in HTPCs than in HTPC-Fs. Catalase, which is part of the ROS scavenging system and is mainly involved in degradation of hydrogen peroxide in cells, was examined to explore possible reasons for higher ROS level in HTPCs. Western Blots showed lower expression levels of catalase in untreated HTPCs than in HTPC-Fs. After oxidative stress, triggered by hydrogen peroxide, catalase protein was reduced in both cell types, but in HTPCs the reduction was smaller than in HTPC-Fs. Pilot studies indicate that HTPC and HTPC-Fs respond not only to hydrogen peroxide but also to the PG metabolite 15dPGJ2 in a similar fashion.

Conclusion HTPCs and HTPC-Fs respond differently to oxidative stress, possibly because their ROS scavenging enzyme systems, including catalase differ. Cells from pathologic testes appear to be able to handle oxidative stress in a more effective way than HTPCs. Further details of ROS scavenging systems and their role for cell metabolism remain to be elucidated.

Support DFG MA 1080/16-3

27

A Ca²⁺-activated potassium channel (BK_{Ca}) in Leydig cells is involved in testosterone production

S. Siebert¹, K. Spinnler¹, E. Matzkin², L. Kunz², R. Calandra², M. Frungieri², A. Mayerhofer¹

¹Institute for Cell Biology, Anatomy and Centre for Integrated Protein Science Munich (CIPSM), Ludwig-Maximilians-University München; ²Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires, Argentina; ³Division of Neurobiology, Department of Biology II, Ludwig-Maximilians-University München

Background and Objectives Previously, we found that human ovarian granulosa cells express all major types of Ca²⁺-activated potassium channels (K_{Ca}), including BK_{Ca}, IK and SKs [Traut et al., RB&E, 2009], which were found to be involved in steroid production. Whether human testicular Leydig cells are also endowed with K_{Ca}s is not known. We focussed on BK_{Ca}, because this Ca²⁺-activated K⁺-channel can be manipulated, e.g. by a specific blocker, the red scorpion toxin iberiotoxin, which binds to the outer face with high affinity and selectively inhibits the current by decreasing both the probability of opening and the open time of the channel.

Methods Human: Paraffin embedded sections of human testicular biopsies were studied by immunohistochemistry. RT-PCR was performed by using human testes samples from Leydig cells obtained by laser microdissection (LMD). Hamster: RT-PCR was performed from isolated Leydig cells. The release of testosterone was examined in supernatant of isolated and cultured Leydig cells by radioimmunoassay (RIA). Paraffin embedded testes sections were subjected to immunohistochemistry for BK_{Ca}. Real time PCR was performed to evaluate levels of StAR and of steroidogenic enzymes.

Results Immunohistochemistry and RT-PCR of human and hamster testicular tissue showed the presence of BK_{Ca} in Leydig cells. The role of this channel in testosterone production was analyzed in hamster. As expected, during a 3 h stimulation period hCG (100 mIU/ml) led to a significantly increased release of testosterone over basal levels. Importantly, the presence of iberiotoxin further significantly increased this stimulated testosterone production. The further increase was not associated with detectable changes in StAR, or main steroidogenic enzymes (p450SCC or 17βHSD), as shown by real time PCR.

Conclusion Our results indicate that a K_{Ca} is involved in the stimulated regulation of steroid production in Leydig cells in hamster and, possibly, also in man. It may represent a cellular mechanism how the LH/hCG induced testosterone production is inhibited. Experiments are under way to examine the mechanism of actions. We hypothesize that it may be related to changes in intracellular Ca²⁺ which is known to be increased as a consequence of LH/hCG action and/or the regulation of the membrane potential by BK_{Ca}.

Support DAAD – Mincyt

28

Growth Factors and Growth Factor Signalling in Human Testicular Peritubular Cells: PDGF

M. Adam¹, U. Schwarzer², F. M. Köhn³, A. Mayerhofer¹
¹Institute for Cell Biology, Anatomy and CIPSM, Ludwig-Maximilians-University, München; ²Practice for Urology and Andrology; ³Andrologicum, University of Technology München

Background and Objectives Growth factors (GFs) and their receptors play important roles in the development of the testis and presumably in regulation of testicular functions in adults, by influencing cell proliferation, hypertrophy, differentiation and apoptosis, at least in rodents. Whether GFs are also important in human testis, is not well examined. Therefore we investigated GFs, especially epidermal GF (EGF) and platelet-derived GF (PDGF), employing our cellular model of human testicular peritubular cells (HTPCs), isolated from men with obstructive azoospermia undergoing reconstructive surgery but displaying normal spermatogenesis. In addition, we determined, whether PDGF receptors (PDGFRs) are expressed in vivo.

Methods RT-PCR followed by sequencing was performed to examine the existence of receptor tyrosine kinases (RTKs). Acute changes of intracellular calcium levels were measured after EGF or PDGF-BB (both human recombinant) was added. Using the CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay, cellular viability was determined. To examine effects of EGF and PDGF-BB (and in some cases also PDGF-AA) on cell number and size, HTPCs were treated and cell numbers were counted with an automated cell counting device (CASY). Mitotic figures were counted after DAPI (4', 6'-diamidino-2-phenylindole) staining. Semi-quantitative RT-PCR for smooth muscle actin (SMA) in PDGF-BB treated cells was performed. Cells of at least 3 different patients were used for each experiment. Finally, laser micro dissection (LMD) was performed to isolate peritubular cells from sections of human biopsies embedded in paraffin. RT-PCR for PDGFR- α and - β was performed to determine whether these receptors are expressed in the in vivo counterparts of HTPCs.

Results RT-PCR and sequencing showed that several RTKs, namely the EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR- α and - β , are expressed by HTPCs. Functionality of EGFRs and PDGFRs was demonstrated by the ability of their ligands, EGF (activates all members of the EGFR family; 150 μ M) and PDGF-BB (which can activate all known PDGFR α/β combinations; 5 ng/ml), to repeatedly and transiently elevate intracellular calcium levels within seconds. EGF and PDGF-BB also significantly increased cell viability, as shown by elevated ATP levels (24 h). This is due to a stimulation of cell proliferation by PDGF-BB, but not EGF (CASY/DAPI). CASY experiments showed further that PDGF-BB and PDGF-AA did not influence the size of HTPCs. PDGF-BB treatment resulted in increased expression of

the smooth muscle marker SMA in HTPCs. Finally, LMD followed by RT-PCR, determined that PDGFR- α and - β are expressed in vivo counterparts of HTPCs in the peritubular wall.

Conclusion HTPCs express EGFRs and PDGFRs. Both are functional in HTPCs. PDGF treatment did not alter cell size, but resulted in elevated SMA mRNA levels and cell proliferation. The roles of EGFRs remain to be studied. These evolving results allow new insights into unexplored mechanisms responsible for the regulation of the human testis in health and disease.

Support DFG MA 1080/16-3

29

Mast Cells in Human Testicular Biopsies Express Prostaglandin D2 Synthase and Cyclooxygenase 2: Implications for Male Infertility

H. Welter¹, F.-M. Köhn², A. Mayerhofer¹
¹Institute for Cell Biology, Anatomy and Centre for Integrated Protein Science Munich (CIPSM), Ludwig-Maximilians-University, München; ²Andrologicum München

Background In male sub-/infertility due to impaired spermatogenesis, increased numbers of immune cells, namely mast cells (MCs) and macrophages, along with structural alterations of the seminiferous tubule wall are obvious. Furthermore, an increase of COX2-expression in Leydig cells and macrophages has previously been reported mainly in biopsies of patients with Sertoli cell only syndrome and germ cell arrest. Prostaglandin (PG) D2 synthase (PGDS) is reportedly expressed by Leydig cells and possibly also by testicular immune cells. PGD2 and its terminal metabolite 15 desoxy-D¹²⁻¹⁴-prostaglandin J2 (15dPGJ2) are therefore expected to be present and active in these cases. Indeed, we previously found that 15dPGJ2 strongly affects contractility and phenotype of peritubular cells hinting to a role in the development of changes related to male infertility.

Objectives As PGs may play a fundamental role in the pathogenesis of male infertility, we attempted to further analyze the nature of COX-2 expressing cells. In order to obtain information whether testicular MCs are able to synthesize PGs, the present study was performed. We focused on samples of testes of men with focal changes (mixed atrophy; MA).

Material and Methods Testicular biopsies of 11 patients with MA were investigated by immunohistochemistry for COX-2 and the MC product tryptase using consecutive sections. Immunoreactive cells were also isolated by laser micro dissection (LMD) and subjected to RT-PCR analyses for detection of PGDS.

Results Only in 3 of 11 patients with MA typical interstitial Leydig cells were COX-2

positive. In the majority of patients, COX-2 was restricted to tryptase positive mast cells, as shown in colocalization studies. However, not all tryptase positive cells expressed COX-2. LMD/RT-PCR gave evidence for the presence of PGD2 mRNA in tryptase positive MCs.

Conclusion The majority of tryptase positive MCs in MA biopsies express COX-2 and PGDS. Therefore, it is possible that these cells release PGD2, which may be metabolized to 15dPGJ2. As we frequently observed focal accumulation of tryptase expressing MCs in MA biopsies, this result may point to testicular MCs as key modulators in the early development of male infertility.

Support DFG MA1080/16-3

30

Testicular Macrophages: Friends or Enemies?

D. Jezek¹, N. Knezevic², I. Krhen², V. Kozina¹, A. Vukasovic¹, Z. Kastelan
¹School of Medicine, Histology and Embryology, University of Zagreb; ²Clinic for Urology, University Hospital Zagreb

Aim and Scope Testicular macrophages, situated within the interstitial compartment, largely affect Leydig cells. Their paracrine factors seem to influence steroidogenesis and testosterone production. In addition, testicular macrophages exert immunosuppressive action on other immunocompetent cells in order to keep them away from seminiferous tubules. The aim of our study was to investigate the expression of KiM1P1 antigen (macrophage marker) and ultrastructural characteristics of macrophages in testicular biopsies of infertile men with non-obstructive azoospermia.

Methods Overall, 120 testicular biopsies from infertile men were analyzed. Samples were obtained by the "open testis biopsy" method. Several pieces of the tissue (after dissection), were immediately immersed into the Sperm Prep (Medi-Cult) medium and fixative. As fixatives, 5.5 % buffered glutaraldehyde and Bouin's fluid were used. Tissue samples transported in Sperm Prep medium were plunged into Sperm Freezing medium (Medi-Cult) and were stored in the liquid nitrogen for potential in vitro fertilization procedures. The tissue fixed in glutaraldehyde and Bouin's fluid was processed for semi-thin sections and transmission electron microscopy and immunohistochemistry (IHC), respectively. In addition, the ultrastructural characteristics of macrophages were assessed by stereology.

Results Semi- and ultra-thin sections from 24 patients demonstrated regular testis structure and fully preserved spermatogenesis (control biopsies). Within the interstitial tissue, a moderate presence of cells expressing KiM1P1 macrophage marker has been found. The cells were located mainly around blood vessels and within the loose connective tissue. Some cells were located at the

periphery of the lamina propria of seminiferous tubules, but were not seen within the tubular lumen. In the remaining 96 cases, spermatogenesis was impaired and a variety of pathological changes could be seen: disorganization and desquamation of spermatogenic cells, spermatid or spermatocyte “stop”, spermatogonia only, “Sertoli cells only” or tubular fibrosis. IHC and morphometric results indicated an increase in the presence of macrophages within the interstitial testicular compartment. Moreover, these cells infiltrated the lamina propria of some seminiferous tubules and/or were found within the tubular lumen, phagocytosing spermatogenic cells. Electron microscopy data indicated that the macrophages in patients with non-obstructive azoospermia were very likely activated, bearing a lot of secondary lysosomes, phagolysosomes, phagocytic vacuoles and cytoplasmic processes.

Conclusion Cases of non-obstructive azoospermia (with various lesions of the testicular parenchyma) could be strongly linked to the presence of testicular macrophages. The factors that activate these cells and cause their migration into seminiferous tubules remain to be identified.

■ Soziale und Verhaltens-Aspekte

31

Lebenszufriedenheit und Partnerschaftsqualität bei Paaren mit Kinderwunsch im Vergleich zur Referenzpopulation

S. Schanz, T. Reimer, C. Bräunlich, G. Fierlbeck
Andrologie, Universitäts-Hautklinik, Tübingen

Fragestellung Unerfüllter Kinderwunsch wird für die betroffenen Paare vielfach als belastend beschrieben. Dennoch liegen bisher relativ wenige Daten vor, die einen Vergleich von Paaren mit unerfülltem Kinderwunsch mit Referenzpopulationen ziehen. Vor allem hinsichtlich eines längeren zeitlichen Verlaufs liegen hierzu kaum Untersuchungen vor. Unsere Studie hatte das Ziel, zu 2 Zeitpunkten (bei Baseline und nach 5 Jahren) die Lebenszufriedenheit und Partnerschaftsqualität im Vergleich zu altersgematchten Referenzpopulationen zu untersuchen.

Patienten und Methoden 275 Männer und 272 Frauen mit unerfülltem Kinderwunsch wurden mit dem Fragebogen zur Lebenszufriedenheit (FLZ) und dem Partnerschaftsfragebogen (PFB) bei Erstvorstellung wegen unerfüllten Kinderwunsches befragt. An einer erneuten Befragung nach 5 Jahren nahmen 101 Männer und 113 Frauen teil. Als Vergleichspopulationen dienten altersgematchte Referenzgruppen aus der Normierungsstichprobe der verwendeten Fragebögen.

Ergebnisse Zum ersten Befragungszeitpunkt zeigten sich sowohl die Männer als auch die Frauen lediglich hinsichtlich ihres Gesundheitszustandes unzufriedener als die Referenzpopulation. Deutlich besser wurde hingegen die finanzielle und die partnerschaftliche Situation bewertet. Für alle anderen Bereiche zeigten sich für beide Geschlechter keine relevanten Unterschiede gegenüber den Referenzgruppen. Nach 5 Jahren zeigte sich eine deutliche Abnahme der Zufriedenheit mit dem Sexualleben, bei jüngeren Männern mit der Freizeitgestaltung und bei älteren Frauen mit dem Selbstwertgefühl. Die Partnerschaftsqualität wurde von Männern und Frauen nach 5 Jahren auffallend unterschiedlich bewertet. Während die Zufriedenheit mit Zärtlichkeit und Gemeinsamkeit in der Partnerschaft bei den Männern im Vergleich zur Referenzgruppe nur wenig abnahm, zeigten sich die Frauen nach 5 Jahren sehr viel unzufriedener mit beiden Bereichen. Mit dem Konfliktverhalten in der Partnerschaft zeigten sich die Männer nach 5 Jahren unverändert ähnlich zufrieden wie die Referenzgruppe, während die Frauen diesbezüglich dramatisch unzufriedener wurden.

Schlussfolgerung Bei insgesamt großer Zufriedenheit auch im zeitlichen Verlauf nach 5 Jahren lassen sich dennoch einige markante Unterschiede im Vergleich zu den Referenzgruppen erkennen. Bemerkenswert sind die ausgeprägten Unterschiede in der Bewertung der Partnerschaftsqualität zwischen Männern und Frauen nach 5 Jahren.

32

Altersstratifizierte Nachtschlafuntersuchung mit dem NEVA-Gerät bei erektionsfähigen Männern zwischen 20 und 60 Jahren

A. Tok, F. Meier, L. Burghaus
Urologie, Uniklinik Köln

Fragestellung Gibt es einen eindeutigen Zusammenhang zwischen der REM-Schlafphase und der nächtlichen Erektion? Gibt es einen Unterschied in der altersstratifizierten NEVA-Messung zwischen jüngeren und älteren erektionsfähigen Männern?

Methoden Bei insgesamt 33 Männern zwischen 20 und 60 Jahren wurde eine Nachtschlafuntersuchung mit dem NEVA-Gerät durchgeführt, hierbei die einzelnen Erektionsereignisse gemessen und zugleich eine EEG+EMG-Messung zur Beurteilung der einzelnen Schlafphasen vorgenommen.

Es erfolgte eine Nachtschlafuntersuchung, diese führten wir unter stationären Bedingungen durch.

Zur Objektivierung der Erektionsfähigkeit wurde der IIEF-Score zur Beurteilung des Schlafverhaltens verschiedene Fragebögen bezüglich des Schlafverhaltens verwendet.

Ein- und Ausschlusskriterien wurden festgelegt.

Ergebnisse Unsere Messungen haben zeigen können, dass es keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen der REM-Schlafphase und der nächtlichen Erektion gibt.

Im Vergleich zu älteren erektionsfähigen Männern liegt die Messung der nächtlichen Tumescenz bei jüngeren Männern deutlich höher.

Die maximale Volumenzunahme während einer Erektion liegt bei Männern zwischen 20 und 30 Jahren durchschnittlich bei 251 %, bei Männern zwischen 50 und 60 Jahren hingegen bei 198 %.

Schlussfolgerung Eine altersstratifizierte Nachtschlafuntersuchung mit dem NEVA-Gerät war bislang nicht validiert worden, mit dieser Studie liegen Referenzwerte für das NEVA-Gerät vor, auf die in weiteren Messungen mit dem NEVA-Gerät Bezug genommen werden kann.

Bislang war immer ein Zusammenhang zwischen der nächtlichen Erektion und der REM-Schlafphase postuliert worden, diesen Zusammenhang haben wir in unserer Studie jedoch nicht nachweisen können.

■ Spermatologie

33

Vorkommen und Bedeutung von VDAC-Isoformen in Mitochondrien boviner Spermatozoen

E. Hirsch¹, A. Wirth¹, W. Weidner¹, K.-D. Hirsch²
¹Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie, Justus-Liebig-Universität Gießen; ²Fachklinikum Borkum

Einleitung Voltage-dependent anion channels (VDACs) sind transmembranäre Kanalproteine mit einer Molekularmasse von 30–36 kDa. Sie kommen in unterschiedlichen Kompartimenten somatischer Zellen vor, wie zum Beispiel in der äußeren mitochondrialen Membran oder in der Plasmamembran. Bei Eukaryonten sind bisher 3 Isoformen, VDAC1, 2 und 3, bekannt. VDAC verändert in Abhängigkeit des Membranpotentials seine Leitfähigkeit. Im geöffneten Zustand können Metabolite wie ATP und Ca²⁺ den Kanal passieren. Ebenfalls von Bedeutung ist VDAC für die Apoptose und für die Volumenregulation der Zelle; VDACs finden sich auch als Teile von Proteinkomplexen, wie z. B. mit Hexokinase, die an der äußeren mitochondrialen Membran assoziiert ist. In vorangegangenen Untersuchungen konnten wir VDAC in den Mantelfasern und im Bereich des Akrosoms von bovinen Spermatozoen lokalisieren und eine funktionelle Beteiligung beim Verlust des Akrosoms sowie bei der Volumenregulation nachweisen. Ziele dieser Untersuchungen waren:

1. Mitochondrien aus bovinen Spermatozoen zu isolieren und
2. das Vorkommen und die mögliche funktionelle Bedeutung von VDAC-Isoformen

in Mitochondrien boviner Spermatozoen zu untersuchen.

Methoden

1. Bovine Spermatozoen wurden in einem Dounce Homogenisator homogenisiert und anschließend in einem „mitochondria isolation buffer (Bio chain, USA) inkubiert. Nach Differentialzentrifugation wurde eine mit Mitochondrien angereicherte Proteinfraction gewonnen. Zum immunbiochemischen Nachweis von Mitochondrien wurden anti-oxComplex-IV-Antikörper eingesetzt. VDAC-Isoformen wurden im Immunoblot mit Subtyp spezifischen anti-VDAC-Antisera identifiziert.
2. Nach Zugabe von 15 µg/ml affinitäts-gereinigten P45 anti-VDAC2-Antikörpern wurde die Spermatozoenmotilität durch „computer-assisted cell motion analysis“ (CASA) ermittelt.

Ergebnisse

1. Nach Einsatz des anti-Ox PhosComplex-IV-Antikörpers konnte eine mitochondriale Polypeptide enthaltende Proteinfraction identifiziert werden. Es wurde eine prominente immunreaktive Proteinbande bei ca. 38 kDa nachgewiesen.
2. In der angereicherten Mitochondrienfraction aus bovinen Spermatozoen konnten VDAC Proteine detektiert werden. Während nur sehr geringe Mengen von VDAC1 (~35 kDa) und VDAC3 (~34 kDa) immunbiochemisch nachweisbar waren, konnte mit VDAC2-spezifischen Antikörpern eine stark ausgeprägte Immunreaktion bei ~36 kDa detektiert werden.
3. Die Inkubation boviner Spermatozoen mit affinitätsgereinigten anti-VDAC2 Antikörpern hatte nach 4 Stunden eine Abnahme der Motilität von ca. 65 % auf ca. 10 % zur Folge.

Schlussfolgerung Es konnten VDAC-Proteine in Mitochondrien boviner Spermatozoen nachgewiesen werden; die Isoform VDAC2 stellte den Hauptanteil dar. Die Isoformen VDAC1 und VDAC3 waren nur in sehr geringen Mengen vorhanden. In bovinen Spermatozoen könnte VDAC2 ein Schlüsselprotein für Mitochondrien-vermittelte Funktionen sein, indem es freie ATP-Konzentrationen in Spermatozoen aufrechterhält und adaptiert und somit eine wichtige Rolle bei der Regulation der Spermatozoenmotilität spielt.

■ Testikuläre Stammzellen

34

GDNF is Constitutively Produced by Human Testicular Peritubular Cells and may Contribute to the Spermatogonial Stem Cell Niche in Man

K. Spinner¹, F. M. Köhr², U. Schwarzer³, A. Mayerhofer¹
¹Institute for Cell Biology, Anatomy and Centre for Integrated Protein Science Munich (CIPSM), Ludwig-Maximilians-University, München; ²Andrologicum, University of Technology; ³Practice for Urology and Andrology, University of Technology, München

Background and Objectives Testicular peritubular cells are thin, spindle-like myofibroblastic cells, which form an ill-characterized compartment of the human testis, bordering on Sertoli cells and spermatogonial stem cells (SSCs). We recently developed a cellular model for the study of human peritubular testicular cells (HTPCs) isolated from testes of men with obstructive azoospermia (but normal testicular morphology) undergoing reconstructive surgery and from fibrotically remodelled human testes (HTPC-Fs). Our previous studies led to the identification of a prototype neurotrophin, namely nerve growth factor (NGF), which is a secreted factor of these cells. Mast cells and macrophages in testes of infertile men are significantly increased and we found that a product of either cell type, TNF- α , enhanced NGF secretion. Interestingly, it was reported that TNF- α also increased glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) production by Sertoli cells. Based on these observations, we hypothesized that human peritubular cells might be able to also produce other neurotrophins, namely GDNF, and that this production may be regulated by products of mast cells or macrophages. To test this hypothesis we examined human testicular biopsies and cultured HTPCs and HTPC-Fs.

Methods Evaluation of human testicular biopsies and cultured peritubular cells using immunohistochemistry, laser micro dissection (LMD), RT-PCR and ELISA measurements of GDNF and cAMP.

Results Peritubular wall cells are in close proximity to immunopositive cells expressing the receptor for GDNF (GDNF family co-receptor- α , n = 10). To examine whether peritubular wall cells may be able to produce GDNF, LMD of testicular compartments followed by RT-PCR analyses were performed. GDNF mRNA was detected in samples of peritubular wall, tubular compartment, but not interstitial cells. To unambiguously examine GDNF production, we studied isolated peritubular cells from men with normal spermatogenesis (HTPCs, n = 6 patients), and impaired spermatogenesis and testicular fibrosis (HTPC-Fs, n = 8 patients). The cells lack FSH- or LH-receptors, indicating that neither Sertoli cells nor Leydig cells contaminate the cellular preparation. However they express receptors for the mast cell and macrophage products tumour necrosis fac-

tor- α (TNF- α) and trypsinase. Most importantly, they express GDNF and constitutively released GDNF into the culture medium in comparably high amounts. TNF- α (5 ng/ml, 24 h and 72 h) or trypsinase (100 ng/ml, 24 h and 72 h) are known to alter certain functions of HTPCs, including NGF secretion, or GDNF in Sertoli cells, but did not affect secretion of GDNF by HTPCs (n = 3 patients) or HTPC-Fs (n = 4 patients).

Conclusion Peritubular cells in testes of normal and sub-/infertile men produce GDNF. GDNF secretion is not altered by two inflammatory factors, thus peritubular cells in health and disease are likely constitutive contributors of the SSC niche in the human testis.

Support DFG MA 1080/16-3

35

ER α -Expression und Mitoseaktivität der Spermatogonien bei normaler und gestörter Spermatogenese beim Mann

M. Bergmann¹, C. Beck¹, S. Siebert², O. Raabe¹, S. Kliesch³

¹Institut für Veterinär Anatomie, Justus-Liebig-Universität, Gießen; ²Institut für Zellbiologie, Ludwig-Maximilians-Universität München; ³Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Universitätsklinikum Münster

Fragestellung Östrogene wirken über Östrogenrezeptoren, ER α und ER β . Die zelluläre Lokalisation und Expression des ER α im humanen Hoden wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind abhängig von der Methodik und dem verwendeten Antikörper. Es gibt Hinweise, dass die Mitoseaktivität der Spermatogonien bei Wirbeltieren und Säugern einschließlich des Menschen über Östrogene getriggert wird.

Ziele dieser Arbeit waren der Nachweis der präzisen Lokalisation des ER α sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene im humanen Hoden. Außerdem sollte untersucht werden, ob zwischen der mitotischen Aktivität der Spermatogonien und dem peripheren Östrogenwert im Blut ein Zusammenhang besteht.

Methoden Untersucht wurden Hodenbiopsien von Patienten mit unterschiedlichen histologischen Befunden und unterschiedlichen peripheren Östrogenwerten. Der Nachweis des Proteins erfolgte immunhistochemisch an Paraffinschnitten mit 2 verschiedenen Antikörpern (Santa Cruz Biotechnology: HC-20 und F-10) und Western Blot. Als Positivkontrolle diente der Nachweis von ER α im Epithel von Ductuli efferentes. Der Nachweis der RNA erfolgte mit PCR qualitativ und quantitativ und von einzelnen interstitiellen immunopositiven Zellen mit einer semi-nested PCR nach Laser-assistierter Mikrodissektion (LAM), sowie mit in situ Hybridisierung. Zur Untersuchung der mitotischen Aktivität der

Spermatogonien wurde eine morphometrische Analyse nach immunhistochemischer Markierung mit dem S-Phase spezifischen Ki67 Antigen vorgenommen und die Daten mit den peripheren Östrogenwerten in einen Zusammenhang gebracht.

Ergebnisse ER α mRNA lässt sich sowohl im Hodenhomogenat als auch in isolierten Tubuli mit normaler Spermatogenese nachweisen. Nach In-situ-Hybridisierung sind Spermatogonien, primäre Spermatozyten und einzelne interstitielle Zellen markiert. Im Western Blot findet sich eine Bande bei 46 KD (F-10). Die immunhistochemische Färbung zeigt eine zytoplasmatische Markierung von Spermatogonien, primären Spermatozyten und runden Spermatisiden und einzelnen interstitiellen Zellen (HC-20) bzw. eine nukleäre Markierung der Spermatozyten und runden Spermatisiden (F-10). Einzelne immunpositive Zellen wurden nach LACP und semi-nested PCR als ER α und STAR-positiv charakterisiert. Die Menge der Rezeptor-mRNA in Hodenbiopsien mit normaler Spermatogenese war signifikant höher als in Biopsien mit Spermatogenese-arresten auf der Stufe der runden Spermatisiden, Spermatozyten und Spermatogonien sowie beim SCO. Die mitotische Aktivität der Spermatogonien war in Tubuli mit Spermatogensedefekten signifikant niedriger (Hypospermatogenese 24,89 \pm 12,39 %, Spermatisidenarrest 21,08 \pm 14,56 %, Spermatozytenarrest 24,67 \pm 14,02 %, Spermatogonienarrest 18,24 \pm 13,39 %) als in Tubuli mit normaler Spermatogenese (27,53 \pm 12,16 %). Eine Korrelation mit peripheren Östrogenwerten ließ sich nicht nachweisen.

Schlussfolgerungen Unsere Daten zeigen, dass im humanen Hoden ER α in den Keimzellen und einzelnen interstitiellen Leydig-Zellen exprimiert wird. Die Abnahme der Rezeptorexpression und der Mitoseaktivität in Tubuli mit Spermatogensedefekten deutet auf eine regulatorische Funktion der Östrogene für die humane Spermatogenese hin.

36

Molekulare Charakterisierung humaner Spermatogonien

K. von Kopylow, C. Kirchoff, W. Schulze, A.-N. Spiess
Andrologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Fragestellung Spermatogoniale Stammzellen (SSCs) als Untergruppe der Spermatogonien sind die Grundlage für lebenslange Spermatogenese im adulten männlichen Organismus.

Therapeutisch eingesetzt könnten sie zur Behandlung männlicher Fertilitätsstörungen dienen, Ausgangszellen für eine Restitution der Spermatogenese nach Radiatio und Chemotherapie sein und die Quelle von Stammzellen in der regenerativen Medizin darstellen.

Die Umsetzung solcher therapeutischer Einsatzmöglichkeiten setzt die umfassende Charakterisierung der Zellen voraus. Bisher konnten keine eindeutigen morphologischen und molekularen Parameter für SSCs festgelegt werden.

Ziel der molekularen Charakterisierung war u. a. die Suche nach Markern mit einer wichtigen Rolle in der späteren klinischen Umsetzung. So könnten Zelloberflächenmoleküle für Isolierung von Zellen und Stimulation über entsprechende Liganden während einer Zellkultur benutzt werden.

Methoden Zur Identifizierung spermatogonien-spezifischer Marker führten wir eine Mikroarray-Analyse an Hodenbiopsien von Patienten zweier definierter Testispathologien durch. Die Validation erfolgte mittels „real-time reverse transcription polymerase chain reaction“ und Immunhistochemie. Eine weitere Charakterisierung der Spermatogonien wurde mithilfe von Immunfluoreszenzmarkierungen durchgeführt.

Ergebnisse Für die Mikroarray-Analyse wurden Hodenbiopsien von Patienten mit 2 einheitlichen Erscheinungsformen des Keimepithels, modifizierter Johnsen-Score 2 (Sertoli-Zell-Syndrom) und modifizierter Johnson-Score 3 (Tubuli seminiferi mit Spermatogonien als einzige Keimzellen) benutzt. Das Hodengewebe wurde im Vorfeld mikroskopisch (Semidünnschnitttechnik und „trial testicular sperm extraction“ [Test-TESE]) analysiert und den entsprechenden Scores zugeordnet. Aus den nachfolgend gewonnenen Mikroarraydaten wurden unter Anwendung der Bonferroni-Korrektur 388 differentiell exprimierte Gene ermittelt, von denen einige auf mRNA-Ebene und auf Proteinebene validiert wurden. Die immunhistochemischen Untersuchungen ergaben, dass die Mikroarray-Analyse auch für die Detektion neuer Marker für normale humane Spermatogonien geeignet ist, da hier Biopsien von Patienten mit vollständiger Spermatogenese verwendet wurden.

Als Oberflächenmarker für Spermatogonien wurden der Wachstumsfaktorrezeptor FGFR3 („fibroblast growth factor receptor“ 3), ein single pass Typ 1 Membranprotein, sowie das desmosomale Cadherin Desmoglein 2 (DSG2) nachgewiesen.

Kolokalisationen spermatogonialer Marker ergaben einen hohen Grad an Heterogenität innerhalb der spermatogonialen Zellpopulation und keine einfache Korrelation mit der klassischen A-dark- und A-pale-Morphologie.

Schlussfolgerung Die Mikroarray-Analyse mit nachfolgender Validation führte zur Detektion spermatogonien-spezifischer Marker. Aufgrund der Untersuchung von Spermatogonien in situ wurde der Gesamtzustand des Hodengewebes nach Erscheinen dieses Zelltyps erfasst.

Die Zelloberflächenmarker FGFR3 und DSG2 könnten für die Isolierung von Spermatogonien bzw. SSCs aus Hodengewebe sowie deren Proliferation und Differenzierung in Kultur relevant sein. Deshalb sollte man diese Proteine als Kandidaten für Anreicherung und Isolation von Spermatogonien und möglicherweise spermatogonialer Stammzellen betrachten.

Immunfluoreszenz-Mehrfachmarkierungen könnten zum Auffinden spermatogonialer Subpopulationen dienen.

■ Transsexualität

37

Meshgraft-Neovagina bei Transsexualismus

M. Katzer, S. Wagner, P. Fornara
Universitätsklinik und Poliklinik für Urologie,
Universitätsklinikum Halle

Fragestellung Eine unzureichende Tiefe und Weite der Neovagina stellt ein häufig beklagtes Kohabitationshindernis bei Mann-zu-Frau-Transsexualismus dar. Ungünstige Ausgangssituationen, Voroperationen, postoperative Komplikationen, und unzureichende Eigendilatation der Neovagina sind wichtige Ursachen dafür. Die Möglichkeiten und Grenzen der Neovagina-Anlage mit Meshgraft sollen dargelegt werden.

Methoden In den vergangenen 3 Jahren führten wir an 6 Patientinnen, die z. T. bei uns und z. T. auswärts bei MzF-Transsexualismus genitaloperiert worden waren, eine Neovagina-Rekonstruktion mit Meshgraft durch. Wir evaluierten die klinischen und postklinischen Verläufe.

Ergebnisse Neben der operativen Technik und dem postoperativen Management stellt die langfristige regelmäßige Eigendilatation der Neovagina durch die Patientin einen wichtigen Faktor für den Erfolg der Neovagina-Anlage bzw. -Vertiefung mit Meshgraft dar.

Schlussfolgerung Motivation und Zuverlässigkeit der Patientin sind wichtig für die Indikationsstellung zur Neovagina-Rekonstruktion mittels Meshgraft.

38

Abweichende Befunde bei Transsexualismus

M. Katzer, S. Wagner, P. Fornara
Universitätsklinik und Poliklinik für Urologie,
Universitätsklinikum Halle

Fragestellung Abweichende körperliche Befunde wurden im Zusammenhang mit Transsexualismus wiederholt in Einzelfällen beschrieben. Gesucht werden Angaben zur Häufigkeit solcher abweichender Befunde.

Methoden Die Befunde aller 21 Patienten, die sich 2009 in unserer Transsexualismus-Sprechstunde vorstellten, wurden gesichtet.

Ergebnisse Über 40 % der Patienten zeigten körperliche geschlechtliche Abweichungen, die keine Folge einer stattgehabten Transsexualismus-Behandlung waren, sondern vorbestanden hatten. Diese Häufung weicht signifikant von Beschreibungen der Normalbevölkerung ab.

Schlussfolgerung Hinsichtlich körperlicher Abweichungen ist verstärkte Aufmerksamkeit und Sorge geboten, u. a. um den Bedürfnissen der Patienten gerecht zu werden und vermeidbar ungünstige Verläufe zu verhindern.

Autorenindex

(nur Erstautoren)

A		J		S	
Adam M.	446	Jezeck D.	446	Schagdarsurengin U.	439
Albrecht K.	438			Schanz S.	447
B		K		Schlatt S.	444
Bergmann M.	448	Kampfer C.	445	Schmidt S.	441
Bongers R.	437	Katzer M.	449 (2×)	Schuppe H.-C.	444
F		Kopylow K. von	449	Siebert S.	445
Fietz D.	438	Kulchavenya E.	443	Spiess A.-N.	437
Fijak M.	444			Spinnler K.	448
Fink C.	442	M		T	
Furchert S.	442	Martinschek A.	436 (2×)	Tok A.	447
G				Tüttelmann F.	440
Gottardo F.	443	P		W	
Grzmil P.	440	Paasch U.	438	Wapelhorst B.	439
H		Paradowska A.	441	Welter H.	446
Hinsch E.	447	Pilatz A.	436	Westernströer B.	442
		Pöschke A.	440	Wieczerek K.	440
		Potthoff A.	443		

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](#)