

**DIE EXPRESSION VON STEROID- UND GONADOTROPIN-  
REZEPTOR mRNA IM HODEN VOM SCHWEIN UNTER  
BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER  
ÖSTROGENREZEPTOREN (ER- $\alpha$ , ER- $\beta$ )**

**OKSANA LEKHKOTA**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

---

*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

---

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Martin Bergmann

**Die Expression von Steroid- und Gonadotropinrezeptor mRNA im Hoden  
vom Schwein unter besonderer Berücksichtigung der Östrogenrezeptoren  
(ER- $\alpha$ , ER- $\beta$ )**

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Oksana Lekhkota**  
Tierärztin aus Brazhynzi / Ukraine

Gießen 2007

Gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft  
(BE 1016.6-1)

---

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M Reinacher

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Bergmann
2. Gutachter: Apl. Prof. Dr. G. Schuler

Tag der Disputation: 28. Juni 2007

Meiner Familie  
(моїй сім'ї)



INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG .....	1
2	LITERATURÜBERSICHT .....	2
2.1	Anatomie und Histologie des männlichen Genitaltraktes beim Eber .....	2
2.2	Lage und Aufbau des Hodens beim Eber .....	2
2.2.1	Histologie des Hodens .....	6
2.2.1.1	Leydig-Zellen .....	6
2.2.1.2	Keimzellen .....	8
2.2.1.3	Sertoli-Zellen .....	8
2.3	Spermatogenese.....	12
2.3.1	Spermatogoniogenese .....	12
2.3.2	Spermatozytogenese .....	12
2.3.3	Spermiogenese .....	14
2.3.4	Kinetik der Spermatogenese .....	15
2.3.4.1	Stadien der Spermatogenese beim Eber.....	15
2.3.4.2	Dauer der Spermatogenese .....	19
2.4	Die endokrine Regulation der Hodenfunktion.....	20
2.4.1	Das Hypothalamus-Hypophysen-System.....	20
2.4.2	Endokrine Steuerung der Spermatogenese .....	20
2.4.3	Das gonadotropinfreisetzende Hormon (GnRH) .....	23
2.4.4	Die Gonadotropine .....	24
2.5	Testikuläre Steroidbiosynthese .....	26
2.5.1	Syntheseort und Synthese .....	26
2.5.2	Androgene .....	29
2.5.3	Östrogene .....	31
2.5.3.1	Wirkungen der Östrogene.....	32
2.5.3.2	Östrogenrezeptoren.....	32
2.5.3.3	Die zelluläre Lokalisation von Östrogenrezeptoren .....	34
2.5.3.3.1	Expressionsregulation von Östrogenrezeptoren.....	34
3	ZIELE DER ARBEIT .....	35
4	MATERIAL UND METHODEN .....	36
4.1	Versuchsaufbau .....	36
4.2	Gewebe.....	39

4.3	Methoden .....	39
4.3.1	Nachweis der Expression von Steroid- und Gonadotropinrezeptoren mRNA mittels Reverse-Transkriptase- Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	40
4.3.1.1	RNA-Extraktion und -Isolation aus Gefriermaterial .....	40
4.3.1.1.1	Aufarbeitung des Gewebes .....	40
4.3.1.1.2	RNA-Extraktion aus Gesamthomogenat.....	40
4.3.1.1.3	Isolation von RNA.....	42
4.3.1.2	Durchführung der RT-PCR .....	44
4.3.1.2.1	Primer.....	44
4.3.1.2.2	Probeninterne Kontrolle .....	44
4.3.1.2.3	RT-PCR.....	45
4.3.1.2.4	Analyse der PCR-Produkte durch Agarose- Gelelektrophorese (DNA-Gel).....	47
4.3.2	Nachweis der zellulären Lokalisation der Rezeptoren mittels In situ Hybridisierung (ISH).....	49
4.3.2.1	Herstellung histologischer Schnittpräparate für die ISH .....	49
4.3.2.1.1	Fixation in Bouin`scher Lösung .....	49
4.3.2.1.2	Entwässerung der Proben .....	49
4.3.2.1.3	Einbettung der Proben.....	50
4.3.2.1.4	Beschichtung der Objektträger .....	50
4.3.2.1.5	Herstellung von Paraffinschnitten .....	50
4.3.2.1.6	Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	50
4.3.2.2	Herstellung von Digoxigenin-markierten cRNA-Sonden .....	51
4.3.2.2.1	Aufreinigung des PCR-Fragmentes.....	51
4.3.2.2.2	Klonierung .....	51
4.3.2.3	In situ Hybridisierung .....	56
4.3.3	Nachweis der zellulären Lokalisation der Rezeptoren mittels in situ RT-PCR .....	59
4.3.3.1	In situ RT-PCR .....	59
4.3.4	RT-PCR nach Ultraviolett-Laser-assistierter Mikrodisektion (UV- LACP) .....	62
4.3.4.1	Herstellung histologischer Schnittpräparate (Gefrierschnitte) für UV-LACP.....	62



4.3.4.1.1	Vorbereitungen .....	62
4.3.4.1.2	Beschichtung der Objektträger .....	62
4.3.4.1.3	Herstellung von Gefrierschnitten .....	62
4.3.4.1.4	Fixation der Gefrierschnitte für UV-LACP .....	63
4.3.4.1.5	Ablauf der UV-LACP .....	63
4.3.4.1.6	Extraktion der RNA .....	64
4.3.4.1.7	RT-PCR .....	65
4.3.5	Semiquantitative Real Time PCR .....	67
4.3.5.1	Auswertung .....	69
4.3.5.2	Statistische Verfahren .....	70
4.4	Materialien .....	72
4.4.1	RT-PCR .....	72
4.4.2	ISH .....	72
4.4.3	In situ RT-PCR .....	74
4.4.4	UV-LACP .....	74
4.4.5	Real Time PCR .....	74
5	ERGEBNISSE .....	75
5.1	Histologische Evaluierung .....	75
5.2	Nachweis der Expression von Steroid- und Gonadotropinrezeptor mRNA mittels RT-PCR an Gesamthomogenat .....	77
5.2.1	Nachweis der ER- $\alpha$ und ER- $\beta$ mRNA .....	77
5.2.2	Nachweis der LHR, AR, FSHR mRNA .....	78
5.3	Ergebnisse der Sequenzierung .....	80
5.3.1	Östrogenrezeptor- $\alpha$ cDNA und Plasmid .....	80
5.3.2	Östrogenrezeptor- $\beta$ cDNA und Plasmid .....	80
5.4	Nachweis der zellulären Lokalisation der Östrogenrezeptoren mRNA mittels ISH und in situ RT-PCR .....	81
5.4.1	Nachweis der Östrogenrezeptor- $\alpha$ mRNA .....	81
5.4.2	Nachweis der Östrogenrezeptor- $\beta$ mRNA .....	84
5.5	RT-PCR nach UV-LACP .....	86
5.5.1	Nachweis der Östrogenrezeptor- $\alpha$ mRNA-Expression .....	86
5.5.2	Nachweis der Östrogenrezeptor- $\beta$ mRNA-Expression .....	88
5.6	Real Time PCR .....	89
5.6.1	RT-PCR .....	89

5.6.2	Auswertung der Real Time PCR .....	90
6	DISKUSSION.....	91
6.1	Histologische Befunde .....	91
6.2	Die zelluläre Lokalisation der ER- $\alpha$ und ER- $\beta$ mRNA .....	92
6.3	Die Regulation der Rezeptorexpression.....	97
7	ZUSAMMENFASSUNG .....	101
8	SUMMARY .....	103
9	LITERATURVERZEICHNIS .....	104
10	ANHANG .....	123
10.1	Ergebnisse der Sequenzierung.....	125
10.2	Real Time PCR .....	128
11	BEZUGSQUELLEN.....	135
11.1	Substanzen und Reagenzien .....	135
11.2	Geräte .....	138
11.3	Sonstige Materialien.....	139
11.4	Software.....	140
12	VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN .....	141
13	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS .....	144

### 1 Einleitung

Es ist bekannt, dass der Hoden germinative und endokrine Aufgaben erfüllt. Im grundlegenden Ablauf der Spermatogenese und ihrer endokrinen Regulation treten beim Eber einige reproduktionsphysiologische Besonderheiten auf.

Eber weisen einen besonders hohen Anteil an Interstitialgewebe am Gesamtvolumen des Hodens auf (Groth & Claus, 1977). Im Vordergrund steht die Synthese von Steroiden.

In den Leydig-Zellen wurde die Synthese von Testosteron beschrieben (Colenbrander et al., 1978), wobei dieses Steroidhormon nicht nur rein endokrin, sondern auch parakrin auf die Sertoli-Zellen wirkt und über diese indirekt in die germinative Funktion der Spermienbildung eingreift (Vornberger et al., 1994; Kotula et al., 2000). Eine Aromatisierung von Androgenen findet beim Eber im Gegensatz zu anderen Spezies in den Tubuli nicht statt (Raeside & Renaud, 1983). Es ist jedoch nicht bekannt, ob die Leydigzell-Aromatase, ähnlich wie die Aromatase in den Follikelzellen, durch Follikel-Stimulierendes-Hormon (FSH) stimuliert wird. Weiterhin bildet der Eber kein Androgen bindendes Protein (ABP) in den Sertoli-Zellen (Ritzen et al., 1975; Jegou & Le Gac-Jegou, 1978).

Neben dem Testosteron werden in den Leydig-Zellen des Ebers bedeutende Östrogenmengen synthetisiert (Claus & Hoffmann, 1980). Es ist bekannt, dass diese hohen Östrogenkonzentrationen die Bedeutung für die Ausbildung des Sexualverhaltens haben (Booth 1988, Parrott & Booth, 1984). Im weiblichen Genitaltrakt beschleunigen die testikulären Östrogene durch ihre kontraktionsfördernden Eigenschaften den Spermientransport und beeinflussen den Ovulationszeitpunkt bei der Sau. (Claus, 1990).

Ihre Rolle für die Spermatogenese beim Eber ist allerdings nicht bekannt.

Ziel vorliegender Arbeit war daher der Nachweis der Steroid- und Gonadotropinrezeptor mRNA Expression im Eberhoden.

Im Hinblick auf die Zuordnung der Rezeptor exprimierenden Zellen, fokussiert die vorliegende Arbeit auf den Nachweis der zellulären Lokalisation der Östrogenrezeptoren. Außerdem soll erfasst werden inwieweit eine 17 $\beta$ -Estradiol-Infusion Auswirkungen auf die Expression von testikulären Steroid- und Gonadotropinrezeptoren nach einer GnRH-Immunisierung bei Ebern haben.

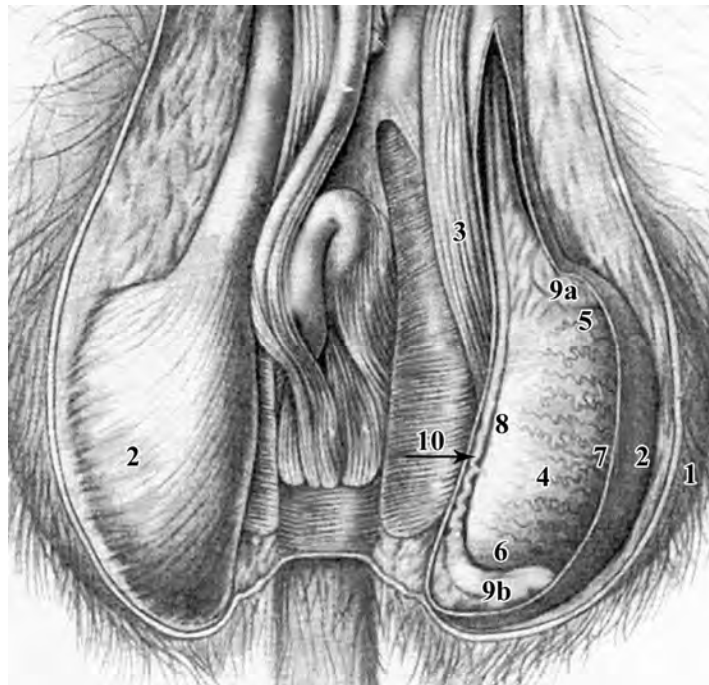
## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Anatomie und Histologie des männlichen Genitaltraktes beim Eber

Der männliche Genitaltrakt besteht aus den Hoden als keimbereitenden Organen, den Nebenhoden, sowie den Samenleitern als keimleitenden Organen. Dazu gehören auch die akzessorischen Geschlechtsdrüsen, deren Sekrete die charakteristische Zusammensetzung des Seminalplasmas bestimmen, sowie dem zur Begattung dienenden Penis. Der Hoden stellt die Bildungsstätte der Spermien dar, der Nebenhoden der Ort der Spermienreifung und -speicherung (Sinowatz, 2001).

### 2.2 Lage und Aufbau des Hodens beim Eber

Der Aufbau des Hodens ist für die verschiedenen Säugetierspezies ähnlich (Wrobel, 1990; Johnson et al., 1999; Sinowatz, 2001; Gasse, 2004). Abbildung 1 gibt einen schematischen Überblick.



**Abb. 1:** Anatomie von Hoden und Nebenhoden des Ebers (modifiziert nach Gasse, 2004). 1-Scrotum, 2-Processus vaginalis, 3-Musculus cremaster, 4-Hoden, 5-Extremitas capitata, 6-Extremitas caudata, 7-Margo liber, 8-Margo epididymis, 9a-Kopf und 9b-Schwanz des Nebenhodens, 10-Ductus deferens.

Der Hoden und der Nebenhoden liegen in den Hodenhüllen und dem Skrotum. Der Hoden besitzt eine ei- oder kugelförmige Gestalt. Der Speziesvergleich ergibt keine Korrelation von Körper- und Hodengröße. So besitzen Eber, Ziegenbock und Widder relativ grosse, Fleischfresser dagegen auffallend kleine Hoden. Innerhalb einer Spezies jedoch sind Körpergröße (Körpergewicht) und Hodengröße (Länge, Breite) grundsätzlich positiv korreliert. Ein Hoden kann bei einem ausgewachsenen Eber ein Gewicht von bis zu 500 g erreichen.

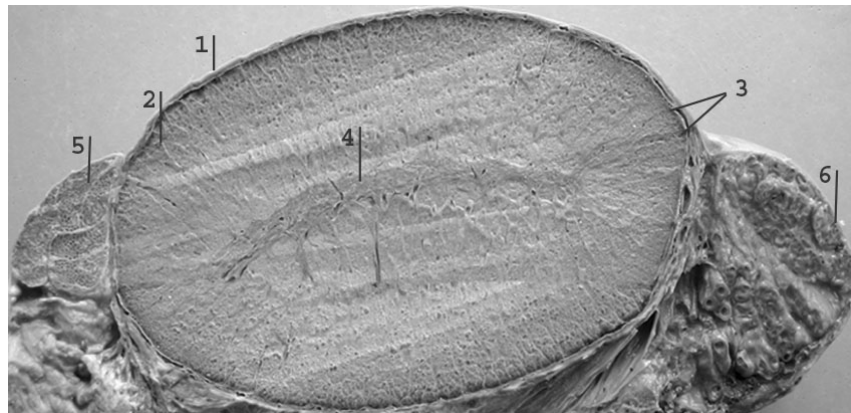
Das Skrotum besteht aus der äußeren Haut, der muskulös elastischen Tunica dartos und der zweischichtigen Fascia spermatica externa. Die Tunica dartos bildet das Septum Scroti, welches das Skrotum und beide Hoden trennt. An der äußeren Haut stellt sich das Septum Scroti als Raphe scroti dar.

Die Fascia spermatica externa liegt dem Musculus cremaster an und zieht sich beim Eber als flaches Band an der lateralen Seite des Processus vaginalis vorbei. Der Musculus cremaster ist von der Fascia cremasterica bedeckt. Die Fascia spermatica interna und die Lamina parietalis des Processus vaginalis werden von den beiden inneren Schichten des Scrotums gebildet.

Generell umschließt die paarig angelegten Hoden eine starke fibrose, kollagenfaserreiche Organkapsel (Tunica albuginea), welche mit einem Teil des Bauchfells, (Lamina visceralis) das ebenfalls das Hodenparenchym überzieht, verwachsen ist (dieser Teil wird während des embryonalen Hodenabstiegs mit in das Skrotum überführt) und den Hoden unter Druck hält. In der Tunica albuginea sind Gefäßäste der Arteria (A) testicularis und Anastomosen der Vena (V) testicularis eingelagert. Ausgehend von der Organkapsel, strahlen Bindegewebssepten (Septula testis) in das Hodenparenchym ein, wo sie zentral einen axial durch das Organ verlaufenden Bindegewebskörper, das Mediastinum des Hodens, bilden. Durch diese Septenbildung wird der Hoden in mehrere Läppchen, die Lobuli testis, unterteilt (Abb. 2). Über diese Läppchen gelangen die über die Tunica albuginea eintretenden Blutgefäße (A. und V. testicularis), sowie Nervenfasern in das Hodenparenchym. Das Mediastinum ist beim Eber sowie bei vielen Haussäugetieren (z.B. Rüden, Bulle) zentral ausgebildet. Ausnahmen sind: der Hengst, der Kater, die Nagetiere, der Mensch und Primaten, bei denen das Mediastinum nur in der Extremitas capitata gebildet wird.

Im Mediastinum enden die Samenkanälchen des Hodens und bilden das Hodennetz (Rete testis), aus dem die Ausführungsgänge (Ductuli efferentes) in den Nebenhoden ziehen.

Die Hodenläppchen bestehen aus in Gruppen liegenden, dreifach gewundenen Samenkanälchen, den Tubuli seminiferi contorti. Die Samenkanälchen verlaufen in Richtung Mediastinum. Kurz vor Erreichen desselben werden sie zu geraden Ausführungsgängen (Tubuli recti) und verzweigen sich, durch Anastomosen verbunden, in das Hodennetz. Man unterscheidet septale und mediastinale Tubuli recti. Die septalen Tubuli recti verlaufen konvergierend und verbinden dabei die Tubuli seminiferi contorti mehrerer Hodenläppchen miteinander. Die mediastinalen Tubuli recti ziehen radiär zum Mediastinum und münden dort in das Rete testis.



**Abb. 2:** Darstellung von Hoden und Nebenhoden des Ebers. 1-Tunica albuginea, 2-Septula testis, 3-Lobuli testis, 4-Mediastinum mit Rete testis, 5-Kopf und 6-Schwanz des Nebenhodens.

Im Interstitium des Hodenparenchyms befinden sich die Leydig-Zellen, die Blutgefäße, sowie Nervenbahnen und Lymphgefäße.

Die Blutversorgung des Hodens erfolgt über die A. testicularis. Sie verläuft in der Tunica albuginea und den zum Mediastinum verlaufenden Bindegewebssepten und gelangt so in das Interstitium des Hodenparenchyms. Hier verzweigt sie sich bis auf Kapillargröße und kehrt, die Tubuli umwindend, wieder zur Tunica albuginea zurück. Der venöse Blutabfluss erfolgt über die V. testicularis, welche aus von den Tubuli kommenden Kapillaren in der Tunica albuginea zusammenfließt. Durch den Plexus pampiniformis wird ein Temperaturgefälle des Blutes in Richtung Hoden, welches zur Aufrechterhaltung einer intakten

Spermatogenese essentiell ist, sichergestellt. Dieser besteht aus sich umeinander windenden Arterien und Venen, so dass vom Hoden kommendes „kaltes“ venöses Blut für die Abkühlung des vom Körper kommenden arteriellen „warmen“ Blutes sorgt. Die den Hoden versorgenden Nervenbahnen verlaufen parallel zu den Blutgefäßen und sind überwiegend sympathischen Ursprungs. Die Nervenfasern enden wie die Blutgefäße auch zwischen den Tubuli im Interstitium des Hodenparenchyms.

Ebenfalls aus dem Interstitium des Hodenparenchyms kommend, verlaufen lymphatische Gefäße über die Bindegewebssepten des Hodenparenchyms zu der Tunica albuginea und leiten die Lymphe bis in die nahe der Aorta liegenden Lymphknoten.

Der Hoden ist über mehrere Bänder im Scrotum fixiert. So ist der Hoden mit dem Nebenhoden über das Ligamentum testis proprium von der Extremitas capitata testis zum Schwanz des Nebenhodens verbunden. Das Ligamentum caudae epididymis wiederum befestigt den Nebenhodenschwanz am Fundus des Processus vaginalis. Beide Bänder sind Anteile des Gubernaculum testis, das als Leitband des Hodens während des Descensus testis dient. Desweiteren wird der Hoden durch eine doppellagige Serosalamelle gehalten; sie verbindet die Lamina parietalis der Tunica vaginalis mit der den Hoden umhüllenden Lamina visceralis. Von dieser als Mesorchium bezeichneten Serosa, die insbesondere bei jungen Ebern sehr lang ist, spaltet sich eine weitere Lamelle ab, die als Mesepididymis an den Nebenhoden zieht. Sie teilt dabei das Mesorchium in einen proximalen und distalen Anteil. Mesorchium und Mesepididymis bilden gemeinsam auf der lateralen Hodenseite eine Tasche, die Bursa testicularis (Übersicht bei Wrobel, 1998; Sinowatz, 2001; Gasse, 2004).

### **2.2.1 Histologie des Hodens**

Das Hodenparenchym selbst enthält zwei Hodenkompartimente:

- das tubuläre- (Samenkanälchen) und
- das interstitielle Kompartiment (Interstitium).

Im Samenkanälchen befinden sich die Keimzellen und somatische Sertoli-Zellen. Im interstitiellen Kompartiment finden sich als wichtigster Zelltyp die Testosteron produzierenden Leydig-Zellen, sowie lockeres Bindegewebe, Makrophagen, Blutgefäße, Nerven und Lymphgefäße. Auf 10-50 Leydig-Zellen kommt je ein Makrophage. Möglicherweise sind die Makrophagen an der Steuerung der Proliferation und Differenzierung und der Steroidproduktion der Leydig-Zellen über die Sekretion von Zytokinen beteiligt. Makrophagen sezernieren sowohl Stimulatoren als auch Inhibitoren der Steroidogenese (Übersicht bei Sinowatz, 2001).

#### **2.2.1.1 Leydig-Zellen**

Die von Franz Leydig im Jahre 1850 beschriebenen Zellen produzieren und sezernieren die Steroidhormone. Nach dem morphologischen Erscheinungsbild werden zwei Typen von Leydig-Zellen unterschieden: immature und adulte Zellen (Chemes, 1996). Immature Leydig-Zellen sind im Vergleich zu denen des adulten Typs, sehr selten und die physiologische Bedeutung dieser Zellen ist nicht eindeutig geklärt. Möglicherweise fungieren sie als Reservezellen, da im Tierexperiment nach Elimination der adulten Leydig-Zellen wiederum eine Population adulter Zellen rekrutiert wird (Teerds, 1996). Adulte Leydig-Zellen sind reich an glattem endoplasmatischem Retikulum und Mitochondrien mit tubulären Cristae. Diese zytologischen Charakteristika sind typisch für eine Steroidhormon-produzierende Zelle.

Der Hodenparenchymanteil am Zwischengewebe und damit Leydig-Zellen ist unterschiedlich ausgeprägt. Sie liegen je nach Tierart in unterschiedlicher Anzahl, in kleinen und größeren Gruppen zusammen. Dabei haben sie meist Kontakt zu Blutgefäßen, können aber auch an der Wand den Tubuli seminiferi als elongierte spindelförmige Zellen liegen. Ihr prozentualer Anteil am Hodengewebe beträgt beim Eber ca. 25 %, beim Rind ca. 5 %, bei Hund und Katze ca. 15 % (Wrobel, 1990).



Diese anatomisch-histologischen Unterschiede lassen auf unterschiedliche Hormonsyntheseleistungen schließen. Beim Eber stehen Östrogene, Testosteron sowie steroidale Pheromone im Vordergrund (Claus & Hoffmann, 1980; Bamberg, 1994 b; Claus, 1994).

### 2.2.1.2 Keimzellen

Die Tubuli seminiferi contorti bestehen aus einer Wand (Lamina propria) und dem Keimepithel. Die Lamina propria setzt sich aus 4-5 Lagen kontraktiler myoider Zellen (Myofibroblasten), Fibroblasten und kollagener Fasern zusammen und ist durch eine Basallamina gegen das Keimepithel abgegrenzt.

Das Keimepithel besteht aus:

- Keimzellen (Cellulae spermogenicae) und
- Stützzellen (Epitheliocyti sustentantes, Sertoli-Zellen).

Keimzellen differenzieren sich in Keimepithel aus embryonal eingewanderten Primordialkeimzellen (Urkeimzellen) in engem räumlichem Kontakt zu Sertoli-Zellen. Die Keimzellen durchlaufen Vermehrungs- und Reifungsphasen, an deren Ende Spermatozoen (Spermien) in das Lumen der Hodenkanälchen abgegeben werden. Diese erhalten auf ihrem Weg durch die inneren männlichen Geschlechtsorgane ihre endgültige Reife. Befruchtungsfähig werden die Samenzellen erst im weiblichen Geschlechtsapparat. Die Vermehrung und Differenzierung der Keimzellen wird hormonell gesteuert (Kap.2.4.2).

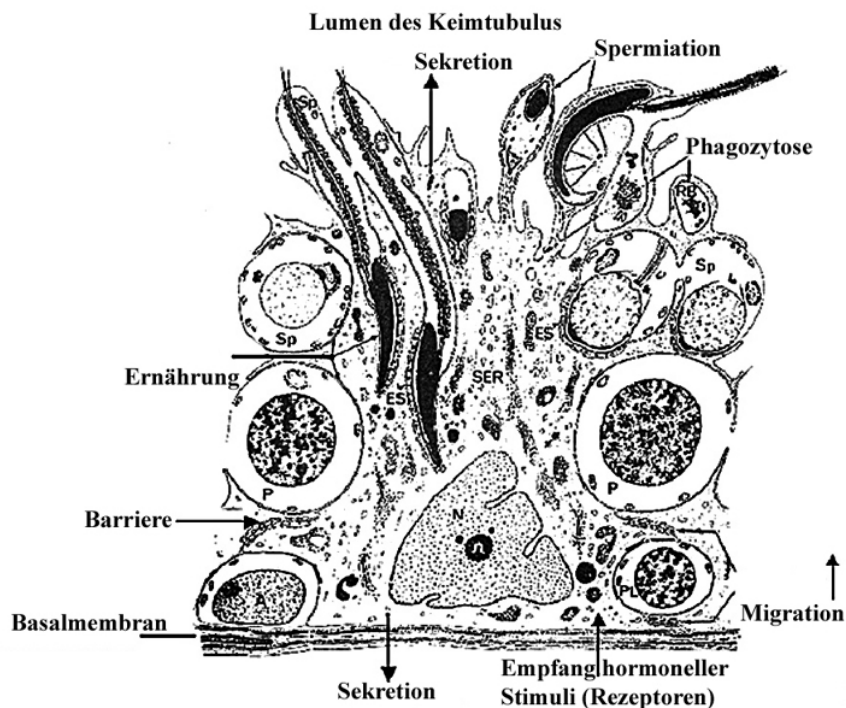
### 2.2.1.3 Sertoli-Zellen

Die Sertoli-Zellen sind postmitotische, hochprismatische Zellen, die von der Basallamina bis zum Tubuluslumen reichen. Sie wurden im Jahre 1865 von Enrico Sertoli entdeckt und beschrieben. Adulte Sertoli-Zellen besitzen einen großen, unregelmäßig konturierten, gelappten Zellkern, der im basalen Drittel der Zelle oberhalb der Spermatogonien liegt und einen dreigeteilten Nucleolus aufweist (Abb. 3). Die Eber weisen durchschnittlich  $4 - 15 \times 10^9 \pm 1,3$  Sertoli-Zellen je Tier auf (Okwun et al., 1996).

Die somatischen Sertoli-Zellen machen während ihrer fetalen, postnatalen und pubertären Entwicklung einen komplexen Differenzierungsprozess durch, der mit einer Vielzahl morphologischer, chemischer und metabolischer Veränderungen einhergeht (Pelliniemi et al., 1993; Gondos & Berndston, 1993; Bardin et al., 1994; de Kretser & Kerr, 1994). Dieser geordnet ablaufende Differenzierungsprozess wird kurz vor der Pubertät abgeschlossen (Gondos & Berndston, 1993). Zu den wichtigsten Hormonen, die direkten Einfluß auf die Entwicklung, Differenzierung und Reifung der Sertoli-Zellen nehmen, gehören das FSH und

Testosteron (Gondos & Berndston, 1993; Griswold, 1993; Pelliniemi et al., 1993). Auch andere Hormone, Wachstumsfaktoren, Metalloproteine, Vitamine, sowie parakrine Faktoren und Zellen (Leydig-Zellen, peritubuläre Zellen, Keimzellen) können auf direktem oder indirektem Wege für das Wachstum von Sertoli-Zellen und den Erhalt ihrer verschiedenen Funktionen verantwortlich gemacht werden (Griswold, 1993; Skinner, 1993 a, b; Bardin et al., 1994; Guraya, 1998).

Die adulten Sertoli-Zellen haben insgesamt mehrere wichtige Funktionen zu erfüllen (Abb 3).



**Abb. 3:** Keimepithel des Hodens mit Sertoli-Zelle und Keimzellen sowie verschiedener Sertoli-Zellfunktionen (modifiziert nach Clermont, 1993).

*a. Bildung der Blut-Hoden-Schranke, Schutzfunktion und Migration*

Alle Keimzellen außer den Spermatogonien, die mit einem mehr oder minder großen Areal direkt auf der Basalmembran der Samenkanälchen sitzen, werden von Sertoli-Zellen umschlossen. Dadurch entsteht um die Keimzellen ein ganz spezifisches Mikromilieu, durch das der Ablauf der Spermatogenese maßgeblich beeinflusst wird (Rüsse & Sinowatz, 1998). Benachbarte Sertoli-Zellen sind in ihrem basalen Drittel durch Zonulae occludentes, bzw. „tight

junctions“ eng miteinander verbunden. Diese Zell-zu-Zell-Verbindungen, die durch Fusion der Zellmembranen eng aneinander liegender Sertoli-Zellen entstehen, verschließen den Interzellularspalt vollständig und bilden das wichtigste morphologische Äquivalent der sogenannten Blut-Hoden-Schranke (Schulze, 1984). Hierbei handelt es sich um eine sehr effektive Diffusionsbarriere zwischen dem basalen Kompartiment des Keimepithels, in dem Spermatogonien und präleptotäne Spermatozyten I zu finden sind und dem adluminalen Kompartiment, in dem sich die weiter fortgeschrittenen Keimzellstadien der Meiose und Spermiogenese befinden. Die wichtigste Funktion der Blut-Hoden-Schranke ist die einer immunologischen Barriere, da die Keimzellen ab dem Stadium des Pachytäns Oberflächen-Antigene exprimieren, und dadurch für das Immunsystem als fremd erkannt werden.

*b. Stützfunktion, Ernährung der Keimzellen und Sekretion*

Die Sertoli-Zellen durchziehen das gesamte Keimepithel von der Basalmembran bis zum Lumen des Tubulus. Mit seitlichen Fortsätzen schieben sie sich zwischen der Keimzellen und füllen die Räume zwischen den Keimzellen vollständig aus. Als Stützzellen übernehmen sie eine rein mechanische Aufgabe, indem sie als Gerüst der Stabilität der Keimzellen im Keimepithel dienen. Die zahlreichen Zell-Zell-Kontakte unterstützen diese Funktion. Es ist bekannt, dass Sertoli-Zellen neben verschiedenen anorganischen Ionen auch Inositol, Glutamat, Laktat sowie ABP (jedoch nicht beim Eber) und das auf die adenohipophysären Gonadotropinproduzenten rückwirkende Inhibin synthetisieren. Durch das von Sertoli-Zellen gebildete Inhibin wird die Freisetzung von FSH aus dem Hypophysenvorderlappen gehemmt. Sertoli-Zellen besitzen wiederum FSH-Rezeptoren und können somit über komplexe Signalkaskaden hormonelle Stimuli auf die Keimzellen übertragen, die keine Rezeptoren für FSH besitzen (Böckers et al., 1994). FSH spielt bei der fetalen Induzierung der Sertoli-Zellproliferation eine entscheidende Rolle (Übersicht bei Griswold et al., 1977; Orth, 1984; Orth & Boehm, 1990).

*c. Übertragung hormoneller Stimuli auf die Keimzellen*

Es ist bekannt, dass die somatischen Sertoli-Zellen, die interstitiellen Leydig-Zellen und auch die peritubulären Zellen Androgenrezeptoren besitzen, (Suarez-Quian et al., 1999; Regadera et al., 2001), welche die hormonellen Stimuli über parakrine Faktoren an die Keimzellen übertragen.

*e. Phagozytosefunktion*

Die Sertoli-Zellen verfügen über absorptive Fähigkeiten. Sie phagozytieren vor allem im Verlauf der Spermiogenese degenerierende Spermatozyten, Spermatiden und anfallende Zytoplasmarestkörper der Spermatiden die sie mit Hilfe lysosomaler Enzyme aufschliessen (Jegou, 1992).

*f. Spermiation*

Die periodische Freisetzung der zunächst noch durch spezielle Zellverbindungen an der Sertoli-Zelle gebundenen Spermien in das Tubuluslumen wird als Spermiation bezeichnet. Die Auflösung der tubulobulbären Komplexe oder der ektoplastischen Spezialisierungen zwischen Spermatiden bzw. Spermien und Sertoli-Zellen läuft unter aktiver Mitwirkung der Sertoli-Zellen (Russell, 1993 a, b).

Durch die Ausbildung der tubulobulbären Komplexe verankern sich die elongierten Spermatiden in der Sertoli-Zelle und verhindern eine zu frühe Abgabe in das Tubuluslumen. Zusätzlich wird durch die tubulobulbären Komplexe die Aufnahme von überschüssigem Zytoplasma und von Zellmembranbestandteilen durch die Sertoli-Zelle vereinfacht (Kojima, 1990). Demnach werden die von den Sertoli-Zellen ausgehenden ektoplastischen Spezialisierungen kurz vor der Spermiation abgebaut und durch von den Spermatiden ausgehende tubulobulbäre Komplexe ersetzt (Übersicht bei Mruk & Cheng, 2004).

## **2.3 Spermatogenese**

Die Spermatogenese ist ein streng koordinierter und kontrollierter Zellproliferations- und Zelldifferenzierungsprozess mit dem Ziel einer möglichst kontinuierlichen Produktion einer Vielzahl von befruchtungsfähigen Spermien. Sie ist in drei Entwicklungsphasen zu unterteilen: Spermatogoniogenese, Spermatozytogenese und Spermiogenese.

### **2.3.1 Spermatogoniogenese**

Die Entwicklung der Spermien nimmt ihren Ausgang von Primordialkeimzellen. Zwischen der frühen Embryonalzeit und dem adulten Zustand durchlaufen diese Zellen verschiedene Vermehrungsphasen, in denen sie als Gonozyten, Prospermatogonien und schließlich als Spermatogonien bezeichnet werden (Rüsse & Sinowatz, 1998). Die Spermatogonien von Säugetieren können aufgrund ihrer topographische Beziehung zur Basallamina und anhand von morphologischen Unterschieden, wie der Größe des Zellkerns, der Verteilung von Eu- und Heterochromatin und der Zahl der Nukleoli in drei Haupttypen unterteilt werden (de Kretser & Kerr, 1994; Sinowatz, 2001):

- Spermatogonien Typ A
- Intermediäre Spermatogonien
- Spermatogonien Typ B.

Die A-Spermatogonien gelten als Stammzellen der Samenbildung. Die intermediären Spermatogonien und die B-Spermatogonien führen mitotische Teilungen durch.

### **2.3.2 Spermatozytogenese**

Typ B Spermatogonien entwickeln sich weiter und teilen sich mitotisch in die Spermatozyten erster Ordnung (Spermatozyten I, primäre Spermatozyten). Charakteristisch ist, dass die Spermatozyten und alle folgenden Stadien bis zu den Spermatischen durch Zytoplasmabrücken miteinander verbunden bleiben.

Die weitere Entwicklung der primären Spermatozyten besteht aus den Phasen: Präleptotän, Leptotän, Zygotän, Pachytän, Diplotän und Diakinese (Übersicht bei Wrobel, 1998, Sinowatz, 2001; Bergmann, 2006).

Die primären Spermatozyten beginnen, die meiotische Prophase zu durchlaufen. Die Prophase der Meiose beginnt mit der DNA Reduplikation -

*Präleptotän.* Präleptotäne Zellen sind histologisch kaum von Spermatogonien Typ B zu unterscheiden; sie haben jedoch keinen Kontakt zur Basallamina. Zellen, die das Präleptotän durchlaufen haben, sind diploid. Durch in der Prophase der Meiose ablaufende typische Vorgänge wie Kondensierung und Paarung der homologen Chromosomen, Chiasmabildung und „crossing over“ wird diese in verschiedene Phasen eingeteilt, die sich an typischen Kernformen unterscheiden lassen.

*Leptotän:* das Chromatin kondensiert und wird als Fäden sichtbar. Die Zellen haben runde Kerne und ein feinfaseriges Chromatin.

*Zygotän:* hier erfolgt die Paarung der homologen Chromosomen durch die Bildung des synaptomalen Komplexes. Die Zellen haben runde Kerne und ein grobfaseriges Chromatin.

*Pachytän:* Das Chromatin kondensiert weiter und es kommt zur Chiasmabildung mit „crossing over“- dem Austausch von genetischem Material zwischen den homologen Chromosomen. Die Zellen haben grosse runde Kerne und dicke kurze Chromatinstränge. Dies macht eine Differenzierung von frühen und späten pachytänen Spermatozyten möglich.

*Diplotän:* die Chromosomen trennen sich voneinander. Die Zellen haben grosse runde Kerne mit dicken kurzen Chromatinsträngen. Das Ende der Prophase markiert die *Diakinese*, in der sich die Kernmembran auflöst.

Während der Prophase nehmen die Zellkerne um etwa das dreifache an Größe zu. In den dann folgenden schnell ablaufenden Metaphase, Anaphase und Telophase reihen sich die gepaarten Chromosomen in der Äquatorialebene auf und werden zu den gegenüberliegenden Polen auseinandergezogen, wobei sich die Chromosomen auf die Tochterzellen aufteilen. Aus einer Spermatozyte I entstehen so zwei Spermatozyten zweiter Ordnung (Spermatozyten II, sekundäre Spermatozyten) mit einem heterochromatischen Zellkern. Sekundäre Spermatozyten treten ohne weitere DNA Synthesephase in die zweite meiotische Teilung ein und werden zu runden Spermatischen mit haploidem X - bzw. Y - Chromosomensatz. Mit der Bildung der Spermatischen ist der Prozess der Zellvermehrung abgeschlossen (Übersicht bei Sinowatz, 2001).

### 2.3.3 Spermiogenese

Dieser Prozess beinhaltet zeitgleich die Kondensation und strukturelle Ausformung des Zellkerns, die Entwicklung von Akrosom und Geißel und die Abstossung großer Zytoplasmaanteile (de Kretser & Kerr, 1994; de Kretser et al., 1998; Sinowatz, 2001).

Bei den meisten Säugetierspezies verändert sich die Position des Kerns während der Spermiogenese von zentral nach exzentrisch. Indem das Zytoplasma immer stärker zurückweicht, wird die von der Zellmembran umschlossene Kernfläche immer größer. Gemeinsam mit dieser Lokalisationsveränderung des Kerns findet eine fortschreitende Kondensation des Chromatins statt, so dass dieses schließlich zu einer kompakten Masse wird. Hierbei werden lysinreiche Histone gegen argininreiche, hodenspezifische Protamine ausgetauscht. In der späten Spermiogenese kommt es zur nahezu vollständigen Einstellung der Gentranskription innerhalb des Zellkerns. Während der Chromatinverdichtung verliert der Kern immer mehr an Volumen und bildet eine für jede Spezies charakteristische Form aus (Übersicht bei Steger, 2001).

Die Entwicklung des Akrosoms lässt sich in vier Phasen einteilen: Golgi-, Kappen-, Akrosomale- und Reifungsphase. Die *Golgiphase* ist gekennzeichnet durch die Bildung eines akrosomalen Bläschens (Vakuole) mit zentralem Granulum, das durch die Fusion zahlreicher vom Golgiapparat abgeschnürter primärer Lysosomen entsteht. Einige dieser Vakuolen vereinigen sich zum akrosomalen Vesikel. Es bewegt sich auf den Kern zu und lagert sich an die Kernmembran an.

In der darauf folgenden *Kappenphase* flacht sich die akrosomale Vakuole unter gleichzeitiger Verdichtung ihres Inhalts ab, das akrosomale Granulum entsteht. Die akrosomale Vakuole breitet sich zunehmend über den Kern der Spermatide aus und bildet so die Kopfkappe. In der *akrosomalen Phase* erfolgt nun die definitive Ausbildung des Akrosoms. Dieses enthält eine Reihe hydrolytischer Enzyme, die für die Auflösung der Corona radiata sowie der Zona pellucida der Eizelle notwendig sind. In dieser Phase beginnt auch die Kondensation des Zellkerns. Die *Reifungsphase* schließt die Entwicklung ab. Das Akrosom zieht sich langsam über einen großen Teil des Kerns und passt sich der Elongation des Zellkerns an.



Die Entwicklung der Geißel (Flagellum) beginnt, indem die Zentriolen der jungen runden Spermatide zur Zelloberfläche wandern, wo eines der beiden ein Axonem bildet. Das Flagellum wächst schnell in Richtung Tubuluslumen, wobei sein Zentriol wieder ins Zytoplasma hinein auf den Kern zuwandert. Die an ihm haftende Plasmamembran faltet sich dabei ein. Das Flagellum implantiert an der Kernmembran und zwar immer an dem Pol, der dem Akrosom gegenüberliegt. Zur vollständigen Ausdifferenzierung des Flagellums gehört das helikale Arrangement der Mitochondrien um das Mittelstück, die Formation von „dense fibres“ als Stützelemente im Mittel- und Endstück und die Stabilisierung des Endstückes durch fibröse Ringe. Die Spermatide reduziert ihr Volumen um etwa 75 %, bevor sie als Spermium mit der Spermiation in das Tubuluslumen entlassen wird. Zu diesem Zweck wird während des Elongationsprozesses zunächst Wasser aus dem Kern und dem Zytoplasma ausgeschleust. Dies erklärt die höhere Dichte, die diese Zellen im mikroskopischen Bild aufweisen. Außerdem wird Zytoplasma durch die immer wieder kurzfristig auftretenden tubulobulbären Komplexe am Kopf der Spermatide abgeschnürt und von Sertoli-Zellen phagozytiert (Übersicht bei Sinowatz, 2001).

### **2.3.4 Kinetik der Spermatogenese**

Durch den synchronisierten Ablauf der Spermatogoniogenese, Spermatozytogenese und Spermiogenese entwickelt sich im geschlechtsreifen Hoden ein aus verschiedenen Zelltypen und mehreren Zellgenerationen bestehendes mehrschichtiges Keimepithel. Bei den meisten Säugetieren sind vier aufeinander folgende Zellgenerationen vorhanden. Die dabei zugrunde liegende Zeitspanne wird als Keimepithelzyklus bezeichnet (Leblond & Clermont, 1952).

#### **2.3.4.1 Stadien der Spermatogenese beim Eber**

Auf Querschnitten der Keimtubuli des Ebers mit normaler Spermatogenese lassen sich acht verschiedene charakteristische Assoziationen von Keimzellstadien unterscheiden (Stadium I - VIII) (Swierstra, 1968; Garcia-Gil et al., 2002). Andere Autoren teilten den Keimepithelzyklus des Ebers in 14 Stadien ein, um bestimmte Keimzellen besser definieren zu können (Frankenhuis et al., 1982). Wegen der besseren Übersichtlichkeit werden die Stadien auch in die drei Abschnitte zusammengefasst (Garcia-Gil et al., 2002):

- prämeiotische Phase (I, II, III),
- meiotische Phase (IV, V) und
- postmeiotische Phase (VI, VII, VIII).

Die Häufigkeit, mit der die einzelnen Stadien in den Tubuli auftreten, ist direkt korreliert mit der Lebensdauer der in diesen Stadien dominierenden Keimzellen. So sind die meiotischen Stadien, die eher selten in den Tubuli anzutreffen sind, charakterisiert durch die relativ kurzlebigen, sekundären Spermatozyten. In den postmeiotischen Stadien hingegen findet die gesamte Spermiogenese mit anschließender Spermiation statt, so dass diese Stadien häufiger vertreten sind (Garcia-Gil et al., 2002).

Betrachtet man einen Tubulus in seiner Länge, so sind die Stadien des Keimepithelzyklus über seine Länge verteilt, d.h. Stadium I nimmt eine bestimmte Länge ein. Dann folgt Stadium II mit einer bestimmten Länge, usw.... Die Aneinanderreihung der einzelnen Stadien wurde bereits von Ebner (1871) als „Welle des Keimepithels“ bezeichnet. Der Längenabschnitt, über den ein Stadium den Tubulus besetzt, ist, sowohl zwischen den Stadien, als auch zwischen den Tubuli sehr unterschiedlich (Perey et al., 1961). Garcia-Gil et al. (2002) bestimmten den Längenabschnitt eines Tubulus, über den ein Stadium bei Ebern der Deutschen Landrasse auftritt. So werden innerhalb eines gegebenen Abschnittes 1790 µm eines Tubulus von den prämeiotischen, 7871 µm von den meiotischen und 2097 µm von den postmeiotischen Stadien besetzt. Damit ist also die Zeitdauer eines Keimepithelstadiums nicht proportional zu dem von ihm besetzten Tubulusabschnitt.

Die Nummerierung der Stadien erfolgt abhängig von der Spermatisierung und beginnt mit dem Auftreten der frühen Spermatisierung in der Golgiphasen. Die Entwicklung der vorherigen Generation der Spermatisierung ist in diesem Stadium noch nicht abgeschlossen, so dass im Stadium I zwei Spermatisierungstypen im Keimepithel gleichzeitig vorkommen. Diese Stadien der Spermatisierung (Abb. 4) beim Eber sind wie folgt definiert (nach Swierstra, 1968; Garcia-Gil et al., 2002):

*Stadium I:* A-, B-Spermatogonien mitotisch aktiv; primäre Spermatozyten (Präleptotän, Leptotän, Pachytän); runde Spermatisierung.

*Stadium II:* A-, B-Spermatogonien; primäre Spermatozyten (Leptotän, Pachytän); runde und elongierende Spermatisden.

*Stadium III:* A-, B-Spermatogonien; primäre Spermatozyten (Diplotän, Diakinese); elongierende Spermatisden.

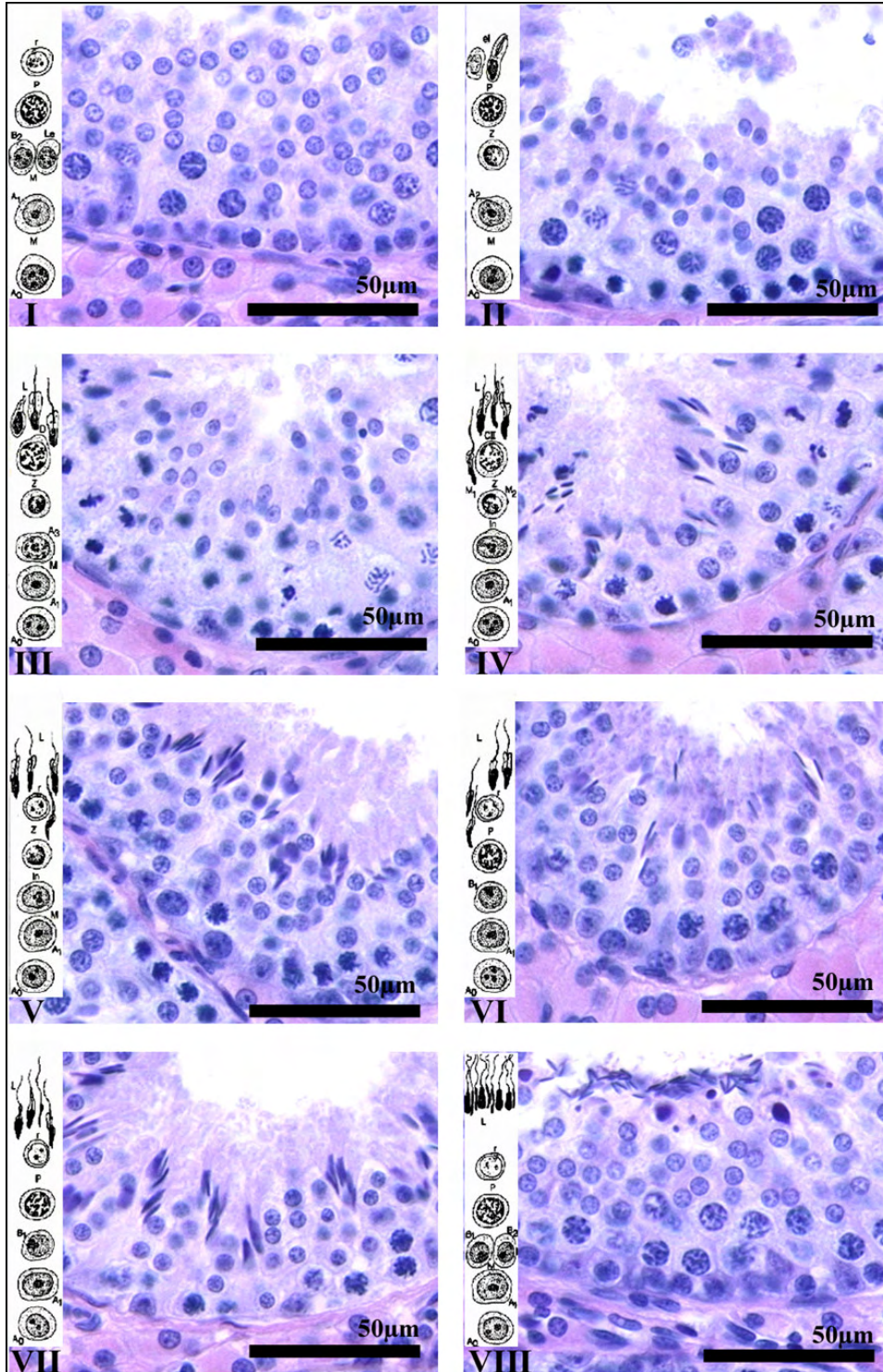
*Stadium IV:* A-Spermatogonien; Beginn 1. bis Ende 2. Reifeteilung; Mitosestadien der primären Spermatozyten; sekundäre Spermatozyten, runde und elongierende Spermatisden.

*Stadium V:* A-Spermatogonien; primäre Spermatozyten (Pachytän); runde und elongierende Spermatisden, letztere tief in der Keimepithelschicht.

*Stadium VI:* A-, B-Spermatogonien; runde und elongierende Spermatisden, letztere näher am Tubuluslumen.

*Stadium VII:* Beginn Mitose B-Spermatogonien; runde und elongierende Spermatisden.

*Stadium VIII:* A-, B-Spermatogonien; Spermatozyten (Pachytän); runde Spermatisden mit Akrosom; elongierende Spermatisden am Tubuluslumen aufgereiht.



**Abb. 4:** Stadien des Keimepithelzyklus beim Eber (modifiziert und definiert nach Swierstra, 1968). Typ A Spermatogonien (A0-3), intermediäre Spermatogonien (In), Typ B Spermatogonien (B), Leptotän (Le), Zygotän (Z), Pachytän (P), runde Spermatozoen (r), elongierte (el) Spermatozoen, Mitose (M), Meiose I und II (M1, M2).

### 2.3.4.2 Dauer der Spermatogenese

Der Spermatogenesezyklus bezeichnet die Dauer der Entwicklung einer A-Spermatogonie bis zur Freisetzung der differenzierten elongierten Spermatoide in das Tubuluslumen. Dazu sind generell vier Keimepithelzyklen notwendig. Dieser Zeitraum kann allerdings nur näherungsweise bestimmt werden, da der Beginn der ersten mitotischen Stammzellteilung, so wie der Endpunkt, d.h. die Abgabe der Spermatozoen in das Tubuluslumen schwer zu definieren ist.

Die Dauer der Keimepithelzyklen und folglich auch die Dauer der Spermatogenese sind von Tierart zu Tierart unterschiedlich (Tab. 1).

**Tab. 1:** Dauer (Tage) des Keimepithelzyklus und der Spermatogenese bei verschiedenen Tierarten.

Tierart	Keimepithelzyklus und Zahl der Zyklen je Spermatogenese		Spermatogenese	Literatur
Eber	8,6	4,0	34,0	Swierstra, 1968
Bulle	13,0	4,0	54,0	Hochereau et al., 1964 Clermont, 1972
Hengst	12,0	4,0	48,0	Swierstra et al., 1974
Ratte (Wistar)	13,0	4,0	53,2	Clermont & Harvey, 1965
Maus	6,0	4,0	34,5	Adler, 1996
Mensch	16,0	4,6	74,0	Heller & Clermont, 1963

Die Dauer der einzelnen Stadien unterscheiden sich zwischen den Schweinerassen sehr wenig. Die Abweichungen sind in erster Linie methodisch bedingt und insbesondere durch eine unterschiedliche Einteilung der Stadien zu erklären. Generell nehmen die prämeiotischen Stadien ca. 32 %, die meiotischen Stadien etwa 16 % und die postmeiotischen Stadien ungefähr 52 % ein (Garcia-Gil et al., 2002).

## **2.4 Die endokrine Regulation der Hodenfunktion**

Die endokrine Regulation der Hodenfunktion ist ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren auf mehreren Ebenen. Sie wird vom Hypothalamus aus gesteuert. Dessen ist die Hypophyse mit der Produktion der gonadotropen Hormone nachgeschaltet. Diese Hormone steuern die Gametogenese und Hormonproduktion innerhalb der Testes.

### **2.4.1 Das Hypothalamus-Hypophysen-System**

Der Hypothalamus als übergeordnete Schaltstelle liegt als kleiner, rostraler Teil des Diencephalons in der Nähe des dritten Ventrikels. Sein mediobasaler Teil steht mit der Hypophyse in Verbindung. Die Hypophyse wird in einen anterioren (Adenohypophyse) und posterioren Anteil (Neurohypophyse) unterteilt.

In seinem medialen Gebiet enthält der Hypothalamus Kerngebiete, in denen Peptidhormone synthetisiert werden. Darunter befindet sich, neben anderen sogenannten „Releasing-Hormonen“, auch gonadotropinreisetzende Hormon (GnRH). Über die Axone dieser Neurone werden die Hormone zu der rostralen Seite des Hypophysenstiels transportiert, wo sie in den hypophysären Portalkreislauf gelangen. Mit Hilfe dieses zweiten Kapillarsystems erreichen sie auf kurzem Wege die Zellen der Adenohypophyse (Übersicht bei Weinbauer et al., 2000; Möstl, 2005).

Im Bereich der Adenohypophyse werden in den gonadotropen Zellen, auf GnRH-Stimulation hin, luteinisierendes Hormon (LH) und FSH produziert. Etwa 15 % der Zellen im Bereich der Adenohypophyse zählen zu den gonadotropen Zellen. Obwohl in einer Zelle beide Hormone synthetisiert werden, findet jedoch ihre Sekretion zumeist getrennt statt. Da die Freisetzung des GnRH pulsatil erfolgt, unterliegt auch die Bereitstellung von LH und FSH einem pulsatilen Muster, wobei dies beim LH, wegen seiner kürzeren Halbwertszeit, deutlicher in Erscheinung tritt (Übersicht bei Weinbauer et al., 2000).

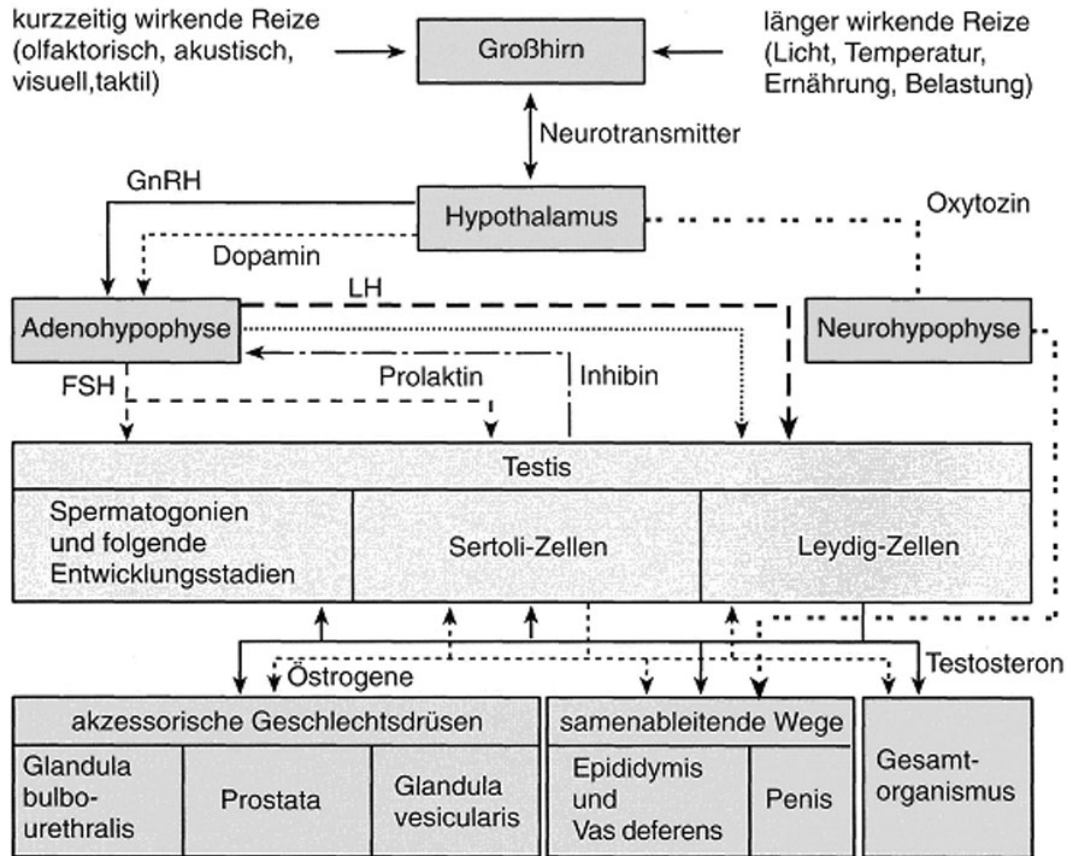
### **2.4.2 Endokrine Steuerung der Spermatogenese**

Die grundlegenden Abläufe der Spermatogenese und ihre endokrine Regulation sind für zahlreiche Spezies bekannt. Für die Regulation der Hodenfunktion auf hypothalamischer Ebene ist in erster Linie GnRH von Bedeutung. Der GnRH stimuliert die Ausschüttung der Gonadotropine LH und FSH. Bei Nagern und

Bullen scheint GnRH allein für die FSH-Freisetzung zuständig zu sein (Finnerty et al., 1998; McLachlan et al., 1995). Bei den Ratten wurde dagegen über die Existenz eines separaten Releasing-Hormons, das allein die FSH-Freisetzung steuert, vermutet (Yu et al., 1997; 2000).

Das Hypophysenhormon LH regt die Steroidbiosynthese in den Leydig-Zellen an, so dass die vermehrt gebildeten Androgene die Spermatogenese fördern. Die FSH-Freisetzung wird durch ein von den Sertoli-Zellen produziertes „Inhibin“ reguliert (Übersicht bei Zirkin, 1993; Sharpe, 1994; Steger, 2001). Das Hypophysenhormon FSH ist generell zur Initiierung der Spermatogenese z. B. in Zusammenhang mit der Pubertät bzw. bei der Wiederaufnahme saisonaler Reproduktionsfunktionen essentiell (Monet-Kuntz & Fontaine, 1989; McLachlan et al., 1996; Sharpe, 1989). In den Sertoli-Zellen fördert FSH die Ausbildung des Zytoskelettes durch die Beeinflussung von Strukturproteinen wie f-Aktin und Vinculin (McLachlan et al., 1996) und bewirkt zusätzlich die Synthese von Androgenrezeptoren, so dass die synergistische Wirkung von FSH und Androgenen z.T. erklärbar wird (Simoni et al., 1999). Durch diese FSH-abhängigen Mechanismen wird die Spermienbindung an die Sertoli-Zellen gewährleistet, die Voraussetzung für eine optimal ablaufende Spermatogenese ist (Muffly et al., 1994). Zudem fördert FSH - Spezies unterschiedlich- die Bildung des ABPs, das seinerseits die Androgene vermehrt in die Tubuli vermittelt und so für die hohen Androgenkonzentrationen im Tubulumilieu sorgt, die für die Aufrechterhaltung der Spermatogenese essentiell sind. Androgene dienen als Präkursoren für die Aromatisierung zu Östrogenen. Die Effekte der Östrogene auf die Spermatogenese und die Spermienreifung wurden bisher primär an Nagern untersucht. Bei der Ratte beeinflussen die Östrogene Differenzierung der Leydig- und Sertoli-Zellen bis zur Pubertät (Payne et al., 1987), Spermidenreifung und Akrosomentwicklung (Robertson et al., 1999). Bei der Maus beeinflussen sie die Entwicklung der Sertoli- und Keim- über peritubuläre Zellen (Nielsen et al., 2000).

Die Spermatogenese beim Eber wird wie beim allen Säugern über die Hypothalamus-Hypophysen-Gonadenachse hormonell reguliert. Es existieren jedoch einige physiologische Besonderheiten (Schnurrbusch, 2001; Abb. 5).



**Abb. 5:** Schematische Darstellung der neuroendokrinen Steuerung der Fortpflanzung beim Eber (nach Schnurrbusch, 2001).

Beim Eber lässt das LH im peripheren Blut kein kontinuierliches Konzentrationsniveau erkennen, sondern in irregulären Abständen auftretende, pulsartige Konzentrationsanstiege (Sanford et al., 1976). Den LH-Gipfeln folgen in Abständen von jeweils ca. 30-60 Minuten Anstiege der Testosteronkonzentration (Sanford et al., 1976). Daraus kann geschlossen werden, dass die Leydig-Zellen sehr schnell auf eine Erhöhung des LH-Spiegels mit einer erhöhten Androgensynthese antworten können.

Während die LH-Bildung und -Sekretion ausschließlich von GnRH veranlasst wird (Culier & Negro-Vilar, 1986), ist die Bedeutung von GnRH für die Regulation der FSH-Bildung und -Sekretion unterschiedlich. Einige Studien lassen auf eine GnRH-unabhängige zusätzliche Regulation der FSH-Freisetzung, in erster Linie beim Eber und Hengst schließen, bei denen die FSH-Konzentrationen nach einer GnRH-Immunsierung unverändert hoch blieben (Awoniyi et al., 1988 b; Rabb et al., 1990; Wagner et al., 2006).



Schließlich wird auch beim Eber ein eigener FSH-Releasing-Faktor vermutet (Awoniyi et al., 1988 b).

Beim Eber konnte im Gegensatz zu anderen Spezies kein ABP nachgewiesen werden (Ritzen et al., 1975; Jegou & Le Gac-Jegou, 1978). Somit besteht die Androgenwirkung möglicherweise in einer Stimulierung der Östrogenproduktion, die beim Eber besonders hoch ist.

Die hohe Mengen an Östrogenen werden in den Leydig-Zellen gebildet (Claus & Hoffmann, 1980). Daraus ergibt sich die Frage, ob die Östrogene eine Bedeutung für die Spermatogenese beim Schwein haben. In der Studie von Wagner et al, (2006) konnte gezeigt werden, dass Östrogene beim Eber von essentieller Bedeutung für die Spermatogenese sind.

Es gibt auch Umweltfaktoren, die zu einer Beeinflussung des gesamten Organismus führen (Schnurrbusch, 2001). Zu diesen Faktoren zählen beim Eber in erster Linie das Licht, die Umgebungstemperatur, die Ernährung, sowie besondere körperliche Belastungen. Durch das Licht wird über die Vermittlung der Epiphyse vor allem die jahreszeitliche Rhythmik der Fortpflanzung bestimmt, die auch bei männlichen Hausschweinen noch nachweisbar ist. Die Temperatur wirkt sich besonders dann negativ auf die Fortpflanzungsfähigkeit aus, wenn der Eber über längere Zeit suboptimalen Temperaturen ausgesetzt ist. Insbesondere zu hohe Umgebungstemperaturen führen zu Störungen der Spermatogenese (Wetteman et al., 1976; Cameron & Blackshaw, 1980).

### **2.4.3 Das gonadotropinreisetzende Hormon (GnRH)**

Das GnRH wird als Dekapeptid von Neuronen des Hypothalamus aus einem Vorläuferprotein (PrePro-GnRH) synthetisiert. Dabei werden vom PrePro-GnRH ein Signalpeptid, das den Transport zur Zellmembran initiiert, sowie das GnRH-assoziierte Peptid (GAP) abgespalten. Im reifen Zustand liegt das GnRH als einsträngiges, zyklisches Peptid vor mit einer Aminosäuresequenz: (Pyro)-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub> (Übersicht bei Weinbauer et al., 2000; Aurich & Töpfer-Petersen, 2005).

Wie bereits erwähnt, wird GnRH pulsatil freigesetzt. Allerdings ist noch unklar worin die Pulsatilität begründet liegt. Hierbei nehmen Frequenz und Amplitude der GnRH-Ausschüttung Einfluß auf die LH- und FSH-Freisetzung. Die physiologische Regulation der GnRH-Sekretion erfolgt über eine negative

Rückkopplung mittels Testosteron und Estradiol auf hypothalamischer und hypophysärer Ebene. Im Hypothalamus senken Testosteron die Pulsfrequenz. In der Hypophyse wirken Östrogene direkt auf die Amplituden der LH- und FSH-Freisetzung bzw. hohe Östrogenkonzentrationen wirkend hemmend auf die Sekretion von FSH und LH (Kittok et al., 1984).

Seine Wirkung entfaltet das GnRH über einen Rezeptor, der zur Familie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren gehört. Der GnRH-Rezeptor nimmt innerhalb dieser Familie eine Sonderstellung ein, da er mit nur 328 AS der Kleinste dieser Gruppe ist und die intrazelluläre Domäne vermissen läßt. Die Regulation des GnRH-Rezeptors kann direkt durch GnRH erfolgen. So ist die Rezeptorexpression hoch, wenn GnRH pulsatil verabreicht wird und niedrig wenn der Rezeptor einer ständigen Aktivierung durch GnRH unterliegt und die Gonadotropinausschüttung fällt ab (Übersicht bei Weinbauer et al., 2000, Aurich & Töpfer-Petersen, 2005).

### **2.4.4 Die Gonadotropine**

Die Gonadotropine FSH und LH gehören zur Familie der Glykoprotein hormone und zeichnen sich durch eine enge Verwandtschaft im Aufbau aus.

Beim LH sorgt ein hoher Anteil an Glukosaminsulfaten für eine schnelle Beseitigung des LH aus dem Blut durch die Leber, wogegen das FSH vor dem Zugriff der Leber geschützt bleibt.

FSH und LH werden nach ihrer Synthese in den Zellen der Adenohypophyse in Sekretgranula gespeichert und auf GnRH-Stimulation exozytiert (Weinbauer et al., 2000).

Das LH wird in den Leydig-Zellen an Rezeptoren gebunden. Die Expression des LH-Rezeptors (LHR) wurde in den Leydig-Zellen nachgewiesen (Zhang et al., 1994). Die Konzentration der LH-Rezeptoren (LHR) in den Leydig-Zellen des Ebers variiert altersabhängig (Peyrat et al., 1981). Zwischen dem 20. und 70. Lebensjahr mit  $9 \times 10^{-12}$  M/g Hodengewebe, bis zum Erreichen der Pubertät auf  $3 \times 10^{-12}$  M/g abfallend, um dann beim erwachsenen Eber stabil auf diesem Niveau zu bleiben. Infolge des Wachstums und der damit verbundenen Zunahme des Hodengewichtes kommt es jedoch auch noch nach dem Erreichen der Pubertät zu einer Erhöhung der Gesamtzahl der LHR. Die Gesamtzahl der Rezeptoren unterliegt in erster Linie einer Autoregulation, wird

aber durch verschiedene Faktoren moduliert, wie zum Beispiel durch Prolaktin, FSH, Östrogene, den Arginin-Vasotocin-like-Faktor, den LHRH-like-Faktor und andere bisher nicht definierte Substanzen aus den Sertoli-Zellen (Tähkä, 1986). Das Hypophysenhormon FSH ist generell zur Initiierung der Spermatogenese, z.B. in Zusammenhang mit der Pubertät, bzw. bei der Wiederaufnahme saisonaler Reproduktionsfunktionen, essentiell (Monet-Kuntz & Fontaine, 1989; Sharpe, 1989; McLachlan et al., 1996).

Wesentliche Wirkungen von FSH werden über seine Rezeptoren in den Sertoli-Zellen vermittelt (Heckert & Griswold, 1992; Kliesch et al., 1992; Böckers et al., 1994). In den Sertoli-Zellen fördert FSH die Ausbildung des Zytoskelettes durch die Beeinflussung von Strukturproteinen wie f-Aktin und Vinculin (McLachlan et al., 1996) und bewirkt zusätzlich die Synthese von Androgenrezeptoren, so dass die synergistische Wirkung von FSH und Androgenen zum Teil erklärbar wird (Simoni et al., 1999). Durch diese FSH-abhängigen Mechanismen wird die Spermienbildung an die Sertoli-Zellen gewährleistet, welche Voraussetzung für eine optimal ablaufende Spermatogenese ist (Muffly et al., 1994). FSH stimuliert die Proliferation von Keimzellen (Arslan et al., 1993), während der Entzug von FSH zur Erhöhung der Apoptoserate führt (Billig et al., 1995; Print & Loveland., 2000). So nimmt FSH Einfluss auf die verschiedenen Entwicklungsstadien der Keimzellen (McLachlan et al., 1996). Beim präpuberalen Schwein und Ratte ist FSH essentiell für die Induktion der ersten Spermatogonienteilungen und damit die Initiierung der Spermatogenese. Zudem wird durch FSH die beim murenen Tier fixe Sertoli-Zellzahl während der puberalen Phase festgelegt (Orth, 1984; Monet-Kuntz & Fontaine, 1989).

## 2.5 Testikuläre Steroidbiosynthese

### 2.5.1 Syntheseort und Synthese

In den Leydig-Zellen werden Testosteron und  $17\beta$ -Estradiol gebildet (Raeside & Renaud, 1983; Bamberg, 1994 a, b; Payne & Youngblood, 1995).

Van der Molen et al. (1981) berichten, dass im unreifen Hoden auch die Sertoli-Zellen in der Lage sind Östrogene zu bilden.

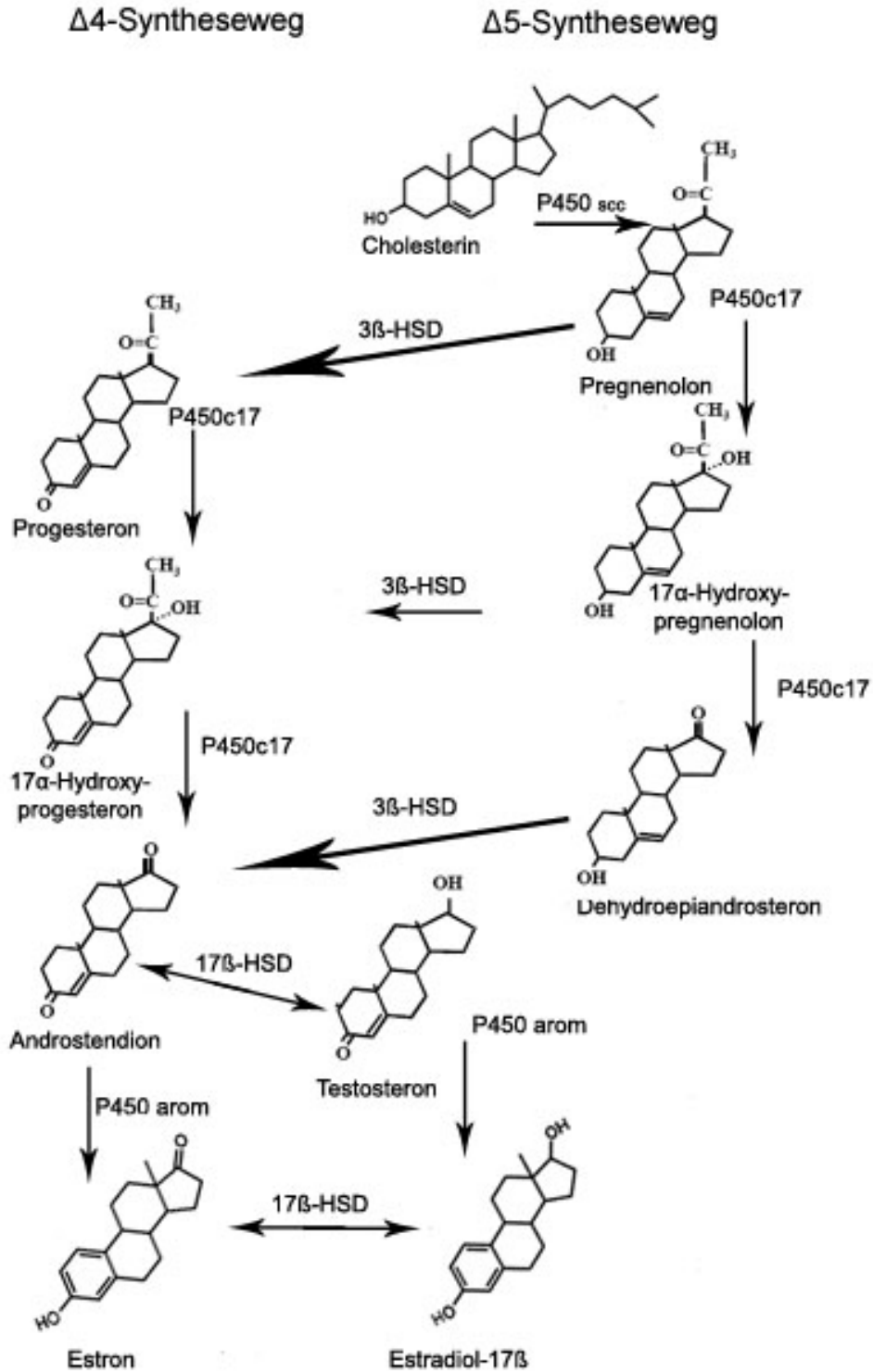
Allerdings ist die P450-Aromatase Menge, die für die Östrogenbiosynthese notwendig ist, in den Leydig-Zellen viel größer als die in der Sertoli-Zelle (Rommerts et al., 1982; Übersicht bei Carreau et al., 2003). Weiterhin gibt es Studien, die berichten, dass Keimzellen auch Östrogen synthetisieren (Übersicht bei Carreau et al., 2003). Der Nachweis der Cytochrom P450-Aromatase wurde beim Eber nur in den Leydig-Zellen beschrieben (Conley et al., 1996; Fraczek et al., 2001).

Die Steroid-Biosynthese erfolgt aus Cholesterin, der im Allgemeinen über die Blutbahn transportiert wird. Dabei ergibt sich die Besonderheit, dass der Hoden, im Gegensatz zu anderen steroidbildenden Geweben, nur in sehr begrenztem Maße in der Lage ist, Cholesterin aus dem Blut aufzunehmen. So wird der größte Teil des zur testikulären Steroidsynthese benötigten Cholesterins in den Leydig-Zellen selbst gebildet (Bamberg, 1994 b).

Als erster Syntheseschritt erfolgt die Abspaltung eines Teils der Seitenkette im *Cholesterin*-Molekül. Das resultierende Steroid Pregnenolon enthält 21 Kohlenstoffatome ( $C_{21}$ ) und ist somit nominell ein Gestagen, allerdings ohne gestagene Potenz. Daraus kann u.a. das eigentlich gestagen wirksame Progesteron gebildet werden. Pregnenolon ist eine Vorstufe für sämtliche anderen Steroidhormone. Einer von mehreren möglichen Stoffwechselwegen der  $C_{21}$ -Steroide führt durch Abspaltung einer  $C_2$ -Kette vom  $C_{17}$ -Atom zu  $C_{19}$ -Steroidderivaten, den Androgenen. Androgene (Testosteron bzw. Androstendion) sind wiederum obligate Vorstufen für die Östrogensynthese. Dabei kommt es zur Abspaltung des  $C_{19}$ -Atoms, so dass Östrogene als  $C_{18}$ -Steroide die Endstufe der Steroidhormon-Kaskade bilden. Sie unterscheiden sich ferner von allen anderen Steroidhormon-Klassen durch den aromatisierten Ring A im Steroidgerüst (Abb. 6).

Im Jahre 1958 weist der Velle den testikulären Ursprung des Estrons nach, Claus und Hoffmann (1980) zeigen den unmittelbaren Zusammenhang der testikulären Östrogen-, Testosteron- und Androstenonproduktion auf, wobei Estron als das eigentliche testikuläre Östrogen bezeichnet wird.

Inwieweit der sog. 4- oder 5- Syntheseweg eingeschlagen wird ist von Tierart zu Tierart unterschiedlich. Bei Schwein, Pferd, Ratte und Maus verläuft die Synthese über den 4-Syntheseweg und bei Primaten und Wiederkäuern über den 5-Syntheseweg (Conley & Bird, 1997). Allerdings konnten Raeside und Renaud (1983) beim Schwein beide Synthesewege bestätigen. Beide Synthesewege münden schließlich in die Bildung von Androstendion, das die unmittelbare Vorstufe von Testosteron darstellt, welches aber auch direkt zu Estron via P450-Aromatase katalysiert werden kann. Nach Aromatisierung entsteht aus Testosteron Estradiol-17 $\beta$  (Hall, 1988; Conley & Bird, 1997). In den Hoden des Ebers werden außerdem verschiedene andere Steroide, z.B. 16-Andostene gebildet, die als Pheromone der sexuellen Stimulation der weiblichen Tiere gelten (Claus, 1979, 1994; Claus & Hoffmann, 1980). Die Wichtigste dieser Substanzen ist das Androsteron. Es kann sowohl im Hoden als auch in den Speicheldrüsen in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Androstenol umgewandelt werden. Die testikulären Pheromone werden auch als 16-Steroide bezeichnet, da bei ihnen im D-Ring eine Doppelbindung von C<sub>16</sub> nach C<sub>17</sub> vorliegt. Wie bei den anderen testikulären Steroiden ist auch für die Pheromone das Cholesterin die Ausgangssubstanz. Es konnte nachgewiesen werden, dass die gleichzeitige Synthese von Pheromonen und Hodensteroiden korreliert zueinander abläuft (Claus & Alsing, 1979; Claus & Hoffmann, 1980; Claus, 1994).



**Abb. 6:** Steroidbiosynthese, Cytochrom P450 Side-chain-cleavage (P450<sub>scc</sub>), Cytochrom P450c17 [(17 $\alpha$ -Hydroxylase C 17, 20-Lyase) P450c 17], 3 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase- $\Delta$  5/4 Isomerase (3 $\beta$ -HSD), 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase (17 $\beta$ -HSD), Cytochrom P450 Aromatase (P450 arom).

### 2.5.2 Androgene

In den Leydig-Zellen werden unter dem Einfluss von LH Androgene produziert, von denen das Testosteron das wichtigste ist. Da beim Eber das Leydig-Zellvolumen innerhalb des Hodens und auch das Gewicht der Hoden, mit jeweils ca. 300-500 g, im Vergleich zu anderen Haustieren relativ hoch ist, wird auch vergleichsweise eine grosse Menge an Androgenen produziert. Die Testosteronkonzentration im peripheren Blut liegt bei erwachsenen Ebern bei ca. 2-6 ng/ml (Gray et al., 1971; Colenbrander et al., 1978). Die Tagesproduktion von Testosteron in den Hoden des Ebers beträgt ca. 3-10 mg (Bamberg, 1994 b). Während der Geschlechtsentwicklung steigert sich die Testosteronsynthese, wobei insbesondere zwischen dem 100. und 190. Lebenstag ein starker Anstieg der Testosteronkonzentration im Blutplasma festgestellt werden kann (Allrich et al., 1982).

Das Testosteron übt viele essentielle Wirkungen im Organismus männlicher Tiere aus. Innerhalb der Spermatogenese entfaltet das Testosteron eine spezifische Wirkung auf die Reifung von runden zu elongierten Spermatozyten (O'Donnell et al., 1994). Testosteronentzug kann zu einer unmittelbaren Arretierung der meiotischen Transformation primärer Spermatozyten zu Spermatozyten und damit zu einer Blockierung der Spermienproduktion führen (Jeyakumar et al., 1995; Suresh et al., 1995). Die Funktion der Sertoli-Zellen wird ebenfalls durch Testosteron stimuliert. Suarez-Quian et al. (1999) konnten die zelluläre Lokalisation des Androgenrezeptors in den Sertoli-Zellen beim Mensch nachweisen. Androgene steigern insbesondere die Antwort der Sertoli-Zellen auf FSH (Hansson et al., 1975).

Weitere wesentliche Zielorgane der Androgene sind die samenableitenden Wege, die akzessorischen Geschlechtsdrüsen sowie die Nebenhoden, deren Funktionen direkt androgenabhängig sind. Durch Androgene werden bereits während der Embryonal- und Fetalentwicklung die Differenzierung der Geschlechtsorgane zum männlichen Typ induziert. Postnatal stimulieren Androgene deren Wachstum. Nur unter dem Einfluß von Androgenen erhält der Penis seine Erektionsfähigkeit und das Epithel des Nebenhodens, wie auch die akzessorischen Geschlechtsdrüsen, werden zur Produktion spezifischer Sekrete angeregt. Eine volle Funktionsfähigkeit der akzessorischen

Geschlechtsdrüsen und der Nebenhoden ist beim Eber nur bei synergistischer Wirkung von Androgenen und Östrogenen möglich (Joshi & Raeside, 1973).

Weiterhin entfalten die Androgene auch eine Wirkung auf den Gesamtorganismus, indem sie das Wachstum der Muskulatur (anaboler Effekt) und die vollständige Ausbildung des Skelettes, sowie die Ausprägung des männlichen Habitus steuern (Schnurrbusch, 2001). Zusätzlich zu den geschlechtsspezifischen Ausprägungen üben die Androgene einen Einfluß auf verschiedene Stoffwechselabläufe aus; so wirken sie sich anabol auf Organe, wie z.B. das Herz und die Leber aus, stimulieren das Knochenwachstum und hemmen den Fettstoffwechsel (Bamberg, 1994 c). Ebenfalls durch Androgene induziert und zentralnervös vermittelt ist das Sexual- und Aggressionsverhalten männlicher Tiere. Beim Eber stehen aber alle diese Leistungen unter dem synergistischen Einfluss von Androgenen und Östrogenen.

Als tierartspezifische Besonderheit werden beim Eber neben Testosteron auch Dihydrotestosteron (0.75 ng/ml Blutplasma), Androstendion (14-23 ng/ml) und Dehydroepiandrosteronsulphat (DHEAS) (>100 ng/ml) (Tan & Raeside, 1980; Schwarzenberger et al., 1993).

Die Konzentration von DHEA kann als ein Indikator für die androgene Aktivität der Hoden angesehen werden. Das sezernierte DHEAS ist möglicherweise eine Vorstufe für die Synthese von Testosteron in anderen Geweben (Raeside & Tan, 1976).



### 2.5.3 Östrogene

In den Leydig-Zellen einiger Spezies, insbesondere des Ebers und des Hengstes werden bedeutende Östrogenmengen synthetisiert (Claus & Hoffmann, 1980; Raeside & Renaud, 1983), die in peripherem Blutplasma, Tubulusflüssigkeit und Ejakulat nachgewiesen werden können (Velle, 1958; Setchell & Cox, 1982; Claus et al., 1992). Dass ihre Bildung unmittelbar dem Hoden zuzuschreiben ist, zeigen die deutlich höheren Konzentrationen an Östrogenen in der testikulären Lymphe und der Vena testicularis im Vergleich zum peripheren Blut.

Außer in nicht-konjugierten (freier) können Östrogene auch in konjugierter (sulfatierter), d.h. gekoppelter Form vorkommen.

Aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften können freie Östrogene Zellmembranen durch Diffusion passiv durchdringen und an Spezifische intranukleäre Rezeptoren binden. Die ligandgebundenen Östrogenrezeptoren bilden Dimere, welche über Zinkfinger an spezifische regulatorische Abschnitte - die hormone responsive elements (HRE) in der Promotorregionen der jeweiligen Zielgene binden und als Bestandteile von Transkriptionskomplexen die Expression von Zielgenen beeinflussen (Muramatsu & Inoue, 2000; Geserick et al., 2005).

Die Sulfatkonjugation geht einher mit einer deutlichen Erhöhung der Wasserlöslichkeit und damit dem Verlust des passiven Diffusionsvermögens durch biologische Membranen, einer Reduktion des Verteilungsvolumens sowie einem kompletten Wirkungsverlust an den klassischen nukleären Rezeptoren.

Das aktive Östrogen ist das 17 $\beta$ -Estradiol, welche eine Konzentration beim adulten Eber von etwa 180 pg/ml im peripheren Blutplasma aufweist (Weiler et al., 1998). Die Gesamtproduktion an testikulären Östrogenen erreicht beim Eber pro Tag 20-100 mg (Bamberg, 1994 b). Im Blutplasma des Ebers lassen sich Östrogene in jeder Altersstufe messen (Ford, 1983). Während der Sexualentwicklung steigt die Produktion der Östrogene an, wobei eine besonders starke Erhöhung der Östrogenkonzentration zwischen dem 100. und 160. Lebensjahr zu verzeichnen ist. Danach wird der Anstieg bis zum 250. Lebensjahr wieder etwas geringer (Allrich et al., 1982).

### **2.5.3.1 Wirkungen der Östrogene**

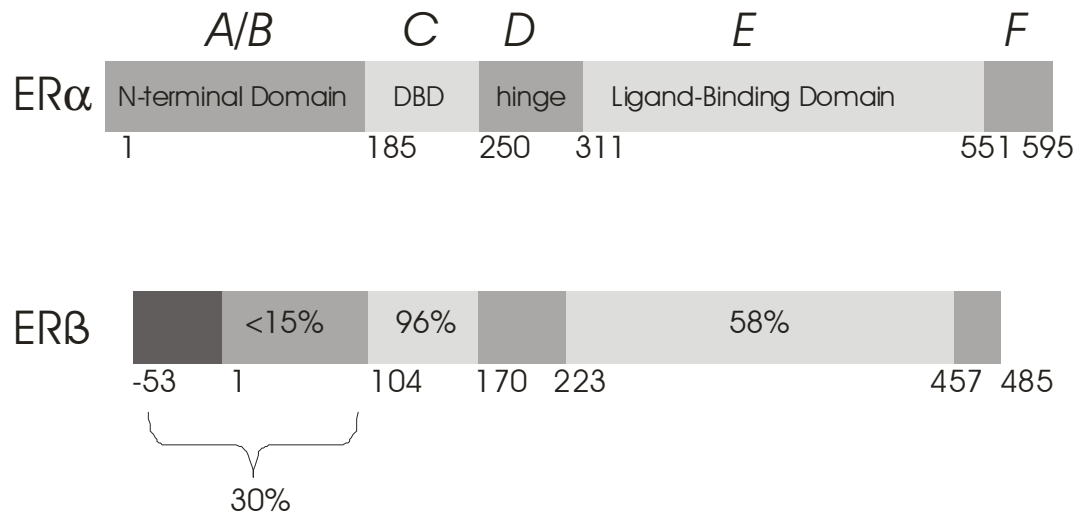
Die testikulären Östrogene sind über ihre endokrinen und parakrinen Wirkungen im Wesentlichen bei der Entwicklung und Steuerung der Geschlechtsorgane essentiell. Libido und Sexualverhalten des Ebers werden synergistisch über Östrogene und Androgene gesteuert (Joshi & Raeside, 1973; Parrott & Booth, 1984; Booth, 1988). Eine Rolle der Östrogene bei der Funktion der akzessorischen Geschlechtsdrüsen ist ebenfalls beschrieben. Auch hier wirken Östrogene synergistisch mit Testosteron, um eine optimale Funktion der akzessorischen Geschlechtsdrüsen zu gewährleisten (Joshi & Raeside, 1973). Grosse Mengen an Östrogenen gelangen beim Eber auch in das Seminalplasma und werden mit dem Ejakulat in den weiblichen Genitaltrakt abgegeben, sie erleichtern durch Steigerung der Uteruskontraktionen den Spermientransport und wirken ovulationsfördernd (Claus, 1990).

### **2.5.3.2 Östrogenrezeptoren**

Die Steroidhormone entfalten ihre Wirkung durch die Bindung an spezifische, intrazellulär exprimierte Rezeptoren der Zielzellen (Evans, 1988). Aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften können die Steroide die Zellmembran ungehindert passieren und so in die Zelle, bzw. in den Zellkern einwandern.

Zurzeit sind zwei Formen von Östrogenrezeptoren bekannt. Der als Östrogenrezeptor- $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) bezeichnete Rezeptor wurde 1962 von Jensen und Jacobsen entdeckt. Sie fanden ein intrazelluläres, uterines Protein, das in der Lage war, Estradiol-17 $\beta$  zu binden. In der Folge wurde dieser Rezeptor als Östrogen-, Estradiol oder als klassischer Östrogenrezeptor bezeichnet. Nach der Entdeckung eines zweiten Östrogenrezeptors durch Kuiper et al. (1996) und Mosselmann et al. (1996) wurde der bisher bekannte Östrogenrezeptor als Östrogenrezeptor- $\alpha$  und der neu gefundene Rezeptor als Östrogenrezeptor- $\beta$  (ER- $\beta$ ) bezeichnet. Hawkins et al. (2000) haben einen dritten Östrogenrezeptor- $\gamma$  (ER- $\gamma$ ) bei Teleostes lokalisiert, die Bedeutung dieses Rezeptors ist aber noch nicht geklärt.

ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  Gene sind z.B. beim Mensch auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert (Enmark et al., 1997), ihr Aufbau weist eine hohe Homologie, 96% in der DNA-bindenden und 58% in der Ligand-bindenden Domäne auf (Abb. 7) (Übersicht bei Saunders, 1998; O'Donnell et al., 2001).



**Abb. 7:** Vergleich der Struktur von ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  Proteinen. A/B - Domäne, C - DNA-bindende Domäne (DBD), D - Scharnierregion, E - Ligand-bindende Gebiet und F - Domäne. Erzeugung von ER- $\beta$ -Varianten durch alternative Startcodons -53 und 1 (modifiziert nach O'Donnell et al., 2001).

### **2.5.3.3 Die zelluläre Lokalisation von Östrogenrezeptoren**

Die Östrogenrezeptoren sind in vielen Organen in unterschiedlicher Anzahl vorhanden (Kuiper et al., 1996).

Untersuchungen über die exakte zelluläre Lokalisation des ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  basieren hauptsächlich auf immunhistochemischen Methoden mit unterschiedlichen monoclonalen und polyklonalen Antikörpern, die zu unterschiedlichen Resultaten führten. Während beide Rezeptoren in den Epithelzellen des Ausführungsgangs des Hodens und in den Nebenhoden exprimiert werden (Übersicht bei Hess, 2003), ist die Expression in den Hoden unterschiedlicher Spezies nicht so eindeutig. ER- $\beta$  scheint fast in jeder Zelle innerhalb des Keimepithels und des Interstitiums exprimiert zu werden (Enmark et al., 1997; Rosenfeld et al., 1998; Saunders et al., 1998; Pelletier et al., 1999; van Pelt, 1999; Jefferson et al., 2000; Pelletier & EL-Alfy, 2000; Mäkinen et al., 2001; McKinnell et al., 2001; Saunders et al., 2001; Carreau et al., 2003; Rago et al., 2004), während die ER- $\alpha$  Expression auf das Interstitium beschränkt ist (Iguchi et al., 1991; Fisher et al., 1997; Jefferson et al., 2000).

#### **2.5.3.3.1 Expressionsregulation von Östrogenrezeptoren**

Viele Hormone, auch die Östrogene können die Expression ihrer eigenen als auch die anderer Rezeptoren regulieren (Ing, 2005).

Ohsako et al. (2003) überprüften nach Infusion des Anti-Androgens Flutamid die Rezeptorexpression in den Hoden und in der Hypophyse von der Ratte. Unter den drei überprüften Steroidrezeptoren wurden Androgenrezeptor und Glukocorticoidrezeptor mRNAs erheblich runterreguliert. Dabei gab es aber keine Änderung in der Expression der ER- $\alpha$  mRNA. In der Studie von Tena-Sempere et al. (2000) wurde eine Blockade auf die Gonadotropinsekretion mit einem starken LHRH Antagonisten ausgeübt. Dies führte zu einer Hochregulation der ER- $\alpha$  und AR mRNA.

In zahlreichen Untersuchungen im weiblichen Geschlechtstrakt wurde gezeigt, dass Östrogene die Expression der eigenen Rezeptoren hochregulieren können (Bergman et al., 1992; Ing & Tornesi, 1997; Xiao & Goff, 1999). Der molekulare Mechanismus, durch den Östrogene die Rezeptorexpression hoch- oder runterregulieren können, ist unbekannt.

### **3 Ziele der Arbeit**

Die Spermatogenese beim Eber wird wie beim allen Säugern über die Hypothalamus-Hypophysen-Gonadenachse hormonell reguliert. Es existieren jedoch einige physiologische Besonderheiten (Kapitel 2.4.2)

In den Leydig-Zellen werden neben Androgen- hohe Östrogenmengen synthetisiert, deren mögliche Bedeutung für die Spermatogenese beim Eber nicht geklärt ist. In der beantragten Studie sollen diese regulatorischen Besonderheiten in ihren Auswirkungen auf die Spermatogenese geklärt werden. Somit sind die Ziele der Arbeit:

1. Testikuläre Expression von Steroid- und Gonadotropinrezeptor mRNA
2. Zelluläre Lokalisation von ER- $\alpha$  und ER- $\beta$ .
3. Regulation der Expression von Steroid- und Gonadotropinrezeptoren durch 17 $\beta$ -Estadiol-Infusion.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Versuchsaufbau

Eingesetzt wurden Eber (Genotyp: Deutsche Landrasse). Alle Tiere wurden im Versuchsstall in Hohenheim in mit Stroh eingestreuten Einzelbuchten aufgestellt, die gegenseitigen Sichtkontakt erlaubten.

Die Fütterung aller Tiere erfolgte bedarfsgerecht mit 30 MJ ME und 40 g Rohprotein pro Tag (Wagner, 2005)

Die Tiere wurden in drei Gruppen unterteilt:

„Intakte Eber“

„Immunisierte Eber“ Immunisierung gegen GnRH

„17 $\beta$ -Estradiol-infundierte, immunisierte Eber“ (Tab. 2).

**Tab. 2:** Gruppenteilung mit zugehörigen Körper- und Hodengewichten.

Gruppe	Name	Körpergewicht (kg)	Hoden (li)		Hoden (re)	
			Gewicht (g)	Volumen (ml)	Gewicht (g)	Volumen (ml)
intakte Eber	Zentis	121	344	350	308	317
	Ernesto	140	330	330	320	320
	Ernie	164	400	400	370	380
	Elba	147	300	320	310	312
	Edwin	140	295	315	310	310
	Rudi	174	375,8	350	384,4	360
	Ronaldo	140	332	320	315	310
	Romeo	153	472,5	460	469	440
	Dodo	130	359,4	350	357,2	360
immunisierte Eber	Eddy	128	120	130	87	94
	Esra	142	150	150	110	121
	Zorro	126	87	94	90	90
	Zunder	126	110	121	114	119
	Racker	133	88,9	80	86,8	90
	Rubens	145	97	80	88,3	70
	Karl	127	95,9	90	95,8	80
	Knut	122	107,6	100	106,6	105
	Duplo	120	96,9	90	95,3	90
17 $\beta$ -Estradiol-infundierte, immunisierte Eber	Zimt	107,5	99	111	110	115
	Zottel	121	134	137	131	134
	Egon	151	140	140	143	145
	Etzel	135	200	220	120	123
	Enzo	146	180	190	180	187

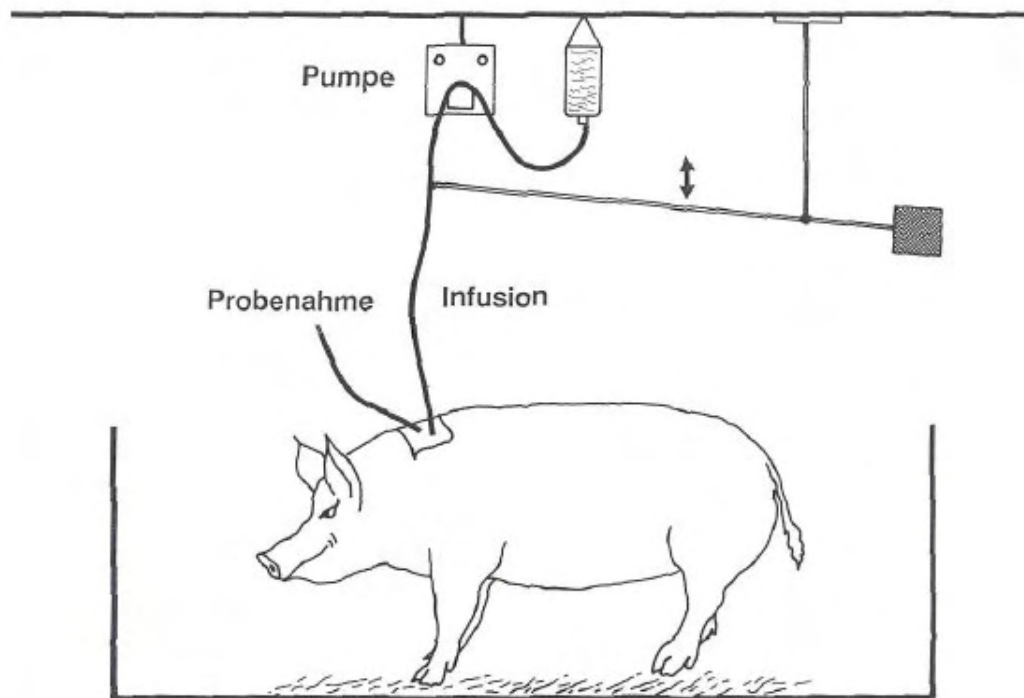
Die Immunisierung im Rahmen des Versuchs erfolgte bei den Gruppen „Immunisierte Eber“ und „17 $\beta$ -Estradiol-infundierte, immunisierte Eber“ im Alter

von 20 Wochen. Dieses ist der Zeitpunkt, zu dem alle Keimzellstadien im Hoden bereits als etabliert gelten konnten (Wagner, 2005).

Die Immunisierungen erfolgten mit dem GnRH-Antigen „Improvac<sup>®</sup>“ (Improvac<sup>®</sup>, Boar taint vaccine, CSL Animal Health, Victoria, Australien). Der Impfstoff enthält 200 µg eines GnRH-Protein-Konjugates je ml, 0,1 mg Thimerosal je mL zur Konservierung sowie zusätzlich ein synthetisches Adjuvans auf Dextranbasis. Entsprechend der Empfehlung des Herstellers wurde er in einer Dosis von 2 ml subkutan am Ohrgrund injiziert.

Die Gruppen „Intakte Eber“ und „Immunisierte Eber“ bekamen über die gesamten sieben Wochen Versuchsdauer physiologische Kochsalzlösung infundiert, um eventuelle Effekte der Infusionsflüssigkeit zu erfassen.

Die 17β-Estradiol-infundierten, immunisierten Eber bekamen zunächst eine Woche lang über einen Katheter mittels Peristaltikpumpen physiologische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) in die V. jugularis infundiert (Abb. 8).



**Abb. 8:** Infusionstechnik beim Schwein (Vorlesungsunterlagen FG Tierhaltung & Leistungsphysiologie).

Für die Infusion wurden Infusionspumpen (Typ Niki V4, Fa. CME Ltd., Caesarea Medical Electronic, Israel) eingesetzt.

Dieser wurden dann über 7 Tage 1,3 mg  $17\beta$ -Estradiol je Tier und Tag zugesetzt, was zu einer Estradiolkonzentration von etwa 1000 pg/ml im peripheren Blutplasma führte. Dazu wurden 500  $\mu$ l (0,54 mg Estradiol) einer ethanolischen Stammlösung (1,08 mg/ml EtOH) an  $17\beta$ -Estradiol (Sigma E8875) in 1 L 0,9 % NaCl gelöst. Damit sollte der beim Eber charakteristische präpuberale Hormonanstieg simuliert werden (Schwarzenberger et al., 1993). Es folgte eine 5-wöchige Infusion mit 0,49 mg  $17\beta$ -Estradiol je Tier und Tag, was zu Blutplasmakonzentrationen vergleichbar mit jenen von intakten Ebern führte. Dazu wurden 250  $\mu$ l (0,2 mg Estradiol) der ethanolischen Stammlösung (0,81 mg/ml EtOH) in 1 L 0,9% NaCl gelöst.

Am Ende der Versuche wurden alle Tiere mittels intravenöser Applikation von 10-20 ml Eutha 77 (Pentobarbital-Natrium 128,3 mg/mL, ESSEX Pharma, München) über den Venenverweilkatheter exzitationsfrei eingeschläfert.

Die Immunisierung gegen GnRH, sowie die  $17\beta$ -Estradiol-Infusion wurde detailliert in der Dissertation von Frau Wagner beschrieben (Wagner, 2005).



## 4.2 Gewebe

Das Hodengewebe wurde innerhalb von 10 Minuten post mortem gewonnen und weiter verarbeitet. Zur Reproduktion der Ergebnisse wurden mehrere Biopsien an unterschiedlichen Stellen genommen, so dass von einem Tier mehrere Proben zur Verfügung standen. Der Hoden wurde mit einem sterilen Skalpell auf einer sauberen Unterlage in der Längsachse vorsichtig geteilt. Je Hälfte wurden anschließend von je drei Stellen entlang der Querachse, links und rechts vom Mediastinum testis bzw. Rete testis, jeweils 0,5 cm x 1 cm x 0,5 cm große Gewebestücke entnommen. Die Probe wurde nach der Entnahme vorsichtig mit einem Skalpell in zwei etwa gleich große Hälften geteilt, von denen die eine sofort mit einer Injektionsnadel in Bouin`sche Lösung gebracht wurde. Die andere Hälfte wurde, in eine sterile Aluminiumfolie verpackt, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert (Tab. 3).

## 4.3 Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden angewendet (Tab. 3).

**Tab. 3:** Schematische Übersicht über die durchgeführten Methoden.

Frischmaterial			
Gefriermaterial		Paraffinmaterial	
Extraktion von RNA		Gefrierschnitte	Paraffinschnitte
RT-PCR (Gesamthomogenat)	Real Time PCR (Gesamthomogenat)	RT-PCR nach Laser cell picking (UV-LACP)	HE ISH In situ RT-PCR

### **4.3.1 Nachweis der Expression von Steroid- und Gonadotropinrezeptoren mRNA mittels Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)**

Für diesen qualitativen Nachweis erfolgten die Untersuchungen an jeweils einem Hoden von jedem Tier aus jeder Behandlungsgruppe.

#### **4.3.1.1 RNA-Extraktion und -Isolation aus Gefriermaterial**

##### **4.3.1.1.1 Aufarbeitung des Gewebes**

Die Aufarbeitung des Gewebes wurde im Kapitel 4.2 beschrieben. Für die RNA-Extraktion wurden die Gewebestücke so präpariert, dass keine Tunica albuginea, kein Rete testis und keine Anteile des Nebenhodens anhafteten.

##### **4.3.1.1.2 RNA-Extraktion aus Gesamthomogenat**

###### **a. Vorbereitungen:**

Für den Nachweis der mRNA der Steroid- und Gonadotropinrezeptoren mittels RT-PCR wurde aus dem Gefriermaterial RNA extrahiert. Dies erfolgte mit dem TRIzol<sup>®</sup>-Reagent.

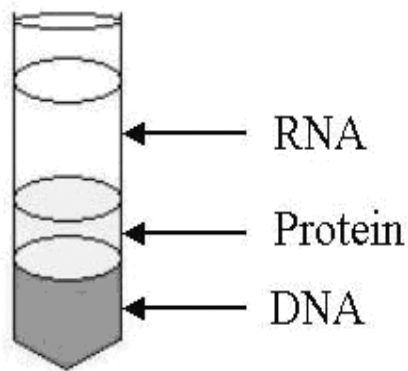
- RNase-freien Arbeitsplatz sicherstellen: Arbeitsplatz mit absolutem Ethanol und RNase-AWAY<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen, Karlsruhe) säubern.
- RNase-freie und sterile Materialien sicherstellen: Glas, Porzellanschalen, Spatel, Pinzetten, Pipettenspitzen, Mikroreaktionsgefäße Arbeitsgeräte wie Ultra-Turrax<sup>®</sup> (T8-Homogenisator, S8 N-5G Einsatz) und Lösungen (mit DEPC-behandeltes Wasser).
- DEPC als RNase-Inhibitor zur Herstellung von RNase-freien Lösungen verwenden.
- Frische RNase-freie Einmalhandschuhe verwenden (Reduzierung der Kontamination durch RNasen der Haut). Gewebe ständig in flüssigem Stickstoff aufbewahren. Vor der Extraktion alle Arbeitsgeräte in flüssigem Stickstoff vorkühlen.

### b. Extraktion

- Gewebe in Porzellanschale mit flüssigem Stickstoff mörsern.
- Etwa 100 mg Gewebe abwiegen und in ein 2 ml Eppendorf-Tube mit 1 ml TRIzol®-Reagent überführen.
- Das Gewebe wird mit Ultra-Turrax® auf höchster Geschwindigkeitsstufe 3 Minuten lang homogenisiert.
- 5 Minuten bei Raum Temperatur (RT) stehen lassen.
- 200 µl Trichlormethan (Choloroform) zugeben.
- Tube zusätzlich mit Parafilm verschließen und vortexen.
- 5 Minuten bei RT stehen lassen.
- 15 Minuten bei 4°C mit 14.00 x g zentrifugieren.

### c. Ergebnis

Es sind drei Phasen zu erkennen (Abb. 9): die obere wässrige Phase ist farblos (RNA), die mittlere Phase ist weiß (Proteine) und die untere organische Phase ist rot und enthält DNA.



**Abb. 9:** Phasentrennung nach Zentrifugation.

#### 4.3.1.1.3 Isolation von RNA

##### a. Präzipitation

- Phase 1 (RNA) vorsichtig abpipettieren und in neues Eppendorf-Tube überführen (Verunreinigung durch Interphase vermeiden!).
- Gleiche Menge Isopropanol (-20°C) zupipettieren und fünf bis zehn Mal kippen.
- 30 Minuten bei -20°C stehen lassen und anschließend fünf bis zehn Mal kippen.
- 10 Minuten bei 4°C mit 14.160 x g zentrifugieren.

##### b. Waschen

- Überstand verwerfen.
- Pellet mit 1 ml 70%igem Ethanol in DEPC-behandeltem Wasser (-20°C) lösen.
- 10 Minuten in Eiswasser stellen und anschließend fünf bis zehn Mal kippen.
- 10 Minuten bei 4°C mit 14.160 x g zentrifugieren. Diesen Schritt 1 x wiederholen.

##### c. Resuspendieren

- Überstand verwerfen.
- Pellet trocknen (ca. 10-20 Minuten im Trockenschrank).
- Getrocknetes Pellet im Wasserbad bei 70°C in 50 µl Aqua bidest oder RNase-freiem Wasser resuspendieren.
- Lagerung der RNA in Flüssigstickstoff.

##### d. Qualitätskontrolle der RNA-Präparation

Die Qualitätskontrolle erfolgte durch Konzentrationsbestimmung und Bestimmung der Reinheit.

Die Menge an isolierter RNA (Optische Dichte (OD)<sub>260nm</sub> 1=33 µg RNA/ml) und die Bestimmung ihrer Reinheit erfolgte mittels Absorptions-Einstrahlphotometrie (Spektralphotometrie) am BioPhotometer. Saubere RNA-Präparationen haben ein Verhältnis der Extinktion (Extinktionswerte) (E) von E<sub>260nm</sub> zu E<sub>280nm</sub>, das

zwischen 1,5 und 2,0 liegt. Die einzelnen Arbeitsschritte sind im Folgenden aufgeführt:

- Verwendung von Kunststoff-Einmalküvetten „UVetten<sup>®</sup>“.
- Für jede UVette<sup>®</sup> vor der Probenwertmessung Leerwert bestimmen.
- Leerwertbestimmung: 69  $\mu$ l sterilen 0,1 M Tris/HCL-Puffer in UVette<sup>®</sup> pipettieren und messen.
- Probenwertbestimmung: 1  $\mu$ l RNA in gleiche UVette<sup>®</sup> pipettieren und durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette gut mischen und messen.
- Ein Teil der mRNA wurde mit Aqua bidest oder RNase-freiem Wasser auf 200 ng/30  $\mu$ l verdünnt. Die reine mRNA wurde in flüssigem Stickstoff gelagert und die verdünnte mRNA in der Reversen Transkription weiterverarbeitet.

### 4.3.1.2 Durchführung der RT-PCR

#### 4.3.1.2.1 Primer

Zum Nachweis der Expression von Steroid- und Gonadotropinrezeptoren im Eberhoden wurden Schweinespezifische Primer eingesetzt (Tab. 4). Die Primerpaare bzw. Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech GmbH synthetisiert.

**Tab. 4:** Sequenzen von Primern für die RT-PCR (T<sub>m</sub> - Schmelztemperatur der Primer; bp - die Größe des Amplifikates).

Name	Primer Sequenzen Vorwärts 5'/3' Rückwärts 3'/5'	Accession-Nr. (Genbank)	T <sub>m</sub>	bp
ER-α Vorwärts	GCTCCTGTTTGCTCCTAAC	AF35775	55°C	232
ER-α Rückwärts	GACACGGTGGATATGGTC			
ER-β Vorwärts	ACACCTCTCTCCTTTAGCC	AF267736	56°C	222
ER-β Rückwärts	CCTGACGCATAATCACTG			
AR Vorwärts	AGCAGC AGGAGGCAGTAT	AF202775	56°C	258
AR Rückwärts	GAGTGGGACGCACAGATG			
LHR Vorwärts	CTGGAGCTGAAGGAGAATGC	M29525	58°C	231
LHR Rückwärts	GTGGCTGGGGTAAGTCAATG			
FSHR Vorwärts	AGCCTCTGGACCAGTCATTC	AF025377	58°C	308
FSHR Rückwärts	CACCATCTTCTGCCAGAGAC			

#### 4.3.1.2.2 Probeninterne Kontrolle

Zur Kontrolle des Ablaufs der RT-PCR wurde die Expression des zur Gruppe der „House-keeping Genes“ gehörenden β-Aktins herangezogen.

Die Basenfolge des β-Aktin (GenBank accession AJ312193) Vorwärts-Primer: 5'-CGT GGA CAT CAG GAA GGA C-3'; Rückwärts-Primer: 5'-TCT GCT GGA AGG TGG ACA-3'. Die von Vorwärts- und Rückwärts-Primer amplifizierte cDNA umfasst 205 bp und hat eine Schmelztemperatur von 55°C. Die Primerpaare wurden ebenfalls von der Firma MWG Biotech GmbH synthetisiert.

#### **4.3.1.2.3 RT-PCR**

Im Folgenden ist das Arbeitsprotokoll für die durchgeführte RT-PCR, ausgehend von der extrahierten Gesamt-RNA aus Hodenhomogenat dargestellt. Alle Untersuchungen wurden im Doppelansatz durchgeführt.

Vor jeder RT-PCR wurde eine Behandlung der gewonnenen RNA mit DNase durchgeführt, um eine Amplifikation von eventuell noch in der Probe vorhandener genomischer DNA und somit ein falsch positives Ergebnis zu vermeiden.

Die Reverse Transkription der mRNA und die sich daran anschließende Amplifikation der cDNA wurde mit Hilfe des Gold RNA PCR Core Kits durchgeführt.

##### **a. DNase-Behandlung:**

Jeder Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 2 µl 10 x DNase I Puffer
- 1 µl DNase I, RNase frei
- 0,25 µl RNase-Inhibitor
- 6,65 µl mRNA (entspricht 200 ng/µl mRNA)

Proben kurz anzentrifugieren.

Inkubation im T3 Thermocycler 10 Minuten bei 37 °C; 5 Minuten bei 75 °C.

Die mRNA muss nach der DNase-Behandlung innerhalb ½-1 Stunde weiterverarbeitet werden, weil danach die Stabilität der mRNA nicht mehr sicher gewährleistet ist.

##### **b. Reverse Transkription (RT):**

Jeder Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 2 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>
- 1 µl 10 x PCR-Puffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl)
- 4 µl 10 mM dNTPs
- 0,5 µl 50 µM Random Hexamers
- 0,5 µl RNase-Inhibitor (20 U/µl)
- 0,5 µl MuLV Reverse Transkriptase (50 U/µl)
- 1,5 µl mRNA (nach DNase-Behandlung)

Dabei wurde so vorgegangen, dass alle Reagenzien bis auf die mRNA der einzelnen Gewebeproben mit der Anzahl der Proben multipliziert und gemischt wurden, das Gemisch wurde danach auf die Reaktionsgefäße verteilt. Als letztes folgte dann die Zugabe der mRNA (1,5 µl).

Anstelle der mRNA wurde bei jedem Ansatz einmal 1,5 µl DEPC-behandeltes Wasser als negative Kontrolle eingesetzt. Danach wurden die Reaktionsansätze in den T3 Thermocycler überführt und folgendem Temperaturregime unterzogen: 8 Minuten bei 21 °C; 15 Minuten bei 42 °C; 5 Minuten bei 99 °C; 5 Minuten bei 5 °C.

### **c. Die Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Jeder Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 2 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>
- 4 µl 10 x PCR-Puffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl)
- 0,5 µl Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)
- 0,5 µl Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)
- 0,25 µl GOLD Amplitaq<sup>®</sup> DNA-Polymerase
- 10 µl cDNA

Jeder Reaktionsansatz wurde auf ein Gesamtvolumen von 50 µl mit Aqua bidest (steril) oder mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt.

Die Reaktionsansätze wurden in den T3 Thermocycler überführt und folgendem Temperaturregime unterzogen:

- |                      |                                 |
|----------------------|---------------------------------|
| 1. Startextension    | 95 °C 10 Minuten                |
| 2. Extension         | 94 °C 1 Minute                  |
| 3. Annealing         | 55 °C ER-α; 56 °C ER-β 1 Minute |
| 4. Elongation        | 72 °C 1 Minute 30 Sekunden      |
| 2-4                  | je 35 Zyklen                    |
| 5. Schlusselongation | 72 °C 10 Minuten                |
| 6. Kühlen            | 4 °C                            |



#### **4.3.1.2.4 Analyse der PCR-Produkte durch Agarose-Gelelektrophorese (DNA-Gel)**

##### **a. Anfertigung des Ethidiumbromid-Agarosegels**

Zur Auftrennung der PCR-Amplifikate wurden die Proben in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer auf ein 2%iges Agarose-Gel aufgetragen.

0,6 g Agarose wurden mit 30 ml 1xTAE-Puffer gemischt und in der Mikrowelle bei 800 Watt gelöst. Zunächst wurde die Lösung unter leichtem Schwenken abgekühlt, wonach 6 µl Ethidiumbromid zugesetzt wurden. Das dann noch flüssige Gel wurde in eine mit einem Kamm versehene Giesskammer gegossen.

##### **b. Elektrophorese**

Nach Erstarren des Gels wurde der Kamm entfernt, das Gel entnommen und in eine horizontale Gelelektrophoresekammer gelegt, wo es mit TAE-Puffer überschichtet wurde. 15 µl cDNA wurden in einem Eppendorf-Tube mit 5 µl Ladepuffer versetzt.

Zur Bestimmung der Fragmentgröße der zu untersuchenden cDNA-Proben wurde ein DNA-Größenstandard „100 bp DNA-Ladder“ auf das Gel aufgetragen. 2 µl DNA-Marker wurden in einem Eppendorf-Tube mit 8 µl Aqua bidest und 5 µl Ladepuffer versetzen. Der Marker und die Probenlösungen wurden nacheinander in die Taschen des Gels pipettiert.

Die Auftrennung der DNA erfolgte über 35 Minuten im elektrischen Feld bei 125 V und 300 mA Gleichstrom (Gassen & Schimpf, 1999).

##### **c. Detektion und Dokumentation**

Die Detektion der gelelektrophoretisch getrennten Ethidiumbromid-DNA-Komplexe erfolgte mittels UV-Licht. Das Ethidiumbromid interkaliert mit den Basen der Nukleinsäuren und leuchtet nach Anregung durch UV-Licht orange auf. Die Position der Nukleinsäuren im Gel kann somit erkannt werden (Gassen & Schimpf, 1999).

#### **d. Sequenzierung der Amplifikate**

Zur Überprüfung, ob die nach Durchführung der RT-PCR erhaltenen Amplifikate der Sequenz des jeweiligen Rezeptors entsprachen, wurden sie sequenziert (Firma Qiagen). Die Firma arbeitet mit einer Sanger-Coulson-Sequenzierung (enzymatische Sequenzierungsmethode) (Sanger et al., 1977). Die Methode besteht aus zwei Teilschritten:

- Markierungsreaktion
- Terminationsreaktion.

Bei der Markierungsreaktion wird anhand einer DNA-Sequenz als Matrize in einem Reaktionsansatz mit einem Primer, einem Puffer, DNA-Polymerase, den drei Nucleotiden dTTP, dCTP, dGTP und einem <sup>35</sup>S-Schwefel-markierten dATP ein kurzes Stück neue (komplementäre) DNA synthetisiert. Der <sup>35</sup>S-Schwefel ist ein radioaktives Isotop und dient später als Nachweis der jeweiligen synthetisierten Fragmente über eine Autoradiographie. Der Markierungsansatz wird anschließend auf vier getrennte, neue Reaktionsansätze für die Terminationsreaktion aufgeteilt, die zusätzlich zu den oben genannten Komponenten noch eine andere Art von Nucleotiden enthält. Diesen Nucleotiden (Dideoxyribonucleosid-Triphosphate) fehlt eine essentielle Gruppe, dadurch kann das Verknüpfen mit anderen hinzukommenden Nucleotiden nicht stattfinden. In getrennten Reaktionsansätzen wird jeweils eine dieser Nucleotidarten (ddATP, ddGTP, ddCTP oder ddTTP, zusammen als ddNTPs bezeichnet) zusätzlich eingesetzt und konkurriert mit seinem normalen Gegenstück. Wird ein solches "modifiziertes" Nucleotid in die neue Sequenz eingebaut, kommt es hier zu einem Kettenabbruch, da es das Anfügen des nächsten Nucleotids verhindert. Die Verhältnisse der dNTPs zu ddNTPs (normalerweise 1-4 % ddNTP's) sind so gewählt, dass die markierten Stränge bis zu mehreren hundert Basen lang sind. Dabei endet jeder neue DNA-Strang an einem zufällig ausgewählten A, C, T oder G. Es entstehen unterschiedlich lange Fragmente. Die Auswertung erfolgt über eine hochauflösende Gelelektrophorese. Die vier Reaktionsansätze werden auf parallele Bahnen aufgetragen und durch anschließende Autoradiographie sichtbar gemacht.

### **4.3.2 Nachweis der zellulären Lokalisation der Rezeptoren mittels In situ Hybridisierung (ISH)**

Diese Methode verwendet Digoxigenin-markierte cRNA-Sonden, die mit der komplementären mRNA in der Zelle bindet. Die entstandene Struktur wird mit einem Anti-Digoxigenin-Antikörper detektiert und mit Hilfe einer Farbreaktion visualisiert. Durch dieses Verfahren können spezifische mRNA Spezies *in situ* nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde eine „*antisense*“-Sonde, die Primer ER- $\alpha$  und Primer ER- $\beta$  mRNA detektiert und eine „*sense*“-Sonde, die eine komplementäre Sequenz zu beiden Primern erkennt, hergestellt. Die „*sense*“-Sonde dient als Negativkontrolle. Die einzelnen Arbeitsschritte der Schnitte- und Sondenherstellung sowie der ISH sind chronologisch aufgeführt.

#### **4.3.2.1 Herstellung histologischer Schnittpräparate für die ISH**

Die Herstellung der histologischen Schnittpräparate, die in Bouin`scher-Lösung fixiert und in Paraffin eingebettet wurden, ist in folgenden Abschnitten beschrieben.

##### **4.3.2.1.1 Fixation in Bouin`scher Lösung**

Unmittelbar nach der Probenentnahme wurde das Gewebe in Bouin`scher Lösung fixiert (15 ml gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung) 5 ml Formalin (35%ig), 1 ml Eisessig. Die Lösungen wurden unmittelbar vor Gebrauch gemischt. Die Fixierzeit betrug einheitlich 24 h. Nach dem Fixieren wurde das Gewebe zehn Tage lang täglich mit frischem 70%igem Alkohol (hergestellt aus absolutem vergälltem Alkohol) gespült, bis keine Gelbfärbung des Alkohols mehr sichtbar war. Danach erfolgte die Entwässerung und Einbettung der Proben.

##### **4.3.2.1.2 Entwässerung der Proben**

Die Proben wurden nach dem zehnten Washtag in 70%igem Alkohol in 3 cm x 2 cm x 2 cm große Plastik-Biopsiekörbchen verbracht und mit dem Entwässerungsgerät Leica TP 1050 (Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomat) in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, mit Xylol vermischt und mit Paraffin durchtränkt (Programm siehe Anhang).

#### **4.3.2.1.3 Einbettung der Proben**

Das Einbetten der Gewebeproben in Paraffin erfolgte in dem Einbettgerät Leica EG 1160. Hierbei wurden die Proben in 3 cm x 2 cm x 2 cm große Stahlförmchen verbracht und mit 60°C warmem Paraffin übergossen. Anschließend wurden sie zur Abkühlung und Härtung auf die Kühlplatte des Geräts gelegt.

#### **4.3.2.1.4 Beschichtung der Objektträger**

Vor der Herstellung von Paraffinschnitten wurden die Glas-OT (SuperFrost-OT;) zum Erreichen einer besseren Haftung der Schnitte mit einer Silanelösung beschichtet. Die OT wurden nach Protokoll mit APTEX behandelt (Protokoll siehe Anhang).

#### **4.3.2.1.5 Herstellung von Paraffinschnitten**

Von den in Paraffin eingebetteten Präparaten wurden mittels Schlittenmikrotom pro Probe 10 Serienschnitte mit einer Dicke von 6 µm angefertigt und in einem 37°C warmen, mit Aqua dest gefüllten Wasserbad gestreckt. Jeweils zwei aufeinanderfolgende Schnitte wurden dann auf einen mit APTEX beschichteten OT gezogen. Zum Trocknen wurden die Paraffinschnitte über Nacht in einen Trockenschrank bei 37°C verbracht.

#### **4.3.2.1.6 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Zur vorläufigen Beurteilung bezüglich der Gewebeerhaltung und -beschaffenheit wurde vor der ISH von allen ausgewählten Gewebeproben bzw. von jedem ausgesuchten Paraffinblock zunächst ein HE-Präparat angefertigt. Zellkerne wurden von dem basischen Hämalaun blau angefärbt, alle anderen Strukturen erschienen in verschiedenen Farbabstufungen durch Eosin rot (das Färbeprotokoll siehe Anhang).

#### **4.3.2.2 Herstellung von Digoxigenin-markierten cRNA-Sonden**

Für die Sondenherstellung wurde mRNA von einer Hodenprobe von einem Eber mit normaler Spermatogenese benutzt, die mRNA Gewinnung wurde im Kapitel 4.3.1.1 beschrieben. Für ER- $\alpha$  wurde mit entsprechenden Primern ein 232 bp-langes und für ER- $\beta$  222 bp-langes mRNA-Fragment mittels der RT-PCR amplifiziert (siehe Kapitel 4.3.1.2.1).

##### **4.3.2.2.1 Aufreinigung des PCR-Fragmentes**

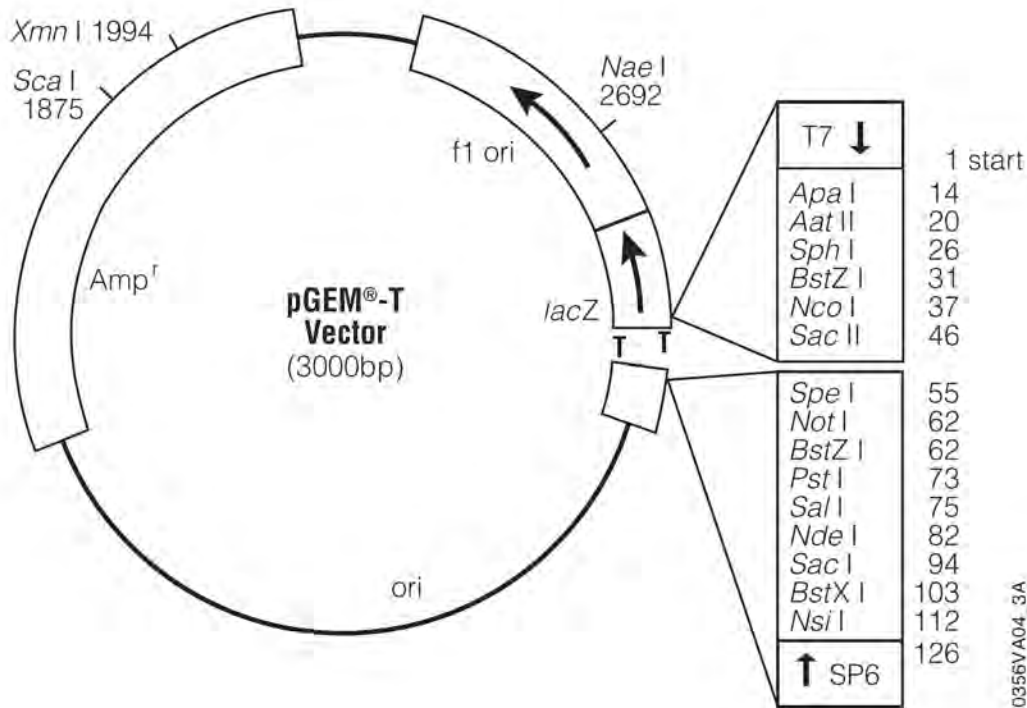
Zur Aufreinigung des PCR-Fragmentes wurde QIAEX II Kit verwendet.

Die gewünschte Bande wurde mit einem sterilen Skalpell unter UV-Licht-Kontrolle aus dem Gel ausgeschnitten:

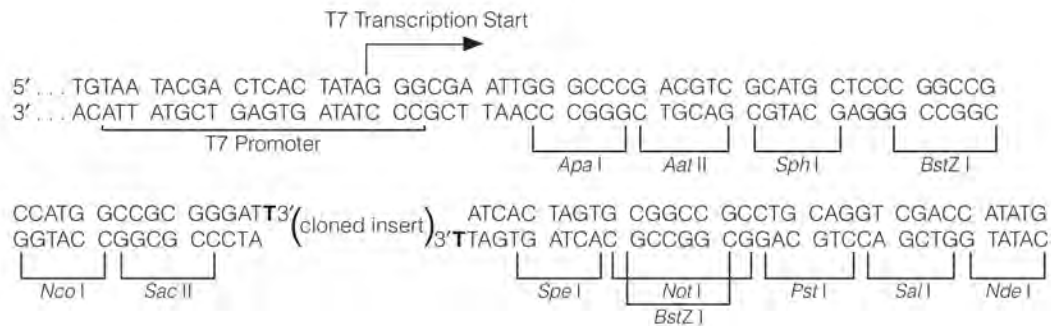
- Das Gelstück in einem 1,5 ml Eppendorf Tube wiegen und 3 x Volumen Puffer QX1 zu 1 x Volumen/Gewicht des Gelstückes dazu geben.
- QIAEX II-Lösung resuspendieren (30 Sekunden gut mischen).
- 30-60  $\mu$ l QIAEX II-Lösung zupipettieren, mischen.
- 10 Minuten im Wasserbad bei 50°C inkubieren, während der Inkubation alle 2 Minuten kurz mischen.
- 30 Sekunden bei 17.000 x g zentrifugieren, Überstand verwerfen.
- 500  $\mu$ l Puffer QX1 dazu geben, mischen.
- 30 Sekunden bei 17.000 x g zentrifugieren, Überstand verwerfen.
- 500  $\mu$ l Puffer PE dazu geben, mischen.
- 30 Sekunden bei 17.000 x g zentrifugieren, Überstand verwerfen, diesen Schritt 1 x wiederholen.
- Pellet trocken (10-15 Minuten bei 37°C).
- In 20  $\mu$ l Aqua bidest zupipetieren, mischen.
- 5 Minuten bei RT stehen lassen.
- 30 Sekunden bei 17.000 x g zentrifugieren => DNA im Überstand!

##### **4.3.2.2.2 Klonierung**

Durch Klonierung wurden die PCR Produkte erst in ein Plasmid (pGEM<sup>®</sup>-T Vektor) inseriert und anschließend in einem Bakterium (Escherichia coli, Eco XL-1 Blue) vervielfältigt (Abb. 10, 11).



**Abb. 10:** pGEM<sup>®</sup>-T Vektor.



**Abb. 11:** Sequenz des pGEM<sup>®</sup>-T Vektors. Oben die mRNA die durch T7 synthetisiert ist, unten durch Sp6 (Promega manual, WI, USA, 2003).

Nach der Klonierung folgt die Separierung der Plasmide aus dem Bakterium mit Hilfe des QIAprep Spin Plasmid Kit nach Anleitung des Herstellers. Die Spezifität und der Erfolg der Klonierung werden geprüft, indem man das Primer-Insert des Plasmids mit zwei Restriktionsenzymen trennt, deren spezifische Schnittstellen die Insertionsstelle abgrenzen (siehe auch Abb. 10). Die Primer-Inserts werden in einer 2%igen Agarose-Gelelektrophorese unter UV-Licht

nachgewiesen. Der nächste Schritt beinhaltet die Spaltung der Plasmide mit jeweils zwei Enzymen. Es entstehen zwei „lineare“ Plasmide, mit endständigen Inserts. Die Inserts werden dann durch Hinzufügen von zwei RNA-Polymerasen (z.B. T7 und SP6) transkribiert in eine „*antisense*“- bzw. „*sense*“-Richtung, deren spezifische Initiationsstellen und Promotoren sich auf dem Plasmid finden. Die Identität des Primers-Inserts wird durch Sequenzierung geprüft und bestätigt.

**a. Herstellung „kompetenter Zellen“ (Eco XL1-Blue)**

- 2 ml LB-Medium in ein steriles Reagenzglas geben.
- Eco XL1-Blue Bakterien mit einer Öse dazu geben (ca. ½ Öse).
- Über Nacht (ÜN) bei 37°C auf dem Schüttler inkubieren. Am nächsten Tag: 19,5 ml LB-Medium + 0,5 ml ÜN Bakterien-Kultur 1-2 Stunden bei 37°C auf Schüttler inkubieren.
- 30 Minuten auf Eiswasser stellen.
- 5 Minuten bei 4°C und 6.300 x g zentrifugieren, Überstand verwerfen.
- Pellet mit 20 ml CaCl<sub>2</sub> 50mM mischen, 30-60 Minuten auf Eis stellen und häufig mischen.
- Zentrifugieren 5 Minuten bei 4°C und 6.300 x g, Überstand verwerfen und Pellet in 2 ml CaCl<sub>2</sub> resuspendieren => 2 ml kompetente Zellen.

**b. Ligation von pGEM-T Vektor und Insert (PCR-Produkt)**

- 5 µl 2 x Ligase-Puffer
- 1 µl pGEM-T Vektor
- 3 µl Insert
- 1 µl T4 DNA-Ligase
- ÜN bei 4°C im Wasserbad oder 1 Stunde beim RT stehen lassen => 10 µl Ligationsprodukt

**c. Transformation der „kompetenter Zellen“**

Zum Ligationsprodukt (10 µl):

- 100 µl kompetente Zellen geben und 30 Minuten auf Eis stehen lassen.
- 2 Minuten bei 42°C im Wasserbad inkubieren.
- 2 Minuten auf Eiswasser stellen.

- Zugabe von 300 µl LB-Medium (37°C warm).
- 30 Minuten bei 37°C inkubieren.
- Ca. 150 µl transformierte Eco XL-1 Blue auf Platten mit Trigalski-Spatel verteilen. ÜN bei 37°C inkubieren (Deckel nach unten, damit kein Kondenswasser auf den Agar tropft).
- Weiße Kolonien (durch Insertion des Plasmids verlieren die Kolonien ihre blaue Farbe) mit einer sterilen Öse ernten und in ein steriles Reagenzglas mit 5 ml LB Medium + 50 µl 1%iges Ampicillin zugeben. ÜN bei 37°C auf Schüttler inkubieren.

### **d. Plasmid-Extraktion**

Die Plasmid-Extraktion erfolgte mittels QIAprep Spin Plasmid Kit.

- 5 ml ÜN Kultur 2 Minuten bei 4°C und 6.300 x g zentrifugieren, Überstand verwerfen.
- Pellet in 250 µl Puffer 1 resuspendieren (mischen).
- 250 µl Puffer 2 zugeben, 3-6x kippen.
- 350 µl N3-Puffer zugeben, 3-6x kippen.
- 10 Minuten bei 4°C und 31.870 x g zentrifugieren.
- Plasmid ist im Überstand.
- Überstand in Spin Columns geben und 1 Minute bei 4°C und 17.000 x g zentrifugieren. Durchfluss verwerfen.
- 750 µl PE-Puffer auf ein Sieb geben und 1 Minute bei 4°C und 17.000 x g zentrifugieren.
- Durchfluss verwerfen.
- 1 Minute bei 4°C und 17.000 x g zentrifugieren.
- Spin Columns auf ein neues 1,5 ml Tube setzen.
- 50 µl EB-Puffer (oder Aqua bidest, pH 7,0-8,5) auf ein Sieb geben.
- 1 Minute bei RT stehen lassen.
- 1 Minute bei 4°C und 17.000 x g zentrifugieren.
- Plasmid ist im Durchfluss.
- Mit einem BioPhotometer der Firma Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH wurde die Konzentration des Plasmids bestimmt.



Zur Überprüfung, ob die nach Durchführung der Klonierung erhaltenen Amplifikate der Sequenz des Rezeptors entsprachen, wurden sie sequenziert (Firma Qiagen).

**e. Trennung des Plasmids mit Hilfe von Not-I und Nco-I**

- 0,2 µl 100 x BSA-Lösung
- 2 µl Puffer 3
- x µl Plasmid (mind. 100 ng)
- 0,5 µl Not-I
- 0,5 µl Nco-I
- bis zu 20 µl Aqua bidest
- Inkubation 37°C 1 Stunde oder ÜN
- Hitzeinaktivierung: 20 Minuten bei 65°C
- Nachweis des Transkriptes mittels einer 2%igen Agarose-Gel-Elektrophorese

**f. Spaltung des Plasmids jeweils mit Not-I und Nco-I**

Ansatz mit Not-I:

- X µl Plasmid (mind. 100 ng)
- 2 µl Puffer 3
- 0,2 µl 100 x BSA-Lösung
- 0,5 µl Not-I
- bis zu 20 µl Aqua bidest

Ansatz mit Nco-I:

- X µl Plasmid (mind. 100 ng)
- 2 µl Puffer 4
- kein BSA
- 0,5 µl Nco-I
- bis zu 20 µl Aqua bidest

Beide Ansätze (Not-I und Nco-I) 1 Stunde bei RT oder ÜN bei 37°C inkubieren.  
Hitzeinaktivierung 20 Minuten bei 65°C.

**g. Herstellung der „sense“ und „anti-sense“ Sonden mittels in vitro-Transkription**

Not-I-geschnittenes Plasmid:

- 8 µl Aqua bidest
- 4 µl 5 x Transkriptionspuffer
- 2 µl 10 x Digoxigenin RNA-Labeling-Mix
- 2 µl 100 x DTT
- x µl linearisiertes Plasmid (mind. 100 ng)
- 2 µl T7 RNA-Polymerase

Nco-I-geschnittenes Plasmid:

- 8 µl Aqua bidest
- 4 µl 5 x Transkriptionspuffer
- 2 µl 10 x Digoxigenin RNA-Labeling-Mix
- 2 µl 100 x DTT
- x µl linearisiertes Plasmid (mind. 100 ng)
- 2 µl Sp6 RNA-Polymerase

- Inkubation 1 Stunde bei 37°C.

Zugabe zu den Not-I- bzw. Nco-I-geschnittenen Plasmiden:

- 0,5 µl 0,5 M EDTA-Lösung
- 1,2 µl 8 M Lithium-Chlorid-Lösung
- 70,7 µl gekühlter (-20°C) 100%iger Ethanol
- Inkubation 1 Stunde bei -80°C.
- 20 Minuten bei 4°C und 17.000 x g zentrifugieren, Überstand abpipettieren.
- 200 µl 70%iges Ethanol (-20°C) zugeben.
- 15 Minuten bei 4°C und 17.000 x g zentrifugieren, Überstand abpipettieren. Pellet trocknen bei 37°C, dann in 50 µl Aqua bidest bei 70°C im Wasserbad ca. 10 Minuten resuspendieren.
- beide Sonden („sense“ und „anti-sense“) bei -20°C lagern.

**4.3.2.3 In situ Hybridisierung**

Vorbereitung am Vortag:

- die Paraffinschnitte und Xylol in Trockenschrank bei 60°C über Nacht inkubieren lassen.

**Tag 1**

**a. Vorbereitung der Schnitte**

Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte:

- 5 Minuten Xylol 60°C, 2 x 5 Minuten Xylol RT, 2 x 5 Minuten 100%iges Ethanol, 1 x 5 Minuten 96%iger Ethanol, 1 x 5 Minuten 70%iger Ethanol.

Im weiteren Verlauf wurden ausschließlich sterile Behälter, steriles Besteck und sterile Lösungen verwendet, um eine RNase-Kontamination zu vermeiden.

- Die Schnitte 1 x in DEPC-behandeltes Wasser spülen.
- 20 Minuten in 0,2 N HCl inkubieren.
- 15 Minuten bei 70°C in 2 x SSC inkubieren und kurz in PBSM-Puffer spülen.
- 25 Minuten Inkubation mit Proteinase K (feuchte Kammer mit DEPC-behandeltem Wasser). Die optimale Konzentration für Proteinase K muss im Voraus bestimmt werden, z.B. für Hoden 20 µg/ml.
- 5 Minuten abstoppen in 0,2%igem Glycin.
- 15 Sekunden in 20%iger Essigsäure inkubieren (Blockierung endogener Phosphatase).
- 5 Minuten in PBSM-Puffer spülen.
- 10 Minuten in 4%iger Paraformaldehyd-Lösung inkubieren.
- 5 Minuten in PBSM-Puffer spülen.

### **a. Prähybridisierung**

- 1 h in 20%igem Glycerol inkubieren.

### **b. Hybridisierung**

- Schnitte kurz in 2 x SSC tauchen, Sonden-Gemisch und Hybridisierungspuffer zusammenpipettieren und auf den Schnitt geben (je nach der Größe des Schnitt ca. 50-100 µl).
- Objektträger auf eine Heizplatte legen und 10 Minuten bei 70°C denaturieren, dann auf einer Eisplatte abkühlen.
- ÜN in einer Hybridisierungskammer inkubieren.
- Die Inkubationstemperatur soll für jede Sonde ausgetestet werden, (ER-α 40°C; ER-β 37°C).

## Tag 2

### c. Posthybridisierung

Nach Ablauf der Hybridisierungsdauer wurden die Schnitte dem so genannten stringenten Waschen unterzogen. Durch das Waschen werden unspezifisch gebundene Sonden vom Schnitt gelöst und somit eine unspezifische Hintergrundreaktion reduziert.

- Schnitte 4 x 10 Minuten in 4 x SSC bei RT waschen.
- 30 min bei 37°C Inkubation mit RNaseA / RNaseT1.
- 4 x 5 Minuten in 4 x SSC bei 42°C waschen.
- 15-20 Minuten in 2 x SSC bei 60°C waschen.
- 15-20 Minuten in 0,2 x SSC bei 42°C waschen.
- 5 Minuten in 0,1 x SSC bei RT waschen.
- 5 Minuten in 2 x SSC bei RT waschen.

### d. Immunhistochemie

- Schnitte 10 Minuten in 1 x TNMT-Puffer bei RT spülen.
- Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte durch Inkubation 1 Stunde bei RT in 3%igem BSA in 1 x TNMT-Puffer.
- Inkubation mit anti-DIG-Antikörper (Anti-Digoxigenin-AP Fab-Fragment) in feuchter Kammer ÜN bei 4°C, oder 1 Stunde bei RT. Verdünnung: 1:500 in 3%igem BSA und 1 x TNMT (1:2).

## Tag 3

- Schnitte 2 x 10 Minuten in 1 x TNMT-Puffer waschen.
- 5 Minuten in 1 x NTB-Puffer waschen.
- 5 Minuten in 50 ml 1 x NTB + 250 µl 1 M Levamisol waschen.
- Im Dunkeln mit NBT-BCIP in einer feuchten Kammer entwickeln.
- Nach der Entwicklung: die Schnitte mit Aqua bidest waschen, evtl. Gegenfärbung und Eindecken in Glycergel.

### **4.3.3 Nachweis der zellulären Lokalisation der Rezeptoren mittels in situ RT-PCR**

In situ RT-PCR ist eine molekularbiologische Methode für Forschung und Diagnostik, die die hohe Sensitivität einer Polymerasekettenreaktion mit dem Vorteil der ISH verbindet, um gesuchte RNA- bzw. DNA-Abschnitte spezifisch einzelnen Zellen zuzuordnen (Nuovo, 1994; Schiller et al., 1998).

Grundsätzlich werden zwei verschiedene Methoden verwendet. Bei der in situ RT-PCR werden während der RNA-Amplifikation markierte Nukleotide eingebaut, die nachfolgend direkt immunhistochemisch nachgewiesen werden können (direkte Methode). Bei der zeitintensiveren aber spezifischeren PCR in situ-Hybridisierung (PCRisHyb) werden im Anschluss an die PCR durch eine ISH markierte spezifische Oligonukleotidsonden an die gesuchten Amplifikationsprodukte gebunden und nachfolgend immunhistochemisch nachgewiesen (indirekte Methode). In der vorliegenden Arbeit wurde eine direkte Methode angewendet.

#### **4.3.3.1 In situ RT-PCR**

Es wurden die gleichen Primerpaare wie für die RT-PCR am Gesamthomogenat benutzt (Kapitel 4.3.1.2.1).

#### **Tag 1**

##### **a. Vorbereitung der Schnitte**

Vom Paraffinblock werden 5-6 µm dünne Gewebescheiben auf SuperFrost-Plus Objektträger angefertigt.

- Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte: 100%iges Xylol für 10-15 Minuten, 100%iges Isopropanol 2 x 5 Minuten ca. 30 Minuten lufttrocknen.
- 1 x mit DEPC-behandeltem Wasser waschen.
- 10 Minuten Inkubation mit Proteinase K (3 µg/ml) (feuchte Kammer mit DEPC-behandeltem Wasser) bei RT.
- 5 Minuten abstoppen in 0,2%igem Glycin.
- 3 x 1 x PBS waschen.

DNase I-Verdau:

- 2 µl 10 x DNase I Puffer (MnCl<sub>2</sub> 10 mM, 10 x PCR-Puffer;1:1)
- 2 µl DNase I (10 U/µl)
- 15 µl DEPC-behandeltes Wasser
- 1 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl)

Das Gemisch auf die Schnitte geben (ca. 20 µl pro Schnitt) und 18-24 Stunden (ÜN) bei 37°C in feuchte Kammer inkubieren; 1 x ohne DNase I als Positivkontrolle.

**Tag 2**

- 2 x mit DEPC-behandeltem Wasser waschen.
- 3-5 Minuten in 100%igem Isopropanol waschen und ca. 60-90 Minuten lufttrocknen.

In situ RT-PCR Reaktion-Mix:

- 10 µl 5 x EZ Puffer (Applied Biosystems)
- 1,0 µl dATP, dCTP, dGTP, dTTP Mix (dNTP Stammlösung 10 x)
- 1,0 µl DIG-dUTP (PCR-DIG-Labeling-Mix 10 x)
- 1,0 µl RNase Inhibitor (20 U/µl)
- 3,0 µl Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)
- 3,0 µl Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)
- 6,0 µl Mn(OAc)<sub>2</sub> (10 mM)
- 2,0 µl rTth (2,5 U/l)
- bis 50 µl DEPC-behandeltes Wasser
- 1x ohne Primer als negative Kontrolle

Schnitte mit Folie „FrameSeal Slide Chambers 65“ abdecken und 50 µl Reaktions-Mix 50 µl auf der Schnitt geben.

Die „FrameSeal Slide Chambers 65“ verschließen. Objektträger in PCR Block legen und RT-PCR Programm durchführen.

### PCR Programm:

1. 62°C für 45 Minuten
2. 94°C für 3 Minuten
3. 94°C für 1 Minute 30 Sekunden
4. 60°C 55°C für ER- $\alpha$  und 56°C für ER- $\beta$  2 Minuten
5. 68°C für 2 Minuten
- 3-5: je 36 Zyklen
6. 15°C Pause

### Nach der PCR:

- 3 x 15 Minuten in 0,1 x SSC bei 60°C waschen (beim letzten Waschen 0,1%iges Schafserum als Blockierungsreagenz).
- 5-10 Minuten bei RT abkühlen lassen.
- 10 Minuten mit Puffer 7,5 pH waschen.
- Inkubation mit anti-DIG-Antikörper in Puffer 7,5 pH (Anti-Digoxigenin-AP Fab-Fragment 1:1000) in einer feuchten Kammer ÜN bei 4°C.

### Tag 3

- 2 x 10 Minuten mit Puffer 7,5 pH waschen.
- 5 Minuten mit Puffer 9,6 pH waschen.
- 5 Minuten mit Puffer 9,6 pH + 1 M Levamisol waschen, um endogene Phosphatase zu unterdrücken.
- Entwickeln mit NBT-BCIP in einer feuchten Kammer im Dunkeln.
- Nach der Entwicklung: Schnitte mit Aqua bidest waschen, evtl. Gegenfärbung und eindecken in Glycergel.

#### **4.3.4 RT-PCR nach Ultraviolett-Laser-assistierter Mikrodissektion (UV-LACP)**

Bei der UV-LACP werden aus einem Paraffinschnitt oder, wie in dieser Arbeit, aus einem Gefrierschnitt mit Hilfe eines fokussierten UV-Lasers vorher ausgewählte Zellen oder Zellgruppen herausgeschnitten und durch das sog. „Laser-Pressure Catapulting“ (LPC), mit Laser-Energie aus dem Gewebe herauskatapultiert. Die Zellen oder Zellgruppen werden im Deckel eines Mikrozentrifugenröhrchens aufgefangen und stehen nun für eine anschließende molekularbiologische Analyse zu Verfügung.

##### **4.3.4.1 Herstellung histologischer Schnittpräparate (Gefrierschnitte) für UV-LACP**

Die Herstellung der histologischen Gefrierschnitte ist in folgenden Abschnitten beschrieben.

###### **4.3.4.1.1 Vorbereitungen**

RNase-freien Arbeitsplatz und RNase-freie Geräte sicherstellen (siehe Kapitel 4.3.1.1.2, a).

###### **4.3.4.1.2 Beschichtung der Objektträger**

Für die Herstellung von Gefrierschnitten wurden die mit einer Membran beschichteten Objektträger (Palm<sup>®</sup> Membrane Slides) 30 Minuten mit UV-Licht (Wellenlänge: 254 nm) aus ca. 15 cm Entfernung für eine bessere Haftung der Schnitte bestrahlt.

###### **4.3.4.1.3 Herstellung von Gefrierschnitten**

Durch Gefrieren der Präparate wurde die zum Schneiden notwendige Härtung des Gewebes erzielt. Neben einer schnellen Verarbeitung bei niedrigen Temperaturen liegt der Vorteil dieses Verfahrens in der möglichst schonenden Gewebebehandlung unter Vermeidung von Schrumpfungartefakten.

Die bei -80°C konservierten Gewebeproben wurden mit einer sterilen Pinzette aus dem Gefriertruhe entpackt und mit dem wasserlöslichen Gewebeklebemittel Tissue-Tek<sup>®</sup> auf speziell für diesen Zweck angefertigte Metall-Objekthalter befestigt.



Vor dem eigentlichen Schneidevorgang wurde das frisch aufgeblockte Gewebe für einige Zeit im Gefriermikrotom 2800 Frigocut gelagert, um sich der dort eingestellten Temperatur anpassen zu können. Mit dem Kryostat wurden dann 5 µm dicke Gefrierschnitte zum UV-LACP angefertigt.

Kühltemperatur: -28°C bis -30°C

Objekttemperatur: -20°C bis -22°C

#### **4.3.4.1.4 Fixation der Gefrierschnitte für UV-LACP**

Zur histologischen Beurteilung wurde jeweils der erste Gefrierschnitt auf einen unbeschichteten OT aufgenommen, für 30 Sekunden mit Hämatoxylin gefärbt und anschließend in Aqua bidest gespült. Mit Hilfe dieser Schnellfärbung wurden geeignete Präparate ausgewählt.

- Schnitte mit Membran-beschichteten Objektträgern aufnehmen und eine Minute bei RT trocknen lassen.
- 30 Sekunden mit Haematoxylin überschichten, in sterilem Aqua bidest abspülen.
- In aufsteigender Alkoholreihe dehydrieren: 10 Sekunden in 70%igem Ethanol, 10 Sekunden in 80%igem Ethanol, 10 Sekunden in 96%igem Ethanol.
- Schnitte trocknen lassen.
- Jeden einzelnen Schnitt mit DAKO-Pen umkreisen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C in steriler Standkuvette aufbewahren.

#### **4.3.4.1.5 Ablauf der UV-LACP**

Die UV-LACP erfolgte mit Hilfe des Palm<sup>®</sup> MicroBeam Systems.

Das System besteht aus folgenden Komponenten:

- inverses Hochleistungsmikroskop (Axiovert 135)
- motorisierter und über eine Computermaus steuerbarer Objektisch
- mit dem Computer sowie mit dem Mikroskop verbundener integrierter Laser (Nitrogen/Stickstoff-Laser 337) zum Ausschneiden der gewünschten Zellen
- mit dem Computer verbundene 3-CCD Color Video Camera KY-F55B
- Software (Palm@Robo Software) zur Steuerung der Mikrodisektion

Die Mikrodisektion lässt sich in vier Arbeitsschritte untergliedern:

- Auswahl der interessierenden Zellen am Gefrierschnitt mittels Mikroskop bzw. Monitor
- Markierung der späteren Schnittlinie mit Hilfe der Software
- automatisches Umschneiden des ausgewählten Areals mit Hilfe des Laserstrahls
- Herauskatapultieren des ausgeschnittenen Areals mit Hilfe des „Laser-Pressure Catapulting“
- Das herauskatapultierte Gewebe wird im Deckel eines Mikrozentrifugenröhrchens, welches mit 2,5 ml sterilem Mineralöl ausgekleidet ist, aufgefangen und steht nach anschließender kurzer Zentrifugation zur weiteren Behandlung im Boden des Mikrozentrifugenröhrchens zur Verfügung.

In dieser Arbeit wurden aus dem Hodengewebe von Ebern unterschiedliche Ansätze (je 35 Ausschnitte) mittels der Mikrodissektion angefertigt:

- basaler Teil des Keimepithels (Spermatogonien und primäre Spermatozyten)
- adluminaler Teil des Keimepithels (runde und elongierende Spermatiden)
- gesamtes Keimepithel

Alle drei Ausschnitte enthalten Sertoli-Zell Zytoplasma.

- Areale mit überwiegend Leydig-Zellen

#### **4.3.4.1.6 Extraktion der RNA**

Zur Extraktion der Gesamt-RNA des mikrodissezierten Gewebes wurde das RNasy Micro Kit und das dazu gehörende Protokoll verwendet.

- Mikrodisseziertes Gewebe direkt nach der Zentrifugation mit 350 µl Puffer RLT versetzen, 5 µl Träger-RNA-Gebrauchslösung zugeben, 30 sec auf dem Deckel vortexten und dann kurz anzentrifugieren.

Die Probe kann im flüssigen Stickstoff mehrere Monate aufbewahrt werden und nach anschließendem Auftauen bei RT wie folgt weiterverarbeitet werden:

- 350 µl 70%igen Ethanol zugeben, gut mischen, die Probe in ein Säulchen (RNeasy MinElute Spin Column), welches in einem 2 ml Sammelgefäss steckt, geben. 15 Sekunden bei RT mit 9.800 x g zentrifugieren, Durchfluss verwerfen.

- 350 µl Puffer RW1 (Buffer RW1) zugeben. 15 Sekunden bei RT mit 9.800 x g zentrifugieren, Durchfluss verwerfen.
- 10 µl DNase Stammlösung mit 70 ml Puffer RDD (Buffer RDD) mischen und die Lösung direkt auf die Membran des Säulchens geben. 15 Minuten bei RT inkubieren.
- 350 µl Puffer RW1 zugeben. 15 sec bei RT mit 9.800 x g zentrifugieren.
- Durchfluss verwerfen, Säulchen in ein neues 2 ml Sammelgefäß stecken.
- 500 µl Puffer RPE zugeben. 15 Sekunden bei RT mit 9.800 x g zentrifugieren, Durchfluss verwerfen.
- 500 µl 80%igen Ethanol zugeben. 2 Minuten bei RT mit 9.800 x g zentrifugieren.
- Durchfluss verwerfen, Säulchen in ein neues 2 ml Sammelgefäß stecken und mit offenem Deckel 5 Minuten bei RT mit 31.870 x g zentrifugieren, um restlichen Ethanol zu entfernen.
- Durchfluss verwerfen, Säulchen in ein neues 1,5 ml Sammelgefäß stecken.
- 14 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran geben und 1 Minute bei RT stehen lassen. 1 Minute bei RT mit 31.870 x g zentrifugieren.
- Die RNA befindet sich im Sammelgefäß. Aufbewahren in flüssigem Stickstoff.
- 

#### **4.3.4.1.7 RT-PCR**

Für die cDNA-Synthese wurde ein Sensiscript<sup>®</sup> RT Kit (200) verwendet.

##### **a. cDNA-Synthese:**

- 2,6 µl Aqua bidest
- 2,0 µl 10 x RT-Puffer
- 2,0 µl 5 mM dNTP
- 0,4 µl 50 µM Oligo-dT-Primer
- 1,0 µl Sensiscript reverse transcriptase (4 U/µl)
- 12 µl mRNA

Inkubation im Thermocycler: 60 Minuten 37°C, 5 Minuten 93°C.

## **b. PCR**

Die PCR wurde mittels Taq DNA-Polymerase Kit durchgeführt. Für die PCR aus mikrodissiziertem Gewebe wurden die Primer ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  verwendet. Als interne Kontrolle für jede Probe wurde  $\beta$ -Aktin mitgeführt (Kapitel 4.3.1.2.2).

PCR-Ansatz:

- 9,4  $\mu$ l Aqua bidest
- 2,0  $\mu$ l 10 x Puffer
- 4,0  $\mu$ l 5 x Q-Solution
- 0,4  $\mu$ l 10mM dNTP
- 0,4  $\mu$ l Vorwärts-Primer (10 pmol/ $\mu$ l)
- 0,4  $\mu$ l Rückwärts-Primer (10 pmol/ $\mu$ l)
- 0,2  $\mu$ l Taq-Polymerase (1 U/ $\mu$ l)

Proben kurz anzentrifugieren.

Inkubation im Termocycler:

1. Startextension 95°C 2 Minuten
2. Extension 94°C 1 Minute
3. Annealing 54°C für ER- $\alpha$  und 56°C für ER- $\beta$  1 Minute
4. Elongation 72°C 1 Minute 30 Sekunden
- 2-4 je 35 Zyklen
5. Schlusselongation 72°C 10 Minuten
6. Kühlen 4°C

Die Auftrennung der PCR-Amplifikate erfolgte wie unter Punkt 4.3.1.2.4 beschrieben, jedoch mit folgenden Modifikationen:

Der Laufpuffer (1 x TAE-Puffer) wurde auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt.

Herstellung des 2%igen DNA-Agarosegel (Mini-Gel):

- Anstelle von Ethidiumbromid wurden der 30 ml Agarose-Lösung 6  $\mu$ l SYBR-Green zugegeben.
- Elektrophorese 40 min bei einer Spannung von 125 V laufen lassen.

#### 4.3.5 Semiquantitative Real Time PCR

Die Real Time PCR, auch "quantitative PCR" genannt, stellt eine Weiterentwicklung der PCR dar. Sie wird eingesetzt, um das Expressionsniveau der RNA in einer Probe zu bestimmen.

Die Methode erlaubt die direkte Detektion der PCR-Produkt-Akkumulation während der log-linearen Phase der Reaktion über Fluoreszenzfarbstoffe oder Fluoreszenzfarbstoff-markierte Sonden. Diese binden sich in bestimmten Schritten des PCR-Zyklus an die Ziel-DNA. Das Signal der durch eine Lichtquelle angeregten Fluoreszenzfarbstoffe korreliert dabei quantitativ mit der Menge an PCR-Produkt und kann über eine Software in Echtzeit (real-time) dargestellt werden. Zum Einsatz können verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe und Sonden kommen: SYBR Green, TaqMan-Hybridisierungs-Sonden.

In dieser Arbeit wurden die TaqMan-Sonden eingesetzt (Holland et al., 1991).

Analog zu der konventionellen RT-PCR muss die mRNA vor der eigentlichen PCR in ein geeignetes Template (cDNA) mittels Reverser Transkriptase umgeschrieben werden.

Die cDNA Synthese erfolgte wie im Kapitel 4.3.1.2.3 (a, b) beschrieben. Nach der reversen Transkription mit der MuLV-Reverse-Transkriptase wurde die quantitative Real Time PCR durchgeführt. Dazu wurde das Gerät AbiPrism 5700<sup>TM</sup> Sequence Detection System im „Absolute Quantification“ Modus benutzt. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Bei der Durchführung der Real Time PCR wurde der TaqMan<sup>®</sup> qPCR MasterMix eingesetzt. Für die PCR wurde cDNA, die 44,3 ng der mRNA entspricht, in einem 25 µl PCR Reaktionsgemisch benutzt, das 12,5 µl TaqMan Reaktion Puffer (dNTPs, Hot Goldstar DNA Polymerase, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, Urazil-N-glycosylase), 300 nM der jeweiligen Primer und 200 nM TaqMan-Sonde enthält. Das Real Time-Programm wurde mit einem Zyklus (2 Minuten 50°C, 10 Minuten 95°C), gefolgt von 40 Zyklen (15 Sekunden 95°C und 60 Sekunden für 60°C), durchgeführt.

Die Primer und Sonden für die *Real Time PCR* wurden mit Hilfe der Primer Express Software (Version 2.0, Applied Biosystems, Foster City, CA) entwickelt (Tab. 5). Die zugehörigen Genbanknummern für ER-α, ER-β, AR, LHR und FSH sind in der Tabelle 4 eingetragen. Die Genbanknummer für GAPDH ist AF017079.

**Tab. 5:** Sequenzen von Primern und Sonden für die Real Time PCR (Tm - Schmelztemperatur der Primer, bp - die Größe des Amplifikates).

Name	Primer Sequenzen Vorwärts 5'/3' Rückwärts 3'/5'	Tm	bp
ER- $\alpha$ Vorwärts	TCTTTGACATGTTGCTGGCTACA	60°C	81
ER- $\alpha$ Rückwärts	TGGATTTGAGGCACACAAACTC		
Sonde	TCTCGCTTCCGTATGATGAATCTCCAGG		
ER- $\beta$ Vorwärts	CTGGTCGACAGGCCACAAG	57°C	87
ER- $\beta$ Rückwärts	GAAGTGACGGCTGGCAATG		
Sonde	TTGTGGCCAACTCCTGGACACCTCTCT		
AR Vorwärts	TTGCTCCTGACCTGGTTTTCA	58°C	76
AR Rückwärts	TGCCTCATCCGGACACACT		
Sonde	TACCGCATGCATAAGTCCCGAATGTACAG		
LHR Vorwärts	CATGGATGTGGAAACCACTCTCT	62°C	92
LHR Rückwärts	TGTAGCAAGCACAAATGATGATGA		
Sonde	ACCATCCTGATCCTCAATGTGGTGGC		
FSHR Vorwärts	ACGCGGTTGAACTGAGGTTT	55°C	81
FSHR Rückwärts	TCTCCAGGTCCCCAAATCC		
Sonde	TTCTCACCAAGCTTCGAGTCATCCCAA		
GAPDH Vorwärts	CCTGCCAAATATGATGACATCAAG	64°C	96
GAPDH Rückwärts	GGACACAACCTGGTGCTCAGT		
Sonde	CTCGGACGCCTGCTTCACCACT		

#### 4.3.5.1 Auswertung

Die mittels Real Time PCR ermittelte Quantifizierung der Expression eines Gens lässt sich in eine absolute und eine relative Quantifizierung unterscheiden. Bei der absoluten Quantifizierung wird die absolute Menge, also die Kopienzahl eines Gens, ermittelt. Hierbei wird zur Erstellung einer Regressionsgeraden ein genauer Standard benötigt (z.B. eine definierte Menge von Plasmid-DNA des entsprechenden Gens). Bei der relativen Quantifizierung wird der Anstieg bzw. Abfall des Zielgens in Bezug auf ein Referenzgen ermittelt. Das House-keeping Gene, das zur Normalisierung der Daten verwendet wird, sollte daher nicht reguliert sein, d. h. es sollte ein konstantes Expressionsniveau in verschiedenen Geweben, Stadien und unter verschiedenen experimentellen Bedingungen besitzen. Voraussetzung zur Anwendung der relativen Quantifizierung ist, dass die Ziel- und Referenzgen-PCR vergleichbare Reaktionseffizienzen zeigen.

In der vorliegenden Arbeit kam die relative Quantifizierung unter Verwendung des House-keeping Genes GAPDH als Referenzgen nach den Angaben des Herstellers von ABI PRISM™ 5700 Sequence Detection System zum Einsatz.

Die Quantifizierung der PCR basiert auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem so genannten Threshold Cycle oder  $C_T$ -Wert. Der  $C_T$ -Wert ist jener PCR-Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Dabei gilt, dass zu Beginn der PCR-Reaktion nur die Basis- oder Hintergrundfluoreszenz gemessen wird, da die Fluoreszenz aufgrund der geringen Templatekonzentration im Reaktionsgefäß während der ersten PCR-Zyklen normalerweise nicht detektierbar ist. Der  $C_T$ -Wert definiert also jenen Zeitpunkt, ab dem die Amplifikation und damit die Bildung von Doppelstrang-cDNA exponentiell ist und in dieser Phase die PCR-Reaktion von keinen limitierenden Faktoren, wie Primer-, Nukleotidmangel oder nachlassende Enzymaktivität eingeschränkt wird.

Der  $C_T$ -Wert ist umgekehrt proportional zum Logarithmus der ursprünglich in die Reaktion eingebrachten cDNA-Kopienzahl des entsprechenden Gens. Je mehr cDNA-Template initial vorhanden ist, umso geringer ist die erforderliche Anzahl an Zyklen, bis das Fluoreszenzsignal über dem Hintergrund detektierbar ist.

Die Bestimmung der relativen Expression setzt sich aus drei Formeln zusammen:

Mit der Formel (1) berechnet man den Unterschied an Thresholdzyklen für die Zielsequenz und das Referenzgen. Hierbei wird auf das House-keeping Gene GAPDH normalisiert.

$$1. \Delta C_T = \Delta C_{T \text{ Zielgen}} - \Delta C_{T \text{ GAPDH}}$$

Bevor die relative Expression bestimmt werden kann, muss zunächst  $\Delta\Delta C_T$  bestimmt werden. Hiefür wird ein Kalibrator ausgewählt. Als Kalibrator wird die Probe bezeichnet, bei der die Expression am niedrigsten war (also die Probe mit dem höchsten  $\Delta C_T$  Wert). Der  $\Delta C_T$ -Wert des Kalibrators wird von den  $\Delta C_T$ -Werten aller Proben abgezogen (Formel 2).

$$2. \Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ Zielgen}} - \Delta C_{T \text{ Kalibrator}}$$

Mit Hilfe des  $\Delta\Delta C_T$  (Formel 3), kann die relative Gene Expression (RGE) bestimmt werden.

$$3. RGE = 2^{(-\Delta\Delta C_T)}$$

Die RGE gibt die n-fache Überexpression eines Gens im Vergleich zu der Probe mit der niedrigsten Expression (Kalibrator) an.

### 4.3.5.2 Statistische Verfahren

Die statistische Auswertung der quantitativ ermittelten und in Prozent angegebenen Zahlenwerte für Rezeptorexpression nach der Real Time PCR wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe „Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen“ durchgeführt. Die Auswertungen wurden unter Verwendung des Statistikprogrammpakets BMPD/Dynamic, Release 7.0, (Dixon, 1993) durchgeführt.

Zum globalen Mittelwertvergleich zwischen den Gruppen wurde eine einfaktoriale Varianzanalyse durchgeführt. Im Fall einer statistischen Signifikanz folgte der paarweise Vergleich mit der Kontrollgruppe (intakte Eber) mit dem „Dunnnett-Test“ nach. Zur Beschreibung der Daten wurden arithmetische Mittelwerte, Standardabweichungen, berechnet und tabellarisch weitergegeben (Kapitel 10.2, Tab. 14).

Bei rechtsschiefer Verteilung positiver quantitativer Merkmale wurde eine logarithmische Transformation der Daten durchgeführt, und die



Datenbeschreibung mit Hilfe von geometrischen Mittelwerten ( $\bar{x}_g$ ) und Streufaktoren (SF), dargestellt in Form von Intervallen  $[\bar{x}_g/SF; \bar{x}_g \cdot SF]$ , vorgenommen (Kapitel 10,2, Tab. 14).

Bei der Bewertung der statistischen Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$  zugrunde gelegt, d.h. Ergebnisse mit  $p \leq 0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen. Zusätzlich wurde der exakte p-Wert angegeben. Die grafischen Abbildungen wurden auf einem Personalcomputer mit dem Program Microsot Excel sowie Corel Graphics erzeugt.

## 4.4 Materialien

### 4.4.1 RT-PCR

- Geneamp Gold RNA PCR Core Kit
- Amplitaq Gold 1000 U+Gold Buffer+MgCl<sub>2</sub>
- DNase I (10 U/μl)
- RNase-Inhibitor (40 U/μl)
- DEPC-behandeltes Wasser: 1 ml DEPC in 1 l Aqua dest bei 37°C lösen und anschließend autoklavieren.
- 0,1 M Tris-HCl-Puffer: 1,2 g Tris-HCl in 100 ml DEPC-behandeltes Wasser lösen und den pH 7,3 mit konzentrierter HCl einstellen.
- 10 x DNase I Puffer: 1,2 g Tris-HCl; 3,7 g KCl; 0,3 g MgCl<sub>2</sub> in 100 ml DEPC-behandeltes Wasser lösen und anschließend aliquotieren. Lagerung der Aliquots bei -20°C.
- EDTA 0,5 M: 18,61 g EDTA; 80 ml Aqua dest; 2,00 g NaOH. pH 8,0 einstellen (um das EDTA zu lösen). Aqua dest ad 100 ml.
- Laufpuffer (1 x TAE): 10 x TAE: 48,4 g Tris; 11,4 ml Essigsäure; 20 ml 0,5 M EDTA, mischen, auf pH 8,4 einstellen und auf 1 l mit Aqua bidest auffüllen.
- Auftragspuffer: 0,05 g Bromphenolblau (0,5 ml aus 1%iger Lösung); 0,05 g Xylencyanol (0,5 ml aus 1%iger Lösung); 3 g Ficoll 400; 3 ml 0,5 M EDTA mischen und mit 1xTAE auf 20 ml auffüllen und filtrieren.
- Herstellung eines 2%igen DNA-Agarosegels (Mini-Gel): 1 g Agarose (1 %) in sterilem Becherglas in 50 ml 1xTAE suspendieren.
- 1 % Ethidiumbromid
- 100 Bp Marker

### 4.4.2 ISH

- QIAEX<sup>®</sup> II Gel Extraction Kit (150)
- LB-Medium: 25 Kapseln LB-Medium, 1 l Aqua bidest. Autoklavieren. Im Kühlschrank aufbewahren.
- LB-Agar-Medium: 40 Kapseln LB-Agar-Medium, 1 l Aqua bidest. Autoklavieren. Im Kühlschrank aufbewahren.
- LB-Agar-Medium-Platten: LB-Agar-Medium im Schnellkochtopf 10 Minuten kochen, bis zu 60°C kühlen, dann 30 μg/ml Tetracyclin und

100 µg/ml Ampicillin zugeben. Ca. 30 ml Agar pro Platte gießen, fest werden lassen, sofort weiter verwenden oder im Kühlschrank aufbewahren.

- LBtet-amp-IPTG-XGal-Platten: Die LB-Agar-Medium-Platten 15-30 Minuten bei 37 C inkubieren. Auftragen von X-Gal: (20 mg/ml in 1 ml Dimethylformamid) 40 µl pro Platte, kurz einziehen lassen. Auftragen von IPTG: (20 mg/ml in 1 ml Aqua bidest), 40 µl pro Platte, kurz einziehen lassen. 30 min bei 37 C inkubieren.
- 1 % Ampicillin: 1 g Ampicillin, 100 ml Aqua bidest steril.
- 0,2 N HCl: 5,2 ml 25%ige HCl; 200 ml DEPC-behandeltes Wasser.
- 20 x SSC-Stammlösung mit DEPC-behandeltes Wasser: auf 1 l Aqua bidest: 88,23 g Natriumcitrat ( $C_6H_5O_7Na_3 \times 2H_2O$ ); 175,29 g NaCl; pH 7,0. Zugabe von 1 ml DEPC-behandeltes Wasser. Kräftig schütteln; ÜN im Brutschrank bei 37°C inkubieren; Autoklavieren.
- 20 x SSC-Stammlösung ohne DEPC-behandeltes Wasser: auf 1 l Aqua bidest: 88,23 g Natriumcitrat ( $C_6H_5O_7Na_3 \times 2H_2O$ ); 175,29 g NaCl; pH 7,0. Autoklavieren.
- 1 M  $MgCl_2$ -Lösung: 81,4 g  $MgCl_2$ ; 400 ml DEPC-behandeltes Wasser.
- PBSM-Puffer: 200 ml DEPC-behandeltes Wasser, 1 PBS-Tablette, 1 ml 1 M  $MgCl_2$ -Lösung.
- 0,2%ige Glycin-Lösung: 100 ml PBSM-Puffer, 200 mg Glycin.
- 4%ige Paraformaldehydlösung: 25 g Paraformaldehyd in 500 ml 1 x PBSM-Puffer lösen (unter dem Abzug, auf einem Magnetrührer bei 70°C). 4 N NaOH zugeben bis die Lösung klar wird. Eventuell mit konzentriertem HCl auf pH 7,0 zurücktitrieren. Aliquotieren und bei -20°C aufbewahren.
- 50%iges Dextransulfat: 10 ml DEPC-behandeltes Wasser, 5 g Dextransulfat. Nach dem Lösen Aliquots bei -20°C lagern.
- Denhardt-Reagenz (BFP): auf 10 ml DEPC-behandeltes Wasser 200 mg BSA, 200 mg Ficoll 400, 200 mg Polyvinylpyrrolidon. Aliquots bei -20 °C lagern.
- 10 x TNMT-Puffer: 1 l Aqua bidest: 121,1 g Tris-HCl; 58,4 g NaCl; 4,17 g  $MgCl_2$ . Autoklavieren.

- 5 x NTB Puffer: 60,5 g Tris-HCl; 29,2 g NaCl in 1 l Aqua bidest lösen, pH 9,6 einstellen. Zugabe von 1 ml DEPC. Kräftig schütteln; ÜN im Brutschrank bei 37°C. Autoklavieren.
- 1 M Levamisol: 10 ml 1 x NTB-Puffer ; 2,4 g Levamisol. Aliquots bei -20°C lagern.

Sonden-Mischung vorbereiten:

- 4 µl DEPC-behandeltes Wasser
- 4 µl Salmon-sperm-DNA (1mg/ml)
- 8 µl Yeast-t-RNA (1mg/ml)
- 4 µl DIG-cRNA Sonde

Hybridisierungspuffer vorbereiten:

- 52 µl DEPC-behandeltes Wasser
- 40 µl 20 x SSC
- 80 µl 50%iges Dextransulfat
- 8 µl Denhardt-Reagenz
- 200 µl deionisiertes Formamid

#### **4.4.3 In situ RT-PCR**

- Puffer pH 7,5: 12,70 g Tris-HCl; 2,36 g TRIZMA Base; 8,76 g NaCl; 1 l Aqua bidest. Autoklavieren. 5 ml Triton x 100 zugeben.
- Puffer 9,6pH: 1,52 g Tris-HCl; 10,94 g TRIZMA Base; 5,84 g NaCl; 4,76 g MgCl<sub>2</sub>; 1 l Aqua bidest. Autoklavieren.

#### **4.4.4 UV-LACP**

- β-Mercaptoethanol
- QIAprep® Spin Miniprep Kit (250)
- RNeasy® Micro Kit (50)
- Sensiscript® RT Kit
- Taq DNA-Polymerase Kit

#### **4.4.5 Real Time PCR**

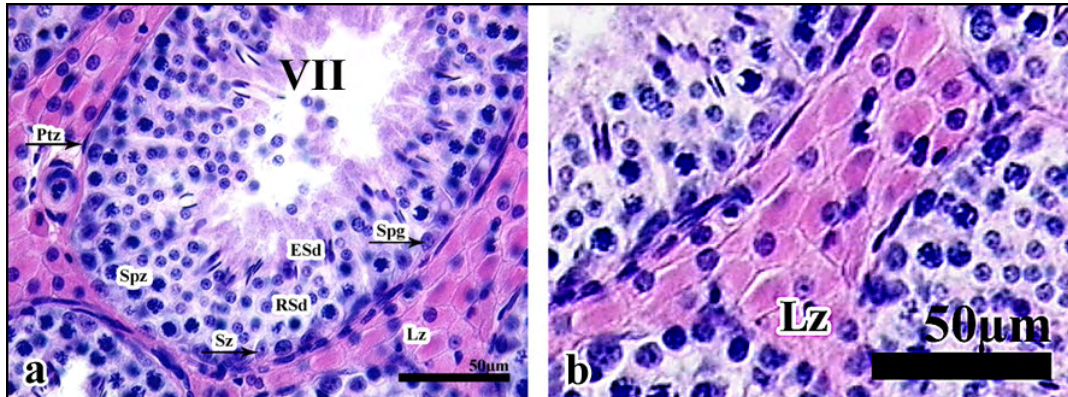
- TaqMan® qPCR Master Mix
- TaqMan-Sonden

## 5 Ergebnisse

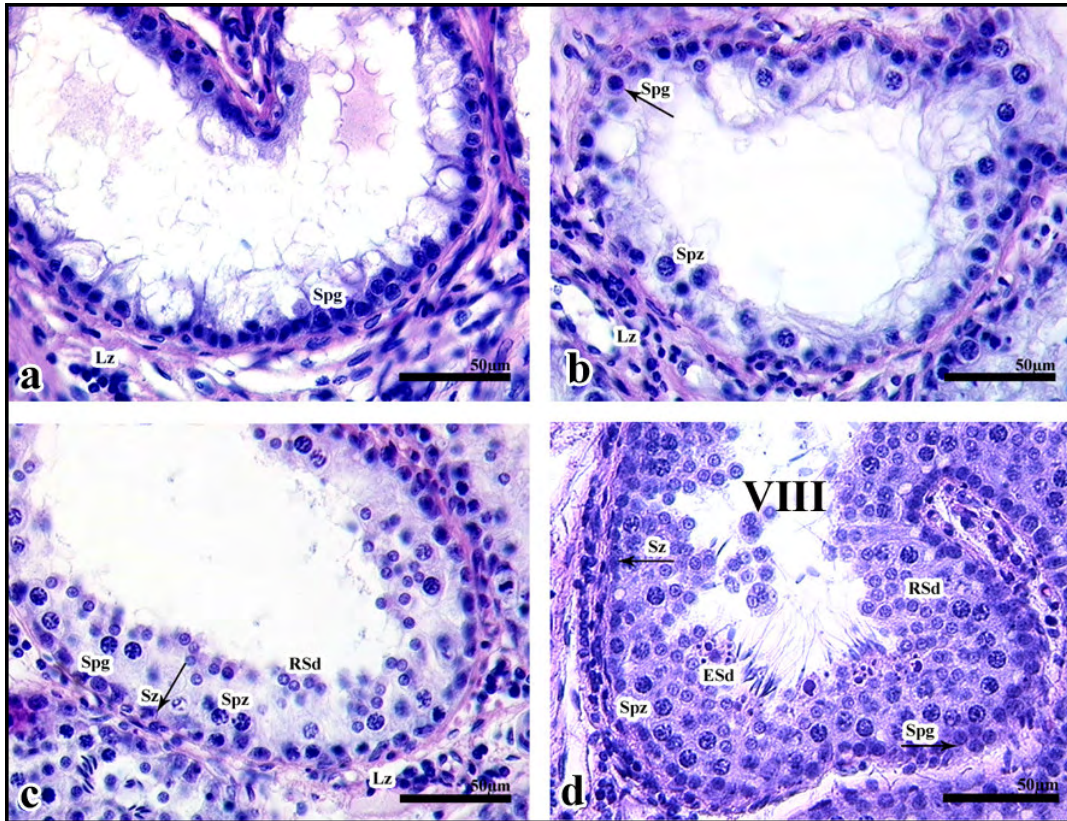
### 5.1 Histologische Evaluierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden im Hoden der intakten Eber eine normale Spermatogenese detektiert (Abb. 12 a, b). Die Immunisierung gegen GnRH unterdrückte, wie erwartet, effektiv die Hodenfunktion mit einer Abnahme des Hodengewichtes (Tab. 2). Es wurde eine bunte Atrophie der Spermatogenese detektiert. Neben Tubuli mit einer qualitativ intakte Spermatogenese (Abb. 13 d), wurde ein Arrest der Spermatogenese auf der Stufe der Spermatogonien (Abb. 13 a), der primären Spermatozyten (Abb. 13 b) und der runden Spermatischen (Abb. 13 c) detektiert. Außerdem wurde im Interstitium eine Atrophie der Leydig-Zellen diagnostiziert, die durch eine Abnahme des Leydig-Zellzytoplasmas bedingt war (Abb. 13 a-d).

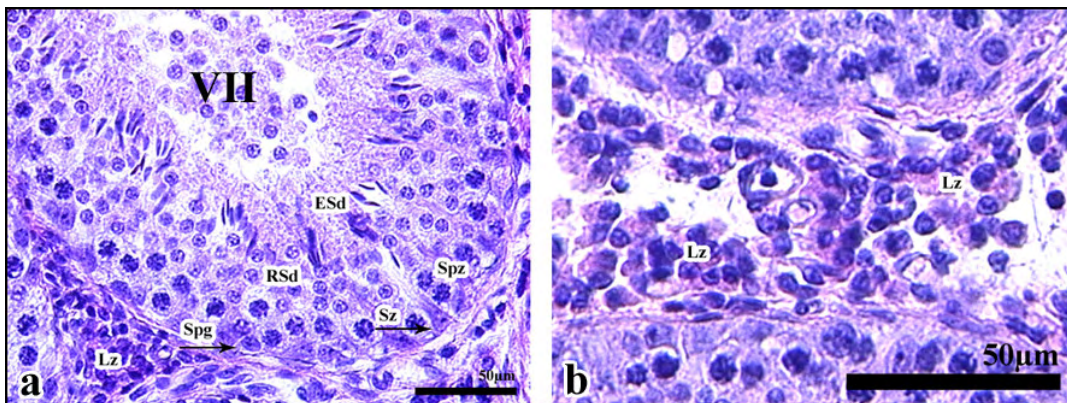
Die  $17\beta$ -Estradiol-Infusion bei immunisierten Eber führte zur Zunahme des Hodengewichtes (Tab. 2) einer Rekrudescenz der Spermatogenese, allerdings bei weiterhin atrophischen Leydig-Zellen (Abb. 14 a, b).



**Abb. 12:** Intakter Eber. **a:** Keimtubulus mit histologisch normaler Spermatogenese (Stadium VII). **b:** histologisch normale Leydig-Zellen. Spermatogonien (Spg), Spermatozyten (Spz), runde Spermatischen (RSd), elongierte Spermatischen (ESd), Sertoli-Zellen (Sz), peritubuläre Zellen (Ptz), Leydig-Zellen (LZ).



**Abb. 13:** Immunisierter Eber. **a:** Spermatogonienarrest und Atrophie der Leydig-Zellen. **b:** Spermatozytenarrest und Atrophie der Leydig-Zellen. **c:** Spermatidenarrest und Atrophie der Leydig-Zellen. **d:** qualitativ intakte Spermatogenese (Stadium VIII).

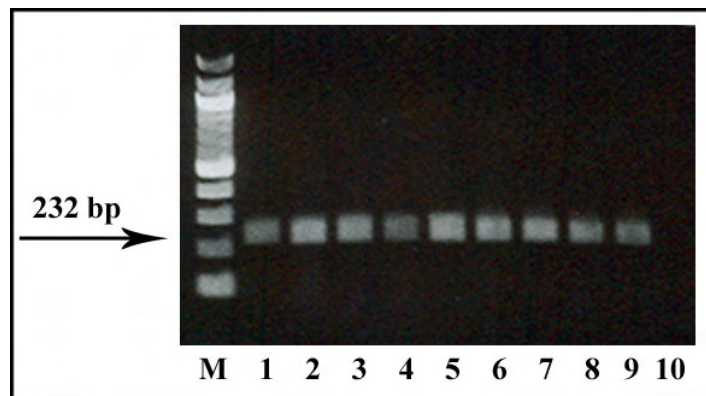


**Abb. 14:** 17β-Estradiol-infundierter, immunisierter Eber. **a:** Keimtubulus mit histologisch normaler Spermatogenese und einer Atrophie der Leydig-Zellen (Stadium VII). **b:** atrophische Leydig-Zellen.

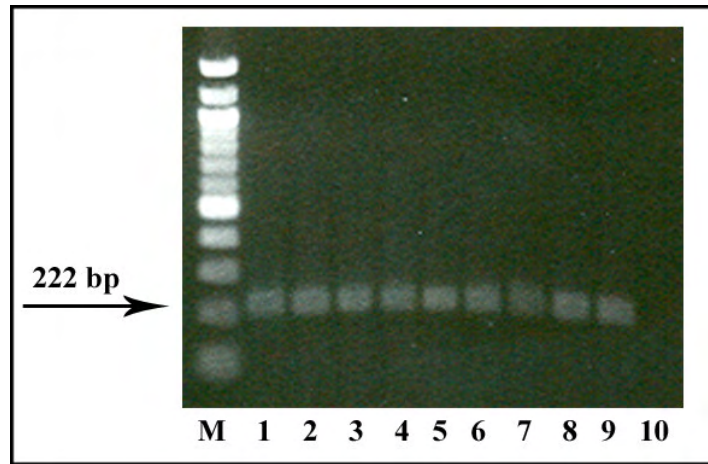
## 5.2 Nachweis der Expression von Steroid- und Gonadotropinrezeptor mRNA mittels RT-PCR an Gesamthomogenat

### 5.2.1 Nachweis der ER- $\alpha$ und ER- $\beta$ mRNA

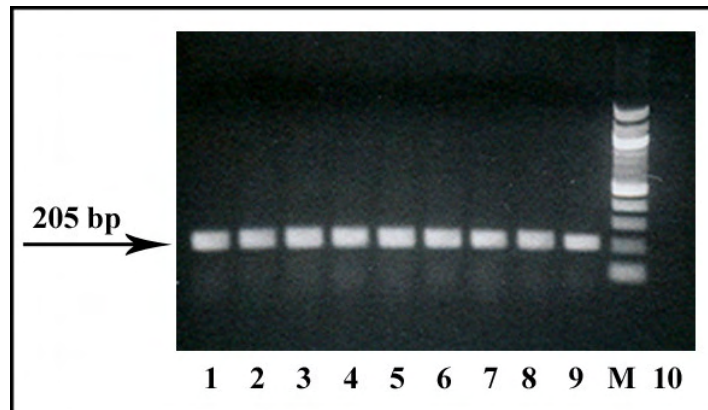
Untersucht wurde Hodengewebe von normalen, immunisierten sowie 17 $\beta$ -Estradiol-infundierten, immunisierten Ebergruppen (Tab. 2). Die RT-PCR für ER- $\alpha$  mRNA am Gesamthomogenat, extrahiert aus Hodengewebe ergab ein spezifisches PCR-Produkt bei 232 bp (Abb. 15) für ER- $\beta$  mRNA (Abb. 16) bei 222 bp. Als House-keeping Gene Kontrolle diente  $\beta$ -Aktin, die Amplifikate lagen im Bereich über der 200 Basenpaarlinie, die erwartete Größe liegt bei 205 bp (Abb. 17). In der Wasserleerprobe, die als negative Kontrolle (NK) diente, war keine cDNA nachweisbar.



**Abb. 15:** RT-PCR am Hodenhomogenat für ER- $\alpha$  mRNA. M: 100 bp DNA-Marker, 1-3: intakte Eber, 4-6: immunisierte Eber, 7-9: 17 $\beta$ -Estradiol-infundierte, immunisierte Eber, 10: NK.



**Abb. 16:** RT-PCR am Hodenhomogenat für ER-β mRNA. M: 100 bp DNA-Marker, 1-3: intakte Eber, 4-6: immunisierte Eber, 7-9: 17β-Estradiol-infundierte, immunisierte Eber, 10: NK.

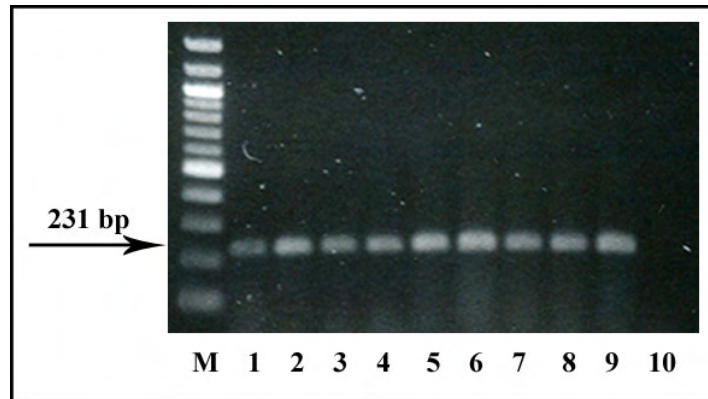


**Abb. 17:** RT-PCR am Hodenhomogenat für β-Aktin mRNA. M: 100 bp DNA-Marker, 1-3: intakte Eber, 4-6: immunisierte Eber, 7-9: 17β-Estradiol-infundierte, immunisierte Eber, 10: NK.

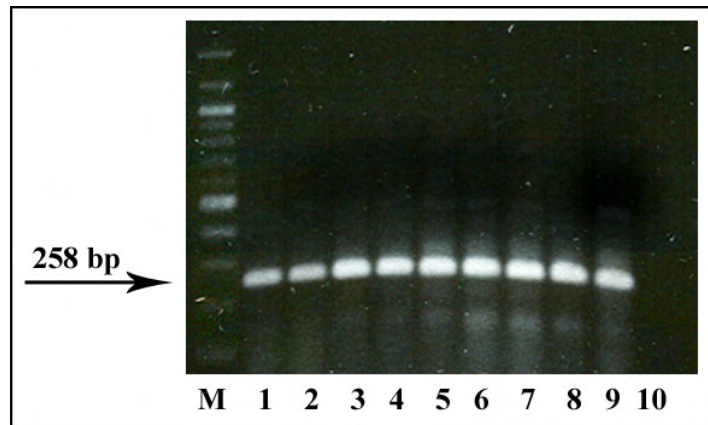
### 5.2.2 Nachweis der LHR, AR, FSHR mRNA

Untersucht wurde Hodengewebe von normalen, immunisierten sowie 17β-Estradiol-infundierten, immunisierten Ebergruppen (Tab. 2). Die RT-PCR für LHR mRNA am Gesamthomogenat, extrahiert aus Hodengewebe ergab ein spezifisches PCR-Produkt bei 231 bp (Abb. 18), für AR mRNA (Abb. 19) bei 258 bp und FSHR (Abb. 20) bei 308 bp. In der Wasserleerprobe, die als negative Kontrolle (NK) diente, war keine cDNA nachweisbar.

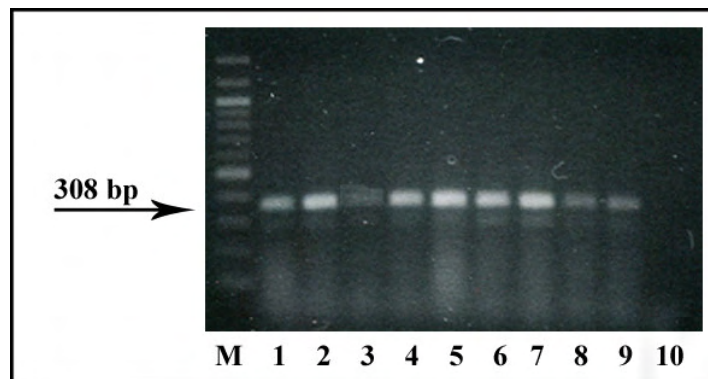




**Abb. 18:** RT-PCR am Hodenhomogenat für LHR mRNA. M: 100 bp DNA-Marker, 1-3: intakte Eber, 4-6: immunisierte Eber, 7-9: 17 $\beta$ -Estradiol-infundierte, immunisierte Eber, 10: NK.



**Abb. 19:** RT-PCR am Hodenhomogenat für AR mRNA. M: 100 bp DNA-Marker, 1-3: intakte Eber, 4-6: immunisierte Eber, 7-9: 17 $\beta$ -Estradiol-infundierte, immunisierte, 10: NK.



**Abb. 20:** RT-PCR am Hodenhomogenat für FSHR mRNA. M: 100 bp DNA-Marker, 1-3: intakte Eber, 4-6: immunisierte Eber, 7-9: 17 $\beta$ -Estradiol-infundierte, immunisierte, 10: NK.

### **5.3 Ergebnisse der Sequenzierung**

Die Auswertung der Ergebnisse wurde online mittels BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

#### **5.3.1 Östrogenrezeptor- $\alpha$ cDNA und Plasmid**

Die Sequenz der aus dem Hoden gewonnenen cDNA für ER- $\alpha$  umfasste eine Länge von 232 bp Basenpaaren.

Die Sequenzierung der PCR-Produkte sowie des Plasmids durch die Firma Qiagen ergab eine 99%ige Homologie zum porcinen ER- $\alpha$  (Sequenzen im Anhang).

#### **5.3.2 Östrogenrezeptor- $\beta$ cDNA und Plasmid**

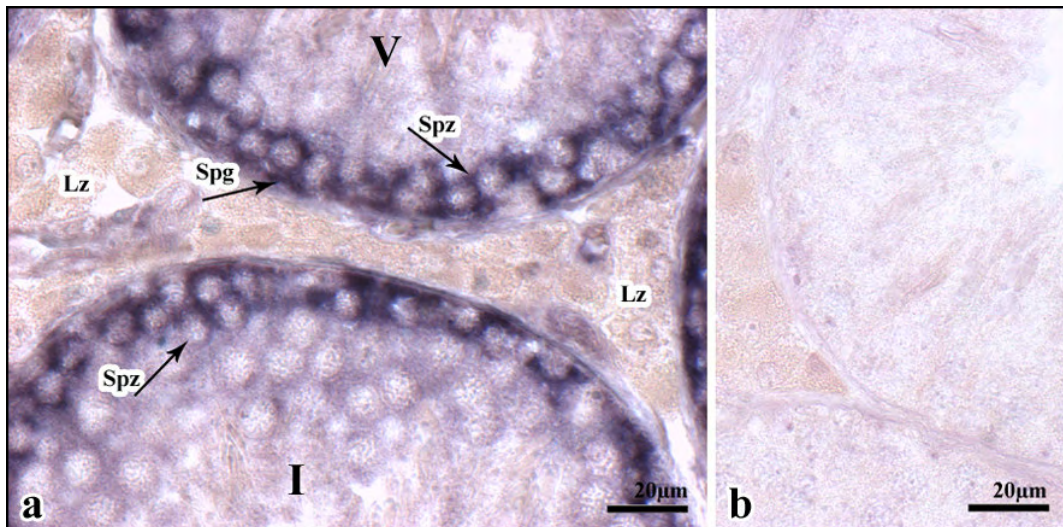
Die Sequenz der aus dem Hoden gewonnenen cDNA für ER- $\beta$  umfasste eine Länge von 222 bp Basenpaaren.

Die Sequenzierung der PCR-Produkte sowie des Plasmids durch die Firma Qiagen ergab eine 100%ige Homologie zum porcinen ER- $\beta$  (Sequenzen im Anhang).

## 5.4 Nachweis der zellulären Lokalisation der Östrogenrezeptoren mRNA mittels ISH und in situ RT-PCR

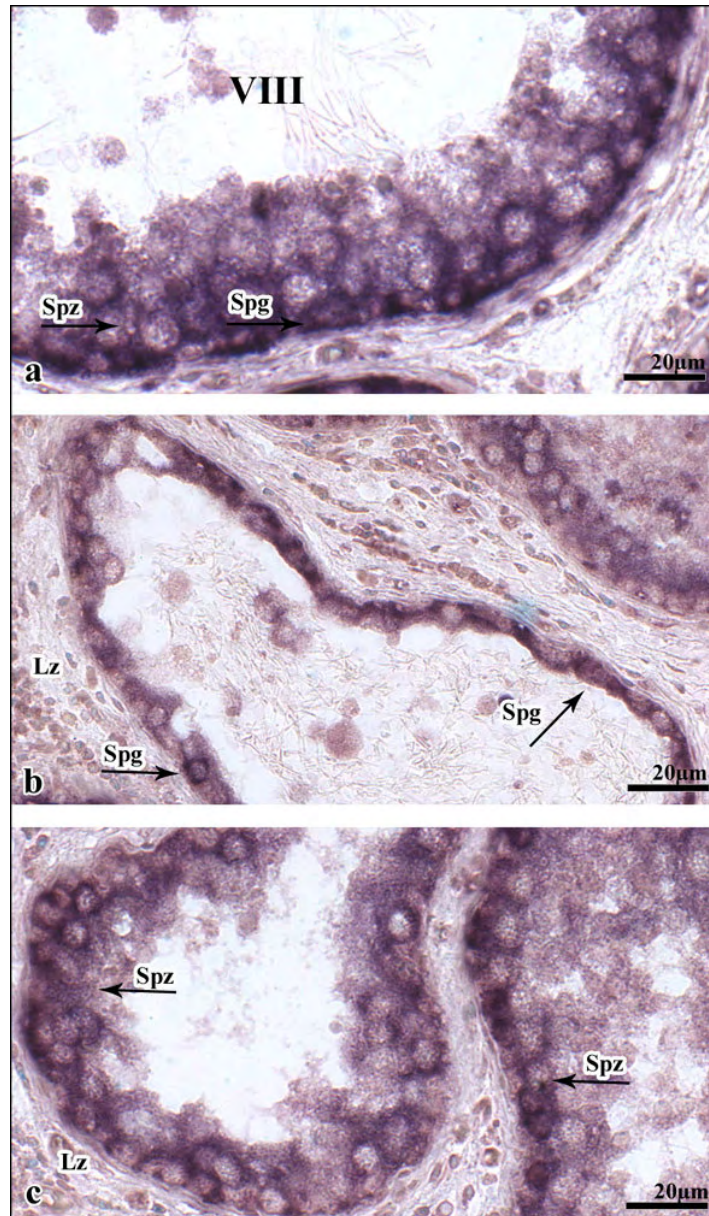
### 5.4.1 Nachweis der Östrogenrezeptor- $\alpha$ mRNA

Die ER- $\alpha$  mRNA ließ sich mittels ISH bei intakten Ebern am Paraffinschnitten mit einer normalen Spermatogenese in Spermato gonien und primären Spermatozyten (bis zum „mid-pachyten“) als zytoplasmatische Markierung nachweisen. Die Spermatoziden, sowie die interstitiellen Leydig-Zellen wiesen keine spezifische RNA-Markierung auf (Abb. 21 a). Da in den Schnitten, welche mit der sense cRNA-Sonde inkubiert wurden, keine spezifische RNA-Markierung sichtbar war (Abb. 21 b), mussten die Färbungen der mit antisense-Sonde behandelten Schnitte ausschließlich durch die Expression von ER- $\alpha$  mRNA bedingt sein.

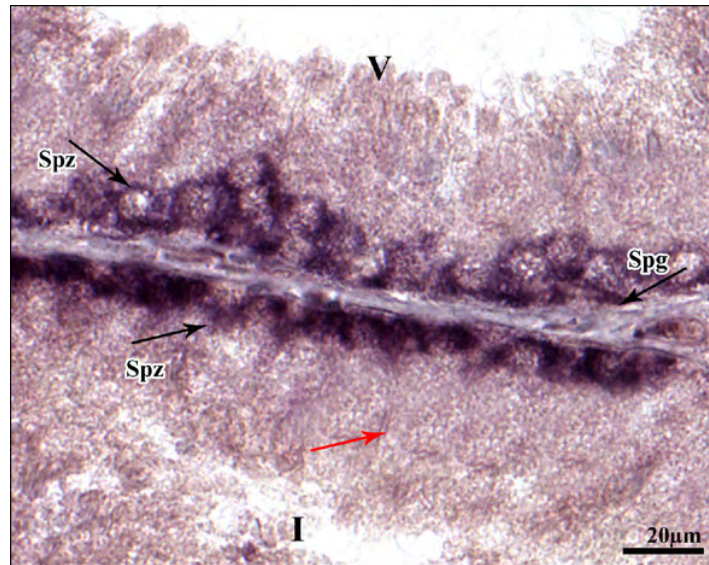


**Abb. 21:** Intakter Eber, Keimtubulus mit normaler Spermatogenese. **a:** Reaktion in den Spermato gonien, und den primären Spermatozyten ( $\rightarrow$ ). Die frühen Spermatozyten im Stadium V sind positiv, die späten dagegen im Stadium I negativ. Die Spermatoziden, sowie interstitiellen Leydig-Zellen sind negativ, **b:** Negativkontrolle.

Auch bei den immunisierten, als auch  $17\beta$ -Estradiol-infundierten, immunisierten Tieren, wurde die ER- $\alpha$  mRNA Expression in Spermato gonien und primären Spermatozyten nachgewiesen. In den Spermatischen sowie interstitiellen Leydig-Zellen konnte keine RNA-Markierung nachgewiesen werden (Abb. 22, 23).

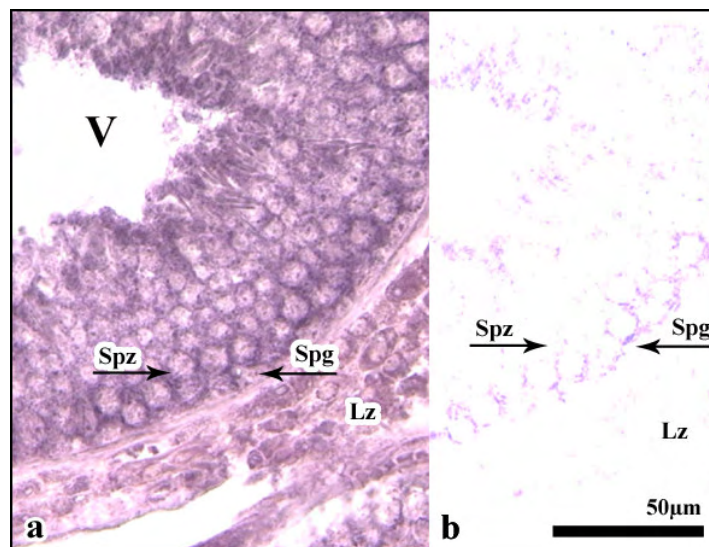


**Abb. 22:** Immunisierter Eber. Reaktion in den Spermato gonien, und den primären Spermatozyten (→). **a:** Keimtubulus mit qualitativ intakter Spermato genese (Stadium VIII). **b:** Keimtubulus mit Spermato gonienarrest und einer Atrophie der Leydig-Zellen. **c:** Keimtubulus mit Spermatozyten- (links) und Spermatischenarrest (rechts) und Atrophie der Leydig-Zellen.



**Abb. 23:** 17- $\beta$ -Estradiol-infundierter, immunisierter Eber, Keimtubulus mit histologisch normaler Spermatogenese und einer Atrophie der Leydig-Zellen. Reaktion in den Spermatogonien, und den primären Spermatozyten ( $\rightarrow$ ). Die frühen Spermatozyten im Stadium V sind positiv, die späten dagegen im Stadium I ( $\rightarrow$ ) nicht.

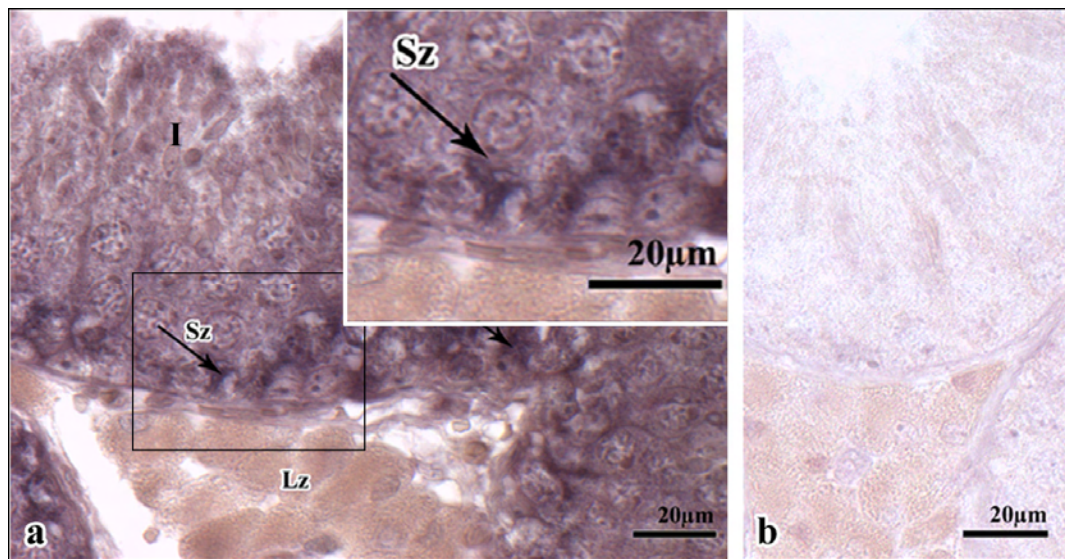
Mittels in situ RT-PCR wurde ER- $\alpha$  mRNA in den Spermatogonien und primären Spermatozyten nachgewiesen (Abb. 24 a, b). In den Spermatischen sowie interstitiellen Leydig-Zellen konnte keine Markierung nachgewiesen werden.



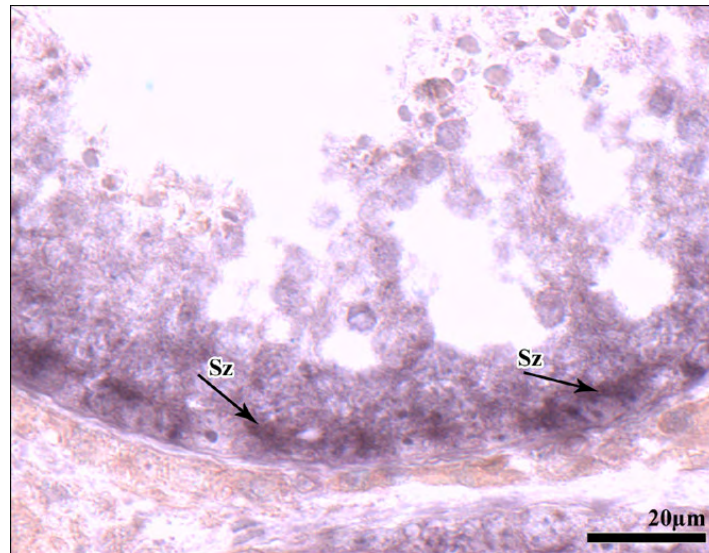
**Abb. 24:** Intakter Eber, Keimtubulus mit normaler Spermatogenese (Stadium V). Reaktion in den Spermatogonien und den primären Spermatozyten ( $\rightarrow$ ). Die Spermatischen sowie die Leydig-Zellen sind negativ. a-normaler, b-erhöhter Kontrast.

#### 5.4.2 Nachweis der Östrogenrezeptor- $\beta$ mRNA

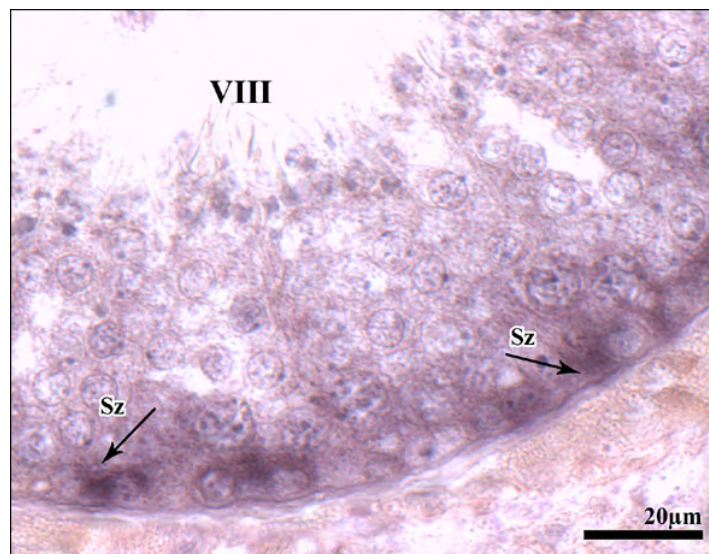
Die ER- $\beta$  mRNA liess sich mittels ISH bei den intakten als auch bei den immunisierten und  $17\beta$ -Estradiol-infundierten, immunisierten Tieren mittels ISH nur in den Sertoli-Zellen als zytoplasmatische Markierung nachweisen (Abb. 25, 26, 27). Die Keimzellen, Leydig-Zellen und die Schnitte, welche mit der sense cRNA-Sonde inkubiert wurden, wiesen keine spezifische RNA-Markierung auf (Abb. 25).



**Abb. 25:** Intakter Eber, Keimtubulus mit normaler Spermatogenese (Stadium I). **a:** Reaktion in den Sertoli-Zellen ( $\rightarrow$ ), deutlich erkennbar im Inserten. Die Spermatogonien, Spermatozyten, Spermatisden sowie die Leydig-Zellen sind negativ, **b:** Negativkontrolle.

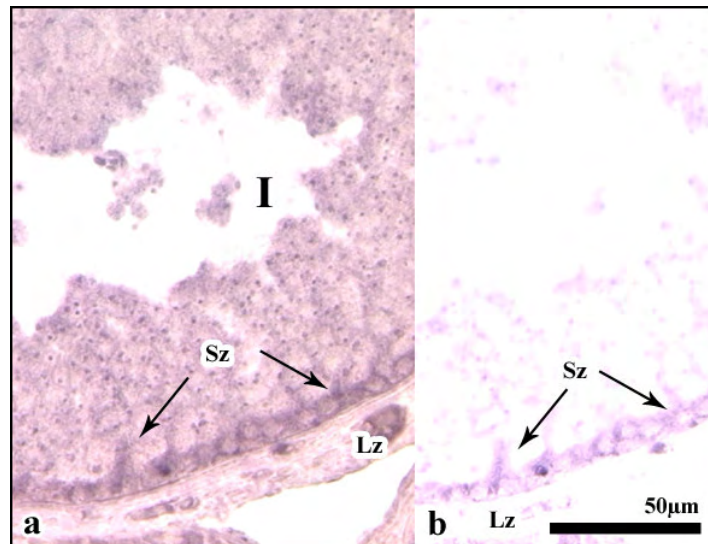


**Abb. 26:** Immunisierter Eber, Keimtubulus mit Spermatidenarrest und einer Atrophie der Leydig-Zellen. Reaktion in den Sertoli-Zellen (→). Die Spermatogonien, Spermatozyten, Spermatiden sowie die Leydig-Zellen sind negativ.



**Abb. 27:** 17-β-Estradiol-infundierter, imunisierter Eber, Keimtubulus mit histologisch normaler Spermatogenese und einer Atrophie der Leydig-Zellen (Stadium VIII). Reaktion in den Sertoli-Zellen (→). Die Spermatogonien, Spermatozyten, Spermatiden sowie die Leydig-Zellen sind negativ.

Mittels in-situ RT-PCR wurde die ER-β mRNA nur im Zytoplasma von den Sertoli-Zellen nachgewiesen. In den Keimzellen sowie in den Leydig-Zellen konnte keine Markierung nachgewiesen werden (Abb. 28 a, b).



**Abb. 28:** Intakter Eber, Keimtubulus mit normaler Spermatogenese. Reaktion in den Sertoli-Zellen (→). Die Spermatogonien, Spermatozyten, Spermatiden sowie die Leydig-Zellen sind negativ. a-normaler, b-erhöhter Kontrast.

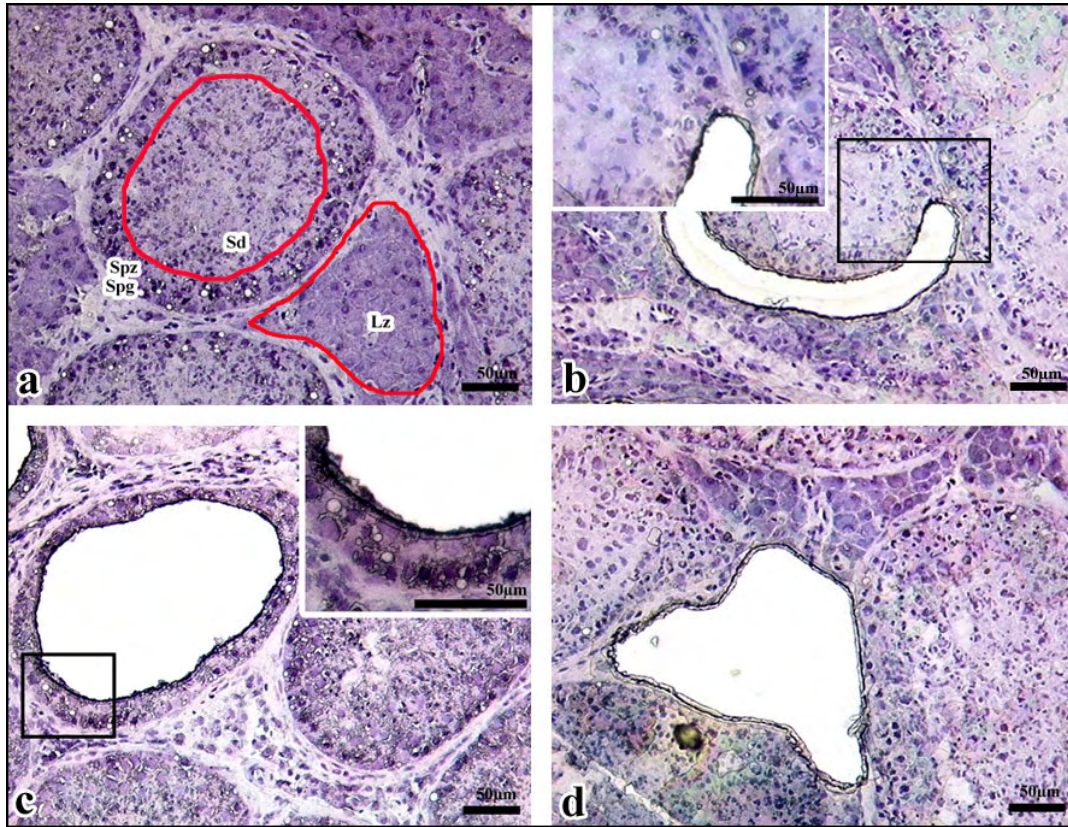
## 5.5 RT-PCR nach UV-LACP

### 5.5.1 Nachweis der Östrogenrezeptor- $\alpha$ mRNA-Expression

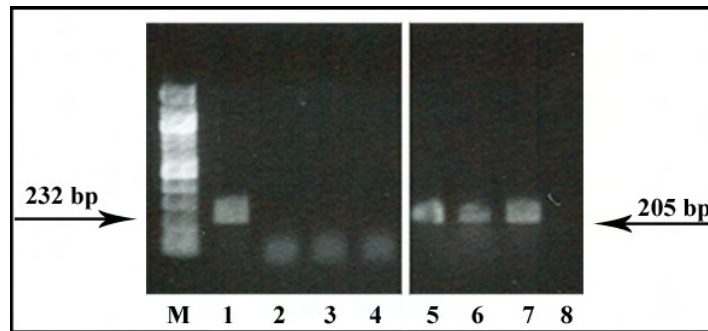
Zur Unterscheidung der intratubulären von einer möglichen interstitiellen ER- $\alpha$  mRNA-Expression wurden mit Hilfe des UV-LACP selektiv die Zellen von einem Eber mit histologisch normaler Spermatogenese aus Keimtubuli (Spermatogonien und Spermatozyten sowie getrennt davon Spermatiden und aus Interstitium (Leydig-Zellen) isoliert (Abb. 29).

Die isolierten Proben wurden anschließend auf ihren ER- $\alpha$  mRNA-Gehalt untersucht. Zur Detektierung der ER- $\alpha$  mRNA aus mikrodisssezierten Zellen wurde das Primerpaar „ER- $\alpha$ “ (Amplifikatgröße: 232 bp) Kapitel 4.3.1.2.1 verwendet. Mittels RT-PCR konnte gezeigt werden, dass in Keimtubuli mit histologisch normaler Spermatogenese ER- $\alpha$  mRNA in Spermatogonien und Spermatozyten exprimiert wird. In Leydig-Zellen sowie Spermatiden jedoch konnte mit dieser Methode kein spezifisches ER- $\alpha$  PCR-Produkt nachgewiesen werden. Als House-keeping Gene Kontrolle diente  $\beta$ -Aktin mit einer Amplikongröße von 205 bp. In der Wasserleerprobe, die als negative Kontrolle diente, wurde keine ER- $\alpha$  mRNA nachgewiesen (Abb. 30).





**Abb. 29:** Darstellung der UV-Lasser-assistierten Mikrodisektion für ER- $\alpha$  (rot markierte Bereiche). **a:** Keimtubulus mit histologisch normaler Spermatogenese. **b:** Isolierung von Spermatogonien und primären Spermatozyten (Insert vergrößert). **c:** Isolierung von Spermatischen (Insert vergrößert). **d:** Isolierung von Leydig-Zellen. Spermato gonien (Spg), Spermatozyten (Spz), Spermatischen (Sd), Leydig-Zellen (Lz).

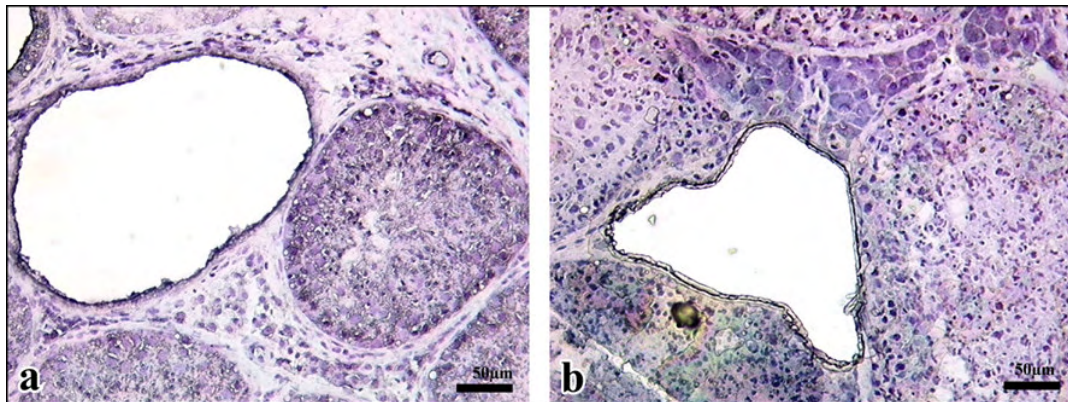


**Abb. 30:** RT-PCR nach UV-LACP. M: 100 bp DNA-Marker, 1-4 ER- $\alpha$  Primer; 1: Spermato gonien und Spermatozyten, 2: Spermatischen, 3: Leydig-Zellen, 4: NK. 5-8  $\beta$ -Aktin Primer; 5: Spermato gonien und Spermatozyten, 6: Spermatischen, 7: Leydig-Zellen, 8: NK.

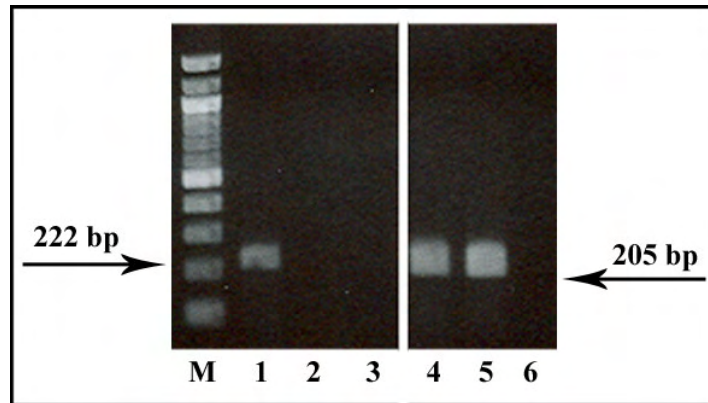
### 5.5.2 Nachweis der Östrogenrezeptor- $\beta$ mRNA-Expression

Zum Nachweis der ER- $\beta$  mRNA-Expression wurden die Zellen mit Hilfe des UV-LACP von einem Eber mit histologisch normaler Spermatogenese aus gesamten Keimtubuli, weil die Zytoplasma einer Sertoli-Zelle von Basallamina bis zum Tubuluslumen reicht, sowie getrennt davon aus dem Interstitium (Leydig-Zellen) isoliert (Abb. 31) und anschließend auf ihren ER- $\beta$  mRNA-Gehalt untersucht.

Zur Detektierung der ER- $\beta$  mRNA aus mikrodisssezierten Zellen wurde das Primerpaar „ER- $\beta$ “ (Amplifikatgröße: 222 bp) Kapitel 4.3.1.2.1 verwendet. Mittels RT-PCR im Keimtubuli mit histologisch normaler Spermatogenese konnte ER- $\beta$  mRNA im erwarteten Bereich detektiert werden. In Leydig-Zellen jedoch konnte mit dieser Methode kein spezifisches ER- $\beta$  PCR-Produkt nachgewiesen werden. Als House-keeping Gene Kontrolle diente  $\beta$ -Aktin mit einer Amplikongröße von 205 bp. In der Wasserleerprobe, die als negative Kontrolle diente, war keine cDNA nachzuweisen (Abb. 32).



**Abb. 31:** Darstellung der UV-Laser-assistierte Mikrodisssektion für ER- $\beta$ . **a:** Isolierung des gesamten Keimtubulus. **b:** Isolierung von Leydig-Zellen.

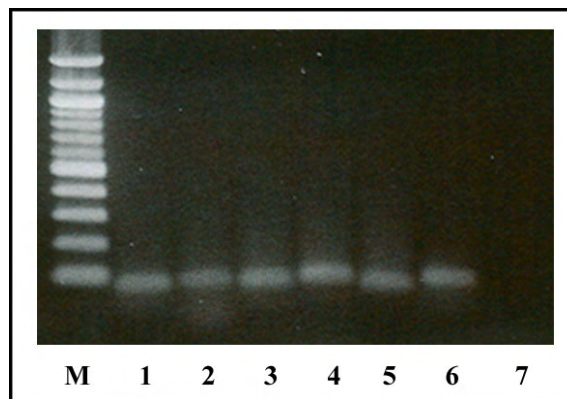


**Abb. 32:** RT-PCR nach UV-LACP. M: 100 bp DNA-Marker, 1-3 ER- $\beta$  Primer; 1: gesamter Tubulus, 2: Leydig-Zellen, 3: NK. 4-6  $\beta$ -Aktin Primer; 4: gesamter Tubulus, 5: Leydig-Zellen, 6: NK.

## 5.6 Real Time PCR

### 5.6.1 RT-PCR

Die benutzten Primer (Tab. 4) für die Real Time PCR wurden zuerst mittels einer Konventionellen RT-PCR getestet Kapitel 4.3.1.2.3. Die Auftrennung der PCR-Amplifikate erfolgte wie im Kapitel 4.3.1.2.4 beschrieben. Mittels RT-PCR konnte die Expression von ER- $\alpha$ , ER- $\beta$ , LHR, AR und FSHR nachgewiesen werden. Als House-keeping Gene Kontrolle diente GAPDH mit einer Amplikongröße von 96 bp. In der Wasserleerprobe, die als negative Kontrolle diente, wurde keine cDNA nachgewiesen (Abb. 33).



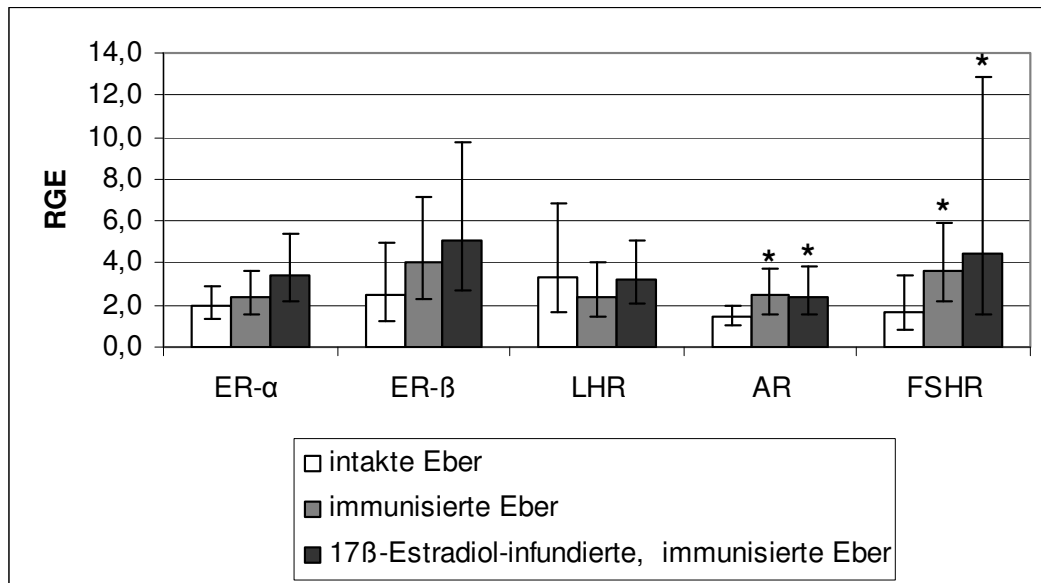
**Abb. 33:** RT-PCR zur Überprüfung der Primer. M: 100 bp DNA-Marker, 1-ER- $\alpha$  (81 bp), 2-ER- $\beta$  (87 bp), 3-FSHR (81 bp), 4-LHR (92 bp), 5-AR (76 bp), 6-GAPDH (96 bp), 7-NK.

### 5.6.2 Auswertung der Real Time PCR

Mittels der Real Time PCR konnte die Rezeptor Expression, in normalen, immunisierten und in den 17 $\beta$ -Estradiol-infundierten, immunisierten Ebern nachgewiesen werden. Der "threshold" lag bei 0,0037. Innerhalb der einzelnen Läufe lag die Standardabweichung der Ct-Werte der jeweils als Duplikat gemessenen Proben stets unter 1.

Die Ct-Werte sowie die Bestimmung der relativen gene Expression befinden sich im Anhang (Tab. 8-14).

Die Befunde zeigen, dass die FSHR und AR mRNA Expression in den Hoden nach 17 $\beta$ -Estradiol-Infusion hochreguliert wird. Auf ER- $\alpha$ , ER- $\beta$  und LHR hat die Infusion keinen bedeutenden Einfluss gezeigt (Abb. 34).



**Abb. 34:** Die Rezeptorexpression mittels Real Time PCR. RGE - relative gene expression. \* auf den Säulen weisen auf signifikante Unterschiede. ER- $\alpha$ : = 0,0802; ER- $\beta$ : = 0,1232; LHR: = 0,4619; AR: = 0,0217; FSHR: = 0,022.

## 6 Diskussion

### 6.1 Histologische Befunde

Die Immunisierung gegen GnRH unterdrückte, wie erwartet, effektiv die Hodenfunktion mit reduzierten Hodengewichten und volumina. Auch Awoniyi et al. (1988 a) konnten durch GnRH-Immunisierung beim Eber und Sanford et al. (2002) beim Schafbock photoperiodisch induziert eine Abnahme der Hodengewichte feststellen.

Ausserdem wurde in der vorliegenden Arbeit neben Tubuli mit quantitativ normaler Spermatogenese auch eine qualitativ intakte Spermatogenese und bunte Atrophie detektiert. Die Tatsache, dass in manchen Tubuli der immunisierten Eber noch alle Keimzelltypen anzutreffen waren, kann dadurch erklärt werden, dass die FSH-Konzentrationen durch die GnRH-Immunisierung nicht vollständig unterdrückt wurden. Demgegenüber führte eine GnRH-Immunisierung bei Ratten zu einer vollständigen Rückbildung der Tubuli, so dass nur Spermatogonien und Sertoli-Zellen übrig blieben (Fraser et al., 1974). In dem Fall ist allerdings zu berücksichtigen, dass die FSH-Konzentration bei Ratten durch eine GnRH-Immunisierung im Gegensatz zum Eber vollständig unterdrückt war (McLachlan et al., 1994).

Im Interstitium der Eber wurde eine Atrophie der Leydig-Zellen diagnostiziert, die durch eine Abnahme des Leydig-Zellzytoplasmas bedingt war. Die Fläche der Leydig-Zellen innerhalb des Hodens sank durch die Immunisierung und die damit verbundene Steroidbiosynthese um etwa 75 % (Übersicht bei Wagner, 2005). Da die Steroidbiosynthese in den Mitochondrien und im endoplasmatischen Retikulum stattfindet (Ewing et al., 1979), erklären sich trotz Aufrechterhaltung der Leydig-Zellkerne, die reduzierten Steroidwerte.

Während Hodengewicht und -volumen bei den  $17\beta$ -Estradiol-infundierten, immunisierten Ebern geringe Unterschiede zu den immunisierten Ebern aufwiesen, war im Tubulusbereich eine Rekrudescenz der Spermatogenese, allerdings bei weiterhin atrophischen Leydig-Zellen zu beobachten. Zwei Studien an hypogonadalen Mäusen zeigten, dass eine Estradiol-Behandlung zur einer qualitativ intakten Spermatogenese führt (Baines et al., 2005; Ebling et al., 2006). D. h.: Estradiol hat einen positiven Effekt auf die Spermatogenese.

## **6.2 Die zelluläre Lokalisation der ER- $\alpha$ und ER- $\beta$ mRNA**

In der vorliegenden Arbeit wurde die zelluläre Lokalisation von ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  mRNA im Eberhoden nachgewiesen. Diese Daten wurden durch unterschiedliche Methoden bestätigt. Der mittels RT-PCR und anschließender Sequenzierung gelungene Nachweis der mRNA Expression des ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  zeigt, dass die Rezeptoren im Eberhoden vorhanden sind. Die zelluläre Lokalisation von ER- $\beta$  mRNA wurde mittels ISH, in situ RT-PCR sowie mittels RT-PCR nach UV-LACP bestätigt.

In den normalen, immunisierten, sowie in den  $17\beta$ -Estradiol-infundierten, immunisierten Ebern wurde ER- $\beta$  mRNA in den Sertoli-Zellen nachgewiesen. Sowohl die Keimzellen als auch die Leydig-Zellen waren negativ. Auch in der Arbeit von Pelletier et al. (2000) wurde die Expression von ER- $\beta$  mittels in-situ Hybridisierung in der Sertoli-Zellen von der Ratte beschrieben.

Die Proteinnachweismethoden, bezogen auf ER- $\beta$  Lokalisation, liefern dagegen extrem unterschiedliche Ergebnisse (Tab. 6).

In einer Studie an immaturren Eberhoden wurde das ER- $\beta$  Protein in Spermatogonien und Leydig-Zellen und an maturaen Eberhoden in Spermatogonien und Spermatozyten lokalisiert (Rago et al., 2004). Dagegen berichten Mutembei et al. (2005), dass in den Hoden von maturaen Eber mit Ausnahmen von elongierten Spermatischen in allen Keimzellen sowie in den somatischen Sertoli- und Leydig-Zellen das Protein synthetisiert wird.

Bei anderen Spezies sind die Ergebnisse hinsichtlich der zellulären Lokalisation von ER- $\beta$  Protein im Hoden auch widersprüchlich. Es gibt viele Studien, die mittels immunhistologischer Untersuchung die ER- $\beta$  Expression in den unterschiedlichen Zellarten, wie Keimzellen (Spermatogonien, Spermatozyten, Spermatischen) oder in den Leydig-Zellen detektiert haben. In den Hoden von der adulten Ratte konnte van Pelt et al. (1999) das ER- $\beta$  Protein in primären Spermatozyten und runden Spermatischen nachweisen. Enmark et al. (1997) und Mäkinen et al., (2001) fanden ER- $\beta$  Protein in humanem Hodengewebe in Keimzellen, Pelletier und El-Alfy (2000) dagegen in somatischen Sertoli- und Leydig-Zellen. Saunders et al. (2001) zeigten beim Menschen und Primaten das ER- $\beta$  Protein in den Spermatogonien, primären Spermatozyten, Sertoli-Zellen, peritubulären Zellen und in den Leydig-Zellen.

**Tab. 6:** ER- $\beta$  Lokalisation bei verschiedenen Spezies. Spermato gonien (Spg), Spermatozyten (Spz), Spermato den (Sd), Sertoli-Zellen (Sz), peritubuläre Zellen (Ptz), Leydig-Zellen (LZ). Lokalisation nachweisbar [ + ], nicht nachweisbar [ ].

Spezies	Lz	Ptz	Sz	Spg	Spz	Sd	Literatur
Schwein	+		+	+	+	+	Mutembei et al., 2005
				+	+		Rago et al., 2004
Ratte	+						Fisher et al., 1997
			+				Saunders et al., 1997
					+	+	van Pelt et al., 1999
			+				Pelletier et al., 2000
Marmoset	+		+	+	+	+	McKinnell et al., 2001
	+	+	+	+	+		Saunders et al., 2001
Maus	+					+	Rosenfeld et al., 1998
				+			Jefferson et al., 2000
	+	+	+	+	+		Zhou et al., 2002
Mensch					+	+	Enmark et al., 1997
	+		+				Pelletier & El-Alfy, 2000
	+		+				Taylor & Al-Azzawi, 2000
				+	+	+	Mäkinen et al., 2001
	+	+	+	+	+		Saunders et al., 2001
Kater	+	+	+	+	+	+	Nie et al., 2002
Rüde	+	+	+	+	+	+	Nie et al., 2002

In den Hoden von Marmosets fanden McKinnell et al. (2001) ER- $\beta$  mittels immunhistologischer Untersuchung in den Leydig-, Keim- und Sertoli-Zellen. Ähnliche Befunde hinsichtlich der ER- $\beta$  Protein-Lokalisation wurden auch bei den Mäusen beschrieben. Rosenfeld et al. (1998) fanden ER- $\beta$  in den elongierten Spermato den und in den Leydig-Zellen, Jefferson et al. (2000) nur in den Spermato gonien, Zhou et al. (2002) in den Leydig-, peritubulären-, Sertoli- sowie Keimzellen. Nie et al. (2002) zeigten, dass beim Rüden und Kater ER- $\beta$  stark in den runden Spermato den, etwas schwächer in den Spermato gonien und Spermato zyten exprimiert wurde, wobei aber auch wenige Sertoli-, peritubuläre Zellen und auch Leydig-Zellen den Rezeptor exprimieren.

Es gibt Studien, die mittels immunhistologischem Nachweis das ER- $\beta$  Protein in den Sertoli-Zellen der Ratte (Saunders et al., 1997; Pelletier et al., 2000) und des Menschens (Pelletier & El-Alfy, 2000; Taylor & Al-Azzawi, 2000)

nachweisen konnten. Somit kann gesagt werden, dass die zelluläre Lokalisation der ER- $\beta$  mRNA beim Eber und Ratte mit der Lokalisation des ER- $\beta$  Proteins beim Mensch und Maus übereinstimmt und ER- $\beta$  in die Funktion der Sertoli-Zellen involviert ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde ER- $\alpha$  mRNA in den Spermatogonien und primären Spermatozyten bis zum „mid-pachyten“, in den normalen, immunisierten, und in den 17 $\beta$ -Estradiol-infundierten, immunisierten Ebern nachgewiesen. In den Spermatischen, als auch in den Leydig-Zellen konnte keine ER- $\alpha$  mRNA Expression detektiert werden. Mittels immunhistologischer Untersuchung konnten Rago et al. (2004) und Mutembei et al. (2005) das ER- $\alpha$  Protein in den Keim- und Leydig-Zellen und Wagner et al. (2006) nur in den Spermatogonien nachweisen. Diese Daten deuten darauf hin, dass die zelluläre Lokalisation der ER- $\alpha$  mRNA beim Eber mit der Lokalisation des ER- $\alpha$  Proteins nur in den Keimzellen übereinstimmt.

Im Rahmen einer anderen Studie wurde die ER- $\alpha$  mRNA beim Mensch, Maus, Hund und Pferd ebenfalls in den Spermatogonien und primären Spermatozyten bis zum „mid-pachyten“ nachgewiesen (Lekhkota & Bergmann, 2007). Dieser Befund deutet daraufhin, dass es keine Spezies-spezifischen Unterschiede in der zellulären Lokalisation von ER- $\alpha$  auf mRNA-Niveau gibt.

Die zelluläre Lokalisation von ER- $\alpha$  wiederum im Hoden anderer Haussäugetiere, Primaten und von Menschen ist auf Proteinebene unterschiedlich (Tab. 7).

Verschiedene Studien zeigen, dass in den Leydig-Zellen der Ratten und der Mäuse ER- $\alpha$  exprimiert wird (Fisher et al., 1997; Saunders et al., 2001; Zhou et al., 2002). Im Hodengewebe des Menschen Pelletier et al. (2000) lokalisierten ER- $\alpha$  Protein nicht nur in den Leydig-Zellen sondern auch in den Spermatozyten und runden Spermatischen. Mittels immunhistologischer Untersuchung konnten einige Studien das ER- $\alpha$  Protein in den Hoden von Ratte und Marmoset (Fisher et al., 1997) und beim Mensch (Pelletier & El-Alfy, 2000) in Leydig-Zellen nachweisen; jedoch konnten andere Studien kein ER- $\alpha$  Protein in den Leydig-Zellen von Primaten (West & Brenner, 1990; Saunders et al., 2001) und Menschen (Mäkinen et al., 2001; Saunders et al., 2001) ermitteln. Nie et al. (2002) konnte ER- $\alpha$  Protein in den interstitiellen- und peritubulären



Zellen, sowie im Endothel beim Hund und nur in den interstitiellen-Zellen in den Hoden beim Kater nachweisen.

**Tab. 7:** Ergebnisse der ER- $\alpha$  Lokalisation bei verschiedenen Spezies. Spermato gonien (Spg), Spermatozyten (Spz), Spermatischen (Sd), Sertoli-Zellen (Sz), peritubuläre Zellen (Ptz), Leydig-Zellen (LZ). Lokalisation nachweisbar [ + ], nicht nachweisbar [ ].

Spezies	Lz	Ptz	Sz	Spg	Spz	Sd	Literatur
Schwein	+			+	+		Rago et al., 2004
	+			+	+	+	Mutembei et al., 2005
				+			Wagner et al., 2006
Ratte	+						Fisher et al., 1997
	+				+		Pelletier et al., 2000
Marmoset							Fisher et al., 1997
							Saunders et al., 2001
Mensch	+						Pelletier G & El-Alfy M, 2000
	+		+				Taylor & Al-Azzawi, 2000
							Mäkinen et al., 2001
							Saunders et al., 2001
				+	+		Lekhkota & Bergmann, 2007
Maus	+						Jefferson et al., 2000
	+						Zhou et al, 2002
				+	+		Lekhkota & Bergmann, 2007
Kater	+	+					Nie et al., 2002
Hund	+						Nie et al., 2002
				+	+		Lekhkota & Bergmann, 2007
Pferd				+	+		Lekhkota & Bergmann, 2007

Diese unterschiedlichen Daten sind sicher z.T auch methodisch bedingt. So sind Antikörper gegen unterschiedliche Regionen der ER- $\alpha$  Moleküle ausgewählt worden und folglich wurden unterschiedliche Epitope nachgewiesen (Pavao & Traish, 2001). Selva et al. (2004) zeigten, dass verschiedene Antikörper gegen ER- $\beta$  unterschiedliche Ergebnisse liefern.

Ein weiteres Problem in den immunohistochemischen Studien ist, dass unterschiedliche Methoden der Gewebefixierung, der Antikörperverdünnung und der Visualisierung (z.B APAP, ABC etc.) zu unterschiedlichen Ergebnissen

führen. Diese Befunde machen deutlich, dass ein dringender Bedarf an Antikörpern besteht, die gute und reproduzierbare Ergebnisse liefern.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass beim Eber ER- $\alpha$  mRNA in den Spermatogonien und primären Spermatozyten exprimiert wird.

Somit erklärt sich der Befund, dass die Rekrudescenz der Spermatogenese nach 17 $\beta$ -Estradiol-Infusion bei immunisierten Eber durch eine Erhöhung der Mitoserate der Spermatogonien bedingt ist (Wagner et. al., 2006). Diese mitogenen Effekte der Östrogene im Tubulusbereich sind aus anderen Geweben und östrogenabhängigen Tumoren durchaus bekannt (Altucci et al., 1997; Zhang et al., 1998). Auch für Hengst und Nager wurde eine mitosefördernde Wirkung der Östrogene bei der Spermatogenese bereits vermutet (Übersicht bei O'Donnell et al., 2001; Sipahutar et al., 2003).

### 6.3 Die Regulation der Rezeptorexpression

Die mRNAs, welche Hormonrezeptoren kodieren, können allgemein durch ihre eigenen Hormone hoch- oder runterreguliert werden. Diese „negativen“ und „positiven“ autoregulatorischen Rückkopplungsmechanismen dienen dazu, die hormonellen Wirkungen zu begrenzen bzw. zu vergrößern. Die Modulation des Östrogenrezeptorniveaus durch Östrogene, des AR durch Androgene oder des FSH sind in vielen Studien, in denen die Hormone unterschiedliche Wirkungen auf Zunahme oder Abnahme des jeweiligen Rezeptors ausüben, untersucht worden (Tena-Sempere et al., 2000; Maguire et al., 1997; Shan, et al., 1990). Die vorliegende Studie konzentrierte sich auf 17 $\beta$ -Estradiol-Einflüsse auf die Regulation der Genexpression der Steroid- (ER- $\alpha$ , ER- $\beta$ , AR) und Gonadotropinrezeptoren (LHR, FSHR) im Hoden des Ebers.

Zu Klärung dieser Aufgabe wurden die Eber zuerst mit einem GnRH-Antigen „Improvac<sup>®</sup>“ immunologisch kastriert, danach erfolgte eine 17 $\beta$ -Estradiol-Infusion.

Die GnRH-Immunisierung führte zu einer deutlichen Hemmung der LH-Konzentrationen im peripheren Blutplasma (Wagner & Claus, 2004). Die niedrigen LH-Konzentrationen blieben über den gesamten Versuchszeitraum konstant (Wagner, 2005). Auch bei der Ratte und beim Bullen ist die vollständige Hemmung der LH-Konzentrationen durch die GnRH-Immunisierung beschrieben (Finnerty et al., 1998; McLachlan et al., 1994; 1995).

Aufgrund der unterdrückten LH-Sekretion wurde auch die Steroidsynthese (Testosteron, Östrogen) in den Leydig-Zellen auf Minimalwerte gehemmt. Auch dieser Einfluss der Immunisierung auf die Konzentrationen von Testosteron ist in der Literatur beschrieben (Eber: Falvo et al., 1986; Grizzle et al., 1987; Awoniyi et al., 1988 b. Bulle: Finnerty et al., 1998. Ratte: McLachlan et al., 1994; 1995). Der Abfall der Östrogenkonzentrationen ist in Zusammenhang mit den erniedrigten Testosteronwerten zu erklären.

Der FSH-Wert wurde durch GnRH-Immunisierung nicht vollständig unterdrückt (Wagner & Claus, 2004). Ähnlich Daten konnten auch Awoniyi et al. (1988 b) bei Ebern nach der GnRH-Immunisierung und Rabb et al. (1990) beim Pferd nach der Kastration feststellen. Diese Ergebnisse stehen allerdings im Widerspruch zu anderen Studien bei Bulle und bei der Ratte, in der eine

deutliche Reduktion der FSH-Konzentrationen im Blutplasma nachgewiesen wurde (Finnerty et al., 1998; McLachlan et al., 1994; 1995).

Diese unterschiedlichen Ergebnisse von FSH, nicht aber von LH sind vermutlich auf die GnRH-unabhängige Regulation des FSH zurückzuführen. Vermutet wird ein eigener FSH-Releasing-Faktor (Awoniyi et al., 1988 b; Padmanabhan & McNeilly, 2001). Daneben werden auch Steuerungsmechanismen über das Aktivin-Inhibin-System diskutiert, welche zusätzlich bzw. alternativ zu GnRH in die FSH-Regulation eingreifen könnten (Brown & McNeilly, 1999; Bernard & Woodruff, 2001).

Die 17 $\beta$ -Estradiol-Infusion erhöhte Östrogen- und FSH-Konzentrationen bis zu den physiologischen Niveaus, die Testosteron- und LH-Konzentrationen blieben unverändert (Wagner et al., 2006).

Zwei Studien an hypogonadalen Mäusen mit niedrigen Testosteron- und FSH-Werten zeigten, dass eine Estradiol-Behandlung zu einer Zunahme der FSH-Werte bei unveränderten LH- und Testosteron-Werten führt (Baines et al., 2005; Ebling et al., 2006).

Auf der Rezeptorebene konnte gezeigt werden, dass es nach GnRH-Immunsierung mit anschließender 17 $\beta$ -Estradiol-Infusion zu einem statistisch signifikanten Anstieg der FSHR- und A- Expression kommt. Alle anderen erfassten Rezeptorexpressionen (ER- $\alpha$ , ER- $\beta$ , LH) blieben unverändert. Der 17 $\beta$ -Estradiol-Effekt war spezifisch, weil die Expression von GAPDH durch die Behandlung unverändert verblieb.

Tena-Sempere et al. (2000) zeigten, dass bei den neonalen Ratten durch Östrogenbehandlung die testikuläre Expression von ER- $\alpha$  mRNA erheblich runterreguliert wurde, während sich das Niveau von ER- $\beta$  mRNA erhöhte. In der Studie von Shayu et al. (2005) wurde der Effekt eines Steroidantagonisten (ICI 182, 780) im Nebenhodenkopf beim Marmoset untersucht. ER- $\alpha$  mRNA Expression war nach einer Behandlungsdauer von 30 Tagen 4-fach und nach 60 Tagen 1,5-fach erhöht. Nach der oralen Applikation des Anti-Androgens Flutamid an adulten Ratten, hatten Ohsako et al. (2003) festgestellt, dass Flutamid keinen bedeutenden Effekt auf ER- $\alpha$  mRNA in den Hoden hatten.

In der vorliegenden Arbeit hatte 17 $\beta$ -Estradiol keinen bedeutenden Effekt auf die Expression von ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  mRNA. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Östrogenrezeptorexpression unabhängig von der Hormon-

konzentration ist, d.h. ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  mRNA wird nicht durch 17 $\beta$ -Estradiol reguliert.

Es ist bekannt, dass die AR-Protein Synthese in Sertoli-Zellen der Ratte durch hormonelle Behandlungen moduliert werden kann. Block et al., (1989) haben gezeigt, dass in den kultivierten Sertoli-Zellen eine FSH-Behandlung die AR mRNA und das AR Protein hochreguliert. Auch die Testosteron-Behandlung regulierte das AR Protein hoch, die AR mRNA blieb dagegen unverändert. In einer anderen Studie konnten Block et al. (1992) nach der Behandlung unreifer Ratten mit FSH über einen Zeitraum von 4 Stunden eine Runterregulation der AR mRNA in den Sertoli-Zellen detektieren. Das AR-Protein Niveau wurde nicht deutlich durch die vorübergehende Abnahme an der AR mRNA Expression beeinflusst. Shan et al. (1990) haben über Abnahmen an AR mRNA und -Protein nach Testosteronbehandlung berichtet. Sanborn et al. (1991) dagegen berichteten über eine 4-fache Erhöhung der testikulären AR mRNA 15 Tage nach der Hypophysectomie. Block et al. (1992) konnten nach der FSH Behandlung über einen Zeitraum von 74 Stunden eine Hochregulation des AR-Proteines und der AR mRNA Expression beobachten. In einer Studie an der SK 11 Mäusezelllinie zeigten Sneddon et al., (2005), dass eine Behandlung der Sertoli-Zellen mit Testosteron und 17 $\beta$ -Estradiol zur einer Hochregulation der AR und ER- $\beta$  mRNA führt. Dieses führte zu der Hypothese, dass Testosteron und 17 $\beta$ -Estradiol eine Rolle in der Regulation der Expression von Protein- und mRNA spielt.

Es ist auch weiterhin bekannt, dass FSH eine wichtige Rolle in der Regulation der mRNA Expression des FSHR in der Sertoli-Zellkultur spielt. Die in vivo Studien von Maguire et al. (1997) und Themmen et al. (1991) berichten, dass FSHR mRNA unter dem Einfluss von FSH im unreifen Rattenhoden runterreguliert wird. Sanford et al., (2002) konnten dagegen eine Hochregulation der FSHR unter Einfluss von Inhibin nachweisen. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass der FSHR hormonell regulierbar ist.

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen einen signifikanten hochregulierenden Effekt der 17 $\beta$ -Estradiol auf AR und FSHR mRNA Expression. Die Hochregulation nach der GnRH-Immunisierung ist vermutlich durch eine stimulatorische Wirkung des FSH, welches durch GnRH-Immunisierung nicht vollständig unterdrückt war, zu erklären. Da AR und FSHR in den Sertoli-Zellen

exprimiert werden, wird die Hochregulation nach der  $17\beta$ -Estradiol-Infusion vermutlich via ER- $\beta$  vermittelt, der ebenfalls in der Sertoli-Zelle exprimiert wird. Zusammen betrachtet deuten diese Resultate darauf hin, dass AR und FSHR mRNA Expression in den Sertoli-Zellen von adulten Ebern von dem zirkulierenden Niveau des  $17\beta$ -Estradiol abhängig ist.

Chuzel et al. (1995) demonstrierten eine Runterregulation der LHR mRNA nach der Behandlung mit einem LH-Antagonist in der Leydig-Zellkultur.

Demgegenüber gab es in der vorliegenden Arbeit keinen positiven oder negativen Effekt des  $17\beta$ -Estradiols auf die LHR mRNA Expression.

Die Daten dieser Arbeit müssen im Kontext einer multihormonellen Wechselwirkung unter verschiedenen natürlichen Signalen betrachtet werden. Die Befunde zeigen, dass die hormonelle Regulation eines Rezeptors zell- und rezeptorspezifisch ist. Im Eberhoden kann der FSHR und AR durch Wirkung des  $17\beta$ -Estradiol hochreguliert werden. Diese Wirkung wird vermutlich durch ER- $\beta$  vermittelt.

## 7 Zusammenfassung

In den Leydig-Zellen einiger Spezies, insbesondere des Ebers, werden bedeutende Östrogenmengen synthetisiert (Claus & Hoffmann, 1980), die in peripherem Blutplasma, Tubulusflüssigkeit und Ejakulat nachgewiesen werden können (Velle, 1958; Setchell & Cox, 1982; Claus et al., 1992). So weisen Eber im peripheren Blutplasma Östrogenkonzentrationen von bis zu 280-400 pg/ml auf (Claus & Hoffmann, 1980), im Vergleich: Bulle bis zu 10-25 pg/ml (Hartl, 1990), Mann 68 pg/ml (Behre & Nieschlag, 1998). Daraus ergibt sich die Frage, ob die Östrogene eine funktionelle Bedeutung für die Hodenfunktion bzw. Spermatogenese haben.

Um diese Fragestellungen zu klären, wird als erste Aufgabe der Nachweis des Östrogenrezeptors im Hoden angesehen. Im Rahmen einer anderen Studie (Wagner, 2005) wurde beim Eber durch GnRH-Immunsierung (immunologische Kastration) die gesamte Hodenfunktion auf ein Minimum reduziert, danach folgte eine 17 $\beta$ -Estradiol-Substitution. So ergab sich die Möglichkeit, mit Hilfe der Real Time PCR zu erfassen, inwieweit 17 $\beta$ -Estradiol-Substitution Auswirkungen auf die Expression von Steroid- und Gonadotropinrezeptoren nach einer GnRH-Immunsierung bei Ebern haben.

Zur Verfügung standen jeweils Hoden von drei Tiergruppen: intakte Eber (n=9), immunisierte Eber (n=9) und die über sieben Wochen lang mit 17 $\beta$ -Estradiol-infundierten, immunisierten Eber (n=5).

Die Untersuchungen zum Nachweis der mRNA Expression erfolgten mittels RT-PCR und der zellulären Lokalisation des ER- $\alpha$  und des ER- $\beta$  mittels ISH, in situ RT-PCR und UV-LACP.

Die erhaltenen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen: Mittels RT-PCR konnte die Expression der ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  mRNA bei allen drei Gruppen nachgewiesen werden. Die zelluläre Lokalisation der ER- $\alpha$  mRNA wurde in Spermatogonien und primären Spermatozyten bis zum mid-pachyten, und ER- $\beta$  mRNA in den Sertoli-Zellen detektiert. Mittels Real Time PCR wurde gezeigt, dass die Expression des FSHRs und ARs in den Eberhoden durch 17 $\beta$ -Estradiol statistisch signifikant hochreguliert wird. Auf die Expression von ER- $\alpha$ , ER- $\beta$  und LHR hat die Infusion keinen signifikanten Einfluss gezeigt.

Damit konnte gezeigt werden, dass Östrogene beim Schwein eine essentielle Rolle in der Spermatogenese spielen. Die zelluläre Lokalisation der ER- $\alpha$  mRNA weist darauf hin, dass Östrogene in der Proliferation und Differenzierung von Spermatogonien (in dem sie insbesondere auf das Mitose-Apoptose-Gleichgewicht in den Tubuli Einfluss nehmen) und primären Spermatozyten beteiligt sind. Die zelluläre Lokalisation der ER- $\beta$  mRNA deuten darauf hin, dass ER- $\beta$  in die Funktion der Sertoli-Zellen involviert ist und vermutlich die stimulatorische Wirkung bzw. Hochregulation auf FSHR und AR vermittelt.



## 8 Summary

Leydig cells in mammals are known to synthesize different amounts of estrogens, as these hormones can be detected, i.e: in peripheral blood plasma, tubular fluid and ejaculate (Velle, 1958; Setchell & Cox, 1982; Claus et al, 1992). The estrogen concentrations in the peripheral blood plasma in the boar is about 280-400 pg/ml (Claus & Hoffmann, 1980), in bull 10-25 pg/ml (Hartl, 1990), and in man 68 pg/ml (Behre & Nieschlag, 1998).

The question now is whether there exists a functional implication or role of estrogen for normal testicular function and/or spermatogenesis in the boar. A possible involvement of estrogens in spermatogenesis, however, has not been investigated so far.

In an earlier study (Wagner, 2005) the entire testicular function in boars was first reduced to a minimum by GnRH-immunization, which was followed by a 17 $\beta$ -estradiol treatment. This unique study design allowed the elucidation of effects of steroid hormones on the expression and distribution pattern of testicular steroid- and gonadotropin receptors using real time PCR.

Investigations were performed with testes from three groups: intact boars (n=9), immunized boars (n=9), and immunized boars that were infused with 17 $\beta$ -estradiol for a time period of 7 weeks (n=5).

The results of the present study revealed that ER- $\alpha$ , and ER- $\beta$  mRNA expression was detectable in all three groups using RT-PCR. Using ISH, in situ RT-PCR, and RT-PCR after LACP ER- $\alpha$  mRNA was localized in spermatogonia and in primary spermatocytes up to mid-pachytene, and ER- $\beta$  mRNA in Sertoli cells. Real time PCR with testis homogenates showed that FSHR and AR were found to be significantly increased after 17 $\beta$ -estradiol infusion, whereas levels of ER- $\alpha$ , ER- $\beta$ , and LHR were unaltered.

Thus it may be concluded that estrogen plays an essential/important role in the spermatogenesis of the boar. The cellular localization of ER- $\alpha$  mRNA indicates/implies a possible effect of estrogen on germ cell proliferation and differentiation, by influencing the ratio of mitosis-apoptosis in spermatogonia, and the differentiation potential of spermatocytes. The cellular localization of ER- $\beta$  mRNA suggests a direct impact of estrogen on Sertoli cell function. ER- $\beta$  may exert stimulatory effects and/or upregulation of FSHR and AR.

## 9 Literaturverzeichnis

- Adler ID (1996) Comparison of the duration of spermatogenesis between male rodents and humans. *Mutation Research* 352: 169-172
- Allrich RD, Christenson RK JJ, Zimmerman DR (1982) Pubertal development of the boar: Testosterone, estradiol-17 $\beta$ , cortisol and LH concentrations before and after castration at various ages. *Journal of Animal Science* 55: 1139-1146
- Altucci L, Addeo R, Cicatiello L, Germano D, Pacilio C, Battista T, Cancemi M, Petrizzi VB, Bresciani F, Weisz A (1997) Estrogen induces early and timed activation of cyclin-dependent kinase 4, 5, and 6 and increases cyclin messenger ribonucleic acid expression in rat uterus. *Endocrinology* 138: 978-984
- Arslan M, Weinbauer GF, Shabab M, Nieschlag E (1993) FSH and testosterone, alone or in combination, initiate testicular growth and increase in number of spermatogonia and Sertoli cells in a non-human primate (*Macaca mulatta*). *Journal of Endocrinology* 136: 235-243
- Aurich C, Töpfer-Petersen E (2005) Reproduktion beim Säugetier. In: *Physiologie der Haustiere*. von Engelhardt W, Breves G (Hrsg.), Enke, 2 Aufl.: 518-523
- Awoniyi CA, Chandrashekar V, Arthur RD, Schanbacher BD, Falvo RE (1988 a) Changes in testicular morphology in boars actively immunized against gonadotropin releasing hormone. *Journal of Andrology*: 9 160-171
- Awoniyi CA, Chandrashekar V, Arthur RD, Schanbacher BD, Amador AG, Falvo RE (1988 b) Pituitary and Leydig cell function in boars actively immunized against gonadotrophin-releasing hormone. *Journal of Reproduction and Fertility* 84: 295-302
- Baines H, Nwagwu MO, Furneaux EC, Stewart J, Kerr JB, Mayhew TM, Ebling FJ (2005) Estrogenic induction of spermatogenesis in the hypogonadal (hpg) mouse: role of androgens. *Reproduction* 130: 643-654
- Bamberg E (1994 a) Chemie, Biochemie und Nachweis der Steroidhormone. In: *Veterinärmedizinische Endokrinologie*. Döcke F (Hrsg.), Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart: 31-40

- Bamberg E (1994 b) Biochemie der gonadalen Steroidhormone. In: Veterinärmedizinische Endokrinologie. Döcke F (Hrsg.), Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart: 411-418
- Bamberg E (1994 c) Wirkungen der Keimdrüsenhormone. In: Veterinärmedizinische Endokrinologie. Döcke F (Hrsg.), Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart: 418-443
- Bardin CW, Cheng YC, Musto NA, Gunsalus GL (1994) The Sertoli cell. In: The Physiology of Reproduction. Knobil E, Neill J et al., (Hrsg.), Raven Press, New York: 1291-1334
- Behre HM, Nieschlag E (1998) Endokrine Regulation der Hodenfunktion und endokrinologische Labordiagnostik. In: Andrologie. Krause W, Weidner W (eds.), Enke Verlag: 101-111
- Bergmann M (2006) Physiology of Spermatogenesis. In: Andrology for the Clinician. Schill WB, Comhaire FH, Hargreave TB (eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 272-280
- Bergman MD, Schlachter BS, Karelus K, Combatsiaris EP, Garcia T, Nelson JF (1992) Up-regulation of the uterine estrogen receptor and its messenger ribonucleic acid during the mouse estrous cycle: the role of estradiol. *Endocrinology* 130: 1923-1930
- Bernard DJ, Woodruff TK (2001) Inhibin binding protein in rats: alternative transcripts and regulation in the pituitary across the estrous cycle. *Molecular Endocrinology* 15: 654-667
- Billig H, Furuta I, Rivier C, Tapanainen J, Parvinen M, Hsueh AJW (1995) Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology* 136: 5-12
- Blok U, Mackenbach F, Trapman J, Themmen APN, Brinkmann AO, Grootegoed JA (1989) Follicle-stimulating hormone regulates androgen receptor mRNA in Sertoli cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 63: 267-271
- Blok LJ, Hoogerbrugge JW, Themmen AP, Baarends WM, Post M, Grootegoed JA (1992) Transient Down-Regulation of Androgen Receptor Messenger Ribonucleic Acid (mRNA) Expression in Sertoli

- Cells by Follicle-Stimulating Hormone Is Followed by Up-Regulation of Androgen Receptor mRNA and Protein. *Endocrinology* 131: 1343-1349
- Böckers TM, Nieschlag E, Kreutz MR, Bergmann M (1994) Localization of follicle-stimulating hormone (FSH) immunoreactivity and hormone receptor mRNA in testicular tissue of infertile men. *Cell and Tissue Research* 278: 595-600
- Booth WD (1988) Hormones, pheromones and sexual behaviour in the boar. *Pig News and Information* 9: 251-255
- Brown P, Mc Neilly AS (1999) Transcriptional regulation of pituitary gonadotrophin subunit genes Review. *Reviews of Reproduction*: 4 117-124
- Cameron RDA, Blackshaw AW (1980) The effect of elevated ambient temperature on spermatogenesis in the boar. *Journal of Reproduction and Fertility* 59: 173-179
- Carreau S, Lambard S, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bilinska B, Bourguiba S (2003) Aromatase expression and role of estrogens in male gonad : a review. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1: 35-40
- Chemes HE (1996) Leydig cell development in humans. In: *The Leydig cell*. Payne AH, Hardy MP, Russell LD (eds.), Cache River Press, Vienna: 175-201
- Chuzel F, Schteingart H, Vigier M, Avallet O, Saez JM (1995) Transcriptional and post-transcriptional regulation of luteotropin/chorionic gonadotropin receptor by the agonist in Leydig cells. *European Journal of Biochemistry* 229: 316-325
- Claus R (1979) Pheromone bei Säugetieren unter besonderer Berücksichtigung des Ebergeruchstoffes und seiner Beziehung zu anderen Hodensteroiden. *Fortschr. Tierphysiologie und Tierernährung, Beiheft 10*. Paul-Parey: 1-136
- Claus R (1990) Physiological role of seminal components in the reproductive tract of the female pig. *Journal of Reproduction and Fertility* 40: 117-131
- Claus R (1994) Pheromone. In: *Veterinärmedizinische Endokrinologie*. Döcke F (eds.), Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart: 691-712

- Claus R, Alsing W (1979) Occurrence of 5  $\alpha$ -androst-16-en-3-one, a boar pheromone in man and its relationship to testosterone. *Journal of Endocrinology* 68: 483-484
- Claus R, Dimmick MA, Gimenez T and Hudson LW (1992) Estrogens and prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  in the semen and blood plasma of stallions. *Theriogenology* 38: 687-693
- Claus R, Hoffmann B (1980) Oestrogens compared to other steroids of testicular origin in blood plasma of boars. *Acta Endocrinologica* 94: 404-411
- Clermont Y, Harvey SC (1965) Duration of the cycle of the seminiferous epithelium of normal, hypophysectomized and hypophysectomized-hormone treated albino rats. *Endocrinology* 76: 80-89
- Clermont Y (1972) Kinetics of Spermatogenesis in Mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological Reviews* 52: 198-235
- Clermont Y (1993) Introduction to the Sertoli cell. In: *The Sertoli cell*, Griswold MD, Russell LD (Hrsg.), Cache River Press: Clearwater, FL: 21-25
- Colenbrander B, de Jong FH, Wensing CJG (1978) Changes in serum testosterone concentrations in the male pig during development. *Journal of Reproduction and Fertility* 53: 377-380
- Conley AJ, Corbin CJ, Hinshelwood MM, Liu Z, Simpson ER, Ford JJ & Harada N (1996) Functional aromatase expression in porcine adrenal gland and testis. *Biology of Reproduction* 54: 497-505
- Conley AJ, Bird IM (1997) The role of Cytochrome P450 17 $\alpha$  Hydroxylase and 3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase in the Integration of Gonadal and Adrenal Steroidogenesis via  $\Delta$ 5 and  $\Delta$ 4 Pathways of Steroidogenesis in Mammals. *Biology of Reproduction* 56: 789-799
- Culier MD, Negro-Vilar A (1986) Evidence that pulsatile Follicle-stimulating hormone secretion is independent of endogenous luteinizing hormone releasing hormone. *Endocrinology* 118: 609-612
- de Kretser DM, Kerr JB (1994) The cytology of the testis. In: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E, Neill J (Hrsg.), Raven Press, New York: 1177-1290

- de Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N (1998) Spermatogenesis. *Human Reproduction* 1: 1-8
- Dixon WJ (1993) *BMDP Statistical Software Manual*, Volume 1 and 2. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London
- Ebling FJ, Nwagwu MO, Baines H, Myers M, Kerr JB (2006) The hypogonadal (hpg) mouse as a model to investigate the estrogenic regulation of spermatogenesis. *Human Fertility* 9:127-135
- Ebner von V (1871) *Untersuchungen über den Bau der Samenkanälchen und die Entwicklung der Spermatozoiden bei den Säugetieren und beim Menschen*. Leipzig
- Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson JA (1997) Human estrogen receptor  $\beta$ -gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 82: 4258-4265
- Evans RM (1988) The Steroid and Thyroid Hormone Receptor Superfamily. *Science* 240: 889-895
- Ewing LL, Zirkin BR, Cochran RC, Kromann N, Peters C, Ruiz-Bravo N (1979) Testosterone secretion by rat, rabbit guinea pig, dog and hamster testis perfused in vivo: correlations with leydig cell mass. *Endocrinology* 112: 1763-1769
- Falvo RE, Chandrashekar V, Arthur RD, Kuenstler AR, Hasson T, Awoniyi C, Schanbacher BD (1986) Effect of active immunization against LHRH or LH in boars: reproductive consequences and performance traits. *Journal of Animal Science* 63: 986-994
- Finnerty M, Enright WJ, Roche JF (1998) Testosterone, LH and FSH episodic secretory patterns in GnRH-immunized bulls. *Journal of Reproduction and Fertility* 114: 85-94
- Fisher JS, Millar MR, Majdic G, Saunders PT, Fraser HM, Sharpe RM (1997) Immunolocalisation of oestrogen receptor-alpha within the testis and excurrent ducts of the rat and marmoset monkey from perinatal life to adulthood. *Journal of Endocrinology* 153: 485-495
- Ford JJ (1983) Serum estrogen concentrations during postnatal development in male pigs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 174: 160-164

- Fraczek B, Kotula-Balak M, Wojtusiak A, Pierscinski A, Bilinska B (2001) Cytochrome p450 aromatase in the testis of immature and mature pigs. *Biology of Reproduction* 1: 51-59
- Frankenhuis MT, Kramer MF, de Rooij DG (1982) Spermatogenesis in the boar. *Veterinary quarterly* 4: 57-61
- Fraser HM, Gunn A, Jeffcoate SL, Holland DT (1974) Effect of active immunization to luteinizing hormone releasing hormone on serum and pituitary gonadotropins, testes and accessory sex organs in the male rat. *Journal of Endocrinology* 63: 399-406
- Garcia-Gil N, Pinart E, Sancho S, Badia E, Bassols J, Kadar E, Briz M, Bonet S (2002) The cycle of the seminiferous epithelium in Landrace boars. *Animal Reproduction Science* 73: 211-225
- Gasse H (2004) Männliche Geschlechtsorgane. In: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*. Nickel R, Schummer A, Seiferle E (Band 2 Eingeweide). Parey Verlag, Stuttgart: 369-373
- Gassen HG, Schimpf G (1999) Genetische Methoden 2. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer 50: 64-65, 338
- Geserick C, Meyer HA, Haendler B (2005) The role of DANN response elements as allosteric modulators of steroid receptor function. *Molecular and Cellular Endocrinology* 236: 1-7
- Gondos B, Berndtson WE (1993) Postnatal and pubertal development. In: *The Sertoli Cell*. Russell LD, Griswold MD (eds.), Clearwater, FL: Cache River Press: 116-153
- Gray RC, Day BN, Lasley JF, Tribble LF (1971) Testosterone levels of boars at various ages. *Journal of Animal Science* 33: 124-126
- Greger R (1994) Die Zelle als Grundbaustein. In: *Lehrbuch der Physiologie*. Klinker R, Silbernagl S (Hrsg.), Thieme, Stuttgart, New York: 13-36
- Griswold MD, Solari A, Tung PS, Fritz IB (1977) Stimulation by follicle-stimulating hormone of DNA synthesis and of mitosis in cultured Sertoli cells prepared from testes of immature rats. *Molecular and Cellular Endocrinology* 7: 151-165
- Griswold MD (1993) Action of FSH on mammalian Sertoli cells. In: *The Sertoli Cell*. Russell LD, Griswold MD (eds.), Clearwater, FL: Cache River Press: 493-508

- Grizzle TB, Esbenshade KL, Johnson BH (1987) Active immunization of boars against gonadotropin releasing hormone. I. Effects on reproductive parameters. *Theriogenology* 27: 571-580
- Groth W, Claus R (1977) Beziehungen zwischen den Konzentrationen von Testosteron und dem Ebergeruchstoff 5 $\alpha$ -Androst-16-en-3-on im Blut bzw. Fettgewebe und histometrischen Befunden im Hoden vom Schwein. *Zentralblatt für Veterinärmedizin* 24: 103-121
- Guraya SS (1998) Sertoli cells. In: Cellular and molecular biology of gonadal development and maturation in mammals. Guraya SS. (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin: 195-222
- Hall PF (1988) Testicular steroid synthesis: Organization and regulation. In: The Physiology of Reproduction. Knobil E, Neill J (eds.), Raven Press; Ltd., New York: 975-997
- Hansson V, Weddington SC, Mc Lean WS, Smith AA, Nayfeh SN, French FS, Ritzen EM (1975) Regulation of seminiferous tubular function by FSH and androgen. *Journal of Reproduction and Fertility* 44: 363-375
- Hartl P (1990) Pulsatile Freisetzung von Sexualhormonen und Gonadotropinen bei Besamungsbullen. Dissertation, Universität München
- Hawkins MB, Thronton JW, Crews D, Skipper JK, Dotte A, Thomas P (2000) Identification of a distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 10751-10756
- Heckert L, Griswold MD (1992) Expression of the FSH-receptor in the testis. *Recent Progress in Hormone Research* 48: 61-77
- Heller CG, Clermont Y (1963) Spermatogenesis in man: an estimate of its duration. *Science* 140: 184-186
- Hess RA (2003) Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1: 1-14
- Hochereau MT, Courot M, Ortavant R (1964) Labeling of germ cells of rams and bulls by injection of tritiated thymidine into the spermatic artery. *Annales de la Biologie Animale, Biochimie, Biophysics* 4: 157-161
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand, DH (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5`-



- 3`exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88: 7276-7280
- Iguchi T, Uesugi Y, Sato T, Ohta Y, Takasugi N (1991) Developmental pattern of estrogen receptor expression in male mouse genital organs. Molecular Andrology 3: 109-119
- Ing NH (2005) Steroid Hormones Regulate Gene Expression Post-transcriptionally by Altering the Stabilities of Messenger RNAs. Biology of Reproduction 72: 1290-1296
- Ing NH, Tornesi MB (1997) Estradiol Up-Regulates Estrogen Receptor and Progesterone Receptor Gene Expression in Specific Ovine Uterine Cells. Biology of Reproduction 56: 1205-1215
- Jefferson WN, Couse JF, Banks EP, Korach KS, Newbold RR (2000) Expression of estrogen receptor beta is developmentally regulated in reproductive tissues of male and female mice. Biology of Reproduction 62: 310-317
- Jegou B, Le Gac-Jegou M (1978) Androgen Binding Protein in the seminal plasma of some mammalian species. Journal of Endocrinology 77: 267-268
- Jegou B (1992) The Sertoli cell in vivo and vitro. Cell biology and toxicology 8: 49-54
- Jensen EV, Jacobsen HI (1962) Basic guides to the mechanism of estrogen action. Recent Progress in Hormone Research 18: 387-414
- Jeyakumar M, Suresh R, Krishnamurthy HN, Moudgal NR (1995) Changes in testicular function following specific deprivation of LH in the adult male rabbit. Journal of Endocrinology 147: 111-120
- Johnson L, McGowen TA, Keillor GE (1999) Testis, overview. Encyclopedia of Reproduction 4: 769-783
- Joshi HS, Raeside JI (1973) Synergistic effect of testosterone and oestrogens on accessory sex glands and sexual behaviour of the boar. Journal of Reproduction and Fertility 33: 411-423
- Kittok RJ, Kinder JE, Johnson PK (1984) Relationship between serum luteinizing hormone and estradiol in prepubertal boars. Theriogenology 21: 303-315

- Kliesch S, Penttilä TL, Gromoll J, Saunders PTK, Nieschlag E, Parvinen M (1992) FSH receptor mRNA is expressed stage dependently during rat spermatogenesis. *Molecular Cell Endocrinology* 84: 45-49
- Kojima Y (1990) Ultrastructure of the goat testes: tubulobulbar complexes between spermatids and Sertoli cells. *Japanese Journal of Veterinary Science* 52: 781-786
- Kotula M, Tuz R, FR Czek B, Wojtusiak A, Bilinska B (2000) Immunolocalization of androgen receptors in testicular cells of prepubertal and pubertal pigs. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 38: 157-162
- Kuiper GGJM, Enmark E, Puelto-Huiko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996) Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 93: 2925-2930
- Leblond C, Clermont Y (1952) Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the "Periodic acid-Fuchsin-Sulfurous Acid" technique. *American Journal of Anatomy* 90: 167-215
- Lekhkota O, Bergmann M (2007) Expression and cellular localization of estrogenrezeptor alpha (ER- $\alpha$ ) mRNA in the testis of different mammals. *Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft*. 102. Versammlung der Anatomischen Gesellschaft, Giessen
- Mäkinen S, Makela S, Weihua Z, Warner M, Rosenlund B, Salmi S, Hovatta O, Gustafsson JK (2001) Localization of oestrogen receptors alpha and beta in human testis. *Molecular Human Reproduction* 7: 497-503
- Maguire SM, Triblev WA, Griswold MD (1997) Follicle-Stimulating Hormone (FSH) Regulates the Expression of FSH Receptor Messenger Ribonucleic Acid in Cultured Sertoli Cells and in Hypophysectomized Rat Testis. *Biology of Reproduction* 56: 1106-1111
- McKinnell C, Saunders PTK, Fraser HM, Kelnar CJ, Kivlin C, Morris KD, Sharpe RM (2001) Comparison of androgen receptor and oestrogen receptor beta immunoexpression in the testes of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) from birth to adulthood: low androgen receptor immunoexpression in Sertoli cells during the neonatal increase in testosterone concentrations. *Journal of Reproduction* 122: 419-429

- McLachlan RI, Wreford NG, Tsonis C, de Kretser DM, Robertson DM (1994) Testosterone effects on spermatogenesis in the gonadotropin-releasing hormone-immunized rat. *Biology of Reproduction* 50: 271-280
- McLachlan RI, Wreford NG, de Kretser DM, Robertson DM (1995) The effects of recombinant follicle-stimulating hormone on the restoration of spermatogenesis in the gonadotropin-releasing hormone-immunized adult rat. *Endocrinology* 136: 4035-4043
- McLachlan RI, Wreford NG, O'Donnell L, de Kretser DM, Robertson DM (1996) The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. *Journal of Endocrinology* 148: 1-9
- Möstl E (2005) Spezielle Endokrinologie. In: *Physiologie der Haustiere*. von Engelhardt W, Breves G (Hrsg.), Enke, 2 Aufl.: 477-480
- Monet-Kuntz C, Fontaine I (1989) Age-dependent changes in the in vitro response of a pig Sertoli cell-enriched population to FSH. *Journal of Reproduction and Fertility* 86: 643-651
- Mosselmann S, Polman J, Dijkema R (1996) ER beta: Identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Letters* 392: 49-53
- Mruk D, Cheng CY (2004) Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocrine Reviews* 25: 747-806
- Muffly KE, Nazian SJ, Cameron DF (1994) Effects of Follicle stimulating hormone on the junction-related Sertoli Cell Cytoskeleton and Daily Sperm Production in testosterone-treated hypophysectomized rats. *Biology of Reproduction* 51: 158-166
- Muramatsu M, Inoue S (2000) Estrogen receptors: how do they control reproductive and nonreproductive functions? *Biochemical and Biophysical Research Communications* 270: 1-10
- Mutembei HM, Pesch S, Schuler G, Hoffmann B (2005) Expression of oestrogen receptors (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) and that of cytochrome P450 aromatase in the testes of immature and mature boars. *Reproduction in domestic animals* 40: 228-236

- Nakhla AM, Mather JP, Janne OA, Bardin CW (1984) Estrogen and androgen receptors in Sertoli, Leydig, myoid, and epithelial cells: effects of time in culture and cell density. *Endocrinology* 115: 121-128
- Nie R, Zhou Q, Jassim E, Saunders PT, Hess RA (2002) Differential expression of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in the reproductive tracts of adult male dogs and cats. *Biology of Reproduction* 66: 1161-1168
- Nielsen M, Björnsdóttir S, Hayer PE, Bysker AG (2000) Ontogeny of oestrogen receptor  $\alpha$  in gonads and sex ducts of fetal and newborn mice. *Journal of Reproduction and Fertility* 118: 195-204
- Nuovo GJ (1994) PCR in situ Hybridization. In: PCR in situ hybridization: protocols and applications. Nuovo GJ (eds.), Raven, New York: 169-231
- O'Donnell L, McLachlan RI, Wreford NG, Robertson DM (1994) Testosterone promotes the conversion of round spermatids between stages VII and VIII of the rat spermatogenic cycle. *Endocrinology* 135: 2608-2614
- O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER (2001) Estrogen and Spermatogenesis. *Endocrine Reviews* 22: 289-318
- Okwun OE, Igboeli G, Ford JJ, Lunstra Dd, Johnson L (1996) Number and function of Sertoli cells, number and yield of spermatogonia, and daily sperm production in three breeds of boar. *Journal of Reproduction and Fertility* 107: 137-149
- Orth JM (1984) The role of follicle-stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in testes of fetal rats. *Endocrinology* 115: 1248-1255
- Orth JM, Boehm R (1990) Endorphin suppresses FSH-stimulated proliferation of isolated neonatal Sertoli cells by a pertussis toxin-sensitive mechanism. *The Anatomical Record* 226: 320-327
- Ohsako S, Kubota K, Kurosawa S, Takeda K, Qing W, Ishimura R, Tohyama C (2003) Alterations of gene expression in adult male rat testis and pituitary shortly after subacute administration of the antiandrogen flutamide. *Journal of Reproduction and Development* 49: 275-290
- Padmanabhan V, McNeilly AS (2001) Is there an FSH releasing factor. *Reproduction* 121: 21-30

- Parrott RF, Booth WD (1984) Behavioural and morphological effects of 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone and oestradiol-17 $\beta$  in the prepubertal castrated boar. *Journal of Reproduction and Fertility* 71: 453-461
- Pavao M, Traish AM (2001) Estrogen receptor antibodies: specificity and utility in detection, localization and analyses of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$ . *Steroids* 66: 1-16
- Payne AH, Perkins LM, Georgiou M, Quinn PG (1987) Intratesticular site of aromatase activity and possible function of testicular estradiol. *Steroids* 50: 435-448
- Payne AH, Youngblood GL (1995) Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *Biology of Reproduction* 52: 217-225
- Pelletier G, Luu-The V, Charbonneau A, Labrie F (1999) Cellular Localization of estrogen receptor beta messenger ribonucleic acid in cynomolgus monkey reproductive organs. *Biology of Reproduction* 61: 1249-1255
- Pelletier G, Labrie C, Labrie F (2000) Localization of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  and androgen receptors in the rat reproductive organs. *Journal of Endocrinology* 165: 359-390
- Pelletier G, El-Alfy M (2000) Immunocytochemical localisation of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in the human reproductive organs. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 85: 4835-4840
- Pelliniemi LJ, Fröjdman K, Paranko J (1993) Embryological and prenatal development and function of Sertoli cells. In: *The Sertoli Cell*. Russell LD, Griswold MD (eds.), Clearwater, FL: Cache River Press: 88-113
- Perey B, Clermont Y, Leblond CP (1961) The wave of the seminiferous epithelium in the rat. *American Journal of Anatomy* 108: 47-77
- Peyrat JP, Meusy-Dessolle N, Garnier J (1981) Changes in Leydig cells and luteinizing hormone receptors in porcine testis during postnatal development. *Endocrinology* 108: 625-31
- Print CG, Loveland KL (2000) Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *BioEssays* 22: 423-430
- Promega manual (2003) pGEM $\text{\textcircled{R}}$ -T and pGEM $\text{\textcircled{R}}$ -T Easy Vector Systems. WI, USA: 1-28

- Rabb MH, Thomson DL, Barry BE, Colborn DR, Hehnke KE, Garza F (1990) Effects of active immunization against GnRH on LH, FSH and Prolactin storage, secretion and response to their secretagogues in pony geldings. *Journal of Animal Science* 68: 3322-3329
- Raeside JI, Renaud RL (1983) Estrogen and androgen production by purified leydig cells of mature boars. *Biology of Reproduction* 28: 727-733
- Raeside JL, Tan HS (1976) Determination of plasma levels of dehydroepiandrosterone sulphate and testosterone in the boar. VIIIth Int Congr Anim Reprod and AI Cracow 3: 77-80
- Rago V, Maggiolini M, Vivacqua A, Palma A and Carpino A (2004) Differential expression of estrogen receptors (ER $\alpha$ /ER $\beta$ ) in the testis of mature and immature pigs. *The Anatomical Record* 281: 1234-1239
- Regadera J, Martinez-Garcia F, Gonzalez-Peramato P, Serrano A, Nistal M, Suarez-Quian C (2001) Androgen receptor expression in Sertoli cells as a function of seminiferous tubule maturation in the human cryptorchid testis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88: 413-421
- Ritzen EM, Hagenas L, Hansson V, Weddington SC, French FSH, Nayfeh SN (1975) Androgen binding and transport in testis and epididymis. *Vitamines and Hormones Review* 33: 283-295
- Robertson KM, O'Donnell L, Jones ME, Meachem SJ, Boon WC, Fischer CR, Graves KH, McLachlan RI, Simpson ER (1999) Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. *Proceedings of the National Academy of Science* 96: 7986-7991
- Rommerts FF, de Jong FH, Brinkmann AO, van der Molen HJ (1982) Development and cellular localization of rat testicular aromatase activity. *Journal of Reproduction and Fertility* 65: 281-288
- Rosenfeld CS, Ganjam VK, Taylor JA, Yuan X, Stiehr JR, Hardy MP, Lubahn DB (1998) Transcription and translation of estrogen receptor-beta in the male reproductive tract of estrogen receptor-alpha knock-out and wild-type mice. *Endocrinology* 139: 2982-2987
- Russell LD (1993 a) Role in Spermiation. In: *The Sertoli Cell*. Russell LD, Griswold MD (eds.), Clearwater, FL: Cache River Press: 269-304

- Russell LD (1993 b) Morphological and functional evidence for Sertoli-germ cell relationships. In: The Sertoli Cell. Russell LD, Griswold MD (eds.), Clearwater, FL: Cache River Press: 365-390
- Rüsse I, Sinowatz F (1998) Gametogenese. In: Lehrbuch der Embryologie der Haustiere. Rüsse I, Sinowatz F (Hrsg.), 2. Aufl., Blackwell, Berlin: 53-70
- Sanborn BM, Caston LA, Chang C, Liao S, Speller R, Porter LD, Ku CY (1991) Regulation of androgen receptor mRNA in rat Sertoli and peritubular cells. *Biology of Reproduction* 45: 634-641
- Sanford LM, Swierstra EE, Palmer WM, Howland BE (1976) The profile of luteinizing hormone and testosterone secretion in the boar. VIIIth Int Congr Anim Reprod and AI Cracow 3: 97-99
- Sanford LM, Price CA, Legge DG, Baker SJ, Yarney TA (2002) Role of FSH, numbers of FSH receptors and testosterone in the regulation of inhibin secretion during the seasonal testicular cycle of adult rams. *Reproduction* 123: 269-280
- Sanger F, Nicklen S, Coulson A R (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5463-5467
- Saunders PTK, Maguire SM, Gaughan J, Miller MR (1997) Expression of oestrogen receptor  $\beta$  (ER $\beta$ ) in multiple rat tissues visualised by immunohistochemistry. *Journal of Endocrinology* 154: 13-16
- Saunders PTK (1998) Oestrogen receptor beta (ERbeta). *Reviews of Reproduction* 3: 164-171
- Saunders PTK, Fisher JS, Sharpe RM, Millar MR (1998) Expression of oestrogen receptor beta (ER $\beta$ ) occurs in multiple cell types, including some germ cells, in the rat testis. *Journal of Endocrinology* 56: 13-17
- Saunders PTK, Sharpe RM, Williams K, Macpherson S, Urquart H, Irvine DS, Millar MR (2001) Differential expression of oestrogen receptor alpha and beta proteins in the testes and male reproductive system of human and non-human primates. *Molecular Human Reproduction* 7: 227-236
- Schiller PI, Puchta U, Ogilvie AJL, Graf A, Kind P, Sander CA (1998) In-situ-PCR und PCR-in-situ-Hybridisierung am Paraffingewebe. *Neue*

- diagnostische Möglichkeiten in der Pathologie. Springer Verlag, Berlin: 313-317
- Schulze C (1984) Sertoli Cells and Leydig Cells in *Man* 88: 7-30
- Schnurrbusch U (2001) Morphologie und Histologie der männlichen Genitalorgane. In: *Veterinärmedizinische Andrologie*, Busch W, Holzmann A (eds.), Schattauer Verlag: 269-336
- Schwarzenberger F, Toole GS, Christie HL, Raeside JI (1993) Plasma levels of several androgens and estrogens from birth to puberty in male domestic pigs. *Acta Endocrinologica* 128: 173-177
- Selva D M, Tirado O M, Toran N, Suarez-Quian C A, Reventos J, Munell F (2004) Estrogen receptor  $\beta$  expression and apoptosis of spermatocytes of mice over-expressing a rat androgen-binding protein transgen. *Biology of Reproduction* 71: 1461-1468
- Setchell BP, and Cox JE (1982) Secretion of free and conjugated steroids by the horse testis into lymph and venous blood. *Journal of Reproduction and Fertility* 32: 123-127
- Shan LX, Rodriquez MC, Janne OA (1990) Regulation of androgen receptor protein and mRNA concentrations by androgens in rat ventral prostate and seminal vesicles and in human hepatoma cells. *Molulare Endocnology* 4: 1636-1646
- Sharpe RM (1989) Follicle-stimulating hormone and spermatogenesis in the adult male. *Journal of Endocrinology* 21: 405-407
- Sharpe RM (1994) Regulation of Spermatogenesis. In: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E, Neill JD (Hrsg.), Press, New York: 1363-1434
- Shayu D, Kesava CCS, Soundarajan R and Rao AJ (2005) Effects of ICI 182780 on estrogen receptor expression, fluid absorption and sperm motility in the epididymis of the bonnet monkey. *Reproductive Biology and Endocrinology* 3: 10-24
- Sinowatz F (2001) Morphologie und Histologie der männlichen Genitalorgane. In: *Veterinärmedizinische Andrologie*. Busch W, Holzmann A (eds.), Schattauer Verlag Stuttgart, New York: 1-22
- Simoni M, Weinbauer GF, Gromoll J, Nieschlag E (1999) Role of FSH in male gonadal function Review. *Annals of Endocrinology* 60: 102-106



- Sipahutar H, Sourdain P, Moslemi S, Plainfosse B, Seralini GE (2003) Immunolocalization of aromatase in stallion Leydig cells and seminiferous tubules. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 51: 311-318
- Skinner MK (1993 a) Secretion of growth factors and other regulatory factors. In: *The Sertoli Cell*. Russell LD, Griswold MD (eds.), Clearwater, FL: Cache River Press: 237-248
- Skinner MK (1993 b) Sertoli cell-peritubular myoid cell interactions. In: *The Sertoli Cell*. Russell LD, Griswold MD (eds.), Clearwater, FL: Cache River Press: 477-484
- Sneddon SF, Walther N, Saunders PT (2005) Expression of androgen and estrogen receptors in sertoli cells: studies using the mouse SK11 cell line. *Endocrinology* 146: 5304-5312
- Steger K (2001) Spermatogenese und Spermatogenesestörungen. *Reproduktionsmedizin* 17: 137-148
- Suarez-Quian CA, Martinez-Garcia F, Nistal M, Regadera J (1999) Androgen receptor distribution in adult human testis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 84: 350-358
- Suresh R, Medhamurthy R, Moudgal NR (1995) Comparative studies on the effects of specific immunoneutralization of endogenous FSH or LH on testicular germ cell transformations in the adult bonnet monkey (*Macaca radiata*). *American Journal of Reproductive Immunology* 34: 35-43
- Swierstra EE (1968) Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar; duration of spermatozoan transit through the epididymis. *The Anatomical Record* 161: 171-186
- Swierstra EE, Gebauer M, Pickett BW (1974) Reproductive Physiology of the stallion I Spermatogenesis and testis composition. *Journal of Reproduction and Fertility* 40: 113-123
- Tähkä KM (1986) Current aspects of Leydig cell function and its regulation. *Journal of Reproduction and Fertility* 78: 367-380
- Tan HS, Raeside JI (1980) Developmental patterns of plasma dehydroepiandrosterone sulphate and testosterone in male pigs. *Animal Reproduction Science* 3: 73-81

- Taylor AH, Al-Azzawi F (2000) Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *Journal of Molecular Endocrinology* 24: 145-155
- Teerds KJ (1996) Regeneration of Leydig cells after depletion by EDS: A Model for postnatal Leydig cells renewal. In: *The Leydig cell*. Payne AH, Hardy MP, Russell LD (eds.), Cache River Press, Vienna: 203-220
- Tena-Sempere M, Navarro J, Pinella L, Gonzalez LG, Huhtaniemi I, Aguilar E (2000) Neonatal exposure to estrogen differentially alters estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  mRNA expression in rat testis during postnatal development. *Journal of Endocrinology* 165: 345-357
- Themmen APN, Blok LJ, Post M, Baarends WM, Hoogerbrugge JW, Vassart G, Grootegoed JA (1991) Follitropin receptor down-regulation involves a cAMP-dependent post-transcriptional decrease of receptor mRNA expression. *Molecular and Cellular Endocrinology* 78: 7-13
- van der Molen HJ, Brinkmann AO, de Jong FH, Rommerts FF (1981) Testicular oestrogens. *Journal of Endocrinology* 89: 33-46
- van Pelt AM, de Rooij DG, van der Burg B, van der Saag PT, Gustafsson JA, Kuiper GG (1999) Ontogeny of estrogen receptor-beta expression in rat testis. *Endocrinology* 140: 478-483
- Velle W (1958) Further studies on urinary oestrogen excretion by the boar. *Acta Endocrinologica* 89: 33-46
- Vornberger W, Prins G, Musto NA, Suarez-Quian CA (1994) Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis. *Endocrinology* 134: 2307-2316
- Wagner A, Claus R (2004) Involvement of glucocorticoids in testicular involution after active immunization of boars against GnRH. *Reproduction* 127: 275-283
- Wagner A (2005) Steuerungsmechanismen der Spermatogenese beim Eber: Auswirkungen einer GnRH-Immunisierung und anschließender Estradiolinfusion. Dissertation der Universität Hohenheim
- Wagner A, Messe N, Bergmann M, Lekhkota O, Claus R (2006) Effects of estradiol infusion in GnRH immunized boars on spermatogenesis. *Journal of Andrology* 27: 880-889
- Weiler U, Claus R, Schoebelen-Combes S, Bonneau M (1998) Influence of age and genotype on endocrine parameters and growth performance: a

- comparative study in Wild boars, Meishan and Large White boars. *Livestock Production Science* 54: 21-31
- Weinbauer G F, Gromoll J, Simoni M, Nieschlag E (2000) Physiologie der Hodenfunktion. In: *Andrologie*. Nieschlag E, Behre H (Hrsg.), Springer, 2. Aufl.: 27-67
- West NB, Brenner RM (1990) Estrogen receptor in the ductuli efferentes, epididymis, and testis of rhesus and cynomolgus macaques. *Biology of Reproduction* 42: 533-538
- Wettemann RP, Wells ME, Omtvedt IT, Pope CE, Turman EJ (1976). Influence of elevated ambient temperature on reproductive performance of boars. *The Indian journal of animal sciences* 42: 664-669
- Wrobel KH (1998) Male Reproductive System. In: *Textbook of Veterinary Histology*. Dellman HD, Eurell J (eds.), 5. Aufl., Williams & Wilkins Company: 226-227
- Wrobel KH (1990) Männliche Geschlechtsorgane. In: *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere*. Mosimann W, Kohler T (Hrsg.), Parey, Berlin, Hamburg: 206-231
- Xiao CW, Goff AK (1999) Hormonal regulation of oestrogen and progesterone receptors in cultured bovine endometrial cells. *Journal of Reproduction and Fertility* 115: 101-109
- Yu WH, Karanth D, Walczewska A, Sower SA, McCann SM (1997) A hypothalamic follicle-stimulating hormone-releasing decapeptide in the rat. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 94: 9499-9503
- Yu WH, Karanth S, Sower SA, Parlow AF, McCann SM (2000) The similarity of FSH-Releasing Factor to lamprey gonadotropin-releasing hormone III (I-GnRH-III). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 224: 87-92
- Zirkin BR (1993) Regulation of spermatogenesis in the adult mammal: gonadotropins and androgens. In: *Cell and Molecular Biology of the Testis*. Desjardins C, Ewing LL (Hrsg.), Oxford University Press, New York: 166-188

- Zhang F, Mämäläinen T, Kaipia A, Pakarinen P, Huhtaniemi L (1994) Ontogeny of luteinizing hormone receptor gene expression in the rat testis. *Endocrinology* 134: 2206-2213
- Zhang Z, Laping J, Glasser S, Day P, Mulholland J (1998) Mediators of estradiol-stimulated mitosis in the rat uterine luminal epithelium. *Endocrinology* 139: 961-966
- Zhou Q, Nie R, Prins GS, Saunders PTK, Katzenellenbogen BS, Hess RA (2002) Localization of Androgen and Estrogen Receptor in Adult Male Mouse Reproductive Tract. *Journal of Andrology* 23: 870-881

## **10 Anhang**

### **Das Program zur Entwässerung der Proben (Kapitel 4.3.2.1.2)**

Alkohol 80 % für 2 Stunden.

Alkohol 96 % für 2 Stunden.

Alkohol 100 % für 3 Stunden.

Alkohol 100 % für 3 Stunden.

Alkohol 100 % für 3 Stunden.

Xylol für 1 Stunden.

Xylol für 45 Minuten.

Xylol für 45 Minuten.

Paraffin mit 59°C für 40 Minuten.

Paraffin mit 59°C für 40 Minuten.

Paraffin mit 59°C für 40 Minuten.

### **Beschichtung der Objektträger (Kapitel 4.3.2.1.4)**

OT in Küvettenhalter einsortieren.

OT kurz in Glasbecken mit Aqua bidest spülen und befeuchten.

Küvettenhalter auf Unterlage abtropfen lassen.

OT kurz in Glasbecken mit reinem Aceton spülen und befeuchten.

Aceton unter laufendem Abzug abdampfen lassen, bis OT trocken sind.

OT für 5 Minuten in Glasbecken mit 2%igem APTEX (4 ml APTEX auf 196 ml Aceton).

OT für 2 Minuten in Glasbecken mit frischem Leitungswasser stellen.

OT in Glasbecken unter fließendem Leitungswasser spülen.

OT für 2 Minuten in Glasbecken mit Aqua bidest stellen.

Küvettenhalter auf Unterlage abtropfen lassen.

OT über Nacht bei 37°C im Trockenschrank trocknen.

**HE-Färbung (Kapitel 4.3.2.1.6)**

OT in Küvettenhalter einsortieren.

3 x 10 Minuten Xylol.

2 x 5 Minuten absoluter Alkohol (Ethanol).

1 x 5 Minuten 96%iger Alkohol (Ethanol).

1 x 5 Minuten 80%iger Alkohol (Ethanol).

1 x 5 Minuten 70%iger Alkohol (Ethanol).

1 x 5 Minuten 50%iger Alkohol (Ethanol).

1 x 5 Minuten Aqua dest.

7 Minuten in Hämatoxylin nach Mayer.

15 Minuten in fließendem Leitungswasser bläuen.

7 Minuten in 1%iges Eosin.

kurz in Leitungswasser spülen.

kurz in 70%igen Alkohol (Ethanol).

kurz in 80%igen Alkohol (Ethanol).

1 x 2 Minuten 80%iger Alkohol (Ethanol).

2 x 2 Minuten 96%iger Alkohol (Ethanol).

3 x 2 Minuten absoluten Alkohol (Ethanol).

3 x 10 Minuten Xylol. Eindecken der gefärbten Schnitte mit Vitro-Clud.

## 10.1 Ergebnisse der Sequenzierung

### RT-PCR

**Sus scrofa estrogen receptor alpha mRNA, partial cds**

**Length=477**

Score = 452 bits (228), Expect = 3e-126

Identities = 231/232 (99%), Gaps = 0/232 (0%)

Strand=Plus/Plus

Query 36 95

GCTCCTGTTTGCTCCTAACTTGCTCCTGGACAGGAACCAGGGCAAGTGTGTCGAGGGAAT

|||||

GCTCCTGTTTGCTCCTAACTTGCTCCTGGACAGGAACCAGGGCAAGTGTGTCGAGGGAAT

Sbjct 51 110

Query 96 155

GGTGGAGATCTTTGACATGTTGCTGGCTACATCATCTCGCTTCCGTATGATGAATCTCCA

|||||

GGTGGAGATCTTTGACATGTTGCTGGCTACATCATCTCGCTTCCGTATGATGAATCTCCA

Sbjct 111 170

Query 156 215

GGGAGAGGAGTTTGTGTGCCTCAAATCCATCATTTTGCTTAATTCTGGAG**C**GTACACGTT

|||||

GGGAGAGGAGTTTGTGTGCCTCAAATCCATCATTTTGCTTAATTCTGGAG**T**GTACACGTT

Sbjct 171 230

Query 216 267

TCTGTCCAGCACCCCTGAAGTCTCTGGAAGAGAAGGACCATATCCACCGTGTC

|||||

TCTGTCCAGCACCCCTGAAGTCTCTGGAAGAGAAGGACCATATCCACCGTGTC

Sbjct 231 282

**Sus scrofa estrogen receptor beta (ER beta) mRNA, complete cds**

**Length=1581**

Score = 383 bits (193), Expect = 7e-106

Identities = 193/193 (100%), Gaps = 0/193 (0%)

Strand=Plus/Plus

Query 5 64

GCCGTCACCTTCTGTATGCAGAACCTCAAAGAGTCCTTGGTGTGACACAAGATCACTAGA

|||||

GCCGTCACCTTCTGTATGCAGAACCTCAAAGAGTCCTTGGTGTGACACAAGATCACTAGA

## Anhang

---

Sbjct 273 332  
Query 65 124  
ACACACCTTACCTGTGAACAGAGAGACATTGAAAAGGAAGGCTAGTGGGAGCAGTTGTGC  
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
ACACACCTTACCTGTGAACAGAGAGACATTGAAAAGGAAGGCTAGTGGGAGCAGTTGTGC

Sbjct 333 392  
Query 125 184  
CAGCCCTGTTACCAGTCCAAGTTCAAAGAGGGATGCCCACTTCTGTGCTGTCTGCAGTGA  
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
CAGCCCTGTTACCAGTCCAAGTTCAAAGAGGGATGCCCACTTCTGTGCTGTCTGCAGTGA

Sbjct 393 452  
Query 185 197  
TTATGCGTCAGGA  
||||||||||||  
TTATGCGTCAGGA

Sbjct 453 465

### Plasmid

**Sus scrofa estrogen receptor alpha mRNA, partial cds**

**Length=477**

Score = 452 bits (228), Expect = 4e-126  
Identities = 231/232 (99%), Gaps = 0/232 (0%)  
Strand=Plus/Minus

Query 31 90  
GACACGGTGGATATGGTCCTTCTCTCCAGAGACTTCAGGGTGTCTGGACAGAAACGTGTA  
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
GACACGGTGGATATGGTCCTTCTCTCCAGAGACTTCAGGGTGTCTGGACAGAAACGTGTA  
Sbjct 282 223

Query 91 150  
CGCTCCAGAATTAAGCAAAATGATGGATTTGAGGCACACAACTCCTCTCCCTGGAGATT  
| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
CACTCCAGAATTAAGCAAAATGATGGATTTGAGGCACACAACTCCTCTCCCTGGAGATT  
Sbjct 222 163

Query 151 210  
CATCATA CGGAAGCGAGATGATGTAGCCAGCAACATGTCAAAGATCTCCACCATTCCCTC  
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
CATCATA CGGAAGCGAGATGATGTAGCCAGCAACATGTCAAAGATCTCCACCATTCCCTC



## Anhang

---

Sbjct 162 103

Query 211 262

```
GACACACTTGCCCTGGTTCCTGTCCAGGAGCAAGTTAGGAGCAAACAGGAGC
|||||
GACACACTTGCCCTGGTTCCTGTCCAGGAGCAAGTTAGGAGCAAACAGGAGC
```

Sbjct 102 51

### **Sus scrofa estrogen receptor beta (ER beta) mRNA, complete cds**

**Length=1581**

Score = 339 bits (171), Expect = 8e-93

Identities = 171/171 (100%), Gaps = 0/171 (0%)

Strand=Plus/Plus

Query 1 60

```
GAACCTCAAAAGAGTCCTTGGTGTGACACAAGATCACTAGAACACACCTTACCTGTGAAC
|||||
GAACCTCAAAAGAGTCCTTGGTGTGACACAAGATCACTAGAACACACCTTACCTGTGAAC
```

Sbjct 292 351

Query 61 120

```
AGAGAGACATTGAAAAGGAAGGCTAGTGGGAGCAGTTGTGCCAGCCCTGTTACCAGTCCA
|||||
AGAGAGACATTGAAAAGGAAGGCTAGTGGGAGCAGTTGTGCCAGCCCTGTTACCAGTCCA
```

Sbjct 352 411

Query 121 171

```
AGTTCAAAGAGGGATGCCCACTTCTGTGCTGTCTGCAGTGATTATGCGTCA
|||||
AGTTCAAAGAGGGATGCCCACTTCTGTGCTGTCTGCAGTGATTATGCGTCA
```

Sbjct 412 462

## 10.2 Real Time PCR

**Tab. 8:** Mittels Real Time PCR untersuchte Hodengewebe mit Angabe des Ct-Wertes für GAPDH und ER- $\alpha$ . Mwt = arithmetischer Mittelwert, STBW = Standardabweichungen aus Ct-Werten der beiden identischen PCR-Läufe.

Gruppe	Eber	GAPDH			ER- $\alpha$		
		Ct-Wert	Mwt	STBW	Ct-Wert	Mwt	STBW
intakte Eber	Zentis	22,55	22,42	0,18384776	27,62	27,745	0,1767767
	Zentis	22,29			27,87		
	Ernesto	23,7	23,375	0,45961941	29,18	29,225	0,06363961
	Ernesto	23,05			29,27		
	Ernie	21,64	21,675	0,04949747	27,53	27,545	0,0212132
	Ernie	21,71			27,56		
	Elba	24,37	24,365	0,00707107	29,88	29,855	0,03535534
	Elba	24,36			29,83		
	Edwin	22,65	22,59	0,08485281	29,35	29,34	0,01414214
	Edwin	22,53			29,33		
	Rudi	21,64	21,7	0,08485281	27,72	27,675	0,06363961
	Rudi	21,76			27,63		
	Ronaldo	23,73	23,81	0,11313708	29,38	29,405	0,03535534
	Ronaldo	23,89			29,43		
	Romeo	22,38	22,335	0,06363961	27,21	27,095	0,16263456
	Romeo	22,29			26,98		
	Dodo	22,44	22,34	0,14142136	28,76	28,565	0,27577164
	Dodo	22,24			28,37		
immunisierte Eber	Eddy	27,15	27,075	0,10606602	32,85	32,54	0,4384062
	Eddy	27			32,23		
	Esra	28,14	28,115	0,03535534	33,78	33,72	0,08485281
	Esra	28,09			33,66		
	Zorro	23,21	22,785	0,60104076	28,62	28,98	0,50911688
	Zorro	22,36			29,34		
	Zunder	23,5	23,51	0,01414214	28,66	28,61	0,07071068
	Zunder	23,52			28,56		
	Racker	21,88	21,985	0,14849242	28,09	28,05	0,05656854
	Racker	22,09			28,01		
	Rubens	22,08	22,185	0,14849242	27,61	27,595	0,0212132
	Rubens	22,29			27,58		
	Karl	23,11	23,13	0,02828427	27,67	27,615	0,07778175
	Karl	23,15			27,56		
	Knut	23,26	23,255	0,00707107	28,19	28,145	0,06363961
	Knut	23,25			28,1		
Duplo	22,63	22,63	0	29,09	28,86	0,32526912	
Duplo	22,63			28,63			
17 $\beta$ -Estradiol-infundierte, immunisierte Eber	Zimt	24,42	24,135	0,40305087	28,61	28,83	0,31112698
	Zimt	23,85			29,05		
	Zottel	24,89	24,585	0,43133514	29,1	29,05	0,07071068
	Zottel	24,28			29		
	Egon	23,77	23,875	0,14849242	28,8	28,8	0
	Egon	23,98			28,8		
	Etzel	26,75	26,605	0,20506097	31,28	31,25	0,04242641
	Etzel	26,46			31,22		
Enzo	23,12	23,1	0,02828427	29,09	29,18	0,12727922	
Enzo	23,08			29,27			

## Anhang

**Tab. 9:** Mittels Real Time PCR untersuchte Hodengewebe mit Angabe des Ct-Wertes für ER-β und LHR. Mwt = arithmetischer Mittelwert, STBW = Standardabweichungen aus Ct-Werten der beiden identischen PCR-Läufe.

Gruppe	Eber	ER-β			LHR		
		Ct-Wert	Mwt	STBW	Ct-Wert	Mwt	STBW
intakte Eber	Zentis	33,63	33,555	0,10606602	23,94	23,725	0,30405592
	Zentis	33,48			23,51		
	Ernesto	35,18	34,715	0,65760931	27,24	27,24	0
	Ernesto	34,25			27,24		
	Ernie	33,07	33,215	0,20506097	22,57	22,74	0,24041631
	Ernie	33,36			22,91		
	Elba	33,61	33,76	0,21213203	26,51	26,56	0,07071068
	Elba	33,91			26,61		
	Edwin	34,9	35,02	0,16970563	24,5	24,5	0
	Edwin	35,14			24,5		
	Rudi	33,82	33,63	0,26870058	24,75	24,445	0,43133514
	Rudi	33,44			24,14		
	Ronaldo	35,95	35,71	0,33941125	26,09	25,86	0,32526912
	Ronaldo	35,47			25,63		
	Romeo	33,68	33,55	0,18384776	26	25,58	0,5939697
	Romeo	33,42			25,16		
	Dodo	35,26	35,2	0,08485281	23,02	23,06	0,05656854
Dodo	35,14			23,1			
immunisierte Eber	Eddy	37,9	37,72	0,25455844	28,27	28,305	0,04949747
	Eddy	37,54			28,34		
	Esra	39,26	38,77	0,69296465	31,34	31,6	0,36769553
	Esra	38,28			31,86		
	Zorro	35,29	35,27	0,02828427	26,38	26,235	0,20506097
	Zorro	35,25			26,09		
	Zunder	34,64	34,36	0,3959798	25,97	25,68	0,41012193
	Zunder	34,08			25,39		
	Racker	33,29	33,18	0,15556349	25,53	25,35	0,25455844
	Racker	33,07			25,17		
	Rubens	32,19	31,96	0,32526912	25,38	24,995	0,54447222
	Rubens	31,73			24,61		
	Karl	33,93	33,575	0,50204581	25,8	25,535	0,37476659
	Karl	33,22			25,27		
	Knut	33,03	33,365	0,47376154	25,59	25,345	0,34648232
	Knut	33,7			25,1		
	Duplo	34,49	34,425	0,09192388	24,97	25,07	0,14142136
Duplo	34,36			25,17			
17β-Estradiol-infundierte, immunisierte Eber	Zimt	33,76	34,025	0,37476659	26,26	26,205	0,07778175
	Zimt	34,29			26,15		
	Zottel	34,56	34,855	0,417193	26,46	26,18	0,3959798
	Zottel	35,15			25,9		
	Egon	34,31	33,995	0,44547727	26,08	26,275	0,27577164
	Egon	33,68			26,47		
	Etzel	36,19	36,73	0,76367532	29,75	29,805	0,07778175
	Etzel	37,27			29,86		
	Enzo	34,9	35,28	0,53740115	24,76	24,715	0,06363961
Enzo	35,66			24,67			

## Anhang

**Tab. 10:** Mittels Real Time PCR untersuchte Hodengewebe mit Angabe des Ct-Wertes für AR und FSH. Mwt = arithmetischer Mittelwert, STBW = Standardabweichungen aus Ct-Werten der beiden identischen PCR-Läufe.

Gruppe	Eber	AR			FSH		
		Ct-Wert	Mwt	STBW	Ct-Wert	Mwt	STBW
intakte Eber	Zentis	25,94	25,91	0,04242641	26,43	26,785	0,50204581
	Zentis	25,88			27,14		
	Ernesto	26,74	26,75	0,01414214	24,25	24,93	0,96166522
	Ernesto	26,76			25,61		
	Ernie	25,24	25,33	0,12727922	25,77	25,78	0,01414214
	Ernie	25,42			25,79		
	Elba	26,84	26,79	0,07071068	26,48	26,52	0,05656854
	Elba	26,74			26,56		
	Edwin	26,34	26,485	0,20506097	26,56	26,56	0
	Edwin	26,63			26,56		
	Rudi	25,85	25,735	0,16263456	26,37	26,115	0,36062446
	Rudi	25,62			25,86		
	Ronaldo	27,65	27,485	0,23334524	27,85	27,895	0,06363961
	Ronaldo	27,32			27,94		
	Romeo	25,67	25,54	0,18384776	25,93	25,86	0,09899495
	Romeo	25,41			25,79		
	Dodo	26,17	26,085	0,12020815	26,78	26,675	0,14849242
Dodo	26			26,57			
immunisierte Eber	Eddy	29,13	29,635	0,71417785	30,84	30,87	0,04242641
	Eddy	30,14			30,9		
	Esra	30,29	30,295	0,00707107	30	30,06	0,08485281
	Esra	30,3			30,12		
	Zorro	26,66	26,685	0,03535534	25,81	25,645	0,23334524
	Zorro	26,71			25,48		
	Zunder	27,08	26,51	0,80610173	26,43	26,42	0,01414214
	Zunder	25,94			26,41		
	Racker	25,25	25,145	0,14849242	24,88	24,59	0,41012193
	Racker	25,04			24,3		
	Rubens	24,3	24,3	0,02828427	23,53	23,43	0,14142136
	Rubens	24,34			23,33		
	Karl	25,49	25,49	0,09899495	26,11	25,495	0,86974134
	Karl	25,35			24,88		
	Knut	25,57	25,405	0,23334524	26,49	26,175	0,44547727
	Knut	25,24			25,86		
	Duplo	26,01	25,86	0,21213203	24,63	24,71	0,11313708
Duplo	25,71			24,79			
17β-Estradiol-infundierte, immunisierte Eber	Zimt	27,06	26,61	0,6363961	25,66	25,81	0,21213203
	Zimt	26,16			25,96		
	Zottel	26,63	26,59	0,05656854	26,05	25,885	0,23334524
	Zottel	26,55			25,72		
	Egon	26,26	26,29	0,04242641	25,29	25,41	0,16970563
	Egon	26,32			25,53		
	Etzel	29,71	29,865	0,2192031	29,43	29,38	0,07071068
	Etzel	30,02			29,33		
	Enzo	26,68	26,74	0,08485281	26,94	26,92	0,02828427
Enzo	26,8			26,9			

**Tab. 11:** Die Unterschiede an Ct-Werten für die Zielsequenz und das Referenzgen (Normalisierung auf das House-keeping Gene).

Gruppe	Eber	Gen-Expression $\Delta$ Ct-Wert				
		ER-alpha	ER-beta	LHR	AR	FSHR
intakte Eber	Zentis	5,33	11,14	1,31	3,49	4,37
	Ernesto	5,85	11,34	3,87	3,38	1,56
	Ernie	5,87	11,54	1,07	3,66	4,11
	Elba	5,49	9,40	2,20	2,43	2,16
	Edwin	6,75	12,43	1,91	3,90	3,97
	Rudi	5,97	11,93	2,75	4,04	4,42
	Ronaldo	5,60	11,90	2,05	3,68	4,09
	Romeo	4,76	11,22	3,25	3,21	3,53
	Dodo	6,23	12,86	0,72	3,75	4,34
immunisierte Eber	Eddy	5,47	10,65	1,23	2,56	3,80
	Esra	5,61	10,66	3,49	2,18	1,95
	Zorro	6,20	12,49	3,45	3,90	2,86
	Zunder	5,10	10,85	2,17	3,00	2,91
	Racker	6,07	10,70	3,37	3,16	2,61
	Rubens	5,41	9,86	2,81	2,12	1,25
	Karl	4,49	10,45	2,41	2,36	2,37
	Knut	4,89	10,11	2,09	2,15	2,92
	Duplo	6,23	11,80	2,44	3,23	2,08
17 $\beta$ - Estradiol- infundierte, immunisierte Eber	Zimt	4,70	9,89	2,07	2,48	1,68
	Zottel	4,47	10,27	1,60	2,01	1,30
	Egon	4,93	10,12	2,40	2,42	1,54
	Etzel	4,65	10,13	3,20	3,26	2,78
	Enzo	6,08	12,18	1,62	3,64	3,82

**Tab.12:** Mittels Real Time PCR untersuchte Hodengewebe mit Angabe des  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wertes (Normalisierung auf den Kalibrator).

Gruppe	Eber	$\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert				
		ER-alpha	ER-beta	LHR	AR	FSHR
intakte Eber	Zentis	-1,43	-1,73	-2,56	-0,55	<b>0,00</b>
	Ernesto	-0,90	-1,52	<b>0,00</b>	-0,66	-2,81
	Ernie	-0,88	-1,32	-2,80	-0,38	-0,26
	Elba	-1,26	-3,47	-1,67	-1,61	-2,21
	Edwin	<b>0,00</b>	-0,43	-1,96	-0,14	-0,40
	Rudi	-0,78	-0,93	-1,12	<b>0,00</b>	0,05
	Ronaldo	-1,16	-0,96	-1,82	-0,36	-0,28
	Romeo	-1,99	-1,65	-0,62	-0,83	-0,84
	Dodo	-0,52	<b>0,00</b>	-3,15	-0,29	-0,03
immunisierte Eber	Eddy	-1,29	-2,22	-2,64	-1,48	-0,57
	Esra	-1,15	-2,21	-0,38	-1,86	-2,42
	Zorro	-0,56	-0,38	-0,42	-0,13	-1,51
	Zunder	-1,65	-2,01	-1,70	-1,04	-1,46
	Racker	-0,68	-2,16	-0,50	-0,88	-1,76
	Rubens	-1,34	-3,01	-1,06	-1,92	-3,12
	Karl	-2,27	-2,42	-1,46	-1,68	-2,00
	Knut	-1,86	-2,75	-1,78	-1,89	-1,45
	Duplo	-0,52	-1,07	-1,43	-0,81	-2,29
17 $\beta$ -Estradiol-infundierte, immunisierte Eber	Zimt	-2,06	-2,97	-1,80	-1,56	-2,69
	Zottel	-2,29	-2,59	-2,27	-2,03	-3,07
	Egon	-1,83	-2,74	-1,47	-1,62	-2,83
	Etzel	-2,11	-2,74	-0,67	-0,77	-1,59
	Enzo	-0,67	-0,68	-2,25	-0,40	-0,55

\* Die Probe bei der die Expression am niedrigsten ist, ist die Probe mit dem höchsten  $\Delta\text{Ct}$ -Wert und wird als Kalibrator bezeichnet.

**Tab.13:** Mittels Real Time PCR untersuchte Hodengewebe mit Angabe der relativen Genexpression (RGE).

Gruppe	Eber	RGE				
		ER-alpha	ER-beta	LHR	AR	FSHR
intakte Eber	Zentis	2,685	3,306	5,897	1,459	1,000
	Ernesto	1,866	2,868	1,000	1,580	7,013
	Ernie	1,840	2,497	6,964	1,301	1,197
	Elba	2,395	11,043	3,182	3,053	4,627
	Edwin	1,000	1,347	3,877	1,102	1,315
	Rudi	1,711	1,905	2,173	1,000	0,966
	Ronaldo	2,227	1,945	3,519	1,283	1,214
	Romeo	3,972	3,127	1,537	1,778	1,790
	Dodo	1,439	1,000	8,846	1,223	1,021
immunisierte Eber	Eddy	2,437	4,643	6,212	2,780	1,485
	Esra	2,211	4,611	1,301	3,618	5,352
	Zorro	1,469	1,297	1,333	1,098	2,838
	Zunder	3,138	4,028	3,238	2,049	2,742
	Racker	1,608	4,469	1,414	1,834	3,387
	Rubens	2,532	8,028	2,078	3,784	8,694
	Karl	4,807	5,333	2,751	3,193	4,000
	Knut	3,630	6,727	3,422	3,694	2,723
	Duplo	1,434	2,092	2,685	1,747	4,874
17β-Estradiol-infundierte, immunisierte Eber	Zimt	4,155	7,835	3,470	2,949	6,453
	Zottel	4,874	6,021	4,823	4,084	8,369
	Egon	3,543	6,681	2,761	3,074	7,111
	Etzel	4,302	6,658	1,586	1,711	3,010
	Enzo	1,591	1,602	4,757	1,315	1,459

## Anhang

**Tab.14:** Mittels Real Time PCR untersuchte Hodengewebe mit Angabe des Mwt = arithmetischen Mittelwertes, STBW = Standardabweichung, geometrischen Mittelwertes und SF = Streufaktors.

Tiergruppe	ER- $\alpha$	ER- $\beta$	RGE LHR	AR	FSHR
Mwt					
intakte Eber	2,1262	3,2265	4,1106	1,5310	2,2381
immunisierte Eber	2,5851	4,5809	2,7150	2,6441	4,0104
17 $\beta$ -Estradiol-infundierte, immunisierte Eber	3,6930	5,7594	3,4793	2,6265	5,2804
STBW					
intakte Eber	0,8563	3,0341	2,6239	0,6183	2,1307
immunisierte Eber	1,1193	2,0723	1,5415	0,9921	2,1181
17 $\beta$ -Estradiol-infundierte, immunisierte Eber	1,2668	2,4144	1,3730	1,1165	2,9163
logarithmierte Daten					
Mwt					
intakte Eber	0,2980	0,4012	0,5246	0,1611	0,2266
immunisierte Eber	0,3781	0,6087	0,3793	0,3900	0,5539
17 $\beta$ -Estradiol-infundierte, immunisierte Eber	0,5382	0,7053	0,5084	0,3841	0,6454
STBW					
intakte Eber	0,1700	0,2958	0,3102	0,1434	0,3138
immunisierte Eber	0,1818	0,2466	0,2263	0,1861	0,2190
17 $\beta$ -Estradiol-infundierte, immunisierte Eber	0,1945	0,2828	0,1998	0,2016	0,4648
geometrischer Mwt					
intakte Eber	1,9862	2,5189	3,3468	1,4489	1,6850
immunisierte Eber	2,3885	4,0621	2,3950	2,4547	3,5801
17 $\beta$ -Estradiol-infundierte, immunisierte Eber	3,4534	5,0736	3,2243	2,4217	4,4199
SF					
intakte Eber	1,4792	1,9761	2,0425	1,3912	2,0595
immunisierte Eber	1,5198	1,7645	1,6838	1,5351	1,6558
17 $\beta$ -Estradiol-infundierte, immunisierte Eber	1,5650	1,9179	1,5842	1,5909	2,9163
Fehlerbalken					
nach oben " + "					
intakte Eber	0,9518	2,4588	3,4891	0,5669	1,7853
immunisierte Eber	1,2416	3,1053	1,6376	1,3136	2,3478
17 $\beta$ -Estradiol-infundierte, immunisierte Eber	1,9511	4,6571	1,8836	1,4309	8,4696
nach unten " - "					
intakte Eber	0,6434	1,2442	1,7082	0,4075	0,8669
immunisierte Eber	0,8169	1,7599	0,9726	0,8557	1,4179
17 $\beta$ -Estradiol-infundierte, immunisierte Eber	1,2467	2,4282	1,1890	0,8994	2,9043



## 11 Bezugsquellen

### 11.1 Substanzen und Reagenzien

Aceton	Roth, Karlsruhe
Agarose	Bioline, Luckenwalde
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ampicillin (2,5 mg)	Stratagene, Heidelberg
APTEX	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
$\beta$ -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Fluka Chemie, Schweiz
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Dextransulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
DIG-dUTP (PCR-DIG-Labeling-Mix 10x)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
DNA-Größenstandard („100bp DNA-Ladder“)	Peqlab, Biotechnologie GmbH, Erlangen Frankfurt
DNA-Purifikationssystem QIAEX II	Qiagen GmbH, Hilden
DNA-Ligase	Promega, Mannheim
DNase I (10U/ $\mu$ l)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Eisessig	Merck, Darmstadt

## Bezugsquellen

---

Eosin	Shandon, Frankfurt
Ethanol vergäht	Schmitt, Dillenburg
Ethanol rein	Merk, Darmstadt
Ethidiumbromid 1 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ficoll 400	Serva, Heidelberg
Formamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Formalin 35%ig	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
FrameSeal Slide Chambers 65	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Glyceringelatine	Merk, Darmstadt
Glycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Hämalaun	Shandon, Frankfurt
HCl	Merck, Haar
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Bioline, Luckenwalde
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
LB-Medium	Q Biogene, USA
LB-Agar-Medium	Q Biogene, USA
Levamisol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ligase-Puffer	Promega, Mannheim
Lithiumchlorid-Lösung (LiCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )-Lösung	Serva, Heidelberg
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Milchhof, Marburg
MgCl <sub>2</sub> -Lösung	Promega, Mannheim
Natriumcitrat (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> Na <sub>3</sub> x 2H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

## Bezugsquellen

---

Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Haar
NBT/BCIP (Phosphatase Substrat)	KPL, Wedel
Oligo-Primer	MWG Biotech AG, Ebersberg
Parafin	Vogel, Giessen
Paraformaldehyd	Merck, Haar
pGEM-T Vektor	Promega, Mannheim
Phosphate buffered saline (PBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Pikrinsäurelösung	Riedel-de Haen, Seelze
TaqMan <sup>®</sup> qPCR Mastermix	Eurogentec Deutschland GmbH, Köln
Restriktionsenzyme (Not-I, Nco-I)	New England Biolabs, Frankfurt
RNAse-AWAY Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
RNAse-Inhibitor (40U/μl)	MBI Fermentas, Mannheim
rTth DNA Polymerase and EZ Buffer Pack	Applied Biosystem, Applied Deutschland GmbH, Darmstadt
RNA-Polymerasen (T7 und SP-6)	Promega, Mannheim
Sensiscript <sup>®</sup> RT Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Salmon-sperm-DNA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Sybr <sup>®</sup> Green	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tag DNA-Polymerase Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Tetracyclin (1,5 mg)	Stratagene, Heidelberg
Tris-HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Triton	Merck, Darmstadt
TRIzol <sup>®</sup>	Invitrogen, Karlsruhe
Vitro-Clud	Langenbrinck, Emmendingen.

X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galaktosidase)	Invitrogen, Karlsruhe
Xylol	Roth, Karlsruhe
Yeast-t-RNA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
<b>11.2 Geräte</b>	
ABI PRISM™ 5700 Sequence Detection Systems	Applied Biosystems, Foster City, CA
Autoklav	MAGV, Rabenau-Londorf
Brutschrank	Memmert, Schwabach
Bio Photometer	Ependorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Einbettgerät Leica EG 1160	Leica, Bensheim
Entwässerungsgerät Leica TP 1050	Leica, Bensheim
Feuchte Kammer	Kreatech Diagnostics, Amsterdam, Niederlande
Flachgel-Elektrophoresekammer „Midi“ 100x150 mm	Keutz Labortechnik GmbH, Reiskirchen
Color Video Camera 3-CCD, KY-F55B	JVC Friedberg
Gießkammer für Flachgel-Elektrophoresekammer „Midi“ 100x150 mm	Keutz Labortechnik GmbH, Reiskirchen
Gießkammer für Hoefer® HE 33 Mini	Pharmacia Biotech
Horizontal Submarine Unit 7x10 cm	Freiburg
Gefriermikrotom 2800 Frigocut	Reichert und Jung, Nussloch
Heizplatte	MAGV, Rabenau-Londorf
Hoefer® HE 33 Mini Horizontal Submarine Unit Elektrophoresekammer 7x10cm	Pharmacia Biotech, Freiburg
Lichtmikroskop Leica DM LB	Leica, Wetzlar
Scanner AV630	Avision Inc, Taiwan
Schlittenmikrotom Leica SM 2000 R	Leica, Bernsheim
Sterilisator Heraeus	MAGV, Rabenau-Londorf
PowerPac 200 Power Supply	Bio-Rad, München
Trockenschrank	Memmert, Schwabach

T3 Thermocycler Biometra®	(biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
Termal Cycler DNA Engine®	Bio-RadLaboratories GmbH München
Ultra-Turrax® T8 mit Dispergierwerkzeug S8 N-5G	KA Labortechnik, Staufen
UV Belichter Biostep	Biostep® GmbH, Jahnsdorf
Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomat	Leica, Bensheim
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifuge	MIKRO 22R; Hettich, Tuttlingen
<b>11.3 Sonstige Materialien</b>	
DAKO-Pen	DAKO-Hamburg
Gewebeklebe Mittel Tissue-Tek®	OCT Compound; Sakura, Torrence, USA
Einmalküvetten (Eppendorf UVetten®)	Eppendorf, Hamburg
Escherichia coli, Eco XL-1 Blue	Stratagene, Heidelberg
Fiterpapiere; Whatman 3MM	Whatman GmbH, Rothenburg
Mikrozentrifugenröhrchen	Palm Microlaser technologies, Benried
Mikroreaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Palm® Membrane Slides	Palm Microlaser technologies, Benried
Peristaltikpumpe	Niki V4, Fa. CME Ltd., Caesarea Medical Electronic, Israel
Porzellanschalen, Pinzetten, Pipettenspitzen	Ratiolab, Dreieich
PCR-Tubes	Axygen Scientific Inc., Union Citi, USA
Pipettenspitzen, gestopft	Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf
Polaroid-Sofortbildfilme Typ 667	Polaroid, Offenbach

SuperFrost-OT	Langenbrinck, Emmendingen
SuperFrost-OT Plus	VWR International GmbH, Darmstadt
Spatel	Ratiolab, Dreieich
TC II Reaction PLT, 96 Well, Barcode Kit	Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH
<b>11.4 Software</b>	
Biddatenbank DHS, V 5.5	Dietermann & Heuser Solution GmbH, Greifenstein Beilstein
Palm <sup>®</sup> Robo Software	Palm Microlaser Technologies, Benried

## 12 Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABP	<b>Androgen-bindendes Protein</b>
Aqua bidest	Zweifach destilliertes Wasser
Aqua dest	Einfach destilliertes Wasser
AR	<b>Androgenrezeptor</b>
$\beta$ -Act	<b>beta Aktin</b> (House-keeping Gene)
bp	<b>Basenpaare</b>
BSA	<b>Bovines Serumalbumin</b>
bzw.	<b>beziehungsweise</b>
ca.	Circa
cDNA	Copy-DNA
DEPC	<b>Diethylpyrocarbonat</b>
d.h.	<b>das heißt</b>
DNA (DNS)	<b>Desoxyribonukleinsäure</b>
DNase	<b>Desoxyribonuklease</b>
dNTP	<b>desoxy-Ribonucleosidtriphosphat</b>
DTT	<b>Dithiothreitol</b>
EDTA	<b>Ethylendiamintetraessigsäure</b>
ER- $\alpha$	<b>Estrogenrezeptor alpha</b>
ER- $\beta$	<b>Estrogenrezeptor beta</b>
EtBr	<b>Ethidiumbromid</b>
FSH	<b>Follikel-Stimulierendes-Hormon</b>
FSHR	<b>Follikel-Stimulierendes-Hormonrezeptor</b>
GAPDH	<b>Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase</b>
GnRH	<b>Gonadotropin Releasing Hormone</b>
g	<b>Gramm</b>
x g	g-Zahl (Erdbeschleunigung)
h	Stunde ( <b>hour</b> )
HCl	Salzsäure
HE	<b>Hämatoxylin-Eosin</b>
ISH	<b>In situ Hybridisierung</b>
kb	<b>Kilobasenpaare</b> (1000bp)

## Verzeichnis der Abkürzungen

---

KCl	<b>K</b> aliumchlorid
l	<b>L</b> iter
LH	<b>L</b> uteinisierendes <b>H</b> ormon
LHR	<b>L</b> uteinisierendes <b>H</b> ormonrezeptor
M	<b>M</b> olar
mA	<b>M</b> illiampere
M/g	<b>Mol/g</b> ramm
mg	<b>M</b> illigramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MJ ME	<b>M</b> egajoule <b>metabolizable energy</b>
ml	<b>M</b> ililiter
mM	<b>M</b> ilimolar
MnCl <sub>2</sub>	<b>M</b> anganchlorid
mRNA	Boten ( <b>m</b> essenger)-RNA
MW (MG)	<b>M</b> olekulargewicht
NaCl	<b>N</b> atriumchlorid
NaOAc	<b>N</b> atriumacetat
NaOH	<b>N</b> atronlauge
NCBI	<b>N</b> ational <b>c</b> enter for <b>b</b> io <b>t</b> echnology <b>i</b> nformation
ng	<b>N</b> anogramm
nm	<b>N</b> anometer
NTB	Nitroblautetrazoliumchlorid
OT	<b>O</b> bjektträger
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung („ <b>P</b> hosphate <b>b</b> uffered <b>s</b> aline“)
PCR	Polymerasekettenreaktion („ <b>P</b> olymerase <b>c</b> hain <b>r</b> eaction“)
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-konzentration
RNA (RNS)	<b>R</b> ibonukleinsäure
RNase	<b>R</b> ibonuklease
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	<b>R</b> aum <b>t</b> emperatur
RT-PCR	<b>R</b> everse <b>T</b> ranskriptase <b>P</b> olymerase <b>K</b> ettenreaktion



## Verzeichnis der Abkürzungen

---

s.o.	<b>s</b> iehe <b>o</b> ben
Tab.	Tabelle
TNMT	<b>T</b> ris- <b>N</b> atriumchlorid- <b>M</b> agnesiumchlorid- <b>T</b> riton-Base
Tris	<b>T</b> ris-(hydroxymethyl)-aminomethan
SSC	<b>S</b> tandard <b>S</b> aline <b>C</b> itrate
U	Enzymeinheiten ( <b>U</b> nit)
ÜN	<b>Ü</b> ber <b>N</b> acht
UV	<b>U</b> ltraviolett
UV-LACP	<b>U</b> ltraviolett-Laser <b>a</b> ssisted <b>c</b> ell- <b>p</b> icking
V	<b>V</b> olt
W	<b>W</b> att
z.B.	<b>z</b> um <b>B</b> eispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

### 13 Publikationsverzeichnis

#### Artikel

Lekhkota O, Brehm R, Claus R, Wagner A, Bohle RM, Bergmann M 2006 Cellular localization of the estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) and estrogen receptor beta (ER $\beta$ ) in the boar testis. *Histochemistry and Cell Biology* 125: 259-264

Wagner A, Messe N, Bergmann M, Lekhkota O, Claus R 2006 Effects of estradiol infusion in GnRH immunized boars on spermatogenesis. *Journal of Andrology* 27: 880-889

Claus R, Lacorn M, Welter H, Lekhkota O, Messe N, Wagner A, Bergmann M Expression of 11 $\beta$ -hydroxysteroid-dehydrogenase 2 in Sertoli cells of boar testes as a possible pre-receptor regulator of glucocorticoid effects on spermatogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* (im Druck)

#### Vorträge

Lekhkota O, Claus R, Wagner A, Bergmann M Zelluläre Lokalisation von Östrogen Rezeptor alpha (ER $\alpha$ ) und Östrogen Rezeptor beta (ER $\beta$ ) beim Schwein. *Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft*, 50. Elsevier Urban & Fischer Verlag Jena. 100. Versammlung der Anatomischen Gesellschaft, Leipzig, März 2005

**Poster**

Lekhkota O, Wagner A, Bohle RM, Claus R, Bergmann M Cellular localization of estrogen alpha expression in boar spermatogenesis. Proceedings 3rd European Congress of Andrology, Münster, September 2004

Lekhkota O, Wagner A, Messe N, Bohle RM, Claus R, Bergmann M Expression of ER $\alpha$  and ER $\beta$  in normal, GnRH immunized and steroid treated boars. Reproduction in Domestic Animals 41 (Suppl. 1), 22. Blackwell Verlag, Berlin. 39th Annual Conference of Physiology and Pathology of Reproduction and 31th Mutual Conference on Veterinary and Human Reproductive Medicine, Hannover, February 2006

Lekhkota O, Bergmann M Expression und zelluläre Lokalisation des Östrogenrezeptors-alpha (ER- $\alpha$ ) in den Hoden verschiedener Säuger. Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie (4) 243, Krause & Pachernegg GmbH Verlag, Gablitz Österreich. 26.Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Reproduktionsmedizin, Regensburg, Oktober 2006.

Lekhkota O, Bergmann M Expression and cellular localization of estrogenrezeptor alpha (ER- $\alpha$ ) mRNA in the testis of different mammals. Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft. 102. Versammlung der Anatomischen Gesellschaft, Giessen, März 2007

---

## Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. M. Bergmann, möchte ich danken für das mir entgegengebrachte Vertrauen beim Überlassen des Themas, für seine Unterstützung beim wissenschaftlichen Arbeiten und Erstellen dieser Dissertation, für seine Ratschläge und das in jeder Hinsicht gezeigte Verständnis und seine Geduld. Desweiteren bedanke ich mich für die Möglichkeit zur Teilnahme an diversen Kongressen, die mich in meiner Arbeit sehr motiviert haben.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. habil. R. Claus aus dem Institut für Tierhaltung und Tierzucht Universität Hohenheim möchte ich mich für die ausgezeichnete Kooperation, insbesondere für die Gewebeproben bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Schmitz für seine Hilfsbereitschaft.

Herrn Dr. K. Failing danke ich für seine umfangreiche Unterstützung bei der statistischen Bearbeitung der gewonnenen Daten.

Frau Dr. Anja Taubert aus dem Institut für Parasitologie danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der quantitativen Real Time PCR.

Bei Frau Gerlinde Erhardt, Anne Hild, Alexandra Hax, und Jutta Dern-Wieloch, bedanke ich mich herzlich für ihre Hilfestellungen im Labor.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie, vor allem Dr. R. Brehm, V. Sonnack, S. Hartmann, V. Kowalewski, M. Zeiler und C. Rüttinger, möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die jederzeit freundliche Unterstützung danken.

Dieses Projekt wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt, ohne die die Durchführung sicherlich nicht in diesem Ausmaß möglich gewesen wäre, so dass ich an dieser Stelle auch hierfür ein herzliches Dankeschön ausspreche.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern, meinem Bruder und meinem Ehemann Markus danken, die durch ihre liebevolle und moralische Unterstützung ganz entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und niemals Zweifel an meinem Gelingen aufkommen ließen.

Я дякую моїй сім'ї за постійну моральну підтримку в період виконання цієї роботи.

---

## **Erklärung**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Giessen, den 30 April

Oksana Lekhkota

édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5175-0



9 783835 195175 4

