

STADIENSPEZIFISCHE mRNA-EXPRESSION
DER KERNPROTEINE PROTAMIN UND
TRANSITIONSPROTEIN IM VERLAUF
DER SPERMATOGENESE BEIM HENGST

KATJA KRETZER

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 2011

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.

1st Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

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

Betreuer: Prof. Dr. M. Bergmann

**Stadienspezifische mRNA-Expression
der Kernproteine Protamin und Transitionsprotein
im Verlauf der Spermatogenese beim Hengst**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorgrades
im Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Katja Kretzer
Tierärztin aus Husum

Gießen 2011

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

Dekan:

Prof. Dr. Dr. h. c. M. Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. M. Bergmann

Prof. Dr. A. Wehrend

Tag der Disputation:

02.12.2011

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	10
2. Literaturübersicht.....	12
2.1 Einleitung der Literaturübersicht.....	12
2.2 Spermatogenese.....	15
2.2.1 Ort der Spermatogenese: Anatomische und endokrinologische Grundlagen.....	15
2.2.2 Keimzellendifferenzierung und Spermatogenesestadien.....	17
2.2.3 Kinetik der Spermatogenese.....	19
2.2.4 Hormonelle Regulation der Spermatogenese beim Pferd.....	21
2.2.5 Pubertät und Spermatogenese beim Pferd.....	22
2.2.6 Saisonale Beeinflussung der reproduktiven Vorgänge beim Hengst.....	23
2.3 Kryptorchismus.....	24
2.4 Kernproteine (Zellkernproteine).....	25
2.5 Transitionsproteine.....	26
2.5.1 Zusammensetzung.....	28
2.5.1.1 Transitionsprotein 1.....	28
2.5.1.2 Transitionsprotein 2.....	28
2.5.1.3 Weitere Transitionsproteine.....	29
2.5.2 Funktionen und Interaktionen der Transitionsproteine.....	30
2.5.2.1 Transitionsprotein 1.....	30
2.5.2.2 Transitionsprotein 2.....	31
2.5.2.3 Transitionsprotein 3 und Transitionsprotein 4.....	32
2.5.3 Austausch der Histone gegen die Transitionsproteine.....	33
2.6 Protamine.....	35
2.6.1 Historie.....	35
2.6.2 Zusammensetzung.....	37
2.6.2.1 Protamin 1 (Prm1) und seine Struktur.....	37

2.6.2.2 Protamin 2 (Prm2) und seine Struktur.....	38
2.6.3 Interaktionen der Protamine.....	39
2.6.3.1 Interaktionen zwischen DNA und Protaminen.....	39
2.6.3.2 Intermolekulare Interaktionen der Protamine.....	45
2.6.3.3 Tertiärstruktur und räumliche Anordnung der Protamin-DNA-Komplexe im Spermienzellkern.....	48
2.6.4 Funktion und Bedeutung der Protamine für das Spermium.....	56
2.7 Stadienspezifische Transkription und Expression von Protaminen und Transitionsproteinen.....	60
2.8 Homologien.....	62
2.8.1 Transitionsprotein 1.....	62
2.8.2 Transitionsprotein 2.....	62
2.8.3 Protamin 1.....	62
2.8.4 Protamin 2.....	63
3. Material und Methoden.....	64
3.1 Materialgewinnung.....	64
3.2 Fixierung des Hodengewebes.....	64
3.3 Einbettung und Schnittherstellung.....	65
3.3.1 Einbettung in Paraffin.....	65
3.3.2 Beschichtung der Objektträger.....	65
3.3.3 Herstellung der Paraffinschnitte.....	66
3.4 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung.....	66
3.4.1 Durchführung.....	66
3.4.2 Kriterien für die Bewertung der HE-Färbung.....	67
3.4.2.1 Lichtmikroskopische Kriterien für die Zuordnung zu Gruppe 1.....	68
3.4.2.2 Lichtmikroskopische Kriterien für die Zuordnung zu Gruppe 2.....	68
3.4.2.3 Lichtmikroskopische Kriterien für die Zuordnung zu Gruppe 3.....	68
3.4.2.4 Lichtmikroskopische Kriterien für die Zuordnung zu Gruppe 4.....	69
3.5 Reverse Transkription (RT) Polymerase Chain Reaction (PCR).....	70
3.5.1 Extraktion von RNA aus Kryomaterial.....	70

3.5.2 Erste-Strang-Synthese (cDNA).....	72
3.5.3 PCR.....	73
3.5.4 Agarose-Gel-Elektrophorese.....	74
3.6 In-Situ-Hybridisierung (ISH).....	76
3.6.1 Protokoll.....	76
3.6.2 Kriterien für die Bewertung der ISH.....	81
4. Ergebnisse	82
4.1 Übersicht über das untersuchte Hodenmaterial.....	82
4.1.1 Altersverteilung der Hengste.....	82
4.1.2 Anamnestische Einteilung des untersuchten Hodenmaterials	82
4.2 Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung.....	83
4.2.1 Auswertung der Hamatoxylin-Eosin-Färbung.....	83
4.2.2 Dokumentation der HE-Färbungen.....	85
4.3 RT-PCR.....	89
4.4 In-Situ-Hybridisierung.....	90
4.4.1 Auswertung für Transitionprotein 1-mRNA (Tp1-mRNA).....	90
4.4.1.1 Tp1-mRNA-Expression in juvenilem Hodengewebe (Gruppe 1).....	90
4.4.1.2 Tp1-mRNA-Expression in Hodengewebe mit normaler Spermatogenese (Gruppe 2).....	90
4.4.1.2.1 Dokumentation der Tp1-mRNA-Expression in normalem Hodengewebe.....	90
4.4.1.2.2 Zusammenfassung der Tp1-mRNA-Expression in normalem Hodengeweb.....	94
4.4.1.3 Tp1-mRNA-Expression in Hodengewebe mit unvollständiger Spermatogenese (Gruppe 3).....	95
4.4.1.4 Tp1-mRNA-Expression in Hodengewebe ohne Spermatogenese (Gruppe 4).....	95
4.4.2 Auswertung für Transitionsprotein 2-mRNA.....	95
4.4.3 Auswertung für Protamin1-mRNA (Pr1-mRNA).....	96
4.4.3.1 Pr1-mRNA-Expression in juvenilem Hodengewebe (Gruppe 1).....	96
4.4.3.2 Pr1-mRNA-Expression in Hodengewebe mit normaler Spermatogenese (Gruppe 2).....	96
4.4.3.2.1 Dokumentation der Pr1-mRNA-Expression innerhalb einer normalen	

Spermatogenese.....	96
4.4.3.2.2. Zusammenfassung der Pr1-mRNA-Expression innerhalb einer normalen Spermatogenese.....	100
4.4.3.3 Pr1-mRNA-Expression in Hodengewebe mit unvollständiger Spermatogenese (Gruppe 3).....	100
4.4.3.4 Pr1-mRNA-Expression in Hodengewebe ohne Spermatogenese (Gruppe 4).....	101
4.4.4 Auswertung für Protamin2-mRNA (Pr2-m-RNA).....	101
4.4.4.1 Pr2-mRNA-Expression in juvenilem Hodengewebe (Gruppe 1).....	101
4.4.4.2 Pr2-mRNA-Expression in Hodengewebe mit normaler Spermatogenese (Gruppe 2).....	101
4.4.4.2.1 Dokumentation der Pr2-mRNA-Expression innerhalb einer normalen Spermatogenese.....	102
4.4.4.2.2 Zusammenfassung der Pr2-mRNA-Expression innerhalb einer normalen Spermatogenese.....	105
4.4.4.3 Pr2-mRNA-Expression in Hodengewebe mit unvollständiger Spermatogenese (Gruppe 3).....	105
4.4.4.4 Pr2-mRNA-Expression in Hodengewebe ohne Spermatogenese (Gruppe 4).....	106
4.4.4.5 Besonderheiten der Tp1-mRNA-Expression innerhalb verschiedener Altersgruppen.....	107
4.4.4.6 Vergleich der stadienspezifischen mRNA-Expression von Pr1 und Pr2.....	108
4.4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der ISH.....	110
5. Diskussion.....	111
5.1 Histologischen Beurteilung.....	111
5.2 RT-PCR.....	112
5.3 In-Situ-Hybridisierung.....	112
5.3.1 Übersicht.....	112
5.3.2 Transitionsproteine.....	112
5.3.3 Protamine.....	115
5.3.4 Diskussion der Methode der ISH.....	117
5.4 Regulation der stadienspezifischen Expression der Kernproteine.....	117

6. Zusammenfassung.....	119
7. Summary.....	121
8. Literaturverzeichnis.....	123
9. Bezugquellen.....	151
9.1 Stoffe, Reagenzien, Arbeitsmaterialien.....	151
9.2 Sonden und Primer.....	153
9.3 Geräte und Zubehör.....	153
9.4 Stamm-, Puffer- und andere herzustellende Lösungen.....	154
10. Verzeichnis der Abkürzungen.....	158
11. Danksagung.....	161
12. Erklärung.....	163

1. Einleitung und Fragestellung

Im Verlauf der Spermatogenese vollziehen sich an den Keimzellen – von der Stammspermatogonie bis zu den maturen, elongierten Spermatischen – einige deutliche morphologische Veränderungen, die vor allem mit einer starken Kernkondensierung einhergehen. Dies hat zur Folge, dass die Säugetier-DNA in den Spermienzellen sechsfach stärker komprimiert ist, als die DNA in somatischen Zellen und somit als die am stärksten kondensierte Nukleinsäure in Eukaryoten-Zellen angesprochen werden kann. Sinn der morphologischen Veränderung ist, das männliche Genom für die Fertilisation in eine inaktive, inerte, gegen äußere Einflüsse resistere Form zu bringen und durch die Kompaktierung die Motilität und Mobilität der Spermienzelle zu verbessern.

Verantwortlich für diesen Prozess ist der Austausch der üblichen nukleohistonischen DNA-Struktur gegen einen DNA-Protamin-Komplex. Der Histon-Protamin-Austausch erfolgt nicht direkt, sondern über Transitionsproteine. Durch die Anlagerung der basischen Protamine an die DNA kommt es in erster Linie zu einer maximalen Kernkondensierung, wobei eine engere Zusammenlagerung der DNA-Stränge ermöglicht wird.

Den beiden spermien-spezifischen Kernproteinen werden, neben dem Austausch der nukleohistonischen Struktur, zusätzliche Funktionen, wie Reparation von single-strand-breaks der DNA, Repression/ Regulation der Transkription und Beteiligung an der Zellkernformation zugesprochen.

Das Expressionsmuster der Transitionsproteine und Protamine und der vorausgehenden mRNA-Expression ist spermatogenesestadien- und speziesspezifisch und wurde bereits für verschiedene Tierarten bestimmt.

Folgende Zielsetzung war Grundlage der vorliegenden Arbeit:

- Erstellung spermatogenesestadienspezifischer Expressionsmuster von Transitionsproteinen und Protaminen auf RNA (mRNA-) Ebene beim Pferd

- Betrachtung altersabhängiger Unterschiede der Expressionsmuster, insbesondere beim Übergang von juvenilen zu fertilen Hengsten oder Veränderung der Muster bei Spermatogenesedefekten.

Die folgenden Untersuchungen erfolgten auf mRNA-Ebene mittels InSitu-Hybridisierung (ISH) und Reverser Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).

2. Literaturübersicht

2.1 Einleitung

Die Kerngröße (Kernvolumen) steht zur Größe des Zelleibes (Zellvolumen) in direkter Beziehung (Kern-Plasma-Relation). Für jede Zellpopulation besteht ein charakteristisches Kern-Plasma-Verhältnis, das innerhalb variabler Grenzen liegt. Die Zellkerne von Spermien sind, trotz gleichem DNS-Gehalt, auffällig dicht und klein und ihr Stoffwechsel ist stark reduziert (Liebich 2003).

Im Endstadium der Spermatogenese finden im Verlauf der Spermiogenese (der Entwicklung von der haploiden Spermatide bis zum reifen Spermium) entscheidende morphologische und molekulare Veränderungen an der Keimzelle statt. Äußerlich entwickelt sich die runde Spermatide zum elongierten, reifen Spermium. Dies bedingt eine Kernkondensierung, Elongation und den Übergang des aktiven Genoms in eine inaktive, inerte Form. Die bis hierher für die DNA-Verpackung verantwortlichen Histone werden durch Protamine ersetzt, die letztendlich eine maximale Kernkondensierung durch entsprechende Lagerung der DNA-Moleküle ermöglichen. Bei Fischen und Vögeln scheint der Austausch der Histone gegen die Protamine direkt statt zu finden (OLIVIA und DIXON 1991). Beim Säugetier erfolgt dieser Austausch über sogenannte Transitionsproteine (MEISTRICH 1989).

POGANY et al. (1981) untersuchten den DNA- und Protein-Gehalt in den Spermienzellen der Maus. Sie finden mit verschiedenen Methoden und bei unterschiedlichen Mäuserassen heraus, dass der durchschnittliche DNA-Gehalt in einem Spermienkern 3,30 pg beträgt. BENCH et al. (1996) weiten diese Untersuchungen auf Rind, Pferd, Hamster, Maus und Mensch aus, erhalten Werte von 3,23-3,42 pg und gehen davon aus, dass sich für die untersuchten Tierarten nahezu identische DNA-Masse-Werte pro Spermienkern bestimmen lassen und minimale Unterschiede bei Untersuchung weiterer Populationen als nicht signifikant beurteilt

werden können. Vorausgegangene Studien von WYROBEK et al. (1976) legen Spermienzellkern-Volumina für verschiedene Rassen der Maus mit $4,01 \pm 0,03$ und $3,72 \pm 0,08 \mu\text{m}^3$ fest. Diese Volumenangaben sind lange Zeit ausschlaggebend für die Vorstellungen über eine mögliche DNA-Organisation im Spermienzellkern und führen zu der Überlegung, dass der in der untersuchten Säugetierzelle durchschnittlich bestimmte Gehalt von 3,3 pg B-DNA-Helix, verpackt in jeweils 200 bp enthaltende Nukleosome, ein Volumen von $15,5 \mu\text{m}^3$ benötigen würde. Selbst wenn die DNA in einzelne, dicht nebeneinander gelagerte Nukleosome ohne eine helikale Anordnung verpackt wäre, müsste ein Volumen von $9,9 \mu\text{m}^3$ zur Verfügung stehen (BALHORN 1982). Weiterhin untersuchen POGANY et al. (1981) das Volumen, das benötigt werden würde, wenn die DNA ohne weitere Proteine irgendeiner Art (vorausgesetzter Helix-Durchmesser $20,4 \text{ \AA} / 2\text{nm}$, Entfernung benachbarter Basen entlang der Helixachse $3,38 \text{ \AA} / 0,34 \text{ nm}$ und um 36° gegeneinander gedreht) vorläge und bestimmen hierfür ein Volumen von $4,06 \mu\text{m}^3$. WARD und COFFEY (1991) stellen die unterschiedlichen Verhältnisse DNA-Masse zu Zellkernvolumen bei somatischen- und Spermienzellkernen dar (Abb. 1).

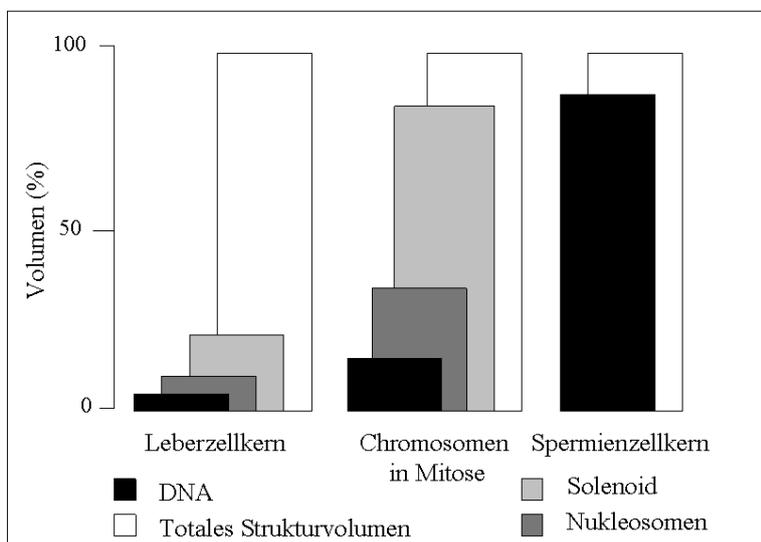


Abb. 1:
DNA-Verpackung in verschiedenen Kernstrukturen (modifiziert nach WARD und COFFEY, 1991)

ALLEN et al. (1991) korrigieren die bisherigen Annahmen über die Größenordnungen der Spermienzellkerne mittels Anwendung des Atomic-Force- Mikroskops an voll hydrierten Maus- und Rinderspermienzellkernen und geben Volumina an, die mehr als zweimal so groß

sind, wie die bisher angenommenen, was auch neue Vorstellungen des DNA-Packaging mit sich bringt.

Trotz unterschiedlicher Zellkerngrößenangaben und Vorstellungen über das DNA-Packaging, ist man sich dennoch einig, dass die DNA in Spermienzellen anders angeordnet sein muss, als in somatischen Zellen.

Interaktionen der basischen Kernproteine, d.h. der Transitionsproteine und Protamine mit der DNA, stellen hierfür aufgrund ihrer geringen räumlichen Ansprüche und hohen Basizität eine Alternative zu der Anordnung mittels Histonen dar.

2.2 Spermatogenese

2.2.1 Ort der Spermatogenese: anatomische und endokrinologische Grundlagen

Das Hodenparenchym wird durch die von der derben Hodenkapsel ausgehenden Septen in zahlreiche Hodenläppchen (Lobuli testis) unterteilt. Jeweils 2-5 samenbereitende Samenkanälchen von einer durchschnittlichen Länge von 50-80 cm und einem Durchmesser von 200-300 μm werden in einem Hodenläppchen eingeschlossen. Die Hodenkanälchen sind stark geschlängelt (Tubuli seminiferi convoluti), von lockerem Bindegewebe, Gefäß- und Nervenplexen, sowie interstitiellen Leydigzellen umgeben. Das Epithel der Tubuli seminiferi convoluti besteht aus germinativen Zellen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien und aus somatischen Stützzellen (Abb. 2). Es dient der Neubildung der männlichen Keimzellen. Bevor diese Tubuli in das zentral im Hoden gelegene Bindegewebe münden, strecken sie sich zu den kurzen, geraden Tubuli seminiferi recti, um dann von hier über Ausführungsgänge zum Nebenhoden weiter zu verlaufen (LIEBICH 2003).

Die Stützzellen, oder auch Sertolizellen genannt, sind hochprismatischen Zellen und sitzen mit einer breiten Basis der Basallamina auf, verlaufen mit ihren lateralen Ausläufern bis ins Lumen der Tubuli und machen beim Hengst 15-20% des gesamten germinativen Epithels aus (AMANN 1981). Ihre Funktionen sind vielfältig und von enormer Bedeutung für die Spermatogenese:

Sie bilden durch zahlreiche Zell-zu-Zell-Kontakte untereinander, sowie zu den Keimzellen, ein Stützgerüst, ermöglichen den transzellulären Stoffaustausch und damit die Ernährung der Keimzellen. Sie phagozytieren z.B. Zytoplasmareste reifer Spermatozyten, sezernieren verschiedene Proteine (Transferin-like-Protein, Inhibin, Activin, ABP), unterstützen die intraepitheliale Wanderung der Keimzellen sowie die Freigabe reifer Spermatozyten in das Tubuluslumen (Spermiation) und bilden die sogenannte Blut-Hoden-Schranke durch einen engen Verschluss benachbarter Sertoli-Zellen im basolateralen Zellbereich (LIEBICH 2003). Die Sertolizellen schotten die Keimzellen durch komplexe Interzellularkontakte ab dem Stadium der leptotänen primären Spermatozyte vom Blutmilieu ab, da diese Zellen Antigene auf ihrer

Oberfläche ausbilden, die vom körpereigenen Immunsystem als fremd erkannt werden und bei Beschädigung der Barriere eine Autoimmunreaktion hervorrufen können (BERGMANN 2006).

Die Funktionen der Sertolizelle werden durch das von der Adenohypophyse sezernierte follikelstimulierende Hormon (FSH) reguliert.

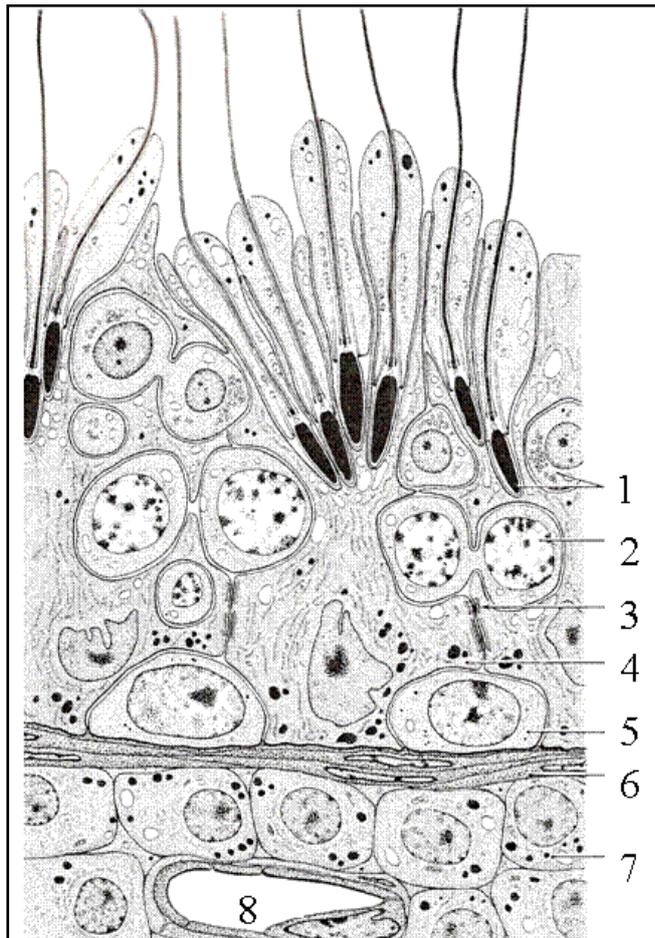


Abb. 2:

Germinatives Hodenepithel (nach PICKETT et al., 1989)

- | | |
|---|-----------------------|
| 1 | Spermatiden |
| 2 | Primäre Spermatozyten |
| 3 | Junktionaler Komplex |
| 4 | Sertolizelle |
| 5 | Spermatogonie |
| 6 | Basalmembran |
| 7 | Leydigzelle |
| 8 | Blutgefäß |

Die in Gruppen angeordneten Leydigzellen verlaufen außerhalb der Tubuli im interstitiellen Bindegewebe strangförmig und bilden beim adulten Hengst und Eber 20-30 % des gesamten Hodenvolumens. Unter der endogenen Stimulation des luteinisierenden Hormons (LH) werden diese Zellen zur Synthese von Testosteron angeregt. Testosteron beeinflusst in großem Maße die Spermatogenese und Spermienreifung. Im Interstitium um die Leydigzellen herum wurden extrem hohe Testosteronkonzentrationen von bis zu 640 ng/g nachgewiesen. Das Hormon gelangt in das Lumen der Tubuli seminiferi, so dass auch hier extrem hohe Konzent-

rationen erreicht werden, die laut einer Zusammenfassung von McKINNON und VOSS (1992) in Anlehnung an Studien bei anderen Tierarten, auch beim Pferd als essentiell für eine normale Spermatogenese angesehen werden könnten. Andererseits sind für das Pferd keine minimalen Testosteronkonzentrationen in den Tubuli seminiferi für den Ablauf einer normalen Spermatogenese bekannt.

In den Leydigzellen des Hengstes wurden noch größere Mengen an Östrogenen (Östron, Östradiol, Östriol Equilin und Equilenin) (RAESIDE 1969) als Testosteron nachgewiesen. Neuere Studien weisen darauf hin, dass auch in den Sertolizellen eine Östrogenproduktion statt findet. Die biologischen Funktionen der hohen Östrogenwerte beim Hengst, bzw. in seinem Seminalplasma sind bisher nicht eindeutig geklärt. Diskutiert werden Mitwirken an dem hormonellen Regelkreis der Spermatogenese oder Auswirkungen auf den Uterus nach der Insemination (SIPAHUTAR et al. 2003).

2.2.2 Keimzellendifferenzierung und Spermatogenesestadien

Der Begriff Spermatogenese umfasst den gesamten Prozess der Keimzellbildung von der Stammzelle bis zum reifen Spermium. Innerhalb des Keimepithels verläuft die Spermatogenese von der Wand des Keimtubulus (basal) zum Lumen (adluminal). Es können drei Phasen der Keimzellbildung unterschieden werden: 1. mitotische Proliferation und Differenzierung (Spermatogonien), 2. meiotische Reifeteilungen (Spermatozyten), 3. Differenzierung der haploiden Spermatiden zu Spermien (Spermiogenese, Spermatohistogenese) (BERGMANN 2006)

Vom Prinzip her verläuft die Spermatogenese bei allen Säugetieren gleich ab. Die Anzahl der Teilungsschritte und die Dauer des Spermatogenesesyklus ist tierartlich unterschiedlich (CLERMONT 1972). Beim Hengst teilt sich eine Stammspermatogonie entweder in 2 voneinander getrennte A1-Spermatogonien, die wiederum als Stammspermatogonien dienen oder in 2 mit einander verbunden bleibende A1.2-Spermatogonien, die sich wiederum über mitotische Teilungen zu 4 A1.4 bzw. 8 A1.8-Spermatogonien aufteilen, ohne sich dabei zu trennen.

Aus dem Typ A1.8 gehen A2-Spermatogonien hervor. Auch hier führen wieder mitotische Teilungen zu A3- und folgend B1- sowie B2-Spermatogonien und letztendlich Spermatozyten der I. Ordnung. Diese diploiden, primären Spermatozyten werden über eine meiotische 1. Reifeteilung zu sekundären Spermatozyten, aus denen durch eine 2. Reifeteilung die haploiden Spermatisden hervorgehen. Theoretisch könnten so aus einer Stammspermatogonie 64 Spermatisden hervorgehen. Tatsächlich geht jedoch ein Anteil der Spermatogonien zugrunde (PICKETT et al. 1989).

An den runden Spermatisden vollziehen sich während der 2. Phase der Spermatogense, der Spermio-genese, deutliche morphologische Umgestaltungsprozesse mit dem Ziel der Differenzierung zum reifen, elongierten Spermium. Die einzelnen Reifungsvorgänge lassen sich in 4 Phasen unterscheiden: die Golgi-, Kappen-, Akrosomen und Reifungsphase (Abb. 3).

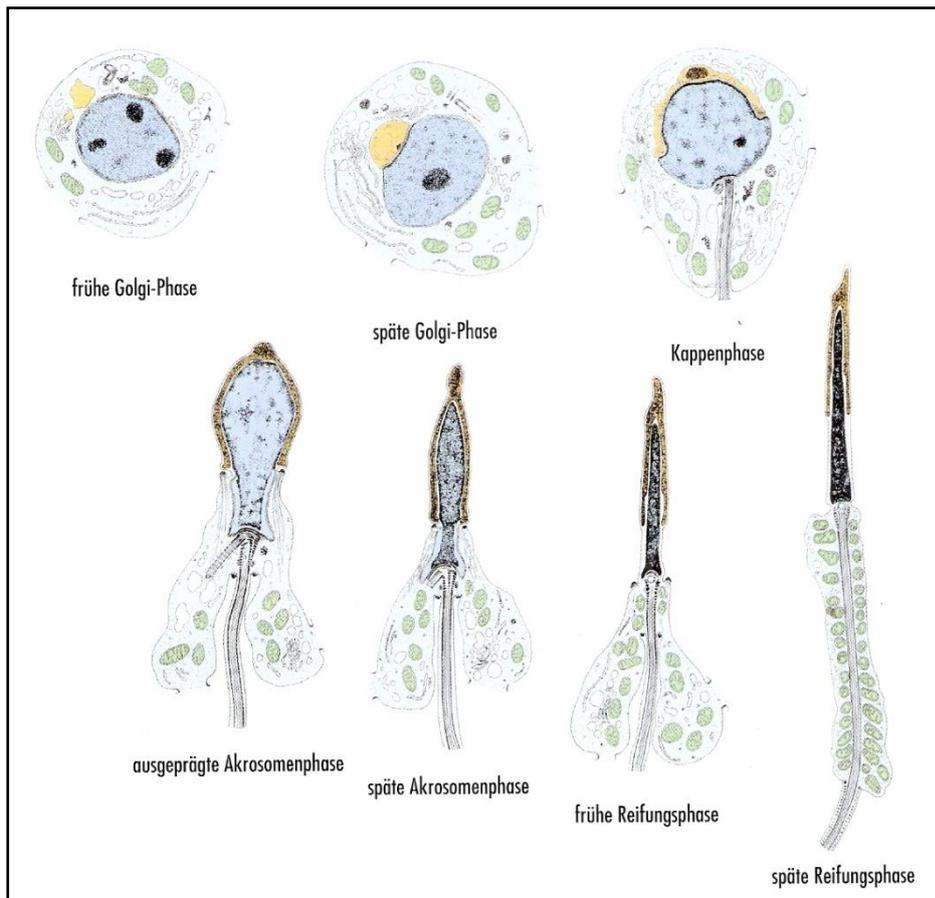


Abb. 3:
Schematische Darstellung der Entwicklungsphasen einer Spermatisde des Bullen (modifiziert nach LIEBICH 2003)

2.2.3 Kinetik der Spermatogenese

Die Teilungs- und Umbildungsvorgänge im Verlauf der Spermatogenese sind streng geregelt und synchronisiert. Die Zellen einer Generation entstehen etwa gleichzeitig und entwickeln sich nahezu synchron weiter. Aus der regelmäßigen Wiederholung des gleichzeitigen Auftretens bestimmter Zellgenerationen nebeneinander ergibt sich ein tierartspezifischer Keimepithelzyklus (CLERMONT 1972), der beim Pferd nach SWIERSTA et al. (1974) in 8 Stadien unterteilt wird. Zuordnungskriterien sind meiotische Zellteilungen, Form des Zellkerns und Lokalisation der Zellen mit elongierenden Zellkernen im Epithel. JOHNSON et al. (1990) differenzieren diese Stadien mittels der Nomarski Optik genauer. Anhand der für das jeweilige Stadium charakteristischen Zellen ergibt sich eine Einteilung wie folgt (Abb. 4):

- Stadium I: primäre Spermatozyten (präleptotän, leptotän, pachytän)
Sb1-Spermatiden (nahezu runde Zellkerne, sich entwickelnde Geißeln)
- Stadium II: primäre Spermatozyten (leptotän, pachytän)
Sb2-Spermatiden (ovaler Zellkern)
- Stadium III: primäre Spermatozyten (zygotän, pachytän)
Sc-Spermatiden (bündelweise angeordnete Zellen, elongierter und kondensierter Zellkern)
- Stadium IV: primäre Spermatozyten (zygotän, diplotän)
sekundäre Spermatozyten
Sc-Spermatiden
- Stadium V: primäre Spermatozyten (pachytän)
Sa-Spermatiden
Sd1-Spermatiden
- Stadium VI: B-Spermatogonien

primäre Spermatozyten (pachytän)

Sa-Spermatiden

Sd1-Spermatiden

Stadium VII: B-Spermatogonien

primäre Spermatozyten (pachytän)

Sa-Spermatiden

Sd2-Spermatiden (luminal gelegen)

Stadium VIII: primäre Spermatozyten (pachytän, leptotän)

Sa-Spermatiden

Sd2-Spermatiden (im „Sperm-Release“,
„Residual Bodies“)

A-Spermatogonien finden sich in allen Stadien

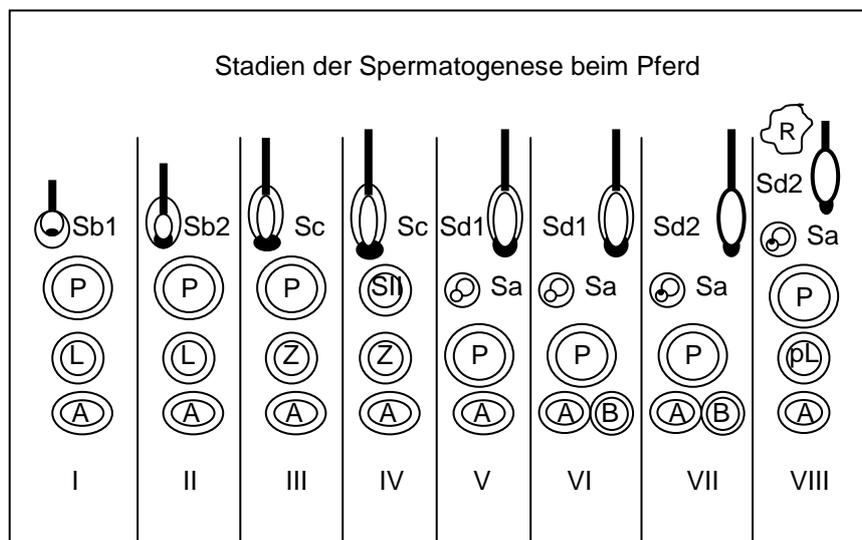


Abb. 4:

Stadien der Spermatogenese beim Pferd (modifiziert nach JOHNSON et al. 1990)

A, B: Spermatozyten Typ A und B, pL: präleptotäne Spermatozyten, L: leptotäne Spermatozyten, Z: zygotäne Spermatozyten, P: pachytäne Spermatozyten, SII: Spermatozyten II. Ordnung, Sa-Sd2: Spermatiden unterschiedlicher Entwicklungsstufen, Rb: Residual bodies

Für den Durchlauf eines Keimepithelzyklus beim Pferd gilt eine Zeit von 12,2 Tagen, wovon Stadium I 2,1 Tage; Stadium II 1,8; Stadium III 0,4; Stadium IV 1,9; Stadium V 0,9; Stadium VI 1,6; Stadium VII 1,5 und Stadium VIII 1,9 Tage in Anspruch nehmen. Für die unterschiedlichen Häufigkeiten der Stadien wurden Werte von 16,9% (I), 14,9% (II), 3,2% (III), 15,8% (IV), 7,4% (V), 13,5% (VI), 12,6% (VII), 15,7% (VIII) ermittelt (SWIERSTA et al. 1974).

Die unterschiedliche Anzahl der Spermatogenesestadien ist speziesspezifisch: Im Unterschied zum Pferd, Rind und Hund, für die VIII Stadien festgelegt wurden, bestimmte man für die Ratte VIX, für die Maus XII, für Primaten (außer Mensch) XII und den Mensch selber VI Stadien (CLERMONT 1963, zitiert nach BERGMANN 2006). Die Gesamtdauer der Spermatogenese beträgt beim Pferd 57 Tage (PICKET et al. 1989). Zum Vergleich, ein vergleichbarer Keimepithelzyklus dauert beim Rind 13,5, beim Schaf 10,5 und beim Schwein 8,5 Tage. Die Gesamtdauer der Spermatogenese wird für das Rind mit 54, für das Schaf mit 49 und für das Schwein mit 34 Tagen angegeben (SCHNORR und KRESSIN 2006). Der Keimepithelzyklus des Menschen dauert 16 Tage, die Gesamtdauer der Spermatogenese 70-75 Tage (BERGMANN 2006).

2.2.4 Hormonelle Regulation der Spermatogenese beim Pferd

Die reproduktiven Organe bei weiblichen und männlichen Säugern unterliegen der Kontrolle des Hypothalamus-Hypophysen-Systems. Der Hypothalamus sezerniert u.a. pulsatil das Gonadotropin-Releasinghormon (GnRH), das über die hypophysären Portalgefäße die Adenohypophyse erreicht. Dort bewirkt GnRH eine ebenso pulsatile Freisetzung des luteinisierenden Hormons (LH) und des follikelstimulierenden Hormons (FSH). Diese beiden Hormone werden in der Regel zusammen sezerniert. Sie können ebenso unabhängig von einander abgegeben werden, da die FSH-Sekretion auch selektiv durch Activin, Inhibin oder Östrogene reguliert werden kann (ROSER 1997). LH stimuliert in den Leydigzellen die Synthese der Sexualsteroiden, d.h. beim männlichen Tier verschiedene Androgene (Testosteron) und Östrogene (RAESIDE 1969). FSH wirkt auf die Sertolizellen und somit auch auf die Spermatogenese. Inhibin, Östrogene und hohe Testosteron-Blutkonzentrationen bewirken am Hypothalamus

eine Herabsetzung der GnRH-Sekretion und an der Adenohypophyse eine reduzierte FSH- und LH-Produktion (negativer Feedback). Activin und niedrige Testosteron-Blutkonzentration bewirken eine gesteigerte GnRH-, FSH- und LH-Freisetzung (McKINNON und VOSS 1992). Die hormonelle Kontrolle der Spermatogenese variiert unter den Spezies (COURROT 1988). Beim kleinen Wiederkäuer sind FSH und Testosteron notwendig, im Gegensatz dazu spielt bei der Ratte für den Ablauf der Spermatogenese nur Testosteron eine entscheidende Rolle.

2.2.5 Pubertät und Spermatogenese beim Pferd

Zum Zeitpunkt der Geburt besteht das Hodenparenchym aus zunächst noch soliden Keimsträngen, Sertolizellen, Primordialkeimzellen und im Interstitium mit einer ersten Generation von Leydigzellen, die nach der Geburt zugrunde geht. Erst beim Einsetzen der Pubertät bildet sich eine 2. Leydigzellpopulation. Es liegen minimale Plasmakonzentrationen von FSH und LH vor und es findet keine Spermatogenese statt. Testosteron wird erstmals von der 1. Leydigzellgeneration zur Differenzierung der Gonaden produziert (SCHNORR und KRESSIN 2006). Die infantile Phase des Hengstes endet rassebedingt und abhängig vom saisonalem Zeitpunkt der Geburt ca. ab dem 6. Lebensmonat (MC KINNON und VOSS 1992). Die Definition „Pubertät“ ist in der Literatur unterschiedlich beschrieben. Nach NADEN et al. (1990) wird der Eintritt der Pubertät mit dem ersten Ejakulat festlegt, das 50×10^6 Spermien/ml enthält, von denen mehr als 10% eine Vorwärtsbeweglichkeit zeigen. Über die genauen Veränderungen im neuroendokrinen System des Hengstes zum Zeitpunkt der Pubertät ist wenig bekannt. Um den 9. Lebensmonat steigen die Plasmakonzentrationen von FSH und LH an. Ungefähr zeitgleich beginnt auch auf einem niedrigen Level erneut die Testosteronsynthese, die um die 70. Lebenswoche (ca. 17. Lebensmonat) deutlich ansteigt. Wenige Monate später setzt die Spermatogenese ein. In der Studie von NADEN et al. (1990) erreichen 11 von 15 untersuchten Junghengsten in der 90. Lebenswoche (ca. 22. Lebensmonat) die oben definierte „Pubertät“. Bei einigen Junghengsten werden bereits im Alter von 14 Monaten erste befruchtungsfähige Spermien im Ejakulat nachgewiesen.

Die peripuberale Phase des Hengstes dauert ca 2-4 Jahre an, so dass erst dann ein Maximum der qualitativen und quantitativen Reproduktionsfähigkeit erreicht wird. Bei vielen Hengsten verändert sich die maximal erreichte tägliche Spermienproduktion (ca. 160×10^6 Spermien/ml, 55-60% Vorwärtsbeweglichkeit), abgesehen von den saisonalen Schwankungen, bis zu einem Alter von knapp 20 Jahren nicht mehr (SQUIRES et al. 1979, JOHNSON et al. 1991).

2.2.6 Saisonale Beeinflussung der reproduktiven Vorgänge beim Hengst

Beim Pferd unterliegt der hormonelle Regelkreis und davon beeinflusst das Keimepithel, die Spermatogenese und die Hormonkonzentrationen, saisonalen Schwankungen. JOHNSON und THOMPSON (1983, 1986) stellen fest, dass in den Frühjahr- und Sommermonaten die Sertoli- und Leydigzellenzahl sowie die Anzahl der germinativen Zellen, insbesondere die der A-Spermatogonien bei adulten Hengsten ansteigen. Weiterhin erhöht sich das testikuläre Gewicht, sowie die tägliche Spermienproduktion von 15 Millionen Spermien/Tag/Gramm Hodenparenchym auf 19 Millionen/Tag/Gramm Hodenparenchym. Die LH- und Testosteronkonzentration sind höher, der Anstieg der FSH-Sekretion ist statistisch gesehen nicht signifikant (JOHNSON und TATUM 1989). ROSER und HUGHES (1992) bestätigen diese Ergebnisse, stellen zusätzlich fest, dass subfertile Hengste weniger photosensitiv mit einer Erhöhung der aufgeführten Werte reagieren.

2.3 Kryptorchismus

Im Normalfall sind bei einem Hengstfohlen die Hoden zum Zeitpunkt der Geburt beiderseits im Skrotum palpierbar. Es ist jedoch auch noch in den nächsten vier Wochen post partum möglich, dass ein normaler Hodenabstieg stattfindet.

Unter Kryptorchismus versteht man einen unterbliebenen oder unvollständigen Descensus testis. Die Hoden befinden sich ein- oder beidseitig in der Bauchhöhle (abdominal) oder im Leistenkanal (inguinal). Die Ursachen sind umstritten: mechanische, wie auch hormonelle Störungen werden diskutiert. Der Kryptorchismus führt zu einer gestörten Spermatogenese bis hin zur Aspermie und das Hodengewebe entartet häufiger neoplastisch (STICK 1981, HAYES 1986).

Von Interesse ist, inwiefern die Spermatogenese in einem kryptorchid gelagerten Hoden beeinflusst wird. Das Hauptproblem dieser Fehllagerung ist die erhöhte Wärmeexposition. Im Versuch (verursacht durch Wollwickel über eine Dauer von 24 und 48 Stunden) wird festgestellt, dass je nach Dauer der Temperaturerhöhung um nur wenige Grad Celsius, eine Reduzierung der Spermienkonzentration, der absoluten Spermienanzahl und der Motilität eintritt. Morphologische Veränderungen treten vermehrt auf, wobei auffällt, dass Spermatogonien weniger empfindlich erscheinen als Spermatozyten und Spermatoziden. Die Veränderungen sind je nach Dauer der Temperaturerhöhung wieder reversibel (individuell unterschiedlich, abhängig vom beobachteten Merkmal, nach bis zu ca. 70 Tagen) (FREIDMAN et al. 1991)

AL-BAGDADI et al. (1991) untersuchen die morphologischen Unterschiede zwischen physiologischen, unilateral abdominalen und inguinalen gelagerten Hoden:

Die kryptorchiden Hoden stellen sich prinzipiell kleiner dar. Die abdominalen Hoden sind z.T. zystisch entartet. Mikroskopisch zeigen sie größere Tubuluslumen, zwischen den in Gruppen angeordneten Tubuli vermehrtes, fibröses Bindegewebe. Das Keimepithel ist meist einschichtig, vereinzelt auch zweischichtig aus undifferenzierten Spermatogonien.

Im Vergleich dazu zeigen die inguinalen Hoden kleinere Tubuluslumen, ausgefüllt mit Epithelzellen und Vakuolen. Das zwischengelagerte Bindegewebe ist weniger stark ausgeprägt und das Epithel differenziert bis maximal zur sekundären Spermatozyte. Sertolizellen sind angelegt in charakteristischer Form, aber mit irregulären Zellkernen.

GANJAM und KENNY (1975) stellen fest, dass im Blutplasma bei bilateral kryptorchiden Hengsten die totalen Östrogenkonzentrationen signifikant höher und die totalen Androgenkonzentrationen signifikant niedriger sind gegenüber normalen Probanden. Die intratestikuläre Androgenkonzentration ist bei bilateralen Kryptorchiden deutlich höher, was auf einen reduzierten Blutfluß, einen reduzierten Testosteronmetabolismus und geringeres Hodengewicht zurückgeführt wird. HEJMEJ und BILINSKA (2008) erklären die Imbalance zwischen erhöhten Östrogen- und erniedrigten Testosteronwerten bei bilateral kryptorchiden Hengsten zum einen durch eine verminderte Expression von LH-Rezeptoren an den Leydigzellen und von 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (katalysiert die Testosteronproduktion) sowie zum anderen durch eine höhere Aromatasekonzentration, die eine vermehrte Östrogenproduktion bedingt.

2.4 Kernproteine (Zellkernproteine)

Die DNA von Eukaryotenchromosomen liegt nicht nackt, sondern mit Proteinen im Massenverhältnis 1:1 verpackt vor (KREUTZIG 1997). Die Mehrheit dieser Kernproteine besteht aus basischen Histonen, die in 5 Gruppen unterteilt werden können: H1, H2A, H2B, H3 und H4 (GRIMES 1986, STEGER et al. 1998; CAVALCANTI et al. 2009). Diese Gruppe der Histone wird aufgeteilt in 4 Core-Histone (H2A, H2B, H3 und H4) sowie 1 Linker-Histon H1. Jeweils 2 Moleküle von jedem der 4 Core-Histone bilden ein Oktamer, um das sich 146 DNA-Basenpaare winden und so ein Nukleosom bilden. Zwischen zwei Nukleosomen wird die DNA durch das Linker-Histon H1 geschützt (GOVIN et al. 2004). Der Histon-DNA-(Nucleoprotein-) Komplex wird als Chromatin bezeichnet (STEGER et al. 1998).

Mit der Elongation des Spermienzellkerns gehen drei wichtige Ereignisse einher: 1. Beginn der Chromatinkondensation, 2. Stillstand der Transkription und 3. Übergang der Nukleohiston- in eine Nukleoprotaminstruktur. In den untersuchten Säugetieren geht das Chromatin

dazu in einen vorübergehenden, inaktiven Zustand über, wobei die meisten Histone (beim Mensch bleibt ein Rest an Histonen bestehen) gegen hodenspezifische Transitionsproteine ausgetauscht werden. Im weiteren Verlauf werden die Transitionsproteine wiederum durch Protamine ausgewechselt (STEGGER et al. 1998, Übersicht bei STEGER 1999, STEGER 2002).

Die 5 Hauptgruppen der Histone bilden diverse Untergruppen an Histonen, die z.T. gewebspezifisch auftreten. So werden z.B. im Verlauf der Spermatogenese somatische Histone gegen hodenspezifische ausgetauscht (GRIMES 1986). H1t ist ein hodenspezifischer Subtyp des Linker-Histons H1 und wurde bei Ratte, Maus, Mensch und Pferd nachgewiesen. Im Verlauf der Spermatogenese wird H1t in haploiden Spermatiden ersetzt durch Transitionsproteine und später durch Protamine. Dieses Histon wird benötigt für die Einleitung der DNA-Kondensation und Schutz der DNA-Strukturen vor Beschädigung (CAVALCANTI et al. 2009). Weitere hodenspezifische Histonvarianten sind HILS1 (H1-like-protein in spermatids), H3t, TH2A und TH2B (GOVIN et al. 2004)

2.5 Transitionsproteine (Tp)

Transitionsproteine (Tp) finden sich bei allen untersuchten Säugetieren in unterschiedlichen Varianten, mit tierartspezifischer Zusammensetzung und zeitlichem Auftreten. Allgemein ist für alle untersuchten Tp festzustellen, dass diese als sogenannte „Intermediär-Proteine“ zeitlich mit Beginn der sich elongierenden Spermienzellen in diesen auftreten, aber wieder „verschwunden“ sind in den vollständig kondensierten Spermatiden (MEISTRICH et al. 2003). Für das Pferd liegen bezüglich der Transitionsproteine noch keine Veröffentlichungen vor. Tab. 1 gibt eine Übersicht über die bisher nachgewiesenen Transitionsproteine und Protamine (Prm) bei verschiedenen Tierarten.

Literaturübersicht

Tierart	Rest an Histonen	Transitionsproteine	Quelle	Protamine	Quelle
Pferd	_____	Tp 1 Tp 2	diese Arbeit	Prm 1 Prm 2 a,b	BELAICHE et al. 1987 PIRHONEN et al. 1989
Schaf	_____	Tp 1	DUPRESSOIR et al. 1985	Prm 1	LOIR und LANNEAU 1980 SAUTIERE et al. 1984
Maus	POGANY et al. 1981	Tp 1 Tp 2 Tp 3 Tp 4	MAYER et al. 1981 BALHORN et al. 1984	Prm 1 Prm 2	KLEENE et al. 1984 a YELICK et al. 1987 BELLVE et al. 1988
Ratte	_____	Tp 1 Tp 2 Tp 3 Tp 4		Prm 1 Prm 2	KISTLER et al. 1976 BOWER et al. 1987 HECHT 1990
Mensch	TANPHAICHTR et al. 1978 ca 15 %	Tp 1 Tp 2	LUERSSSEN et al. 1988 STEGER et al. 1998	Prm 1 Prm 2	KOLK und SAMUEL 1975 MCKAY et al. 1985 MCKAY et al. 1986 AMMER et al. 1986 STEGER et al. 1998
Hamster	_____	_____	_____	Prm 1 Prm 2	CORZETT et al. 1999 DOMENJOURD et al. 1991
Meerschweinchen	_____	_____	_____	Prm 1	CALVIN 1976
Schwein	BANERJEE und SMALLWOOD et al. 1998 ja	Tp 1 Tp 2 Tp 3,4	KREMLING et al. 1989 KEIME et al. 1992 AKAMA et al. 1990 AKAMA et al. 1994 a,b	Prm 1 Prm 2	TOBITA et al. 1982 TOBITA et al. 1983 KEIME et al. 1992 LEE et al. 1987
Rind	_____	Tp 1 Tp 2	KREMLING et al. 1989 REINHART al. 1991	Prm 1 Prm 2	COELINGH et al. 1972 MAZRIMAS et al. 1986 DOMENJOURD et al. 1991
Kaninchen	_____	_____	_____	Prm 1	BALHORN 1989 AMMER und HENSCHEN 1988

Tab. 1:

Übersicht über bisher nachgewiesene Protamine und Transitionsproteine verschiedener Säuger.

2.5.1 Zusammensetzung

In manchen Säugetieren werden z.T. bis zu vier unterschiedliche Tp-Typen nachgewiesen (siehe Tabelle 1). Tp 1 und 2 sind jedoch die vorherrschenden Varianten.

2.5.1.1 Transitionsprotein 1 (Tp 1)

Tp 1 ist ein Oligopeptid aus 54 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 6.2 kDa, das bei den bisher untersuchten Spezies eine Übereinstimmung von 83-98% aufweist (PIRHONEN 1994). Es ist reich an Arginin (20%), Lysin (19%) und Serin (14%). Insbesondere in der Zusammensetzung der basischen Zentralregion (Aminosäure 29-42), welche bei allen untersuchten Tieren einen Tyrosin-Rest feststellen lässt, ist die Übereinstimmung groß. Deswegen wird die Vermutung geäußert, dass der Einbau des Tyrosins für die Destabilisierung des Chromatins eine entscheidende Rolle spielen könnte. Im Gegensatz zu der ausgeprägten Homologie, enthält das Tp 1 von Schwein, Rind (KREMLING et al. 1989) und Schaf (CHIRAT et al. 1991) Cystein, während bei Mensch (LUERSSSEN et al. 1988), Maus (KLEENE et al. 1988) und Ratte (KISTLER et al. 1975) kein Cystein vorzufinden ist (WOUTERS-TYROU et al. 1998).

2.5.1.2 Transitionsprotein 2 (Tp 2)

Tp 2 ist größer als Tp 1 und besitzt ein Molekulargewicht von ca. 13 kDa (ZHAO et al. 2001). Das Tp 2 von Maus und Ratte besteht aus 116 bzw. 115 Aminosäuren, Tp 2 des Bullen hat 13 bzw. 14 Aminosäuren mehr (REINHART et al. 1991). ZHAO et al. 2001 beschreiben, dass das Tp 2 Molekül im Carboxyl-Drittel angereichert ist mit basischen Aminosäuren, welchem Abschnitt auch die Hauptfunktion der elektrostatischen Bindung mit der DNA zugesprochen wird. In der terminalen Aminoregion werden Zink-Finger-Strukturen angenommen und diese mit einer hohen Affinität für CG-Sequenzen der DNA in Zusammenhang gebracht (BASKARAN und RAO 1991). MEETEI et al. 2000 bestätigen das Zinkfingermodell und die DNA-kondensierenden Eigenschaften. BREWER et al. 2002 beschreiben genauer, dass Tp 2 bevorzugt an CG-Sequenzen bindet, die mit Promotordomänen der DNA assoziiert sind und somit die Transkription in den frühen Spermatiden gestoppt wird.

Während das Tp 1-Gen bei allen Säugern hochkonserviert ist, zeigt das Tp 2-Gen große Unterschiede zwischen den Spezies. Dem Tp 2-Protein sollte daher eine speziesspezifische Funktion zukommen (KEIME et al. 1992). REINHART et al. (1991) bemerken, dass die evolutionäre Divergenz nicht zu Lasten des basischen Bereiches geht, dem große funktionelle Bedeutung zu gesprochen wird. Der Vergleich der Tp2- Aminosäuresequenzen von Maus und Ratte zeigen eine Übereinstimmung von 83%, zwischen Nagern und Rind besteht hingegen nur noch eine Übereinstimmung von 42-45%.

2.5.1.3 Weitere Transitionsproteine

Transitionsprotein 3 (Tp 3)

Tp 3 ist bisher beim Schafbock (DUPRESSOIR et al. 1985), beim Eber (AKAMA et al. 1994 b) und bei der Ratte (UNNI et al. 1994) lokalisiert und charakterisiert.

Ratten-Tp 3 besteht aus 103 Aminosäureresten, zeigt eine hohe Homologie mit dem Protamin 2 und wird dementsprechend als ein primäres Translationsprodukt von Prm 2 angesehen (WOUTERS-TYROU et al. 1998).

Transitionsprotein 4 (Tp 4)

Tp 4 ist bisher bei Ratte und Eber lokalisiert und charakterisiert.

Tp 4 der Ratte besitzt eine Molekulargewicht von 13-20 kDa mit einem Arginin- und Lysin-gehalt von 24mol%, und Histidingehalt von 2,2mol%. Es können keine Homologien zu anderen bekannten Proteinen festgestellt werden und mit polyklonalen Antikörpern lassen sich keine immunologischen Gemeinsamkeiten zu anderen Transitionsproteinen, Protaminen oder Histonen feststellen (UNNI und MEISTRICH 1992).

Tp 4 des Ebers wurde von AKAMA et al. 1995 vollständig charakterisiert: es besteht aus 138 Aminosäureresten mit einem hohen basischen Anteil auf der N-terminalen Hälfte und weniger basischen Eigenschaften auf der C-terminalen Seite.

2.5.2 Funktionen und Interaktionen der Transitionsproteine

Bezüglich der Funktionen der Transitionsproteine wurden verschiedene Möglichkeiten diskutiert: Zellkernformation, Histonaustausch, Repression der Transkription, Chromatinkondensation, aber auch dekodensierende Eigenschaften und Reparatur der DNA-„single-strand-breaks“ (MEISTRICH et al. 2003, BOISSONNEAULT 2002)

2.5.2.1 Tp 1

Der Chromatinumbau geht, im Verlauf der Spermatogenese, mit zunehmend auftretenden DNA-single-strand-breaks (SSB) einher. Eine Zunahme von DNA-Fragmenten wird bei Ratten für eine verzögerte Kernkondensierung verantwortlich gemacht (QIU et al. 1995). Für den Menschen wird vermutet, dass eine Zunahme der DNA-Fragmente in der Spermienpopulation über 25%, die Fertilisationsrate unter 20% sinken lassen könnte (LOPES et al. 1998). CARON et al. (2001) nehmen an, dass Tp 1 an den Repariervorgängen dieser SSB beteiligt ist, bzw. stellen fest, dass UV-induzierte DNA-Schäden in Zellen, die Tp 1 exprimieren, verstärkt repariert werden. KIERSZENBAUM (2001) diskutiert in diesem Zusammenhang, dass Tp 1-Moleküle die Enden der DNA-Bruchstücke zusammen halten, bis eine bisher unbekannte Ligase die Bruchenden wieder zusammenführt. Auch BOISSONNEAULT (2002) kommt in seiner Übersicht über die Vorgänge des „Chromatin remodeling“ zu der Schlussfolgerung, dass Transitionsproteine die DNA-Fragmentation minimieren.

SINGH und RAO (1988) stellen fest, dass Tp 1 eine stärkere Affinität gegenüber einzelsträngiger DNA zeigt, doppelsträngige DNA destabilisiert und somit als „DNA-schmelzendes Protein“ fungiert und eine entscheidende Rolle in dem Histonaustausch spielt. Sie stellen dies

fest, in dem sie *in vitro* zu Rattenleber-Core-Partikeln Tp 1 hinzufügen und beobachten, dass dadurch die Kompaktheit der DNA um das Histonoktamer herabgesetzt wird.

YU et al. (2000) untersuchen die Fertilität Tp 1-defizienter Mäuse. Das Hodengewicht und die Spermienproduktion sind unverändert, dafür treten vermehrt Abnormalitäten in der Spermienmorphologie auf. Die Fertilität ist deutlich reduziert, bei stark herabgesetzter Spermienbewegung. Anstelle von Tp 1 werden erhöhte Werte von Tp 2 und Protamin 2- Precursor (p-Prm2) vorgefunden. Tp 2 und p-Prm2 können zwar anstelle von Tp 1 die Chromatinkondensierung einleiten, aber das Chromatin stellt sich insgesamt weniger stark kondensiert dar. ZHAO et al. 2001 bestätigten diese Befunde.

2.5.2.2 Tp 2

Die Bindung aromatischer Aminosäuren an native DNA kann Schleifenausbildung oder Kräuselungen bewirken (HELENE und LANCELOT 1982). SINGH und RAO (1987) stellen weiter fest, dass die Tyrosin-Reste des Ratten Tp 1 bei Bindung an die DNA eine Herabsetzung der thermalen Stabilität bewirken. KLEENE und FLYNN (1987) vermuten, dass eine destabilisierende Wirkung darauf zurück zu führen wäre, dass durch die gebildeten Kräuselungen eine Lockerung der DNA-Windungen um die nukleosomalen Histone entstehen könnte. Da auch Tp 2 zwei aromatische Aminosäuren in der vermuteten DNA-bindenden Domäne aufweist, sind für dieses Proteine ähnliche DNA-destabilisierende Eigenschaften anzunehmen. BASKARAN und RAO (1990) führen ausführliche Untersuchungen zu den Interaktionen zwischen DNA und Tp 2 durch: ihrer Meinung nach ist Tp 2 ein DNA-stabilisierendes Protein, hat bessere DNA-kondensierende Eigenschaften als Tp1. Es hat eine geringgradig geringere Affinität zu einzelsträngiger DNA als Tp1.

ZHAO et al. (2001) beschreiben, dass Tp 2 mittels seiner Zinkfingerstruktur in sequenzspezifischer Art und Weise bevorzugt an den DNA- Basen Cytosin und Guanin bindet. Diese Sequenzen finden sich häufig in engem Zusammenhang mit Genpromotor-Domänen der DNA, die den Stillstand der Transkription und den Beginn der Chromatinkondensation entscheidend beeinflussen könnten. Die Autoren untersuchen weiter die Auswirkungen auf Spermatogenese

und Fertilität Tp 2-defizienter Mäuse. Aus ihren Ergebnissen schlussfolgern sie, dass Tp 2 keinen entscheidenden Einfluss auf die Formgestaltung des Spermienzellkerns, den Histon austausch, die Initiation der Chromatinkondensation, die Repression der Transkription, die Protamin-DNA-Bindung oder auf die Fertilität hat, aber von Bedeutung ist für die Aufrechterhaltung des normalen Processings von Protamin 2 und somit für die Vervollständigung der Chromatinkondensation. Die Autoren sind der Meinung, dass die negativen Konsequenzen, bedingt durch fehlendes Tp 2, durch Tp 1 und Protamine kompensiert werden können.

BREWER et al. (2002) stellen fest, dass Tp 2 DNA sechsmal stärker zu binden vermag als Tp 1, und somit quasi der Affinität eines Protamins zur DNA entspricht. Aufgrund dessen wird angenommen, dass Tp 2 direkt in der Lage ist, Histone aus ihren Bindungen mit der DNA zu lösen, um dann die Kondensation zu initiieren. Sie nehmen an, da Tp 2 im Verlauf der Spermatogenese der Ratte sich ca. 24 Stunden vor dem Auftreten von Tp 1 an die DNA anlagert, dass dieses Protein zunächst die Transkriptionsaktivität stoppt und die Kondensierung initiiert und kurze Zeit später Tp 1 beginnt, DNA-single-strand-breaks zu reparieren.

2.5.2.3 Tp 3 und Tp 4

Tp 3 zeigt eine strukturelle Ähnlichkeit zu Tp 1. Es wird eine lokale DNA-destabilisierende Wirkung vermutet. Tp 3 der Ratte erscheint im Gegensatz zu Tp 1 und Tp 2 erst etwas später in Spermatozyten 16-19.

Dieses Kernprotein hat eine höhere Affinität zu einzelsträngiger DNA als zu doppelsträngiger. (AKAMA et al. 1996).

Tp 4 besitzt eine höhere Affinität zu doppelsträngiger DNA. Auch für Tp 4 wird eine DNA-destabilisierende Wirkung vermutet (WOUTERS-TYROU et al. 1998, AKAMA et al. 1995)

2.5.3 Austausch der Histone gegen Transitionsproteine

Über den Austausch der Histone gegen die Transitionsproteine stellt BALHORN (1982) zunächst fest, dass die Affinität von Arginin zu den Phosphatgruppen der DNA größer ist, als die von Histidin und Lysin. Transitionsproteine besitzen höhere Arginingehalte als Histone und Protamine wiederum höhere Arginingehalte als Transitionsproteine. Daraus folgert der Autor, dass bei Anlagerung der Transitionsproteine an die Phosphorgruppen der DNA, die Histone aus ihren Bindungen verdrängt werden und auf die gleiche Art und Weise auch Protamine, Transitionsproteine und restliche Histone entfernen. GOVIN et al. 2004 fassen eine Übersicht zusammen, welche Histone in die Abläufe der Spermatogenese bzw. in den Histonaustausch durch Transitionsproteine und Protamine eingreifen. Zwei Beobachtungen werden mit dem Histonaustausch in Verbindung gebracht: zum einen eine massive Synthese von Histonvarianten und zum anderen eine stadienspezifische post-translationale Modifikation von Histonen. Die Autoren nehmen an, dass an dem Histonaustausch zahlreiche Histonvarianten und Modifikationen beteiligt sind. Das H1t-Protein hat eine vermutete DNA-dekompensierende Wirkung. H1LS1 dürfte als Linker-Histon während der Chromatinumgestaltung fungieren. Auch nicht-histonspezifische Varianten wurden während der Spermatogenese beobachtet. Weiter werden spermatogeneseabhängige Histon-Modifikationen, wie Acetylierungen, Methylierungen und Phosphorylierungen beschrieben (GOVIN et al. 2004, STEGER 2002) HECHT et al. 2008 beschreiben eine Lockerung der Histon-DNA-Verbindung, durch Acetylierung bestimmter Lysin-Reste innerhalb der terminalen Aminostruktur von Core-Histonen.

CAVALCANTI et al. 2009 beschreiben, dass für viele hodenspezifische Histone und andere Histonvarianten, wie H3.3, macro H2A, ssH2B, tsH2A, H1t und tsHMG eine Schlüsselrolle in Verbindung mit der Transkription, Histonabtrennung bei der Replikation und der Histonentfernung während der Spermatogenese angenommen wird. Durch diese Interaktionen zwischen Core- und H1-Histonen, werden Genaktivitäten moduliert, die wichtige Auswirkungen auf die Transkription bedingen.

In einigen Säugetieren (Mensch, Maus, Schwein) findet der Austausch der Histone gegen Protamine nicht vollständig statt. Für den Menschen ist bekannt, dass der verbleibende Histonanteil (ca. 15%), stark acetyliert ist. Es wird noch diskutiert, ob diesem Rest an Histonen spe-

zielle Funktionen während der Fertilisation und/oder frühen Embryogenese zuzuordnen sind (WYKES und KRAWETZ 2003, HECHT et al. 2009)

2.6 Protamine

2.6.1 Historie

In der Literatur werden Protamine (Prm) erstmals von MIESCHER (1874, zitiert nach OLIVIA 2006) beschrieben, der diese als „organische Basen in den Samenfäden des Rheinlachs“ entdeckt. KOSSEL (1928) und FELIX (1960) erbringen die nächsten Untersuchungen und etablieren die Polypeptidnatur der Protamine. BLOCH (1969) klassifiziert Spermienproteine in fünf Gruppen, in die auch die Protamine eingeordnet werden:

Typ 1: echte Protamine (klein, argininreich)

Typ 2: stabile Protamine (argininreich, aber auch Cystein enthaltend – das hauptsächlichste Protamin in Säugetieren)

Typ 3: intermediäre, basische Spermienproteine (enthalten Histidin und/oder Lysin in Ergänzung zu Arginin)

Typ 4: somatische Histone

Typ 5: nicht-basische-Proteine (entdeckt im Nukleus maturer Spermien)

In den 60 Jahren wuchs das Interesse an dieser Proteinart, so dass u.a. ANDO et al. mit intensiverer Forschung beginnen und Veröffentlichungen, v.a. über Fischprotamine erbringen (ANDO et al. 1962)

Das erste Säugetierprotamin wird für das Rind von COELINGH et al. (1972) sequenziert.

SUBIRANA veröffentlicht 1983 eine Abgrenzung der Protamine von den Histonen, in dem er Protamine als Spermienproteine mit einem Lysin- und Arginidgehalt von 45 – 80 mol%, sowie einem Serin- und Threonengehalt von 10 – 25 mol% beschreibt.

Es folgen in den nächsten Jahren Sequenzierungen für weitere Haussäugetiere, u.a. für den Menschen durch AMMER et al. (1986) und für das Pferd durch BELAICHE et al. (1987). Da im Vergleich der Sequenzen verschiedener Spezies Unterschiede festgestellt werden, gilt es

weiter zu klären, wie man sich den Aufbau und die Funktion der Protamine abhängig von ihrer Sequenz vorzustellen hat.

Protamine werden in Keimzellen synthetisiert. Bisher sind Proteine dieser Art nur in Spermienzellen, bzw. deren Vorstufen lokalisiert worden (HECHT 1989). Nach einer Veröffentlichung von BENCH et al. (1996) über Studien an Hamster, Rind, Mensch, Maus und Pferd, weisen Protamine im Gegensatz zu den Transitionsproteinen ein nur relativ geringes Molekulargewicht von ca. 6,5 bis 8,5 kDa auf. Für das Prm 2 werden hierbei etwas größere Molekulargewichte angegeben. Weiterhin ist ihr besonders hoher Gehalt an Arginin (gewöhnlich 50-60%) und Cystein (10-15%), sowie nur niedriger bis gar nicht vorhandener Lysin-Gehalt (nur sehr geringgradig vorhanden bei Ratten) charakteristisch (MEISTRICH 1989, BELAICHE et al. 1987).

Abhängig von der Säugetierart treten unterschiedliche Protaminvarianten auf: Prm 1 und 2.

Für Rind (COELINGH et al. 1972; MAZRIMAS et al. 1986), Schaf (LOIR und LANNEAU 1980; SAUTIERE et al. 1984), Schwein (TOBITA et al. 1983), Ratte (KISTLER et al. 1976), Kaninchen (BALHORN 1989, AMMER und HENSCHEN 1988) und Meerschweinchen (CALVIN 1976) konnten bisher die vollständige Prm 1-Aminosäuresequenzen festgestellt werden.

Zusätzlich wurden die vollständigen Sequenzen von Prm 2 bei Maus (BELLVE et al. 1988) und Hamster (BALHORN 1989) isoliert. Bei Mensch (AMMER et al. 1986; MC KAY et al. 1986) und Hengst (AMMER und HENSCHEN 1987; PIRHONEN et al. 1989) konnte Prm 2 in jeweils 2 Variationen isoliert werden.

Im Gegensatz zu den Säugetieren, bei denen immer mindestens Prm 1 nachgewiesen werden konnte, besitzen z.B. Frosch und Seeigel keine Protamine und das DNA-Packaging findet in nukleosomähnlicher Art und Weise statt. (KEICHLINE und WASSARMANN 1979; KHARCHENKO und NALIVEAVA 1980). Bei den meisten Fischarten und einigen Insektenarten ist die DNA zusammen mit kleinen, basischen protaminartigen Proteinen angeordnet (FUENTES-MASCORRO et al. 2000).

2.6.2 Zusammensetzung

Gen und Proteinsequenz sind für Protamine von mehr als 100 Vertebratenspezies bestimmt worden. Zwei strukturelle Elemente ließen sich dabei bei allen Protaminen feststellen: zum einen Serien kleiner „Anker-Domänen“, die multiple, d.h. pro Domäne drei oder mehr Aminosäuren, wie Arginin oder Lysin enthalten und der DNA-Protein-Bindung dienen. Zum anderen multiple Serin- und Threoninansammlungen, die für Phosphorylierungen genutzt werden. Die mehrfach pro Molekül eingebaute Aminosäure Cystein ermöglicht die Disulfidbrücken der Protamine untereinander. Protaminen von Insekten, Vögeln, Fischen, Reptilien und den meisten Beuteltieren fehlt Cystein (BALHORN 2007).

2.6.2.1 Protamin 1 (Prm 1) und seine Struktur

Für die Tierarten mit bekannten Prm 1-Aminosäuresequenzen, konnte eine konstante Länge von 49 oder 50 Aminosäuren nachgewiesen werden. Die Sequenzanalysen der verschiedenen Protamine ergaben, dass das Prm 1 prinzipiell in drei strukturelle Domänen unterteilt ist.

Die zentrale, polyargininreiche Region ist DNA-bindend und besteht aus mehreren Arginin-Anhäufungen (bestehend aus 3-11 Argininresten). Zwischen diesen Einheiten liegen ein bis mehrere nicht-Arginin-Reste. Diese zentrale Domäne wird an beiden Seiten von relativ argininarmer, cysteinreicher, weniger basischen, kurzen Peptiden eingerahmt. Für die zentrale, DNA-bindende Domäne kann eine Sequenzidentität von 60-80%, auch bei Fischen, festgestellt werden.

Das Aminoende stellt eine besonders gut konservierte Aminosäuresequenz (Ala-Arg-Tyr-Arg-Cys-Cys) dar. Von 19 (z.T. nur partiell) untersuchten Prm 1-Sequenzen konnten nur bei drei Spezies in diesem Bereich abweichende Mutationen festgestellt werden.

Das Carboxylende ist in der Anzahl seiner Aminosäuren ziemlich konstant, aber nicht in deren Zusammensetzung, so dass hier zwischen verschiedenen Tierarten erhebliche Unterschiede festzustellen sind. Fischen fehlen die Cysteinanreicherungen in den Seitenbereichen, wo-

mit begründet wird, dass ihr Netzwerk an verzweigten Protaminmolekülen, wegen fehlender Disulfidbrücken weniger stabil ist (BALHORN 1989, 2007, VILFAN et al. 2004).

2.6.2.2 Protamin 2 (Prm 2) und seine Struktur

Im Gegensatz zu Prm 1, das bei allen untersuchten Säugetieren bisher nachgewiesen werden konnte, konnte Prm 2 bisher nur bei Primaten, vielen Nagetieren, und dem Pferd identifiziert werden (PIRHONEN et al. 1990, BALHORN 2007). DOMENJOUR et al. (1991) kamen aufgrund ihrer Untersuchungen zu der Annahme, dass in Säugetier-Spermatozoen sowohl Prm 1 als auch Prm 2-Gene vorhanden sind, diese beide transkribiert werden, aber nur bei Mensch, Maus und Pferd zusätzlich zu Prm 1 auch ein funktionelles Prm 2-Protein synthetisiert wird. Die vom Prm 1 bekannte relativ einheitliche Struktur lässt sich bei Prm 2 so nicht nachweisen: über 60% Sequenzidentität innerhalb speziesspezifischer Prm 2 Moleküle und 50-70% Sequenzidentität zwischen Prm1 und Prm 2 (BALHORN 2007).

Prm 2 ist größer als Prm 1 und besitzt höhere Histidinanteile, d.h. 25-30% des Arginidgehaltes werden durch Histidin ersetzt. Die Anhäufungen der Arginreste scheinen mehr über das ganze Molekül verteilt zu sein (OLIVIA und DIXON 1991, BENCH et al. 1996). WOUTERS-TYROU et al. 1998 behaupten hingegen, die „Argin-Cluster“ würden sich vermehrt in der zentralen Region, Aminosäure 30-45, ansammeln.

Das Molekül wird von WOUTERS-TYROU et al. 1998 mit einer Länge von 54-63 angegeben. PIRHONEN et al. 1989 und 1990 fanden beim Pferd zwei Prm 2-Varianten mit einer Länge von 58 und 62 Aminosäuren.

Im Gegensatz zu Prm1 codiert das Gen PRM2 ein Precursor-Protein, eine Vorstufe, das an die DNA bindet und dann durch proteolytische Abspaltung von 40% der terminalen Aminogruppe gekürzt wird. Für die Maus konnten so 6 verschiedene Formen des Prm 2-Precursors festgestellt werden. Anders als bei Nagetieren, wurden bei Mensch, Menschen- und Alte-Welt-Affen zwei unterschiedliche Prm 2- Varianten beobachtet, die an die DNA binden. Die beiden Formen unterscheiden sich lediglich in den letzten 3 Aminosäuren des Aminoterminus (BALHORN 2007). Auch PIRHONEN et al. 1989 finden heraus, dass die beiden equinen Prm 2-Varianten sich vor allem in der terminalen Aminoregion, aber auch noch an 3 weiteren Po-

sitionen unterscheiden und vermuten daraufhin, dass für die beiden Prm 2-Typen zwei unterschiedliche aber homologe Gene existieren.

Desweiteren wurde festgestellt, dass Prm 2 Zink bindet. Mensch, Maus und Hamster sind in der Lage pro Molekül ein Zink-Atom zu binden. Verschiedene Zinkfingermodelle konnten jedoch bisher noch nicht mit der Histidin und Cystein Anordnung des Prm 2 in Einklang gebracht werden. In Spermatozoen des Pferdes wurden Auswirkungen von Zink auf die Chromatinfunktion festgestellt (DIAS et al. 2005, BALHORN 2007).

2.6.3 Interaktionen der Protamine

2.6.3.1 Interaktionen zwischen DNA und Protaminen

In der Literatur werden bereits seit Mitte der fünfziger Jahre Modelle bezüglich einer möglichen Nukleoprotaminstruktur erstellt und diskutiert. Mindestens drei unterschiedliche Strukturmodelle sind seit dieser Zeit vorgeschlagen worden:

- (a) Die Protamine binden in der kleinen Furche der Doppelhelix und winden sich in dieser Art und Weise um das Molekül.
- (b) Die Protamine nehmen eine α -helicale Konformation an und binden in der großen Furche.
- (c) Die DNA lagert sich in einer superspiralisierten Konformation um die Protamine.

Die meisten der erbrachten Modelle basieren auf Verhältnissen bei Fischen. Fischprotamine haben jedoch nur ein Molekulargewicht von durchschnittlich 4,0 kDa (gegenüber 6,7 bis 8,5 kDa beim Säugetier) (BENCH et al. 1996). Säugetierprotamine enthalten Cystein und Histidin, während Fische keine dieser Aminosäuren aufweisen (BIANCHI et al. 1994). Deswegen ist es problematisch, Fischprotamin-Modelle direkt auf das Säugetier zu übertragen. Nachfolgend werden einige Nukleoprotamin-Modelle für das Säugetier vorgestellt.

FEUGHELMAN et al. 1955, WILKENS 1956 und ZUBAY und WILKENS 1962 präsentieren das erste Modell basierend auf Röntgenstrahlanalysen: die Protamine liegen in diesem Modell in den kleinen Furchen der DNA-Helix. Ausgehend von den Protaminen strecken sich Seitenketten bestehend aus Argininresten in Richtung der Phosphate der DNA und neutralisieren diese.

LUZATTI und NICOLAUIEFF 1963 und LUZATTI 1963 sind der Meinung, dass zwischen hexagonal angeordneten DNA-Molekülen, Protamine und Wasser die Zwischenräume auffüllen, so dass ein endloses Netzwerk entsteht.

RAUKAS (1964) erstellt ein drittes Modell, das davon ausgeht, dass jeweils 4 DNA-Doppelhelices von Protaminen und/ oder Metallionen (Mg^{++} oder Ca^{+}) zusammen gehalten werden.

WARRANT und KIM gehen 1978 von der bekannten Aminosäuresequenz des Rinder-Prm 1 aus und nehmen an, dass Protamine eine α -Helix ausbilden und segmentale Zylinder darstellen, die entweder in der kleinen oder in der großen Furche liegen. Nach ihrer Vorstellung besteht das Protaminmolekül aus zwei helikalen Domänen innerhalb der zentralen Region (Aminosäure 13-36), getrennt durch die Sequenz Phenylalanin-Glycin (Position 29 und 30). Tatsache ist jedoch, dass diese letztgenannte Sequenz nicht bei allen Tierarten, wie z.B. bei der Maus, in Protamin 1 konserviert ist.

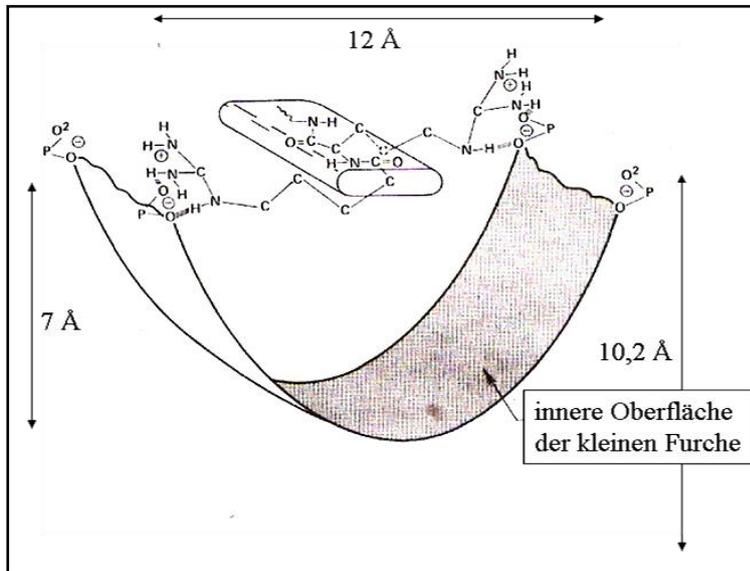
BALHORN liefert 1982 ein detailliertes Modell für den Protamin-DNA-Komplex. Er geht hierbei im Detail vom Prm 1 des Rindes aus, da bis zu diesem Zeitpunkt nur von diesem die komplette Aminosäuresequenz vorlag und Prm 1 bei allen untersuchten Haussäugetieren bisher nachgewiesen werden konnte. Der Vergleich mit verfügbaren, partiellen Aminosäuresequenzen anderer Tierarten ergibt hohe Grade an Homologien und veranlasste zu der Annahme der Allgemeingültigkeit des Modells auch für andere Säugetiere. Die vorhandene Menge an DNA in jedem Spermienzellkern (3,30 pg) (POGANY et al. 1981) und das begrenzt zur Verfügung stehende Zellkernvolumen (ca. $3,7-4,2 \mu m^3$) (WYROBEK et al. 1976) machen zwingend notwendig, dass elektrostatische Abstossungen eine maximal dichte Anlagerung der Protamine an die DNA nicht unterbinden. Der Gehalt negativ geladener Phosphate in der DNA wird mit einem Wert von $6,6 \times 10^9$ Molekülen kalkuliert. Dem gegenüber stehen $8,7 \times 10^9$ positive Ladungen durch Histidine, Lysine und Arginine der Protamine (Rechenbeispiel bezogen auf die Maus (POGANY et al. 1981). d.h. die Protamine sind in der Lage, effizient

die negativen Ladungen der Phosphate zu neutralisieren. Durch die Lagerung der Protamine in „Stauräumen“, wie z.B. den großen und kleinen Furchen der DNA-Helix, werden die zur Verfügung stehenden Platzverhältnisse optimal genutzt und durch die Neutralisierung der Ladungen erst eine derartige, enge und platzsparende Anordnung der DNA-Helices ermöglicht.

Laut BALHORN (1982) wird angenommen, dass die Protamine in der kleinen Furche der DNA zum Liegen kommen (Abb. 5). Nur die zentrale Polyargininsequenz und nicht das komplette Protaminmolekül nimmt eine gestreckte Konformation an, da sonst die Gesamtlänge der zur Verfügung stehenden kleinen Furchen, d.h. 2,10-2,35nm, nicht ausreichen würde, die komplett gestreckten Protaminmoleküle (Rind 4,83nm; Maus 6,03nm) in den kleinen Furchen der DNA zu binden. Um optimale Interaktionen aller Arginine der Protamine mit den Phosphaten der DNA zu ermöglichen, ist das Polyargininsegment nicht am Boden der Furche positioniert, sondern liegt nur in der halben Tiefe in der Furche, d.h. mit der Achse der α -Kohlenstoff-Kette ca. 10 Å entfernt von der DNA-Helix-Achse. Die Guanidinogruppen (R-HN-CH=NH_2) benachbarter Arginine ragen über das Molekül hinaus und interagieren mit den O_2 und O_3 -Molekülen der Phosphate durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatischen Wechselwirkungen, so dass gegenüberliegende DNA-Stränge auf diese Art und Weise mit einander verbunden werden. Jedes Protaminsegment ist lang genug, um die kleine Furche einer DNA-Umdrehung auszufüllen. Die nicht-bindenden C- und N-terminalen Aminosäurenreste können intra- oder intermolekulare Bindungen eingehen.

Folgereaktion der Interaktion zwischen den Guanidinogruppen und den Phosphaten ist, dass das O_2 -Molekül der DNA-Phosphate mehr in das Zentrum der kleinen Furche verlagert wird und damit eine Konformationsänderung der B-DNA-Helix zu einer modifizierten B*-Form ausgelöst wird. Es wird davon ausgegangen, dass diese Konformationsänderung etwa ähnlich der A-DNA-Helix ist, gekennzeichnet durch eine Zunahme der Basenpaare per Umdrehung, Abnahme der Weite der großen Furche um ca. 1 Å, sowie geringfügige Zunahme der Weite der kleinen Furche und des Durchmessers der gesamten Helix. Die DNA in dieser Konformation benötigt geringfügig weniger Volumen: $3,33 \mu\text{m}^3$ gegenüber $4,06 \mu\text{m}^3$.

Infolge sterischer Gegebenheiten werden alle bis auf zwei Phosphatreste eines Protaminsegments innerhalb einer DNA-Umdrehung neutralisiert. Diese Phosphatreste werden im weiteren Verlauf von Argininresten der N-terminalen Protaminsequenz gebunden.

**Abb. 5:**

Positionierung eines Protamin-Polyargininsegments in der kleinen Kuvertur der DNA (modifiziert nach BALHORN 1982)

Zwischen der Synthese und der Disposition der Protamine werden die Serin und Threoninreste phosphoryliert (MARUSHIGE & MARUSHIGE 1975). Diese phosphorylierten und negativ geladenen Aminosäuren, sowie die äußerst geringe Anzahl vorhandener Arginireste im Carboxyl- und Aminoende der Protamine sind dafür verantwortlich, dass diese endständigen Regionen nicht an den DNA-Furchen binden. Die N-terminale Sequenz (Rest 1-15 im Protamin des Rindes) ist so frei beweglich, dass diese sich über die bindende Polyargininsequenz legt. Die noch freien Argininsequenzen des N-Terminus des Protamins können jetzt mit den beiden noch ungebundenen Phosphatresten interagieren und diese neutralisieren. Im Anschluß an die Arginin-Bindungen werden die Aminosäuren Threonin und Serin wieder dephosphoryliert. Verschiedene Cysteinreste sind durch diese Protaminlagerung in gegenüberliegende Positionen gebracht worden, so dass sich zwischen ihnen Disulfidbrücken ausbilden können. Infolge Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Aminosäuren wie Arginin und Tyrosin, Threonin und Histidin sowie hydrophobe Bindungen zwischen Isoleucin und Leucin, sowie weiterer Disulfidbrücken, werden C- und N-terminale Peptide aufeinander folgender Protamine mit einander verbunden und umschließen auf diese Art und Weise die DNA (BALHORN 1982).

Andere Autoren, wie z.B. FITA et al. 1983 gehen aufgrund ihrer Untersuchungen davon aus, dass die Protamine in den großen Furchen binden. Sie finden heraus, dass die B-DNA- durch

Bindung von Polyargininen stabilisiert wird. Für die Diskussion, ob die kleinen oder großen Furchen argininbinden sind, wird zusätzlich berücksichtigt, ob nur ein Protamin (Prm 1), Prm 1 und 2 oder sogar drei Protamine vorhanden sind. Für den Fall mehrerer Protamintypen werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert. Prm 1 und 2 könnten in der großen Furche zu liegen kommen (POGANY und BALHORN 1992), könnten in der großen, wie auch in der kleinen Furche der DNA binden (D'AURIA et al. 1993) oder könnten ebenso ohne eine spezielle Lokalität in den Furchen auf der Oberfläche des DNA-Moleküls via elektrostatischer Anziehungskräfte zwischen den Phosphatresten binden (BIANCHI et al. 1994). FUENTES-MOSCORRO et al. (2000) schlagen vor, basierend auf vorausgegangen Röntgenbeugungsuntersuchungen (FEUGHELMAN et al. 1955, SUWALSKY und TRAUB 1972), dass die Protamine in der kleinen Furche ($12\text{\AA}/ 1,2\text{nm}$ weit und $7\text{\AA}/ 0,7\text{nm}$ tief) der DNA binden, da hier der Abstand zwischen benachbarten DNA-Strängen genau passend ist, so dass die Arginine der Protamine mit Phosphaten beider DNA-Stränge interagieren können, was wiederum für eine zweckmäßige Ladungsneutralisierung von entscheidender Bedeutung ist. Die großen Furchen ($22\text{\AA}/ 2,2\text{nm}$ weit und $8,5\text{\AA}/ 0,85\text{nm}$ tief) wären unter diesem Gesichtspunkt einige Ångström zu weit. HUD et al. 1994 unterstützen die Vorstellung der Bindung der Polyargininsequenz in der großen Furche und gehen dabei von der Form einer B-DNA aus. Durch die Bindung der Protamine an das „phosphodiester backbone“ der DNA erfährt diese eine Konformationsänderung zu einer modifizierten B-DNA, einhergehend mit einer Reduzierung der Basenstapelung, so dass eine Helixwindung nur noch aus $9\frac{1}{3}$ statt 10 Basenpaaren besteht. Neuere Studien bevorzugen die Bindung der Polyargininsequenz in der großen Furche (BREWER et al. 2003, VILFAN et al. 2004)

BREWER et al. 2003 beschreiben, dass die Argininreste, zusammengeballt in den sog. DNA-bindende „Anker-Domänen“ über das Zentrum des Protaminmoleküls verteilt sind. Die „Anker-Domäne“ besteht aus jeweils ca. 3-7 Argininresten und sind der wichtigste Faktor für die Kondensation und Stabilität des DNA-Protaminkomplexes. Zwischen den Argininanhäufungen sind eine oder mehrere ungeladene Aminosäuren angeordnet, die als „Gelenk“ fungieren, um die Umwindung der DNA innerhalb der großen Furche und optimale Interaktionen mit den negativ geladenen Phosphaten des „phosphodiester backbone“ zu ermöglichen. Inter- und intramolekulare Disulfidbindungen der Protamine spielen nur eine zweitrangige Rolle.

Bezüglich externer Einflüsse fassen RODMAN et al. (1984) eigene und Untersuchungen anderer Wissenschaftler über Protamin-DNA-Assoziationen zusammen und stellen fest, dass verschiedene Methoden, wie Röntgenbeugeuntersuchungen, Spektroskopie von Nukleoprotamin-Komplexen, thermodynamische Analysen der DNA-Protamin-Bindung und biochemische Charakterisierungen der Kernproteine zu gleichen Schlußfolgerungen führen: zum einen schwächen ansteigende Konzentrationen von NaCl die DNA-Protamin-Bindung, wodurch die elektrostatische Natur der Bindungen reflektiert wird. Dies wurde genauer untersucht von BIANCHI et al. (1994). Die Anzahl der Protamin-DNA-Komplexe nimmt deutlich bei NaCl-Konzentrationen zwischen 0,2 und 0,7 M ab. Zum anderen ist eine Reduzierung der Disulfidbindung unbedingt notwendig, um *in vitro* eine Dekondensierung des Spermienchromatins zu erzielen. Nur eine Reduzierung der Disulfidbrücken zusammen mit der Anwesenheit bestimmter NaCl-Konzentrationen führt zu einer Dekondensierung und Freisetzung definierter Fraktionen der Kernproteine. Die DNA-Protamin-Assoziation besteht also aus einem Zusammenspiel dieser beiden prinzipiellen Bindungsmöglichkeiten.

Es ist zu bemerken, dass ein großer Teil der Modelle bezüglich der Interaktionen der Protamine mit der DNA auf der Aminosäuresequenz des Rindes beruhen. Das Rind allerdings besitzt nur Prm 1. Über die Interaktionen von Prm 2 liegen bisher keine Daten vor. BIANCHI et al. (1994) vermuten aufgrund ihrer Untersuchungsergebnisse, obwohl sich Prm 1 und 2 strukturell deutlich von einander unterscheiden, dass sich beide Protamintypen in ihrem DNA-Bindungsverhalten äquivalent verhalten. Dennoch kann weiterhin nicht ausgeschlossen werden, dass gerade aufgrund struktureller Unterschiede sich die Protamine auch unterschiedlich in ihrem Bindungsverhalten zeigen. BENCH et al. 1996 gehen aufgrund ihrer Untersuchungen davon aus, dass jedes Prm 1-Molekül von ca. 10 bp DNA gebunden wird, jedes Prm 2-Molekül jedoch 15 bp in seine Bindung mit einbezieht.

2.6.3.2 Intermolekulare Interaktionen der Protamine

Bei der genaueren Untersuchung der Interaktionen der Protamine untereinander werden von BALHORN (1989) und BALHORN et al. (1991) zwei verschiedene Typen beobachtet: zum einen zwischen Prm 1-Molekülen (bei den Spezies, wie z.B. Rind, die nur Prm 1 besitzen), zum anderen zwischen Prm 1- und 2-Molekülen. Balhorn stellt 3 Modelle für Prm 1 vor:

Modell A: Die Protaminmoleküle sind entlang eines DNA-Stranges in abwechselnder Richtung angeordnet, so dass sich alternierend zwischen zwei aufeinander folgenden Carboxyl- oder Aminoenden, Disulfidbrücken ausbilden können (Abb. 6). Zwei Protaminmoleküle bilden dabei eine Dimer-Einheit.

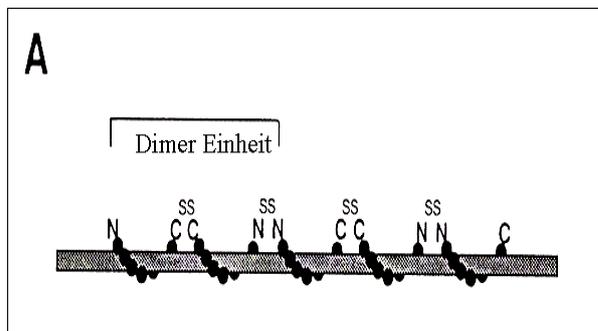


Abb. 6:

Darstellung der Anordnung der Protaminmoleküle entlang eines DNA-Stranges in abwechselnder Richtung

BALHORN (1989)

BALHORN et al. (1991).

Modell B: Die Protaminmoleküle sind auf einem DNA-Strang entlang einer Richtung angeordnet. Die Protaminmoleküle zwei benachbarter DNA-Stränge, die ebenso in die gleiche Richtung ausgerichtet sind, bilden zwischen den sich jeweils gegenüber liegenden Carboxyl- und Aminoenden Disulfidbrücken aus.

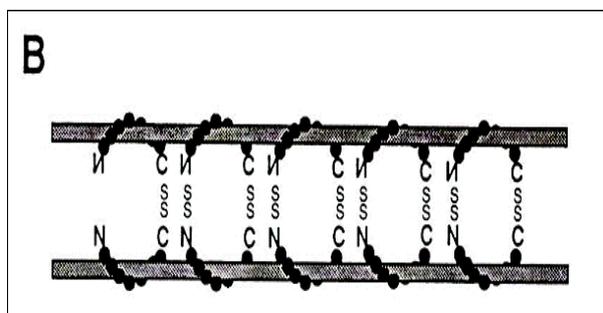


Abb. 7:

Darstellung der Anordnung der Protaminmoleküle entlang eines DNA-Stranges in jeweils gleicher Richtung

BALHORN (1989),

BALHORN et al. (1991).

Modell C: Die Protaminmoleküle sind auf zwei benachbarten DNA-Strängen in gleichem Rhythmus in abwechselnder Richtung angeordnet und bilden so jeweils zwischen zwei sich gegenüber liegenden Amino- oder Carboxylgruppen Disulfidbrücken aus.

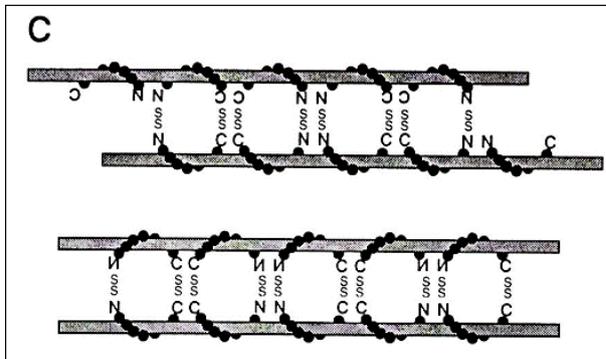


Abb. 8:

Darstellung der Anordnung der Protaminmoleküle auf zwei benachbarten DNA-Strängen

BALHORN (1989)

BALHORN et al. (1991).

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Prm 1-Moleküle in Form einer anderen Dimer-Einheit an die DNA binden könnten. Es wurde festgestellt, dass die Protaminkomponenten, die an dieser Dimer-Ausbildung beteiligt sind, nicht durch Disulfidbrücken mit einander verbunden sein können. Aufgrund der Unlöslichkeit der Dimer in Mercaptoethanol, aber Löslichkeit in 6N HCl wurde angenommen, dass die beiden Proteine durch eine Ester-Bindung verbunden sind (BALHORN 1989).

Über Interaktionen zwischen Prm 1 und 2 liegen weniger Informationen vor.

Die sogenannten Dimer konnten zwischen Prm 1 und 2 noch nicht festgestellt werden. Es wird angenommen, dass die beiden verschiedenen Protamintypen über intermolekulare Disulfidbrücken mit einander verbunden sind, da beide nicht aus Spermienchromatin ohne vorausgehende Reduzierung dieser Bindungen isoliert werden können. Es ist nicht bekannt, ob die Disulfidbrücken direkte Verbindungen darstellen oder ob noch weitere Peptide oder Proteine daran beteiligt sind. (BALHORN et al. 1989)

VILFAN et al. 2004 liefern neuere Untersuchung zu inter- und intramolekularen Bindungen innerhalb der Protamine. Die Modelle von BALHORN (1989) lassen Fragen offen, wie Cys-5 – Cys-22 und Cys-38 – Cys-38 (BALHORN et al. 1991) die intermolekularen Disulfidbrücken darstellen.

cken in diesen Konstellationen ausbilden können. Zusätzlich steht die Vorstellung der Aneinanderreihung von Carboxyl- und Aminoenden benachbarter Protamine im Widerspruch zur kompletten Oxidation aller Cysteinreste und hexagonal dicht gepackten DNA. Zwei intramolekulare Disulfidbindungen bestehen zwischen Cys-6 – Cys-14 und Cys-39 – Cys-47 und bedingen ein Einfalten der Carboxyl- und Aminoenden. Die Disulfidbindung zwischen zwei Cys-38 zwei benachbarter Protamine führen dazu, dass jeweils die Carboxylenden aneinander gelagert werden („tail-to-tail“). Zwischen Cys-5 und Cys-22 bilden sich intermolekulare Bindungen zwischen Protaminen aus, die an unterschiedliche DNA-Stränge angelagert wurden. 4 Umdrehungen einer B-Form-DNA werden von 2 Dimeren, d.h. 4 Protaminmolekülen durch Bindung in der großen Furche neutralisiert (Abb. 9 und Abb. 10).

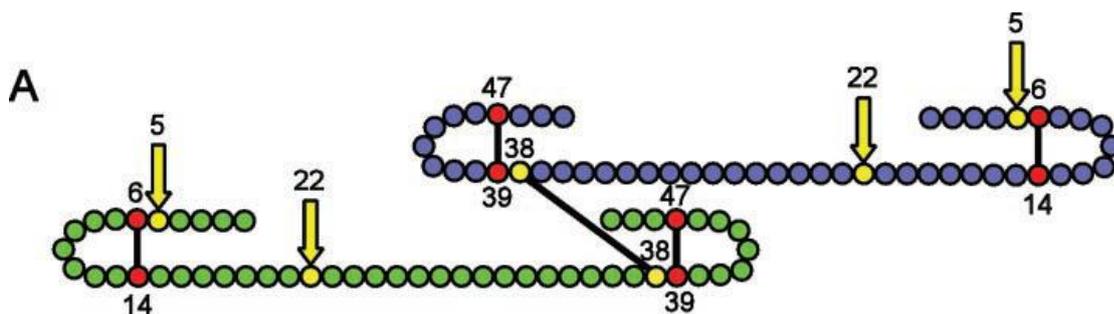
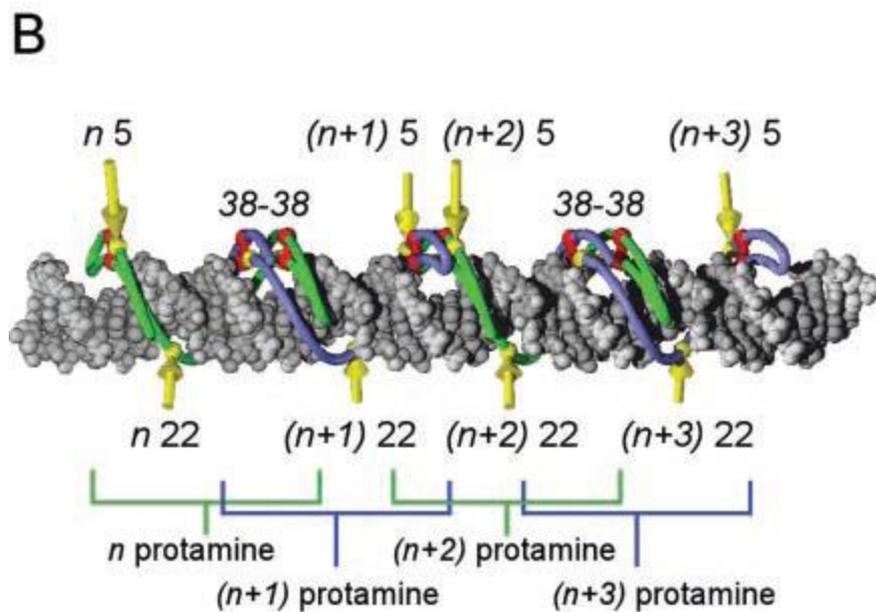


Abb. 9:

Ein Dimer, bestehend aus zwei an den Enden eingefalteten Protaminmonomeren (Rind), verbunden durch Cys-38 – Cys-38- Disulfidbrücken. Rot: Cysteinreste, die an intramolekularen Disulfidbrücken beteiligt sind. Gelb: Cysteinreste, die an intermolekularen Disulfidbrücken beteiligt sind (nach VILFAN et al. 2004).

**Abb. 10:**

Vier Umdrehungen einer B-DNA bilden einen Komplex mit zwei Protamin-Dimern. Jeder Dimer bindet in der großen Kuvertur über zwei Umdrehungen. Die eingefalteten Enden der Protaminmoleküle zeigen dabei nach außen (nach VILFAN et al. 2004).

2.6.3.3 Teriärstruktur und räumliche Anordnung der Protamin-DNA-Komplexe im Spermienzellkern

BALHORN (1982) schlägt vor, dass die elektrostatisch neutralisierten Protamin-DNA-Komplexe besonders dicht gepackt werden könnten, wenn die Anteile der Protamine, die aus den kleinen Furchen hervorragen, inklusive der C- und N-Termini, die mit der Polyargininsequenz interagieren, in der großen Furche eines benachbarten Protamin-DNA-Moleküls positioniert und durch van-der-Wals-Kräfte zusammengehalten werden.

RISLEY et al. (1986) vergleichen protamin- mit histonhaltiger Amphibien-DNA und stellen fest, dass die protaminhaltige DNA ein lineares „DNA-Packaging“ aufweist.

Elektronenmikroskopische Studien an Spermienzellkernen der Ratte (KOEHLER et al. 1983) stellen das Chromatin angeordnet in parallel zur Längsachse des Zellkerns verlaufenden Lamellen dar. Andere Untersucher wie SISPSKI und WAGNER (1977) oder LIVOLANT (1984) schlussfolgern aufgrund ihrer Beobachtungen, dass sich das Säugetier-Chromatin wie ein liquides Kristall („liquid crystal“) darstellt. In einer viskösen Flüssigkeit sind in linearer Anordnung die DNA-Stränge eingelagert. Die einzelnen DNA-Stränge, die Ebenen bilden, sind dabei in definierter Weise in einem variierendem Winkel zu einander angeordnet („cholesteric liquid crystal“)

WARD und COFFEY (1991) sind der Meinung, dass die „somatischen“ superspiralisierten DNA-Filamente in der sogenannten Solenoid-Konfiguration (der Durchmesser eines Filaments beträgt 30 nm) nach jeweils einer Länge von ca. 60 000 bp an der Zellkernmatrix unter Ausbildung sogenannter DNA-Loops befestigt sind. Auch für die linearen Protamin-DNA-Komplexe wird festgestellt, dass diese durch Verbindungen mit der Kernmatrix „Loops“ ausbilden, jedoch von wesentlich geringerer Größe (WARD et al. 1989) und ohne Superspiralisierung. Eine weitere Besonderheit des Spermienchromatins stellt der Kernannulus dar, der erstmals 1989 von WARD et al. als „DNA-Anker“ in Spermien beschrieben wurde: auch bei kompletter Dekondensierung des Chromatins bleiben lange DNA-Stränge mit dem Anulus verbunden.

WARD (1993) vergleicht die Tertiärstruktur der DNA in somatischen Zellen und Spermienzellen (Tab. 2):

Stufe	Hierarchie der DNA-Organisation in somatischen Zellen	Hierarchie der DNA-Organisation in Spermienzellen
1	2 komplementäre DNA-Stränge bilden eine Doppel-Helix.	2 komplementäre DNA-Stränge bilden eine Doppel-Helix. WARD 1993
2	Jeweils 200 bp DNA sind um ein Histonoktamer zu einem Nukleosom angeordnet. MC GHEE u. FELSENFELD 1980	Austausch der Histone und Ausbildung eines linearen Protamin-DNA-Komplexes. BALHORN 1982
3	6 Nukleosome ordnen (superspiralisieren) sich in einer Umdrehung zu einem Solenoid mit einem Durchmesser von 30 nm an. FINCH und KLUG 1976	Linear aneinander angelagerte DNA-Protamin-Komplex-Filamente bilden DNA-Loops von geringerer Größe und ohne Superspiralisierung. WARD et al. 1989
4	60 kbp bilden jeweils eine an der Kernmatrix befestigte DNA-Loop (Schleife) aus. PIENTA u. COFFEY 1984, NELSON et al. 1986	Sperm-DNA-Doughnut-Modell WARD 1993
5	Kondensierung der Solenoid-Konfiguration: Radial-Loop-Modell Radial-Coil-Modell. PIENTA et al. 1991	Kondensierung des Doughnut-Modells: Zusammenlagerung der Doughnuts zu rundlichen Gebilden (Tori), die jeweils eine DNA-Loop repräsentieren (Durchmesser ca.65 nm). WARD 1993 ALLEN et al. 1993

Tab. 2:

Zusammenfassung der Unterschiede der DNA-Organisation in Spermien- und somatischer Zelle (nach WARD 1993)

ALLEN et al. (1993) stellen fest, dass Spermien-DNA nicht in Form von langen Faserbündeln, sondern als knotenartige Gebilde mit einem Durchmesser von ca 50-100 nm vorliegt.

WARD (1993) geht von dem gleichen Grundgedanken aus. Jeder 60 nm-Nodulus repräsentiert eine DNA-Loop. Ausgangsposition für den Austausch der Histone durch Protamine und die Umgestaltung der DNA-Organisation in das Doughnut-Modell ist die Solenoid-Konfiguration.

Eine Solenoid-Umdrehung besteht aus sechs kreisförmig angeordneten Nucleosomen, das heißt, eine Solenoid-Umdrehung besteht aus 13 DNA-Superhelices, zwei für jedes Nucleosom und eine für das Solenoid selbst. Aus einer Solenoid-Umdrehungen werden nun durch Entfernung aller Nucleosome (Histonaustausch gegen Protamine) bis auf eines und damit einhergehende Entspiralisierung zwei DNA-Zirkel, denen linear die Protamine angelagert sind. Fortlaufend, mehr oder weniger parallel angeordnete DNA-Zirkel bilden so eine Spermien-DNA-Loop. Abschließend fällt diese aus Spiralen bestehende DNA-Loop wie ein zusammengelegter Gartenschlauch zusammen und bildet einen Torus („Doughnut“) mit einem äußeren Durchmesser von ca. 65 nm, einem inneren Durchmesser von 32,5 nm und einer Höhe von 25nm (Abb. 11 und 12).

HUD et al. (1993) kommen zu gleichen Ergebnissen. Die Autoren beschreiben die fundamentale Grundeinheit des Spermienchromatins mittels Atomic Force Mikroskopie als toroidale Gebilde mit einem äußeren Durchmesser von 500 bis 1000 Å, einem inneren von ca. 150 Å und einer Dicke von ca. 200 Å (10 Å entsprechen 1nm). Sie finden weiterhin heraus, dass die einzelnen toroidalen Strukturen durch ca. 300 Å lange und 90 Å dicke lineare Strukturen verbunden sind. Unter Beachtung des kalkulierten DNA-Gehaltes von 60kbp eines jeden Toroids (ARSCOTT et al. 1990) und der Größe des haploiden Säugetiergenoms wird geschätzt, dass jeder Spermienzellkern ca. 50.000 solcher toroidalen Strukturen eng an einander gepackt enthält.

Das Doughnut-Modell berücksichtigt, dass Protamine der Länge nach in den Furchen der DNA binden, dass auch für Spermien-DNA „Loops“ existieren, dass die Spermien-DNA nicht superspiralisiert ist und dass das Volumen des Spermienzellkerns größer ist, als bisher angenommen sowie Spermien-DNA in ca. 60nm-großen „Noduli“ zusammengeballt vorgefunden wurde (ALLEN et al. 1993)

Bei diesem Modell ist zu beachten, dass der nicht komplette Austausch der Nukleosomen, der Spermien-DNA-Organisation z.B. beim Menschen entspricht, wo ca. 15% der Spermien-DNA an Histone gebunden bleiben. Bei allen anderen bisher untersuchten Säugetieren wird jedoch von einem vollständigen Austausch der Histone ausgegangen.

Das Doughnut-Modell stellt zusammengefasst eine fundierte Vorstellung über die Spermien-DNA-Organisation dar. WARD (1993) weist jedoch daraufhin, dass es sich nur um eine mögliche Annahme handelt, wie die Verhältnisse vorliegen könnten und weitere Abklärungen notwendig sind, die z.B. auch einen Histon-Protamin-Austausch über Transitionsproteine berücksichtigen.

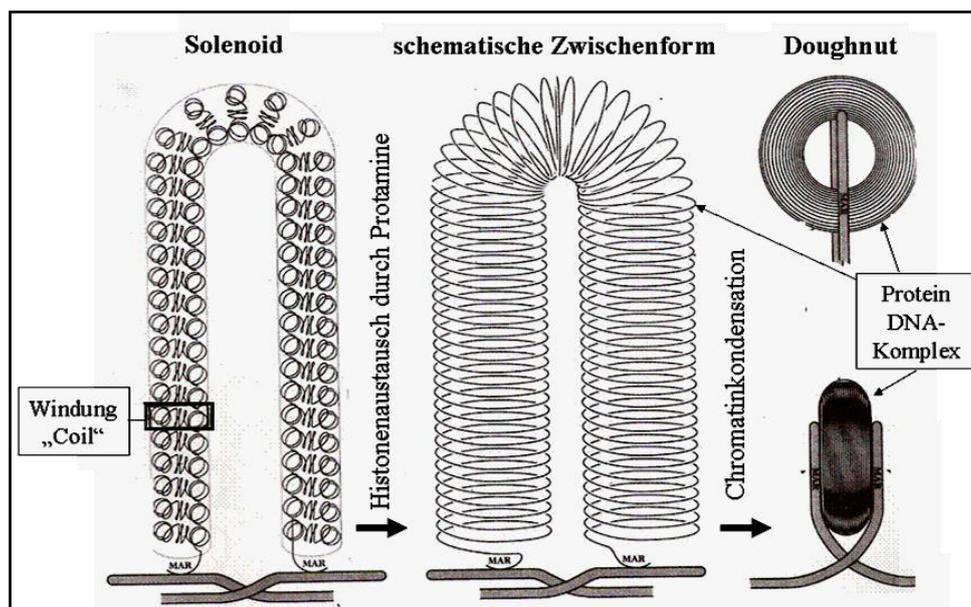


Abb 11:

Modell eines Vergleichs von Solenoid- und Doughnut-Struktur (aus WARD 1993)

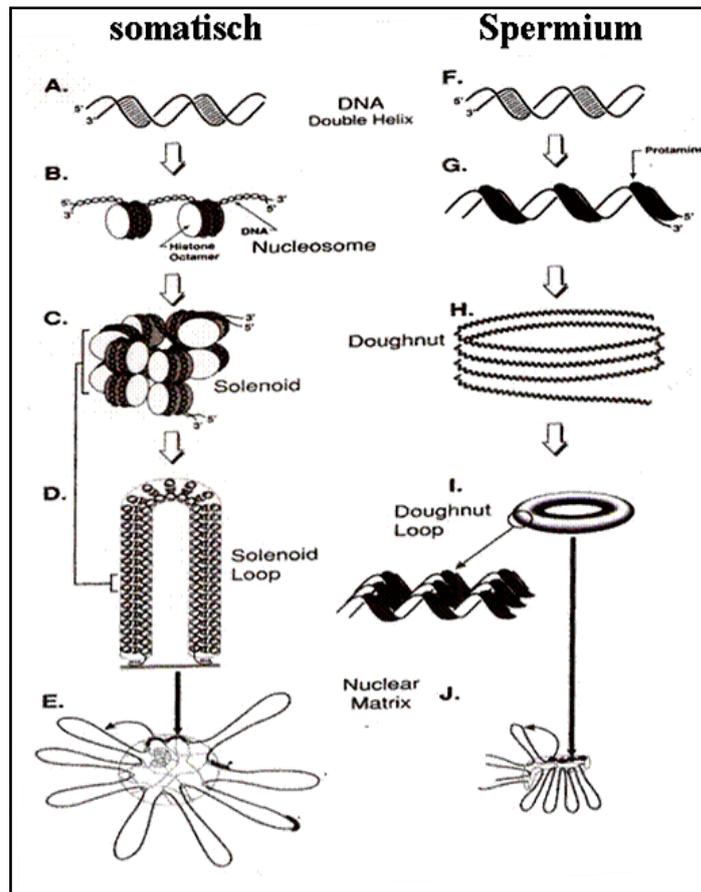


Abb. 12:

Zusammenfassung der Gegenüberstellung der Modellvorstellung der Verhältnisse in somatischen Zellen und Spermienzellen (aus WARD 1993)

RAUKAS und MIKELSAAR (1999) verschaffen sich einen kritischen Überblick über die bis dato erbrachte Literatur, werten diese für sich neu aus und stellen die Existenz des bisher diskutierten Protamin-DNA-Moleküls in Frage. Ihrer Meinung nach sind die DNA-Helices parallel in einem x- y- z- Koordinatensystem entlang der z-Ebene hexagonal angeordnet. Die Abstände Zentrum-zu-Zentrum der einzelnen Helices betragen abhängig von der relativen Feuchtigkeit des untersuchten Mediums nach ihren Ermittlungen minimal 22 bis maximal 30 Å. Die hexagonal angeordneten DNA-Stränge rotieren relativ zur z-Ebene um 0, 120, bzw.

240°. Durch diese räumliche Anordnung entstehen zwischen den DNA-Molekülen in den Bereichen ihrer großen Furchen zwei unterschiedliche gestaltete Hohlräume (siehe Abb. 13), in die die Protamine eingelagert werden. Nach diesem Schema ergibt sich, dass ein DNA-Molekül von jeweils 3 Protamin-Molekülen umgeben wird, bzw. ein Protaminmolekül nicht nur einem DNA-Molekül zuzuordnen ist und somit „Verbindungsstücke“ in dem DNA-Helix-Gitter darstellen. Die beiden Autoren gehen davon aus, dass der Protamin-DNA-Komplex elektrostatisch oder mittels Van der Waals-Kräfte, eventuell auch durch einige Wasserstoffbrücken, zusammen gehalten wird.

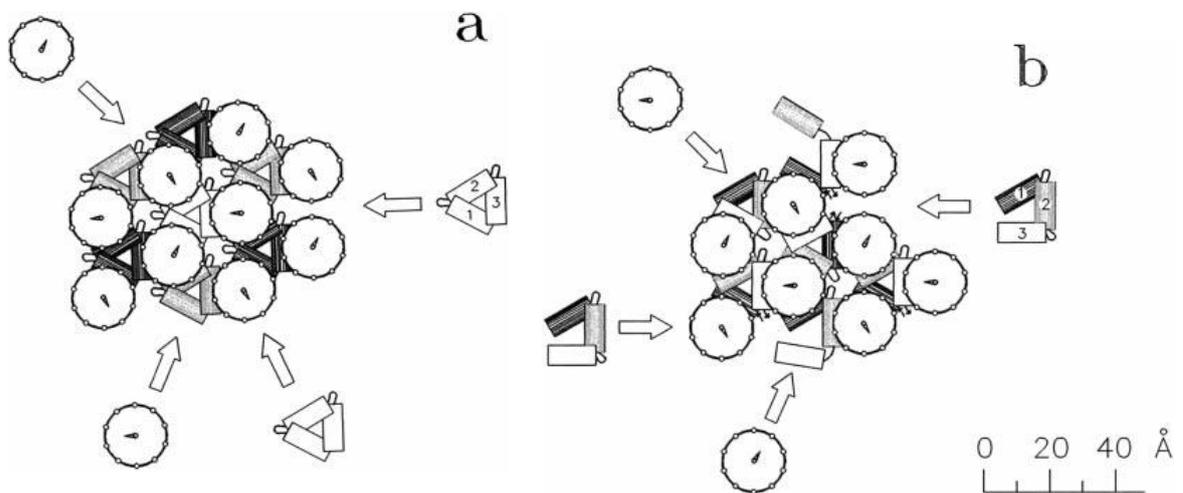


Abb. 13:

Darstellung der x-y-Ebene des dreidimensionalen Protamin-DNA-Modells von RAUKAS und MIKELSAAR (1999). Die Kreise stellen die entlang der Z-Achse verlaufenden DNA-Doppelhelices dar. Die Zeiger in der Mitte der Kreise zeigen die Rotation entlang der Z-Achse an. Daraus ergeben sich zwischen drei aneinandergelagerten Doppelhelices zwei unterschiedliche Arten von Hohlräumen (Abb. 13 a und b) Die Protamine sind als kleine Rechtecke dargestellt.

a) Bei dieser Art der entlang der z-Achse rotierten Doppelhelices, ergeben sich großräumige Aussparungen zwischen den großen Furchen.

b) Bei dieser Anordnung ergeben sich Kanäle, in denen die großen Furchen der drei aneinandergrenzenden DNA-Moleküle, eine linksgängige Helix auf der inneren Oberfläche des Kanals ausbilden.

VILFAN et al. 2003 schlagen ein Modell vor, das ihrer Meinung nach das Erste ist, das eine komplette Oxidation aller Cysteinreste innerhalb einer hexagonalen Anordnung der Protamin-DNA-Komplexe erklärt: sieben ihrer bereits erörterten Protamin-DNA- Komplexe ordnen sich in einem engen hexagonalen Gitter so an, dass Cysteinreste 22 und 5, benachbarter Komplexe nochmals Disulfidbrücken ausbilden.

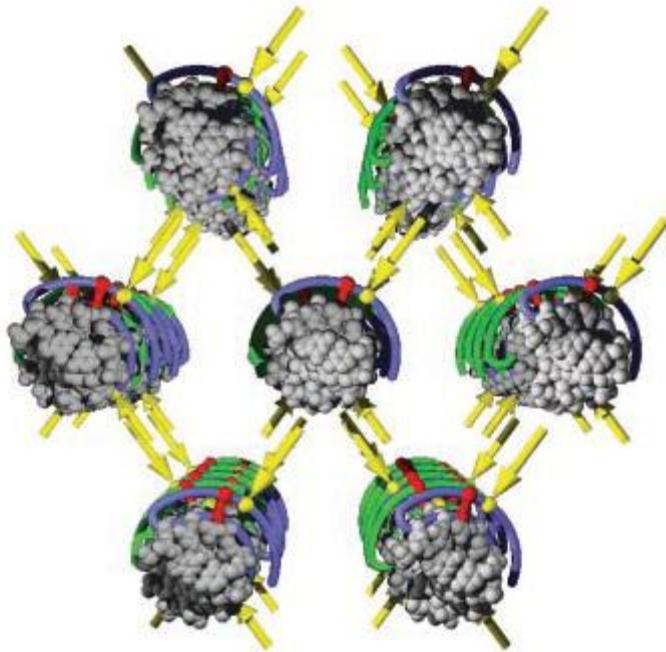


Abb. 14:

Hexagonal angeordnete Protamin-DNA-Komplexe (Rind), gelbe Pfeile markieren Disulfidbindungen zwischen Cysteinresten 5 und 22 benachbarter Komplexe (aus VILFAN et al. 2004)

2.6.4 Funktion und Bedeutungen der Protamine für das Spermium

Über die Funktionen und daraus resultierenden Bedeutungen der Protamine für das Spermium ergeben sich beim Studium der umfangreichen Literatur verschiedene Überlegungen.

BLOCH (1969) stellt fest, dass keine Korrelation zwischen verschiedenen Aspekten der Spermienfunktion und dem Typ der Kernproteine innerhalb verschiedener taxonomischer Gruppen erkennbar wäre. Die Variabilität der Kernproteine reflektiert für ihn die evolutionäre Gleichgültigkeit gegenüber relativ unwichtigen Proteinen in einem inaktiven Zellkern wieder.

BALHORN (1989) und MEISTRICH (1989) teilen die Ansicht, dass die Bindung der Protamine das „Phosphodiester-backbone“ der DNA neutralisiert und so eine engere Zusammenlagerung der DNA-Stränge aneinander ermöglicht wird. Diese Kompaktierung geht einher mit einem biochemisch inerten Zustand. Der Protamin-DNA-Komplex ist unlöslich, enzymatische Prozesse, wie „DNA-Repairing“ werden inhibiert und das Genom verbleibt inaktiv. Auch gegen exogene (z.B. mutagene) Einflüsse ist die kompakte DNA besser geschützt.

Diese erhöhte Resistenz wird durch Unempfindlichkeit später Spermatiden und Spermien gegenüber Verdauung durch Deoxyribonuclease demonstriert (MEISTRICH et al. 1976).

SIDNEY und GRIMES (1986) beschreiben, dass die Protamine nicht durch verdünnte Säuren, so wie hohe Salz- oder Harnstoffkonzentrationen aus dem Komplex entfernt werden können, wenn nicht zuvor mit stark reduzierenden Agenzien, wie Mercaptoethanol (zur Lösung der Disulfidbrücken der Protamine) inkubiert wurde. Der Säugetier-Spermienzellkern ist stabil gegen Ultraschallbehandlung, Trypsin- oder DNase-Verdau, sowie hypotone Lösungen und Detergentien. Diese Behandlungen zerstören normalerweise Zellen und ihre Komponenten. SUBIRANA (1975) stellt fest, je stärker die basischen Eigenschaften der Protamine sind, desto höher ist die Kernkondensierung und folglich die Effektivität der zuvor erwähnten Eigenschaften.

WOLFE (1981) nimmt an, dass die Funktion des Histon-Protamin-Austausches darin besteht, durch die starke Kondensierung den Spermien eine stromlinienförmige Gestalt zu verleihen, das Gewicht und Volumen zu reduzieren, um die Motilität der Spermienzelle zu erhöhen.

KASINSKY (1989) ergänzt diesen Gedanken durch die Beobachtung, dass in Krustaceen, die keine motilen Spermien besitzen, bisher keine basischen Spermienproteine nachgewiesen werden konnten (VAUGHN und HINSCH 1972). Laut BELLVE (1982) liegen, was die

Spermienkopfgestalt verschiedener Tierarten betrifft, keine Anzeichen vor, dass zwischen den dominierenden Protamintypen und der Spermienkopfgestalt ein Zusammenhang besteht.

Von besonderem Interesse bezüglich der Diskussion von Funktion und Bedeutung der Protamine für die Spermienzelle, ist die Tatsache, dass Protamin 2 bisher nur bei wenigen Tierarten isoliert werden konnte.

BENCH et al. (1996) veröffentlichen eine Studie über DNA- und Protamingehalte in fertilen, männlichen Säugetieren. Die Autoren beschreiben hier für das Pferd einen Prm 2-Anteil von 14% am totalen Protamingehalt. Für Hamster, Mensch und Maus wurden diese Werte mit 34%, 43% und 67% angegeben. Wie aus anderen Veröffentlichungen bekannt ist, weisen Bulle (COELINGH et al. 1972, MAZRIMAS et al. 1986), Schwein (TOBITA et al. 1982 und 1983), Meerschweinchen (CALVIN 1976) und Ratte (KISTLER et al. 1976, BUNICK et al. 1990) hingegen keine nachweisbaren Prm 2-Level auf. Die Studie von BENCH et al. (1996) stellt fest, dass, obwohl die relativen Verhältnisse zwischen Prm 1 und Prm 2 stark variieren, das Verhältnis von Gesamt-Protamin-Gehalt zu Gesamt-DNA-Masse bei Rind, Pferd, Hamster und Maus konstant erscheint. Im Gegensatz dazu, weist der Mensch einen geringeren Gesamtgehalt an Protaminen auf, der auf die Persistenz von 15% Histonen an der Verpackung der humanen DNA zurück geführt wird. Studien von CORZETT et al. (2002) bauen auf diese Ergebnisse auf und stellen fest, dass der Gesamtprotamingehalt (ca. 3,0 pg/ Zelle), sowie das Verhältnis zwischen dem Gesamtprotamin- und DNA-Gehalt konstant ist. Daraus wird gefolgert, dass je größere Mengen an Prm 2 bei einer Spezies vorhanden sind, desto niedriger müssen die Prm 1-Anteile sein. Dies wiederum bringt die Schlußfolgerung mit sich, dass die beiden Protamintypen nicht in einer universellen Stoichiometrie mit einander und mit der DNA reagieren können. Die Autoren berechnen, dass ein Prm 1-Molekül mit 10 bp DNA eine Bindung eingeht, während ein Prm 2-Molekül in der Lage ist 15 bp DNA zu binden und somit effektiver „arbeitet“.

PERREAULT et al. (1988) untersuchen das Dekondensierungsverhalten von Prm 2-haltigen Spermienzellkernen und solchen ohne dieses Kernprotein, indem sie die verschiedenen Spermienzellkerne in Hamster-Oozyten injizierten. Dabei stellten sie fest, dass die Prm 2-haltigen schneller dekondensieren. Anhand der Ergebnisse stellten sie folgende Reihenfolge der Dekondensierungsraten auf: Mensch > Maus > Hamster > Ratte > Rind. Mit Ausnahme der

Spermienzellen des Menschen, der als einzige der untersuchten Spezies im Spermium auch noch Histone aufweist und insgesamt einen niedrigeren Protamingehalt von ca. 18% aufweist (BENCH et al. 1996), korreliert die Reihenfolge mit den Prm 2-Gehalt dieser Tierarten.

BALHORN (1989) vermutet, dass zum einen aufgrund des vorhandenen (in Prm 2) oder fehlenden (in Prm 1) Histidin-Gehaltes, zum anderen aufgrund der relativ beständigen Lokalisierungen von Cystein-Resten innerhalb der jeweiligen Proteinmoleküle, die beiden Protamintypen mit unterschiedlichen Enzymen oder Liganden reagieren. Histidin und Cystein sind so genannte metallbindende Proteine und bilden zusammen mit Zink den „Zinkfinger“. Zinkfinger-Proteine werden nach MITCHELL und TJIAN (1989) in zwei verschiedene Prototypen unterteilt, die auf unterschiedlichen Anteilen von Cystein und Histidin beruhen (namentlich Cys2-Cys2 und Cys2-His2). Metallbindende Finger-Strukturen findet man bei vielen Proteinen (STRYER 2007), die sich an Nukleinsäuren binden, auch bei Transitionsproteinen (BASKARAN und RAO 1991). Zinkfingerstrukturen sind in regulierenden Transkriptionsfaktoren enthalten und können spezifische Gene oder Gengruppen durch Bindung an die DNA aktivieren oder auch inaktivieren. Unterschiedliche Histidin und Cystein-Gehalte könnten eine veränderte Metallbindungsfähigkeiten bewirken und somit Struktur und Wirkung zinkfingerenthaltender Elemente, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, beeinflussen. Im einfacheren Falle könnte schon die Nähe multipler Histidin- und Cystein-Reste Chelatbildungen auslösen (BALHORN 1989).

BIANCHI et al. (1994) stellen fest, dass das Zinkfingerprotein Prm 2 nicht durch veränderte Zinkkonzentrationen, in den Interaktionen mit der DNA beeinflussbar war. Die Zinkfingerstruktur scheint also für den Protamin-DNA-Komplex nicht von großer Bedeutung zu sein, könnte aber andere biologische Funktionen erfüllen, wie z.B. Kerntransport der neu synthetisierten Protamine oder Konkurrenz mit Transkriptionsfaktoren. BENCH et al. (2000) unterstützen die Annahme solcher „Funktionen“ und stellen fest, dass bei fünf von sechs untersuchten Spezies, die Mehrheit des in der Spermienzelle vorhandenen Zinks an Protamine gebunden ist und der Zinkgehalt ausreichen würde, jedes Prm 2-Molekül mit einem Zink-Molekül zu binden.

Andererseits behaupten BREWER et al. 2002, dass die Anwesenheit von Zink, die Prm 2-DNA-Bindungsrate um das 3-fache erhöht. Sie nehmen an, dass die Bindung von Zink eine Strukturumwandlung des Prm 2 bedingt und somit die Bindung an die DNA erleichtert wird.

Studien von BALHORN et al. (1988) am Chromatin normaler und infertiler menschlicher Spermien ergaben Hinweise, dass Prm 2 eine entscheidende Rolle bei der Chromatinorganisation und Fertilität spielt. In infertilen Spermien, insbesondere solche mit vergrößerten Spermienköpfen, konnte ein deutlich reduzierter Prm 2- oder ein erhöhter Prm 1-Gehalt festgestellt werden.

CARELL und LIU (2001) stellen fest, dass bei 13 von 75 infertilen Männern, Prm 2 abwesend war und dass bei allen 50 fertilen Probanden das Protein festgestellt werden konnte. Sie stellen eine Korrelation zwischen niedrigem Prm 2-Level und geringer Spermiedichte, reduzierter Motilität und morphologischen Abnormalitäten fest.

STEGGER et al. (2003) beschäftigen sich genauer mit dem Prm 1/Prm 2-Verhältnis bei fertilen und infertilen Männern. Sie stellen fest, dass infertile Männer einen deutlich reduzierten Prm 1-Gehalt vorwiesen, woraus geschlossen wird, dass insbesondere Prm 1 einen kritischen Faktor darstellt. STEGGER et al. 2007 weiten ihre Untersuchungen diesbezüglich aus und stellen fest, dass Männer mit einer normalen Spermatogenese gleiche Anteile von Prm 1 und 2 aufweisen. Infertile Männer zeigen einen geringeren Anteil an beiden Protaminen, wobei Prm 2 einen stärkeren Abfall aufweist. Sie diskutieren im Zusammenhang mit abnormaler Protaminexpression einen in der Funktion gestörten Regulator der Transkription und Translation oder gestörte post-translationale Modifikationen.

KEMPISTY et al. (2007) zeigten ähnlich, dass sowohl reduzierte Prm 1 und Prm 2-Werte im Zusammenhang mit einer gestörten Spermatogenese festgestellt werden können.

Fasst man die Untersuchungen zusammen, stellt man fest, dass keine eindeutige Erklärung bisher dafür gegeben werden kann, warum Prm 2 bei bestimmten Tierarten vorhanden ist und bei anderen nicht, warum eine so hohe quantitative Variabilität besteht, wie die defizienten Tierarten das Fehlen kompensieren und wie insgesamt die Zusammenhänge bezüglich der Auswirkungen der Protamine auf die Funktion der Spermatogenese zu bewerten sind.

2.7 Stadienspezifische Transkription und Expression der Protamine und Transitionsproteine

Der erste Schritt des Prozesses des „Chromatin-remodeling“ findet in den haploiden runden Spermatiden statt und geht einher mit dem Austausch der Histone gegen Transitionsproteine. Im weiteren Verlauf werden in den sich elongierenden Spermatiden die Transitionsproteine wieder gegen Protamine ausgewechselt (KEMPISTY et al. 2007).

Der zeitliche Ablauf der entsprechenden mRNA- und Proteinexpression ist genau festgelegt und wurde für verschiedene Tierarten untersucht.

Bei der Maus beginnt die mRNA-Transkription von Tp 1 und 2 in späten runden Spermatiden step 7 und dauert bis step 13. In Spermatiden step 10 bis 11 befinden sich noch Histone und bisher nur wenige Transitionsproteine. Maus-Spermatiden step 12 bis 14 enthalten fast ausschließlich Transitionsproteine und nur geringfügige Anteile an Protaminen (MEISTRICH et al. 2003, Übersicht bei STEGER 2002). Maus Prm 1 und 2-mRNA wird in den Spermatiden step 7 bis step 14, bzw. bis step 15 synthetisiert (MALI et al. 1989). Die Prm1 und 2-Proteine erscheinen in den Spermatiden step 12 bis step 15 (HECHT 1990).

Bei der Ratte beobachtet man Tp1-mRNA in Spermatiden step 6 bis 16 (HECHT 1990) und das korrespondierende Protein in Spermatiden step 12 bis 15 (KISTLER et al. 1996). Prm 1-mRNA befindet sich in den Spermatiden step 7 bis 16 (HECHT 1990) und das Protein in den Spermatiden step 12 bis 19 (KISTLER et al. 1996).

Beim Menschen findet sich Tp 1-mRNA in Spermatiden step 2-4, das dazugehörige Protein in step 3 bis 4. Tp 2-mRNA lässt sich lokalisieren in späten runden und elongierenden Spermatiden (WYKES et al. 1995), das dazugehörige Protein findet sich in step 1 bis 5. Prm 1 und 2-mRNA wurden zeitgleich in step 1 bis 4 und die Proteine in step 4 bis 8 festgestellt. In Ratte, Schwein, Schaf und Rind wurden bisher zwar Prm 2-mRNA-Transkripte detektiert, aber keine dazugehörigen Proteine lokalisiert (STEGER et al. 1998, STEGER 1999, Übersicht bei STEGER 2002).

LEE et al. 1987 konnten in Hoden 7 Monate alter Rinder mRNA für Prm 1 nachweisen. Dieser Testis enthält 10-15% runde Spermatiden, aber noch keine maturen Spermien. Mit RNA aus Hodengewebe jüngerer Tiere, in denen noch ausschließlich diploide Keimzellen vorhanden sind, konnte keine Hybridisierung mit der Bullenprotamin-cDNA-Probe erhalten werden. Das Signal in den 7 Monate alten Hoden und nicht in den Hoden jüngerer Tiere spricht für eine post-meiotische Expression des Protamin-Gens während der Spermatogenese des Bullen.

STEGER (2002) gibt eine Übersicht über Kontrollmechanismen der Translation und Transkription in diesem Zusammenhang. Bei der transkriptionalen Regulation spielen (De)methylierungen von Cytosinen in der Promotorregion der DNA eine Rolle. Die DNA-Methylierung bedingt eine Herabsetzung der positiven Ladungen und somit eine Herabsetzung der Anziehungskraft von z.B. Histonen zur DNA, so dass die Gene in eine aktive Form übergehen können. Doch Methylierungen alleine sind nicht ausreichend für die Initiation der Transkription, so dass bestimmte Proteine in der Promoterregion der Gene zu binden haben. Z.B. die TATA-Box ist in allen Protamin-Genen und in dem Transitionsprotein 1-Gen zu finden. An diese Region bindet das TATA-bindende Protein (TBP) und initiiert dadurch die RNA-Synthese. Das TBP ist in runden Spermatiden in 1000fach höherer Konzentration nachgewiesen worden als in somatischen Zellen. Eine weitere Rolle spielt das cAMP-response-Element (CRE), an das entweder das cAMP-response-bindende-Protein (CREB) oder das cAMP-response-Modulatorprotein (CREM) binden. Diese Proteine werden aktiviert durch Proteinkinase K-Phosphorylierungen. Die Proteinasen sind nicht einheitlich und variieren bei verschiedenen Protamintypen oder auch bei verschiedenen Tierarten (PIRHONEN et al. 1994). Die Regulation der Genexpression auf translationaler Ebene wird bewirkt durch Proteinbindungen an die 3'untranslated region (UTR) (BRAUN et al. 1989) oder den Poly-A-Schwanz der Transkripte. Bevor die transkribierte mRNA in Ribonukleoproteinpartikeln zur Lagerung verpackt wird, wird das Transkript ergänzt mit einem Poly-A-Schwanz bestehend aus 180 Adenylresten an seinem 3'Ende. Bevor nun wiederum in den elongierenden Spermatiden die Translation initiiert wird, ist es notwendig, dass an dem Poly-A-Schwanz eine Deadenylierung, d.h. Kürzung stattfindet. In Mäusen korreliert die Länge der Poly-A-Sequenz von Transitionsprotein- und Protamin-m-RNA mit der translationalen Aktivität der Transkripte.

2.8 Homologien

2.8.1 Tp 1

Für Tp 1 beschreiben REINHART et al. (1991) unter Säugetieren (Mensch, Maus, Ratte, Bulle, Eber) eine Ähnlichkeit von 83 bis 98%. Diese hohe Übereinstimmung des Tp1-Gens wird von KEIME et al. (1992) bestätigt, so dass diese daraus eine speziesunabhängige Funktion für die Kernkondensation schließen.

2.8.2 Tp 2

REINHART et al. (1991) beschreiben erstmals die Nucleotidsequenz und Organisation des Gens für Bullen-Tp 2. Die kodierende Sequenz Sequenz der cDNA stimmt nur noch zu etwa 70% mit der von Nagern überein. Auf der Ebene der Aminosäuresequenz liegt lediglich nur noch eine Übereinstimmung von 45 bzw. 43% vor. Die Autoren bemerken jedoch, dass die evolutionäre Divergenz nicht zu Lasten der basischen Aminosäuren geht, die für die DNA-Protein-Interaktionen in dem sich kondensierenden Spermienkern von Bedeutung sind.

2.8.3 Prm 1

Viele Haussäugetiere weisen nur Prm 1 auf, das bei allen diesen Tieren eine relativ einheitliche Struktur vorweist. Die aminoternale Region (Rest 1-12) ist bei allen untersuchten Tierarten durch die hochkonservierte Sequenz der Reste 1-6 charakterisiert. Ebenso die ariginreiche, zentrale Region weist eine hohe Homogenität auf. Lediglich das Carboxylende (Rest 28-50) stellt sich mit einer größeren Variabilität dar (WOUTERS-TYROU et al. 1998).

2.8.4 Prm 2

Für das Prm 2 wurden bei Maus, Pferd und Mensch eine variable Aminosäureanzahl festgestellt (PIRHONEN et al. 1990). Es liegen unterschiedliche Varianten vor: zum einen geht man von einem hydrolytisch abgespalteten „Precursor“ aus, zum anderen von zwei Varianten, die von verschiedenen Genen abstammen. Die hochkonservierte endständige Aminosäuresequenz des Prm 1 ist bei Prm 2 so nicht vorzufinden. Bestimmte Aminosäuresequenzen finden sich in so genannten Minidomänen wieder, die jedoch irregulär im Vergleich zu Prm 1 lokalisiert sind. (BALHORN 1989)

3. Material und Methoden

3.1 Materialgewinnung

Es standen 52 Hoden von 34 kastrierten Hengsten im Alter von 1 bis 16 Jahren zur Verfügung. Die Kastrationen wurden von der Chirurgischen Veterinärklinik – Chirurgie der Pferde – der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt. Laut Anamnese waren 32 Hoden physiologisch abgestiegen, 10 Hoden lagen inguinal und 10 Hoden abdominal.

3.2 Fixierung des Hodengewebes

Unmittelbar nach der Kastration wurden von den auf Eis gekühlten und transportierten Hoden mittels eines Skalpells Gewebelöcher mit einer Kantenlänge von ca. 0,3 cm entnommen.

Diese Blöcke wurden über Nacht in BOUINScher Lösung fixiert. Anschließend wurden die Gewebestücke über 5 Tage in 70%igem Alkohol gespült bis diese entfärbt waren, d.h. der Alkohol keine Gelbfärbung mehr aufwies.

Zusätzlich ca. 3g von jedem Hoden wurden in sterile Alufolie eingewickelt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.3 Einbettung und Schnittherstellung

3.3.1 Einbettung in Paraffin

Die entfärbten Hodenblöcke wurden für 18 Stunden in einen Vakuum- Gewebeeinfiltrationsautomaten verbracht. Dort durchliefen sie zunächst zur Entwässerung eine aufsteigende Alkoholreihe (Ethanol 80%, 96% 100%), wurden in Xylol getränkt und anschließend mit Paraffin bei 59° C infiltriert.

Von den infiltrierten Gewebeblöcken wurden am nächsten Tag mit Hilfe eines Einbettgerätes 3 x 3 x 2cm große Paraffinblöcke angefertigt.

3.3.2 Beschichtung der Objektträger

Um die Haftung der aufgetragenen Schnitte zu verbessern, wurden die Objektträger (Super Frost OT) zuerst mit APTEX (3-Aminopropyl-Triethoxysilan) nach folgendem Protokoll beschichtet:

- Objektträger (OT) in einen Küvettenhalter einsortieren
- in Aqua bidest. spülen (OT auf und ab bewegen)
- Küvettenhalter auf Unterlage abtropfen lassen
- in frischem Aceton spülen (OT auf und ab bewegen)
- Küvettenhalter auf Unterlage restlos abtropfen lassen (Abzug!)
- OT 5 min in 2 % APTEX (4ml auf 196ml reines Aceton) stellen
- OT 2 min in frisches Leitungswasser stellen
- OT 2 min unter fließendem Leitungswasser spülen
- OT 2 min in Aqua bidest. stellen
- Küvettenhalter auf Unterlage abtropfen lassen, bei Raumtemperatur oder im Trockenschrank trocknen lassen

3.3.3 Herstellung der Paraffinschnitte

Von den Paraffinblöcken wurden mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms 7 bis maximal 10µm dünne Gewebeschnitte hergestellt. Je zwei Schnitte wurden auf einen mit APTEX- beschichteten Objektträger im Wasserbad bei 42° Celsius aufgezogen. Die Objektträger trockneten anschließend einige Stunden im Trockenschrank bei 37° Celsius.

3.4 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

3.4.1 Durchführung

Die HE-Färbung diente dazu, die verschiedenen Hodengewebe histologisch und zytologisch in Bezug auf Entwicklungsstand, Qualität und Quantität der Spermatogenese und eventueller pathologischer Veränderungen beurteilen zu können. Bei dieser Färbung stellen sich die Zellkerne durch Anfärbung mit basischem Hämalaun blau und alle anderen Strukturen durch Anfärbung mit Eosin rot dar. Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- OT in einen Küvettenhalter einsortieren
- 3 x 10 min in Xylol
- 2 x 5 min abs. Ethanol
- 1 x 5 min 96%iger Ethanol
- 1 x 5 min 80%iger Ethanol
- 1 x 5 min 70%iger Ethanol
- 1 x 5 min 50%iger Ethanol
- 1 x 5 min Aqua dest.
- 1x 7 min Hämatoxylin
- 1 x 15 min in fließendem Wasser bläuen

- 1 x 7 min 1%iges Eosin
- 1 x 1 min in Leitungswasser spülen
- kurz in 70%igen Ethanol tauchen
- kurz in 80%igen Ethanol tauchen
- 1 x 2 min 80%iger Ethanol
- 2 x 2 min 96%iger Ethanol
- 3 x 2 min abs. Ethanol
- 3 x 10 min Xylol

Im Anschluß an die HE-Färbung wurden die Schnitte mit Vitro-Clud eingedeckt.

3.4.2 Kriterien für die Bewertung der HE-Schnitte

Die untersuchten Hodengewebe wurden unter Beachtung von Alter und Anamnese der Hengste, in Bezug auf Entwicklungsstatus, Qualität und Quantität der Spermatogenese anhand histo- und zytologischer Kriterien in vier verschiedene Gruppen eingeteilt:

Gruppe 1	typisch <i>juveniles</i> Hodengewebe
Gruppe 2	Hodengewebe mit einer <i>normalen</i> Spermatogenese
Gruppe 3	Hodengewebe mit einer <i>eingeschränkten</i> Spermatogenese, bzw. einer „ <i>bunten Atrophie</i> “
Gruppe 4	Hodengewebe <i>ohne</i> erkennbare Anzeichen einer Spermatogenese (bis zum Spermien-Release)

Tab 3:

Gruppeneinteilung für die Bewertung der HE-Färbung

3.4.2.1 Lichtmikroskopische Kriterien für die Zuordnung zu Gruppe 1 (juveniles Hodengewebe)

Charakteristisches, juveniles Hodengewebe zeigte Keimstränge ohne Lumenausbildung aus undifferenzierten Sertolizellen mit ovalen Zellkernen und Präspmatogonien auf der Basallamina. Vereinzelt finden sich Leydigzellen.

3.4.2.2 Lichtmikroskopische Kriterien für die Zuordnung zu Gruppe 2 (normale Spermatogenese)

Der normale, skrotale, adulte Hoden stellte sich mit deutlicher Lumenausbildung und vollständigem Keimepithel dar. Das Keimepithel bestand zum einen aus den breitflächig der Basallamina aufsitzenden Sertolizellen, die mit ihrem Zellkörper die gesamte Höhe des Keimepithels durchsetzten. Es konnten alle Stadien der Spermatogenese festgestellt werden. Leydigzellen lagerten sich an die Tubuli an.

3.4.2.3 Lichtmikroskopische Kriterien für die Zuordnung zu Gruppe 3 (unvollständige Spermatogenese/ bunte Atrophie)

Die „unvollständige Spermatogenese“ war durch verschiedene Erscheinungen gekennzeichnet:

1. In einigen Tubuli blieben einzelne Spermatogenesewellen aus, so dass die für ein bestimmtes Stadium typischen Keimzellen nur vereinzelt anwesend waren.
2. In einzelnen Tubuli oder auch in einem größeren Verband traten Arreste auf. Das bedeutet, dass die Spermatogenese nur bis zu bestimmten Keimzellstadien stattfindet und dann stagniert (z.B. Pachytän-Arreste). Es waren nicht alle Stadien der Spermatogenese vertreten.
3. Letzendlich war die Folge, dass insgesamt weniger bis gar keine Spermatogonien sich bis zum Spermium differenzierten und diese ins Tubuluslumen abgegeben werden konnten.

Unter einer „bunten Atrophie“ wird verstanden, dass Areale unterschiedlicher Gruppierung neben einander auf einem Hodenanschnitt vorgefunden werden.

3.4.2.4 Lichtmikroskopische Kriterien für die Zuordnung zu Gruppe 4 (keine Spermatogenese)

Diese Hoden entsprachen aufgrund großlumiger Tubuli nicht dem typischen Bild des juvenilen Status, präsentierten aber auch keine intakte Spermatogenese. D. h. in der Mehrzahl der untersuchten Tubuli stellten sich Sertoli-Cell-Only-Tubuli, Vakuolen oder oben beschriebene Arreste anstelle eines physiologischen Keimepithels dar. Leydigzellen waren in normaler oder reduzierter Anzahl um die Tubuli herum gruppiert. Insgesamt konnte in so gut wie keinem der Tubuli ein Spermienrelease oder überhaupt eine Differenzierung bis zur elongierten Spermatische nachgewiesen werden.

3.5 Reverse Transkription (RT) Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die PCR ist ein Verfahren, mit dem eine bestimmte DNA-Sequenz vervielfältigt werden kann. Um einen bestimmten RNA-Abschnitt nachweisen zu können, muß zunächst die RNA mittels der Reversen Transkriptase in eine cDNA umgeschrieben werden, um dann in einer anschließenden PCR mit dem Einsatz von spezifischen Primern den gesuchten cDNA-Abschnitt zu vervielfältigen.

Für vorliegenden Versuchsaufbau wurde das tiefgefrorene Hodenhomogenat eines Pferdes mit intakter Spermatogenese verwendet. Wir verwendeten für Tp1 und Tp2 humane Primer nach STEGER et al. (1998): Tp1 FW-Primer 5'ATGTCGACCAGCCGCAAATTAAAG3' (Basenpaar 1-24), RV-Primer 5'TCACAAGTGGGAGCGGTAATTGC3' (Basenpaar 146-168), Tp2 FW-Primer 5'GACACCCAGACTCACAGCCTTCC3' (Basenpaar 4-26) und RV-Primer 5'CGGTCTCATTAGTTGGATTTCCATC3' (Basenpaar 401-425). Für Prm1 und Prm2 verwendeten wir humane Primer nach STEGER et al. 2000: Prm1 FW-Primer 5'GCCAGGTACAGATGCTGTCGCAG3' (Basenpaar 4-26), Prm1 RV-Primer 5'TTAGTGTCTACATCTCGGTCTG3' (Basenpaar 132-156). Prm2 FW-Primer 5'GTGAGGAGCCTGAGCGAACGC3' (Basenpaar 16-36), Prm2 RV-Primer 5'TTAGTGCCTTCTGCATGTTCTCTTC3' (Basenpaar 285-309)

3.5.1 Extraktion von RNA aus Kryomaterial (Pferd)

Das bei -18° C tiefgefrorene, portionierte Hodengewebe wurde in einer sterilen Porzellschale zusammen mit flüssigem Stickstoff zermörsert. Ca. 100 mg Homogenat und 1ml Trizol- Reagenz gab man in ein 2 ml Eppendorf-Cup (sog. „Tube“) zusammen mit, homogenisierte mit dem Ultra- Turrax, ließ den Ansatz 5 min bei RT stehen und gab den Inhalt in ein neues 2ml-Tube.

Es wurden 200µl Trichlormethan (Chloroform) zugegeben, dieser Ansatz mit Hilfe eines Vortexer gemischt und 5 min bei RT stehen gelassen. Anschließend wurde 15 min bei 4°C und 12.000 UpM zentrifugiert.

Nach dem Zentrifugieren hatte sich das Gemisch in drei Phasen aufgetrennt: in die untere rote Phase (DNA und Protein), die mittlere weiße Phase (Phenol-Chloroform-Phase) und die obere, wässrige, farblose Phase mit der zu isolierenden RNA.

Präzipitation:

Nachdem die RNA-Phase abpipettiert (Menge abgemessen), und in neues 2 ml Tube überführt wurde, gab man die gleiche Menge (ca. 500 μ l) Chloroform hinzu. Das Tube wurde vorsichtig mehrmals gekippt und anschließend 5 min bei 4°C und 18.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen und dann die gleiche Menge 100%iger Isopropanol zu diesem hinzu gegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt, 30 min bei -20°C stehen gelassen und anschließend 10 min bei 4°C und 18.000 UpM zentrifugiert.

Waschen:

Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1 ml kaltem 70%igem Ethanol in DEPC-Wasser gelöst und 10 min auf Eis gestellt. Es erfolgte ein weiteres Zentrifugieren von 10 min bei 4°C und 12.000 UpM. Dieser Schritt wurde 1x wiederholt.

Resuspendieren:

Der Überstand wurde wieder verworfen, das verbleibende Pellet (ca. 30 min bei 37°C im Trockenschrank) getrocknet und anschließend in 50 μ l DEPC bei 70°C im Wasserbad resuspendiert.

An der nun vorliegenden Suspension wurden folgende Messungen am Photometer durchgeführt:

- Konzentrationsbestimmung: OD_{260nm}=1:40 μ g RNA/ 1ml

- Bestimmung der Reinheit: $OD_{260nm}:OD_{280nm}= 1,5 - 2,0$

1 μ l der vorliegenden RNA-Suspension wurden mit 69 μ l 0,1 M Tris-HCl in DEPC-Wasser-
pH-Wert 7,3 in die Photometer-Meßkuvette pipettiert und der Meßvorgang durchgeführt.

Das gelöste Pellet wurde in Flüssigstickstoff schockgefroren und gelagert.

3.5.2 Erste-Strang-Synthese (cDNA)

Zunächst wurde wie folgt zusammenpipettiert:

- x μ l DEPC-Wasser (Differenz zu 12 μ l)
- 1 μ l Primer Oligo dT-15
- x μ l isolierte RNA (ca.8 μ g)

Diesen Ansatz inkubierte 10 min bei 70°C und wurde anschließend 3 min in Eiswasser gestellt.

Die benötigte Menge der RNA-Suspension, um in dem Ansatz 8 μ g RNA zu erhalten, berechnete sich mit Hilfe der gemessenen Extinktion, wie folgt:

Gemessene Extinktion = x μ g/ml bzw. (x/1000) μ g/ μ l

Daraus folgt: $8\mu\text{g} : (x/1000)\mu\text{g}/\mu\text{l} = \text{benötigte Menge RNA-Suspension in } \mu\text{l}$

Zu dem obigen Ansatz wurde hinzu pipettiert:

- 4 μ l 5x First Strand Buffer
- 2 μ l 0,1 M DTT
- 1 μ l 10 mM dNTP

Dieses Gemisch wurde 1 min bei 37°C inkubiert.

Zuletzt wurden

- 1 µl Superscript II Reverse Transcriptase
- hinzu pipettiert, 1h bei 37-42°C inkubiert und das Gemisch bei –20° C gelagert.

3.5.3 PCR

Es wurde folgender 50 µl-Ansatz mit gestopften Pipetten zusammenpipettiert:

- 38,5 µl DEPC-Wasser
- 5 µl 10x PCR-Puffer
- 4 µl 25 mM MgCl₂-Lösung
- 1 µl 10 mM dNTP
- 1 µl FW-Primer (10 pmol)
- 1 µl R-Primer (10 pmol)
- 1 µl cDNA
- 0,5 µl Taq DNA-Polymerase

Der Ansatz wurde in den Thermocycler zur Inkubation verbracht.

Die Schmelztemperatur und die Anlagerungstemperatur der Primer berechnete sich nach folgenden Formeln:

$$\text{Schmelztemperatur: } T_M = (A + T) \times 2^\circ\text{C} + (G + C) \times 4$$

$$\text{Anlagerungstemperatur: } T_M - 5^\circ\text{C}$$

Das Inkubationsprogramm des Thermocyclers wurde dementsprechend, wie folgt festgelegt (Tab. 4):

Schritt	Vorgang	Temperatur in °C	Dauer in min (40 x Wdhlg.)
Schritt 1	Denaturierung der doppelsträngigen DNA	95	3
Schritt 2		95	1

Schritt 3	Anlagerung der Primer	65	1
Schritt 4	Verlängerung der Primer	72	2
Schritt 5		72	10
Schritt 6		4	Pause

Tab. 4:

Inkubationsprogramm des Thermocyclers für den Ablauf der PCR

3.5.4 Agarose-Gel-Elektrophorese

Zur Detektion der PCR-Produkte wurde eine Agarose-Gel-Elektrophorese durchgeführt.

Für die Herstellung eines 2%igen DNA-Gels, wurden 1,0 g Agarose in 50 ml TAE-Puffer mittels Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Pro 50 ml Gel (ausreichend für ein Mini-Gel) wurden 10 µl Ethidiumbromid hinzugegeben und das Gel sofort – luftblasenfrei – in die Gelkammer mit aufgestecktem Gelkamm gegossen.

Das Probengemisch und Marker wurden wie folgt zusammen pipettiert:

Probengemisch:

- 6 µl cDNA (Produkt aus voran gegangener PCR)
- 4 µl A.bidest
- 2 µl Loading Buffer

Marker:

- 8 µl A.bidest
- 5 µl Loading Buffer
- 2 µl Marker

Nachdem das Elektrophorese-Gel sich vollständig auspolymerisiert hatte, wurde der Kamm entfernt, die Gel-Cassette in die mit Running-Buffer gefüllten Elektrophoresekammer gelegt und die Slots mit je ca. 12 µl Probenmaterial gefüllt. Zwecks späterer Identifizierung der Banden wurde in einen Slot je Gel das Markergemisch aufgetragen.

Die Elektrophoresekammer wurde darauf folgend über einen Power Pak 200 an eine Stromquelle angeschlossen. Die Laufzeit betrug 25 min bei einer Spannung von 125 Volt.

Im Anschluß wurde auf einem Ultraviolett-Transilluminator das Ergebnis detektiert und mittels einer Gel Cam mit Blende 11 und einer Belichtungszeit von 1 sec fotografiert

3.6 In- Situ- Hybridisierung (ISH)

Die In-Situ-Hybridisierung wird angewendet, um Nukleinsäuren, z.B. mRNA in Geweben, in-situ, nachzuweisen. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde die ISH angewendet, um spezifische mRNA-Sequenzen, der zu untersuchenden Transitionsproteine und Protamine in den unterschiedlichen, germinativen Zellen des Hodenepithels aufzufinden.

Für die In-Situ-Hybridisierung der Protamin1-mRNA wurde eine für das Pferd eigene Sonde verwendet (siehe Anhang). Zum Nachweis von Protamin 2 und der Transitionsproteine 1 und 2 nutzten wir eine humane Sonde nach STEGER et al. (1998). Innerhalb der Kernproteinfamilien sind Homologien der Nukleinsäuren bekannt.

3.6.1 Protokoll:

Am Vortag wurden die Paraffinschnitte (in Küvette) und eine Xylolküvette über Nacht in einen Brutschrank bei 60°Celsius gestellt.

1. Tag:

Alle Arbeitsschritte wurden mit Handschuhen durchgeführt und verwendete Gerätschaften sollten zuvor sterilisiert worden sein, um eine Verunreinigung mit RNasen zu vermeiden.

Zur Entparaffinierung wurden die Schnitte folgender Alkohldreihe unterzogen:

- 5 min in Xylol bei 60°C
- 2 x 5 min in Xylol bei Raumtemperatur (RT)
- 2 x 5 min in abs. Ethanol bei RT
- einige Sekunden in 96% Ethanol bei RT
- 5 min in 70%igem- Ethanol bei RT
- Zur Spülung in einem RNase freiem Wasser:

einige Sekunden in DEPC- Wasser bei RT

- 20 min in 0,2 N HCl bei RT

Anschließend wurden die Schnitte folgenden Inkubationen und Spülschritten unterzogen:

- 15 min in 2x SSC bei 70° C spülen
(die OT wurden steril mit einer Pinzette in eine bereits im Wasserbad vorgeheizte SSC-Küvette übertragen)
- 5 min in PBSM- Puffer spülen
(Übtragung in Standküvette mit 50 ml PBSM-Puffer)
- Vor dem nächsten Arbeitsschritt Umrandung der Schnitte mit dem DAKO-Pen, um ein Verlaufen der Lösungen zu vermeiden.
- Zur Gewebepерmeabilisierung:
30 min mit Proteinase K in mit A. bidest befeuchteten Kammer inkubieren
(20 µl Stammlösung Proteinase K + 10 ml PBSM – Puffer, d.h. 20 µg Proteinase K/ml)
- Abstoppen der Proteinase-Reaktion:
5 min in 0,2%igem Glycin in DEPC-Wasser bei RT spülen.
- Zur Reduzierung unspezifischer Hintergrundreaktionen:
15 sec in 20%igem Eisessig in DEPC-Wasser bei 4° C spülen (Standküvette)
- 5 min in 1x PBSM- Puffer bei RT spülen (Standküvette)
- Zur Nachfixierung:
10 min in 4% Paraformaldehyd- Lösung bei RT spülen (Standküvette)
- 5 min in PBSM- Puffer bei RT spülen (Standküvette)
- Prähybridisierung:
30-60 min Inkubation in 20% Glycerol in DEPC- Wasser bei RT.

Das Sondengemisch und der Hybridisierungspuffer wurden nach folgendem Schema zusammenpipettiert (Tab.5):

Substanzen	Sense (µl)	Antisense(µl)
DEPC- Wasser	4	4
Salmon Sperm DNA (1mg/ml)	4	4
Yeast t- RNA (1mg/ml)	8	8
DIG-cRNA (Sonde; unterschiedl. je nach Ansatz)	4 (1:100)	4 (1:100)

Tab. 5:

Pipettierschema für den Sense- und Antisense-Ansatz (Sondengemisch)

Die Sonden wurden in einer Verdünnung von 1:100 in dem Sondengemisch verwendet. Für den „Sense-Ansatz“ wurde eine DIG-cRNA als Sonde verwendet, die mit der Zielsequenz identisch ist und für den „Antisense-Ansatz“ eine Sonde, die zu der Zielsequenz komplementär ist und somit an diese anheften kann.

Das Sondengemisch wurde nach dem Zusammenpipettieren 10-12 min in ein 70° C- Wasserbad gestellt und anschließend in Eiswasser abgeschreckt (Tab.6).

Substanzen	Sense (µl)	Antisense (µl)
DEPC- Wasser	56	56
20x SSC	40	40
50% Dextransulfat	80	80
Denhardt- Reagenz	4	4
Deionisiertes Formamid (50%)	200	200

Tab. 6:

Pipettierschema für den Hybridisierungssuffer Sense und Antisense

Ein Ansatz reichte je nach Schnittgröße für 4-8 Schnitte.

- Die OT kurz in 2x SSC tauchen; 10-12 min auf Heizplatte bei 70° C legen, anschließend auf Kühlakku abschrecken
- Hybridisierung:
jeweils einen Ansatz Sondengemisch (Sense und Antisense) mit dem Hybridisierungspuffer zusammen pipettieren und auf jeweils einen der beiden Schnitte eines Objektträgers (Positiv- und Negativkontrolle) aufbringen (50 µl pro Schnitt)
 - Schnitte mit Deckglas abdecken, über Nacht in feuchter Kammer (befeuchtet mit 100ml 50% Formamid + 20 ml 20x SSC + 80 ml DEPC-Wasser) bei 37°C im Brutschrank inkubieren

Die Schnitte wurden folgenden Inkubationen und Spülungen unterzogen (Posthybridisierung):

- Zur Ablösung der Deckgläschen:
4 x 15 min Spülen in 4x SSC bei RT
- Zur Entfernung nicht hybridisierter RNA:
30 min Inkubation mit RNase bei 37°C in feuchter Kammer (A.bidest.).
(1,35ml 4x SSC + 150µl 10x RNaseA/ RNaseT₁ Stock)
- 4 x 5 min in 4x SSC bei 37°C spülen
- 20 min in 2x SSC bei 60°C spülen
- 20 min in 0,2x SSC bei 42°C spülen
- 5 min in 0,1x SSC bei RT spülen
- 10 min in 2x SSC bei RT spülen
- Zur Hemmung unspezifischer Hintergrundreaktionen wurden folgende Spülungen und Inkubationen durchgeführt:
10 min in 1x TNMT bei RT spülen
- Schnitte 1 h in 1x TNMT + 3% BSA bei RT inkubieren
- 2x 10 min spülen in 1x TNMT- Puffer bei RT.

- aus 666µl 1x TNMT + 333µl 3% BSA/ 1x TNMT + 1µl Anti-DIG-Fab-Antikörper eine 1:1000-Verdünnung herstellen und damit die Schnitte über Nacht in einer feuchten Kammer (A. bidest.) bei 4°Celsius inkubieren

3.Tag:

Die Schnitte wurden folgenden Inkubationen und Spülungen unterzogen:

- 10 min in 1x TNMT- Puffer bei RT spülen
- 5 min in 1x NTB- Puffer bei RT spülen
- Zur Blockade unspezifischer Hintergrundreaktionen:
5 min in 1x NTB- Puffer + 800µl Levamisol bei RT spülen
- Entwickeln:
Inkubation mit NBT/ BCIP in dunkler feuchter Kammer (A. bidest.):
 - Prm1- mRNA: 1,5 bis 2 h bei RT
 - Prm2- mRNA: über Nacht bei 4°C
 - Trp1- mRNA: 2 bis 3 h bei RT
 - Trp2- mRNA: über Nacht bei 4°C
- 5 min in der Lösung aus 1x NBT + 800µl Levamisol bei RT spülen
- kurz in A. bidest spülen

Die Schnitte wurden anschließend mit Hämatoxylin gegengefärbt, mit Glyceringelatine eingedeckelt und lichtmikroskopisch ausgewertet.

3.6.2. Kriterien für die Bewertung der ISH

Die Detektion der Hybridisierung von Zielsequenz (mRNA des jeweils nachzuweisenden Kernproteins) und Digoxigenin-markierter Sonde erfolgte über einen mit Alkalischer Phosphatase-markierten Primärantikörper gegen Digoxigenin. BCIP/NBT (Brom-Chrom-Indolylphosphat/ Nitroblautetrazolium) ist ein Substrat der Alkalischen Phosphatase, das bei einer weiteren Inkubation zu einem braun-bläulichen Präzipitat umgesetzt wird.

Zur Kontrolle wurde von jedem Schnitt eine Negativkontrolle angefertigt, die nicht mit der Digoxigenin-markierter Sonde inkubiert wurde und dementsprechend nicht das positive Signal erkennen ließ.

Die ISH-Schnitte wurden mit dem 40er Objektiv eines Lichtmikroskopes durchgemustert. Als positiv wurden solche Zellen beurteilt, die sich mit einem bräunlichen bis dunkelblauem Zytoplasma darstellten. Das positive Ereignis wurde zwei quantitativen Abstufungen zugeordnet (Tab. 7):

	negativ, keine Anfärbung des Zytoplasmas, kein positives Signal
	schwach positiv, leichte, hellbraune Anfärbung des Zytoplasmas
	deutlich positiv, braune bis dunkelviolette Anfärbung des Zytoplasmas

Tab. 7:

Qualitative Kriterien für die Bewertung der ISH.

4. Ergebnisse

4.1 Übersicht über das untersuchte Hodenmaterial

4.1.1 Altersverteilung der Hengste

Die Altersverteilung der kastrierten Hengste bewegte sich zwischen 1 und 16 Jahren (Tab. 8)

	Altersverteilung der Kastraten (in Jahren)										
	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	6	8	12	16
Anzahl der Hoden	4	4	17	4	11	4	2	1	2	1	2

Tab. 8:

Altersverteilung der kastrierten Hengste.

4.1.2 Anamnestiche Einteilung des untersuchten Hodenmaterials

Das vorliegende Hodenmaterial wurde aufgeteilt entsprechend der Lagerung im Körper bei der Kastration in physiologisch abgestiegen, unilateral inguinal sowie unilateral und bilateral abdominal. Es gab keine bilatral inguinal gelagerten Hoden.

	Lage der zu untersuchenden Hoden			
	physiologisch	unilateral inguinal	unilateral abdominal	bilateral abdominal
Anzahl der Hoden	31	10	10	1

Tab. 9:

Anamnestiche Einteilung des Hodenmaterials.

4.2. Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung

4.2.1 Auswertung Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Bei dem vorliegenden Hodenmaterial wurde das Alter der Hengste zum Zeitpunkt der Kastration, die Positionierung des Hoden im Körper und die histologische Bewertung in Zusammenhang gebracht. Dabei konnte festgestellt werden, dass skrotal gelagerte Hoden normale Spermatogenesemuster, juveniles Hodengewebe, Spermatogenesedefekte oder gar keine Spermatogenese erkennen ließen. Bei den inguinal und abdominal gelagerten Hoden zeigten sich entweder gar keine Spermatogeneseanzeichen oder juveniles Hodengewebe (Tab. 10)

Alter in Jahren	lfd. Hoden-Nr.	skrotal	inguinal	abdominal
1	1			
1	2			
1	3			
1	4			
1,5	5			
1,5	6			
1,5	7			
1,5	8			
2	9			
2	10			
2	11			
2	12			
2	13			
2	14			
2	15			
2	16			
2	17			
2	18			
2	19			
2	20			
2	21			
2	22			
2	23			
2	24			
2	25			
2,5	26			
2,5	27			
2,5	28			

Ergebnisse

2,5	29			
3	30			
3	31			
3	32			
3	33			
3	34			
3	35			
3	36			
3	37			
3	38			
3	39			
3	40			
3,5	41			
3,5	42			
3,5	43			
3,5	44			
4	45			
4	46			
6	47			
8	48			
8	49			
12	50			
16	51			
16	52			

	Normale Spermatogenese
	Juveniles Hodengewebe
	Keine Spermatogenese
	Spermatogenesedefekt

Tab. 10:

Auswertung der HE-Färbung.

4.2.2 Dokumentation der HE-Färbung

Die Abb. 15 bis 21 der HE-Färbungen dokumentieren die Spermatogenesestadien eines fertilen Hengstes nach JOHNSON et al. 1990.

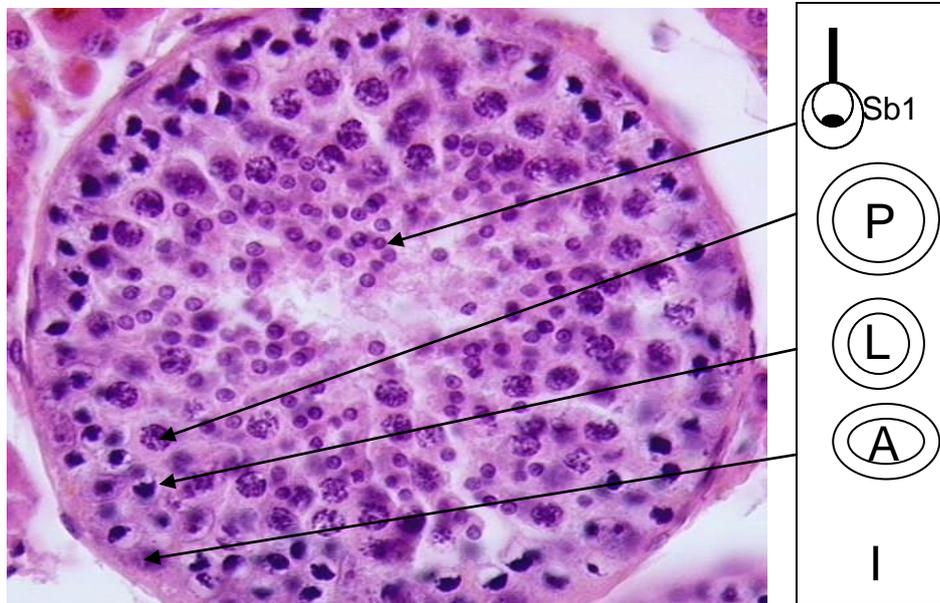


Abb. 15:

Normale Spermatogenese: Stadium I nach JOHNSON et al. 1990, Primärvergrößerung x 40.

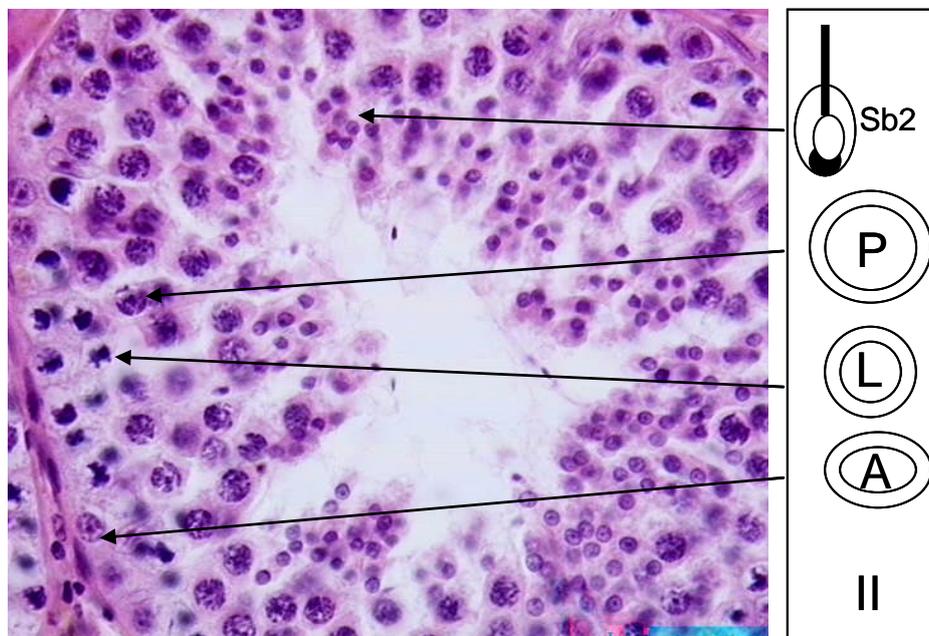


Abb. 16:

Normale Spermatogenese: Stadium II nach JOHNSON et al. 1990, Primärvergrößerung x 40.

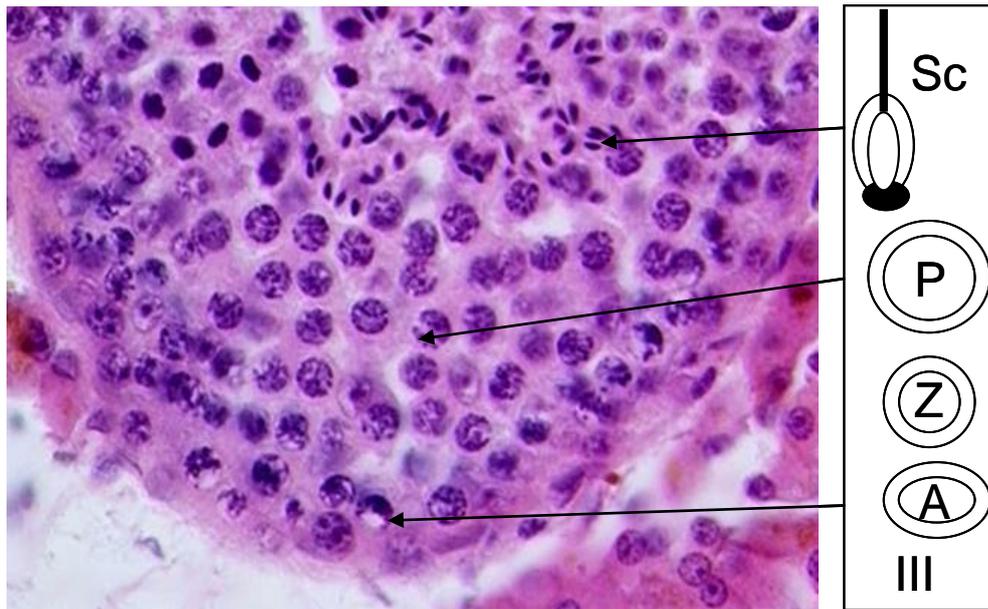


Abb. 17:

Normale Spermatogenese: Stadium III nach JOHNSON et al. 1990, Primärvergrößerung x 40.

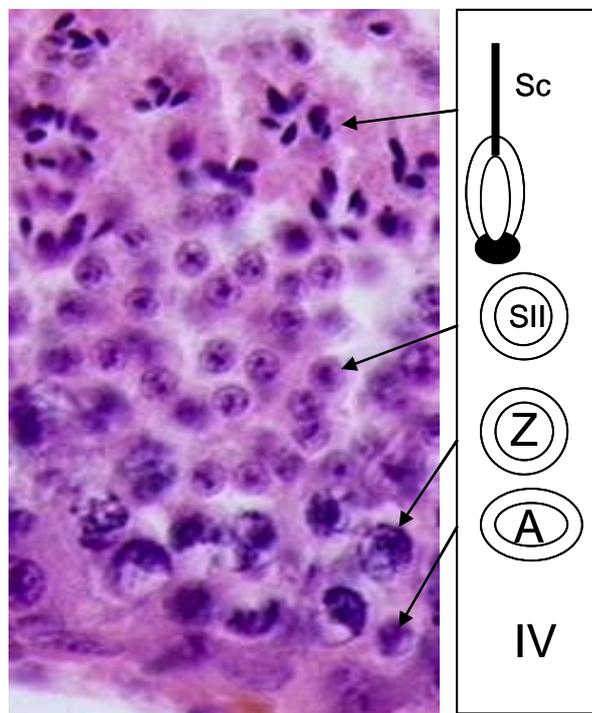


Abb. 18:

Normale Spermatogenese: Stadium IV nach JOHNSON et al. 1990, Primärvergrößerung x 40.

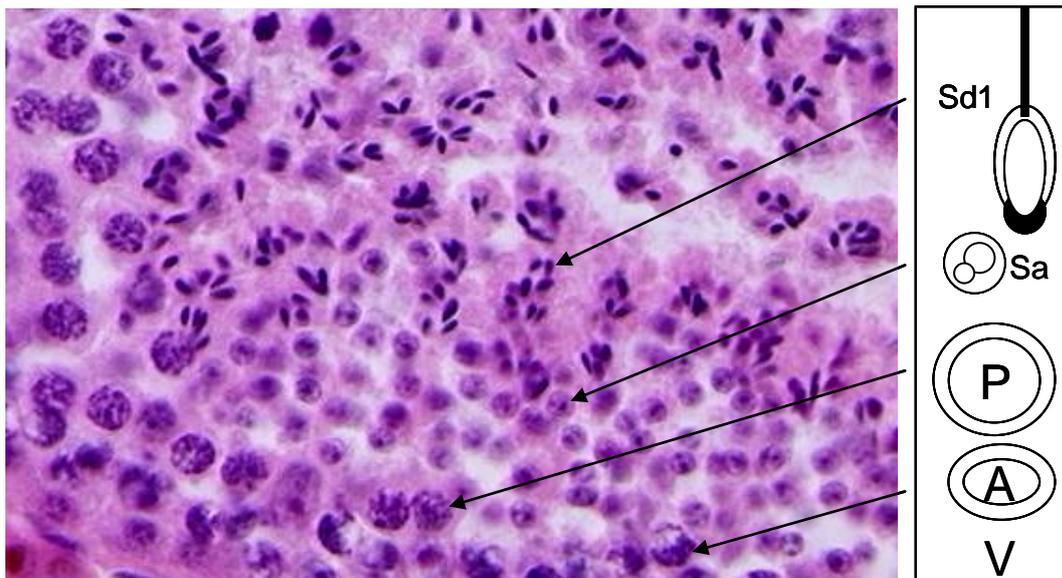


Abb. 19:

Normale Spermatogenese: Stadium V nach JOHNSON et al. 1990, Primärvergrößerung x 40.

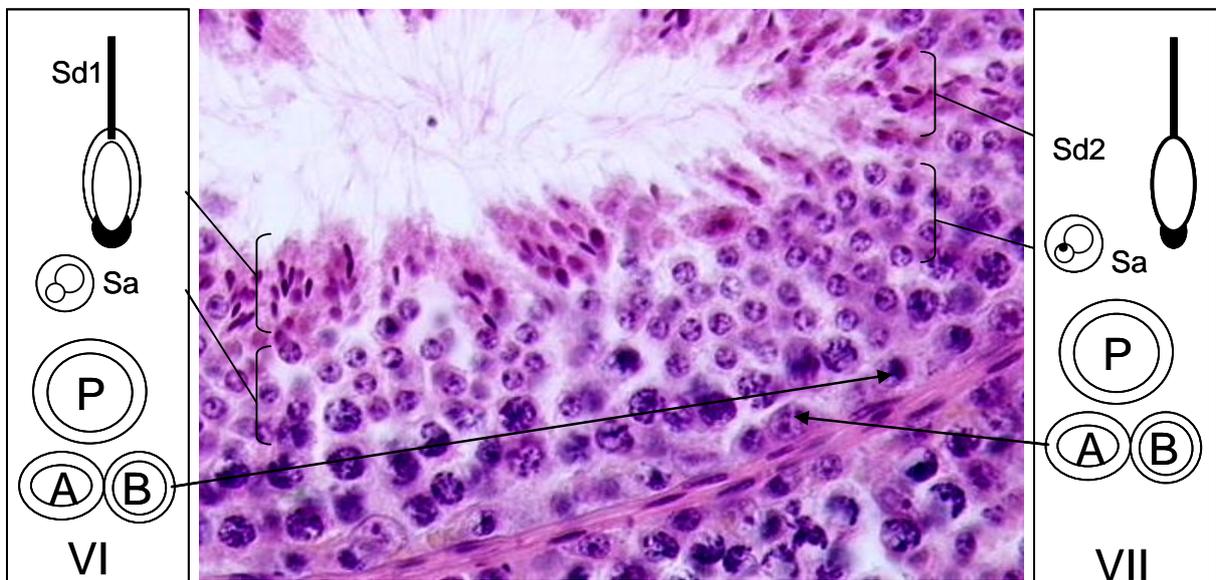


Abb. 20:

Normale Spermatogenese: Stadium VI/VII nach JOHNSON et al. 1990, Primärvergrößerung x 40.

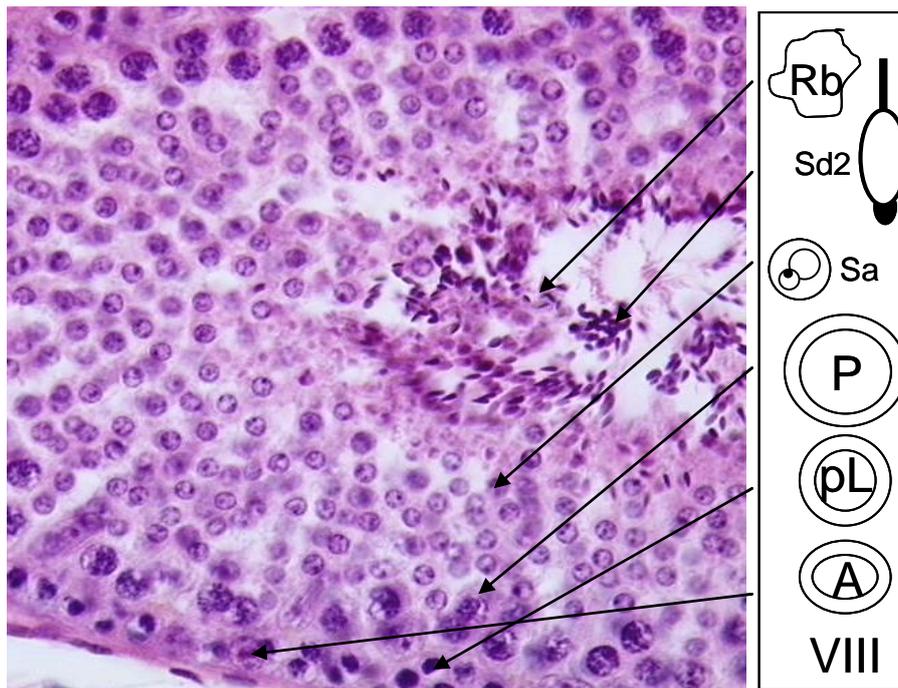


Abb. 21:

Normale Spermatogenese: Stadium VIII nach JOHNSON et al. 1990, Primärvergrößerung x 40.

4.3 RT-PCR

Der Nachweis der Kernprotein mRNA wurde für Protamin1-mRNA an aus equinem Hodenhomogenat extrahierter Gesamt-RNA durchgeführt.

Das Hodenhomogenat stammte aus einer Probe, in der zuvor über die ISH ein deutlich positives Signal für das Vorhandensein von Tp1, Prm1 und Prm2-mRNA festgestellt werden konnte. Für Tp2 konnte mittels ISH kein positiver mRNA-Nachweis geführt werden. Es konnte nur Protamin1-mRNA mittels RT-PCR nachgewiesen werden (siehe Abb. 22)

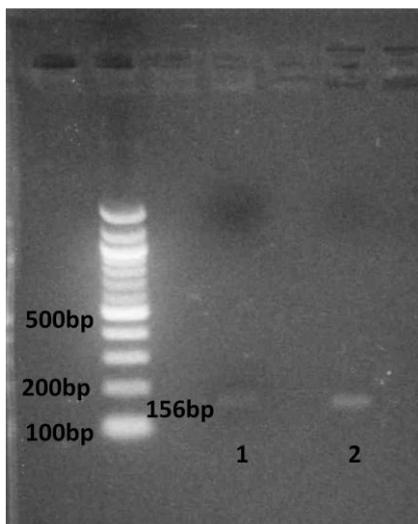


Abb. 22

RT-PCR Protamin 1- positiver mRNA
Nachweis im Bereich von 156 bp.

4.4 In-Situ Hybridisierung

4.4.1 Auswertung für Transitionsprotein 1-mRNA (Tp1-mRNA)

4.4.1.1 Tp1-mRNA-Expression in juvenilem Hodengewebe (Gruppe 1)

Tp1-mRNA konnte in keinem der juvenilen Hodenschnitte (Gruppe 1) nachgewiesen werden.

4.4.1.2 Tp1-mRNA-Expression in Hodengewebe mit normaler Spermatogenese (Gruppe 2)

Es wurde untersucht, in welchen Spermatiden der Spermatogenesestadien nach JOHNSON et al. 1990 eine Expression der Tp1-mRNA nachgewiesen werden konnte.

4.4.1.2.1 Dokumentation des Nachweises der Tp1-mRNA-Expression in Hodengewebe mit normaler Spermatogenese

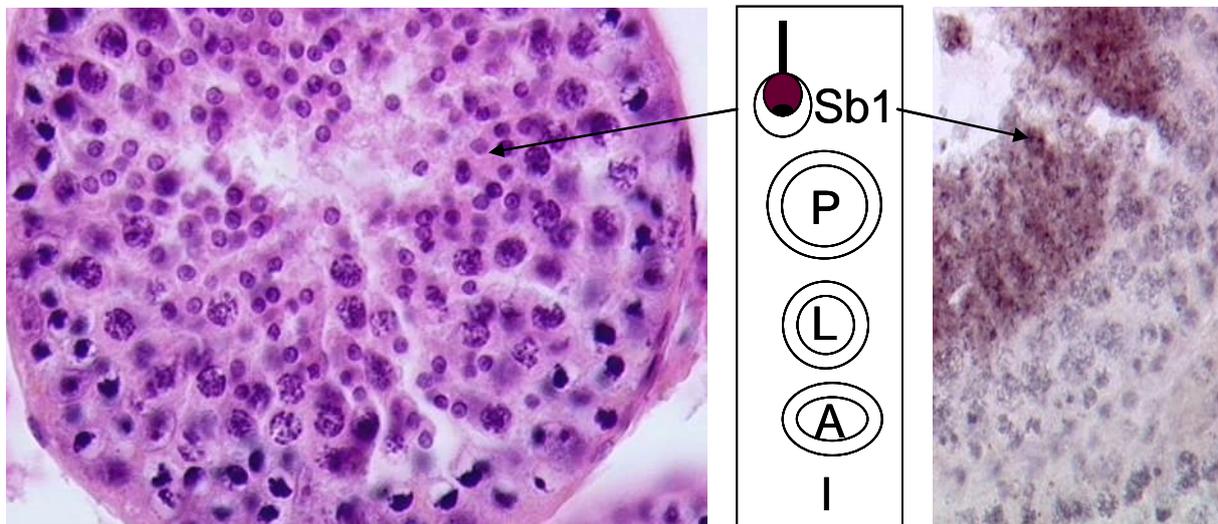


Abb. 23:

Normale Spermatogenese, Hengst über 3 Jahre alt, Stadium I, Expression von Tp1-mRNA in Sb1-Spermatiden, links HE-Färbung, rechts ISH, Primärvergrößerung x 40.

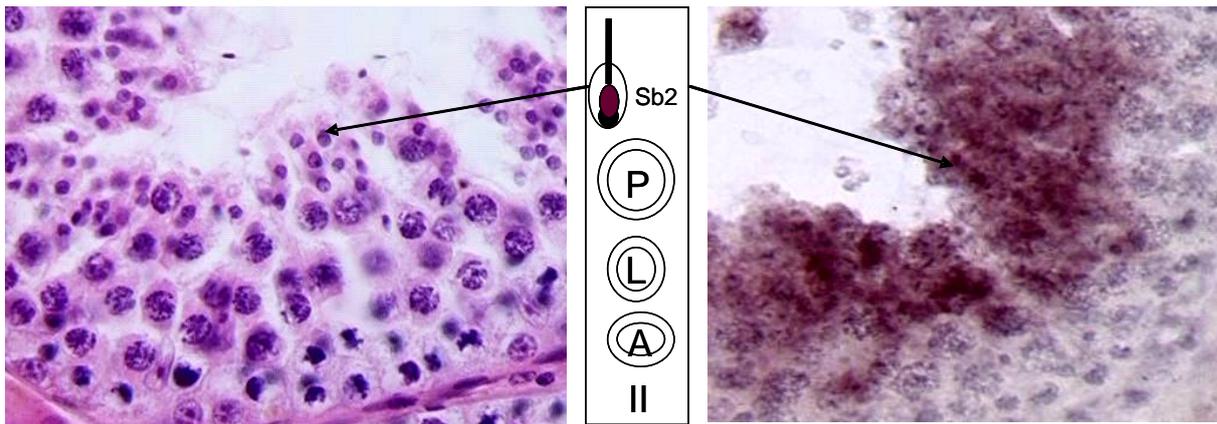


Abb. 24:

Normale Spermatogenese, Hengst über 3 Jahre alt, Stadium II, Expression von Tp1-mRNA in Sb2-Spermatiden, links HE-Färbung, rechts ISH, Primärvergrößerung x 40.

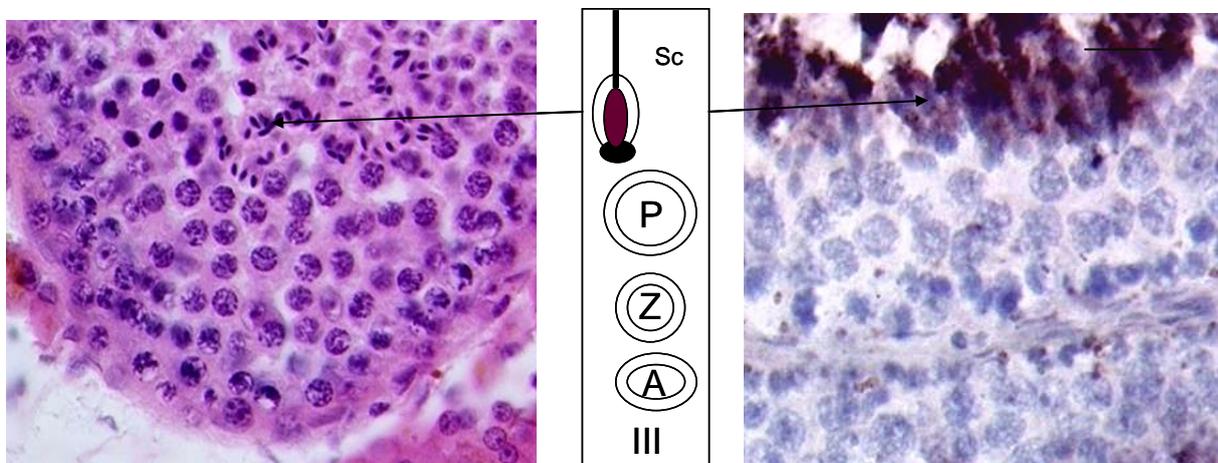


Abb. 25:

Normale Spermatogenese, Hengst über 3 Jahre alt, Stadium III, Expression von Tp1-mRNA in Sc-Spermatiden, links HE-Färbung, rechts ISH, Primärvergrößerung x 40.

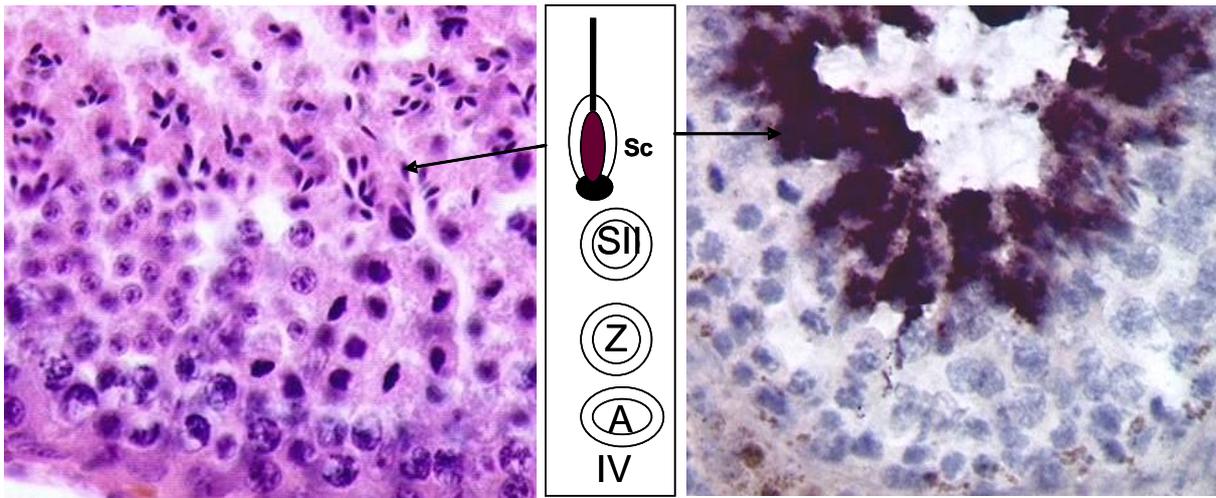


Abb. 26:

Normale Spermatogenese, Hengst über 3 Jahre alt, Stadium IV, Tp1-mRNA-Expression in Sc-Spermatiden, links HE-Färbung, rechts ISH, Primärvergrößerung x 40.

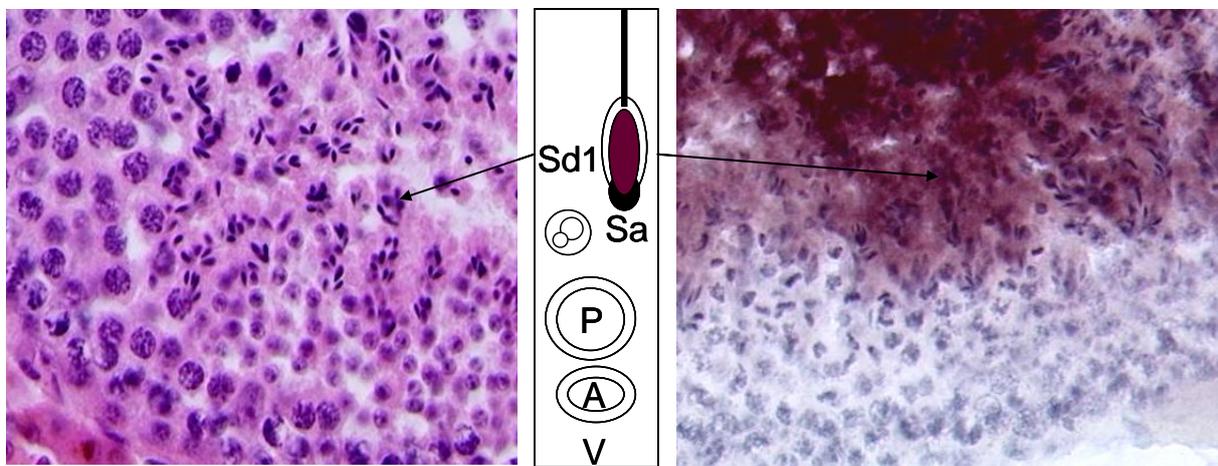


Abb. 27:

Normale Spermatogenese, Hengst über 3 Jahre alt, Stadium V, Expression von Tp1-mRNA in Sd1-Spermatiden, links HE-Färbung, rechts ISH, Primärvergrößerung x 40.

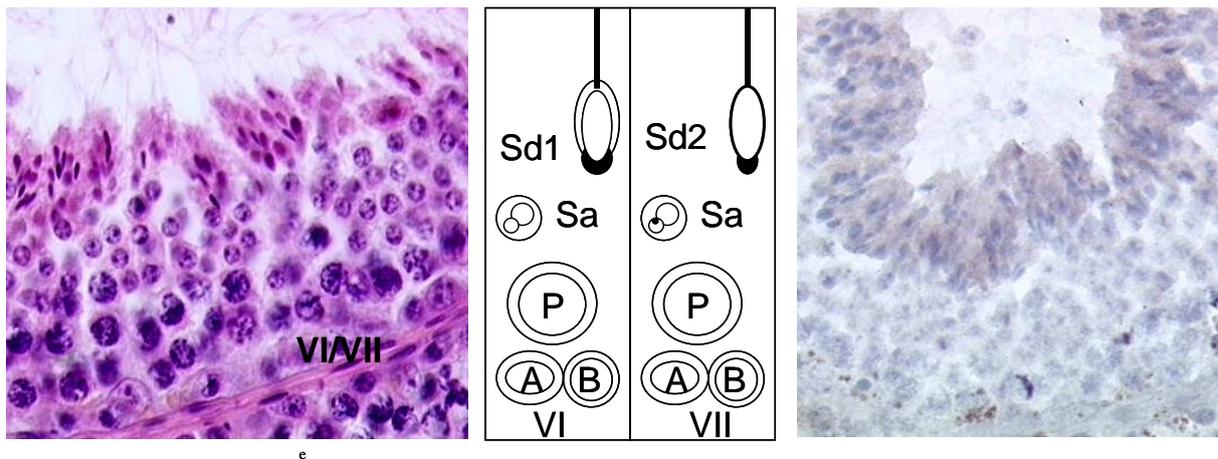


Abb. 28:

Normale Spermatogenese: Hengst über 3 Jahre alt, Stadium VI/VII, keine Tp1-mRNA-Expression in Sd1 oder Sd2-Spermatiden, links HE-Färbung, rechts ISH, Primärvergrößerung x 40.

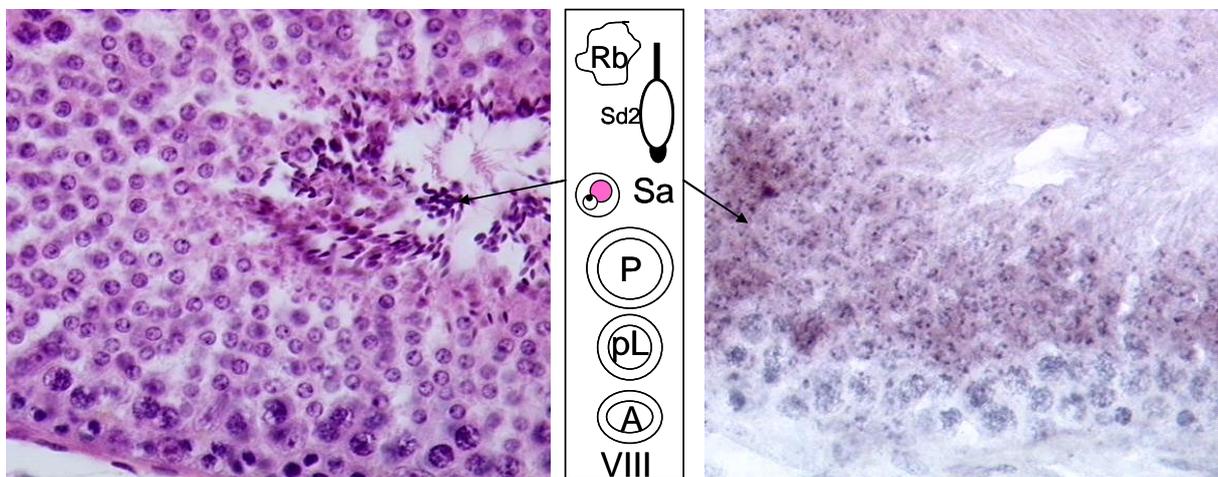


Abb. 29:

Normale Spermatogenese: Hengst über 3 Jahre alt, Stadium VIII, schwache, Tp1-mRNA-Expression in Sa-Spermatiden, links HE-Färbung, rechts ISH, Primärvergrößerung x 40.

4.4.1.2.2 Zusammenfassung der Tp1-mRNA-Expression in Hodengewebe mit normaler Spermatogenese

Die Ergebnisse der Tp1mRNA-Exprssion innerhalb der Gruppe der „normalen Spermatogenese“ ließen folgende Regelmäßigkeit erkennen: die Hodenschnitte der Hengste, die älter waren als 3 Jahre zeigten ein schwach positives Signal in Sa-Spermatiden (Stadium VIII). Deutlich positive Signale wurden in Sb1-, Sb2-, Sc- und Sd1-Spermatiden der Stadien I bis V erreicht. In den Sd1- und Sd2-Spermatiden von Stadium VI bis VIII konnte keine Tp1-mRNA nachgewiesen werden.

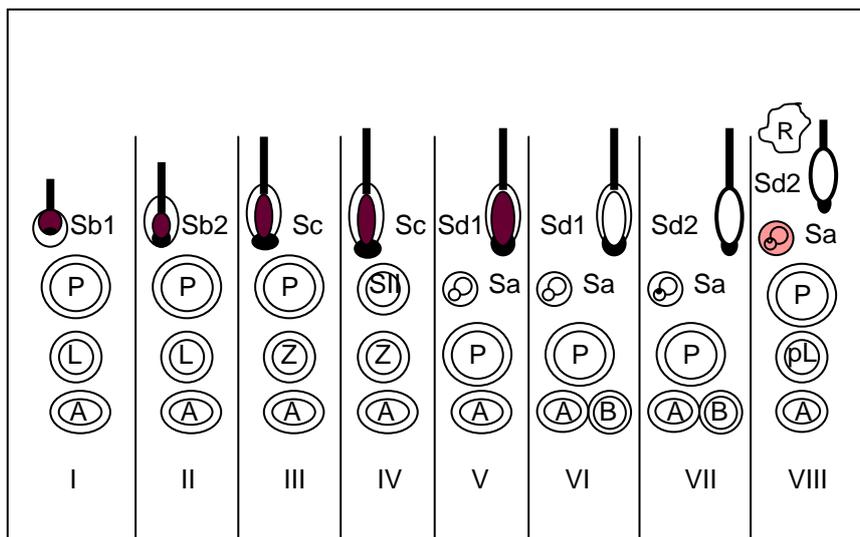


Abb. 30:

Stadienspezifische Tp1-mRNA-Expression bei Hengsten über 3 Jahren mit normaler Spermatogenese, Stadien der Spermatogenese nach JOHNSON et al. 1990.

A: A-Spermatogonie, B: B-Spermatogonie, pL: präleptotäne Spermatozyten, L: leptotäne Spermatozyten, P: pachytäne Spermatozyten, Z: zygotäne Spermatozyten, SII: Spermatozyten II. Ordnung, Sa-Sd2: Spermatiden unterschiedlicher Entwicklungsstufen, Rb: „Residual Bodies“

schwach positiv positiv

4.4.1.3 Tp1-mRNA-Expression in Hodengewebe mit unvollständiger Spermatogenese (Gruppe 3)

Sofern das Keimepithel soweit vollständig ausgebildet war, dass die Keimzellen in denen ein Tp1-mRNA-Nachweis bisher beobachtet wurde (Spermatiden Sa-Sd1), infolge von Arresten oder Ausbleiben einzelner Spermatogenesewellen nicht fehlten, konnte eine Tp1-mRNA-Expression wie bei einer normalen Spermatogenese der über 3 Jahre alten Hengste beobachtet werden. Es war dabei nicht ausschlaggebend, ob in dem untersuchten Hodengewebe überhaupt ein „Spermienrelease“ festgestellt werden konnte. Selbst in den als „juvenil“ eingestuftten Schnitten (z.B. der inguinalen Hoden), die fokal in einzelnen Tubuli eine Spermatogenese bis zu Sb1/Sb2-Spermatiden erkennen ließen, konnte ein schwacher Tp1-mRNA-Nachweis geführt werden.

4.4.1.4 Tp1-m-RNA-Expression in Hodengewebe ohne Spermatogenese (Gruppe 4)

In den Tubuli, die kein intaktes Keimepithel aufweisen konnten, bzw. in denen keine Sa bis Sd1-Spermatiden zu finden waren, in denen bisher der Tp1-mRNA-Nachweis gelang, konnte dem entsprechend kein positiver Nachweis geführt werden. Dies betraf alle Hodenschnitte, in denen keine Spermatogenese stattfand.

4.4.2. Auswertung für Transitionsprotein 2-mRNA (Tp2-mRNA)

Unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit, Anamnese oder Alter der Tiere konnte kein auswertbares, reproduzierbares positives Ergebnis für den Nachweis von Tp2-mRNA erzielt werden. Negativ- und Positivkontrollen wiesen keinen Unterschied auf.

4.4.3. Auswertung für Protamin 1-mRNA (Pr1-mRNA)

4.4.3.1 Pr1-mRNA-Expression in juvenilem Hodengewebe (Gruppe 1)

Pr1-mRNA konnte in keinem der untersuchten Hodenschnitte, die der Gruppe 1 zugeordnet wurden, nachgewiesen werden.

4.4.3.2 Pr1-mRNA-Expression in Hodengewebe mit normaler Spermatogenese (Gruppe 2)

Es wurde untersucht, in welchen Spermatiden der Spermatogenesestadien nach JOHNSON et al. 1990 eine Expression der Pr1-mRNA nachgewiesen werden konnte.

4.4.3.2.1 Dokumentation der Pr1-mRNA-Expression innerhalb einer normalen Spermatogenese

Die Abbildungen 31 bis 37 dokumentieren den Nachweis von Pr1-mRNA in Spermatiden der Spermatogenesestadien nach JOHNSON et al. 1990 bei Hengsten mit normaler Spermatogenese:

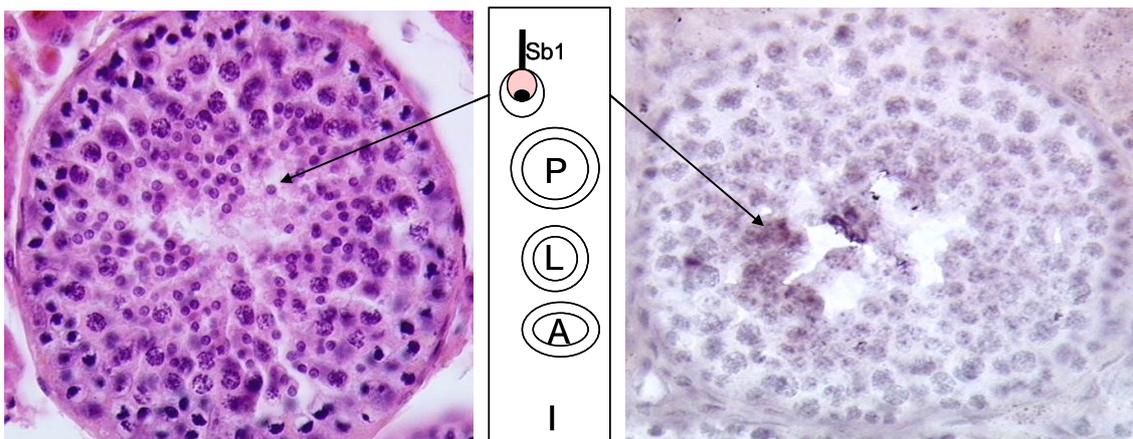


Abb. 31:

Normale Spermatogenese, Stadium I, schwache Expression Pr1-mRNA in Sb1-Spermatiden, links HE-Färbung, rechts ISH, Primärvergrößerung x 40.

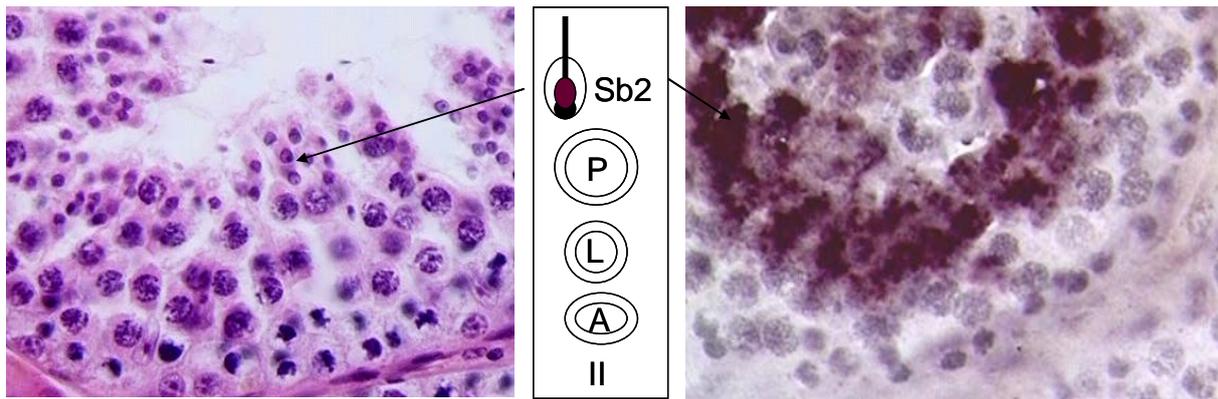


Abb. 32:

Normale Spermatogenese, Stadium II, Expression von Pr1-mRNA in Sb2- Spermatiden, links HE-Färbung, rechts ISH, Primärvergrößerung x 40.

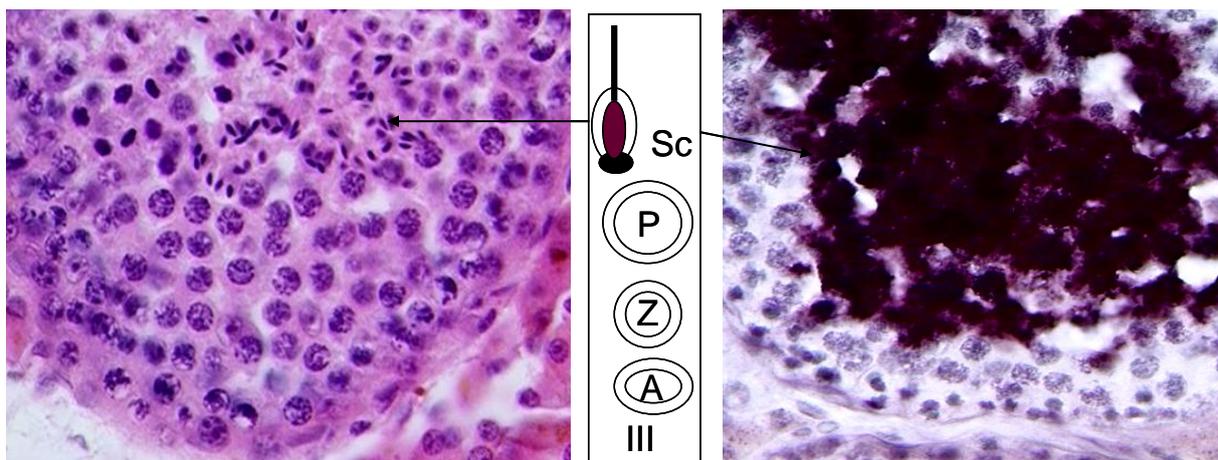


Abb. 33:

Normale Spermatogenese, Stadium III, Pr1-mRNA-Expression in Sc- Spermatiden, links HE-Färbung, rechts ISH, Primärvergrößerung x 40.

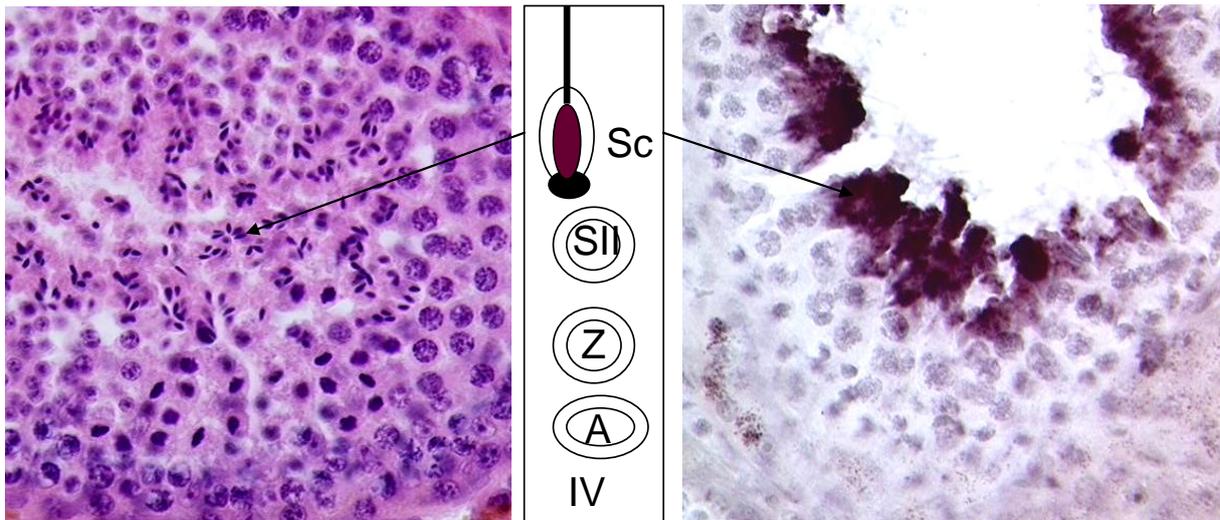


Abb. 34:

Normale Spermatogenese, Stadium IV, Prm1-mRNA Expression in Sc-Spermatiden, links HE-Färbung, rechts ISH, Primärvergrößerung x 40.

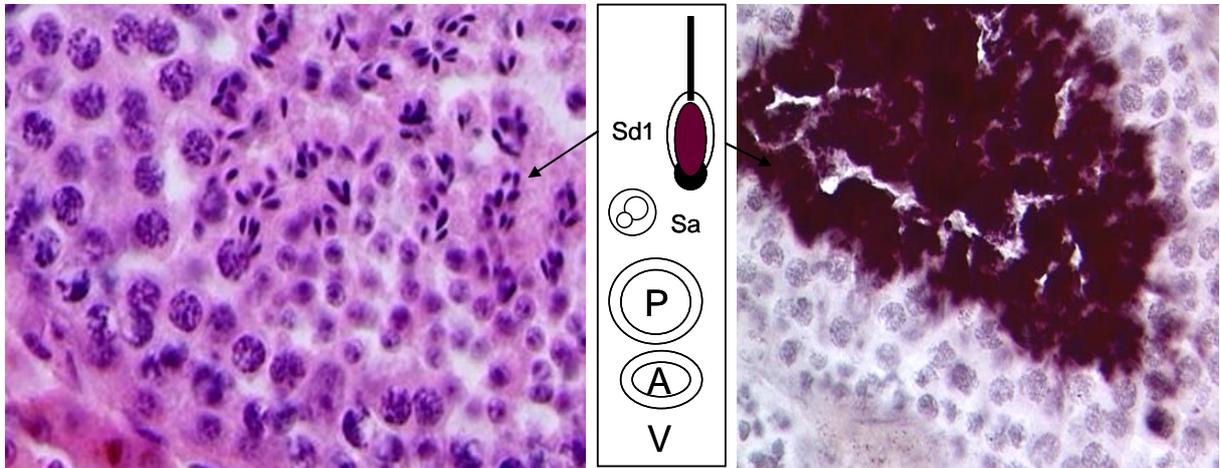


Abb. 35:

Normale Spermatogenese, Stadium V, Prm1-mRNA Expression in Sd1-Spermatiden, links HE-Färbung, rechts ISH, Primärvergrößerung x 40.

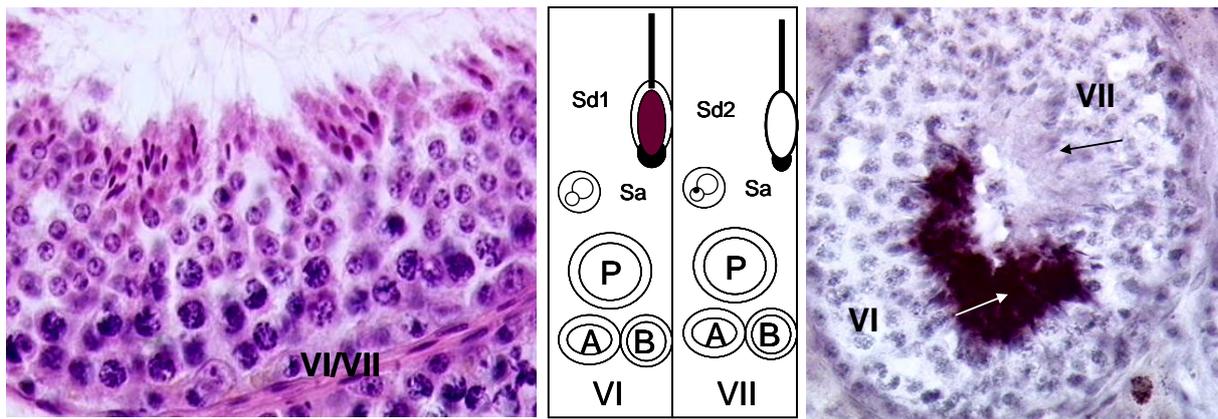


Abb. 36:

Normale Spermatogenese, Stadium VI und VII, Expression von Prm1-mRNA in Sd1-Spermatiden in Stadium VI (weißer Pfeil) und keine Expression in Sd2-Spermatiden von Stadium VII (schwarzer Pfeil), links HE-Färbung, rechts ISH, Primärvergrößerung x 40.

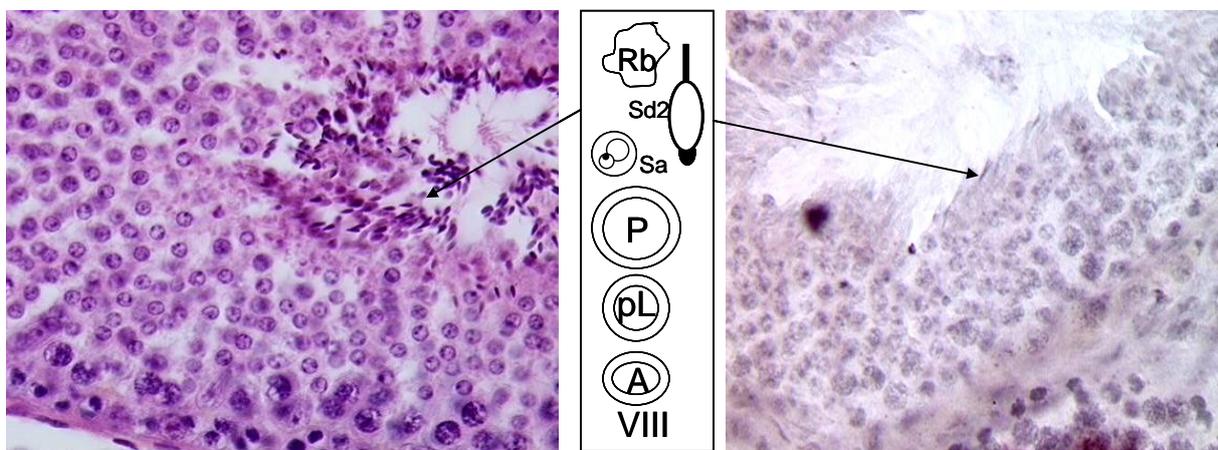


Abb. 37:

Normale Spermatogenese, Stadium VIII, keine Expression von Prm1-mRNA, links HE-Färbung, rechts ISH, Primärvergrößerung x 40.

4.4.3.2 Zusammenfassung der Pr1-mRNA-Expression innerhalb einer normalen Spermatogenese (Gruppe 2)

Pr1-mRNA wurde innerhalb einer normalen Spermatogenese bei allen Altersgruppen zunächst noch schwächer in Sb1-Spermatiden (Stadium I) dann deutlich bis in Sd1-Spermatiden des Stadium VI nachgewiesen. Die Spermatiden der Stadien VII und VIII zeigten keine Expression.

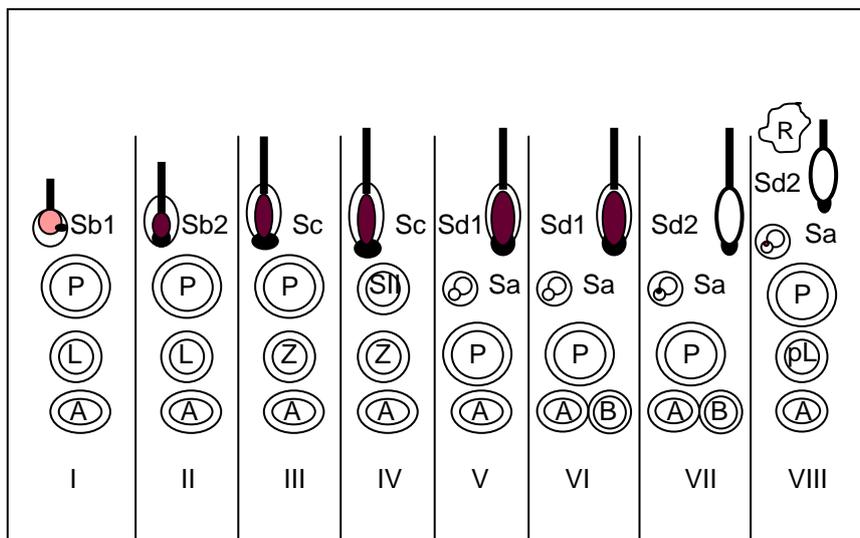


Abb. 38:

Stadienspezifische Pr1-mRNA-Expression bei Hengsten mit normaler Spermatogenese, Spermatogenesestadien nach JOHNSON et al. 1990 (Legende s. Abb. 30).

4.4.3.3 Pr1-mRNA-Expression in Hodengewebe mit unvollständiger Spermatogenese (Gruppe 3)

Sofern das Keimepithel vollständig ausgebildet war, bzw. die Keimzellen in denen ein Pr1-mRNA-Nachweis bisher beobachtet wurde (Spermatiden Sb1 bis Sd2), infolge von Arresten oder Ausbleiben einzelner Spermatogenesewellen nicht fehlten, konnte eine Pr1-mRNA-Expression wie bei einer normalen Spermatogenese beobachtet werden. Es war auch in die-

sem Falle, vergleichbar mit Transitionsprotein 1, nicht ausschlaggebend, ob in dem untersuchten Hodengewebe überhaupt ein Spermienrelease festgestellt werden konnte.

4.4.3.4 Pr1-mRNA-Expression in Hodengewebe ohne Spermatogenese (Gruppe 4)

In den Tubuli, die kein intaktes Keimepithel aufweisen konnten, bzw. in denen keine Keimzellen zu finden waren, in denen bisher der Pr1-mRNA-Nachweis gelang, konnte dem entsprechend kein positiver Nachweis geführt werden. Dies betraf alle Hodenschnitte, die keine Spermatogenese erkennen ließen.

4.4.4 Auswertung für Protamin 2-mRNA (Pr2-mRNA)

4.4.4.1 Pr2-mRNA-Expression in juvenilem Hodengewebe (Gruppe1)

Eine Pr2-m-RNA-Expression konnte in keinem der untersuchten, juvenilen Hodenschnitte festgestellt werden.

4.4.4.2 Pr2-mRNA-Expression in Hodengewebe mit normaler Spermatogenese (Gruppe 2).

Pr2-mRNA wurde in Hodengewebe mit normaler Spermatogenese in Sa-Spermatiden (Stadium VIII) bis in Sd1-Spermatiden (Stadium V) exprimiert.

4.4.4.2.1 Dokumentation der Prm2-mRNA-Expression innerhalb einer normalen Spermatogenese

Abb. 39 bis 44 demonstrieren den Nachweis der Prm2-mRNA Expression in den Spermatiden der Spermatogenese nach JOHNSON et al. 1990.

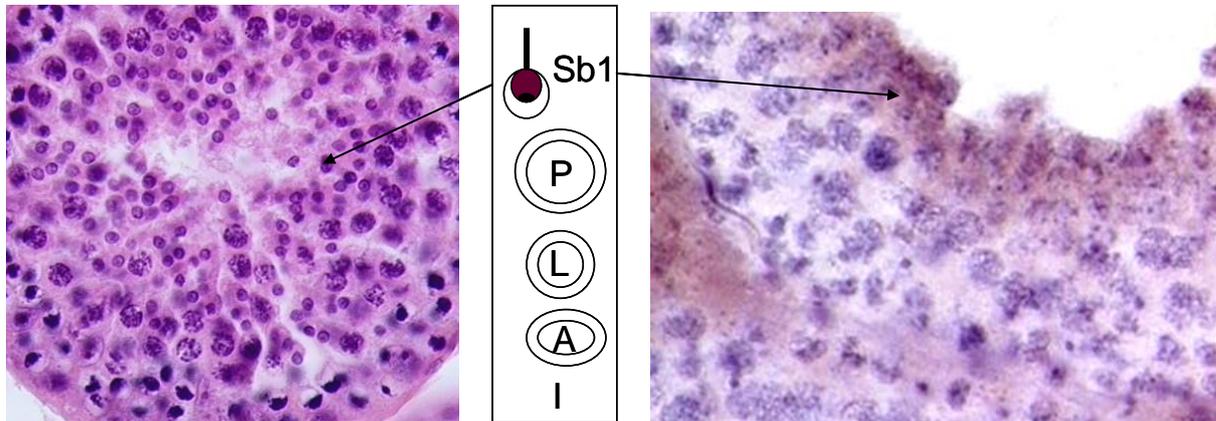


Abb. 39:

Normale Spermatogenese, Stadium I, Pr2-mRNA-Expression in Sb1-Spermatiden, links HE-Färbung, rechts ISH, Primärvergrößerung x 40.

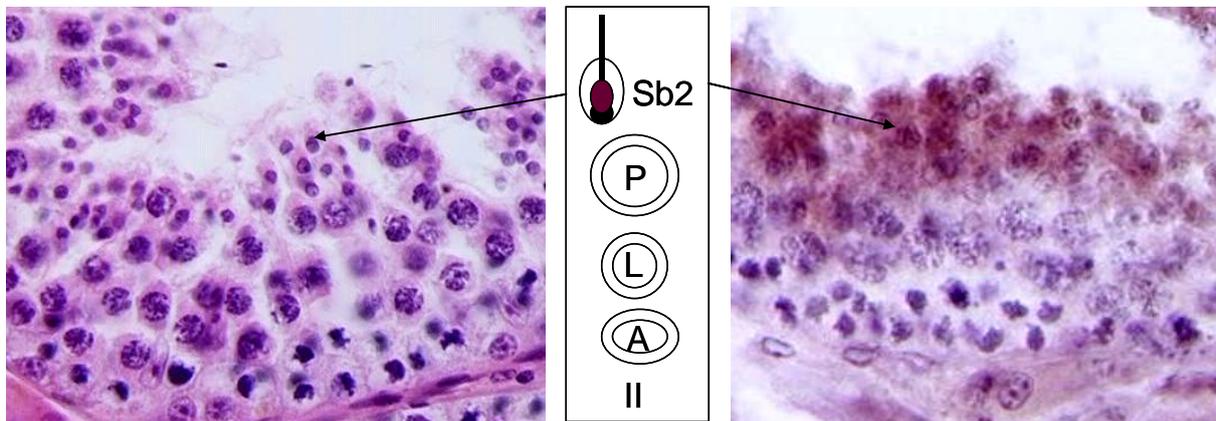


Abb. 40:

Normale Spermatogenese, Stadium II, Pr2-mRNA-Expression in Sb2-Spermatiden, links HE-Färbung, rechts ISH, Primärvergrößerung x 40.

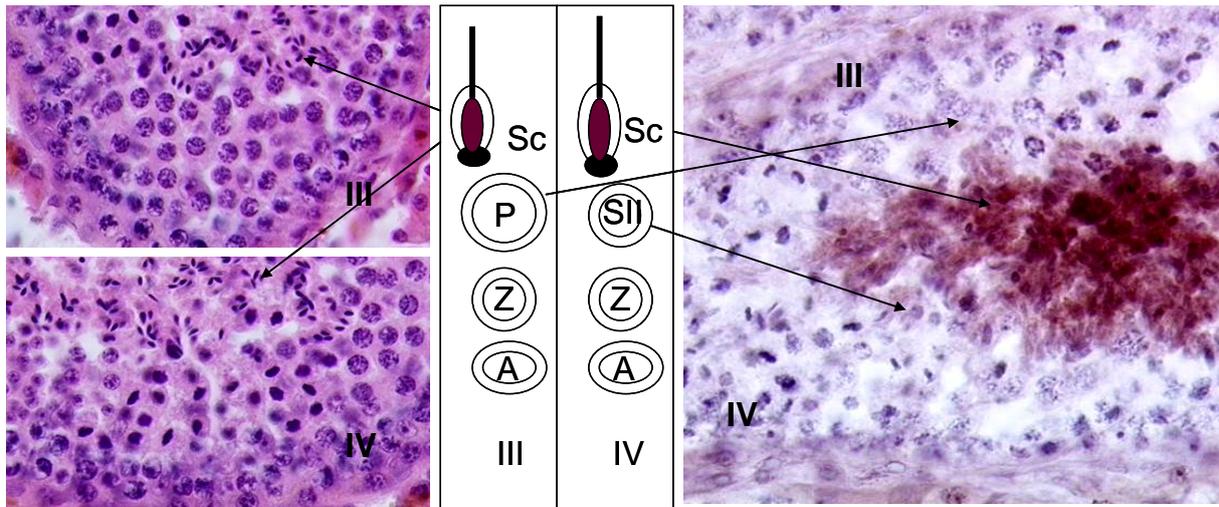


Abb. 41:

Normale Spermatogenese, Stadium III und IV, in beiden Stadien Pr2-mRNA-Expression in Sc-Spermatiden, links HE-Färbung, rechts ISH, Primärvergrößerung x 40.

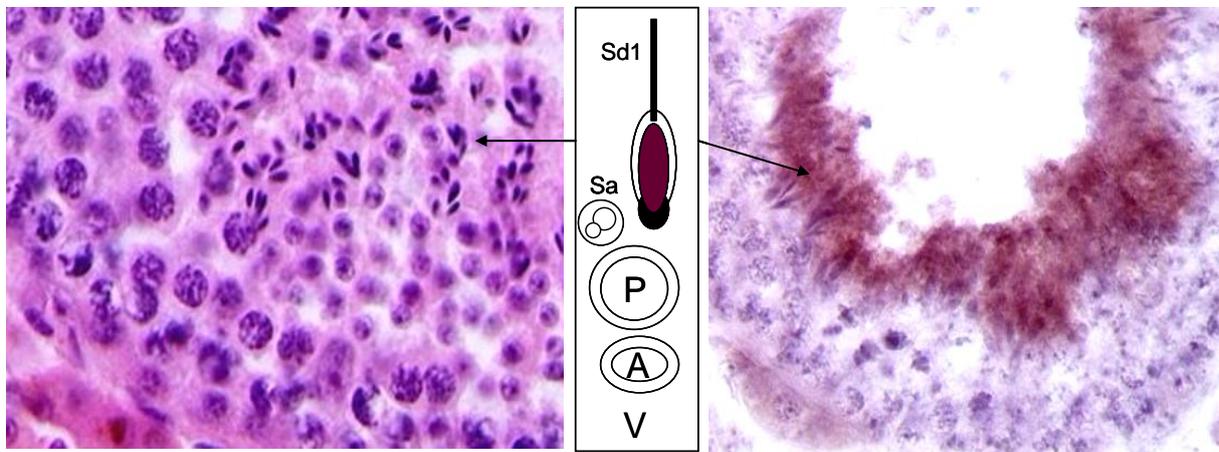


Abb. 42:

Normale Spermatogenese, Stadium V, Pr2-mRNA-Expression in Sd1-Spermatiden, links HE-Färbung, rechts ISH, Primärvergrößerung x 40.

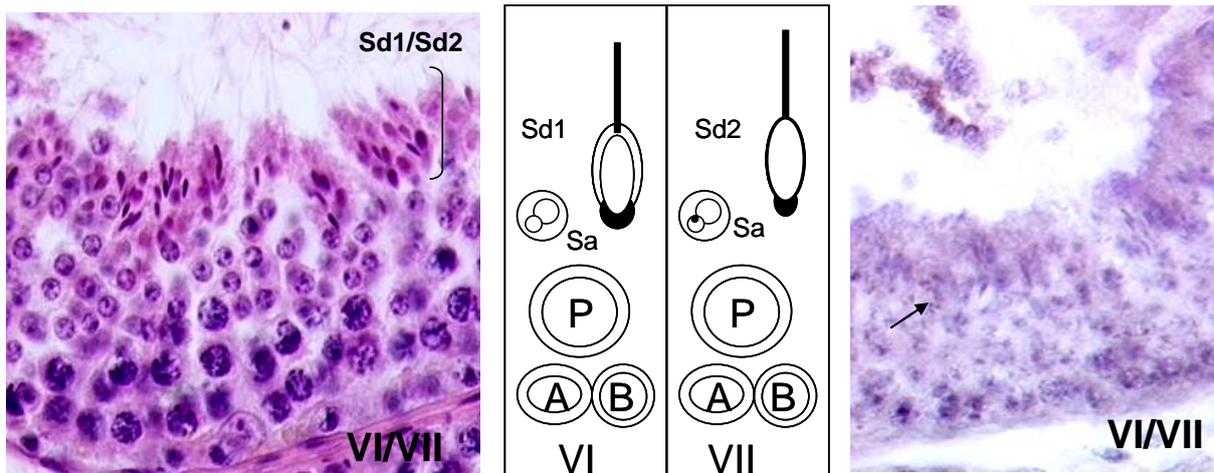


Abb. 43:

Normale Spermatogenese, Stadium VI/VII, keine Pr2-mRNA-Expression in Sd1 und Sd2-Spermatiden (Pfeil rechtes Bild), links HE-Färbung, rechts ISH, Primärvergrößerung x 40.

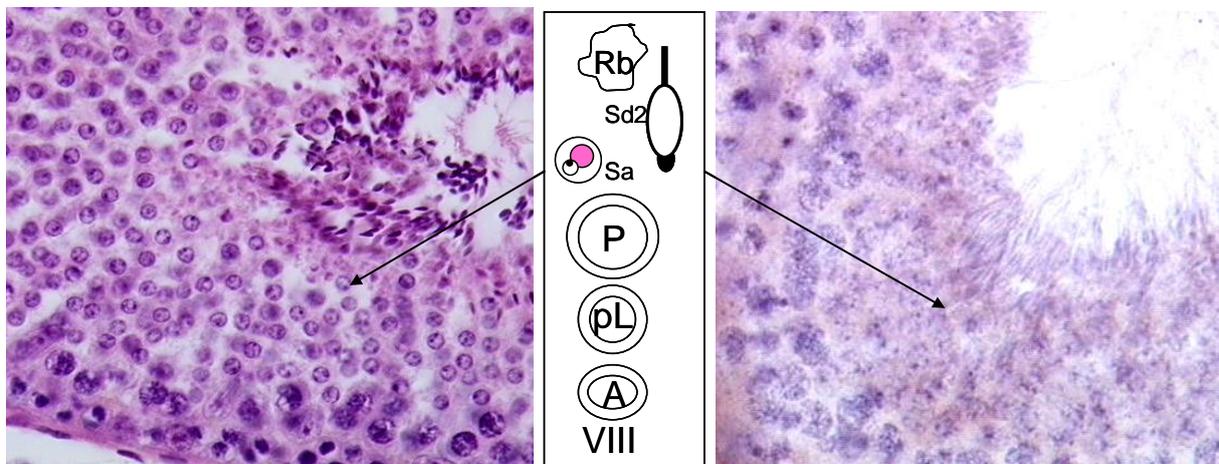


Abb. 44:

Normale Spermatogenese, Stadium VIII, schwache Pr2-mRNA-Expression in Sa-Spermatiden, links HE-Färbung, rechts ISH, Primärvergrößerung x 40.

4.4.4.2 Zusammenfassung der Prm2-mRNA-Expression innerhalb der normalen Spermatogenese.

Pr2-mRNA konnte bei einer normalen Spermatogenese, unabhängig vom Alter der Hengste, zunächst nur mit schwacher Expression in Sa-Spermatiden im Stadium VIII, dann auch mit deutlicher Expression bis zu den Sd1-Spermatiden in Stadium V nachgewiesen werden.

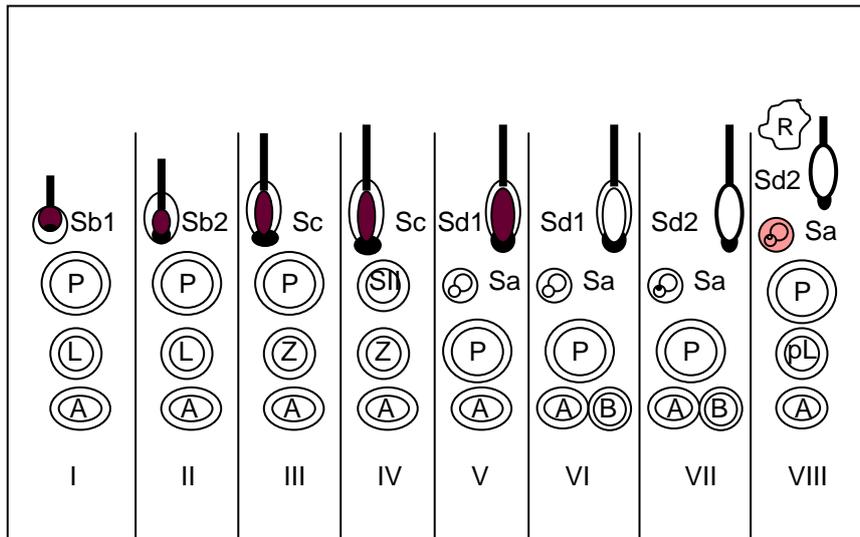


Abb. 45:

Stadienspezifische Expression der Prm2-mRNA-Expression in Hodengewebe mit normaler Spermatogenese, Stadien nach JOHNSON et al. 1990 (Legende s. Abb. 30).

4.4.4.3 Pr2-mRNA-Expression in Hodengewebe mit unvollständiger Spermatogenese (Gruppe 3)

Für die Expression der Pr2-mRNA wurde festgestellt, sofern das Keimepithel vollständig ausgebildet war, bzw. die Keimzellen in denen ein Pr2mRNA-Nachweis bisher beobachtet wurde, infolge von Arresten oder Ausbleiben einzelner Spermatogenesewellen nicht fehlten, eine Pr2m-RNA-Expression (in Zellen wie bei der normalen Spermatogenese) beobachtet werden konnte. Es war in diesem Falle, vergleichbar mit Transitionsprotein 1 und Protamin 1, nicht ausschlaggebend, ob in dem untersuchten Hodengewebe überhaupt ein Spermienrelease festgestellt werden konnte.

4.4.4.4 Pr2-mRNA-Expression in Hodengewebe ohne Spermatogenese (Gruppe 4)

Vergleichbar mit der mRNA-Expression von Transitionsprotein 1 und Protamin 1 in Gruppe 4, galt für die Tubuli, die kein intaktes Keimepithel aufweisen konnten, bzw. in denen keine Keimzellen zu finden waren, in denen bisher der Prm2-mRNA-Nachweis gelang, dass dem entsprechend kein positiver Nachweis geführt werden konnte. Dies betraf alle Hodenschnitte, in denen keine Spermatogenese darstellbar war.

Spermatiden noch mit deutlich positiver Pr1-mRNA, während Sd1/Sd2-Spermatiden keine Expression zeigen.

4.4.4.5 Besonderheiten der Tp1-mRNA-Expression innerhalb verschiedener Altersgruppen

Die Ergebnisse der Tp1mRNA-Expression innerhalb der Gruppe der „normalen Spermatogenese“ ließen weitere Regelmäßigkeiten abhängig vom Alter der Tiere erkennen: die Hodenschnitte der Hengste, die älter waren als 3 Jahre zeigten ein schwach positives Signal in Sa-spermatiden (Stadium VIII). Deutlich positive Signale wurden in Sb1-, Sb2-, Sc- und Sd1-Spermatiden (Stadium I bis V) erreicht. Das Signal wurde in Sd1- und Sd2-Spermatiden (Stadium VI und VIII) nicht mehr nachgewiesen.

Hengste unter 2 Jahren zeigten in den Sb1- und Sb2-Spermatiden (Stadium I und II) ein sehr schwaches, aber stärker werdendes Signal. Vereinzelt zeigte sich in Sb1-Spermatiden auch noch kein Signal. Erst Sc-Spermatiden (ab Stadium III) färbten sich hier deutlich an. Bei Hengsten zwischen 2 und 3 Jahren konnte bereits in den Sb2-Spermatiden (Stadium II) ein deutliches Signal der Tp1-mRNA-Expression festgestellt werden.

Altersgruppenunterschiede dieser Art konnten bei den anderen untersuchten Proteinen nicht beobachtet werden.

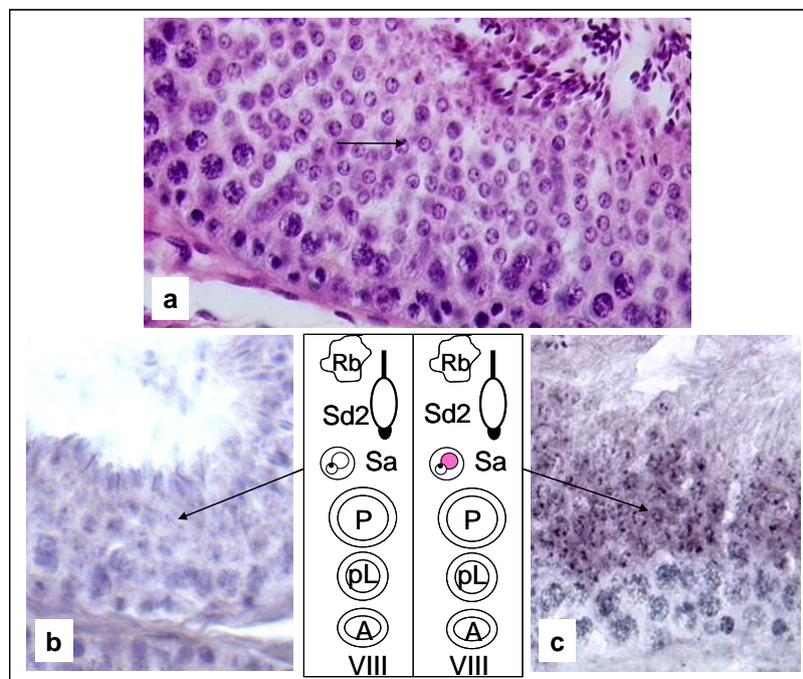


Abb. 46:

Normale Spermatogenese, Stadium VIII, Expression von Tp1-mRNA.

a: HE-Färbung, Sa-Spermatiden markiert durch schwarzen Pfeil. **b:** ISH, keine Expression von Tp1-mRNA-Expression in Sa-Spermatiden bei Hengsten unter 2 Jahren. **c:** ISH, schwache Tp1-mRNA-Expression in Sa-Spermatiden bei Hengsten älter als 3 Jahren. Primärvergrößerung x 40 (Legende s. Abb. 30).

4.4.4.6 Vergleich der stadienspezifischen mRNA-Expression von Pr1 und Pr2

Im Vergleich zeigen Pr1 und Pr2 vom Alter der Hengste unabhängige, geringgradig von einander abweichende Expressionsmuster. Pr1-mRNA wird ab Stadium I in Sb1-Spermatiden zunehmend stärker bis Stadium VI in Sd1-Spermatiden exprimiert. Der Beginn der Pr2-mRNA-Expression beginnt etwas früher in Sa-Spermatiden des Stadium VIII und endet früher als Pr1 in Sd1-Spermatiden im Stadium V.

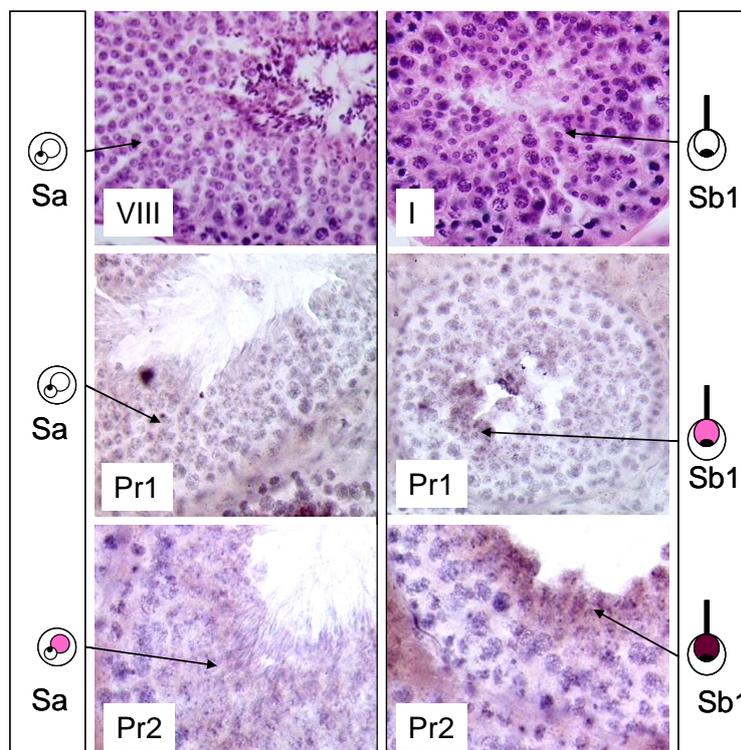


Abb. 47:

Normale Spermatogenese, Vergleich der mRNA-Expression von Pr1 und Pr2.

Oben links: HE-Färbung, Stadium VIII, normale Spermatogenese, **mitte links:** ISH, keine Pr1-mRNA-Expression in Sa-Spermatiden im Stadium VIII, **unten links:** ISH, schwache Pr2-mRNA-Expression in Sb1-Spermatiden in Stadium VIII. **Oben rechts:** HE-Färbung, normale Spermatogenese, Stadium I, **mitte rechts:** ISH, schwache Pr1-mRNA-Expression in Sb1-Spermatiden in Stadium I, **unten rechts:** ISH, deutliche Pr2-mRNA-Expression in Sb1-Spermatiden in Stadium I (Legende s. Abb. 30).

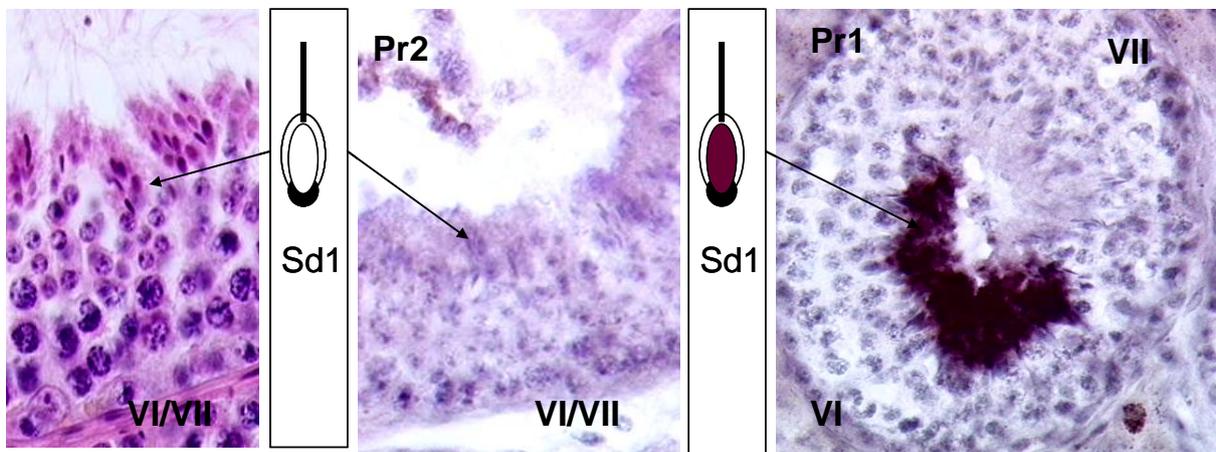


Abb. 48:

Vergleich der mRNA-Expression von Pr1 und Pr2 im Stadium VI:

Links: HE-Färbung, **mitte:** ISH, Pr2, Stadium VI/VII, keine mRNA-Expression, **rechts:** Pr1, Stadium VI/VII, mRNA-Expression in Stadium VI (Legende s. Abb. 30).

4.4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der ISH

Abb. 49 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der ISH von Prm1 und 2, sowie Tp1 beim Pferd.

	VIII	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Tp1 <2 Jahre	 Sa	 Sb1	 Sb2	 Sc	 Sc	 Sd1	 Sd1	 Sd2	 Sd2
Tp1 2-3 Jahre	 Sa	 Sb1	 Sb2	 Sc	 Sc	 Sd1	 Sd1	 Sd2	 Sd2
Tp1 >3 Jahre	 Sa	 Sb1	 Sb2	 Sc	 Sc	 Sd1	 Sd1	 Sd2	 Sd2
Prm1	 Sa	 Sb1	 Sb2	 Sc	 Sc	 Sd1	 Sd1	 Sd2	 Sd2
Prm2	 Sa	 Sb1	 Sb2	 Sc	 Sc	 Sd1	 Sd1	 Sd2	 Sd2

Abb. 49:

Zusammenfassung der stadienspezifischen (Stadium I-VIII, modifiziert nach JOHNSON et al. 1990) Expression der m-RNA der Kernproteine Tp1, sowie Prm1 und 2 in den Spermatisden während einer normalen Spermatogenese des Hengstes. Für Tp1 wurden unterschiedliche Expressionsmuster abhängig vom Alter der Tiere festgestellt (Legende siehe Abb. 30).

5. Diskussion

5.1. Histologische Beurteilung

Nach McKINNON und VOSS (1993) wird der Beginn der Pubertät mit Einsetzen der Spermienproduktion mit durchschnittlich gut einem Lebensjahr festgelegt, variiert aber stark zwischen verschiedenen Rassen und ist abhängig von der Jahreszeit der Geburt des Hengstes. Die postpuberale Phase, innerhalb der ein Hengst zu seiner maximalen Spermienproduktion gelangt, dehnt sich 2 bis 4 Jahre nach Beginn der Pubertät aus, so dass ein Maximum erst mit 4 bis 6 Lebensjahren erreicht wird und so altersabhängige Unterschiede in der Spermatogeneseintensität erklärt werden können.

Die unterschiedlichen Beobachtungen bei der histologischen Untersuchung des Keimepithels der abdominal und inguinal gelagerten Hoden entsprechen den Beurteilungen von ALBAGDADI et al. (1991). Bestätigt werden konnte mit vorliegender Untersuchung, dass das Keimepithel der abdominalen Hoden insgesamt weniger ausgebildet und differenziert ist als das der inguinalen. Prinzipiell ist anzunehmen, dass inguinal und abdominal gelagerte Hoden sich unterschiedlich entwickeln, da sie unterschiedlichen (Temperatur-) Verhältnissen ausgesetzt sind. FREIDMAN et al. (1991) fertigten eine Studie an, wobei sie zwei Hengstgruppen 24 und 48 Stunden einer Hodenerwärmung von normalen 35°C auf untypische 37,3 +/- 0,69°C aussetzten. Dies sind Verhältnisse, wie sie unter natürlichen Bedingungen, z.B. bei kryptorchiden Hoden, fieberhaften Infekten oder entzündlichen Infektionen der Hoden vorkommen können. Innerhalb einer Zeitspanne von ca. 70 folgenden Tagen wurden die Auswirkungen auf die Spermatogenese untersucht. Volumen und pH-Wert wurden bei beiden Gruppen nicht wesentlich beeinflusst. Die Verschlechterungen in Bezug auf Spermienmotilität und -konzentration, sowie die Erholungsdauer bis zu Normalwerten wie zu Versuchsbeginn, waren in der 48 Stunden-Gruppe deutlich ausgeprägter. Die Autoren nahmen an, dass v.a. Spermatozyten und Spermatischen anfälliger sind als Spermatogonien, Spermatischen aber im proximalen Nebenhodensystem vor übermäßiger Wärmeexposition besser geschützt sind.

LOVE und KENNEY (1999) untersuchten die Auswirkungen einer erhöhten Wärmeexposition auf die Chromatinstruktur. Sie stellten fest, dass primäre Spermatozyten, die noch eine nukleoprotamine Gestalt aufweisen, am meisten betroffen sind. Sie stellten weiter fest, dass der Protamingehalt und Gestalt konstant blieben, jedoch eine deutliche Reduzierung der Disulfidbrückenbindungen beobachtet wurde.

Es sollte kritisch überdacht werden, inwiefern die Auswirkungen dieser nur temporär erhöhten Wärmeexpositionen auf kryptorchide Verhältnisse, die eine ständig erhöhte Hodentemperatur bedingen, übertragen werden können. Sie liefern jedoch erste Anhaltspunkte.

5.2 RT-PCR

Für das Protamin 1 konnten die Ergebnisse der ISH mittels RT-PCR untermauert werden, nämlich insofern, dass hier der Nachweis der mRNA für Protamin 1 im equinen Hodenhomogenat gelang.

5.3. In-Situ-Hybridisierung

5.3.1 Übersicht

Studien mit Maus-RNA-Proben aus isolierten Zellpopulationen von pachytänen Spermatozyten, runden und elongierten Spermatiden sowie Restkörperchen ergaben, dass keine Transitionsprotein- oder Protamin-mRNA in primären Spermatozyten, aber große Mengen mRNA in

allen post-meiotischen RNA-Proben nachweisbar waren (KLEENE et al. 1984 b, YELICK et al. 1989).

Für Mensch, Maus und Ratte konnten bisher ähnliche stadienspezifische Expressionsmuster für mRNA und zugehörige Kernproteine bestimmt werden. In späten runden Spermatiden beginnt zunächst die Synthese der Transitionsprotein-mRNA. Zeitlich geringgradig verspätet setzt die Transkription der Protamin-mRNA ein. In den elongierenden Spermatiden und frühen kondensierenden Spermatiden beginnt die Expression der Transitionsproteine und etwas verzögert die der Protamine. Die Protamine werden etwas länger synthetisiert, d.h. bis zu relativ weit kondensierten Spermatiden. Vor dem Spermienrelease sind weder mRNA noch Proteine der Transitionsproteine und Protamine nachweisbar (MALI et al. 1989, HECHT 1990, WYKES et al. 1995, KISTLER 1996, STEGER et al. 1998, STEGER 1999 MEISTRICH et al. 2003).

Wie bisher bei anderen Tierarten untersucht, konnte im Rahmen dieser Arbeit auch beim Pferd, ähnlich den bekannten Expressionsmustern, post-meiotisch Transitionsprotein und Protamin-mRNA nachgewiesen werden.

5.3.2 Transitionsproteine

Bei Hengsten mit normaler Spermatogenese und einem Alter von über 3 Jahren konnte Tp1-mRNA in Sa-Spermatiden (Spermatogenesestadium VIII) bis in Sd1-Spermatiden (Stadium V) nachgewiesen werden.

Frühere Studien an Maus, Ratte und Mensch verschiedener Autoren untermauern vorliegende Ergebnisse der Tp1-mRNA-Expression beim Pferd in späten runden Spermatiden bis hin zu frühen sich elongierenden Spermatiden (MEISTRICH et al. 2003, STEGER 2002, HECHT 1990, KISTLER 1996, STEGER et al. 1998, STEGER 1999).

Ein gleiches Muster konnte bei Hengsten mit inguinal und abdominal gelagerten Hoden, mit Spermatogenesedefekten, sowie Bunten Atrophien festgestellt werden, sofern es zu einer Ausbildung dieser Spermatidenstadien kam. Es war dabei ohne Bedeutung, ob ein „Spermienrelease“ statt fand oder nicht.

Abhängig vom Alter, konnte bei den Hengsten unter 3 Jahren eine verzögerte mRNA Expression beobachtet werden. Hengste mit einer normalen Spermatogenese, aber mit einem Alter unter 2 Jahren exprimierten innerhalb der Stadien I bis V in den Spermatiden Sb1 bis Sd1 die gesuchte mRNA, wobei die Sb1-Spermatiden (Stadium I) sich nur schwach anfärbten. Hengste im Alter zwischen 2 und 3 Jahren zeigten bereits in den Sb1-Spermatiden ein deutliches Signal der gesuchten mRNA.

Junghengste erreichen erst 2-4 Jahre nach Einsetzen der Pubertät ein Maximum der Spermatogenesaktivität (McKINNON und VOSS 1992).

Die altersabhängige, später einsetzende Expression der Tp1-mRNA kann mit Beobachtungen von CAVALCANTI et al. (2009) in Einklang gebracht werden. Abhängig vom Alter der Tiere mit einer großen Variationsbreite zwischen zwei und vier Jahren, konnte hier für peripuberale Hengste eine verlängerte H1- und H1t-Protein-Expression bis in das Stadium V/ Sd1- bzw. Stadium II/ Sb2-Spermatiden festgestellt werden. Somit ist bei einer altersabhängigen Verschiebung der Expressionsmuster der Histon-Transitionproteinaustausch zeitlich verzögert, aber „logistisch“ dennoch gewährleistet, und unterstreicht die von CAVALCANTI et al. (2009) aufgestellte Vermutung, dass diese Beobachtungen beitragen können, die von MELO et al. (1998) beschriebene peripuberale Subfertilität aufzuklären.

Die peripuberale Subfertilität stellt für Junghengste auch ein „praktisches Problem“ dar. Die Hengste werden ca. 2 1/2-jährig im Herbst zur Körung vorgestellt. Die erste Stationierung in den Hengstställen der Deckstationen erfolgt Anfang des nächsten Jahres ab Januar/ Februar. Je nach Geburtsmonat sind einige Junghengste zu diesem Zeitpunkt noch nicht einmal 3jährig. Die erste Saison dauert bis Juli/ August, dann folgt die Vorbereitung für den Hengstleistungstest. Seine Präsentation auf der Körung und den folgenden Hengstschauen, sein Pedigree und letztendlich ganz entscheidend seine „Vermarktung“ sind ausschlaggebend dafür, inwiefern ein junger Vererber zum hochfrequentierten „Modehengst“ hochstilisiert wird und dementsprechende Erwartungen der Züchter zu erfüllen hat. Eine ganz entscheidende Erwartung ist sicherlich, eine gute Fertilitätsrate aufzuweisen. Auch wenn medizinisch das Problem der puberalen Subfertilität nicht neu ist, fällt es doch der kritischen und anspruchsvollen Züchterschaft schwer, diese zu akzeptieren, wenn ihre Stuten aufgrund einer mangelhaften Spermaqualität nicht tragend werden. Folge ist, dass einem im Vorjahr hochgefragter

Jungsthengst in der nächsten Decksaison schnell der Ruf einer schlechten Spermaqualität vorausseilt. Um dem vorzubeugen, erhalten der Art auffällige Hengste nur eine begrenzte Anzahl von Stuten oder andere Restriktionsmaßnahmen, wie Besamung mit Frischsperma ausschließlich direkt auf der Hengstation und nicht als Hofbesamung. Man versucht damit erfolgslimitierende Faktoren, wie Spermatransport oder auch nicht optimale Bestimmung des günstigsten Besamungszeitpunktes bei der Stute ausschließen zu können. Viele dieser Junghengste zeigen eine deutliche Besserung der Spermaqualität in der nächsten Saison und werden dann ohne Einschränkungen angeboten.

Tp2-mRNA konnte mit dem durchgeführten Verfahren der In-Situ-Hybridisierung im Hodengewebe des Pferdes nicht nachgewiesen werden.

Wir versuchten Tp2-mRNA mittels einer humanen Sonde zu detektieren. Vereinzelt extrem schwach positive Ergebnisse waren nicht eindeutig reproduzierbar und wurden deshalb als negativ beurteilt. Bei den Untersuchungen von STEGER et al. (1998) ließ sich ebenso humane Tp2-mRNA nicht im Paraffinschnitt nachweisen. Erst mittels RT-PCR gelang ein deutlicher Nachweis der gesuchten RNA. Man vermutete hier als Ursache, dass das menschliche Tp2-Gen lediglich auf einem sehr geringen Level exprimiert wird. Mit Anwendung einer α -35-S-cRNA (WYKES et al. 1995) und einer RNase-Gold-Behandlung (DADOUNE et al. 1991) gelang der mRNA-Nachweis bei Mensch, bzw. Affe.

5.3.3 Protamine

Für die Prm1-mRNA-Expression konnte festgestellt werden, dass sich innerhalb der Gruppe der Hoden mit einer normalen Spermatogenese in den Spermatogenesestadien I bis VI in den sich elongierenden Spermatiden Sb1 bis Sd1 ein positives Signal darstellt, wobei die frühen Sb1-Spermatiden sich noch eher schwach anfärbten. Dieses Expressionsmuster stimmt mit bisher veröffentlichten Daten bei Maus, Ratte und Mensch überein (MALI et al. 1989, HECHT 1990, KISTLER et al. 1996, STEGER et al. 1998, STEGER 1999, STEGER 2002).

Soweit das Keimepithel entsprechend ausgebildet war, bzw. die Keimzellen in denen ein Pr1-mRNA-Nachweis bisher beobachtet wurde, infolge von Arresten oder ausbleibenden Sperma-

togenesewellen nicht fehlten, konnte eine Pr1-mRNA-Expression wie bei einer normalen Spermatogenese beobachtet werden. Es war dabei nicht entscheidend, ob es überhaupt zu einem Spermienrelease kam.

STEGGER (1998) stellte für den Menschen für Pr1 und 2 eine zeitgleiche mRNA-Expression in den Spermatiden step 1-4 fest. Der Autor fasst zusammen, dass die transkribierte mRNA der Protamine (und auch der Transitionsproteine) für einige Tage als Ribonukleinproteine in einem translational blockiertem Zustand gelagert wird um dann in den Spermatiden step 4-8 translatiert zu werden. Eine zeitlich unterschiedlich einsetzende Transkription der Pr1 und 2-mRNA beim Hengst ist eventuell auf eine unterschiedliche Funktion der beiden Proteine zurückzuführen oder auch im Zusammenhang mit den zwei Strukturvarianten des equinen Pr2 anzusprechen. Für das Pferd wurden von PIRHONEN et al. (1989) angenommen, dass es sich nicht wie beim Menschen um eine Precursor-Variante, sondern Varianten handelt, die von 2 verschiedenen Genen abstammen.

Die Expression der Pr1- und Pr2-mRNA wurde abhängig von den im Keimepithel vorhandenen, exprimierenden Spermatiden, aber unabhängig von einem Spermienrelease oder folgenden Arresten beobachtet. LEE et al. (1987) fanden ähnliche Zusammenhänge heraus. Sie konnten in 7 Monate alten Bullen Pr1-mRNA nachweisen. Die Hoden dieser Tiere enthielten 10-15% runde Spermatiden. Mature Spermienzellen wurden erst bei 9 Monate alten Tieren beobachtet. Bei jüngeren Tieren wurde keine Prm-mRNA festgestellt.

5.3.4 Diskussion der Methode der ISH

Die Prm1-mRNA wurde nachgewiesen mittels einer eigens hergestellten Sonde, basierend auf der bekannten Gen-Sequenz. Für den Nachweis der Pr2-, Tp1- und Tp2-mRNA wurde eine humane Sonde verwendet. Entscheidend bei der Verwendung einer nicht spezieseigenen Sonde ist die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz insbesondere in dem von der Sonde codierten Bereich, so dass es zu einer Hybridisierung kommen kann. Die Aminosäuresequenz

von Prm2 weist innerhalb der Gruppe der untersuchten Spezies weniger Übereinstimmungen auf. Beim Menschen und der Maus wird eine zweite Precursor-Variante diskutiert (BALHORN 2007), beim Pferd wird eventuell sogar vermutet, dass die zwei Strukturvarianten von unterschiedlichen Genen abstammen (PIRHONEN et al. 1989).

Tp2 mRNA konnte nicht nachgewiesen. Es gilt zu klären, ob das Pferd Tp2 genetisch besitzt, ob es, wenn vorhanden, auch zu einer genetischen Expression kommt und somit der zum heutigen Zeitpunkt negative Nachweis einer mangelhaften Methodik zuzuschreiben wäre. Hilfreich hierbei wären für dieses Protein etablierte Verfahren der Immunhistochemie, des Western Blottings oder Polymerasekettenreaktion.

5.4 Regulation der stadienspezifischen Expression der Kernproteine

Die zeitlich unterschiedliche Expression der Kernproteine erklärt sich durch die Ereignisse der Spermiogenese. Laut KIERSZENBAUM und TRES (1975) bedingt der Austausch der Histone durch Transitionsproteine in den frühen runden Spermatiden, einhergehend mit der beginnenden Kernkondensierung, eine Einstellung der Transkription. Gleichzeitig wird der Zellkern zunehmend resistenter gegen mechanische Beanspruchungen (MEISTRICH et al. 1976, GRIMES et al 1975). Die Synthese der Transitionsproteine und Protamine findet jedoch bei allen untersuchten Säugetieren ähnlich, erst in den späten runden oder sich elongierenden Spermatiden statt. Zu diesem Zeitpunkt wird ihre Funktion zur weiteren Kernkondensierung benötigt. Maus Pr1-mRNA wird z.B. 8 Tage lang bis zu ihrer Transkription in inaktiven Ribonukleoproteinpartikeln „gelagert“ (PESCHON et al. 1987)

Für das Tp1 konnten HEIDERAN und KISTLER (1987) eine haploide Genexpression nachweisen. Tp1-mRNA ist in den späten, runden Spermatiden vorzufinden und verbleibt 3-4 Tage translational inaktiv bis in den frühen, elongierten Spermatiden die Synthese beginnt. LEE et al. (1987) konnten für das bovine Pr1 ebenso eine haploide Genexpression festlegen.

Die Regulationsmechanismen für die zum einen stadienspezifische Genexpression der Kernproteine und das zeitlich getrennte Auftreten der mRNA und ihres korrespondierenden Proteins sind äußerst komplex. Es bleibt weiterhin zu klären, durch den qualitativen und stadienspezifischen Nachweis der Kernproteine im Verlauf der equinen Spermatogenese, inwiefern sich bisher bekannte Verteilungsmuster anderer Tierarten wieder erkennen lassen oder speziesspezifische Besonderheiten zu vermerken sind, um somit z.B Sub- und Infertilitäten evtl. erklären zu können.

6. Zusammenfassung

Für die starke Kernkondensierung in Keimzellen im Verlauf der Spermatogenese sind nach dem Austausch der Histone, Transitionsproteine und Protamine verantwortlich.

Diese sind hoch basische spermien-spezifische Kernproteine, die sich an die DNA anlagern, dabei neutralisieren und eine kompaktere Anlagerung der einzelnen DNA-Stränge ermöglichen. Es gibt verschiedene Modelle in welcher Art und Weise die Interaktion von Kernproteinen mit der DNA stattfindet.

Der Austausch der Kernproteine ist spezies- und spermatogenesestadienspezifisch.

Für u.a. Maus, Ratte, Mensch wurden diese Expressionsmuster auf mRNA- und Proteinebene bereits untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag zur Klärung der stadienspezifischen Kernproteinexpression von Transitionsprotein1 und den Protaminen beim Pferd zu leisten.

Zur Verfügung standen 52 orchiektomierte Hoden von 35 Hengsten unterschiedlicher Anamnese: Kastrationen von skrotal, inguinal und abdominal gelagerten Hoden.

Zunächst wurden das Hodengewebe mittels HE-Färbung klassifiziert und der Spermatogenesestatus bestimmt. Mittels Verfahren der In Situ-Hybridisierung wurde die mRNA der gesuchten Kernproteine nachgewiesen und ein Expressionsmuster aufgestellt. Mittels RT-PCR wurde zusätzlich der Trp1 m-RNA Nachweis geführt.

Für Transitionsprotein 1 und Protamin 1 und 2 konnten stadienspezifische mRNA-Expressionsmuster festgelegt werden, die mit denen bisher untersuchter Säugetiere übereinstimmen.

Für das Transitionsprotein 2 konnte kein positiver mRNA Nachweis mittels ISH oder PCR geführt werden.

Die altersabhängige, d.h. bei peripubertären Hengsten verzögert einsetzende Tp1-mRNA-Expression, steht im Einklang mit den Ergebnissen von CAVALCANTI et al. (2009), die bei Hengsten dieser Altersgruppe eine verlängerte Histon H1 und H1t-Expression feststellen

konnten. Wie bereits CAVALCANTI et al. (2008) annahmen, verhärtet sich mit den vorliegenden Ergebnissen der Verdacht, dass die bekannte peripubertäre, vorübergehende Sub- bzw. Infertilität mit einem unzulänglichen Histon-Protamin-Austausch begründet werden könnte.

Für Spermatogenesedefekte konnte gezeigt werden, dass es unabhängig von einer vollständigen Spermatogenesewelle dann zu einer Expression kommt, wenn die normalerweise „exprimierenden“ Zellen vorhanden sind.

7. Summary

During spermatogenesis, histones, transitionproteins and protamines are responsible for a strong condensation of the nucleus. These are basic, spermatidspecific proteins, which bound to DNA, neutralize negative charges und facilitate a very compact storage of the DNA in the chromatin. There are different meanings about the models of interaction between DNA and the basic proteins.

The exchange of transitionproteins and protamines during spermatogenesis is speciespecific and depends on the stage of spermatogenesis.

Object of this work was to establish the stagespecific exchange of transitionproteins and protamines during equine spermatogenesis.

From 35 stallions, we took altogether 52 testis. The stallions were different years old from one to sixteen and were castrated for different reasons like cryptorchism or routinely castration of scrotal testis.

First, we made a HE-colouring of the testis tissues to examine the state of spermatogenesis. Using in situ-hybridization, we detected the m-RNA of transitionprotein 1, protamine 1 and 2 in stagespecific spermatids and revealed corespondig models of their m-RNA expression during the equine spermatogenesis. Using RT-PCR, additional we provided evidence of transitionprotein 1-mRNA.

For transitionprotein 1, protamine 1 and 2 we revealed patterns of m-RNA expression that go together with previous examinations of other mammals like mouse, rat or man. We were not able to detect the mRNA of transitionprotein 2.

In the case of transitionprotein 1, we established a different expression of mRNA relative to the age of the stallions: peripuberal stallions, younger than 2 years, showed a delayed beginning of mRNA expression in sb1 respectively sb2-spermatids of stage I and II. Stallions older than 3 years expressed already tp1-mRNA in sa-spermatids of stage VIII.

Summary

This result is in accord with previous examinations from CAVALCANTI et al. (2008), who revealed an extended expression of H1 and H1t-mRNA in spermatids of peripuberal stallions. It seems to be presumable, that there`s a connection between the age dependent, probably insufficient histone to transitionprotein 1 exchange and the well known temporary, peripuberal, equine sub- resp. infertility.

8. Literaturverzeichnis

Akama K, Ichimura H, Sato H, Kojima S, Miura K, Hayashi H, Komatsu Y, Nakano M (1995)

The amino acid sequence and interaction with the nucleosome core DNA of transitionprotein 4 from boar late spermatid nuclei.

Eur J Biochem 233, 179-185

Akama K, Kosuge M, Sato H, Yamaoka Y, Nakano M, Tobita T (1994) a

Isolation of intact transition protein 1 and 3 from boar late spermatid nuclei.

Biochem Mol Biol Int 32, 615-622

Akama K, Mayurama R, Mochizuki H, Tobita T (1990)

Boar transition protein 2 and 4 isolated from late spermatid nuclei by high performance liquid chromatography.

Biochim Biophys Acta 1041, 264-268

Akama K, Oka S, Tobita T, Hayashi H (1994) b

The amino acid sequenz of boar transitionprotein 3.

J Biochem 115, 58-65

Akama K, Sato H, Furihata-Yamauchi M, Komatsu Y, Tobita T, Nakano M (1996)

Interaction of nucleosome core DNA with transition proteins 1 and 3 from boar late spermatid.

J Biochem 119, 448-455

Al –Bagdadi F, Hoyt P, Karns P, Martin G, Memon M, McClure R, McCoy, Shoemaker S (1991)

The morphology of abdominal and inguinal cryptorchid testes in stallions: a light and electron microscpic study.

Int J Fertil 36, 57-64

Allen MJ, Hud NV, Lee C, Pogany C, Siekhaus WJ, Balhorn R (1991)

Analysis of sperm nuclear volumes and extent of chromatin compaction by atomic force microscopy.

J Cell Biol 115, 50 (abstract 289)

Allen MJ, Lee C, Lee JD, Pogany CG, Balooch M, Siekhaus WJ, Balhorn R (1993)

Atomic force microscopy of mammalian sperm chromatin.

Chromosoma 102, 623-630

Amann RP (1981)

Spermatogenesis in the stallion: a review.

J Equine Vet Sci 1, 131-139

Ammer H, Henschen A, Lee C (1986)

Isolation and amino acid sequence analysis of human sperm protamines P1 und P2.

Biol Chem 367, 515-522

Ammer H, Henschen A (1987)

The major protamine from stallion sperm.

Biol Chem 368, 1619-1626

Ammer H, Henschen A (1988)

Primary structure of rabbit sperm protamine, the first protamine of ist type with an aberrant N-terminal.

FEBS Letters 242, 111-116

Ando T, Iwai K, Azegami M, Nakahara C (1962)

The chemical structure of one component of clupeine.

Biochim Biophys Acta 56, 628-630

Arcscott PG, Li AZ, Bloomfield VA (1990)

Condensation of DNA by trivalent cations. 1. effects on DNA length and topology on the size and shape of condensed particles.

Biopolymers 30, 619-630

Balhorn R (1982)

A model for the structure of chromatin in mammalian sperm.

Journal of Cell Biol 93, 298-305

Balhorn R (1989)

Mammalian protamines: structure and molecular interactions.

In: Molecular Biology of Chromosome Function. Adolph KW (ed) Springer, New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo. 366-395

Balhorn R (2007)

The protamine family of sperm nuclear proteins.

Genome Biol 8, 227-238

Balhorn R, Corzett M, Mazrimas J, Watkins B (1991)

Identification of bull protamine disulfids.

Biochemistry 30, 175-181

Balhorn R, Reed S, Tanphaichitr N (1988)

Aberrant protamine 1/ protamine 2 ratios in sperm of infertile human males.

Experientia 4, 52-55

Balhorn R, Weston S, Thomas C, Wyrobek AJ (1984)

DNA packaging in mouse spermatids.

Exp Cell Res 150, 298-308

Banerjee S, Smallwood A (1998)

Chromatin modification on imprinted H19 gene in mammalian spermatozoa.

Mol Reprod Develop 50, 474-484

Baskaran R, Rao MRS (1990)

Interaction of spermatid-specific protein Tp2 with nucleic acids, *in vitro*.

J Biol Chem 265, 21039-21047

Baskaran R, Rao MRS (1991)

Mammalian spermatid specific protein, TP2, is a zinc metalloprotein with two finger motifs.

Biochim Biophys Res Commun 179, 1491-1499

Bellve AR (1982)

Biogenesis of mammalian spermatozoon.

In: Amman RP, Seidel GE (eds), Prospects for Sexing Mammalian Sperm.

Boulder: Colorado Associated University Press, 69-102

Bellve AR, McKay DJ, Renaux BA, Dixon GH (1988)

Purification and characterization of mouse protamines P1 and P2, amino acid sequence of P2.

Biochemistry 27, 2890-2897

Belaiche D, Loir M, Kruggle W, Sautiere P (1987)

Isolation and characterization of two protamines St1 and St2 from stallion spermatozoa, and amino-acid sequence of the major protamine St 1.

Biochim Biophys Acta 913, 145-149

Bench G, Corzett MH, Kramer CE, Grant PG, Balhorn R (2000)

Zinc is sufficiently abundant within mammalian sperm nuclei to bind stoichiometrically with protamine 2.

Mol Reprod Dev 56, 512-519

Bench GS, Friz AM, Corzett MH, Morse DH, Balhorn R (1996)

DNA and total protamine masses in individual sperm from fertile mammalian subjects.

Cytometry 23, 263-271

Bergmann M (2006)

Physiology of spermatogenesis.

In: Andrology for the Clinician. Schill WB, Comhaire FH, Hargreave TB, Springer Berlin, 272-280

Bianchi F, Rousseaux-Prevost R, Bailly C, Rousseaux J (1994)

Interaction of human P1 and P2 protamines with DNA.

Biochem Biophys Res 201, 1197-1204

Bloch DP (1969)

A catalog of sperm histones.

Genetics 61, 93-111

Boissonneault G (2002)

Chromatin remodeling during spermatogenesis: a possible role for the transition proteins in DNA stand break repair.

FEBS Letters 514, 111-114

Bower PA, Yelick PC, Hecht NB (1987)

Both protamine 1 and 2 are expressed in the mouse, hamster and rat.

Biol Reprod 37, 479-488

Braun RE, Peschon JJ, Behringer RR, Brinster RL, Palmiter RD (1989)

Protamine 3'-untranslated sequences regulate temporal translational control and subcellular localization of growth hormone in spermatids of transgenic mice.

Genes and Devel 3, 397-802

Brewer L, Corzett M, Balhorn R (2002)

Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins.

J Biol Chem 277, 38895-38900

Brewer L, Corzett M, Lau EY, Balhorn R (2003)

Dynamics of protamine 1 binding to single DNA molecules.

J Biol Chem 278, 42403-42408

Bunick D, Balhorn R, Stanker LH, Hecht NB (1990)

Expression of the rat protamine 2 Gene is expressed at the level of transcription and translation.

Exp Cell Res 188, 147-152

Calvin H (1976)

Comperative analysis of the nuclear basic proteins in rat, human, guinea pig, mouse and rabbit spermatozoa.

Biochim Biophys Acta 434, 377-389

Caron N, Veilleux S, Boissonneault G (2001)

Stimulation of DNA repair by the spermatidal TP1 protein.

Mol Reprod Dev 58, 437-443

Carrell DT, Liu L (2001)

Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, an may reflect other abnormalities of spermiogenesis.

J Androl 22, 604-610

Cavalcanti MC, Rizgalla M, Geyer J, Failing K, Litzke LF, Bergmann M (2008)

Expression of histone 1 (H1) and testis-specific histone (H1t) genes during stallion spermatogenesis.

Anim Reprod Sci 111, 220-234

Chirat F, Martinage A, Briand G, Kouch M, Van Dorsselaer A, Loir M, Sautier P (1991)

Nuclear transition protein 1 from ram elongating spermatids. Mass spectrometry characterization, primary structure and phosphorylation of two variants.

Eur J Biochem 198, 13-20

Clermont Y (1963)

The cycle of the seminiferous epithelium in man.

Am J Anat 112, 35-51

Clermont Y (1972)

Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal.

Physiol Rev 52, 198-236

Coelingh JP, Moonfort CH, Rozijn TH, Geversleuven A, Schiphof R, Steyne-Parve EP, Braunitzer G, Schrank B, Ruhfus A (1972)

The complete amino acid sequence of the basic nuclear protein of bull spermatozoa.

Biochim Biophys Acta 285, 1-14

Cole DK, Kistler WS (1987)

Nuclear Transition Protein 2 (TP2) of mammalian spermatids has a very carboxyl terminal domain.

Biochem Biophys Res Comm 147, 437-442

Corzett M, Kramer C, Blacher R, Mazrimas J, Balhorn R (1999)

Analysis of hamster protamines: primary sequence and species distribution.

Mol Reprod Dev 54, 273-282

Corzett M, Mazrimas J, Balhorn R (2002)

Protamine 1:protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals

Mol Reprod Dev 61, 519-527

Courot M (1988)

The effects of gonadotropins on testicular function (spermatogenesis).

Proc 11th Inter Congress Anim Reprod Artif Insem 5: 311-319

Dadoune JP, Alfonsi MF, Fain-Maurel MA (1991)

Cytochemical variations in the nucleolus during spermiogenesis in man and monkey.

Cell Tiss Res 264, 167-173

D'Auria G, Paolillo L, Sartorio R, Wurzbürger S (1993)

Structure and function of protamines and nuclear magnetic resonance investigation of the interaction of clupeins with mononucleotids.

Biochim Biophys Acta 1162, 209-216

Dias GM, Retamal CA, Tobella L, Arnholdt ACV, Lopez ML (2005)

Nuclear status of immature and mature stallion spermatozoa.

Theriogenology 66, 354-365

Domenjoud L, Kremling H, Burfeind P, Maier WM, Engel W (1991)

On the expression of protamine genes in the testis of man and other mammals.

Andrologia 23, 333-337

Dupressoir T, Sautiere P, Lanneau M, Loir M (1985)

Isolation and characterization of the ram spermatidal nuclear proteins P1,3 and T.

Exp Cell Res 161, 63-74

Felix K (1960)

Protamines.

Adv Protein Chem. 15, 1

Feughelman MR, Langridge WE, Seeds AR, Stokes HR, Wilson CW, Hooper MHF, Wilkins RK, Barclay RK, Hamilton LD (1955)

Molecular structure of desoxyribonucleic acid and nucleoprotein.

Nature 175, 834-838

Finch JT, Klug A (1976)

Solenoid model for superstructure in chromatin.

Proc Natl Sci USA 73, 1897-1901

Fita I, Campos JL, Puigjaner C, Subirana JA (1983)

X-ray diffraction study of DNA complexes with arginine peptides and their relation of nucleoprotamine structure.

J Mol Biol 167, 157-177

Freidman R, Scott M, Heath SE, Hughes JP, Daels PF, Tran TQ (1991)

The effects of increase testicular temperature on spermatogenesis in the stallion.

J Reprod Fertil Suppl 44, 127-134

Fuentes-Mascorro G, Serrano H, Rosado A (2000)

Sperm chromatin.

Arch Androl 45, 215-225

Ganjam V, Kenny RM (1975)

Androgens and oestrogens in normal and cryptorchid stallions.

J Reprod Fertil Suppl 23, 67-73

Govin J, Caron C, Lestrat C, Rousseaux S, Khochbin S (2004)

The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis.

Eur J Biochem 271, 3459-3469

Grimes SR, Platz Jr.RD, Meistrich ML, Hnilica LS (1975)

Partial characterization of a new basic nuclear protein from rat testis elongated spermatids.

Biochem Biophys Res Com 67, 182-189

Grimes JR, SR (1986)

Nuclear proteins in spermatogenesis.

Comp Biochem Physiol 3, 495-500

Hayes H (1986)

Epidemiological features of 5009 cases of equine cryptorchism.

Equine Vet J 18, 467-471

Hecht N, Behr R, Hild A, Bergmann M, Weidner W, Steger K (2009)

The common marmoset (*Callithrix jacchus*) as a model for histone and protamine expression during human spermatogenesis.

Hum Reprod 24, 41-46

Hecht NB (1989)

Mammalian protamines and their expression.

In: Histones and other basic nuclear proteins: Hnilica LS (ed), CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 347-365

Hecht NB (1990)

Regulation of „haploid expressed genes“ in male germ cells.

J Reprod Fertil 88, 679-693

Heidaran MA, Kistler WS (1987)

Transcriptional and translational control of the message for transitionprotein1, a major chromosomal protein of mammalian spermatids.

J Biol Chem 262, 13309-13315

Hejmej A, Bilinska B (2008)

The effect of cryptorchidism on the regulation of steroidgenesis and gap junctional communication in equine testes.

Pol J Endocrinol 59, 112-118

Helene C, Lancelot G (1982)

Interactions between functional groups in protein-nucleic acid associations.

Prog Biophys Mol Biol 39, 11-68

Hud NV, Allen MJ, Downing KH, Lee J, Balhorn R (1993)

Identification of the elemental packaging unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy.

Biochem Biophys Res Com 193, 1347-1354

Hud NV, Milanovich FP, Balhorn R (1994)

Evidence of novel secondary structure in DNA-bound protamine is revealed by raman spectroscopy.

Biochemistry 33, 7528-7538

Johnson L, Hardy VB, Martin MT (1990)

Staging equine seminiferous tubules by Nomarski Optics in unstained histologic sections and in tubules mounted in toto to reveal the spermatogenic wave.

Anat Rec 227, 167-174

Johnson L, Tatum ME (1989)

Temporal appearance of seasonal changes in numbers of sertoli cells, leydig cells and germ cells in stallions.

Biol Reprod 40, 994-999

Johnson L, Thompson DL Jr (1983)

Age related and seasonal variation in the sertoli cell population, daily sperm production and serum concentrations of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in stallions.

Biol Reprod 29, 777-789

Johnson L, Thompson DL Jr (1986)

Seasonal variation in the total volume in stallions is explained by variation in cell number rather than cell size.

Biol Reprod 35, 971-979

Johnson L, Varner DD, Tatum ME, Scrutchfield WL (1991)

Season but not age affects sertoli cell number in adult stallions.

Biol Reprod 45, 404-410

Kasinky HE (1989)

Specificity and distribution of sperm basic proteins.

In: Histones and other basic nuclear proteins: Hnilica LS (ed), CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 73-150

Keichline LD, Wassarman PM (1979)

Structure of chromatin in sea urchin embryos, sperm and adult somatic cells.

Biochemistry 18, 214-219

Keime S, Heitland K, Kumm S, Schlösser M, Hroch Nicole, Holtz W, Engel W (1992)

Characterization of four genes encoding basic proteins of the porcine spermatid nucleus and close linkage of three of them.

Biol Chem 373, 261-270

Kempisty B, Depa-Martynow M, Lianeri M, Jedrzejczak P, Darul-Wasowicz A, Jagodzinski PP (2007)

Evaluation of protamine 1 and 2 transcript contents in spermatozoa from asthenozoospermic men.

Folia Histochem Cytobiol 45, 109-113

Kharchenko EP, Nalivaeva NN (1980)

Analysis of structural characteristics of sperm chromatin in amphibians.

J Evol Physiol 15, 410-416

Kierszenbaum AL (2001)

Transition nuclear proteins during spermatogenesis: Unrepaired DNA breaks not allowed

Mol Reprod Dev 58, 357-358

Kierszenbaum AL, Tres LL (1975)

Structural and transcriptional features of the mouse spermatid genome.

J Cell Biol 65, 258-270

Kistler WS, Henrikson K, Mali P, Parvinen M (1996)

Sequential expression of nucleoproteins during rat spermiogenesis.

Exp Cell Res 225, 374-381

Kistler WS, Keim PS, Henrikson RL (1976)

Partial structure analysis of the basic chromosomal protein of rat spermatozoa.

Biochim Biophys Acta 427, 752-757

Kistler WS, Noyes C, Hsu R, Henrikson RL (1975)

The amino acid sequence of a testis-specific basic protein that is associated with spermatogenesis.

J Biol Chem 250, 1874-1853

Kleene CK, Borzorgzadeh A, Flynn JF, Yelick PC, Hecht NB (1988)

Nucleotide sequence of an cDNA clone encoding mouse transition protein 1.

Biochim Biophys Acta 950, 215-220

Kleene CK, Distel RJ, Hecht NB (1984) a

Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding mouse protamine 1.

Biochemistry 24, 719-722

Kleene CK, Distel RJ, Hecht NB (1984) b

Translational regulation and coordinate deadenylation of a haploid mRNA during spermiogenesis in the mouse.

Dev Biol 105, 71-79

Kleene CK, Flynn JF (1987)

Characterization of a cDNA clone encoding a basic protein, TP2, involved in chromatin condensation during spermiogenesis in the mouse.

J Biol Chem 262, 17272-17277

Koehler JK, Wurschmidt U, Larsen MP (1983)

Nuclear and chromatin structure in rat spermatozoa.

Gamete Res 8, 357-370

Kolk AHJ, Samuel T (1975)

Isolation, chemical and immunological characterization of two strongly basic nuclear proteins from human spermatozoa.

Biochim Biophys Acta 393, 307-319

Kossel A (1928)

The protamines and histones.

Longmans, Green and London

Kremling H, Luerssen H, Adham IM, Klemm U, Tsaousidou S, Engel W (1989)

Nucleotide sequences and expression of cDNA clones for boar and bull transition protein 1 and evolutionary conservation in mammals.

Differentiation 40, 184-190

Kreutzig T (1997)

Biochemie.

Urban & Fischer

Lee CH, Bartels I, Engel W (1987)

Haploid expression of a protamine gene during bovine spermatogenesis.

Biol Chem 368, 807-811

Liebich H-G (2003)

Funktionelle Histologie der Haussäugetiere.

Schattauer GmbH, 4. Auflage

Livolant F (1984)

Cholesteric organization of DNA in the stallion sperm head.

Tiss Cell 16, 535-555

Loir M, Lanneau M (1980)

Partial characterization of ram spermatidal basic nuclear proteins.

Biochem Biophys Res Com 80, 975-982

Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF (1998)

Sperm desoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection.

Fertil Steril 69, 528-532

Love CC, Kenney RM (1999)

Scrotal heat stress induces altered sperm chromatin structure associated with a decrease in protamine disulfide bonding in the stallion.

Biol Reprod 60, 615-620

Luerssen H, Hoyer-Fender S, Engel W (1988)

The nucleotide sequence of human transition protein 1 cDNA.

Nucleic Acids Res 16, 7723

Luzzati V (1963)

The structure of nucleohistones and nucleoprotamines.

Mol Biol 7, 748-749

Luzzati V, Nicolaieff (1963)

The structure of nucleohistones and nucleoprotamines.

J Mol Biol 7, 142-163

Mali P, Kaipia A, Kangasniemi M, Toppari J, Sandberg M, Hecht NB, Parvinen M (1989)

Stage –specific expression of nucleoprotein mRNAs during rat and mouse spermiogenesis.

Reprod Fertil Dev 1, 369-382

Marushige Y, Marushige K (1975)

Transformation of sperm histone during formation and maturation of rat spermatozoa.

J Biol Chem 250, 39-45

Mayer JF, Chang TSK, Zirkin BR (1981)

Spermatogenesis in the mouse 2. amino acid incorporation into basic nucleoproteins of mouse spermatids and spermatozoa.

Biol Reprod 25, 1041-1051

Mazrimas JA, Corzett M, Campos C, Balhorn R (1986)

A corrected primary sequence of bull protamine.

Biochim Biophys Acta 872, 11-15

McGhee JD, Felsenfeld F (1980)

Nucleosome structure.

Annu Rev Biochem 49, 1115-1156

McKay D, Renaux BS, Dixon GH (1985)

The amino acid sequence of human sperm protamine P1.

Bioscience Reports 5, 383-391

McKay D, Renaux BS, Dixon GH (1986)

Human sperm protamines. Amino-acid sequences of two forms of protamine P2.

Eur J Biochem 156, 5-8

Mc Kinnon AO, Voss JL (1993)

Equine reproduction.

Lea & Febiger, Iowa/USA, 1993

Meetei AR, Ullas KS, Rao MRS (2000)

Identification of two novel zinc finger modules and nuclear localization signal in rat spermatidal protein TP2 by site-directed mutagenesis.

J Biol Chem 275, 38500-38507

Meistrich ML, Brock WA, Grimes SR, Platz RD, Hnilica LS (1978)

Nuclear protein transitions during spermatogenesis

Fed Proc 37,2522-2525

Meistrich ML, Bucci LR, Brock WA, Trostle PK, Platz RD, Grimes SR, Burleigh BD (1980)

Characterization of TP4, a major nuclear protein of rat elongated spermatids.

Fed Proc 39, 1884

Meistrich ML, Mohaptra B, Shirley CR, Zhao M (2003)

Roles of transition nuclear proteins in spermatogenesis.

Chromosoma 111, 483-488

Meistrich ML, Reid BO, Barcellona WJ (1976)

Changes in sperm nuclei during spermiogenesis and epididymal maturation.

Exp Cell Res 99, 72-78

Meistrich ML (1989)

Histone and basic nuclear protein transitions in mammalian spermatogenesis.

In: Histones and other nuclear Proteins, Hnilica LS (eds), CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 165-179.

Melo MIV, Sereno RB, Henry M, Cassali GD (1987)

Peripuberal sexual development of Pantneiro stallions.

Theriogenology 50, 727-737

Miescher F (1874)

Das Protamine, eine neue organische Base aus dem Samenfaden des Rheinlaches.

Berichte 7, 376

Mitchell PJ, Tjian R (1989)

Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins.

Science 245, 371-378

Naden J, Amann RP, Squires EL (1990)

Testicular growth, hormone concentrations, seminal characteristics and sexual behavior in stallions.

J Reprod Fertil 88, 167-176

Nelson WG, Pienta KJ, Barrack ER, Coffey DS (1986)

The role of the nuclear matrix in the organization and function of DNA.

Ann Rev Biophys Chem, 15, 457-475

Olivia R, Dixon GH (1991)

Vertebrate protamine genes and histone-to-protamine replacement reaction.

Mol Biol 40, 25-94

Olivia R (2006)

Protamines and male infertility.

Human Reprod Update 12, 417-435

Perreault DS, Barbee RR, Elstein KH, Zucker RM, Keefer CL (1988)

Interspecies differences in the stability of mammalian sperm nuclei assessed in vivo by sperm microinjection and in vitro by flow cytometry.

Biol Reprod 39, 157-167

Peschon JJ, Behringer RR, Brinster RL, Palmiter RD (1987)

Spermatid-specific expression of protamine 1 in transgenic mice.

Proc Natl Acad Sci USA 84, 5316-5319

Pickett BW, Voss JL, Squires EL, Amann RP (1989)

Management of the stallion for maximum reproductive efficiency.

Colo.State Univ. General Series Bulletin 1005,Ft.Collins.

Pienta KJ, Coffey DS (1984)

A structural analysis of the role of the nuclear matrix and DNA loops in the organization of the nucleus and chromosome.

J Cell Sci Suppl 1, 123-135

Pienta KJ, Getzenberg RH, Coffey DS (1991)

Cell structure and DNA organization.

Rev Euk Gene Express 1, 355-385

Pirhonen A (1994)

Mammalian Protamines.

Kuio University Publications C. Natural and Environmental Sciences 23

Pirhonen A, Linnala-Kankkunen A, Mäenpää PH (1989)

Comparison of partial amino acid sequences of two protamine 2 variants from stallion sperm.

FEBS Letters 1, 199-202

Pirhonen A, Valtonen P, Linnala-Kankkunen A, Heiskanen ML, Mäenpää PH (1990)

Primary structures of two protamine 2 variants (St2a und St2b) from stallion spermatozoa.

Biochim Biophys Acta 1039, 177-180

Pirhonen A, Linnala-Kankkunen A, Mäenpää, PH (1994)

P2 protamines are phosphorylated in vitro by protrin kinase C, whereas P1 protamines prefer cAMP-dependent proteinkinase.

Eur J Biochem 223, 165-169

Pogany GC, Balhorn R (1992)

Quantitative flourometry of abnormal mouse sperm nuclei.

J Reprod Fertil 96, 25-34

Pogany GC, Corzett M, Weston S, Balhorn R (1981)

DNA and proteine content of mouse sperm.

Exp Cell Res 136, 127-136

Qui J, Hales BF, Robaire B (1995)

Damage to rat spermatozoal DNA after chronic cyclophosphamid exposure.

Biol Reprod 53, 1465-1473

Raeside JI (1969)

The isolation of estrone sulfate and estradiol-17 β sulfate from stallion testis.

Can J Biochem 47, 811-815

Raukas E, Mikelsaar RH (1999)

Are there molecules of nucleoprotamine?

Bio Essays 21, 441-449

Raukas E (1964)

On the structural organization of nucleoprotamine in spermatozoid nuclei.

Biofizika 9, 653-656

Reinhart N, Kremling H, Luerssen H, Adham MI, Engel W (1991)

Characterization of a gene encoding a basic protein of the spermatid nucleus, TNP2, and its close linkage to the protamine genes in the bull.

Biol Chem 372, 431-436

Risley MS, Einheber S, Bumcrot DA (1986)

Changes in DNA topology during spermatogenesis.

Chromosoma 94, 217-227

Rodman TC, Prushlin FH, Allfrey VG (1984)

Protamine-DNA-association in mammalian spermatozoa.

Exp Cell Res 150, 269-281

Roser JF (1997)

Endocrine basis for testicular function in the stallion.

Theriogenology 48, 883-892

Roser JF, Hughes JP (1992)

Seasonal effects on seminal quality, plasma hormone concentrations and GnRH-Induced LH response in fertile and subfertile stallions.

J Androl 13, 214-223

Sautiere P, Belaiche D, Martinage A, Loir M (1984)

Primary structure of the ram (ovis aries) protamine.

Eur J Biochem 44, 121-125

Schnorr B, Kressin M (2006)

Embryologie der Haustiere.

Enke-Verlag, Stuttgart, 5. Auflage

Sidney R, Grimes JR (1986)

Nuclear proteins in spermatogenesis.

Comp Biochem Physiol 83B, 495-500

Singh JM, Rao MR (1987)

Interaction of rat testis protein, Tp, with nucleid acids in vitro.

J Biol Chem 262, 734-730

Singh JM, Rao MR (1988)

Interaction of rat testis protein, with nucleosome core particle.

Biochem Int 17, 701-710

Sipahutar H, Sourdain P, Moslemi S, Plainfosse B, Seralini GE (2003)

Immunolocalization of aromatase in stallion leydig cells and seminiferous tubules.

J Histochem Cytochem 51,311-318

Sipski ML, Wagner TE (1977)

The total structure and organization of chromosomal fibers in eutherian sperm nuclei.

Biol Reprod 16, 428-440

Squires EL, Pickett BW, Amann RP (1979)

Effect of successive ejaculation on stallion seminal characteristics.

J Reprod Fertil 27, 7-12

Steger (1999)

Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids.

Anat Embryol 199, 471-487

Steger K, Klonisch T, Gavenis K, Drabent B, Doenecke D, Bergmann M (1998)

Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis.

Mol Hum Reprod 4, 939-945

Steger K, Pauls K, Klonisch T, Franke FE, Bergman M (2000)

Expression of protamine-1 and -2 mRNA during human spermiogenesis.

Mol Human Reprod 3, 219-225

Steger K (2002)

Gene expression during mouse spermatogenesis.

Adv Dev Biol Biochem 12, 1-29

Steger K, Fink L, Failing K, Bohle RM, Kliesch S, Weidner W, Bergmann M (2003)

Decreased protamine-1-transcript levels in testes from infertile men.

Mol Hum Reprod 9, 331-336

Steger K, Wilhelm J, Konrad L, Stalf T, Greb R, Diemer T, Kliesch S, Bergmann M, Weidner W (2007)

Both protamine-1 to protamine-2 mRNA ratio and Bcl2 mRNA content in testicular spermatids and ejaculated spermatozoa discriminate between fertile and infertile men.

Human Reprod 23, 11-16

Stick J (1981)

Teratoma and Cyst formation of the equine cryptorchid testicle.

J Am Vet Med Assoc 176, 221-214

Stryer L (2007)

Biochemie.

Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford

Subirana JA (1975)

On the biological role of basic proteins in spermatozoa and during spermiogenesis.

In: The Biology of the Male Gamete. Duckett JC, Racey PA (eds). Academic Press, New York, 239

Subirana (1983)

Nuclearproteins in spermatozoa and their interactions with DNA.

In: The Sperm Cell (Andre´ J ed), Martinus Nijhoff, The Hague, 197-213

Suwalsky M, Traub W (1972)

A comparative x-ray study of a nucleoprotamine and DNA-complexes with polylysine and polyarginine.

Biopolymers 11, 2223-2232

Swierstra EE, Gebauer MR, Pickett BW (1974)

Reproductive physiology of the stallion.

J Reprod Fert 40, 113-123

Tanphaichitr N, Sobhon P, Taluppeth N, Chalermisarachai P (1978)

Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man.

Exp Cell Res 117, 347-56

Tobita T, Nomoto M, Nakano M, Ando T (1982)

Isolation and characterization of nuclear basic protein (protamine) from boar spermatozoa.

Biochim Biophys Acta 707, 252-258

Tobita T, Tsutsumi H, Kato A, Suzuki H, Nomoto M, Nakano M, Ando T (1983)

Complete amino acid sequence of boar protamine.

Biochim Biophys Acta 744, 141-146

Unni E, Meistrich ML (1992)

Purification and characterization of the rat spermatid basic nuclear protein Tp4.

J Biol Chem 267, 25359-25363

Unni E, Zhang Y, Meistrich ML, Balhorn R (1994)

Rat spermatid basic nuclear protein Tp3 is the precursor of protamine 2.

Exp Cell Res 210, 39-45

Vaughn JC, Hirsch GE (1972)

Isolation and characterization of chromatin from the sperm of the spider crab, *Libinia emarginata*.

J Cell Sci 11, 131-152

Vilfan ID, Conwell CC, Hud NV (2004)

Formation of native-like-mammalian sperm cell chromatin with folded bull protamine.

J Biol Chem 279, 20088-20095

Ward WS (1993)

Desoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa.

Biol Reprod 48, 1193-1201

Ward WS, Coffey DS (1991)

DNA Packaging and Organization in Mammalian Spermatozoa: Comparison with Somatic Cells.

Biol Reprod 44, 569-574

Ward WS, Partin AW, Coffey DS (1989)

DNA loop domains in mammalian spermatozoa.

Chromosoma 98, 153-159

Warrant RW, Kim SH (1978)

α -Helix-double helix interaction shown in the structure of protamine transfer RNA complex and a nucleoprotamine model.

Nature 271, 130-135

Wilkins M (1956)

Physical studies of the molecular structure of desoxyribose nucleic acid and nucleoprotein.
Cold Spring Harb Symp Quant Biol 21, 75-90

Wolfe SL(1981)

Biology of the Cell.
2nd ed., Wadsworth, Belmont, Calif.

Wouters-Tyrou D, Martinage A, Chevallier P, Sautiere P (1998)

Nuclear basic proteins in spermiogenesis.
Biochimie 80, 117-128

Wykes SM, Krawtz SA (2003)

The structural organization of sperm chromatin.
J Biol Chem 278, 29471-29477

Wykes SM, Nelson JE, Visscher DW (1995)

Coordinate expression of the PRM1, PRM2 and TNP2 multigene locus in human testis
DNA Cell Biol 14, 155-161

Wyrobek AJ, Meistrich ML, Furrer R, Bruce WR (1976)

Physical characteristics of mouse sperm nuclei.
Biophys J 16, 811-825

Yelick PC, Balhorn R, Johnson PA, Corzett M, Mazrimas JA, Kleene KC, Hecht NB (1987)

Mouse protamine 2 is synthesized as a precursor whereas mouse protamine 1 is not.
Mol Cell Biol 7, 2173-2179

Yelick PC, Kwon Y, Flynn JF, Borzoghadeh A, Kleene K, Hecht NB (1989)

Mouse transition protein1 is translationally regulated during the post-meiotic stages of spermatogenesis.

Mol Reprod Dev 1, 193-200

Yu YE, Zhang Y, Shirley CR, Deng JM, Russel LD, Weil MW, Behringer RR, Meistrich ML (2000)

Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1-deficient mice.

Proc Natl Acad USA, 97, 4683-4688

Zhao M, Shirley CR, Yu YE, Mohapatra B, Zhang Y, Unni E, Deng JM, Arango NA, Terry N, Weil MW, Russel RD, Behringer RR, Meistrich ML (2001)

Target disruption of the transition protein2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice.

Mol Cell Biol 21, 7243-7255

Zubay und Wilkins (1963)

X-ray diffraction study of the structure of nucleohistone and nucleoprotamines.

J Mol Biol 7, 756-757

9. Bezugsquellen

9.1 Stoffe, Reagenzien und Arbeitsmaterialien

Aceton	Roth, Karlsruhe
Agarose	Apligene, Oncor, Illkirch, Frankreich
Anti-Digoxegenin- AP Fab Fragments	Enzo Boehringer, Mannheim
APTEX	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
BSA	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Denhardt`s Solution (50x)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DEPC	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dextransulfat	Roth, Karlsruhe
dNTB Mix	GIBCO, Grand Island, USA
DTT	GIBCO, Grand Island, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eosin	Shandon, Frankfurt
Eppendorf Cup	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Essigsäure 100%, Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ficoll 400	Sigma-Aldrich, Steinheim
First Strand Buffer, 5x	GIBCO, Grand Island, USA
Formalin 40%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formamid	Merck, Darmstadt
Formamide	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glyceringelatine, Kaisers	Merck, Darmstadt
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim

Bezugsquellen

Hämatoxylin, Instant	Shandon, Frankfurt
HCL konz.	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Levamisol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Marker/PCR, 100bp DNA Ladder	New England Bio Labs, Frankfurt
MgCl ₂	Sigma-Aldrich, Steinheim
NaOH konz.	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
NBT/BCIP-Lösung	Kirkegaard&Perry, Gaithersburg,USA
Paraffin	Vogel, Gießen
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS-Tabletten	Sigma-Aldrich, Steinheim
PCR-Buffer, 10x	GIBCO, Grand Island, USA
Pikrinsäurelösung, gesättigt, wässrig	Riedel-de Haen, Seelze
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Steinheim
PVDF-Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
RNaseA	Enzo Boehringer, Mannheim
RNaseT1	Enzo Boehringer, Mannheim
Salmon Sperm DANN	Sigma-Aldrich, Steinheim
Super Frost Objektträger	Langenbrinck, Emmendingen
Superscript II Reverse Transcriptase	GIBCO, Grand Island, USA
Taq DNA-Polymerase	GIBCO, Grand Island, USA
Trichlormethan	Roth, Karlsruhe
Tris (Trishydroxymethylamoniummethan)	Calbiochem, Darmstadt
Tris HCl	Merck, Darmstadt
TritonR-X-100 AR	FERAT Caborat GmbH, Berlin
Trizol Reagent	GIBCO, Grand Island, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Vitro Clud	Langenbrinck, Emmendingen
Xylene Cyanide FF (Xylencyanol)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Xylol	Roth, Karlsruhe

Yeast t-RNA Sigma-Aldrich, Steinheim

9.2 Sonden und Primer

DIG-cRNA-Sonde NCBI-Accession
L10654 bp 616-846,
enthält Intron bp 722-799,
153bp

Primer Protamin 1

F 5' ATG GCC AGA TAC AGA TGC TGC CG 3'

R 5' CTA TCG TCT TCT CCT ACA CCT CAG 3'

9.3 Geräte und Zubehör

Bio Photometer	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
DAKO-Pen	DAKO, Hamburg
Einbettgerät Leica EG 1160	Leica, Bensheim
Elektrophoresekammer: Agagel Mini	Biometra, Göttingen
Feuchte Kammer	Kreatech Diagnostics, Amsterdam, Niederlande
Hamilton Spritze	Hamilton Bonaduz, Schweiz
High Performance UV Transilluminator	Ultra Violet Products, Cambridge, England
Kamera Polaroid Gel Cam	Polaroid, Offenbach

Bezugsquellen

Labor Lux S	Leica, Wetzlar
Lichtmikroskop Leica DM LB	Leica, Wetzlar
Mini- Gelelektrophorese- Apparatur	Biometra, Göttingen
Pipettenspitzen	Ratiolab, Dreieich
Pipettenspitzen, gestopft	Biozym Diagnostik, Hessisch Oldendorf
Polaroid 667 3¼ x 4¼" Film Pack	Polaroid, Offenbach
Power Pac 200	BIO RAD, München
Schlittenmikrotom	Reichert und Jung, Heidelberg
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen
Tockenschränke	Memmert, Schwalbingen; Heraeus, Hanau
Ultra Turrax T8	IKA, Labortechnik, Staufen
Vakuum- Gewebeeinfiltrationsautomat	Leica, Bensheim
Vortexer	Heidolph, Schwalbach
Wasserbad	Memmert, Schwalbach
Zentrifuge Mikro 22R	Hettich, Tuttlingen

9.4 Stamm-, Puffer- und andere herzustellende Lösungen

BOUINSche Fixierlösung	45 ml Pikrinsäure 15 ml Formalin 40% 3 ml Eisessig (kurz vor Gebrauch frisch zu bereiten)
DEPC- Wasser	2 l A. bidest 2 ml DEPC ÜN 37°C, autoklavieren

Bezugsquellen

Dextransulfat, 50%	5 g Dextransulfat/ 10 ml DEPC- Wasser
EDTA-Lösung, 0,5 M	400 ml DEPC-Wasser 8 g NaOH-Plättchen 74,4 g EDTA; pH-Wert 8,0
Levamisol, 1M	10 ml 1x NTB-Puffer 2,4 g Levamisol in 1ml Aliquots bei -18°C lagern
Loading Buffer- PCR (DNA-Gel)	0,05 g Bromphenolblau (0,5 ml 1% Lösung) 0,05 g Xylencyanol (0,5 ml aus 1% Lösung) 3 g Ficoll 400 3 ml 0,5 M EDTA mit 1x TAE-Puffer auf 20 ml auffüllen, filtrieren
MgCl ₂ - Lösung, 1x	81,4 g MgCl ₂ auf 400 ml DEPC- Wasser
NBT- Puffer, 5x	60,5 g Tris-HCl 29,2 g NaCl pH- Wert 9,6; Zugabe von 1 ml DEPC ÜN 37°C, autoklavieren vor Gebrauch: + 25 ml MgCl ₂ / 500 ml NBT- Puffer
Paraformaldehyd, 4 %	25 g Paraformaldehyd/ 500ml 1x PBSM- Puffer (Abzug, Magnetprüher, 70°C) 4N NaOH . zugeben bis Lösung klar wird, pH-Wert 7,0 in 50µl Aliquots bei -18°C lagern
PBSM- Puffer	200 ml DEPC- Wasser

Bezugsquellen

	1 PBS- Tablette
	1 ml 1 M MgCl ₂ - Lösung
	(am ersten Tag frisch ansetzen)
Proteinase K– Stammlösung	10 mg Proteinase K
	100 µl 0,5 M EDTA
	900 µl 1 M PBSM- Puffer
	(Lagerung in 20 µl Aliquots bei -18°C)
RNase A/ RNase _{TI} Stammlösung (Stock)	
	RNase A: 25 mg/ ml, bzw. 12 µl
	(Endkonzentration: 300µg/ ml 2x SSC)
	RNase _{TI} : 10 ⁵ U/ ml, bzw. 0,1 ml
	(Endkonzentration: 10 U/ ml 2x SSC)
Running Buffer - PCR (DNA-Gel)	
	1x TAE- Puffer
SSC- Stammlösung, 20x	88,23 g Natriumcitrat
	175,29 g NaCl auf 1 l A. bidest.
	1 ml DEPC; pH-Wert 7,5, ÜN 37° C
	autoklavieren
TAE-Puffer, 10x	48,4 g Tris
	11,4 ml Essigsäure
	20 ml 0,5 M EDTA
	pH Wert 8,4; auf 1 l mit A.bidest. auffüllen
TNMT- Puffer, 10x	121 g Tris-HCl
	58,4 g NaCl
	4,17 g MgCl ₂ auf 1 A. bidest; pH-Wert 7,5

Bezugsquellen

1 ml DEPC

ÜN 37°C; autoklavieren

nach Erkalten 5 ml Triton-X-100

10. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm ³	Kubikmikrometer
µmol	Mikromolar
A	Adenin
Å	Angström
A. bidest.	zweifach destilliertes Wasser
A. dest.	einfach destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
APTEX	3-Aminoprppyltriethoxy-Silane
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytosin
cDNA	cDNA
cm	Centimeter
C-Terminus	Carboxy-Terminus eines Proteins
Cys	Cystein
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG-	Digoxegenin-
DNA (DNS)	Desoxyribonuleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FSH	Follikel-stimulierendes-Hormon
g	Gramm
G	Guanin

Abkürzungsverzeichnis

GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
HCL	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
His	Histidin
IHC	Immunhistochemie
ISH	In-Situ-Hybridisierung
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LH	Luteinisierungshormon
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger-RNA
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
N-Terminus	Aminoterminus eines Peptids
OD	optische Dichte
OT	Objektträger
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction/ Polymerasekettenreaktion
pg	Pikogramm

Abkürzungsverzeichnis

pH Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
p-Prm	precursor-Protamin
Prm1	Protamin 1
Prm2	Protamin 2
RNA (RNS)	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
sec	Sekunden
SSB	DNA-single-stranded-breaks
std	Stunde
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transport-RNA
Tp2	Transitionsprotein 2
Tp1	Transitionsprotein 1
U	Units (Enzymeinheiten)
ÜN	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt

11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die an der Erstellung dieser Arbeit beteiligt waren.

Zunächst möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Martin Bergmann für die Überlassung des Themas und seine „marathongleichen“ Ausdauer und Geduld bedanken, bis er den ersten und letzten Entwurf dieser Arbeit vorgelegt bekommen hat.

Ein besonderer Dank gilt dem Team aus dem „Labor in der 2. Etage“ des Institutes für Veterinär-Anatomie, Histologie und Embryologie der Justus-Liebig-Universität, insbesondere Frau Alexandra Hax, Frau Anne Hild und Frau Gerlinde Erhardt für die Vorarbeit der Gewebefixierung und unermüdliche Unterstützung vom ersten Paraffinschnitt bis zur PCR. Auch ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus Steger und Prof. Dr. Ralph Brehm für die fachlich beratende Unterstützung dieser Arbeit.

Der Chirurgischen Veterinärklinik, Professur für Chirurgie des Pferdes, Herrn Prof. Dr. L.-F. Litzke, danke ich für die Bereitstellung des Probenmaterials.

Meinem Lebensgefährten und Chef Dr. Mark Kaminski gilt ein ganz besonderes Dankeschön, dass er mir den zeitlichen Rahmen zur Verfügung und den „inspirative“ Anstoß gegeben hat, diese Arbeit fertig zu stellen.

Insbesondere bei meinen Arbeitskollegen Dr. Christine Gaedke und Tierarzt Martin Thunig bedanke ich mich herzlich für die „computertechnische“ Unterstützung dieser Arbeit.

Danksagung

Zum Schluss möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, dass sie mir das Studium der Tiermedizin ermöglicht haben.

Insbesondere meinem verstorbenem Vater Dr. med. vet. Helmut Kretzer danke ich dafür, mir seine Leidenschaft und Freude an diesem Beruf mitgegeben zu haben. Leider konnte er das Ende des Studiums und diese Arbeit nicht mehr erleben.

12. Erklärung nach §10 Absatz 5 der Promotionsordnung

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.

(Katja Kretzer)



édition scientifique

VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-5859-3



9 783835 958593