Expression von Inhibin und Aktivin im Hoden im Verlauf der Rekrudeszenz der Spermatogenese nach Downregulation mit einem GnRH-Implantat beim Rüden

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

Anne-Kathrin Brokmann

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin

Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie
der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz
der Justus-Liebig-Universiät Gießen

Betreuer: Assoc. Prof. Dr. Sandra Goericke-Pesch
Betreuer: Prof. Dr. Axel Wehrend

Expression von Inhibin und Aktivin im Hoden im Verlauf der Rekrudeszenz der Spermatogenese nach Downregulation mit einem GnRH-Implantat beim Rüden

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

Eingereicht von
Anne-Kathrin Brokmann
Tierärztin aus Bielefeld

Gießen 2016

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

Dekan:
Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter/in:
Prof. Dr. Axel Wehrend
Assoc. Prof. Dr. Sandra Goericke-Pesch

Tag der Disputation: 07.03.2016

Meiner Familie

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig 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.“

Anne-Kathrin Brokmann

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1
2 Literaturübersicht 3
2.1 Neuroendokrine Regulation der Hodenfunktion 3
2.1.1 Gonadotropin-releasing-Hormon (GnRH) 3
2.1.2 Gonadotropine LH und FSH 5
2.1.3 Luteinisierendes Hormon (LH) 5
2.1.4 Follikelstimulierendes Hormon (FSH) 6
2.1.5 Inhibin und Aktivin 7
2.1.6 Testikuläre Steroidhormone 12
2.2 Histologischer Aufbau des Hodens 16
2.2.1 Intratubuläre Zellen 16
2.2.2 Interstitielle Zellen 19
2.3 Spermatogenese 20
2.3.1 Spermatogenese beim Hund 22
2.4 Downregulation mittels eines GnRH-Agonist-Implantates 23
2.5 Reproduktion bei saisonalen Tieren 24
3 Material und Methoden 27
3.1 Tierversuchsantrag 27
3.2 Versuchsaufbau 27
3.2.1 Einteilung der Hunde in Entwicklungsgruppen 28
3.2.2 Probenaufbereitung und Fixierung 29
3.3 Qualitativer Nachweis von Zielgen-mRNA mittels RT-PCR 30
3.3.1 RNA-Isolierung aus Hodengewebe 30
3.3.2 Bestimmung der RNA-Konzentration 31
3.3.3 DNase-Behandlung 31
3.3.4 Reverse Transkriptase (RT) 32
3.3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 33
3.3.6 Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte 34
3.3.7 Isolierung und Sequenzierung von PCR-Produkten aus dem Agarose-Gel 35
3.3.8 Bestimmung der relativen mRNA-Expression mittels RT-quantitativer real-time PCR (qPCR) 36
3.3.9 Primerherstellung 36

3.4 Prinzip der SYBR Green qPCR 36
3.4.1 Etablierung der Standardkurve und Ermittlung der Effizienz der qPCR37
3.4.2 Durchführung der SYBR Green qPCR 39
3.4.3 Auswertung der qPCR-Ergebnisse 39
3.5 Western Blot 40
3.5.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten aus Gewebe 40
3.5.2 Messung der Proteinkonzentration 40
3.5.3 Herstellung SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 40
3.5.4 Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Membran 42
3.5.5 Ponceau-S-Färbung 43
3.5.6 Nachweisreaktion 44
3.6 Immunhistochemischer Nachweis von Inhibin α, $\beta_{A/B}$ 45
3.6.1 Herstellung der histologischen Schnitte 45
3.6.2 Immunhistologisches Färbeprotokoll 46
3.6.3 Auswertungsprinzip der Immunhistochemie 49
3.7 Statistische Auswertung 49
4 Ergebnisse 51
4.1 Expression auf mRNA-Ebene 51
4.1.1 Ergebnisse der RT-PCR 51
4.1.2 Ergebnisse der qPCR 53
4.2 Expression von Inhibin α, β_A und β_B auf Proteinebene 60
4.2.1 Western Blot 60
4.2.2 Ergebnisse der Immunhistochemie 62
5 Diskussion 83
5.1 Diskussion der Methodik 83
5.1.1 Versuchsaufbau 83
5.1.2 Western Blot 84
5.1.3 Nachweis von mRNA 84
5.1.4 Immunhistochemie 85
5.2 Diskussion der Ergebnisse 86
5.2.1 Vergleich verschiedener GnRH-Agonist-Implantate 88
5.2.2 Diskussion der Ergbnisse vom juvenilen Hoden (JG) im Vergleich zum downregulierten (DG A, Wo 0, Profact, Suprelorin) bzw. adulten Hoden 88

5.2.3 Vergleich downregulierter Hoden vs. saisonaler Hoden 91
5.2.4 Diskussion der Rekrudeszenz der Spermatogenese nach Aufhebung der Downregulation (Wo 0-24, DGA-D) im Vergleich zur adulten Kontrollgruppe 92
5.2.5 Zusammenfassung der Diskussion 94
6 Zusammenfassung 96
7 Summary 98
8 Literaturverzeichnis 100
9 Anhang 115
9.1 Stoffe und Reagenzien 115
9.2 Verbrauchsmaterialien 117
9.3 Verwendete Geräte 118
9.4 Software 119
9.5 Puffer und Lösungen 121
9.5.1 Proteinextraktion und Western-Blot 121
9.5.2 Immunhistochemie 124
9.5.3 RNA-Isolierung und PCR 126
10 Ratio der mRNA-Expression von Inhibin α, β_A, β_B, Einzelwerte deruntersuchten Rüden 127
11 Danksagung 128

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Neuroendokrine Regulation der Hodenfunktion 4
(GnRH = Gonadotropin-Releasing-Hormone, T = Testosteron, LH = Luteinisierendes Hormon, FSH = Follikelstimulieredes Hormon, ABP = Androgenbindendes Hormon, BHS = Blut-Hoden-Schranke)..... 4
Abb. 2: Schematische Darstellung der Steroidbiosynthese in den Gonaden (modifiziert nach Ludwig 2008) 14
Abb. 3: Gelelektrophoretischer Nachweis auf mRNA-Ebene von Inhibin α und GAPDH mittels RT-PCR; 1 DG A, 2 DG B, 3 DG C, 4 DG D, 5 CG, 6 PG, 7 SG, 8 Negativkontrolle; 50 bp: Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder/Größenstandard; 1 Kb+: 1 kb DNA Ladder Plus/Größenstandard... 51
Abb. 4: Gelelektrophoretischer Nachweis auf mRNA-Ebene von Inhibin β_A und GAPDH mittels RT-PCR; 1 DG A, 2 DG B, 3 DG C, 4 DG D, 5 CG, 6 PG, 7 SG, 8 Negativkontrolle; 1 Kb+: 1 kb DNA Ladder Plus/Größenstandard 52
Abb. 5: Gelelektrophoretischer Nachweis auf mRNA-Ebene von Inhibin β_B und GAPDH mittels RT-PCR; 1 DG A, 2 DG B, 3 DG C, 4 DG D, 5 CG, 6 PG, 7 SG, 8 Negativkontrolle; 1 Kb+: 1 kb DNA Ladder Plus/Größenstandard 53
Abb. 6: Ratio der mRNA-Expression von Inhibin α, geometrische Gruppenmittelwerte [$\bar{x}$g(SF)], 1) Kollektiv 1, DG A–D und Adult 2) Kollektiv 2, Wo 0–24 und Adult 3) Kollektiv 3, Woche 0, Profact, Suprelorin, Juvenil und Adult, a : b $p < 0,05$ 55
Abb. 7: Ratio der mRNA-Expression von Inhibin β_A, geometrische Gruppenmittelwerte [$\bar{x}$g(SF)], 1) Kollektiv 1, DG A–D und Adult 2) Kollektiv 2, Wo 0–24 und Adult 3) Kollektiv 3, Woche 0, Profact, Suprelorin, Juvenil und Adult, a : b $p < 0,05$ 57
Abb. 8: Ratio der mRNA-Expression von Inhibin β_B, geometrische Gruppenmittelwerte [$\bar{x}$g(SF)], 1) Kollektiv 1, DG A–D und Adult 2) Kollektiv 2, Wo 0-24 und Adult 3) Kollektiv 3, Woche 0, Profact, Suprelorin, Juvenil und Adult, a : b $p < 0,05$ 59
Abb. 9: Western Blot Inhibin α (Maus-anti Mensch): Spezifische Bande zwischen 26-34 kDa, Negativkontrolle Hund, Positivkontrolle Maus, Probe Hund, Ladder 60
Abb. 10: Western Blot Inhibin β_A (Kaninchen-anti Mensch): Spezifische Bande zwischen 43 und 55 kDa, Ladder, Probe Hund, Positivkontrolle Mensch,

Negativkontrolle Hund 61
Abb. 11: Western Blot Inhibin β_B (Kaninchen-anti Mensch): Spezifische Bande bei 45 kDa, Ladder, Negativkontrolle Hund, Probe Hund, Positivkontrolle Mensch 61
Abb. 12: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin α-Proteins, Woche 0/DG A. 63
Abb. 13: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin α-Proteins, Woche 3/DG B. 63
Abb. 14: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin α-Proteins, Woche 6/DG C 64
Abb. 15: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin α-Proteins, Woche 9/DG D 64
Abb. 16: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin α-Proteins, Woche 12 65
Abb. 17: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin α-Proteins, Woche 24 65
Abb. 18: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin α-Proteins, CG 66
Abb. 19: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin α-Proteins, JG 66
Abb. 20: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin α-Proteins, PG 67
Abb. 21: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin α-Proteins, SG 67
Abb. 22: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_A-Proteins, Woche 0/DG A 69
Abb. 23: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_A-Proteins, Woche 3/DG B 69
Abb. 24: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_A-Proteins, Woche 6/DG C 70
Abb. 25: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_A-Proteins, Woche 9/DG D 70
Abb. 26: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_A-Proteins, Woche 12..... 71
Abb. 27: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_A-Proteins, Woche 24..... 71
Abb. 28: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_A-Proteins, CG 72
Abb. 29: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_A-Proteins, JG 72
Abb. 30: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_A-Proteins, PG..... 73
Abb. 31: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_A-Proteins, SG..... 73
Abb. 32: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_B-Proteins, Woche 0/DG A 76
Abb. 33: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_B-Proteins, Woche 3/DG B 76
Abb. 34: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_B-Proteins, Woche 6/DG C 77
Abb. 35: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_B-Proteins, Woche 9/DG D 77
Abb. 36: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_B-Proteins, Woche 12..... 78
Abb. 37: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_B-Proteins, Woche 24..... 78
Abb. 38: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_B-Proteins, CG 79
Abb. 39: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_B-Proteins, JG 79
Abb. 40: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_B-Proteins, PG..... 80
Abb. 41: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_B-Proteins, SG..... 80

Abb. 42: Zusammensetzung der einzelnen Untereinheiten für Inhibin A und B, Aktivin A, B und A/B 86

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zuordnung der Hunde nach Entwicklungsgruppen 29
Tab. 2: Zuordnung der Hunde nach Kastrationszeitpunkt 29
Tab. 3: Kontrollgruppen 29
Tab. 4: Zusammensetzung DNase-Mix: 31
Tab. 5: Primerpaare 32
Tab. 6: Zusammensetzung RT-Mix 33
Tab. 7: Zusammensetzung Prä-Mix 34
Tab. 8: Zusammensetzung Primer-Mix 34
Tab. 9: Zusammensetzung qPCR-Mix pro Ansatz/Well 37
Tab. 10: Effizienzen der Primerpaare 38
Tab. 11: Ratio der mRNA-Expression von Inhibin α; geometrische Gruppenmittelwerte mit Streufaktor [$\bar{x}g(SF)$] 54
Tab. 12: Ratio der mRNA-Expression von Inhibin β_A; geometrische Gruppenmittelwerte mit Streufaktor [$\bar{x}g(SF)$] 56
Tab. 13: Ratio der mRNA-Expression von Inhibin β_B; geometrische Gruppenmittelwerte mit Streufaktor [$\bar{x}g(SF)$] 58

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
ABP	Androgenbindendes Hormon
ActRII	activin-type II-receptor
al	alii
ALK	activin receptor-like kinase
ANOVA	analysis of variance
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AR	Androgenrezeptor
3β-HSD	3β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase
17β-HSD	17β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase
BHS	Blut-Hoden-Schranke
bidest.	bidestilliert
BLAST	Basic local alignment search tool
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA
CG	control group (adulte Hundekontrollgruppe)
cm	Zentimeter
co-SMAD	common SMAD
$C_6H_5O_7Na_3$	Natriumcitrat
$C_6H_8O_7$	Citronensäure
Da	Dalton
DG	developmental groupe
d. h.	das heißt
DHT	5α-Dihydrotestosteron
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E	Effizienz
EB	Elution Buffer
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid

ER	Endoplasmatisches Retikulum
for	forward primer
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
hCG	humanes Choriongonadotropin
HCl	Chlorwasserstoff
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
ICC-Puffer	ImmunoCytoChemistry-Puffer
IHC	Immunhistochemie
InhBP/p120	Inhibin binding protein/p120
JG	juvenile group
Kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
LH	Luteinisierendes Hormon
M	Steigung der Gerade
mA	Milliampere
max.	maximal
mg	Milligramm
MgCl	Magnesiumchlorid
min.	minimal
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MnCl	Manganchlorid
mRNA	messenger ribonucleic acid
NaCl	Natriumchlorid
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
n	Anzahl der Versuchstiere
ng	Nanogramm

nm	Nanometer
NTC	no template control
o. g.	oben genannt
o. b. B.	ohne besonderen Befund
P450arom	Cytochrom P450 Aromatase
P450c17α	Cytochrom P450c17α-Hydroxylase/17,20-Lyase
P450scc	Cytochrom P450 side-chain-cleavage
PBS	phosphate buffered saline
PBST	phosphate buffered saline Tween®20
PCR	polymerase chain reaction
PE-PCR	primer extension PCR
PG	Profact Group (Hunde mit Profact®-Depot Implantat)
pmol	Pikomol
PVDF	Polyvinylidenflourid
qPCR	quantitative real-time Polymerase Kettenreaktion
rev	reverse primer
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
RT	Reverse Transkriptase
SD	Standardabweichung
SDS	sodium dodecyl sulfate
SF	Streufaktor
SG	Suprelorin Group (Hunde mit Suprelorin®-Implantat)
SMAD	Small Mothers Against Decapentaplegic
s. o.	siehe oben
sog.	Sogenannt
s. u.	siehe untern
StAR Protein	Steroiogenic Acute Regulatory Protein
T	Testosteron
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF-β	transforming growth factor-beta
Tr.	Tropfen

TRIS	Tris-(hydroxymethyl-aminomethan)
TSH	Thyroid stimulating hormone
U	Unit
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
v. a.	vor allem
vs.	versus
W	Watt
Wo	Wochengruppe
$\bar{x}$	arithmetischer Mittelwert
$\bar{x}_g$	geometrischer Mittelwert
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
℃	Grad Celsius

1 Einleitung

Die paarig angelegten Hoden stellen das zentrale Organ der männlichen Fortpflanzung mit den sich ergänzenden Hauptaufgaben, der Produktion von Samenzellen (Spermatogenese) und der Synthese von Steroidhormonen (Steroidbiosynthese), dar (Amann 1986; Liebich 1999; McLachlan et al. 1996). Die Regulation der Hodenfunktion umfasst viele komplexe Prozesse, deren Details größtenteils noch ungeklärt sind. Prinzipiell erfolgt die Steuerung über die Hyothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse. Der Freisetzung des Gonadotropen-releasing Hormons (GnRH) aus dem Hypothalamus folgt die Sekretion der Gonadotropine, luteinisierendes Hormon (LH) und follikelstimulierendes Hormon (FSH), aus der Hypophyse, die auf die Gonaden einwirken (Simoni und Nieschlag 1995). Durch die Freisetzung von LH kommt es zur Stimulation der Leydig-Zellen, welche Testosteron synthetisieren und sezernieren. Neben einigen anderen Aufgaben übt Testosteron eine negativ-rückkoppelnde Wirkung sowohl am Hypothalamus als auch auf die LH-Freisetzung an der Adenohypophyse aus (Amory und Bremner 2001; Hayes et al. 2001; Padmanabhan et al. 2002; Schally et al. 1973). Neben Testosteron synthetisiert der Hoden u. a. Inhibin (Abeywardene und Plant 1988, zitiert von de Kretser und Robertson 1989), Aktivin (Ling et al. 1986; Vale et al. 1986) und Follistatin (Kogawa et al. 1991; Nakamura et al. 1990), die als direkt oder indirekt hemmende oder fördernde Rückkopplungsmechanismen auf die FSH-Freisetzung an der Adenohypophyse einwirken. Die bedeutendsten Untereinheiten (α, β_A, β_B) für Inhibin und Aktivin werden tierartspezifisch in testikulären Zellen exprimiert und lagern sich über Disulfidbrücken zu Dimeren (Aktivin A und B) bzw. Heterodimeren (Inhibin A, B und Aktivin AB) zusammen (de Kretser und Robertson 1989; Ling et al. 1985). Über die Expression beim Hund liegen bis jetzt nur sehr wenige Publikationen vor. So wiesen Taniyama et al. (2001) in adultem caninen gesunden und tumorösen Hodengewebe die drei Untereinheiten auf Proteinebene lediglich in Leydig-Zellen nach, so dass dort ein Vorliegen von Inhibin A und B vermutet wurde. Im Gegensatz dazu wurden die verschiedenen Untereinheiten bei anderen Tierarten auch in den Sertoli- und Keimzellen nachgewiesen (Marchetti et al. 2003; Roberts et al. 1989; Steinberger und Steinberger 1976).

Durch die Verwendung eines GnRH-Implantates beim Rüden gelingt die reversible Downregulation der Spermatogenese und Steroidbiosynthese (Goericke-Pesch et al.

2011; Ludwig et al. 2009; Riesenbeck et al. 2002; Vickery et al. 1984). Der „downregulierte Rüde“ und die folgende Rekrudeszenz stellen ein geeignetes Modell dar, um die hormonelle Feinregulation der Spermatogenese näher zu untersuchen.
Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expression von Inhibin und Aktivin im Hoden während der Downregulation und nachfolgender Rekrudeszenz mit einem GnRH-Implantat beim Rüden näher zu charakterisieren. Für Inhibin und Aktivin wurden die drei Untereinheiten (Inhibin α, β_A, β_B), zunächst auf mRNA-Ebene mittels qualitativer und quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen und im Anschluss der Nachweis der zellulären Lokalisation mittels Immunhistochemie (IHC) erbracht.

2 Literaturübersicht

2.1 Neuroendokrine Regulation der Hodenfunktion

Die Hodenfunktion wird durch die übergeordnete Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse gesteuert (Nestor 1984 und Vickery 1989, zitiert von Döcke 1994). Hierbei setzt der Hypothalamus pulsatil das GnRH, ein Dekapeptid, frei, in dessen Folge die Gonadotropine FSH und LH sezerniert werden. Während FSH insbesondere an die FSH-Rezeptoren der Sertoli-Zellen bindet und die Spermatogenese stimuliert, kommt es durch die Bindung von LH an die LH-Rezeptoren der Leydig-Zellen zur testikulären Steroidbiosynthese (Döcke 1994). Die Autoregulation der Hormonsynthese unterliegt einem Zusammenspiel verschiedener Feedback-Mechanismen. Die Gonadotropin-Freisetzung aus dem Hypothalamus wird ab einem bestimmten Schwellenwert der Sexualsteroide im Rahmen des „negativen Rückkopplungsmechanismus“ gehemmt, so dass es folglich zu einer verminderten Ausschüttung von FSH und LH an der Adenohypophyse kommt (Döcke 1994). Zusätzlich wird selektiv die FSH-Freisetzung durch Inhibin (Abeywardene und Plant 1988, zitiert von de Kretser und Robertson 1989), Follistatin (Ueno et al. 1987) und Aktivin (Schwall 1998b) reguliert. Inhibin und Follistatin wirken hemmend, während Aktivin als Gegenspieler die FSH-Freisetzung fördert.

2.1.1 Gonadotropin-releasing-Hormon (GnRH)

GnRH wurde 1971 erstmalig von Schally et al. (1971) nachgewiesen und besteht bei Säugetieren aus elf verschiedenen Aminosäuren. Aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit ist es im peripheren Blut nur erschwert bzw. kaum nachweisbar (Döcke 1994) und wird in der Literatur häufig über die Frequenz und Stärke der LH-Pulse beurteilt (Günzel-Apel et al. 1994; Schallenberger 1990). GnRH wird alle 30–120 Minuten pulsatil aus den Nervenenden von ca. 1000 Neuronen (Fink 1988, zitiert von Millar 2005) des Nucleus infundibularis (Döcke 1994) in die Portalvene freigesetzt und zur Adenohypophyse transportiert, wo es an spezifische GnRH-Rezeptoren bindet und dort ebenso pulsatil die Synthese und Sekretion von FSH und vor allem LH induziert (Fink 1988, zitiert von Millar 2005). Durch einen short-loop Mechanismus kann GnRH seine eigene Sekretion beeinflussen (Padmanabhan et al. 1995): So kommt es durch einen Konzentrationsanstieg in der hypophysären

Portalvene zu einer initialen Up-Regulation der GnRH-Rezeptoren, auf welche eine vermehrte LH-Ausschüttung folgt. Hält diese hohe GnRH-Konzentration jedoch über einen längeren Zeitraum an, kommt es schließlich zu einer Hypophysen-desensibilisierung und Internalisierung der Rezeptoren (Downregulation) und damit zur Hemmung der Freisetzung von LH und FSH (Döcke 1994).

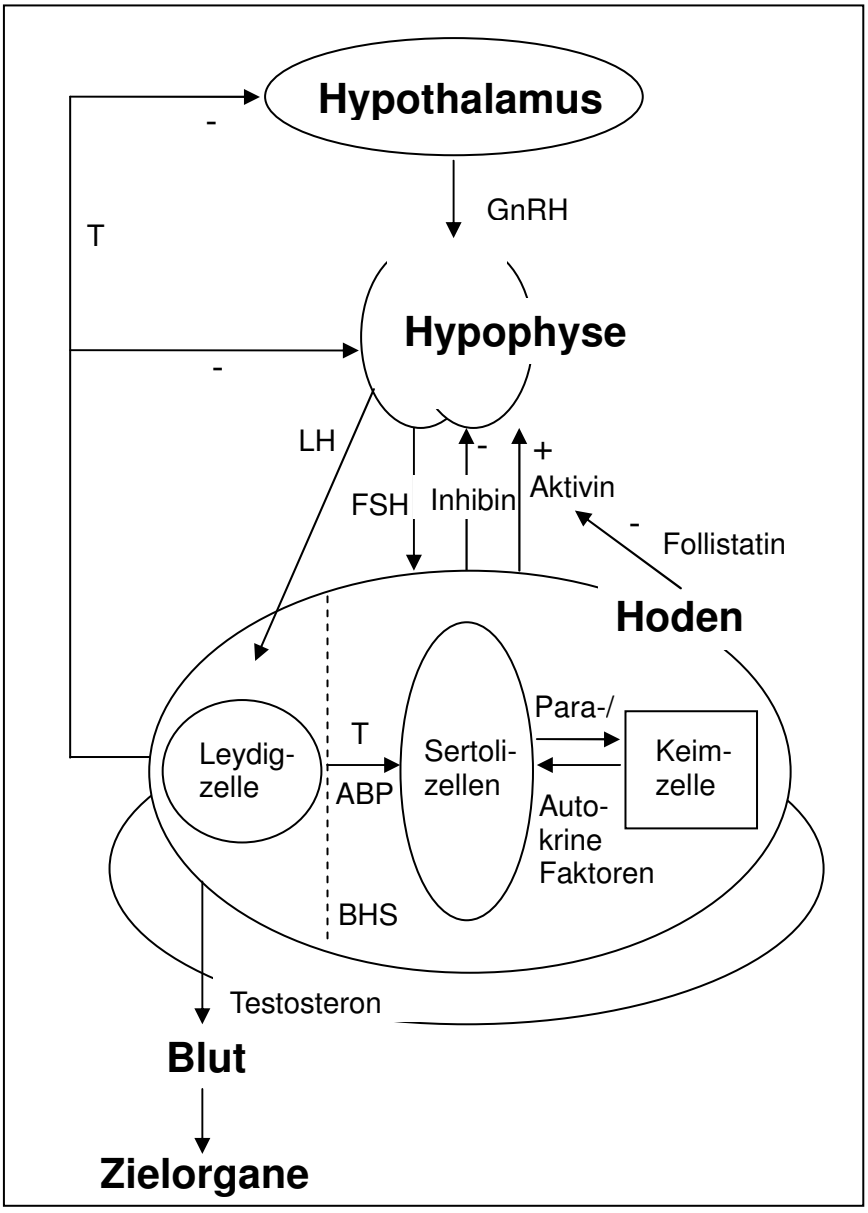


Abb. 1: Neuroendokrine Regulation der Hodenfunktion
(GnRH = Gonadotropin-Releasing-Hormone, T = Testosteron, LH = Luteinisierendes Hormon, FSH = Follikelstimulieredes Hormon, ABP = Androgenbindendes Hormon, BHS = Blut-Hoden-Schranke)

2.1.2 Gonadotropine LH und FSH

Die Gonadotropine LH und FSH sind komplexe Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 34.000 bzw. 28.000 Dalton (Da). Sie wirken auf die Gonaden und haben dort eine essentielle Bedeutung für die Spermatogenese und Steroidhormonproduktion (Simoni und Nieschlag 1995).
Beide Glykoproteine bestehen aus zwei Proteinketten. Während die Aminosäuresequenz der α-Untereinheit einer Spezies bei FSH, LH, humanem Choriongonadotropin (hCG), aber auch dem thyroid stimulating hormone (TSH) nahezu identisch ist, lässt sich für die β-Untereinheit ein hormonspezifischer Aufbau nachweisen, welche den spezifischen Rezeptor am Erfolgsorgan erkennt und damit die biologische Aktivität steuert (Reichert 1998).
Die gonadotropen Hypophysenhormone können als positives oder negatives Feedback in den Regelkreislauf der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse eingreifen und werden deshalb auch als Releasing- oder Inhibiting-Hormone bezeichnet (Thun 1995).

2.1.3 Luteinisierendes Hormon (LH)

Die Zielzellen von LH sind fast ausschließlich die Leydig-Zellen. Aufgrund der stimulierenden Wirkung auf die morphologische Entwicklung und die Androgensekretion der Leydig-Zellen wird LH ebenfalls als interstitial cell-stimulating hormone bezeichnet (Döcke 1994). In den Gonaden konnten spezifische G-Protein-gekoppelte LH-Rezeptoren nachgewiesen werden, die sowohl eine extrazellulär gelegene Domäne mit hoher Affinität zum Hormon als auch eine transmembrane Domäne zur Signaltransduktion aufweisen (Bousfield 1998). Die Testosteronsynthese erfolgt durch LH-Sekretion und -Rezeptorenbindung, wodurch die Steroidbiosynthese in den Leydig-Zellen aktiviert wird. Im Kapitel 2.1.6 Testikuläre Androgene wird näher auf die Steroidbiosynthese in den Leydig-Zellen eingegangen.
Beim Rüden sind verschiedene Studien über die peripheren LH-Konzentrationen publiziert, die teilweise stark abweichende Ergebnisse liefern: So variieren die Konzentrationen bei Günzel-Apel et al. (1990) von 1,2 bis 96 ng/ml, während die Konzentration bei DePalatis et al. (1978) zwischen 0,2 und 12 ng/ml und bei Knol et al. (1993) um 4,6 ± 0,5 ng/ml schwanken. Ludwig et al. (2009) geben einen Mittelwert von 1,6 ng/ml an.

2.1.4 Follikelstimulierendes Hormon (FSH)

Im Blut zirkulierendes FSH bindet spezifisch an die im Hodengewebe ausschließlich auf den Sertoli-Zellen lokalisierten FSH-Rezeptoren (Bockers et al. 1994; Gudermann et al. 1995; Kliesch et al. 1992; Rannikki et al. 1995).
Demnach kann insbesondere nach Ausbildung der Blut-Hoden-Schranke, die eine Passage großer Moleküle wie dem FSH vom basalen zum adluminalen Kompartiment unmöglich macht (Döcke 1994), die FSH-Wirkung auf die Spermatogenese ausschließlich indirekt über die Sertoli-Zellen vermittelt werden. So korrelieren Keimzellanzahl und auch die tägliche Spermienproduktion signifikant mit der FSH-Konzentration; durch exogene FSH-Gaben kam es bei Affen (Macaca fascicularis) zu einem Hodenwachstum von 42 % (van Alphen et al. 1988). Untersuchungen haben gezeigt, dass die Blutkonzentration von LH und Testosteron ebenfalls positiv mit der Spermatogeneseaktivität korreliert. Es zeigte sich, dass LH besonders in der frühen Entwickungsphase Einfluss auf die A-Spermatogonien nimmt, während FSH v. a. bei der weiteren Entwicklung der Spermatogonien zu den Spermatozyten von Bedeutung ist (Courot und Ortavant 1981).
FSH stimuliert zudem maßgeblich die Produktion des androgen-binding proteins (ABP) in den Sertoli-Zellen des Hodengewebes (Hagenäs et al. 1975), ein Glykoprotein, das bisher nur in wenigen Organismen, u. a. bei Ratte (French und Ritzén 1973) und Kaninchen (Danzo et al. 1974), nachgewiesen wurde. ABP bindet mit einer hohen Affinität Testosteron, Dihydrotestosteron und Estradiol, während die Bindungsaffinität zu anderen Steroidhormonen sehr gering ist (Hammond et al. 1987). ABP spielt eine wichtige Rolle in der Steuerung der Androgenaktivität und transportiert das gebundene Androgen in den Nebenhoden (French und Ritzén 1973). Gesteuert von FSH (Hansson et al. 1973; Ritzen et al. 1982) und Testosteron (Reventós et al. 1988, zitiert von Munell et al. 2002), kommt es in den Sertoli-Zellen zur Sekretion von ABP und somit zur Anreicherung der Androgene in den Tubuli seminiferi contorti und den Nebenhoden (Fritz et al. 1974 und Tindall 1974, zitiert von Munell et al. 2002). Bedingt durch die Bindung von ABP und Androgenen wird eine weitere Verstoffwechselung der Androgene verhindert (Petrusz 2002), was zu extrem hohen lokalen Konzentrationen im Hoden und Nebenhoden führt.

2.1.5 Inhibin und Aktivin

Im Jahr 1932 beschrieb Mc Cullagh noch vor der Identifizierung von LH und FSH (de Kretser und Robertson 1989) erstmalig das bis dahin unbekannte wasserlösliche Inhibin im Hoden (Schwall 1998a). Die Isolierung der Substanz bzw. ihrer Untereinheiten gelang aber erst 1985 aus der Follikelflüssigkeit des Rindes (Fukuda et al. 1986; Robertson et al. 1985), gefolgt von Schwein (Ling et al. 1985; Miyamoto et al. 1985; Rivier et al. 1985) und Schaf (Leversha et al. 1987). 1987 gelang der Nachweis von Inhibin auch beim männlichen Tier, dem Schafbock (Bardin et al. 1987, zitiert von de Kretser und Robertson 1989).

Strukturell handelt es sich bei Inhibin und Aktivin um Glykoproteine, die der Transforming Growth Factor beta (TGF-β)-Familie zugeordnet werden (de Kretser und Robertson 1989; Kingsley 1994) und aus drei verschiedenen Glykoproteinketten, der Inhibin α-, β_A- und β_B-Untereinheit bestehen. Durch verschiedene Kombinationen, Dimerisierung und Disulfid- sowie Cysteinbrückenbildung entstehen fünf unterschiedliche Dimere: Inhibin A (α-β_A) und B (α-β_B), Aktivin A (β_A-β_A), B (β_B-β_B) und AB (β_A-β_B) (de Kretser und Robertson 1989; Ling et al. 1985). Obwohl prinzipiell alle Dimere im Hoden und Ovar gebildet werden können, wird organ- und tierartspezifisch eine dominante Variante vermehrt exprimiert (Bardin et al. 1989). Zudem beeinflusst die Menge der Expression der einzelnen Subunits, ob vermehrt Aktivin oder Inhibin synthetisiert wird (Schwall 1998a).

Inhibin und Aktivin wirken als parakrine und/oder autokrine Hormone an der Regulation der Steroidbiosynthese und Spermatogenese mit (Mather et al. 1992), indem sie selektiv die Freisetzung von hypophysärem FSH beeinflussen (de Kretser und Robertson 1989; Ling et al. 1985; Miyamoto et al. 1985; Robertson et al. 1985; Schwall 1998b).

2.1.5.1 Inhibin

Inhibin hemmt insbesondere über den verstärkten Abbau der mRNA und die reduzierte Transkription des FSH-β Gens (Schwall 1998a) selektiv die FSH-Freisetzung aus der Hypophyse (Abeywardene und Plant 1988, zitiert von de Kretser und Robertson 1989). Zusätzlich kommt es zu einer Hemmung der stimulatorischen Effekte des Aktivins auf die Gonadotropin-Sekretion (Weiss et al. 1993).

Bereits 1976 konnten die Sertoli-Zellen bei Ratten (Roberts et al. 1989; Steinberger

und Steinberger 1976) als Hauptsyntheseort von Inhibin identifiziert werden; dies bezieht sich insbesondere auf die essentielle Inhibin α-Untereinheit (Toebosch et al. 1988). Für den Menschen gilt Ähnliches, wobei auf mRNA- und Proteinebene Sertoli-, Leydig- [Inhibin-Untereinheiten: α, β_A (Vliegen et al. 1993); α, β_B (Anderson et al. 1998; Marchetti et al. 2003)] und Keimzellen [Inhibin-Untereinheit: β_B (Marchetti et al. 2003)], die Subunits exprimieren. Die Inhibin α-Untereinheit konnte in den Keimzellen nicht nachgewiesen werden (Cuevas et al. 1987; Majdic et al. 1997; Noguchi et al. 1997; Shaha et al. 1989).

Abweichend zu den o. g. Ergebnissen wiesen Forti et al. (1992) bei erwachsenen Männern die Inhibin α-Untereinheit nicht nur in den Sertoli- und Leydig-Zellen nach, sondern auch in den Spermatozyten. Mittels Immunogold-Färbung gelang in der Elektronenmikroskopie eine genauere Lokalisierung der α-Untereinheit. Die Immunoreaktivität zeigte sich in den Sertoli- und Leydig-Zellen sowohl im rauen ER als auch in den Golgi-Zisternen. Die Spermatozyten wiesen immunopositive Signale in den Vesikeln und Vertiefungen der Zelloberfläche (coated pits) auf (Forti et al. 1992).

Bei Affen und Ratten korreliert die Synthese der α-Untereinheit signifikant mit der Anzahl an Sertoli-Zellen (Ramaswamy et al. 1999; Sharpe et al. 1999).

Im Gegensatz dazu und bislang nur auf Proteinebene gelangen Taniyama et al. (2001) der Nachweis von Inhibin ausschließlich im Zytoplasma der Leydig-Zellen.

Beim Bullen konnte eine alters- und speziesspezifische Expression gezeigt werden (Matsuzaki et al. 2001).: Während neonatal Inhibin im Serum und Hodengewebe in hohen Konzentrationen und die α-Subunit in den Sertoli-Zellen nachweisbar waren, sinkt die Inhibinkonzentration (lokal und peripher) mit steigendem Alter bis in die Adoleszenz auf unterhalb der Nachweisgrenze, so dass die α-Subunit nicht mehr detektierbar ist (Matsuzaki et al. 2001).

Speziesspezifisch kommen bei Mann (Anawalt et al. 1996), Ratte (Sharpe et al. 1999) und Rhesusaffe (Macaca mulatta) (Ramaswamy et al. 1999) Inhibin B, beim Schaf Inhibin A (Illingworth et al. 1996) und beim Hund Inhibin A und B (Taniyama et al. 2001) vor.

So wie Inhibin die FSH-Synthese hemmt, wird es selbst direkt durch FSH, aber auch indirekt durch LH über die Androgenproduktion beeinflusst (McLachlan et al. 1988; Verhoeven und Franchimont 1983). Hohe Testosteronkonzentrationen haben einen inhibierenden Effekt auf die Inhibinsekretion der Sertoli-Zellen (Bicsak et al. 1987;

Ultee-van Gessel und De Jong 1987; Ultee-van Gessel et al. 1986); bei hohen FSH-Konzentrationen kommt es dagegen über einen intrazellulären cAMP-Anstieg zur Stimulation der Sertoli-Zell-Inhibinproduktion (Bicsak et al. 1987).

2.1.5.2 Aktivin

Aktivin fungiert als Gegenspieler zum Inhibin, d. h. über ein positives Feedback kommt es zur Erhöhung der FSH-β mRNA, was selektiv die FSH-Synthese steigert (Ling et al. 1986; Schwall 1998b; Vale et al. 1986). In Abhängigkeit von Inhibin zeigt Aktivin in den Tubuli seminiferi einerseits stimulierende, aber andererseits auch hemmende Wirkungen auf die Spermatogenese (Boitani et al. 1995; de Winter et al. 1993; Mather et al. 1990).

Neben Aktivin A (β_A-β_A), B (β_B-β_B) und AB (β_A-β_B) (de Kretser und Robertson 1989; Ling et al. 1985) existieren zudem Aktivin C, D und E, welche sich als Homodimere aus den $\beta_{C-, D}$- (nur beim Xenopus) und β_E-Untereinheiten zusammensetzen (Fang et al. 1996; Hötten et al. 1995; Oda et al. 1995), aber die FSH-Synthese nicht beeinflussen. Während diese Untereinheiten keine Heterodimere mit der α-Subunit bilden können, kann jedoch die β_C-Subunit sowohl mit der β_A- als auch mit der β_B-Subunit binden (Mellor et al. 2000).

Ebenso wie bei Inhibin existieren auch bezüglich der vorherrschenden Aktivinformen speziesspezifische Unterschiede. So werden die speziesspezifischen Inhibin β-Untereinheiten sowohl in den Sertoli-Zellen [Ratte: Inhibin β_A (de Winter et al. 1993; Lee et al. 1989), Mensch: Inhibin β_B (Anderson et al. 1998; Andersson et al. 1998; Marchetti et al. 2003)] als auch in den Leydig-Zellen [Ratte, Schwein: Inhibin β_A, (de Winter et al. 1994; Lee et al. 1989), Mensch: Inhibin β_B (Anderson et al. 1998; Marchetti et al. 2003)], den peritubulären Zellen [Ratte: Inhibin β_A, (de Winter et al. 1994)] und in den Keimzellen von den pachytänen Spermatozyten bis zu den frühen Spermatiden [Mensch: Inhibin β_B, (Andersson et al. 1998; Marchetti et al. 2003)] synthetisiert. Auf mRNA-Ebene gelang zudem der Nachweis der Inhibin β_B-Subunit in adulten humanen Spermatogonien (Marchetti et al. 2003). Während fetal und neonatal bei der Ratte in den Leydig-Zellen eine hohe Expression vorliegt, verschiebt sich der Syntheseort postnatal bei Ratte (Majdic et al. 1997) und Mensch (Andersson et al. 1998) zugunsten der Sertoli- bzw. Keimzellen.

2.1.5.3 Inhibin- und Aktivinrezeptoren

Während bislang für Inhibin kein eigener Rezeptor identifiziert werden konnte (Woodruff 1999), bindet Aktivin wie viele andere Mitglieder der TGF-β-Familie (Attisano und Wrana 1998; Piek et al. 1999) an transmembranöse Serin/Theorin-Kinase-Rezeptoren. Es werden folgende Aktivin-Rezeptortypen unterschieden: Typ I- und Typ II-Rezeptoren (Mathews und Vale 1991; Zimmermann und Mathews 1996).
Bis heute unterscheiden sich sieben Typ I-Aktivin-Rezeptoren, Activin Receptor Like Kinase (ALK 1-7) (Ten Dijke et al. 1993; Tsuchida et al. 1996). Für den Aktivin-Typ II-Rezeptor konnten zwei Typen, ActRIIA (Mathews und Vale 1991) und ActRIIB (Attisano et al. 1992), identifiziert werden. Der Typ II-Rezeptor fungiert als klassischer Rezeptor, der den Liganden bindet; im Gegensatz dazu ist der Typ I-Rezeptor für die Signaltransduktion verantwortlich. Nach Ligandenbindung kommt es zur stabilen Komplexbildung von Typ I- und II-Rezeptor (Attisano et al. 1993; Ebner et al. 1993; Tsuchida et al. 1993). Die Typ I-Untereinheit wird phosphoryliert und es kommt im Anschluss zur Phosphorylierung des intrazellulär signalübertragenden Proteins SMAD 2/3 (SMAD = Small Mothers Against Decapentaplegic)(Abdollah et al. 1997; Souchelnytskyi et al. 1997). SMAD Proteine sind intrazellulär gelegene Proteine, die die Signalweiterleitung des extrazellulären TGF-β Liganden zum Nukleus ermöglichen (Savage et al. 1996; Sekelsky et al. 1995). Es folgt eine Komplexbildung mit einem Co-SMAD (common SMAD) Protein (SMAD 4) (Nakao et al. 1997) und eine anschließende Translokation in den Nucleus (Baker und Harland 1997; Massague und Wotton 2000; Pangas und Woodruff 2000), wo es zur Transkription kommt (Itoh et al. 2000). Die Anwesenheit des inhibierenden SMAD 7 Proteins verhindert die Bindung zwischen Rezeptor und signalübetragenden SMAD Proteinen, so dass die Signaltranslokation für Aktivin ausbleibt (Lebrun et al. 1999).
Die im Inhibin enthaltene β-Untereinheit kann ebenfalls mit unterschiedlicher Affinität mit Aktivin um die Aktivin-Typ II-Rezeptoren konkurrieren (Attisano et al. 1992; Mathews et al. 1992). Infolge der Bindung von Inhibin wird hier jedoch die Phosphorylierung und Komplexbildung beider Rezeptortypen verhindert (Martens et al. 1997; Xu et al. 1995), wodurch die weitere Signaltransduktion gehemmt wird (Lebrun und Vale 1997; Martens et al. 1997; Mathews et al. 1992; Xu et al. 1995). Da die Affinität von Inhibin zum oben genannten Rezeptor zehnfach geringer als Aktivin ist, ist der Mechanismus nur bei einem deutlichen Inhibinüberschuss möglich (Mathews et al. 1992).

Als mögliche Inhibinrezeptoren werden derzeit zwei Proteine diskutiert: Betaglykan und Inhibin binding protein/p120 (InhBP/p120) (Chong et al. 2000; Lewis et al. 2000). Betaglykan ist ein in der Membran verankertes Proteoglykan (Cheifetz et al. 1988), welches als Typ-β III TGF-Rezeptor identifiziert wurde (Cheifetz et al. 1988; Cheifetz et al. 1987; Massague und Like 1985; Segarini und Seyedin 1988). Der Typ-β III TGF-Rezeptor bindet mit einer hohen Affinität Inhibin A (Lewis et al. 2000). InhBP/p120 wurde aus der bovinen Hypophysenmembran extrahiert und reichert sich in den Leydig-Zellen an. Eine hohe Affinität zu Inhibin A wurde auch hier nachgewiesen (Chong et al. 2000). Er interagiert über die Bindung an ALK 4 mit dem Aktivin Rezeptorkomplex und hemmt dort die weitere Signaltransduktion (Chapman und Woodruff 2001).
Wenngleich beide Proteine nicht alle Anforderungen an einen funktionellen Rezeptor erfüllen, erscheint Betaglykan aufgrund eindeutiger Rezeptorexpression im Zielgewebe von Inhibin, einer hohen Bindungsaffinität zu Inhibin A und B (Mathews und Vale 1991; Zimmermann und Mathews 1996) und Bindungsspezifität als möglicher Rezeptor wahrscheinlicher (Bernard et al. 2002). Zudem vermögen Betagykane mit ActRIIA und Inhibin A Komplexe zu bilden, was die weitere Signalkaskade für Aktivin hemmt, da die Bindung an den ActRIIA Rezeptor blockiert wird (Bernard et al. 2002). Beide möglichen Rezeptortypen scheinen jedoch keinen Mechanismus für einen unabhängigen Signalweg zu besitzen, sondern erfüllen mehr die Aufgabe eines Co-Rezeptors (Bernard et al. 2002). Die Suche nach einem funktionellen Inhibinrezeptor bedarf demnach weiterer Forschung.

2.1.5.4 Follistatin

Während der Isolierung von Inhibin aus der Follikelflüssigkeit wurde ein weiteres Glykoprotein, Follistatin, mit inhibierender FSH-Wirkung isoliert (Robertson et al. 1987; Ueno et al. 1987), welches sich strukturell völlig von Inhibin und Aktivin unterscheidet (Ueno et al. 1987). Wie auch für Inhibin und Aktivin werden die Sertoli-Zellen als Syntheseort für Follistatin genannt (Kaipia et al. 1992; Meinhardt et al. 1998). Es liegen mindestens zwei Formen vor, Follistatin-288 und -315 (Shimasaki et al. 1988). Follistatin-288 bindet mit hoher Affinität Heparansulfat-Proteoglykane und ist gebunden an Aktivin v. a. in der Basalmembran auffindbar. Es spielt eine bedeutende Rolle in der Kontrolle der parakrinen und autokrinen Aktivinaktivität

(Nakamura et al. 1990; Sugino et al. 1993), wohingegen Follistatin-315 weniger Bindungsaffinität aufweist und v. a. als zirkulierende Form beschrieben ist (Schneyer et al. 1996).

Durch die hohe Affinität von Follistatin, Aktivin zu binden, kommt es zur neutralisierenden Komplexbildung und damit zur Hemmung der Aktivinwirkung (Kogawa et al. 1991; Nakamura et al. 1990; Sugino et al. 1993). Shimonaka et al. (1991) postulierten, dass Aktivin durch die β-Untereinheit zwei Bindungsstellen für Follistatin bereitstellt, so dass die relevanten Aktivin-Rezeptoren beide blockiert werden und so die Signalkaskade unterbrochen wird. Bindet Follistatin dagegen an die β-Untereinheit von Inhibin, kommt es hier nicht zur Neutralisation mit anschließendem Wirkungsverlust von Inhibin.

Zusammenfassend kann also Follistatin als auto- oder parakriner Feinregulator der FSH-Synthese bezeichnet werden, welcher die periphere FSH-Plasmakonzentration z. B. beim Schaf nur gering beeinflusst (Tilbrook et al. 1995).

2.1.6 Testikuläre Steroidhormone

Wichtigstes testikuläres Steroidhormon ist Testosteron, welches in den Leydig-Zellen produziert wird. Ausgehend von Cholesterol verläuft die Biosynthese über Gestagene zu den Androgenen.

Durch die LH-Freisetzung und spezifische Bindung an LH-Rezeptoren kommt es zur initialen Aktivierung und Stimulation der Adenylatcyclase in der Plasmamembran der Leydig-Zellen, gefolgt von einer Aktvierung von Proteinkinasen und Phosphorylierung regulatorischer Proteine (Dufau et al. 1980; Dufau et al. 1982, zitiert von Dufau et al. 1984). Mit Hilfe des StAR (steroidogenic acute regulatory) Proteins als essentieller Bestandteil des Transduceosoms (Rone et al. 2009) kommt es zur Aufnahme von Cholesterol in die Mitochondrien (Bamberg 1994a), in denen das Enzym P450scc die Umwandlung zu Pregnenolon synthetisiert. Über passive Diffusion kommt es zum Übergang in das glatte endoplasmatische Retikulum, in dem die weitere Synthese durch die Enzyme, 3β-HSD (3β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase), P450c17α (Cytrochrom P450 17α-Hydroxylase/C17,20-Lyase) und 17β-HSD (17β-Hydroxy-steroid-Dehydrogenase) katalysiert wird. Da in den Leydig-Zellen keine Speicherkapazität für neu synthetisiertes Testosteron vorhanden ist, diffundiert es passiv in die Peripherie (Akingbemi et al. 1999).

Es sind zwei Wege für die Testosteronsynthese im Hoden beschrieben (Abb. 2):
Der Δ^4 Syntheseweg erfolgt über die Bildung von Progesteron zu Testosteron, (Pregnenolon – Progesteron – 17α-Hydroxyprogesteron – Androstendion-Testosteron), während der Δ^5 Syntheseweg (Pregnenolon – 17α-Hydroxypregnenolon – Dihydroepiandrosteron – Androstendion – Testosteron) das Progesteron umgeht.

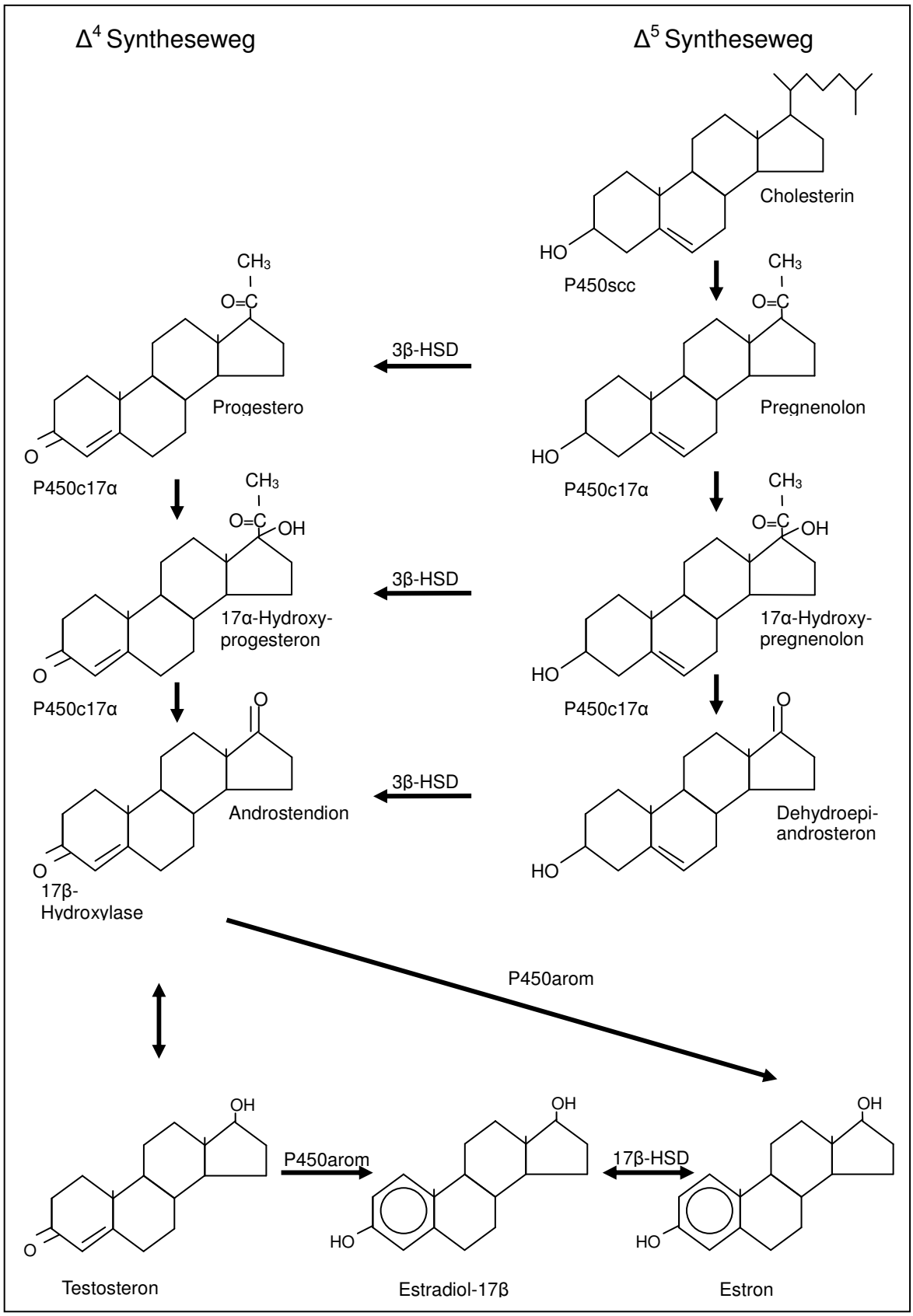


Abb. 2: Schematische Darstellung der Steroidbiosynthese in den Gonaden (modifiziert nach Ludwig 2008)

Beim Hund kommen beide, aber vornehmlich der Δ^5 Syntheseweg vor (Hagen und Eik-Nes 1964, Eik-Nes 1964 und 1970, zitiert von van der Molen und Eik-Nes 1971).
Beim Vorhandensein der 5α-Reduktase kommt es in einem androgensynthetisierenden Organ zur irreversiblen Reduktion in die primär aktive Form des Testosterons, 5α-Dihydrotestosteron (DHT) (Hiipakka und Liao 1998). Aufgrund der verstärkten Expression der 5α-Reduktase in der Prostata beim Rüden (Gloyna et al. 1970) und den akzessorischen Geschlechtsdrüsen beim Eber (Raeside et al. 1999) ist dort DHT das vorherrschende Androgen. Die Rezeptoraffinität von DHT ist im Vergleich mit Testosteron ca. doppelt so hoch, weshalb DHT als biologisch aktiver Metabolit gilt (Bruchovsky und Wilson 1968; Grino et al. 1990; Hiipakka und Liao 1998; Wilbert et al. 1983).
Gonadale Androgene sind präpubertär hauptsächlich für das Wachstum und die Ausbildung der morphologischen und funktionellen primären und sekundären Geschlechtsmerkmale verantwortlich. Postpubertär übernehmen Steroidhormone durch die direkte Kontrolle von GnRH, LH und FSH eine zentrale Rolle in der Regulation der Gonadotropin-Sekretion (Jones und Boyns 1974; Padmanabhan et al. 2002). Testosteron besitzt die Eigenschaft, sowohl am Hypothalamus auf die GnRH-Sekretion als auch an der Hypophyse durch Regulation der GnRH-Rezeptor-Expression als negatives Feedback zu wirken (Amory und Bremner 2001; Padmanabhan et al. 2002; Schally et al. 1973). Im Gegensatz dazu hat DHT beim Hund keinen Einfluss auf die hypophysäre Gonadotropin-Sekretion (Winter et al. 1982). Es stimuliert v. a. das Wachstum der samenleitenden Wege und die akzessorischen Geschlechtsdrüsen. Sowohl die männliche Libido als auch das Aggressionspotenzial werden über zentralnervale Effekte der Androgene geprägt (Bamberg 1994b).
Des Weiteren lassen sich im männlichen Organismus, nach Aromatisierung der im Hoden synthetisierten Androgene, Östrogene nachweisen (Winter et al. 1983). Unabhängig von Testosteron verändern sie die Sensibilität der Hypophyse für GnRH (Jones und Boyns 1974), wodurch die hypophysäre Sekretion von LH inhibiert wird (Peters et al. 2000; Winter et al. 1983). Im Vergleich zu Androgenen zeigen Östrogene eine deutlich potentere negativ-rückkoppelnde Wirkung auf die Gonadotropin-Sekretion (Jones und Boyns 1974; Pineda 2003; Steinberger 1971; Winter et al. 1983; Winter et al. 1982).

2.2 Histologischer Aufbau des Hodens

Der Hoden gliedert sich in zwei Kompartimente: Das tubuläre und interstitielle Kompartiment (Liebich 1999; Russell et al. 1990b). Das tubuläre Kompartiment enthält die Tubuli seminiferi, die aus der Lamina propria und dem Keimepithel bestehen und einen Durchmesser von ca. 180 µm aufweisen (Bergmann 2005; Holstein et al. 2003). In den Tubuli seminiferi contorti findet die Spermatogenese statt, d. h. hier liegen die Keimzellen. Aber auch die somatischen Nähr- und Stützzellen, die Sertoli-Zellen, sind hier lokalisiert (Liebich 1999). Das interstitielle Kompartiment umfasst die Leydig-Zellen, die für die endokrine Hodenfunktion verantwortlich sind (Steroidhormonbiosynthese), aber auch Blut- und Lymphgefäße, Nervenfasern, Fibrozyten und freie mononukleäre Zellen (Russell et al. 1990b). Zu den Keimzellen hin verdichtet sich das Gewebe zur Lamina limitans, die sich unterteilen lässt in das Stratum myoideum mit kontraktilen Myofibroblasten, dem Stratum fibrosum mit Kollagenfasern und der Basalmembran, Membrana basalis (Liebich 1999).

2.2.1 Intratubuläre Zellen

In den Tubuli seminiferi contorti sind Keimzellen und Sertoli-Zellen zu finden. Da im Kapitel Spermatogenese 2.3. die verschiedenen Keimzelltypen näher beschrieben werden, soll hier nur auf die Sertoli-Zelle mit ihren vielfältigen Funktionen eingegangen werden.

2.2.1.1 Sertoli-Zellen

Bei den Sertoli-Zellen handelt es sich um die intratubulär gelegenen somatischen Zellen, die nach dem italienischen Physiologen Enrico Sertoli (1842-1910) benannt wurden, aber auch als Ammen- oder Stützzellen bekannt sind (Ebner 1888).
Der Zellkern kann abhängig vom Zyklusstand vielerlei Formen annehmen, meist zeigt er eine gelappte Struktur (Dym 1973; Lebelo und van der Horst 2010) und ist der Basalmembran anliegend (Hess und Franca 2005; Sharpe et al. 2003). Er ist chromatinarm und hat eine Größe von ca. 250-850 µm^3. In seiner Entwicklung durchläuft er mehrere Phasen und verändert sein äußeres Erscheinungsbild von länglich, ins Lumen erweiternd (Hess und Franca 2005) zu oval bis elliptisch (Liebich

1999). Bei Ratten konnte gezeigt werden, dass sich wenige Tage post natum Keimzellen der Basalmembran anlegen und so die Sertoli-Zellen bis zum Beginn der Spermatogenese nach luminal verdrängt werden. Der Nukleolus ist in der Hämatoxilin-Färbung durch eine prominente basophile Färbung erkennbar (Hess und Franca 2005; Sharpe et al. 2003).

Das Zytoplasma der Sertoli-Zellen erstreckt sich von der Basalmembran bis ins Lumen des Tubulus und umfasst dabei mit seinen zytoplasmatischen Ausläufern alle Keimzellen mit Ausnahme der Spermatogonien (Russell et al. 1983; Weber et al. 1983; Wong und Russell 1983). Die langen, dünn verzweigten Zytoplasmafortsätze schieben sich seitlich zwischen die einzelnen Entwicklungsstadien und füllen den Zwischenraum zwischen den Keimzellen vollständig aus (Liebich 1999; Sinowatz 2001). Damit unterstützen sie die Wanderung der frühen Spermatozyten von basal nach adluminal (Brehm 2005). Für die Quantität der Spermatogenese ist der enge Kontakt zwischen Sertoli- und Keimzellen essentiell (Bergmann 2005).

Auf Höhe der Spermatogonien und primären Spermatozyten kommt es durch verschiedene Zell-zu-Zell-Verbindungen, v. a. Tight- und Gap-Junctions, zur Kontaktaufnahme benachbarter Sertoli-Zellen, was zur Entstehung einer Diffusionsbarriere, der Blut-Hoden-Schranke (BHS), zwischen dem Kreislaufsystem und dem Tubuluslumen führt. Durch die Entstehung der BHS kommt es intratubulär zur Bildung von zwei Kompartimenten (Liebich 1999; Sinowatz 2001): Das basale Kompartiment, welches die Spermatogonien und die primären Spermatozyten enthält, und das adluminale Kompartiment, welches die übrigen Keimzellen beinhaltet (Dym und Cavicchia 1977; Yazama 2008). Die Zellen im basalen Kompartiment haben nahezu uneingeschränkten Zugang zu allen Stoffen, u. a. Proteine und Ionen, die im Blutgefäßsystem und der Lymphe transportiert werden, während es in der Tubulusflüssigkeit, d. h. im adluminalen Kompartiment zu einer deutlichen Konzentrationsminderung dieser Stoffe kommt (Setchell 1967). Die verminderte Durchlässigkeit der Passagebarriere in das adluminale Kompartiment dient dem Schutz der sensiblen Spermatozyten und Spermatiden vor potentiell schädlichen Stoffen aus dem Körperkreislauf (Mruk und Cheng 2004; Su et al. 2009). Im Verlauf der Spermatogenese und der damit verbundenen Entstehung haploider Keimzellen kommt es zur Bildung neuer spezifischer Antigene, die ohne die BHS vom Immunsystem erfasst werden würden (Fijak und Meinhardt 2006; Johnson 1970). Zudem ist die BHS eine Voraussetzung, um im adluminalen Bereich ein besonders

günstiges Mikromilieu für die Keimzellentwicklung zu schaffen (Russell et al. 1989; Sharpe et al. 2003).

Das Zytoplasma der Sertoli-Zelle schließt einen gut entwickelten Golgi-Apparat, viele Mitochondrien vom Cristae-Typ sowie das endoplasmatische Retikulum ein. Es liegt sowohl glattes als auch raues endoplasmatisches Retikulum vor, wobei letzteres besonders bei Schweinen und Wiederkäuern in großer Anzahl vorhanden ist. Das glatte endoplasmatische Retikulum liegt einerseits basal in konzentrisch angeordneten Zisternen vor, andererseits umgibt es als dichte Membranstapel bei allen Tierarten in unterschiedlich starkem Ausmaß die periakrosomale Region der Spermatiden (Liebich 1999; Sinowatz 2001). Da die Keimzellen nicht fähig sind, sich selbstständig zu bewegen, sind die Mikotubuli und -filamente im Cytoplasma der Sertoli-Zellen sowohl für die intrazellulären Transportvorgänge der Keimzellen als auch für die Spermiation von besonderer Bedeutung (Liebich 1999; Russell 1993).

Die Gesamtzahl der Sertoli-Zellen korreliert stark mit der Größe des adulten Hodens und der täglichen Spermaproduktion. So ist bei Ratte (Orth 1982) und Maus (Kluin et al. 1984) schon vor Beginn der Geschlechtsreife die mitotische Phase der Zellteilung beendet und die endgültige Sertoli-Zellzahl festgelegt, wodurch in der weiteren Entwicklung des Hodens lediglich noch eine Größenzunahme der Sertoli-Zellen stattfindet (Brehm und Steger 2005; Sharpe et al. 2003).

Die Funktionen der Sertoli-Zellen sind wie folgt zusammenzufassen:

1.) Nähr- und Stützfunktion (Liebich 1999)
2.) Bildung des androgenbindenden Proteins: Durch die hohe Bindungskapazität für Testosteron und Dihydrotestosteron wird eine hohe Androgenkonzentration u. a. im adluminalen Kompartiment und Seminalplasma gesichert (Petrusz 2002).
3.) Bildung von Inhibin, Aktivin (Skinner 2005) und Follistatin (Kaipia et al. 1992) (siehe Kapitel 2.1.5)
4.) Phagozytose, v. a. der Residualkörperchen reifer Spermatiden. Da die Spermatiden nicht zur aktiven Bewegung befähigt sind, übernimmt das Zytoplasma bei der intraepithelialen Wanderung der Keimzellen eine zentrale Rolle (Liebich 1999).

2.2.2 Interstitielle Zellen

Das Interstitium füllt den Bereich zwischen den Tubuli seminiferi. Es besteht aus Blut- und Lymphgefäßen, Leydig-Zellen, Fibroblasten, Makrophagen, Lymphozyten, Monozyten und Mastzellen (Akingbemi et al. 1999; Liebich 1999).
Im Folgenden soll auf die Leydig-Zellen als Ort der Steroidhormonbiosynthese näher eingegangen werden.

2.2.2.1 Leydig-Zellen

Die Leydig-Zellen wurden 1850 erstmals durch den deutschen Anatomen Franz Leydig identifiziert (Leydig 1850). 1958 gelang es Wattenberg, die Steroidbiosynthese in diesen Zellen nachzuweisen (Wattenberg 1958).
Leydig-Zellen nehmen einen tierartspezifisch unterschiedlich hohen Anteil am Gesamtvolumen des Hodens ein: So beträgt dieser bei der Ratte 4–6 % (Akingbemi et al. 1999), beim Bullen ca. 7 % und bei Hengst und Eber ca. 20–30 % (Liebich 1999). Beim adulten Hund mit vollständiger Spermatogense nimmt das Interstitium mit den enthaltenen Leydig-Zellen ca. 8,5 % ein (Gentil 2012).
Die Größe der einzelnen Zellen variiert zwischen 12 und 30 µm im Durchmesser (Akingbemi et al. 1999). Die Leydig-Zellen sind azidophil, unregelmäßig polygonal und weisen einen euchromatinreichen Kern mit deutlichem Nukleolus und hellem Zytoplasma auf (Liebich 1999). Von besonderer Bedeutung für die Steroidbiosynthese sind das glatte endoplasmatische Retikulum und die Mitochondrien (Akingbemi et al. 1999). Die mitochondriale Membran enthält das sogenannte Transduceosom, an dem StAR, Cytochrom P450 side chain cleavage (P450scc) (Rone et al. 2009), Adrenodoxin und die Adrenodoxin-Reduktase an der Abspaltung der Seitenketten bei der Steroidproduktion beteiligt sind (Akingbemi et al. 1999). Das glatte endoplasmatische Retikulum, dessen häufiges Vorkommen in steroidproduzierenden Zellen charakeristisch ist, enthält die zur Testosteronproduktion benötigten Enzyme 3β-HSD, P450c17α und 17β-HSD. Des Weiteren enthalten die Leydig-Zellen Golgi-Apparat, Lysosomen, Peroxisomen und einen Nukleus mit Nukleolus.
Man unterscheidet zwei Populationen von Leydig-Zellen: die fetalen Leydig-Zellen, die sich während der Embryogenese entwickeln, um pränatal Testosteron zur männlichen Geschlechtsdifferenzierung zu synthetisieren, und die adulten Leydig-

Zellen, die sich postnatal entwickeln und deren Testosteron an der Ausprägung der sekundären Geschlechtsmerkmale beteiligt sowie für den Ablauf der Spermatogenese essentiell ist (Akingbemi et al. 1999).

2.3 Spermatogenese

Die Spermatogenese ist ein Teilungs- und Differenzierungsprozess, der mit der Geschlechtsreife einhergeht. In den Tubuli seminiferi entwickeln sich aus Spermatogonien über mehrere Mitosezyklen primäre Spermatozyten, aus denen in Folge meiotischer Teilungen haploide Spermien hervorgehen. Diese werden während der Spermiation ins Tubuluslumen freigegeben, um im Nebenhoden zu befruchtungsfähigen Spermien zu reifen (Hoffmann 2003; Johnson 1995). Die Spermatogenese lässt sich in vier Phasen unterteilen: Spermatogoniogenese, Spermatozytogenese, Spermiogenese und Spermiation (Hoffmann 2003; Johnson 1995; Sinowatz 2001).

Spermatogoniogenese

Aus der Stammspermatogonie entstehen durch mitotische Teilung zwei A-Spermatogonien, von welchen eine als Stammzelle (A_1) verharrt und somit die Stammzellpopulation für weitere Teilungsvorgänge aufrecht hält (Liebich 1999; Russell et al. 1990b; Sinowatz 2001). Um eine kontinuierliche Spermienproduktion zu sichern, scheint die Stammzellpopulation widerstandsfähiger gegenüber verschiedenen fakultativ pathogenen Substanzen als die fortgeschrittenen Keimzellstadien zu sein (Dym und Clermont 1970). Die zweite Stammzelle (A_2) differenziert sich über das Stadium der intermediären Spermatogonie zur Spermatogonie Typ B (Russell et al. 1990b).

Die B-Spermatogonien durchlaufen wiederum mehrere mitotische Teilungszyklen, aus denen schließlich Spermatozyten 1. Ordnung (primäre Spermatozyten) hervorgehen (Liebich 1999; Schnorr und Kressin 2006).

Während die A- und I-Spermatogonien der Basalmembran direkt anliegen, wandern die B-Spermatogonien bereits Richtung Lumen. Die Differenzierung der verschiedenen Entwicklungsstadien der Spermatogonien kann anhand morphologischer Kriterien wie Größe, Form, Chromatindichte und Anzahl ihrer Nukleoli erfolgen (Foote et al. 1972; Liebich 1999; Russell et al. 1990a).

Spermatozytogenese

Der primäre Spermatozyt entsteht aus einer B_2-Spermatogonie und besitzt einen diploiden Chromosomensatz mit jeweils zwei Geschlechtschromosomen (Hoffmann 2003; Sinowatz 2001). Zu Beginn der Meiose findet eine Wachstumsphase der Spermatozyten statt, so dass es zu einem enormen Größenzuwachs und zur Verdopplung ihres DNA-Gehaltes (4n) kommt, das Präleptotän-Stadium. Die leptotänen Spermatozyten kennzeichnen den Beginn der 1. Reifeteilung, die Prophase (Russell und Frank 1978). Als größte Keimzellen durchlaufen sie in der meiotischen Prophase folgende Stadien: Leptotän, Zygotän, Pachytän und Diplotän, die durch typische Chromosomenkonfigurationen gekennzeichnet sind (Bergmann 2006; Russell et al. 1990b). In der folgenden Meta-, Ana- und Telophase kommt es zu einer erneuten Volumenzunahme und zur Wanderung ins Tubuluslumen (Liebich 1999). Am Ende der 1. Reifeteilung (Reduktionsteilung) sind die Spermatozyten 2. Ordnung (sekundäre Spermatozyten) entstanden, die jeweils einen haploiden Chromosomensatz (2n) aufweisen und deutlich kleiner als die primären Spermatozyten erscheinen (Hoffmann 2003; Sinowatz 2001). Während der sich rasch anschließenden zweiten meiotischen Reifeteilung werden die Chromatiden auf zwei Tochterzellen, die Spermatiden, verteilt, so dass sie nun die gleiche Chromosomenzahl, aber nur noch 1n DNA enthalten (Hoffmann 2003; Liebich 1999; Sinowatz 2001).

Spermiogenese

Während der Spermiogenese durchlaufen die Spermien vielseitige Umgestaltungsprozesse, bis aus runden Spermatiden elongierte Spermatiden entstanden sind. Diese Differenzierung vollzieht sich in vier Phasen:

1. In der Golgi-Phase bildet sich zuerst in kleinen Vesikeln das proakrosomale Granulum. Diese glykoproteinreichen Bläschen verschmelzen zu einem einheitlichen akrosomalen Vesikel, welches der äußeren Kernmembran anliegt und eine polare Orientierung zur weiteren Differenzierung vorgibt (Liebich 1999). In diesem Vesikel sind hydrolytische Enzyme, Hyaluronidase, Neuraminidase und Akrosin enthalten. Gleichzeitig beginnt am proximal gelegenen Zentriol die Geißelbildung (Hoffmann 2003).

2. Kappenphase: Der Vesikel flacht ab und bedeckt kappenartig den proximalen Zellkernbereich. Es kommt zur Ausbildung einer inneren und äußeren Akrosomen-

membran, die durch den dazwischen liegenden subakrosomalen Raum getrennt werden. Das proximale Zentriol steht mit der Kernmembran in Kontakt und bildet die Implantationsgrube aus.
3. Am kranialsten Punkt des Kerns differenziert sich in der Akrosomenphase ein zapfenartiger Akrosomenfortsatz aus. Der Kern flacht dorsoventral ab und kondensiert. Die Spermatide nimmt nun längliche Form an und entwickelt aus dem distalen Zentriol einen Geißelapparat.
4. In der Reifungsphase wird der Kern zu 2/3 vom Akrosom bedeckt. Der Spermatidenschwanz ist nun ausgewachsen und die Mitochondrien sind im Mittelstück spiralförmig um das Flagellum angeordnet. Zur Verlängerung des Spermienschwanzes entwickelt sich das Hauptstück, welches aus einem zentral anliegenden Axonema, den eng anliegenden Außenfibrillen und der Ringfaserscheide besteht. Nach vollständiger Entwicklung kommt es zur Abschnürung eines Zytoplasmatropfens, dem Regaud'schen Restkörper, der vor allem aus Ribosomen, Lipidtropfen, degenerierten Mitochondrien und Golgi-membranen zusammengesetzt ist. Dieser wird von den Sertoli-Zellen aufgenommen und phagozytiert. Es folgt die Spermiation, bei der sich die Spermien von den Sertoli-Zellen lösen und ins Lumen der Tubuli seminiferi freigesetzt werden (Hoffmann 2003; Liebich 1999).

2.3.1 Spermatogenese beim Hund

Die Dauer des Keimepithelzyklus ist tierartspezifisch unterschiedlich und beträgt beim Rüden 13,6 Tage, während die Gesamtdauer der Spermatogenese ca. 61 Tage umfasst (Foote et al. 1972; Johnson 1995). Es sind verschiedene Möglichkeiten des Stageings beim Rüden beschrieben. So unterteilen Ibach et al. (1976) den Keimepithelzyklus in zehn Stages, während andere Autoren die Einteilung auf acht Stages beschränken (Foote et al. 1972; Russell et al. 1990a), abweichend von z. B. der Maus (12 Stages) und der Ratte (14 Stages) (Russell et al. 1990a). Foote (1972) berücksichtigt beim Stageing sowohl die Nukleusform und Lokalisation der Spermatiden als auch das Vorhandensein von Spermatogonien und Spermatozyten. Da in dieser Arbeit nach der Methode von Russell vorgegangen wurde, wird im Folgenden nur auf diese eingegangen.
Bei Russell et al. (1990a) basiert die Einteilung vor allem auf der Morphologie des Akrosoms und der Kopfform der jüngsten Spermatiden. Lichtmikroskopisch ist in

Stage I (Dauer 27,7 Stunden) kein Akrosom erkennbar, so dass die Spermatiden nur anhand des Größenunterschieds von den sekundären Spermatozyten zu unterscheiden sind. In weiteren 23,8 Stunden (Stage II) werden akrosomale Granula im Akrosomenvesikel nahe dem Nukleus sichtbar. In der kürzesten Phase der Spermienentwicklung (22,0 Stunden, Stage III) positionieren sich diese Granula neben dem Nukleus, so dass sie gegen Ende des Stages abflachen und sich halbmondförmig um den Nukleus orientieren.. Bevor das akrosomale Vesikel vollständig kollabiert, endet Stage IV nach ungefähr 91,2 Stunden. Stage V beginnt mit einer frühen Generation der Spermatiden, der Nukleus wird kugelig und erreicht fast die Zelloberfläche. Der Kontakt zwischen Nukleus und Plasmamembran und das Verhältnis zwischen Nukleuslänge und -breite (ca. 1,3 : 1) sind Kennzeichen des Stages VI. Beide Phasen benötigen durchschnitlich 45,0 Stunden. Kommt es zur Ausbildung der elongierenden Spermatiden, verändert sich das Längen : Breiten-Verhältnis des Nukleus (Stage VII, 35,0 Stunden). In den folgenden 35,9 Stunden (Stage VIII) können sowohl Phasen der Meiose I (Anaphase, Telophase), sekundäre Spermatozyten oder alle Phasen der 2. Reifeteilung sichtbar werden.

2.4 Downregulation mittels eines GnRH-Agonist-Implantates

Die hormonelle Kastration des Rüden mittels eines GnRH-Agonist-Implantats stellt eine Möglichkeit zur reversiblen Ausschaltung der Sexualfunktion dar (Riesenbeck et al. 2002; Tremblay und Belanger 1984). GnRH-Agonisten imitieren die Wirkung von endogenem GnRH und führen in Abhängigkeit von ihrer Anwendungsdauer initial zu stimulierenden und anschließend hemmenden Effekten auf die Sexualfunktion (Nestor 1984 und Vickery 1989, zitiert von Gobello 2007; Vickery 1985). Bei der hormonellen Kastration kommt es zu Beginn zur vermehrten Synthese und Freisetzung von FSH und LH, dem sogenannten flare-up, so dass die Suppression der Gonadenfunktion abhängig vom Agonisten erst um 7–27 Tage verzögert eintritt (Junaidi et al. 2003; Ludwig et al. 2009; Riesenbeck et al. 2002). Bei kontinuierlicher Freisetzung oder langwirksamen GnRH-Analoga (slow-release-Implantaten) kommt es zu dem Phänomen der „Desensibilisierung“ und schließlich zur „Downregulation“ infolge Internalisierung der hypophysären GnRH-Rezeptoren (Belchetz et al. 1978; Döcke 1994; Nestor 1984 und Vickery 1989, zitiert von Gobello 2007; Vickery 1985).
Erste Erkenntnisse über die längerfristige Anwendung von GnRH-Agonisten beim

Hund stammen aus den frühen 80er Jahren (Vickery 1985; Vickery et al. 1982). Waren aufgrund der kurzen Halbwertszeit in den Anfangszeiten tägliche intravenöse oder subkutane Injektionen notwendig, um den gewünschten Effekt der „Downregulation“ zu erreichen (Tremblay und Belanger 1984; Tremblay et al. 1984; Vickery 1985; Vickery et al. 1982), eröffnete die Verfügbarkeit von slow-release GnRH-Agonist-Implantaten mit synthetischen GnRH-Analoga mit höherer Wirksamkeit und längerer Halbwertszeit breite Anwendungsmöglichkeiten v. a. beim Rüden.

Insgesamt wurden beim Rüden ähnliche Beobachtungen nach Anwendung verschiedener slow-release GnRH-Agonist-Implante, unabhängig vom enthaltenen Agonisten [Buserelin (Goericke-Pesch et al. 2010; Riesenbeck et al. 2002), Azagly-Nafarelin (Goericke-Pesch et al. 2009; Goericke-Pesch et al. 2010; Ludwig et al. 2009) und Deslorelin (Junaidi et al. 2009)] gemacht:

Nach Einsetzen des Implantats kam es zu einem kurzzeitigen Anstieg von LH, FSH, Testosteron und Estradiol-17ß, dem ein signifikanter Abfall von LH, FSH und Testosteron folgte. Infolge der endokrinen Downregulation kam es auch zur Downregulation der germinativen Hodenfunktion, so dass kein Ejakulat mehr gewonnen werden konnte und histologisch die Spermatogenese auf Ebene der Spermatogonien und Spermatozyten sistierte. Ebenfalls konnte eine signifikante Größenreduktion von Hoden und Prostata nachgewiesen werden. Nach Wirkende bzw. Aufhebung der Wirkung z. B. durch Implantatentfernung waren alle beobachteten Effekte reversibel, d. h. es kam zu einem raschen Wiederanlaufen der Steroidbiosynthese und Spermatogenese und zu einer Vergrößerung von Hoden und Prostata (Junaidi et al. 2003; Ludwig et al. 2009; Riesenbeck et al. 2002).

2.5 Reproduktion bei saisonalen Tieren

Die saisonale Reproduktionsaktivität der Wirbeltiere in kalten und gemäßigten Klimazonen ist eine Anpassung an die Umweltbedingungen und dient u. a. der Optimierung der Aufzucht der Jungtiere. Die jahreszeitliche Regelung des Sexualzyklus, d. h. die Veränderungen der endokrinen Steuerung sowie der Hodenfunktion werden durch exogene Faktoren wie die Photoperiode beeinflusst (Bronson et al. 1994 und Lincoln 1989, zitiert von Goeritz et al. 2003; Steinlechner 1992).

Das Reh gehört zu den saisonalen Tieren, deren kurze Brunstphase jahreszeitlich auf Mitte Juli bis Mitte August beschränkt ist (Blottner et al. 1996). Im sechsmonatlichen Abstand zeigt der Rehbock einen zyklischen Wechsel zwischen einer sexuell aktiven Phase mit ausgeprägtem Hodenwachstum und vollständiger Spermatogenese und einer inaktiven Phase von Oktober bis März mit verminderten testikulären (Blottner et al. 1996) und peripheren Serumtestosteronkonzentrationen (Roelants et al. 2002) infolgedessen kommt es zu einer signifikanten Regression der Hodengröße und einem Sistieren der Spermatogonese (Blottner et al. 1996; Goeritz et al. 2003; Sempere und Boissin 1981; Sempere et al. 1992; Short und Mann 1966).
Auch bei anderen Tierarten zeigt sich außerhalb der Saison eine Reduzierung der Hodengröße. Diese Reduktion ist tierarztspezifisch und beträgt bei der Rötelmaus 96,7 % (Tähkä et al. 1983), dem Goldhamster (Hikim et al. 1988) und dem Nerz 90 % (Boissin-Agasse et al. 1982) sowie beim Reh 80 % (Sempere et al. 1998 zitiert von Klonisch et al. 2006).
Mit Verlängerung der Tageslichtdauer steigen beim Rehbock ab Mitte Februar die Plasmakonzentrationen von LH, FSH und Testosteron an, bis diese im April auf einem Plateau stagnieren. Vor Beginn der Brunst Mitte Juli erreichen LH und Testosteron Höchstwerte, um dann wieder stetig abzusinken. Im Gegensatz dazu sinkt die FSH-Konzentration bereits im Juni, sechs Wochen früher (Schams und Barth 1982). Das Wachstum des Hodens ist positiv mit der Spermatogenese korreliert (Schön et al. 2004). So ist der inaktive Hoden einerseits durch einen verringerten Durchmesser der Tubuli seminiferi, die lediglich Spermatogonien und Sertoli-Zellen beinhalten, andererseits durch eine vergrößerte Fläche des Interstitiums gekennzeichnet. Mit dem Anstieg der Testosteronsynthese steigen sowohl der Durchmesser der Tubuli seminiferi auf ca. die doppelte Fläche als auch die Anzahl der Keimzellen an. Interessanterweise kann nur im Juni ein Stageing der Spermatogenese ähnlich wie bei nicht saisonal aktiven Tieren in acht Phasen erfolgen. Die Anzahl der Leydig- und Sertoli-Zellen bleibt jahreszeitlich unabhängig konstant (Schön et al. 2004).
Die Spermaproduktion erreicht sowohl quantitativ als auch qualitativ Anfang August ihr Maximum, bevor sie dann anschließend rapide abfällt. Schon vor Beginn der Brunst kann eine starke Zunahme des Ejakulatvolumens und der Spermakonzentration beobachtet werden. Die meisten morphologisch intakten und motilen Spermien werden bei maximaler Spermaproduktion beobachtet (Goeritz et al. 2003).

Erhöhte Plasmatestosteronwerte sind nicht nur an der sexuellen Aktivität mit vollständiger Spermatogenese, sondern auch an dem Geweihwachstum, der erfolgreichen Rangverteidigung sowie des Paarungserfolgs maßgeblich beteiligt (Goeritz et al. 2003; Sempere und Boissin 1981; Short und Mann 1966).

Über saisonale Unterschiede bezüglich der Inhibin-Untereinheiten (-α, -β_A und -β_B) liegen bislang nur wenige Untersuchungen vor. Diese beziehen sich auf die Rötelmaus (Tähkä et al. 1998), den japanischen Schwarzbären (Weng et al. 2006a), den Marderhund (Weng et al. 2006b) und wilde Erdhörnchen (Sheng et al. 2012; Sheng et al. 2008). So konnte bei Marderhund und Erdhörnchen während der vollständigen Spermatogenese auf Proteinebene eine deutliche Expression aller Untereinheiten in den Sertoli- und Leydig-Zellen beobachtet werden (Sheng et al. 2008; Weng et al. 2006b). Im Gegensatz dazu zeigte sich am Ende der Fortpflanzungsperiode nur noch ein Signal der drei Subunits (-α, -β_A und -β_B) in den Leydig-Zellen (Weng et al. 2006b) bzw. Inhibin α und β_B in den Sertoli-Zellen (Sheng et al. 2008), so dass von einer saisonabhängigen Regulation auszugehen ist. Auch der Präriehund, eine nordamerikanische Gattung der Erdhörnchen, zeigt eine jahreszeitlich abhängige Inhibinproduktion (Foreman 2007), wobei die vorliegenden Ergenbisse widersprüchlich zu denen von Sheng et al. (2008) sind. Die stärkste Synthese von Inhibin α konnte während der Hodenregression in den Sertoli-Zellen nachgewiesen werden, wohingegen während der Rekrudeszenz kein Inhibin nachgewiesen werden konnte (Foreman 2007). Auf mRNA-Ebene konnten in inaktivem Hodengewebe der Rötelmaus deutlich höhere Werte für Inhibin α und β_B gemessen werden als in sexuell aktivem Hoden (Tähkä et al. 1998).

3 Material und Methoden

Ziel der Untersuchung war es, die Expression von Inhibin und Aktivin auf mRNA- und Proteinebene während Downregulation mittels eines slow-release GnRH-Agonist Implantates und folgender Rekrudeszenz der Spermatogenese beim Rüden nachzuweisen und mit der Expression im juvenilen und adulten Hoden zu vergleichen.

3.1 Tierversuchsantrag

Der Tierversuch wurde beim zuständigen Regierungspräsidium in Gießen angezeigt und unter dem Aktenzeichen AZ V 54-19c20/15c GI18/14 genehmigt.

3.2 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau entspricht dem bei Goericke-Pesch et al. (2009) publizierten.
Für die reversible Downregulation der Hodenfunktion und die anschließende Rekrudeszenz wurden adulte Beagle-Rüden mit einem Gonazon® Implantat (18,5 mg Azagly-Nafarelin, Intervet, Angers Technopole, France) subkutan in der Umbilikalregion behandelt. Vor Versuchsbeginn zeigten alle Rüden ein ungestörtes Allgemeinbefinden, waren klinisch und andrologisch o. b. B. und wiesen ein Spermiogramm im Referenzbereich auf (Riesenbeck et al. 2001).
Um die Rekrudeszenz der Spermatogenese in ihren einzelnen Phasen erfassen zu können, wurde das Implantat bei basalen Testosteron-Konzentrationen nach fünf Monaten entfernt und es wurden jeweils drei bis vier Rüden im Dreiwochenabstand chirurgisch kastriert (Woche 0-24).
Zusätzlich wurden jeweils drei klinisch gesunde Beagle-Rüden mit normalem Spermiogramm mit einem Profact®Depot-Implantat (6,3 mg Buserelinacetat, Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, D) oder einem Suprelorin®-Implantat (4,7 mg Deslorelin, Virbac Tierarzneimittel GmbH, D) behandelt und nach fünf Monaten chirurgisch kastriert.
Die Kontrollgruppen bestanden aus fünf gesunden adulten Beagle-Rüden mit normalem Spermiogramm, die ohne jegliche Vorbehandlung chirurgisch kastriert wurden, und drei juvenilen Hunden, die in der Klinik für Geburtshilfe und Gynäkologie

der Veterinärmedizinischen Fakultät der Uludag Universität in Bursa, Türkei, kastriert wurden.
Alle Hoden wurden direkt nach Gewinnung wie im unten beschriebenen Protokoll aufgearbeitet und zur weiteren Untersuchung konserviert.

3.2.1 Einteilung der Hunde in Entwicklungsgruppen

Die Hunde wurden einerseits anhand von histologischen Merkmalen in vier Entwicklungsgruppen eingeteilt, wobei die am weitesten entwickelten Keimzellen in den Tubuli seminiferi entscheidend waren, so dass sich folgende Einteilung (developmental group, DG) ergab (Tab. 1). Hierbei führte das Vorliegen einer einzigen entsprechenden Zelle zur Zuordnung in die jeweilige Gruppe.

DG A: Spermatozyten
DG B: Runde Spermatiden
DG C: Elongierende Spermatiden
DG D: Elongierte Spermatiden

Aus DG D wurden randomisiert fünf Hunde ausgewählt und weiterführend untersucht (Gentil et al. 2012; Goericke-Pesch et al. 2013).
Andererseits wurden die Hunde anhand ihres Kastrationszeitpunkts in die Wochen 0, 3, 6, 9, 12 und 24 eingeteilt (Tab. 2). Aufgrund der histologischen und endokrinologischen Übereinstimmung mit den Wochen 12 und 24 wurden die Wochen 15, 18 und 21 hierbei nicht weiterführend untersucht. Hierbei wurden zwei Hunde ausgeschlossen, die zum 2. Mal mit dem Implantat behandelt wurden und ca. doppelt so alt waren.
Als Kontrollen wurde, wie bereits beschrieben, Hodengewebe von fünf unbehandelten adulten und drei unbehandelten juvenilen, präpubertären Hunden verwendet (Tab. 3). Um den Einfluss des Wirkstoffs auf den Status der Downregulation zu untersuchen, diente das Hodengewebe der Profact- und Suprelorin-Gruppe als Kontrolle (Tab. 3).

Tab. 1: Zuordnung der Hunde nach Entwicklungsgruppen (DG)

DG	n	Hunde
A	4	Elias, Nick, Percy, Luca
B	3	Joni, Leo Boes, Theo Hoffmann
C	6	Speedy, Spikey, Snoopy, Strolch, Leo Stürmer, Mortimer
D	5	Bruno, Shy, Berry, Feivel, Sydney

Tab. 2: Zuordnung der Hunde nach Kastrationszeitpunkt

Kastrationswoche	n	Hunde
0	3	Nick, Percy, Luca
3	3	Leo Boes, Theo Hoffmann, Speedy
6	4	Spikey, Snoopy, Strolch, Leo Stürmer
9	3	Mortimer, Bruno, Joschi Fraquet
12	3	Shy, Captain Kirk, Elliott
24	3	Sydney, Theo Jensch, Joschi Plefka

Tab. 3: Kontrollgruppen

Kontrollgruppen	n	Hunde
Adult	5	Ben, Tom, Charly, Soto, Horst
Juvenil	3	Jack, William, Averell
Profact	3	Sid, Hansi, Floh
Suprelorin	3	Jan, Bruce, Findus

3.2.2 Probenaufbereitung und Fixierung

Die Hoden wurden mittels bedeckter Kastration gewonnen und umgehend in 4 °C kaltem Phosphatpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Hoden unter Schonung des Gewebes vorsichtig mit einer sterilen Skalpellklinge zur Längsrichtung geviertelt und in Würfel mit maximal 1 cm Kantenlänge für die histologische Aufarbeitung zerlegt. Die Gewebestücke wurden 24 Stunden bei 4 °C in Bouin'scher Lösung fixiert und danach in frischem 70%igem Ethanol gewaschen.

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus-Liebig-Universität in Gießen wurde das Hodengewebe mittels eines dafür vorgesehenen Einbettautomaten mit einer Paraffinausgießstation eingebettet und die fertigen Paraffinblöcke bei 4 °C gelagert.

Für die RNA- und Proteinextraktion wurde die Tunica albuginea entfernt und das restliche Gewebe auf einer sterilen Aluminiumfolie in maximal 0,5 x 0,5 x 0,5 cm große Stücke geschnitten und in 15 ml Tubes 24 Stunden bei 4 °C in der siebenfachen Menge RNAlater® inkubiert. Anschließend wurde das Hodengewebe in

steriler Aluminiumfolie verpackt und bis zur weiteren Bearbeitung bei –80 °C gefroren.
Weitere Gewebematerialien für Positivkontrollen in der Immunhistochemie und in Western Blots stammen aus dem Probengut der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit tierärztlicher Ambulanz in Gießen. Humanes Hodengewebe wurde dankenswerterweise vom Institut für Veterinär -Anatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Verfügung gestellt. Alle Proben wurden nach den gleichen hier aufgeführten Protokollen bearbeitet.

3.3 Qualitativer Nachweis von Zielgen-mRNA mittels RT-PCR

3.3.1 RNA-Isolierung aus Hodengewebe

Vor Arbeitsbeginn wurde die gesamte Arbeitsfläche gründlich mit 70%igem Ethanol und RNaseAWAY® gereinigt. Zunächst wurden die bei –80 °C gelagerten Gewebeproben mit Hilfe eines Hammers grob zerkleinert und anschließend in flüssigem Stickstoff gemörsert. In einem 2 ml-Reagenzgefäß wurde ca. 0,1 g Gewebepulver mit 1 ml Trizol-Reagent (Ambion® Life Technologies GmbH Darmstadt, D) vermengt und für 1 Minute mit Hilfe des UltraTurrax® homogenisiert.
Die RNA-Isolierung des Trizol-Reagents entsprach dem Protokoll des Herstellers. Das hergestellte Homogenisat wurde für 10 Minuten auf Eis gelagert und dann durch kräftiges Schütteln mit 200 µl gekühltem Chloroform (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) vermischt. Es folgte eine wiederholte 5-minütige Inkubation auf Eis, bevor das Gemisch 15 Minuten bei 14000 rpm (20000 g) und 4 °C zentrifugiert und in drei Phasen aufgetrennt wurde. Die oberste, farblose wässrige Phase wurde zur weiteren Verarbeitung verwendet und in ein neues Eppendorfröhrchen pipettiert. Aufgrund der hohen Instabilität der RNA erfolgte eine sofortige Weiterbearbeitung, indem der Überstand erneut mit Chloroform gemischt und zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde 1 : 1 mit Isopropanol versetzt und bei –20 °C für 30 Minuten inkubiert und im Folgenden für 10 Minuten bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Zur weiteren Probenaufarbeitung wurde nun der Überstand verworfen. Zu dem Pellet wurden 2 x 500 µl eisgekühltes 70%iges Ethanol zugegeben und das Gemisch wurde für jeweils 10 Minuten auf Eis inkubiert und weitere 10 Minuten bei 14000 rpm und einer Temperatur von 4 °C abzentrifugiert. Ein letztes Mal wurde der Überstand

verworfen und der Waschvorgang wiederholt. Das mit Ethanol gewaschene Pellet wurde für 30 Minuten bei 37 °C getrocknet. Anschließend erfolgte in einem 70 °C heißen Wasserbad innerhalb von 10 Minuten eine Resuspensierung mit 50 µl autoklaviertem Aqua bidest. und 1,25 µl (40 U/µl, entspricht 1 U/ml) RNase-Inhibitor, der vor enzymatischem RNA-Abbau schützte.

3.3.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration wurde mit Hilfe eines UV-Photometers (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) in einer Kunststoff-Einmalküvette (Eppendorf AG, Hamburg, D) ermittelt. Für die Leermessung wurde autoklaviertes Aqua bidest. verwendet. Die RNA-Konzentration wurde nach Verdünnung 2 : 98 mit Aqua bidest. photometrisch unter Einbeziehung des Extinktionskoeffizienten bei 260 nm ermittelt. Die unverdünnte RNA-Stammlösung wurde bei –80 °C gelagert. Zur weiteren Verwendung wurde aus einem Teil der Stammlösung eine Arbeitsverdünnung mit einer Konzentration von 200 ng/µl hergestellt, die bei –20 °C eingefroren wurde.

3.3.3 DNase-Behandlung

Um keine falsch positiven Ergebnisse zu erhalten, wurde die zuvor vorbereitete RNA mit einem DNase-Mix gemischt. Durch eine spezifische Endonuclease (DNase1) wurde eine Amplifikation mit möglicherweise noch vorhandener DNA verhindert. Der DNase-Mix aus DNase-Puffer, DNase1 und RNase-Inhibitor (Tab. 4) wurde für alle zu bearbeitenden Proben zusammengestellt und es wurden jeweils 3,25 µl mit 6,65 µl RNA-Arbeitsverdünnung in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß vermischt.

Tab. 4: Zusammensetzung DNase-Mix:

Komponenten	Volumen	Konzentration Stammlösung
MnCl2	1 µl	10 mM
PCR-Puffer	1 µl	10 x
DNase I, RNase-frei	1 µl	10 U/µl
RNase Inhibitor	0,25 µl	40 U/µl

Als Negativkontrolle („no template control“, NTC) für die PCR wurde statt der RNA-

Arbeitsverdünnung die gleiche Menge autoklaviertes Aqua bidest. zugegeben.
Nach kurzem Anzentrifugieren erfolgte für 10 Minuten bei 37 °C ein DNase-Verdau in einem TPersonal Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen, D). In einem weiteren Schritt wurden die Reagenzien für 5 Minuten auf 75 °C erhitzt, so dass eine Inaktivierung der DNase erfolgte. Anschließend wurde auf 4 °C abgekühlt.
Aufgrund von der nur sehr kurzen Stabilität der frisch bearbeiteten RNA wurden die Proben direkt für die Reverse Transkription (RT) weiterverwendet.

3.3.4 Reverse Transkriptase (RT)

Um von der aufbereiteten RNA komplementäre DNA bzw. cDNA zu synthetisieren, wurden Primer eingesetzt (Tab. 5), die aus 6 zufällig zusammengesetzten Nukleotiden bestanden, sog. Random Hexamers, welche an verschiedensten RNA-Stellen hybridisieren konnten und so eine vollständige Umschreibung von RNA in cDNA gewährleisteten.

In einem 0,5 ml Reaktionsgefäß wurden pro Ansatz 51 µl RT-Mix (gemäß Tab. 6) und 9 µl DNase-behandelte RNA vermischt. Pro Ansatz waren ca. 20 ng RNA/µl vorhanden.

Tab. 5: Primerpaare

Primer	Sequenzen 5’ – 3’
Inhibin α	for GCA-GCC-CTC-AAC-ATC-TCC-TT rev AGC-CGC-CGT-GAC-AGT-AGT-G
Inhibin β_A	for GAC-GGC-AAG-GTC-AAC-ATC-TG rev GAG-GGG-GCA-ATG-ATC-CAG-T
Inhibin β_B	for CCC-TGG-AAC-TAC-GCC-TTA-GAA rev GAC-AAG-AAC-ACC-TGT-GTG-ACA-C
Canines GAPDH	for GGC-CAA-GAG-GGT-CAT-CAT-CTC rev GGG-GCC-GTC-CAC-GGT-CTT-CT

Tab. 6: Zusammensetzung RT-Mix

Komponenten	Volumen Einfach- bzw. 6-fach-Ansatz	Konzentration Stammlösung
MgCl2	2,0 µl x 6 = 12 µl	25 mM
PCR-Puffer	1,0 µl x 6 = 6 µl	10 x
dNTP	4,0 µl x 6 = 24 µl	10 mM
Random Hexamers	0,5 µl x 6 = 3 µl	50 µM
RNase-Inhibitor	0,5 µl x 6 = 3 µl	20 U/µl
Reverse Transkriptase	0,5 µl x 6 = 3 µl	50 U/µl

Alle Arbeits- und Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt. Wie schon bei der DNase-Behandlung beschrieben, wurden die Proben kurz anzentrifugiert und schließlich im TPersonal Thermocycler platziert, um dort folgendes Programm für die Reverse Transkription zu durchlaufen: Zur Hybridisierung der Random Hexamers wurde die Temperatur für 8 Minuten auf 21 °C gehalten. Für die Reverse Transkription erfolgte eine 15-minütige Temperaturerhöhung auf 42 °C. Im Anschluss daran wurde die Reverse Transkriptase innerhalb von 5 Minuten bei 99 °C inaktiviert. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten auf 5 °C und dann auf 4 °C gekühlt. Die so gewonnene stabile cDNA wurde bei –20 °C aufbewahrt oder direkt zur PCR eingesetzt.

3.3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zum Nachweis ausgewählter Gene wurden diese mit einer thermostabilen Hot-Start DNA-Polymerase (AmpliTaqGOLD^{TM}) amplifiziert. Mit Hilfe der Software „Oligo Explorer“ und dem Online-Programm „BLAST“ konnten die sequenzspezifischen Primerpaare entworfen und auf ihre Spezifität überprüft werden. Hergestellt wurden sie von der Firma biomers.net GmbH, Ulm, D.

Als Negativkontrolle diente Aqua bidest., welches wie die RNA verarbeitet wurde. Zur Überprüfung der Integrität von RNA und cDNA wurde das Referenzgen GAPDH bei jeder PCR mitgeführt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 5 wiedergegeben.

Für den Nachweis wurde zunächst ein Prä-Mix hergestellt (Tab. 7):

Tab. 7: Zusammensetzung Prä-Mix

Komponenten	Volumen	Konzentration Stammlösung
MgCl2	2 µl	25 mM
10 x PCR-Puffer	4 µl	10 x
Aqua bidest.	32,75 µl	

Zur Genamplifikation wurde im nächsten Schritt der Primer-Mix aus Tabelle 8 zugeführt.

Tab. 8: Zusammensetzung Primer-Mix

Komponenten	Volumen	Konzentration Stammlösung
Forward Primer	0,5 µl	10 pmol/µl
Reverse Primer	0,5 µl	10 pmol/µl
AmpliTaqGOLD™	0,25 µl	5 U/µl

Das Gemisch wurde kurz zentrifugiert und in den TPersonal Thermocycler verbracht. Die PCR fand bei folgenden Reaktionsbedingungen und primerabhängigen Annealing-Temperaturen statt:

- 10 Minuten bei 95 °C (Aktivierung der AmpliTaqGOLD™, Initiale Denaturierung)
- 1 Minute bei 94 °C (Denaturierung)
- 2 Minuten bei 60 °C (Annealing)
- 1,50 Minuten bei 72 °C (Elongation)

} 39 Wiederholungen

- 5 Minuten bei 72 °C (finale Elongation)
- Anschließend abkühlen auf 4 °C

3.3.6 Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte

Die horizontale Agarose-Gelelektrophorese dient zur Analyse der PCR-Produkte. Die DNA-Fragmente werden ihrer Größe nach aufgetrennt und mit dem fluoreszierenden Farbstoff GelGreen™ (Biotium, Inc. Hayward, CA, USA) durch Bindung an Nukleinsäuren im UV-Licht sichtbar gemacht. Zuerst wurde ein Gemisch aus 1,82 g Agarose und 91 ml Tris-Acetat-EDTA-Puffer (Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, D) hergestellt und in einer Mikrowelle bei 560 W kurz aufgekocht. Es wurden 9,1 µl

GelGreen™ zugesetzt und die flüssige Masse in die Gießvorrichtung der Elektrophoresekammer EasyPhor Medi (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D) umgefüllt. Zur Ausbildung der Probentaschen wurde eine kammartige Schablone eingesetzt. Das bei Raumtemperatur erstarrte Gel (15,0 x 10,0 x 0,5 cm) wurde aus der Gießvorrichtung entnommen und in die Elektrophoresekammer umgesetzt; anschließend wurde die Kammer mit 1 x TAE-Puffer befüllt, so dass das Gel ca. 0,5 cm hoch bedeckt war.

Die Proben bestanden jeweils aus 15 µl PCR-Produkt und 1,5 µl Ladepuffer und wurden nach sorgfältiger Durchmischung in die Probentaschen pipettiert. Um die Größe der DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurde eine Tasche mit einem verdünnten DNA-Ladder (1 µl DNA-Ladder, 1,5 µl Ladepuffer und 7 µl autoklaviertes Aqua bidest.) gefüllt. Die DNA-Auftrennung erfolgte für 45 Minuten bei konstanter Spannung von 125 V und maximaler Stromstärke von 300 mA. Die DNA-Fragmente wurden mittels UV-Transilluminator mit integrierter Kamera, einem Pentium PC mit Bildschirm und der Software „Phoretix Grabber“ visualisiert, so dass die Fragmente bei einer Wellenlänge von 312 nm durch das fluoreszierende GelGreen™ sichtbar wurden und die Banden digital festgehalten werden konnten.

3.3.7 Isolierung und Sequenzierung von PCR-Produkten aus dem Agarose-Gel

Mit Hilfe des QIA-quick® PCR-Purification Kit 50 (QIAGEN GmbH Deutschland, Hilden, D) wurden die PCR-Produkte zur Sequenzierung zwecks Spezifitätskontrolle aufbereitet.

Wie in der Anleitung vom Hersteller beschrieben, wurde zunächst der im Kit vorhandene PE-Puffer im Verhältnis 1 : 250 mit dem pH-Indikator vermischt. Von diesem Gemisch wurden 250 µl mit 50 µl PCR-Produkt gemischt. Im folgenden Schritt wurde die QIAquick spin column in einem 2 ml Tube platziert und das PE-PCR-Produktgemisch hineinpipettiert. Es folgte eine 1-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm. Der Überstand wurde verworfen, 750 µl PE-Puffer neu hinzugegeben und erneut zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand verworfen. Um eine möglichst gute Entfernung der Flüssigkeitsreste zu erreichen, wurde die QIAquick spin column nochmals zentrifugiert und anschließend in ein Mikrozentrifugen-Tube verbracht. Um den nun gewünschten Überstand zur Sequenzierung zu erhalten, wurden 30 µl EB-

Puffer auf die QIAquick-Membran aufgetragen und für 1 Minute inkubiert. Der Überstand wurde nach 60-sekündigem Zentrifugieren bei 13000 rpm gewonnen und bis zur Sequenzierung bei –20 °C eingelagert.
Die Sequenzierung wurde von der Firma SRD-Scientific Research and Development GmbH, Bad Homburg, D, vorgenommen.

3.3.8 Bestimmung der relativen mRNA-Expression mittels RT-quantitativer real-time PCR (qPCR)

Für die weitere Verarbeitung der Proben in der qPCR wurden die Gewebeproben wie zuvor beschrieben (3.3.1) aufgearbeitet.

3.3.9 Primerherstellung

Es wurden dieselben Primer wie in der konventionellen PCR verwendet.

3.4 Prinzip der SYBR Green qPCR

Bei der qPCR handelt es sich zunächst um eine Vervielfältigung von Nukleinsäuren mit zusätzlicher relativer Quantifizierung der gewonnenen DNA. Das Prinzip basiert auf der konventionellen PCR, bei der die Fluoreszenzintensität während eines PCR-Zyklus genutzt wird. Da die Intensität mit der Menge der PCR-Produkte proportional zunimmt, findet am Ende der letzten Zyklen die Quantifizierung in der exponentiellen Phase statt, da dann die optimalen Reaktionsbedingungen vorliegen. Eine leicht zugängliche Methode der Quantifizierung ist die Nutzung von DNA-Farbstoffen, wie das hier verwendete SYBR Green. Durch die Interkalation des Farbstoffs in die cDNA kommt es zum Anstieg der Fluoreszenzausbeute, da die Zunahme der Target-DNA mit der Fluoreszenzzunahme von Zyklus zu Zyklus korreliert. In jedem Zyklus findet die Messung am Ende der Elongation statt. Aus der Tatsache, dass die verschiedenen PCR-Produkte nicht unterschieden werden können, resultiert eine geringe Spezifität, welche jedoch mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse der DNA verbessert werden kann. Durch langsame und kontinuierliche Erhöhung der Temperatur kommt es zum Aufschmelzen der DNA. Bei einer fragmentspezifischen Schmelztemperatur kommt es schließlich zur Denaturierung des DNA-

Doppelstranges und somit zur Entstehung von zwei einzelsträngigen Molekülen. Gleichzeitig kommt es zur Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green, so dass die Änderung der Fluoreszenz sichtbar wird.
Da GAPDH im Zellzyklus - wie aus den Vorversuchen bekannt - keinen Regulationsmechanismen unterliegt, wurde GAPDH als Referenzgen zur Normalisierung des Zielgens verwendet.

3.4.1 Etablierung der Standardkurve und Ermittlung der Effizienz der qPCR

Zur Ermittlung der Effizienz der qPCR wurde für jedes Primerpaar eine Standardkurve anhand von Triplikaten mit Hilfe von Verdünnungsreihen erstellt. Um eine aussagekräftige Probe aller zu untersuchenden cDNA-Proben zu erhalten, wurde aus allen Proben ein cDNA-Pool gemischt und die Verdünnungsreihe wie folgt mit autoklaviertem Aqua bidest. angesetzt:

Stufe	Verdünnung	% cDNA-Pool
1	unverdünnt	100
2	1 : 10	10
3	1 : 100	1
4	1 : 1000	0,1
5	1 : 10000	0,01

Der qPCR-Mix wurde mit folgenden Substanzen für die Gesamtzahl aller zu untersuchenden Proben angesetzt:

Tab. 9: Zusammensetzung qPCR-Mix pro Ansatz/Well

Komponente	Konzentration	Volumen
SYBR Green		10 µl
Forward Primer	10 pmolar	0,6 µl
Reverse Primer	10 pmolar	0,6 µl
Autoklav. Aqua bidest.		7,8 µl

In die vorgesehenen Wells der verwendeten Thermo-Fast 96 skirted PCR Platte (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA) wurden jeweils 1 µl des cDNA-Gemisches und 19 µl des qPCR-Mixes pipettiert. Abschließend wurde die Platte mit

einer Microseal® ´B´ Film Klebefolie (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) versiegelt und die qPCR im C1000™ Thermal cycler (CFX 96™Real Time System, BioRad, UK) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

3 Minuten	95 °C	
10 Sekunden	95 °C (Denaturierung)	
1 Minute	60 °C (Annealing und Elongation)	} 42 Wiederholungen
10 Sekunden	95 °C	
5 Sekunden	65°C	
	95 °C	

Am Ende eines jeden Laufs der qPCR wurden durch die verwendete CFX-Manager™ Software die C(t)-Werte, die Schmelzkurvenanalyse, die Steigung der Standardkurve und die Effizienzen in % angezeigt. Dazu wurde der cDNA-Gehalt logarithmiert und anschließend gegen den ermittelten C(t)-Wert des Ansatzes in einem Koordinatensystem dargestellt. Um die Effizienz der verschiedenen Primer-Paare zu ermitteln, wurde folgende Formel nach Pfaffl (2001) mit der Steigung der Geraden (m) verwendet.

$$E=10^{(-1/m)}$$

Es ergaben sich folgende Effizienzen für die verschiedenen Primer-Paare:

Tab. 10: Effizienzen der Primerpaare

Primer	Effizienzen	Sequenzen 5’ – 3’
Inhibin α	1,78	for GCA-GCC-CTC-AAC-ATC-TCC-TT rev AGC-CGC-CGT-GAC-AGT-AGT-G
Inhibin β_A	1,95	for GAC-GGC-AAG-GTC-AAC-ATC-TG rev GAG-GGG-GCA-ATG-ATC-CAG-T
Inhibin β_B	1,97	for CCC-TGG-AAC-TAC-GCC-TTA-GAA rev GAC-AAG-AAC-ACC-TGT-GTG-ACA-C
Canines GAPDH	1,83	for GGC-CAA-GAG-GGT-CAT-CAT-CTC rev GGG-GCC-GTC-CAC-GGT-CTT-CT

Alle Arbeitsschritte erfolgten wie die vorherigen Schritte auf Eis und die Arbeitsfläche

wurde entsprechend gereinigt.

3.4.2 Durchführung der SYBR Green qPCR

Wie zuvor beschrieben wurde der qPCR-Mix für einen Doppelansatz auf Eis gemischt und pipettiert. Zusätzlich wurde für jede Probe auf derselben Platte die Expression des Referenzgens GAPDH bestimmt und pro Primerpaar eine Negativkontrolle, bei der die cDNA durch autoklaviertes Wasser ersetzt wurde, mitgeführt. Die weitere Bearbeitung entspricht den vorher beschriebenen Arbeitsschritten. Auch hier wurden durch die verwendete Software die C(t)-Werte und die Schmelzkurvenanalyse angewandt.

3.4.3 Auswertung der qPCR-Ergebnisse

Die Auswertung erfolgte nach einer effizienz-korrigierten relativen Quantifizierung nach Pfaffl (2001). Der zu errechnende Expressionsunterschied (ratio) einer Probe ergab sich aus einem cDNA-Mix der adulten Kontrollgruppe (Kalibrator) zu dem nicht regulierbaren Referenzgen GAPDH, den vorher beschriebenen und errechneten PCR-Effizienzen und den durch die „CFX-Manager™“ Software ermittelten C(t)-Werten. Die C(t)-Werte entsprechen der Anzahl der PCR-Zyklen, die nötig sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Angewandt wurde folgende Formel:

$$\text{Ratio} = \frac{\text{E}^{\Delta\text{C(t) Zielgen}}}{\text{E}^{\text{C(t) Referenzgen}}}$$

Der ΔC(t)-Wert wurde für jede Probe aus der folgenden Formel berechnet:

$$\Delta\text{C(t)} = \bar{x}\ \text{C(t)(Kalibrator)} - \bar{x}\ \text{C(t) (Probe)}$$

Der arithmetische Mittelwert der beiden im Doppelansatz ermittelten C(t)-Werte wurde als $\bar{x}$C(t) (Probe) verwendet. Der im Doppelansatz verwendete cDNA-Mix der adulten Kontrollgruppe wurde als Kalibrator verwendet, der sowohl für das Zielgen als auch das Referenzgen pipettiert wurde. Auch hier wurde aus beiden gemessenen Proben der arithmetische Mittelwert berechnet.

Angaben zu allen verwendeten Materialien, Chemikalien, Geräten, Rezepten für Puffer und Lösungen finden sich im Anhang.

3.5 Western Blot

3.5.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten aus Gewebe

Zuerst erfolgte mit Hilfe eines Hammers eine grobe Zerkleinerung der bei –80 °C, in Aluminiumfolie gelagerten Gewebeteile. Die Stückchen wurden zügig in einen sterilen, mit flüssigem Stickstoff befüllten Porzellanmörser überführt und mit einem Porzellanpistill unter ständiger Kühlung durch flüssigen Stickstoff zu Gewebepulver zerstoßen. Das Gewebepulver (ca. 200 mg) wurde mit 1 ml kaltem Proteaseinhibitor-Cocktail (Complete Mini, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D) in einem 2 ml großen Reaktionsgefäß vermischt und mit dem Ultra Turrax® (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D) 3 x 30 Sekunden lang homogenisiert. Zu diesem Gewebe-Puffer-Gemisch wurden 50 mg SDS gegeben. Das entstandene Gemisch wurde kurz gevortext und anschließend in dem Reaktionsgefäß für 10 Minuten in einem Wasserbad gekocht. Danach erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 3500 rpm (1200 g) und 4 °C. In diesem Schritt wurden noch vorhandene größere Gewebebestandteile von dem proteinhaltigen flüssigen Überstand getrennt, so dass dieser schließlich in ein weiteres Reaktionsglas pipettiert werden konnte. Die Aliquots wurden nach der Proteinbestimmung bei –20 °C gelagert.

3.5.2 Messung der Proteinkonzentration

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte in einem UV-Photometer (Eppendorf AG, Hamburg, D). Zur Konzentrationsbestimmung dienten Kunststoff-Einmalküvetten (Eppendorf AG, Hamburg, D). Bei dem Photometer wurde das Programm „Protein“ bei einer Wellenlänge von 280 nm genutzt. Der Nullwert wurde mit 98 µl autoklaviertem Aqua bidest. und mit Hilfe der „Blank“-Taste ermittelt.
Unter Verwendung der Taste „Dilution“ wurde die Verdünnung 1 : 50 (2 µl Probe + 98 µl Aqua bidest.) eingestellt. Die Probe konnte nach Betätigen der „Sample“-Taste gemessen werden.

3.5.3 Herstellung SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Herstellung des Polyacrylamid-Mini-Gels der Größe 100 x 105 x 0,75 mm

wurde die Gelelektrophorese Apparatur Mighty Small SE 245 Dual Gel Caster (Hoefer® Inc., Holliston, MA, USA) verwendet. Wie vom Hersteller empfohlen, wurden die Glasplatten sorgfältig gereinigt, mit 70%igem Ethanol entfettet und wie beschrieben in die dafür vorgesehenen Halterungen eingeklemmt. Trenngel 7,5 % und Sammelgel 5 % wurden separat voneinander hergestellt.

Trenn- und Sammelgele enthielten abgesehen vom Puffer die gleichen Inhaltsstoffe, 30%ige Acrylamid-Stammlösung, Trenngelpuffer/Sammelgelpuffer, Aqua bidest., 10%ige SDS-Sammellösung, frisch angesetztes 10%iges APS (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) und TEMED (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D), die sich in ihren Konzentrationen des jeweiligen Gels unterschieden. Das fertige Trenngel wurde kurz geschwenkt und mit einer 1000 µl Pipette zügig und luftblasenfrei in die Gelkassette eingefüllt, so dass der Flüssigkeitsspiegel 3 cm unterhalb des oberen Randes endete. Die obere Grenze des Flüssigkeitsspiegels wurde von außen auf der Glasscheibe markiert. Um zum einen eine glatte Gelgrenze zu erhalten und zum anderen den Kontakt mit Luftsauerstoff auszuschließen, wurde das Trenngel mit 1 ml Isopropanol (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) beschichtet. Nach 45-minütiger Polymerisation wurde das Isopropanol abgegossen, die Geloberfläche mit Aqua bidest. gewaschen und die Flüssigkeitsreste wurden mit dünnem Filterpapier beseitigt. Die Gelkassette wurde nun mit vorher angemischter Sammelgellösung aufgefüllt. Zur Herstellung der Probentaschen wurde die Kammschablone eingesteckt. Für die bessere Wiedererkennung der Taschen nach Entfernung des Kammes wurden diese ebenfalls auf der Glasplatte markiert.

Während der 30-minütigen Polymerisationszeit wurden die Proben für die im Anschluss folgende Elektrophorese vorbereitet. Die benötigten Proteinproben sowie Puffer und Ladder wurden auf Eis gelagert, um ein langsames Auftauen zu gewährleisten. Die Arbeitsverdünnung setzte sich aus Protein, Aqua bidest. und Puffer zusammen, wobei eine Proteinkonzentration von 10 µg/µl (Hund) und 5 µg/µl (Maus) verwendet wurde. Pro Probentasche wurde ein Endvolumen der Arbeitsverdünnung von 12 µl benötigt (pro Probentasche 100–150 µg Protein in einem Verhältnis 3 : 1 mit Probenpuffer gemischt). Der Proteinmix wurde jeweils in einem sauberen Eppendorf-Röhrchen angefertigt und unmittelbar danach in einem 3-minütigen Wasserbad bei 95 °C hitzedenaturiert. Danach wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung auf Eis abgekühlt und gelagert.

Nach Ende der Polymerisationszeit konnte die kammähnliche Schablone vorsichtig

entfernt, das Gelsandwich aus der Gießvorrichtung entnommen und wie in der Anleitung beschrieben senkrecht in die Elektrophoresekammer (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) geklemmt werden. Hier wurden die Probentaschen zunächst mit 4 °C kaltem 1 x Elektrodenpuffer gespült. Zeitgleich erfolgte die Füllung beider Kammern der Elektrophorese-Apparatur. Die Probentaschen wurden mit jeweils 12 µl des zuvor vorbereiteten Puffers, der Proben sowie einem Molekulargewichtsmarker befüllt.
Um während der Gelelektrophorese eine dauerhafte Kühlung durch Eiswasser zu gewährleisten, fand eine Thermomix 1419 Pumpe (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D) Verwendung. Die Kammer wurde verschlossen und die Gelelektrophorese bei einer konstanten Stromstärke von 15 mA und einer Spannung von 300 V gestartet. Nach ca. 20 Minuten erreichte die Bromphenolblau-Front das Trenngel, so dass die Stromstärke auf 25 mA umgestellt wurde. Nach ca. 45 Minuten war ein dünner Streifen des Bromphenolblaus am unteren Ende des Trenngels sichtbar und die Elektrophorese wurde beendet.

3.5.4 Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Membran

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden aus dem Polyacrylamid-Gel die zuvor aufgetrennten Proteine in der Tank-Blot-Apparatur Mini Trans-Blot® (Bio-Rad, UK) auf eine PVDF-Membran (Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, D) übertragen.
Das der Größe des Gels entsprechende Stück PVDF-Membran wurde kurz mit Methanol benetzt und für 20 Minuten in 4 °C kalten Transferpuffer verbracht. Des Weiteren wurden vier handelsübliche Haushaltsschwammtücher und vier Mini Trans-Blot-Filterpapiere (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) in Transferpuffer eingeweicht.
Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde die Glasplattenkassette aus der Apparatur genommen und auf einem sauberen Labortisch platziert. Die Spacer, die als Platzhalter zwischen den Glasplatten dienten, wurden entfernt und die obere Glasplatte vorsichtig abgelöst, so dass das Gel nur auf der unteren Platte zurückblieb.
Mit einem Spacer wurde das Sammelgel abgetrennt, das zurechtgeschnittene Trenngel vorsichtig von der Glasplatte gelöst und für 10 Minuten bei Raumtemperatur in ein Gefäß mit Transferpuffer überführt.

Im nächsten Schritt wurde das Kunststoffgitter aus der Tank-Blot-Apparatur geöffnet, mit der schwarzen Seite nach unten gelegt und der Blotstapel in folgender Reihenfolge unter Vermeidung von Luftblasen zusammengebaut:

- 2 Haushaltsschwämme
- 2 Mini-Trans-Blot-Filterpapiere
- Polyacrylamidgel
- PVDF-Membran
- 2 Mini-Trans-Blot-Filterpapiere
- 2 Haushaltsschwämme

Das Blot-Sandwich wurde mit der farblosen Gitterseite nach oben zeigend zusammengepresst, verschlossen und in die Blot-Apparatur verbracht. Wie vom Hersteller angegeben wurde die Tank-Blot-Apparatur mit einer „Cooler-Unit“, 4 °C kaltem Transferpuffer und einem kleinen Magnetrührstab ausgestattet. Das Gerät wurde mit dem vorgesehenen Deckel verschlossen und auf einen Magnetrührer (Janke & Kunkel GmbH + Co. KG, IKA-Werke, Staufen, D) verbracht, um eine gleichmäßige Kühlung zu gewährleisten. Der Transfer wurde bei einer Spannung von 100 V und einer maximalen Stromstärke von 300 mA gestartet. Dadurch wurde ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld erzeugt, so dass die Proteine aus dem Gel auf die Membran wanderten. Nach einer Stunde war dieser Vorgang beendet und das Blot-Sandwich wurde aus der Vorrichtung entnommen. Die PVDF-Membran wurde mit Hilfe einer Kunststoffpinzette vom Trenngel entfernt, mit der dem Gel zugewandten Seite nach oben auf ein Filterpapier platziert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet.

3.5.5 Ponceau-S-Färbung

Um die Effizienz der Proteinübertragung auf die PVDF-Membran überprüfen zu können, wurde diese mittels der Ponceau-S-Färbung (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlruhe, D), einem roten Azofarbstoff, reversibel angefärbt. Ponceau-S färbt nicht nur alle unspezifischen Proteine, sondern fixiert diese zusätzlich auf der Membran.
Dazu wurde die vollständig getrocknete Membran kurz mit Methanol benetzt und für 3 Minuten in der Ponceau-Arbeitslösung, bestehend aus Ponceau-Stammlösung und Aqua bidest. im Verhältnis 1 : 10 geschwenkt. In einem weiteren Gefäß wurde die Reaktion gestoppt, überflüssiger Farbstoff mit Aqua bidest. weggespült und die

übertragenen Proteinstreifen wurden sichtbar. Dieser Schritt eignete sich gut, um die PVDF-Membran an den gewünschten Stellen zwischen den Proteinbanden zur unterschiedlichen Weiterverarbeitung zu zerschneiden. Durch Waschen in PBS konnte die Färbung rückgängig gemacht werden.

3.5.6 Nachweisreaktion

Zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen wurde die Membran über Nacht bei 4 °C in einem Blocking Puffer aus Magermilchpulver, PBS-Puffer und 2%iger Thimerosal-Lösung inkubiert.
Am folgenden Tag wurde die Membran kurz in PBST-Puffer gewaschen und anschließend für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit nach Herstellerangaben verdünntem Avidin (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) zur Blockierung weiterer unspezifischer Bindungsstellen behandelt. Um den Blockingvorgang der unspezifischen Bindungsstellen abzuschließen, wurde nach einem kurzen Waschgang mit PBST eine 30-minütige Inkubation in verdünntem Biotin (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) vorgenommen. Nach einem erneuten Waschvorgang mit PBST wurde die Membran schließlich mit dem Primärantikörper, verdünnt mit Blocking-Puffer, über 2 Stunden auf einem Schüttler inkubiert. Die folgenden Primär-Anitkörper wurden verwendet:

- Inhibin α
  Monoklonaler Antikörper, Maus-anti Mensch, 32 kDa, AbD Serotec, UK, Katalog-Nr. MCA951ST, Verdünnung 1 : 250

- Inhibin β_A
  Polyklonaler Antikörper, Kaninchen-anti Mensch, 47,4 kDa, Protein Tech Group, Inc., Chicago, Katalog-Nr. 10651-1-AP, Verdünnung 1 : 250

- Inhibin β_B
  Polyklonaler Antikörper, Kaninchen-anti Mensch, 45 kDa, Protein Tech Group, Inc., Chicago, Katalog-Nr. 17577-1-AP, Verdünnung 1 : 100

Anschließend wurden alle Membrananteile mehrmals mit frischem PBST gewaschen. Zur Detektion des Primärantikörpers wurde die Membran mit dem verdünnten biotinylierten Sekundärantikörper inkubiert.

Verwendet wurde hier für:

- Inhibin α: biotinylierter-anti-Maus IgG BA 2000 (Vector, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, Verdünnung 1 : 1000)

- Inhibin $\beta_{A/B}$: biotinylierter Ziege-anti-Kaninchen-IgG Antikörper (Vectastain® Elite ABC Kit Rabbit IgG, Vector Laboratories, Inc., USA, Verdünnung 1 : 1000)

Nach einer 60-minütigen Verweilzeit auf dem Schüttler wurde durch einen erneuten, dreimaligen Waschvorgang der übriggebliebene, ungebundene Sekundärantikörper entfernt.
Zur Signalverstärkung des zweiten Antikörpers wurde ein peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex (Vectastain® Elite ABC Kit Rabbit IgG, Vector Laboratories, Inc., USA) verwendet, mit dem die Membran für 30 Minuten inkubiert wurde.
Nach einem letzten Waschvorgang mit PBST wurden die Proteinbanden mit Hilfe des NovaRED™Substrate Kits (Vector® Laboratories, Inc., USA) visualisiert. Die Anwendung der Färbelösung fand in einem abgedunkelten Raum statt. Unter visueller Kontrolle wurde nach einem Zeitraum von bis zu 15 Minuten bei gewünschter Färbeintensität die Reaktion durch Spülung mit Aqua bidest. gestoppt und die Membran bis zur vollständigen Trocknung bei Raumtemperatur auf dünnem Filterpapier gelagert. Unmittelbar danach wurden die Ergebnisse eingescannt und digital dokumentiert.
Bei jedem Western Blot wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, um die unspezifischen Bindungen des Sekundärantikörpers und das Bindeverhalten des Avidin-Biotin-Komplexes besser beurteilen zu können. Dafür wurde auf die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper verzichtet und stattdessen Blocking-Puffer verwendet. Alle anderen Arbeitsschritte wurden wie im Protokoll beschrieben eingehalten.

3.6 Immunhistochemischer Nachweis von Inhibin α, $\beta_{A/B}$

3.6.1 Herstellung der histologischen Schnitte

Die für die immunhistologischen Untersuchungen benötigten Gewebeschnitte wurden aus den in Bouin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Hodenblöcken angefertigt.

Der Zuschnitt erfolgte mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms (RM 2125 RT, Fabr.-Nr. 8493/092004, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, D) und wurde wie vom Hersteller beschrieben in senkrechter Schnittrichtung, bei Raumtemperatur und von gekühlten Paraffinblöcken durchgeführt. Um dabei eine maximale Qualität der morphologischen Details zu erlangen, wurden 3 µm dünne Schnitte hergestellt. Zur besseren Entfaltung der 3 µm dünnen Hodenschnitte wurden diese mit Hilfe eines Objektträgers in ein Wasserbad (Aqua bidest., 37 °C) überführt. Nach vollständiger Glättung wurden die Schnitte schwimmend auf Adhäsionsobjektträger (Thermo Scientific, Menzel-Gläser, Superfrost® Plus, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, D) positioniert und dann über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

3.6.2 Immunhistologisches Färbeprotokoll

Die Immunhistochemie wurde an jeweils einem Gewebeschnitt pro Hund durchgeführt und es wurde aus jeder Entwicklungsgruppe eine Negativkontrolle mitgeführt, um eventuelle unspezifische Signale und Hintergrundfärbungen differenzieren zu können. Hierzu wurde der Schnitt statt mit dem Primärantikörper mit einer Isotypenkontrolle inkubiert. Die weiteren Schritte waren identisch. Alle Gewebeschnitte wurden in einem Durchlauf angefertigt, wobei besonders viel Wert auf die einheitliche Bearbeitung aller Schnitte gelegt wurde, um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit aller Gewebeschnitte aus den verschiedenen Gruppen zu gewährleisten.

Zur Entparaffinierung erfolgte zweimalig ein 5-minütiges Bad in Xylol. Anschließend durchliefen die Schnitte zur Rehydrierung eine Alkoholreihe mit absteigenden Konzentrationen (jeweils 2 x 2 Minuten 99,6 % Ethanol, 96 % Ethanol, 70 % Ethanol). Danach wurden sie 5 Minuten unter kaltem, fließendem Leitungswasser gespült. Im nächsten Schritt erfolgte eine Inkubation für 5 Minuten in Citratpuffer, um die durch die Fixierung vernetzten Epitope zu demaskieren. In vorgeheiztem Citratpuffer wurden die Schnitte 3 x 5 Minuten bei 560 W in der Mikrowelle gekocht. Um das Austrocknen des Hodengewebes zu vermeiden, wurde alle 5 Minuten der verdunstete Puffer ersetzt. Schließlich wurden die Schnitte im Citratpuffer 20 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt, gefolgt von einer 5-minütigen Spülung unter kaltem Leitungswasser. Zur Hemmung der endogenen Peroxidase und späteren Reduktion des Hintergrundsignals wurden die Schnitte für 30 Minuten in eine 0,3%ige

Wasserstoffperoxidlösung in Methanol verbracht. Im Anschluss daran wurden sie 5 Minuten in ICC-Puffer unter Rütteln gewaschen. Danach wurden die Schnitte einzeln aus dem Schiffchen entnommen, überschüssiger Puffer durch Umfahren des Hodengewebes mit einem eingerollten, flusenfreien Papiertuch (KimTech Tuch, Kimberly Clark Professional, Dallas, USA) entfernt und anschließend mit einem DakoPen (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, D) umfahren, der das Auslaufen der im Folgenden aufgetragenen Lösungen verhinderte. Abhängig vom verwendeten Primärantikörper wurde ein Blockingserum erstellt (für Inhibin α mit 10%igem Pferdeserum, Inhibin $\beta_{A/B}$ mit 10%igem Ziegenserum), auf die Schnitte pipettiert und die Schnitte danach für 20 Minuten in einer feuchten Kammer gelagert.
In den letzten Arbeitsschritten war ein zügiges Arbeiten erforderlich, da ein Austrocknen der Gewebeschnitte auf den Objektträgern unbedingt zu vermeiden war. Mit Hilfe einer Vakuumpumpe wurde die Blockinglösung abgesaugt und es wurden – abgesehen von den Negativkontrollen – alle Schnitte mit ca. 90 µl des Primär-antikörpers vollständig bedeckt und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Die Negativkontrollen wurden mit der entsprechenden passenden Isotypenkontrolle inkubiert.
Folgende Primärantikörper und Isotypenkontrollen wurden verwendet:
Primärantikörper

- Inhibin α
  Monoklonaler Antikörper, Maus-anti Mensch, 32 kDa, AbD Serotec, UK, Katalog-Nr. MCA951ST, Verdünnung 1 : 50

- Inhibin β_A
  Polyklonaler Antikörper, Kaninchen-anti Mensch, 47,4 kDa, Protein Tech Group, Inc., Chicago, Katalog-Nr. 10651-1-AP, Verdünnung 1 : 100

- Inhibin β_B
  Polyklonaler Antikörper, Kaninchen-anti Mensch, 45 kDa, Protein Tech Group, Inc., Chicago, Katalog-Nr. 17577-1-AP, Verdünnung 1 : 100

Isotypenkontrolle

- Inhibin α
  Isotypenkontrolle Mouse IgG2a, Kat. Nr. ITC0929 (LINARIS biologische Produkte GmbH, Dossenheim, D), 1 : 5000

- Inhibin $\beta_{A/B}$
  Isotypenkontrolle Rabbit IgG 1000 (Vector Laboratories Inc., Burlinghame, CA, USA), 1 : 1000

Am nächsten Tag wurde der Überstand des Primärantikörpers auf einem Papiertuch abgeklopft und die Schnitte wurden für 2 x 5 Minuten auf dem Schüttler in ICC-Puffer gewaschen. Wie oben beschrieben wurden die Objektträger erneut getrocknet und die Kontur des DakoPens bei Bedarf nachgezogen. Zur Detektion des gebundenen Primärantikörpers wurde das Gewebe mit einem biotinylierten Sekundärantikörper für 30 Minuten beschichtet.
Folgende Sekundärantikörper fanden Verwendung:

- Inhibin α
  Biotinylierter anti-Maus IgG BA 2000, Vector, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Verdünnung 1 : 1000

- Inhibin $\beta_{A/B}$
  Biotinylierter Ziegen-anti-Kaninchen IgG, Vectastain® Rabbit IgG Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Inc., USA, Verdünnung 1 : 1000

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Schnitte wiederholt mit PBST gewaschen, getrocknet und mit jeweils ca. 90 µl eines peroxidase-konjugierten Avidin-Biotin-Komplexes (aus Vectastain® Rabbit IgG Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Inc., USA) über 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte wieder ein Abklopfen, Waschen in ICC-Puffer und Trocknen der DakoPen-Umrandung und abschließend eine Visualisierung der Antikörper-reaktion mit NovaRED™ Färbelösung (Vector® Laboratories, Inc., USA) wie vom Hersteller beschrieben. Unter Sichtkontrolle wurde das Färbeverhalten verfolgt und bei gewünschter Intensität durch 5-minütiges Waschen in Aqua bidest. gestoppt. Zur besseren Identifizierung der einzelnen Zellen wurden die Schnitte einige Sekunden in Hämatoxilin (1 : 1) gegengefärbt und überflüssiger Farbstoff in einem 5-minütigen Waschgang unter fließendem Leitungswasser weggespült. Zur Dehydrierung durchliefen alle Schnitte eine kurze aufsteigende Alkoholreihe (1 x 2 Minuten 96%iges Ethanol, 1 x 2 Minuten 99%iges Ethanol, 2 x 2 Minuten Xylol) mit zunehmender Konzentration. Um die Schnitte über einen längeren Zeitraum sicher lagern zu können, wurden sie mittels Assistent-Histokit (Glaswarenfabrik Karl Hecht

GmbH + Co KG, Sondheim/Rhön, D) eingedeckelt.

3.6.3 Auswertungsprinzip der Immunhistochemie

Ausgewertet wurden nur immunhistologische Schnitte, bei denen das Gewebe von einwandfreier Qualität war und keine Artefakte aufzeigte. In der mikroskopischen Beurteilung wurden die Ränder ausgespart. Die Präparate wurden mit einem Leica Lichtmikroskop (Leitz DM RB, Leica Mikroskopie und Systeme GmbH Wetzlar, D) mäanderförmig, von links nach rechts und von oben nach unten abgefahren und bei einer 400fachen Vergrößerung durchgemustert. Es wurden pro Hund 20 aufeinanderfolgende, annähernd runde Tubuli seminiferi ausgewertet, wobei im ersten Schritt der Tubulustyp bzw. das Stage nach Russell (1990a) beurteilt wurde. Anschließend folgte sowohl eine qualitative wie auch quantitative Auswertung der Zellarten mit positiver Farbreaktion. Die Farbintensität wurde mit einer Skala von 0–4 (gar nicht – stark gefärbt) dokumentiert. Nach gleichem Schema wurden die Zellen des Interstitiums beurteilt.
Zur besseren Vergleichbarkeit wurden alle Präparate eines Antikörpers innerhalb von sieben Tagen ausgewertet und digital festgehalten. Die Grundeinstellungen des Mikroskops wurden während dieser Zeit nicht verändert.

3.7 Statistische Auswertung

Die Erstellung der vorliegenden Arbeit, das Erfassen und Auswerten der erhobenen Daten und schließlich auch die graphische Darstellung erfolgte an einem Toshiba Notebook mittels der Microsoft Office 2003 Software. Die statistische Berechnung unter Verwendung der Statistikprogramme BMDP/Dynamic Release 8.1 (Dixon 1993) und „StatXact“ wurde von der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinär-medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen unter der Leitung von Herrn Dr. K. Failing durchgeführt.
Es wurde wie folgt vorgegangen:
Zur Datenbeschreibung wurden bei annähernder Normalverteilung der Ergebnisse der arithmetische Mittelwert ($\bar{x}$) und die Standardabweichung (SD) berechnet. Bei einer rechtsschiefen Verteilung positiver qualitativer Merkmale der Variablen erfolgte eine logarithmische Transformation der Daten, die Darstellung erfolgte als

geometrischer Mittelwert ($\bar{x}_g$) und Streufaktor (SF). Die graphische Darstellung erfolgte mittels zusätzlicher Verwendung der Intervalle $\bar{x}_g$*SF und $\bar{x}_g$/SF.

Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz der einzelnen Versuchsgruppen wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (einfaktorielle ANOVA, „analysis of variance“) mit dem Programm BMDP7D durchgeführt. Bei statistisch signifikanten Resultaten erfolgte im Anschluss ein paarweiser Gruppenvergleich mittels Tukey-Test.

Bei den ordinalskalierten Merkmalen fand entweder der exakte oder asymptomatische Kruskal-Wallis-Test, unter Verwendung des Programms BMDP3S, Anwendung, um eine allgemeine Gruppensignifikanz ermitteln zu können. Bei signifikanten Ergebnissen kam zur weiteren Differenzierung innerhalb der Gruppen der Dunn-Test (Programmpaket BiAS) zum Einsatz. Die Zusammenhänge beim Vorliegen von quantitativen Merkmalen wurden mit Hilfe von Korrelationsanalysen mit dem Programm BMDP6D unter Angabe des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman ermittelt.

Anwendung fanden die o. g. Verfahren bei allen 3 Kollektiven (Kollektiv 1: DG A, DG B, DG C, DG D und CG; Kollektiv 2: Wochengruppe-0, -3, -6, -9, -12, -24 und Adult; Kollektiv 3: Wochenguppe-0, Juvenil, Profact, Suprelorin und Adult).

Zur stage-spezifischen Auswertung des immunhistologischen Färbeverhaltens wurden die Stage I - VIII nach Russell anhand eines ähnlichen Färbeverhaltens in drei Gruppen eingeteilt: Gruppe 1 (Stage I-IV), Gruppe 2 (Stage V) und Gruppe 3 (Stage VI-VIII).

Auch hier fand der Kruskal-Wallis-Test zur Bestimmung der allgemeinen Gruppensignifikanz mit anschließendem Dunn-Test Anwendung.

Bei der statistischen Auswertung wurde das Signifikanzniveau bei $\alpha = 0{,}05$ gewählt, so dass alle Ergebnisse mit $p \leq 0{,}05$ als statistisch signifikant gewertet wurden.

4 Ergebnisse

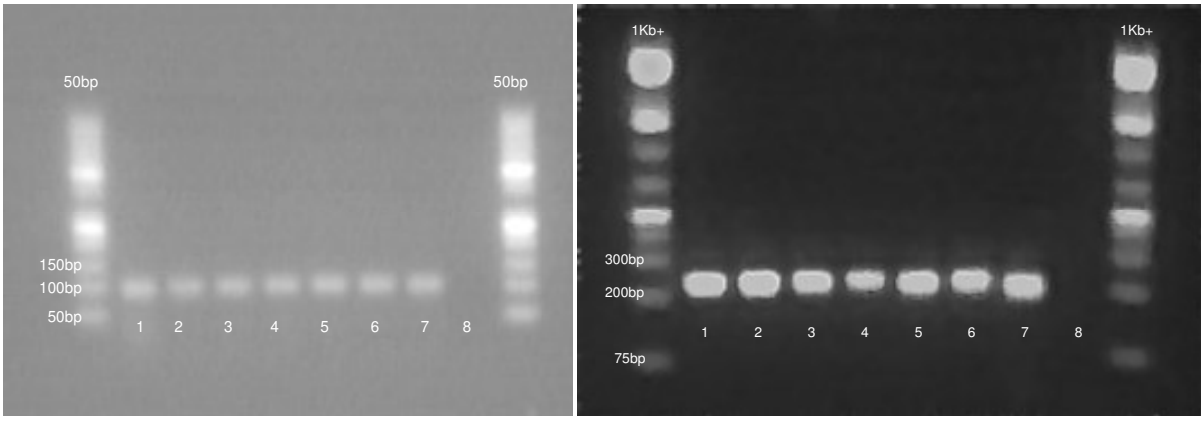
4.1 Expression auf mRNA-Ebene

4.1.1 Ergebnisse der RT-PCR

Der relative Nachweis auf mRNA-Ebene erfolgte aus dem Hodengewebe von jeweils einem Hund aus allen Gruppen (DG A-D, Adult, Profact, Suprelorin) außer JG für Inhibin α, β_A und β_B. Als Kontrolle wurde das Housekeeping Gen canines GAPDH verwendet. Hier konnte nach der elektrophoretischen Auftrennung mit Hilfe von UV-Licht eine deutliche Bande im Bereich von 200-300 bp sichtbar gemacht werden, so dass dies mit der angegebenen Größe von 228 bp übereinstimmte. Die kodierende mRNA von GAPDH konnte in allen Gruppen nachgewiesen und somit die Integrität der RNA und der daraus gewonnenen cDNA bestätigt werden. In der mitgeführten Negativkontrolle waren keine Banden sichtbar.

4.1.1.1 Inhibin α-Subunit

Mittels qualitativer RT-PCR und anschließender Gelelektrophorese konnte unter UV-Licht die zu erwartende Bande bei ca. 90 bp bei den einzelnen Hunden aus den verschiedenen Gruppen sichtbar gemacht werden, welche der für das Amplifikat erwarteten Größe entsprach.

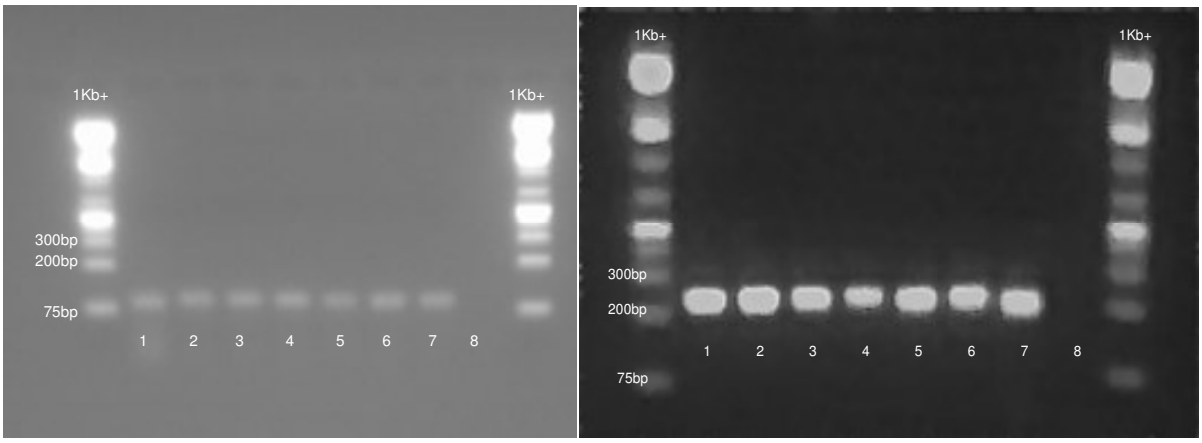


Inhibin α GAPDH

Abb. 3: Gelelektrophoretischer Nachweis auf mRNA-Ebene von Inhibin α und GAPDH mittels RT-PCR; 1 DG A, 2 DG B, 3 DG C, 4 DG D, 5 CG, 6 PG, 7 SG, 8 Negativkontrolle; 50 bp: Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder/Größenstandard; 1 Kb+: 1 kb DNA Ladder Plus/Größenstandard

4.1.1.2 Inhibin β_A-Subunit

In der gelelektrophoretischen Auftrennung der in der RT-PCR gewonnenen PCR-Produkte von Inhibin β_A konnte jeweils eine Bande bei allen untersuchten Gewebeproben zwischen 75 bp und 200 bp visualisiert werden, was der erwarteten Größe von 84 bp entsprach.

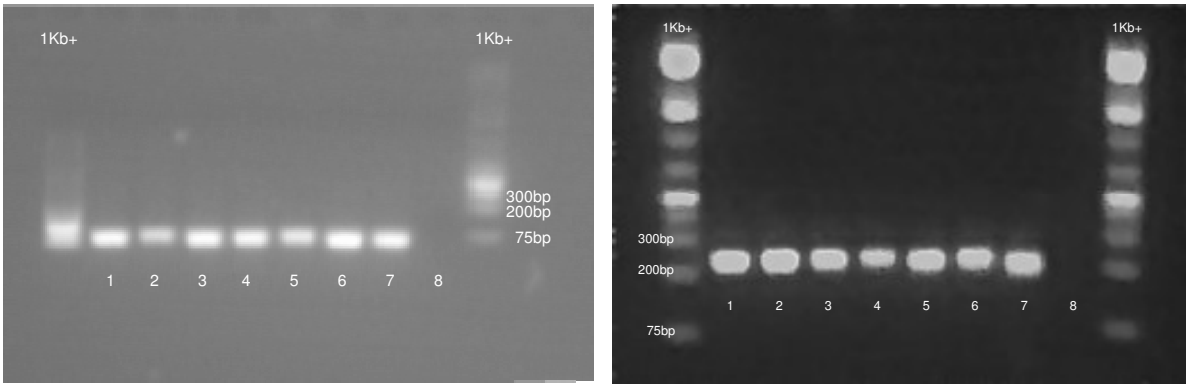


Inhibin β_A GAPDH

Abb. 4: Gelelektrophoretischer Nachweis auf mRNA-Ebene von Inhibin β_A und GAPDH mittels RT-PCR; 1 DG A, 2 DG B, 3 DG C, 4 DG D, 5 CG, 6 PG, 7 SG, 8 Negativkontrolle; 1 Kb+: 1 kb DNA Ladder Plus/Größenstandard

4.1.1.3 Inhibin β_B-Subunit

Die Banden für die Amplifikate von Inhibin β_B konnten nach gelelektrophoretischer Auftrennung für die untersuchten Gewebeproben knapp unter 75 bp detektiert werden, was der erwarteten Größe des PCR-Produkts von 70 bp entsprach.



Inhibin β_B GAPDH

Abb. 5: Gelelektrophoretischer Nachweis auf mRNA-Ebene von Inhibin β_B und GAPDH mittels RT-PCR; 1 DG A, 2 DG B, 3 DG C, 4 DG D, 5 CG, 6 PG, 7 SG, 8 Negativkontrolle; 1 Kb+: 1 kb DNA Ladder Plus/Größenstandard

4.1.2 Ergebnisse der qPCR

Die qPCR wurde mit Material aller Hunde für alle drei Subunits durchgeführt. Die Ergebnisse der qPCR sind in Tabellen und Abbildungen dargestellt. In den mitgeführten Negativkontrollen konnte kein Signal verzeichnet werden.

4.1.2.1 Inhibin α

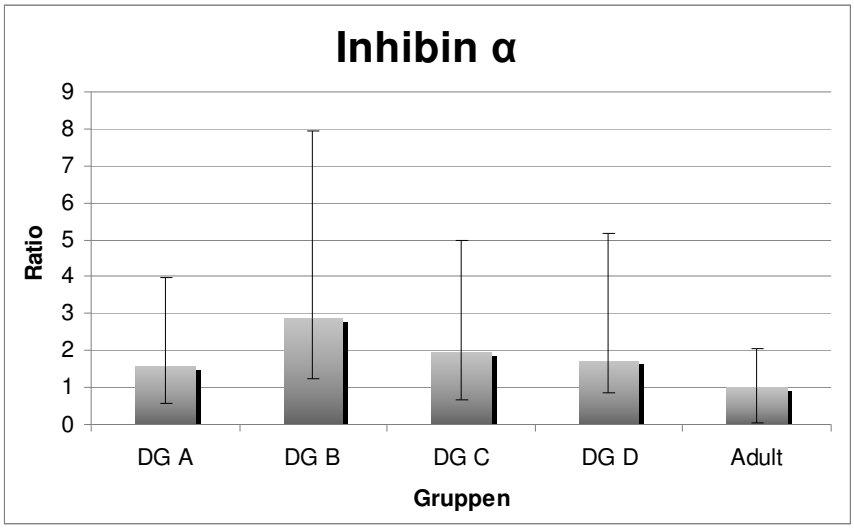
Während in Kollektiv 1 (DG A-D und Adult) keine signifikanten Unterschiede (Abb. 6 (1)) zu erkennen waren, zeigte der Gruppen-Wochen Vergleich (0, 3, 6, 9, 12, 24 und Adult, Kollektiv 2) einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($p = 0{,}0039$). Im Tukey-Test zeigten sich signifikante Unterschiede sowohl zwischen den Wochen 3 und 9 ($p < 0{,}05$), 3 und 24 ($p < 0{,}01$) als auch zwischen 3 und Adult ($p < 0{,}05$). Im Mittel [$\bar{x}_g$(SF)] war die errechnete Ratio in der 3. Kastrationswoche mindestens dreifach höher als in den Wochen 9 und 24 sowie in der adulten Kontrollgruppe (Abb. 6 (2)).

In der einfaktoriellen Varianzanalyse konnte beim Vergleich der Gruppen von Kollektiv 3 (Woche 0, Profact, Suprelorin, Adult, Juvenil) eine statistische Signifikanz ($p = 0{,}0463$) ermittelt werden. Im Durchschnitt [$\bar{x}_g$(SF)] war die Ratio der Inhibin α Expression in der Adult-Gruppe signifikant niedriger als in der Suprelorin-Gruppe ($p < 0{,}05$) (Abb. 6 (3)).

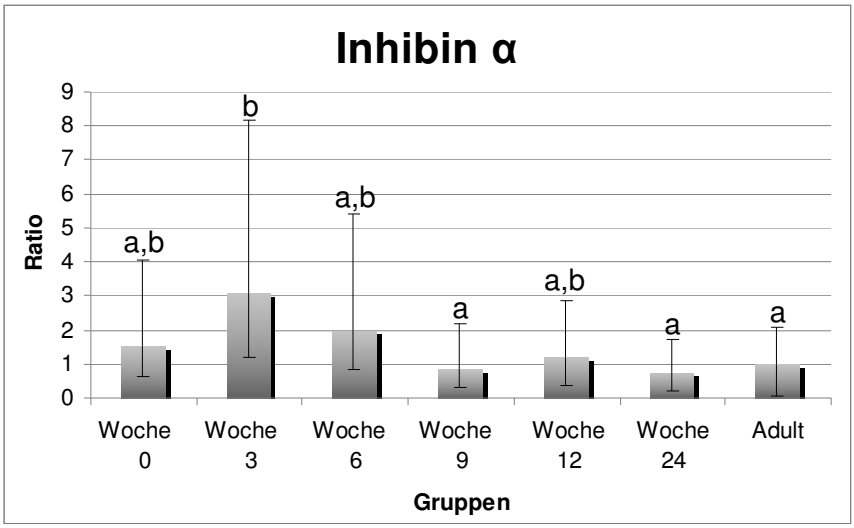
Tab. 11: Ratio der mRNA-Expression von Inhibin α; geometrische Gruppenmittelwerte mit Streufaktor [$\bar{x}_g$(SF)]

Gruppe/Woche	Ratio [$\bar{x}_g$(SF)]
DG A	1,56 (1,55)
DG B	2,87 (1,77)
DG C	1,95 (1,55)
DG D	1,70 (2,04)
Adult	1,00 (1,06)
Profact	1,64 (1,30)
Juvenil	1,23 (1,41)
Suprelorin	2,82 (2,95)
0	1,50 (1,70)
3	3,09 (1,65)
6	2,00 (1,70)
9	0,82 (1,66)
12	1,19 (1,42)
24	0,72 (1,37)

1)



2)



3)

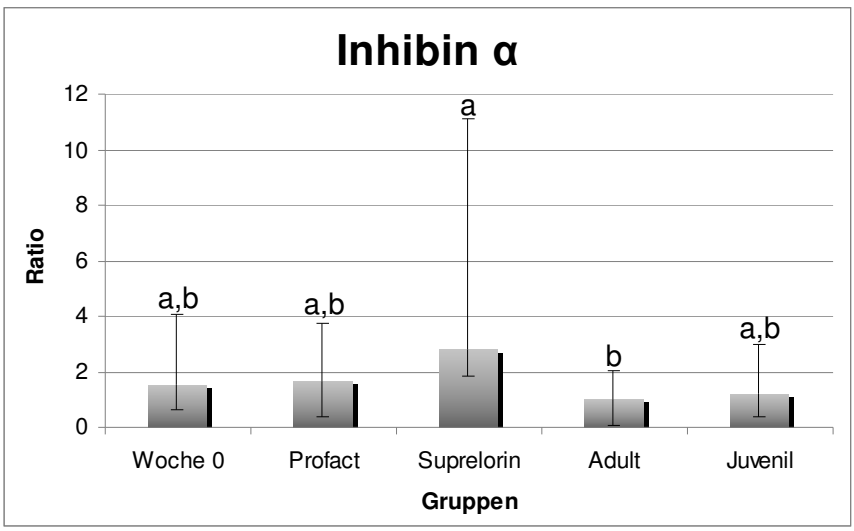


Abb. 6: Ratio der mRNA-Expression von Inhibin α, geometrische Gruppenmittelwerte [$\bar{x}_g$(SF)], 1) Kollektiv 1, DG A–D und Adult 2) Kollektiv 2, Wo 0–24 und Adult 3) Kollektiv 3, Woche 0, Profact, Suprelorin, Juvenil und Adult, a : b $p < 0,05$

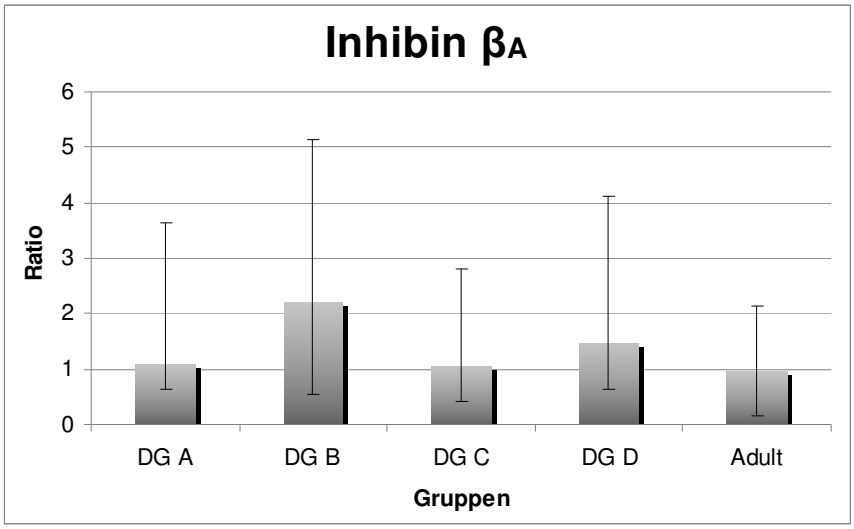
4.1.2.2 Inhibin β_A

In der statistischen Auswertung zeigten, abgesehen von dem Kollektiv 2 (Wo 0-24, Adult, p = 0,0026), alle weiteren Gruppenvergleiche (Kollektiv 1 und 3) keine signifikanten Unterschiede. In der weiteren Untersuchung des Kollektivs 2 konnten mittels Tukey-Test keine Signifikanzen differenziert werden (Abb. 7 (2)).

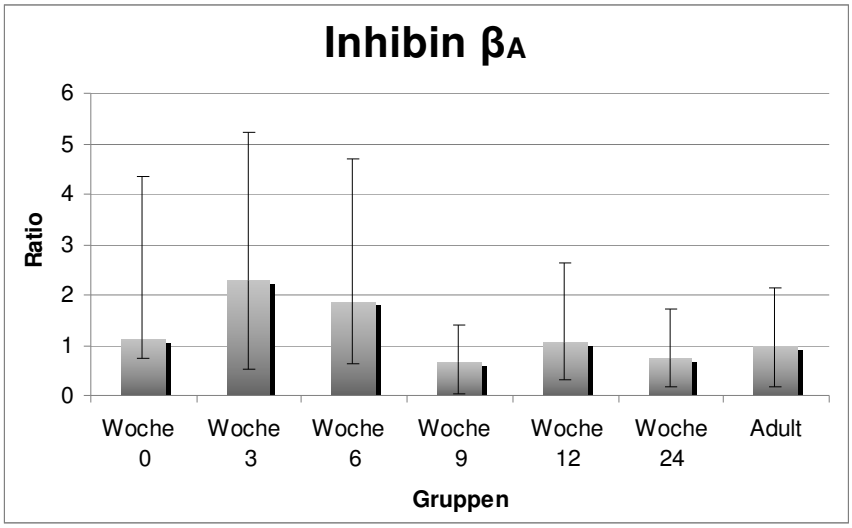
Tab. 12: Ratio der mRNA-Expression von Inhibin β_A; geometrische Gruppenmittelwerte mit Streufaktor [$\bar{x}_g$(SF)]

Gruppe/Woche	Ratio [$\bar{x}_g$(SF)]
DG A	1,08 (2,37)
DG B	2,21 (1,33)
DG C	1,60 (1,66)
DG D	1,46 (1,81)
Adult	0,97 (1,21)
Profact	0,72 (1,22)
Juvenil	1,12 (1,48)
Suprelorin	1,90 (3,16)
0	1,13 (2,86)
3	2,28 (1,29)
6	1,86 (1,52)
9	0,68 (1,08)
12	1,07 (1,45)
24	0,75 (1,29)

1)



2)



3)

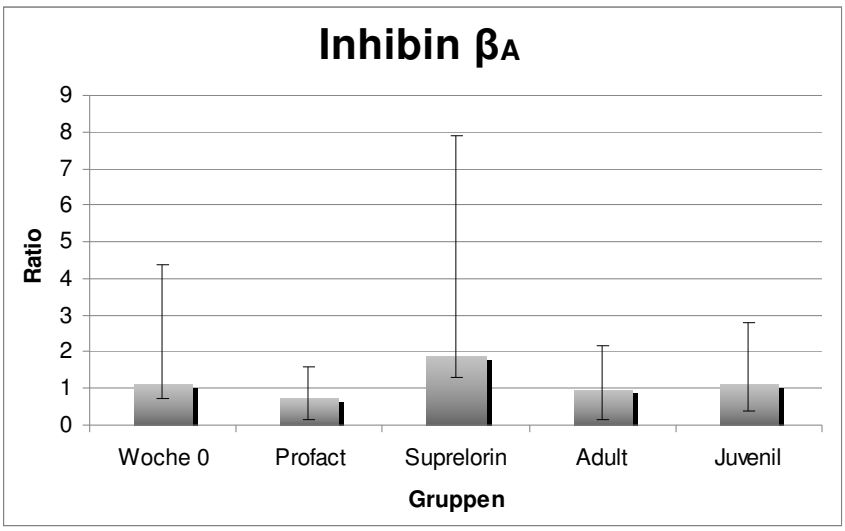


Abb. 7: Ratio der mRNA-Expression von Inhibin β_A, geometrische Gruppenmittelwerte [$\bar{x}_g$(SF)], 1) Kollektiv 1, DG A–D und Adult 2) Kollektiv 2, Wo 0–24 und Adult 3) Kollektiv 3, Woche 0, Profact, Suprelorin, Juvenil und Adult, a : b $p < 0,05$

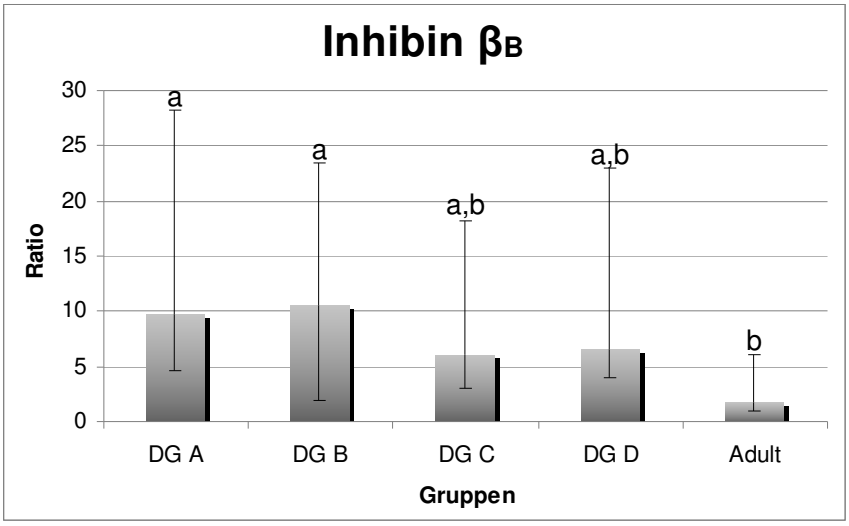
4.1.2.3 Inhibin β_B

Die Ergebnisse der qPCR für Inhibin β_B sind in der Tab. 13 zusammengefasst. Die einfaktorielle Varianzanalyse des Kollektivs 1 (DG A-D und Adult) ergab mittels ANOVA einen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,0158$). Im anschließenden Tukey-Test zeigte sich, dass die Ratio der adulten Hunde, im Vergleich zu DG A und B ($p < 0,05$) um das Fünffache geringer war (Abb. 8 (1)).
Für das Kollektiv 2 waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen (Abb. 8 (2)).
Im Kollektiv 3 konnte eine statistische Signifikanz ($p = 0,0135$) ermittelt werden. Verglichen mit den adulten Hunden zeigten die mit einem Profact®Depot-Implantat behandelten Hunde eine höhere mRNA-Expression ($p < 0,05$). Ebenfalls konnten signifikante Unterschiede zur Gruppe der Kastrationswoche 0 gezeigt werden, die im Vergleich zu der adulten Kontrollgruppe eine mindestens fünffach höhere Ratio erreichten ($p < 0,05$) (Abb. 8 (3)).

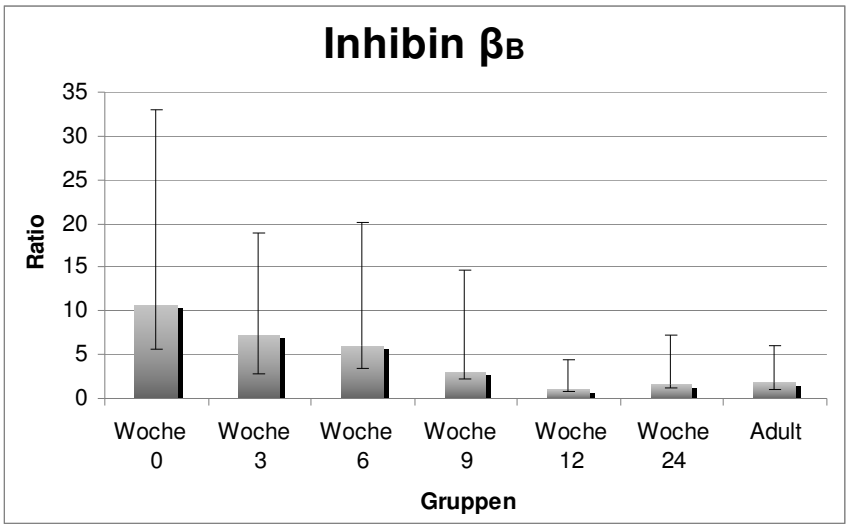
Tab. 13: Ratio der mRNA-Expression von Inhibin β_B; geometrische Gruppenmittelwerte mit Streufaktor [$\bar{x}_g$(SF)]

Gruppe/Woche	Ratio [$\bar{x}_g$(SF)]
DG A	9,79 (1,89)
DG B	10,50 (1,23)
DG C	6,01 (2,02)
DG D	6,62 (2,48)
Adult	1,83 (2,28)
Profact	14,89 (2,00)
Juvenil	6,93 (1,56)
Suprelorin	3,85 (2,25)
0	10,57 (2,13)
3	7,18 (1,64)
6	6,01 (2,34)
9	3,00 (3,90)
12	1,07 (3,18)
24	1,67 (3,33)

1)



2)



3)

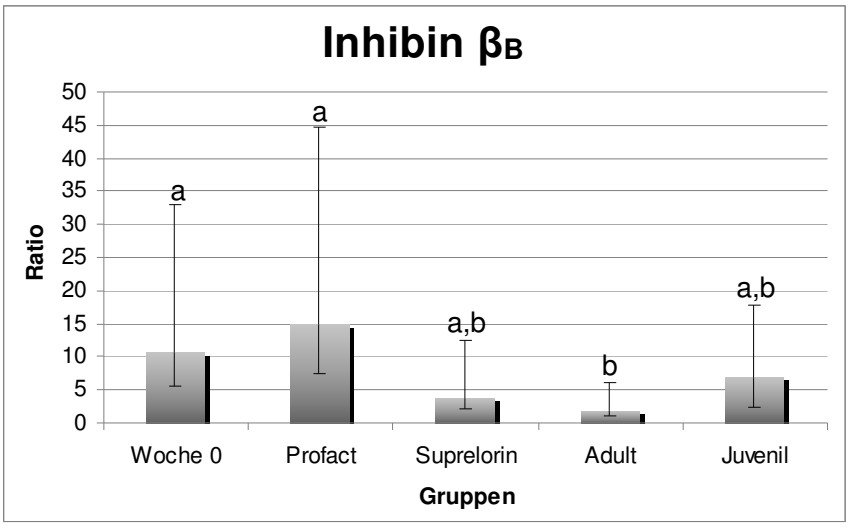


Abb. 8: Ratio der mRNA-Expression von Inhibin β_B, geometrische Gruppenmittelwerte [$\bar{x}_g$(SF)], 1) Kollektiv 1, DG A–D und Adult 2) Kollektiv 2, Wo 0-24 und Adult 3) Kollektiv 3, Woche 0, Profact, Suprelorin, Juvenil und Adult, a : b $p < 0,05$

4.2 Expression von Inhibin α, β_A und β_B auf Proteinebene

4.2.1 Western Blot

Die Spezifität der verwendeten Antikörper wurde jeweils an einer Hodengewebsprobe eines adulten Hundes mittels Western Blot-Analyse überprüft. Als Positivkontrolle diente Antikörper-abhängig entweder Hodengewebe einer adulten Maus (Inhibin α) oder humanes Hodengewebe (Inhibin $\beta_{A/B}$). Eine Negativkontrolle wurde zusätzlich bei jedem durchgeführten Western Blot zur Beurteilung unspezifischer Banden mitgeführt.

4.2.1.1 Inhibin α

Die Spezifität des in der Immunhistochemie verwendeten Inhibin α Antikörpers konnte mittels Western Blots bestätigt werden. Als Positivkontrolle diente Hodengewebe einer Maus. Wie für Inhibin α erwartet, zeigte sich eine schwache, aber spezifische Bande zwischen 26 und 34 kDa, so dass eine Übereinstimmung mit der angegebenen Größe von 32 kDa vorlag (Abb. 9).

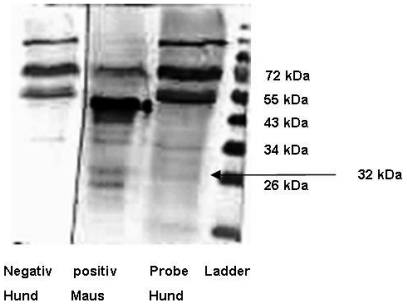


Abb. 9: Western Blot Inhibin α (Maus-anti Mensch): Spezifische Bande zwischen 26-34 kDa, Negativkontrolle Hund, Positivkontrolle Maus, Probe Hund, Ladder

4.2.1.2 Inhibin β_A

Wie Abb. 10 zeigt, konnte eine spezifische Bande im Bereich von 43 bis 55 kDa visualisiert werden, was der erwarteten Größe von 47 kDa entsprach und damit auch hier die Spezifität des verwendeten Antikörpers bestätigte.

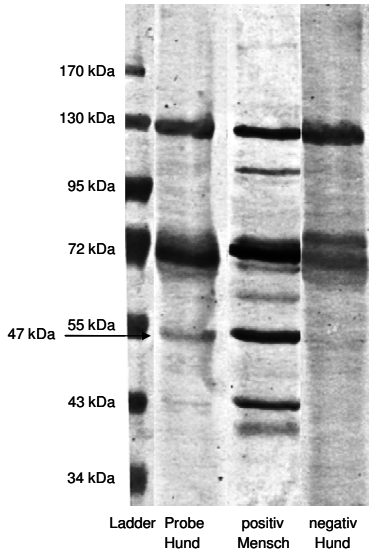


Abb. 10: Western Blot Inhibin β_A (Kaninchen-anti Mensch): Spezifische Bande zwischen 43 und 55 kDa, Ladder, Probe Hund, Positivkontrolle Mensch, Negativkontrolle Hund

4.2.1.3 Inhibin β_B

Auch für Inhibin β_B war nach Durchführung der Western Blot-Analyse eine spezifische Bande zwischen 43 und 55 kDa sichtbar und bestätigte somit die Spezifität des Antikörpers bei einer angegebenen Größe von 45 kDa (Abb. 11).

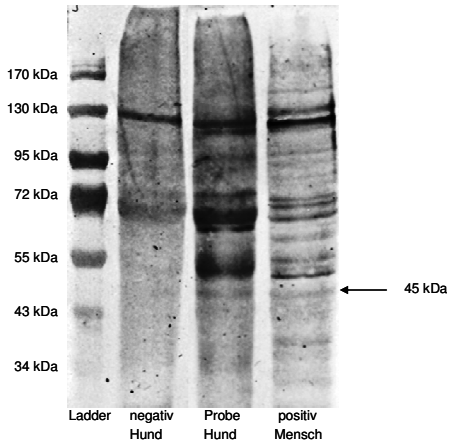


Abb. 11: Western Blot Inhibin β_B (Kaninchen-anti Mensch): Spezifische Bande bei 45 kDa, Ladder, Negativkontrolle Hund, Probe Hund, Positivkontrolle Mensch

4.2.2 Ergebnisse der Immunhistochemie

4.2.2.1 Inhibin α

Beim Nachweis der Inhibin α-Untereinheit konnte ein positives Signal im Zytoplasma der Sertoli- und Leydig-Zellen beobachtet werden. Das Zytoplasma der Leydig-Zellen zeigte ein relativ homogenes Färbeverhalten. In den einzelnen Gruppen zeigte das Zytoplasma der Sertoli-Zellen teilweise unterschiedlich starke immunopositive Signale. Bei der Untersuchung von DG A bzw. Wo 0 waren die Sertoli-Zellen leicht gefärbt. Innerhalb der Gruppe DG A fiel Elias auf, da bei ihm kein Signal zu erkennen war. In beiden Einteilungen (DG A und Wo 0) war im Gegensatz zu Elias bei Luca ein besonders intensives Signal sichtbar. Ähnliche Beobachtungen konnten in der Profact-Kontrollgruppe gemacht werden, wobei auch hier ein Hund (Floh) mit einer intensiveren Signalausprägung auffiel. Die Suprelorin-Gruppe zeigte insgesamt eine mittelstarke, homogene Farbintensität. Besonders deutliche immunopositive Signale waren in den Sertoli-Zellen der Gruppen Juvenil und in DG B/Wo 3 zu verzeichnen. Im fortgeschrittenen Verlauf der Rekrudeszenz konnte in den Gruppen DG C und D sowie in den Wo 6-24 ein leichtes Signal detektiert werden. Auffällig waren die Hunde Mortimer (DG C/Wo 9) und Shy (DG D/Wo 12) bei denen im Gegensatz zu den anderen Hunden kein Signal zu verzeichnen war. Die Kontrollgruppe mit den adulten Hunden zeigte relativ einheitlich nur wenig Signal (Abb. 13-22). Die mit einer Isotypenkontrolle behandelten Negativkontrollen wiesen erwartungsgemäß keine Färbung auf.

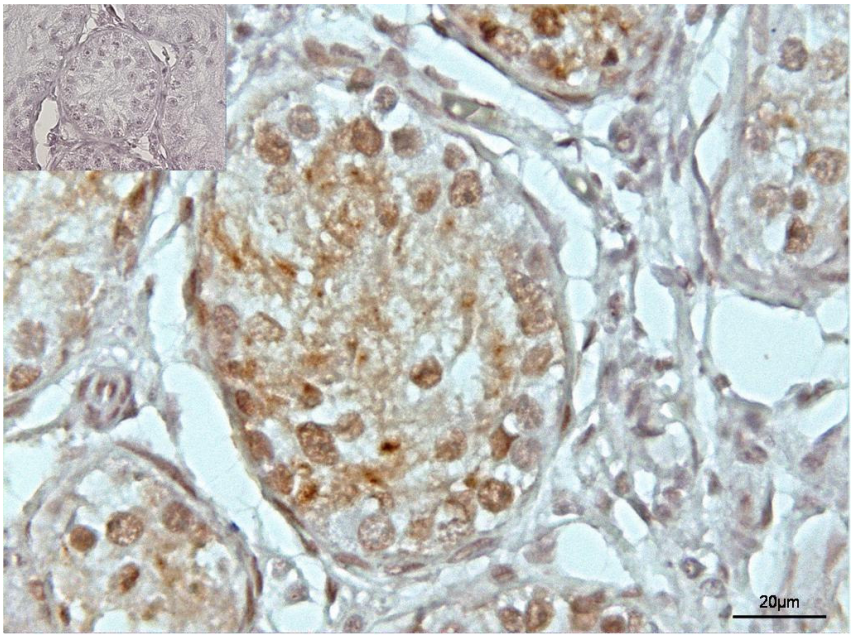


Abb. 12: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin α-Proteins, Woche 0/DG A

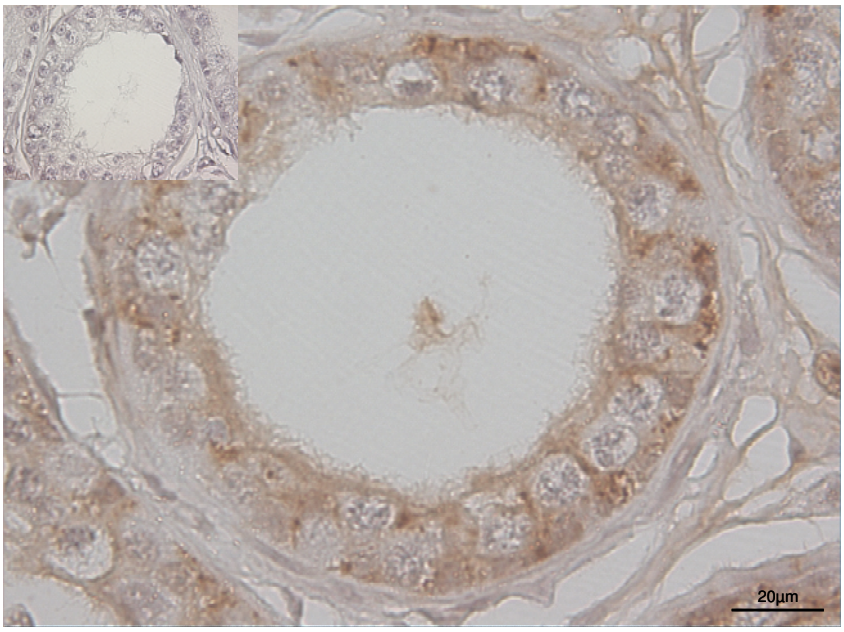


Abb. 13: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin α-Proteins, Woche 3/DG B

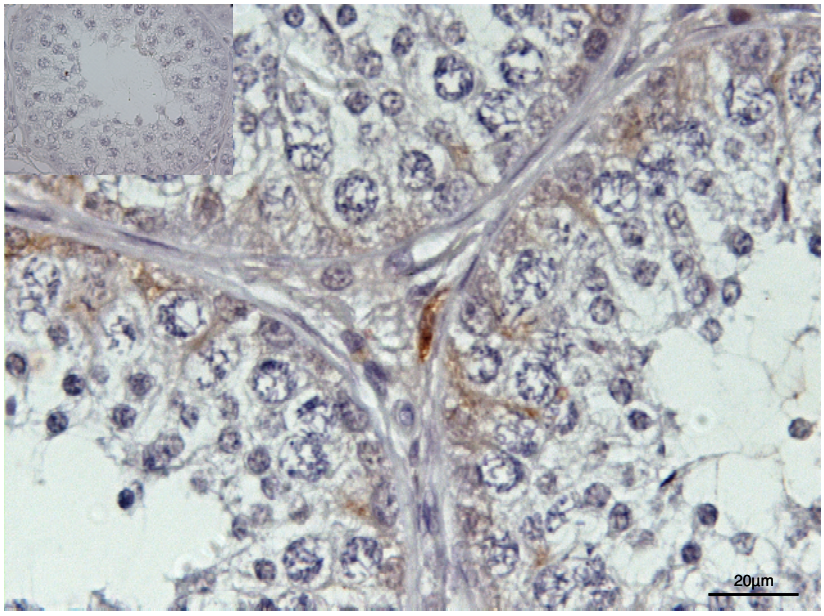


Abb. 14: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin α-Proteins, Woche 6/DG C

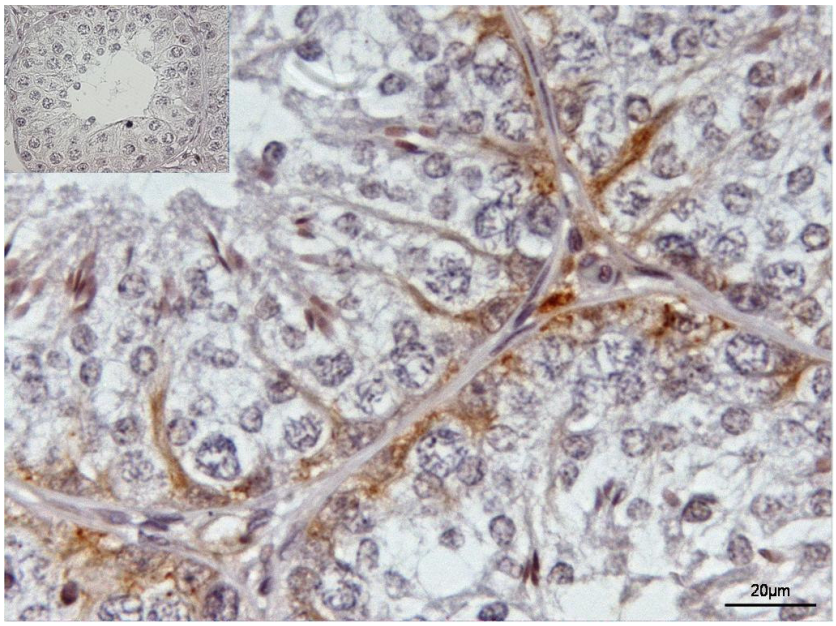


Abb. 15: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin α-Proteins, Woche 9/DG D

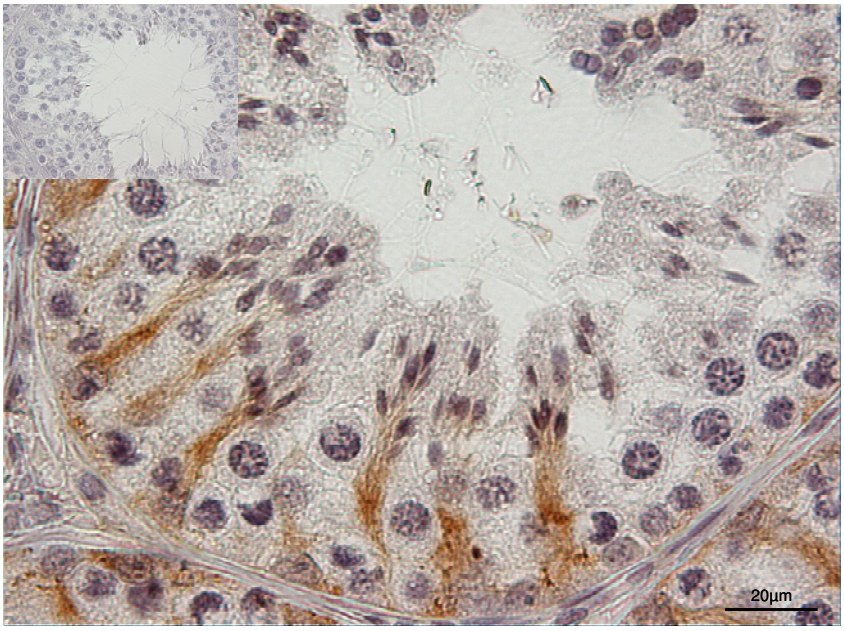


Abb. 16: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin α-Proteins, Woche 12

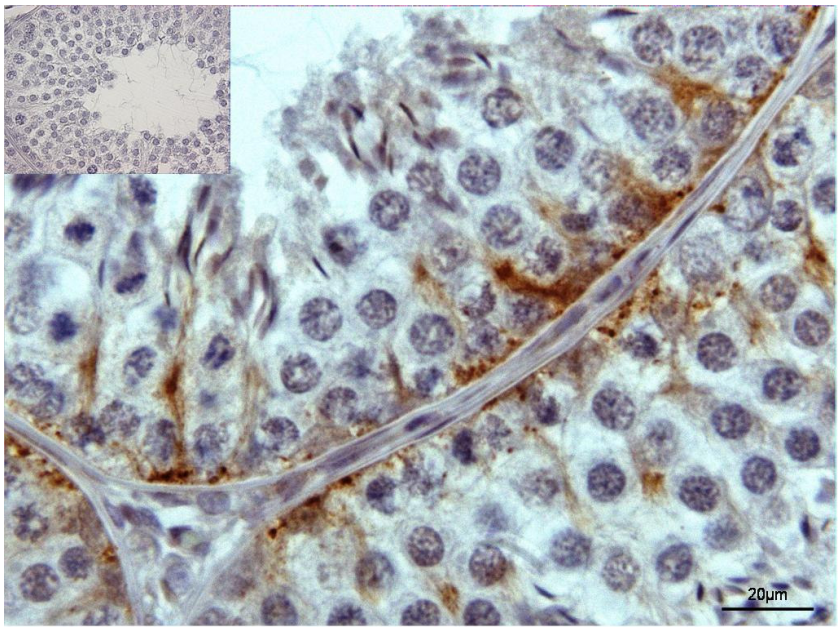


Abb. 17: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin α-Proteins, Woche 24

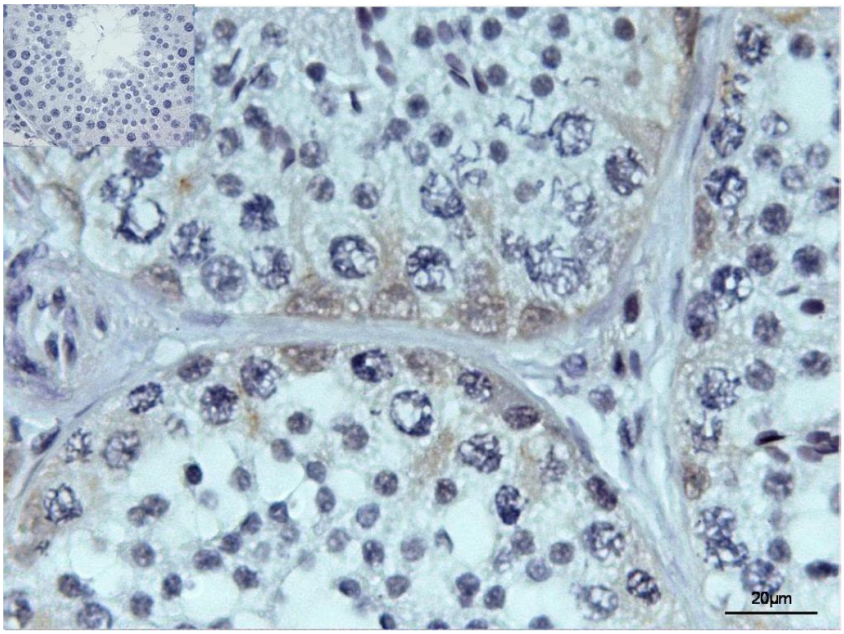


Abb. 18: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin α-Proteins, CG

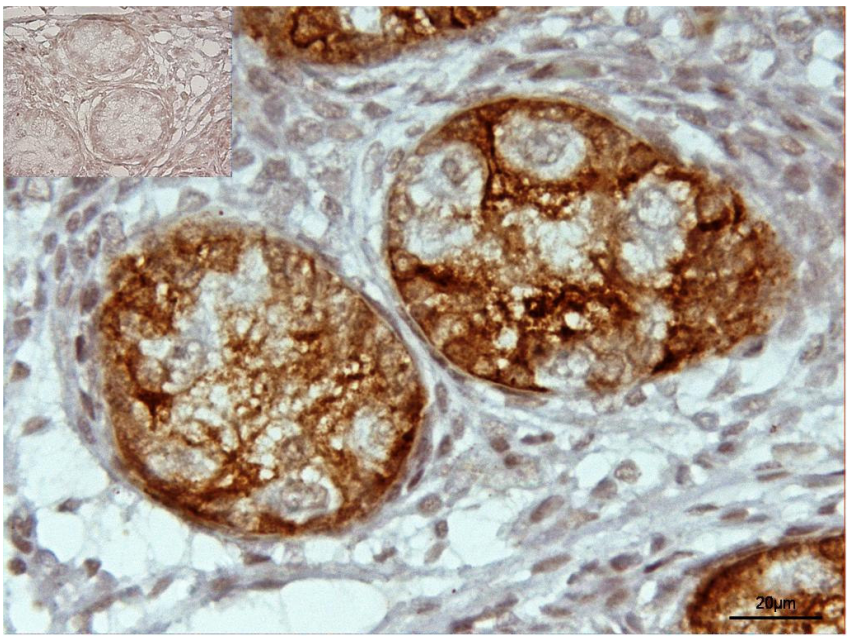


Abb. 19: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin α-Proteins, JG

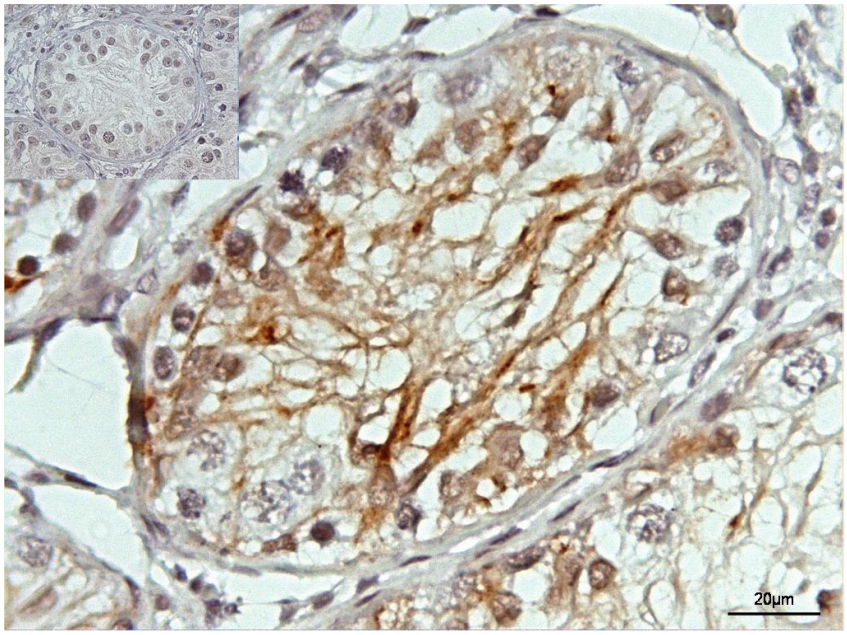


Abb. 20: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin α-Proteins, PG

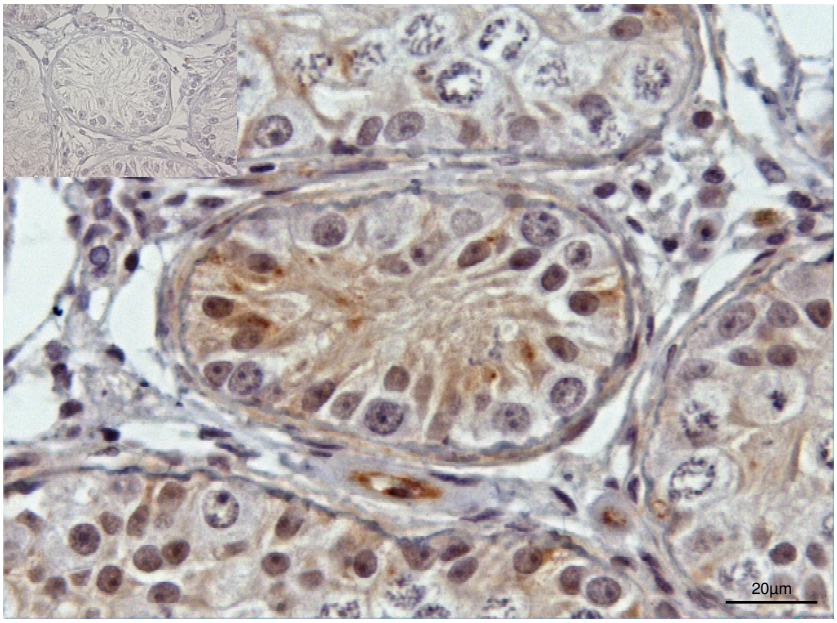


Abb. 21: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin α-Proteins, SG

In der statistischen Auswertung mittels Kruskal-Wallis-Test zeigten die Sertoli-Zellen der Kollektive 1 und 2 keine Signifikanzen der Signalstärke während im Gruppenvergleich innerhalb des Kollektivs 3 signifikante Unterschiede bzgl. der Signalstärke des Zytoplasmas der Sertoli-Zellen festgestellt wurden ($p = 0{,}0158$). Hierbei war das Signal im Kollektiv 3 in der adulten Kontrollgruppe signifikant schwächer ausgeprägt als bei den juvenilen Hunden (Dunn-Test, korrigiert

p = 0,0361).
Bei Betrachtung der Färbeintensität des Interstitiums zeigten sich im Kruskal-Wallis-Test im Gruppenvergleich des Kollektivs 1 (DG A-D, Adult) signifikante Unterschiede (p = 0,0040), wobei DG A im Vergleich zu DG C (Dunn-Test, korrigiert p = 0,0413) nur ein Fünftel der Farbintensität zeigte.
Im Gruppen-Wochen Vergleich (Kollektiv 2) konnte für die zuvor genannten Zellen lediglich im Kruskal-Wallis-Test eine statistisch relevante Signifikanz nachgewiesen werden (p = 0,0114), die jedoch nicht näher spezifiziert werden konnte.
Im Kollektiv 3 (p = 0,0002) war in der Profact-Gruppe eine signifikant geringere Interstitiumsfärbung als in der juvenilen Gruppe nachweisbar (Dunn-Test, korrigiert p = 0,0351).

Die vergleichende Auswertung der Sertoli-Zellen in den unterschiedlichen Stages ergab mittels Kruskal-Wallis eine Signifikanz von $p < 0,0001$. Signifikante Unterschiede konnten zwischen Stage I-IV (Gruppe 1) mit dem geringsten Färbeverhalten und Stage V (Gruppe 2) mit den stärksten Farbsignalen dargestellt werden (Dunn-Test, korrigiert $p < 0,0001$). Selbiges Ergebnis ergab die Gegenüberstellung von Stage I-IV (Gruppe 1) versus Stage VI-VIII (Gruppe 3).

4.2.2.2 Inhibin β_A

Bei Verwendung des Primärantikörpers gegen Inhibin β_A war in der Immunhistochemie bei allen Hunden ein einheitliches Signal mit ähnlicher Färbeintensität in den peritubulären Zellen zu beobachten. Die Gruppe der juvenilen Hunde zeigte eine deutliche immunopositive Farbreaktion in den Gonozyten. Des Weiteren konnten bei allen Hunden im Interstitium geringe Farbsignale verzeichnet werden. Eine meistens schwächere Farbintensität der Spermatogonien konnte in den Gruppen DG A, B, C sowie Wo 0-9 und Profact erkannt werden, wobei im Verlauf der fortschreitenden Rekrudeszenz sowohl die Intensität der Farbsignale als auch die Anzahl der gefärbten Spermatogonien abnahm, so dass ab Gruppe DG D/Wo 12 keine Farbsignale in diesen Zellen sichtbar waren. Die Suprelorin-Gruppe zeigte ebenfalls keine Signale in den Spermatogonien. Anders als in der Profact-Gruppe waren wenige Sertoli-Zellen in den Gruppen DG A/Wo 0, DG B/Wo 3 und Suprelorin leicht gefärbt. Im Gegensatz zu den Spermatogonien konnte für die Sertoli-Zellen mit

fortschreitender Rekrudeszenz der Spermatogenese eine ansteigende Signalintensität beobachtet werden, so dass die fortgeschrittenen Entwicklungsstadien (DG C und D, Wo 6-24) sowie die Kontrollgruppe Adult stärkere Signale aufwiesen. Ebenso zeigten die juvenilen Hunde ausgeprägte Signale im Zytoplasma der Sertoli-Zellen.

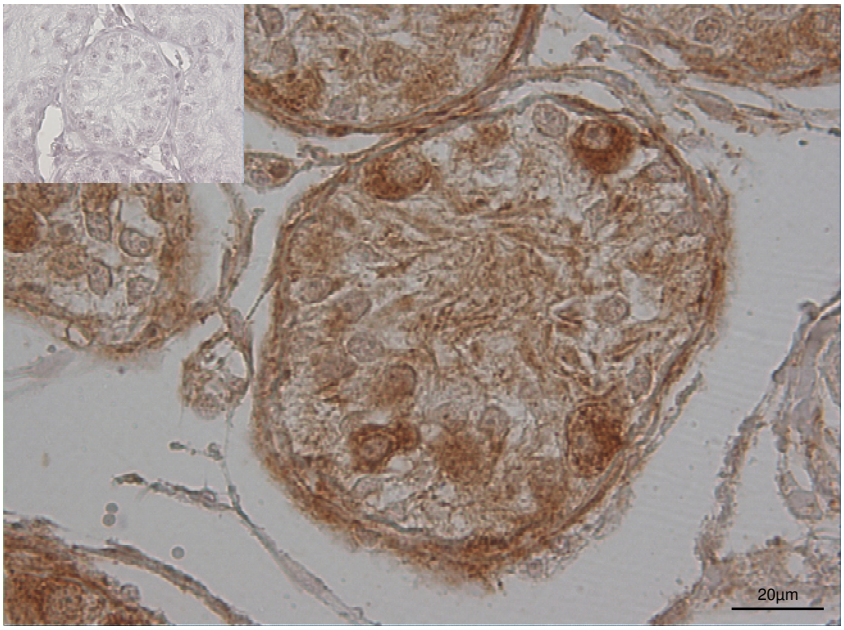


Abb. 22: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_A-Proteins, Woche 0/DG A

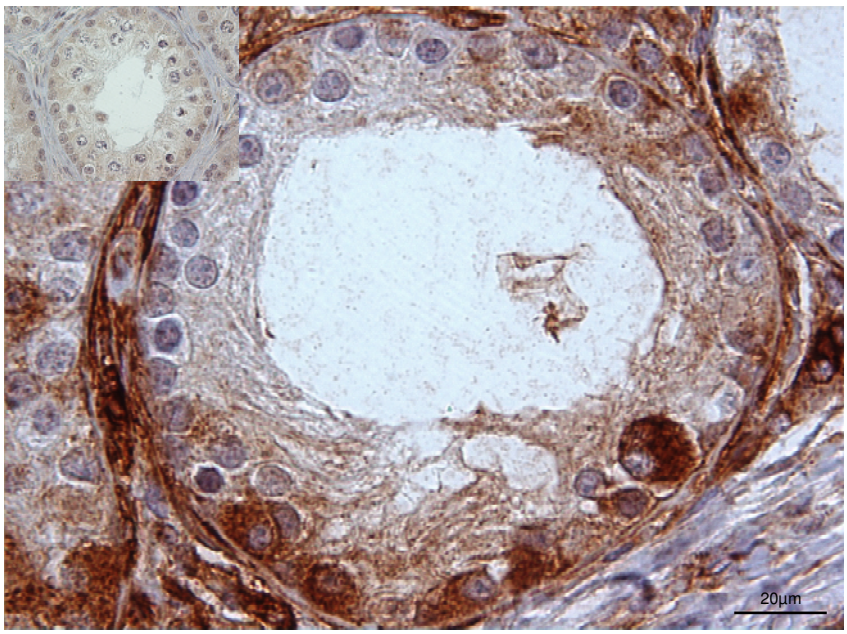


Abb. 23: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_A-Proteins, Woche 3/DG B

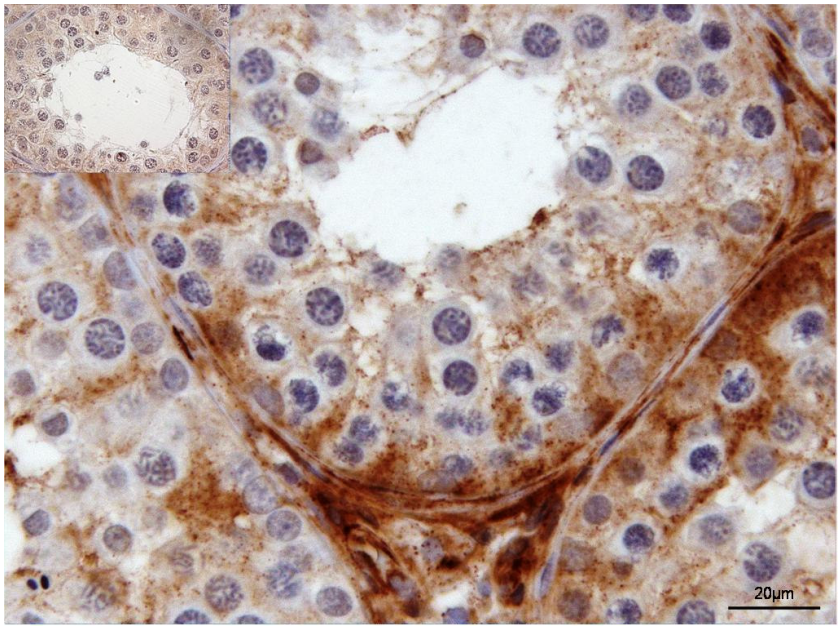


Abb. 24: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_A-Proteins, Woche 6/DG C

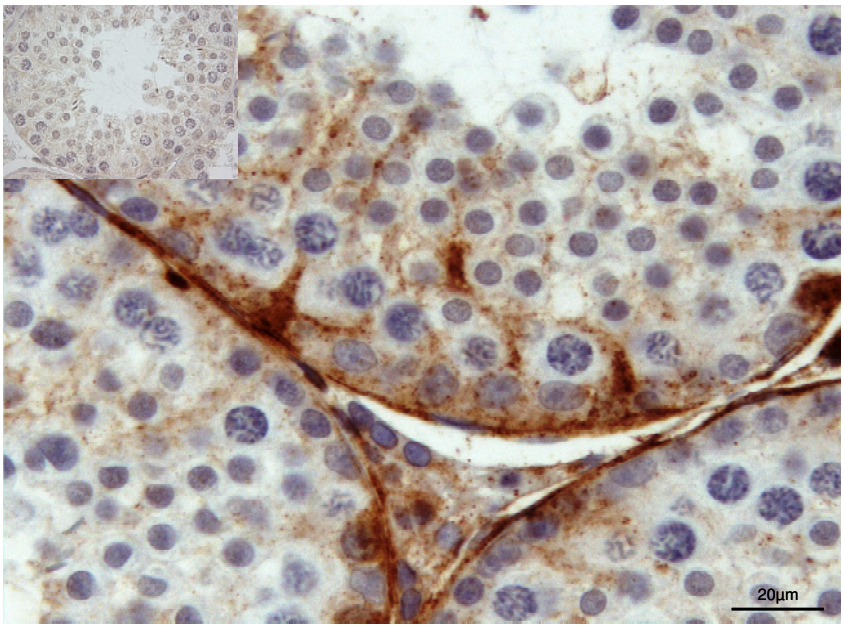


Abb. 25: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_A-Proteins, Woche 9/DG D

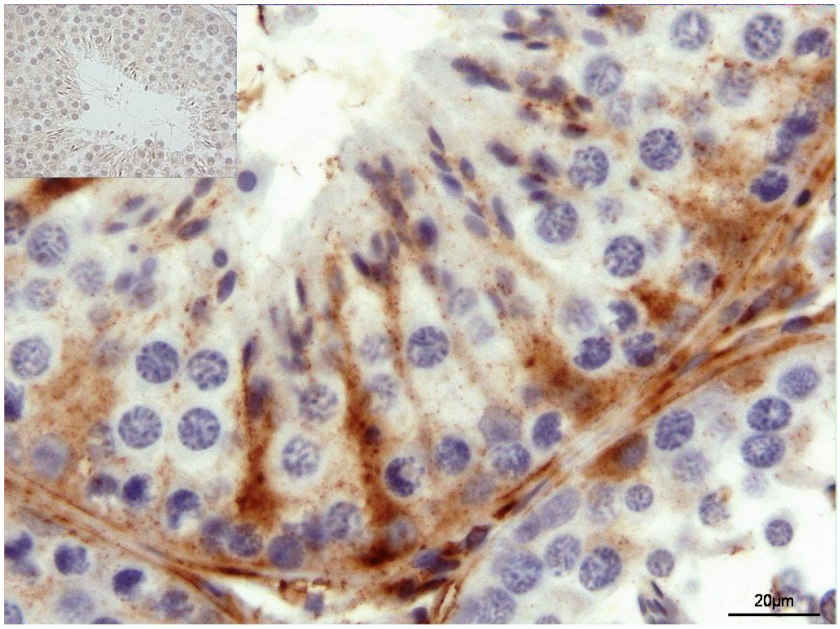


Abb. 26: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_A-Proteins, Woche 12

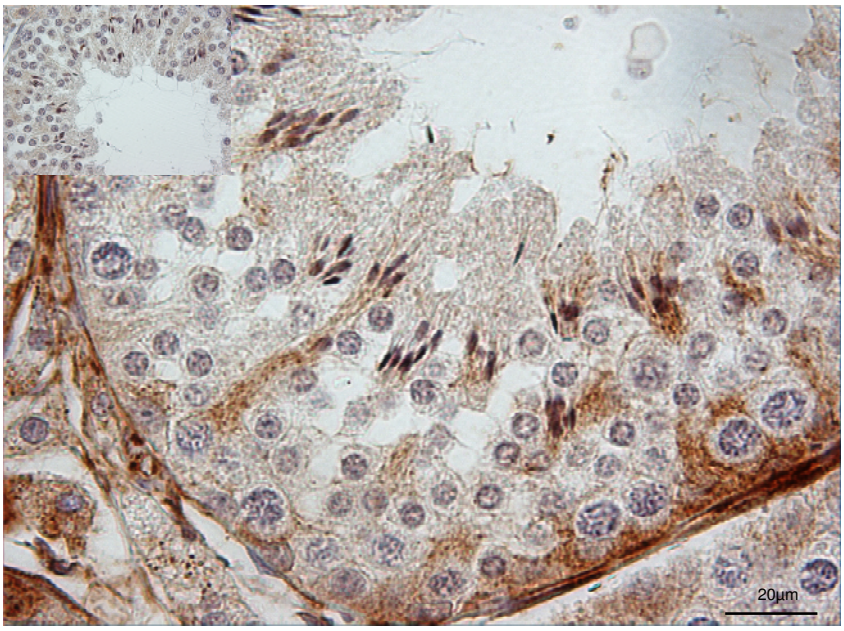


Abb. 27: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_A-Proteins, Woche 24

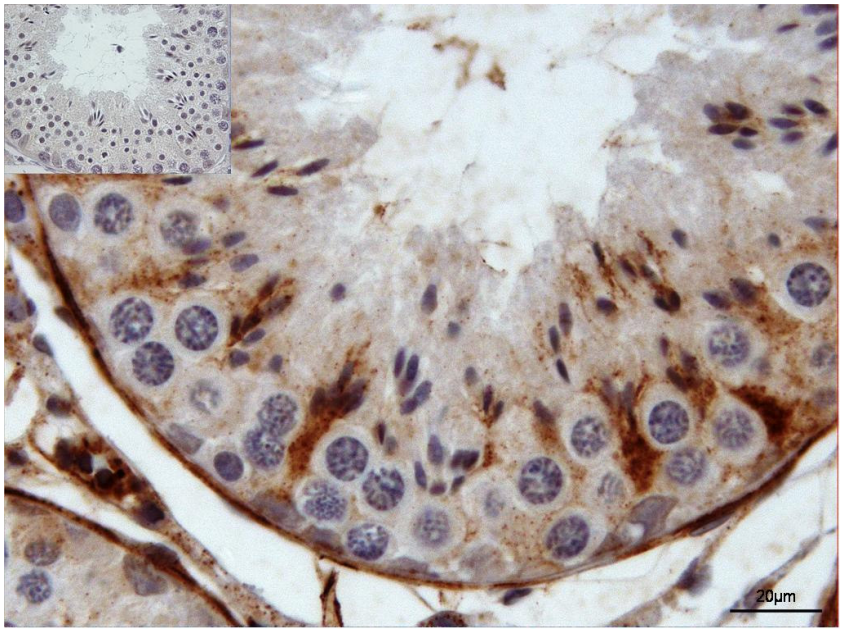


Abb. 28: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_A-Proteins, CG

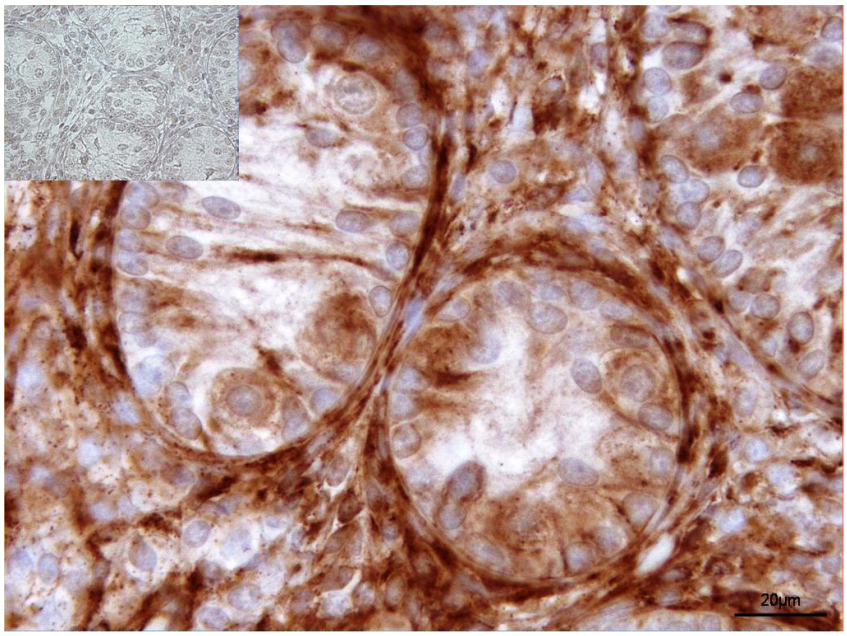


Abb. 29: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_A-Proteins, JG

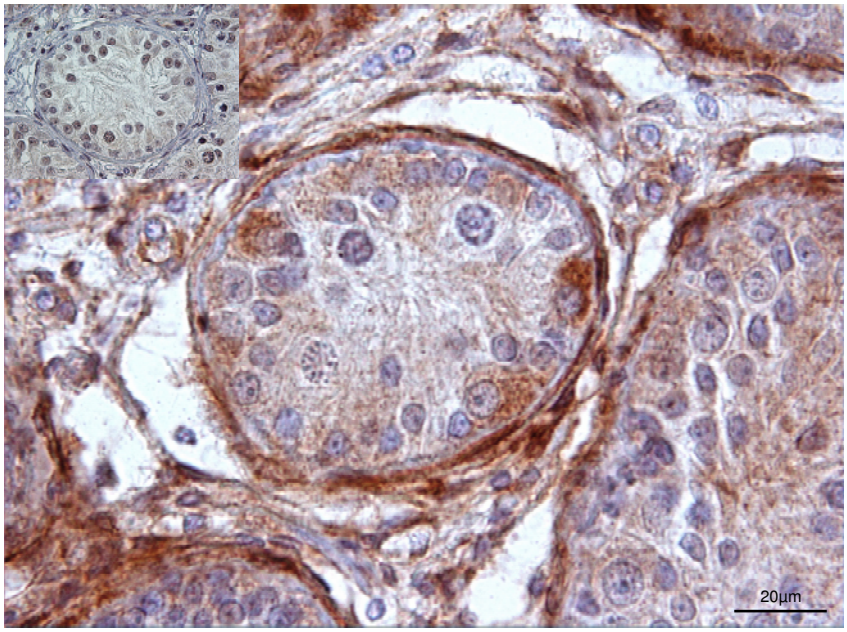


Abb. 30: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_A-Proteins, PG

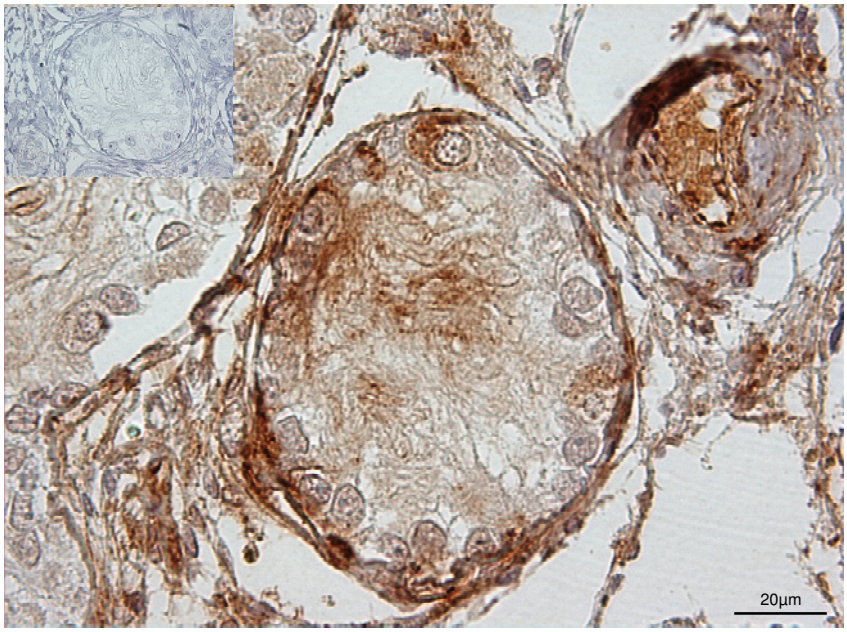


Abb. 31: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_A-Proteins, SG

Im statistischen Gruppen- und Gruppen-Wochen Vergleich konnte in Bezug auf die Signalausprägung für Inhibin-β_A für die Spermatogonien kein signifikanter Unterschied ermittelt werden.

Bezogen auf die Sertoli-Zellen ergab der Gruppenvergleich (DG A-D, Adult) mittels ANOVA ($p = 0{,}0002$) statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen

DG A und DG C bzw. DG D ($p < 0,01$) wobei DG A im Durchschnitt die geringste Intensität aufwies, während sie in allen anderen Gruppen deutlich ausgeprägter war. Weitere signifikante Unterschiede zeigten sich im Vergleich von DG A mit der adulten Kontrollgruppe ($p < 0,05$), die mehr als sechsfach intensiver gefärbt war, sowie in der Gegenüberstellung von DG B mit der zweitniedrigsten Farbintensität und DG C bzw. DG D ($p < 0,05$), die die höchste Signalausprägung aufwiesen.

Der Gruppen-Wochen Vergleich (Kollektiv 2, Kruskal-Wallis $p = 0,0139$) der Sertoli-Zellen zeigte statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Kastrationswochen 0 und 6 (Dunn-Test, korrigiert $p = 0,0086$). Während die Woche 0 die geringste Farbintensität aufwies, zeigte die Woche 6 die mindestens 12fach höhere und damit intensivste Färbung.
Im Kruskal-Wallis-Test des Kollektivs 3 ($p < 0,0001$) ergaben sich Unterschiede im Gruppen-Wochen Vergleich zwischen Kastrationswoche 0 und den juvenilen Hunden (Dunn-Test, korrigiert $p = 0,0417$) sowie zusätzlich zwischen den Gruppen Profact und Juvenil (Dunn-Test, korrigiert $p = 0,0207$). Die Hunde der Kastrationswoche 0 und der Profact-Gruppe zeigten gegenüber den Juvenilen nur ein Zwöftel der Signalintensität.
Im selben Kollektiv zeigte die Kastrationswoche 0 eine signifikant (Kruskal-Wallis-Test $p < 0,0001$) höhere Farbintensität bezüglich des Interstitiums als die adulte Kontrollgruppe (Dunn-Test, korrigiert $p = 0,0385$).
Für die interstitiellen Zellen konnten in den Kollektiven 1 und 2 keine signifikanten Unterschiede erfasst werden.

Die peritubulären Zellen des Kollektivs 1 ($p = 0,0191$) zeigten im Vergleich der Gruppen Adult zu DG A bzw. DG B signifikante Unterschiede ($p < 0,05$), wobei die Gruppe der adulten Kontrollhunde die geringste Farbintensität aufwies.
Aus Kollektiv 2 ($p = 0,003$) wurde mittels ANOVA und im anschließenden Tukey-Test gezeigt, dass signifikante Abweichungen zwischen den Kastrationswochen 0 bzw. 3 mit den intensivsten Signalen und der Woche 12 ($p < 0,01$), bei der die Signalstärke weniger als die Hälfte erreicht, bestehen.
Im Vergleich des Kollektivs 3 zeigten sich nahezu zwischen allen Gruppen signifikante Unterschiede. So ergab sich eine Signifikanz von $p = 0,0002$. Mittels Tukey-Test zeigte sich eine Differenz zwischen der Kastrationswoche 0, mit einer

deutlichen Signalausprägung, und den adulten, schwach gefärbten Kontrollhunden ($p < 0,05$). Die Gruppenvergleiche Woche 0 und Suprelorin, Profact und Adult bzw. Suprelorin, Juvenil und Adult bzw. Suprelorin zeigten sich ebenfalls signifikant ($p < 0,01$). Zusammenfassend erreichten Kastrationswoche 0, Profact und Juvenil im Vergleich zu Adult und Suprelorin fast die doppelte Farbintensität der peritubulären Zellen.

Der Stages-Vergleich zeigte für die Sertoli-Zellen keine signifikanten Unterschiede, während im Kruskal-Wallis-Test für die peritubulären Zellen eine Signifikanz von $p = 0,0018$ errechnet werden kann. Zur weiteren Differenzierung wurde der Dunn-Test durchgeführt. Dieser zeigte zwischen Stage I-IV (Gruppe 1) mit der niedrigsten und Stage VI-VIII (Gruppe 3) mit der höchsten Farbintensität einen signifikanten Unterschied (Dunn-Test, korrigiert $p = 0,0036$).

4.2.2.3 Inhibin β_B

Das Färbeverhalten von Inhibin β_B zeigte sich sowohl in den Gruppen DG A-D als auch in den Kastrationswochen 0-24 sehr einheitlich, so dass bei allen Hunden die Spermatogonien deutliche Signale aufwiesen. Mit fortschreitender Keimzell-entwicklung konnte ein stetig abnehmendes Färbeverhalten beobachtet werden, jedoch waren alle vorhandenen Keimzellen in ihrer jeweiligen Entwicklungsstufe (Spermatozyten, runde Spermatiden, elongierende Spermatiden) sehr homogen gefärbt. Im Hodengewebe der juvenilen Hunde zeigte sich lediglich eine Zellfärbung der Gonozyten. Die Negativkontrollen zeigten keine imunopositiven Signale.

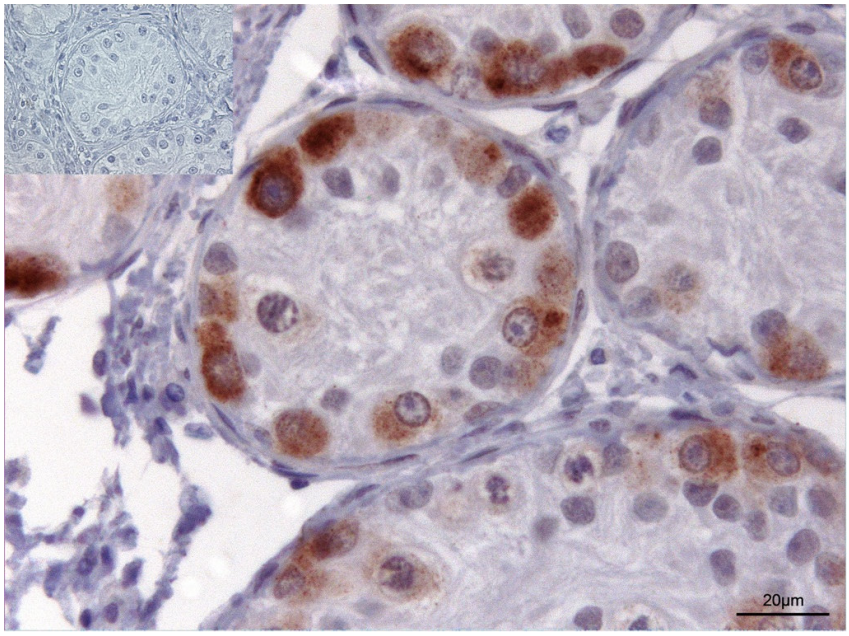


Abb. 32: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_B-Proteins, Woche 0/DG A

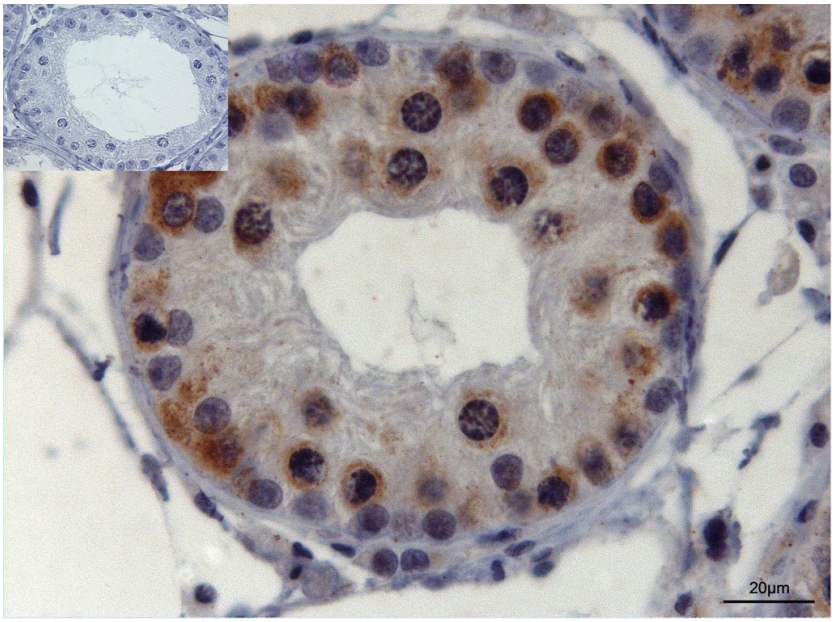


Abb. 33: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_B-Proteins, Woche 3/DG B

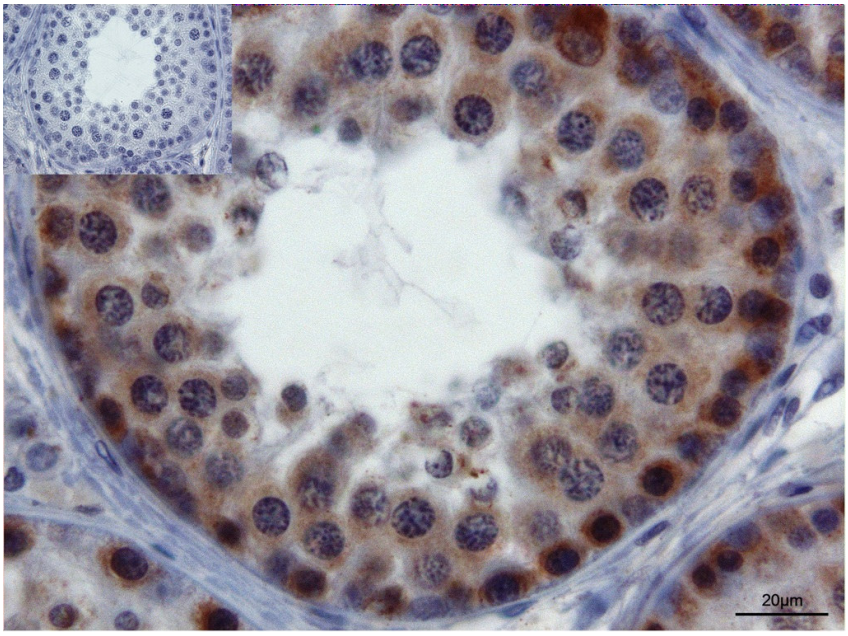


Abb. 34: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_B-Proteins, Woche 6/DG C

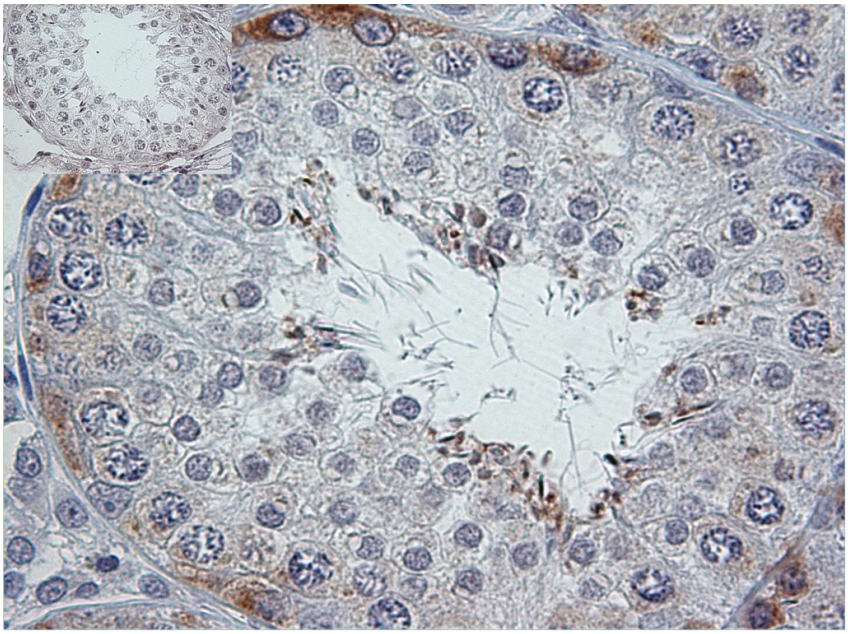


Abb. 35: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_B-Proteins, Woche 9/DG D

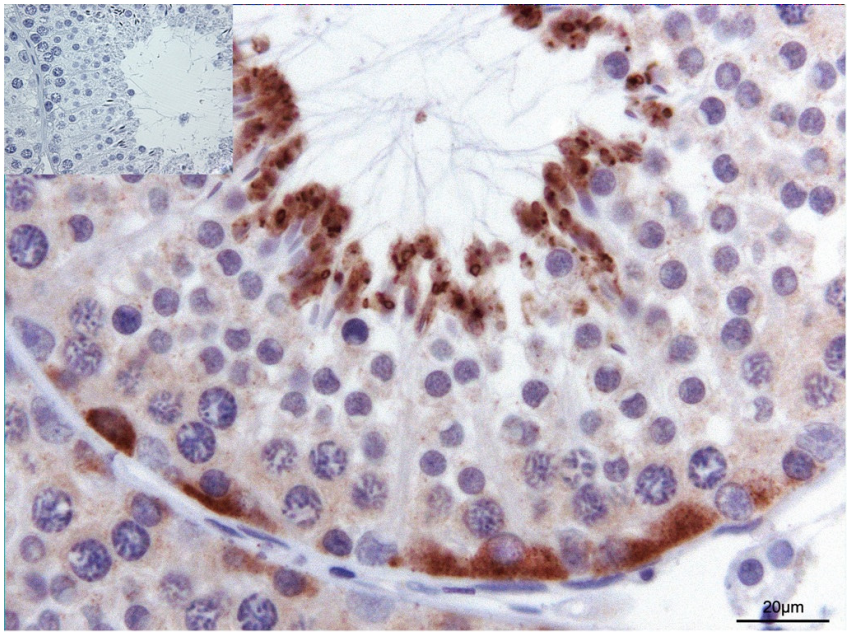


Abb. 36: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_B-Proteins, Woche 12

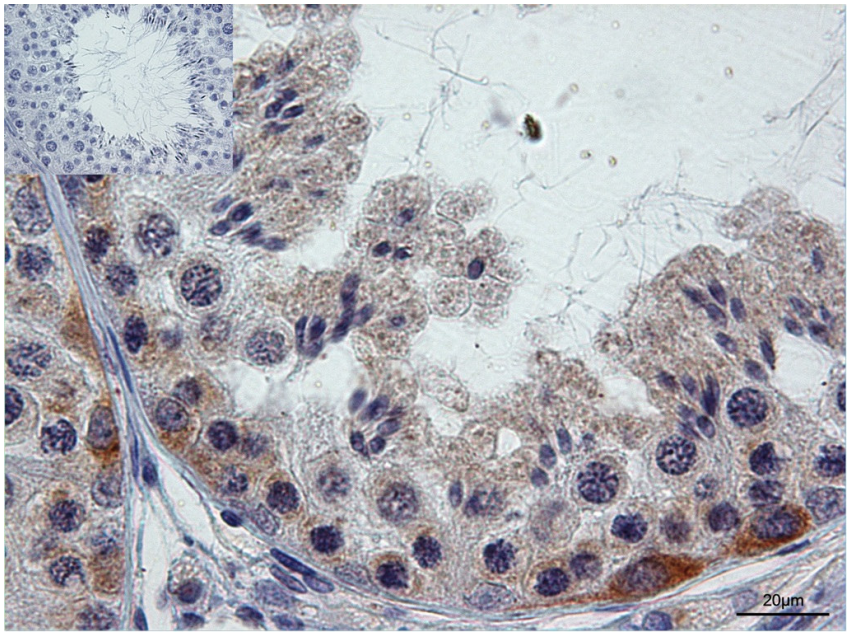


Abb. 37: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_B-Proteins, Woche 24

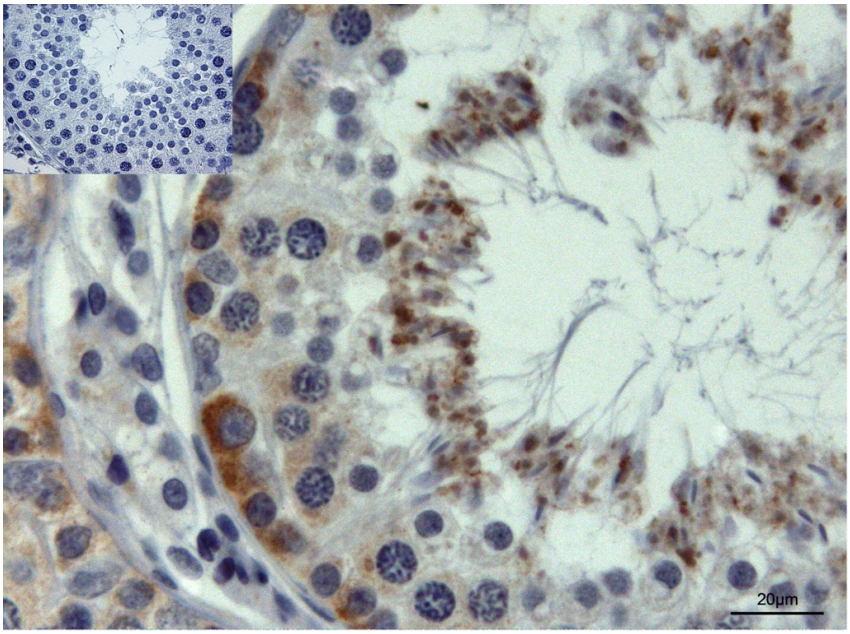


Abb. 38: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_B-Proteins, CG

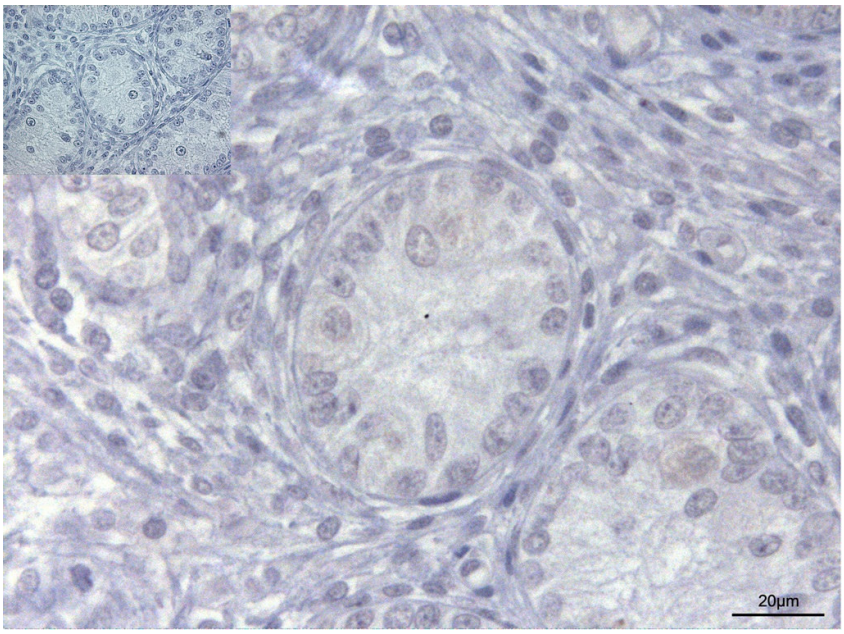


Abb. 39: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_B-Proteins, JG

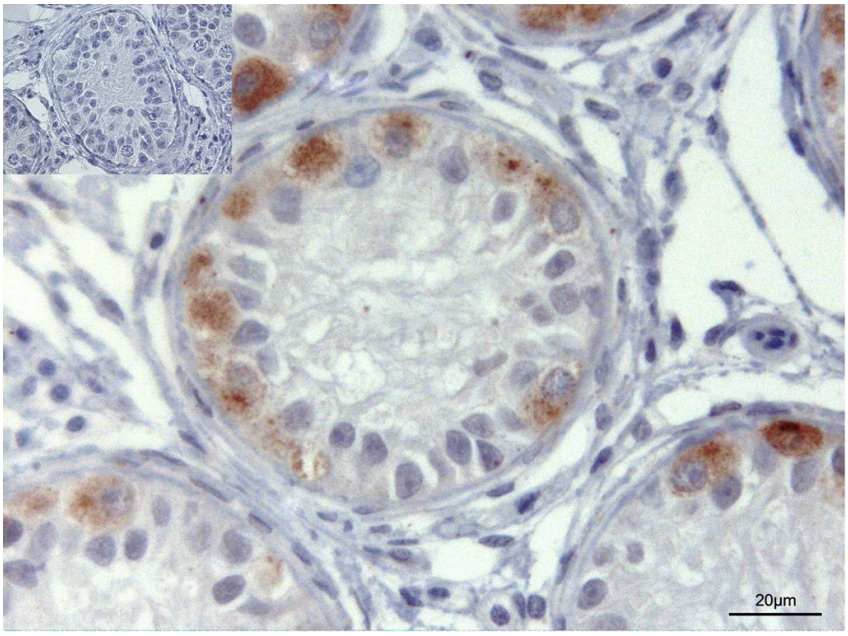


Abb. 40: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_B-Proteins, PG

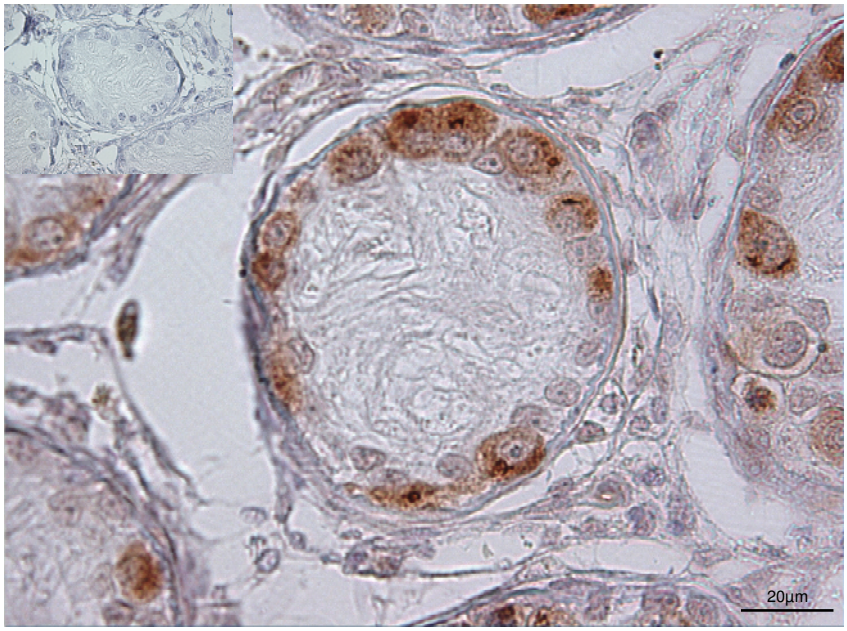


Abb. 41: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibin β_B-Proteins, SG

Im Kollektiv 1 waren signifikante Unterschiede in der Menge der gefärbten Spermatogonien erkennbar ($p = 0{,}0003$). Besonders auffällig war der Vergleich der Gruppen DG C und DG D sowie DG C und Adult ($p < 0{,}01$). Die meisten gefärbten Spermatogonien waren in der Gruppe DG C zu finden. Die Gruppen Adult und DG B zeigten im Tukey-Test nur geringe, aber signifikante Unterschiede ($p < 0{,}05$), wobei die adulten Hunde weniger gefärbte Zellen aufwiesen.

Die Anzahl der gefärbten Spermatogonien im Gruppen-Wochen Vergleich (Kollektiv 2) zeigte ebenso signifikante Unterschiede ($p = 0,0003$). Die Hunde aus der Kastrationswoche 6 zeigten die meisten gefärbten Spermatogonien, während die Wochen 12, 24 und die adulte Kontrollgruppe die wenigsten aufwiesen. Daraus ergaben sich statistische Signifikanzen zwischen Kastrationswochen 6 und 12, 6 und 24 ($p < 0,01$) sowie 3 und 24 ($p < 0,05$). Die Gruppen-Wochen Vergleiche 6 und Adult ($p < 0,01$) und 3 und Adult ($p < 0,05$) war ebenfalls signifikant.

Für das Kollektiv 3 waren bzgl. der Menge der gefärbten Spermatogonien keine statistisch relevanten Signifikanzen erkennbar.

Die Farbintensität der Spermatogonien zeigte für Kollektiv 1 und 2 keine signifikanten Unterschiede. Im Gegensatz dazu konnte diesbezüglich für das Kollektiv 3 mittels ANOVA eine Signifikanz ($p = 0,0320$) ermittelt werden, jedoch war im weiterführenden Tukey-Test keine genauere Spezifizierung zu ermitteln.

Bei Betrachtung des prozentualen Anteils der gefärbten Spermatozyten waren sowohl im Kollektiv 1 als auch im Kollektiv 2 keine signifikanten Unterschiede sichtbar. Im Kollektiv 3 zeigten sich in der einfaktoriellen Varianzanalyse ANOVA signifikante Unterschiede der prozentual gefärbten Spermatozyten ($p = 0,0005$). Verglichen mit der Woche 0, Profact und Adult zeigten die mittels Suprelorin®-Implantat behandelten Hunde ($p < 0,001$) prozentual die geringste Anzahl an gefärbten Spermatozyten im Tubulus.

Ebenso konnten für die Signalintensität der Spermatozyten in den Kollektiven 1 und 2 keine statistischen Signifikanzen festgestellt werden. Das Kollektiv 3 wies für selbige Zellen signifikante Unterschiede ($p = 0,0129$) auf. Bei weiterer Differenzierung war die Signalintensität der mit einem Profact®Depot-Implantat versehenen Hunde 2,4fach höher als die der Suprelorin-Gruppe ($p < 0,05$).

Die runden Spermatiden zeigten in keinem Kollektiv signifikante Unterschiede.

In der statistischen Auswertung der Farbintensität der elongierenden Spermatiden konnte ausschließlich im Kollektiv 1 mittels Kruskal-Wallis eine Signifikanz von $p = 0,003$ ermittelt werden, wobei DG C eine intensivere Signalausprägung aufwies als die Hunde der adulten Kontrollgruppe (Dunn-Test, korrigiert $p = 0,0112$).

Im Vergleich der Signalstärke der Spermatogonien in Abhängigkeit zu den Stages I-VIII lagen signifikante Unterschiede (Kruskal-Wallis-Test $p < 0,0001$) vor. Bei exakter Differenzierung variierten die Werte besonders deutlich zwischen den Stages I-IV (Gruppe 1) versus Stage V (Gruppe 2) (Dunn-Test, korrigiert $p = 0,0009$) und Stage I-IV (Gruppe 1) versus Stage VI-VIII (Gruppe 3) (Dunn-Test, korrigiert $p = 0,0113$).

Die Spermatozyten zeigten lediglich im Gesamtvergleich mittels Kruskal-Wallis-Test signifikante Unterschiede ($p = 0,0491$), die in den weiteren Berechnungen nicht näher differenziert werden konnten. Die runden Spermatiden waren nicht signifikant unterschiedlich gefärbt.

Anders stellte es sich im Kruskal-Wallis-Test bei den elongierenden Spermatiden ($p < 0,0001$) dar, bei denen große Differenzen zwischen Stage I-IV (Gruppe 1) versus Stage VI-VIII (Gruppe 3) (Dunn-Test, korrigiert $p = 0,0000$) zu verzeichnen waren, wobei Stage I-IV (Gruppe 1) mehr als doppelt so hohe Werte erreichte. Signifikante Differenzen ergaben sich ebenfalls zwischen Stage V (Gruppe 2) versus Stage VI-VIII (Gruppe 3) (Dunn-Test, korrigiert $p = 0,0140$). Im Stagevergleich wies Stage V die geringste Farbintensität auf.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methodik

5.1.1 Versuchsaufbau

Der Einsatz von GnRH-Implantaten zur Downregulation der germinativen und endokrinen Hodenfunktion des Rüden wurde in den letzten Jahrzehnten durch verschiedene Arbeitsgruppen ausreichend beschrieben (Goericke-Pesch et al. 2009; Inaba et al. 1996; Junaidi et al. 2007; Ludwig et al. 2009; Riesenbeck et al. 2002; Vickery et al. 1984). Über die Regulation der Synthese von Inhibin und Aktivin - als positive und negative Regulationsmechanismen - während der Rekrudeszenz der Spermatogenese liegen bislang keine Untersuchungen vor.

Das in dieser Studie verwendete Hodenmaterial stammt aus einer vorherigen Studie (Goericke-Pesch et al. 2009), bei der Beaglerüden über fünf Monate mit einem 18,5 mg Azagly-Nafarelin-Implantat (Gonazon®) behandelt wurden. Nach fünf Monaten wurde das Implantat entfernt und es wurden je 3-4 Rüden im dreiwöchigen Abstand kastriert (Woche 0-24). Alle eingeschlossenen Rüden wiesen vor Behandlungsbeginn physiologische LH-, FSH- und T-Konzentrationen (DePalatis et al. 1978; Günzel-Apel et al. 1990; James et al. 1979; Peters et al. 2000) sowie ein normales Spermiogramm auf (Riesenbeck et al. 2001). Um die Chronologie der Rekrudeszenz besser berücksichtigen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit die Ergebnisse anhand eines Kollektivs nach Kastrationswoche (= Wochen nach Entfernung des GnRH-Implantates) ausgewertet. Da die Rekrudeszenz der Spermatogenese in der histologischen Untersuchung z. T. deutliche individuelle Varianzen zeigte und wider Erwarten schnell eine vollständige Spermatogenese zu beobachten war (9-12 Wochen nach Implantatentfernung), erfolgte in vorherigen Arbeiten eine Einteilung anhand des am weitesten entwickelten Keimzellstadiums („developmental groups“ DG) (Gentil et al. 2012; Goericke-Pesch et al. 2009). Hierbei war es ausreichend, wenn eine einzige Keimzelle der DG vorlag, so dass sich ein inhomogenes Bild innerhalb der Gruppen ergab. Aufgrund der sich aus beiden Einteilungen ergebenden relativ kleinen Gruppengrößen ist davon auszugehen, dass die statistische Aussagekraft eingeschränkt ist. Der allgemeine Trend ist jedoch erkennbar.

Zur Untersuchung der hormonellen Feinregulation der Spermatogenese während des Verlaufs der Rekrudeszenz (Bardin et al. 1987, zitiert von de Kretser und Robertson

1989; Ling et al. 1985; Robertson et al. 1985; Schwall 1998a; Schwall 1998b) wurden die drei Untereinheiten Inhibin α, β_A und β_B im Hodengewebe auf mRNA- und Proteinebene untersucht.

5.1.2 Western Blot

Die Durchführung des Western Blots diente der Spezifitätsüberprüfung der in der Immunhistochemie verwendeten Primärantikörper. Die Durchführung erfolgte mit homogenisiertem Hodengewebe adulter Hunde, in denen das zu untersuchende Protein zu erwarten war. Um die detektierte Bande als spezifisch zu bestätigen, wurde je nach verwendetem Antikörper Kontrollgewebe jener Spezies mitgeführt, gegen welches der Antikörper ursprünglich gerichtet war (Inhibin α: murines Hodengewebe; Inhibin $\beta_{A/B}$: humanes Hodengewebe). Des Weiteren wurde eine canine Probe als Negativkontrolle mitgeführt, die nicht mit dem Primärantikörper inkubiert wurde, um unspezifische Reaktionen des Sekundärantikörpers und auch des Avidin-Biotin-Komplexes (ABC) zu detektieren. Das genannte ABC-System diente der Signalverstärkung während der Nachweisreaktion (Hsu et al. 1981; Key 2009a).

5.1.3 Nachweis von mRNA

Die Polymerase-Kettenreaktion ist inzwischen ein Routineverfahren zum qualitativen Nachweis bestimmter mRNA in einem Gewebe. Der Nachweis der mRNA erfolgt qualitativ (RT-PCR) oder (semi-)quantitativ (Realtime PCR/qPCR) in Relation zu einem oder mehreren Referenzgenen (Pfaffl 2004). In der vorliegenden Arbeit erfolgte die qPCR mittels SYBR Green. Dabei handelte es sich um einen DNA-Fluoreszenzfarbstoff, dessen Intensität mit der Menge der synthetisierten PCR-Produkte korreliert. Die Quantifizierung erfolgt in der exponentiellen Phase der PCR durch die Messung des Fluoreszenzsignals des interkalierten DNA-Farbstoffes SYBR Green. Aufgrund der generell geringeren Spezifität infolge unspezifischer DNA-Bindungen wurde stets eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Anhand der fragmentspezifischen Schmelztemperatur kann so die Spezifität des PCR-Produktes bestätigt werden. Zur anschließenden Normalisierung und darauf folgenden relativen, effizienzkorrigierten Quantifizierung (Pfaffl 2001) der Varianz der

Expressionsergebnisse wurde das nicht-regulierte Referenzgen „Housekeeping Gen“, in der vorliegenden Arbeit GAPDH, auf jeder 96-well-Platte mitgeführt (Pfaffl 2004). Für GAPDH konnte in vorherigen Studien (Gentil 2012) eine konstante Genexpression unabhängig von den verschiedenen Gruppen und Behandlungsarten (Gonazon®/ Profact®Depot) verifiziert werden, so dass eine Beeinflussung durch die Behandlung mittels Suprelorin-Implantat nicht zu erwarten war.
Die Bestimmung der PCR-Effizienz erfolgte individuell für jedes Primerpaar anhand von Verdünnungsreihen aus einem Pool aller zu untersuchenden Proben (Pfaffl et al. 2002). Vorteil der verwendeten effizienzkorrigierten relativen Quantifizierung nach Pfaffl (2001) ist, dass damit eine Über- oder Unterschätzung des mRNA-Gehaltes nahezu ausgeschlossen wird (Pfaffl et al. 2002). Um Kontaminationen ausschließen zu können, wurden stets Negativkontrollen mitgeführt.

5.1.4 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine standardisierte und sicher etablierte Methodik, um in Gewebeschnitten die zelluläre Lokalisation spezifischer Proteine mittels eines markierten primären Antikörpers zu visualisieren. Verglichen mit der direkten Sichtbarmachung der Antigen-Antikörper-Reaktion zeigt das verwendete indirekte Nachweisverfahren aufgrund eines Sekundärantikörpers mit zusätzlicher Verwendung des Avidin-Biotin-Komplexes (ABC) als „Signalverstärker“ eine höhere Sensitivität (Hsu et al. 1981; Key 2009b). In Anlehnung an das von Gentil (2012) verwendete Protokoll für immunhistologische Untersuchungen wurden in zahlreichen Vorversuchen einzelne Schritte für die verwendeten Antikörper und Gewebe optimiert. Der Hauptversuch wurde schließlich standardisiert an einem Tag und in einem Durchgang mit den zu untersuchenden Proben durchgeführt. So gelang es, eine hohe Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erzielen und nicht beeinflussbare Faktoren (umweltbedingte Schwankungen wie Temperatur und Licht) auszuschließen. Pro Gruppe wurde je eine Negativkontrolle mitgeführt, um bei der Beurteilung unspezifische Signale durch die Bindung des Sekundärantikörpers und die verwendete ABC-Lösung größtenteils auszuschließen.
Die Auswertung der einzelnen Hodengewebeschnitte erfolgte deskriptiv mittels eines Leica Lichtmikroskops. Jeder Antikörper wurde zur optimalen Vergleichbarkeit innerhalb einer Woche ausgewertet und digitalfotografisch festgehalten. Die

Einstellungen des Mikroskops blieben in dieser Zeit unverändert.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Der Status der Downregulation beim Rüden nach Anwendung eines slow-release GnRH-Agonist-Implantates mit dem Sistieren der endokrinen und germinativen Hodenfunktion ist auf endokrinologischer Ebene bzgl. LH, FSH und T (Goericke-Pesch et al. 2009) sowie auf histologischer und molekularbiologischer Ebene bzgl. StAR, P450scc, P450c17 und AR (Gentil et al. 2012; Goericke-Pesch et al. 2013) hinreichend charakterisiert. Ebenso wurden die entsprechenden endokrinen, histologischen und molekularbiologischen Daten während der Rekrudeszenz der Spermatogenese von unserer Arbeitsguppe bearbeitet und publiziert (Gentil et al. 2012; Goericke-Pesch et al. 2009). Die Feinregulation der FSH-Downregulation und folgenden Aufregulation sowie die Chronologie derselben entziehen sich jedoch bislang der Kenntnis. Im physiologischen Organismus erfolgt die Feinregulation über Inhibin (hemmt FSH-Sekretion) (Abeywardene und Plant 1988, zitiert von de Kretser und Robertson 1989), Aktivin (stimuliert FSH-Sekretion) (Ling et al. 1986; Schwall 1998b; Vale et al. 1986) und Follistatin (hemmt Aktivin) (Kogawa et al. 1991; Nakamura et al. 1990; Sugino et al. 1993).

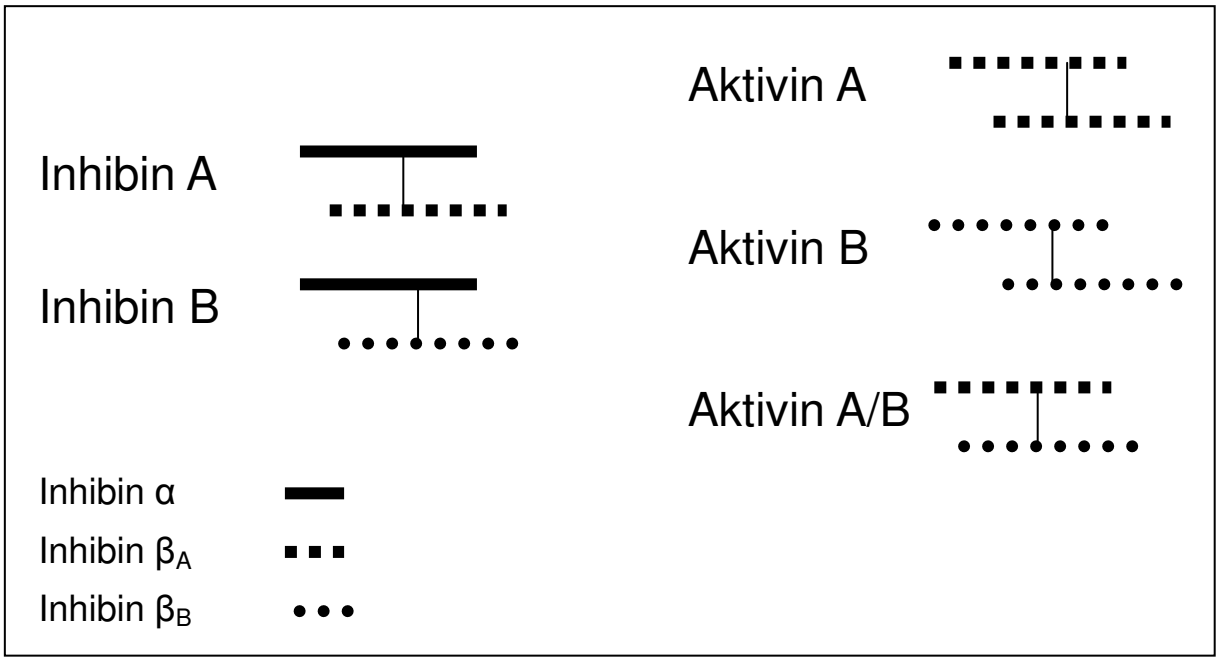


Abb. 42: Zusammensetzung der einzelnen Untereinheiten für Inhibin A und B, Aktivin A, B und A/B

Während Inhibin stets aus einer α- und einer β-Subunit besteht, handelt es sich bei Aktivin um ein Homodimer zweier β-Subunits (Abbildung 42). Die entsprechenden Subunits werden u. a. im Hodengewebe exprimiert. Auch an caninem Hodengewebe konnten die drei entsprechenden Subunits bereits auf Proteinebene nachgewiesen werden (Banco et al. 2010; Marino und Zanghi 2012; Taniyama et al. 2001), wobei ihre Expression ausschließlich auf die Leydig-Zellen beschränkt war. Banco et al. (2010) sowie Marino und Zanghi (2012) wiesen zudem die α-Subunit in neonatalen Sertoli-Zellen, Sertoli-Zellen von kryptorchiden Intersex-Hunden und Sertoli-Zelltumoren, aber nicht in normalen oder juvenilen Hoden nach. Im Gegensatz zu den in der Literatur vorliegenden Daten wurden in dieser Arbeit erstmalig die 3 Subunits auf mRNA-Ebene nachgewiesen und ihre Proteinexpression mittels Immunhistochemie und Western Blot bestätigt. Eine Expression aller 3 Subunits auf mRNA und Proteinebene konnte sowohl unter Downregulation, während der Rekrudeszenz der Spermatogenese, am adulten und am juvenilen Hoden nachgewiesen werden. Anders als zuvor beschrieben, war die Expression nicht auf Leydig-Zellen beschränkt (Taniyama et al. 2001), sondern die α-Subunit wurde in den Sertoli-Zellen und im Interstitium, die β_A-Subunit in Sertoli-Zellen und peritubulären Zellen sowie die β_B-Subunit in Gonozyten bzw. allen vorhandenen Keimzelltypen nachgewiesen. Die Beobachtung, dass der Hauptsyntheseort der α- und β_A-Untereinheit die Sertoli-Zellen sind, stimmt mit anderen Spezies, wie Ratte (Meunier et al. 1988; Roberts et al. 1989; Steinberger und Steinberger 1976) und Mensch (Anawalt et al. 1996), überein. Ebenso entspricht die β_A-Subunit in den caninen peritubulären Zellen den Beobachtungen bei Ratte (de Winter et al. 1994) und Maus (Barakat et al. 2008).

Aus den entsprechenden Lokalisationen der einzelnen Subunits ergibt sich eine mögliche Expression von Aktivin A in den Sertoli- und peritubulären Zellen und von Inhibin A in den Sertoli-Zellen. Da die β_B-Subunit alleine und ausschließlich in Keimzellen exprimiert wird, erscheint es wahrscheinlich, dass diese Subunit in situ vornehmlich für die Synthese von Aktivin B genutzt wird. Ein möglicher Transportweg von Inhibin α aus den Sertoli-Zellen über rezeptor-vermittelte Endozytose in die Keimzellen wäre denkbar (Forti et al. 1992), bedarf jedoch weiteren Untersuchungen.

5.2.1 Vergleich verschiedener GnRH-Agonist-Implantate

Prinzipiell ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen mit Gonazon®, Profact®-Depot und Deslorelin behandelten Tieren nachweisen, weshalb im Folgenden diese Tiere unter „downregulierter Hoden“ zusammengefasst werden. Diese Beobachtung entspricht derer bezüglich der Expression von StAR, der steroidogenen Enzyme und dem Androgenrezeptor, wobei allerdings in diese Untersuchungen nur mit Gonazon® und Profact®-Depot behandelte Tiere einflossen (Goericke-Pesch et al. 2013). Bei der Untersuchung der BHS konnten ebenfalls keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Implantaten festgestellt werden (Röhrs 2013).

Trotz der prinzipiell gleichen Ergebnisse unabhängig vom verwendeten GnRH-Agonisten entstand bei Betrachtung der Gesamtheit der Ergebnisse dennoch der subjektive Eindruck, dass die Inhibin α- und β_A-Subunits mittels eines Profact®Depot- oder Suprelorin®-Implantates stärker downreguliert wurden. Für die β_B-Subunit zeigten die mit Suprelorin behandelten Tiere sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene die geringste Expression. Eine mögliche Begründung hierfür könnte seine unterschiedliche GnRH-Rezeptoraffinität bzw. ein unterschiedlicher Turnover der einzelnen Agonisten sein. Um diese subjektiven Beobachtungen und die Hypothese zu belegen, sind definitiv weitere Untersuchungen erforderlich.

5.2.2 Diskussion der Ergbnisse vom juvenilen Hoden (JG) im Vergleich zum downregulierten (DG A, Wo 0, Profact, Suprelorin) bzw. adulten Hoden

In allen drei Gruppen (downregulierter, juveniler und adulter Hoden) waren sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene die drei untersuchten Inhibin-Subunits stets nachweisbar. Prinzipiell ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der mRNA-Expression zwischen dem juvenilen und downregulierten Hoden. Jedoch war im downregulierten und im juvenilen Hoden eine höhere mRNA-Expression der β_B-Subunit nachweisbar als im adulten Hoden.

Im Gegensatz dazu waren auf Proteinebene in Abhängigkeit der Subunit und der exprimierenden Zellen Unterschiede zwischen den Gruppen nachweisbar. So waren die Sertoli-Zellen stark positiv für die α-Subunit im juvenilen Hoden, im downregulierten Hoden wiesen sie eine variable Färbung auf und im adulten Hoden

waren sie signifikant weniger gefärbt als bei JG. Diese Relation spiegelte sich in JG und CG auch bezüglich des Färbeverhaltens des Interstitiums wieder. Die Beobachtung, dass juvenile Sertoli-Zellen die höchste Proteinexpression der Inhibin α-Subunit aufweisen, stimmt mit den Beobachtungen bei Ratte (Rivier et al. 1988), Bulle (Matsuzaki et al. 2001) und Hund (Banco et al. 2010) überein, den letztgenannten Autoren misslang sogar der Nachweis bei (prä-)pubertären und adulten Sertoli-Zellen, was ebenfalls auf eine signifikant niedrigere Proteinexpression hindeutet. Dass das Protein der α-Subunit im pubertären bzw. adulten Hoden allerdings gar nicht exprimiert wird, erscheint auf Grundlage der eigenen Daten beim Hund auf mRNA- und Protein-Ebene sowie im Speziesvergleich (Ratte, Mensch) sehr unwahrscheinlich (Marchetti et al. 2003; Roberts et al. 1989). Der endgültige Nachweis der entsprechenden Subunit in den Sertolizellen könnte auf mRNA-Ebene mit Laser-assisted cell picking und auf Proteinebene gegebenenfalls in Zellkultur erfolgen.

Auch die β_A-Subunit wies Proteinexpressionsunterschiede zwischen den Gruppen auf: So wiesen Sertoli-Zellen im downregulierten Hoden eine deutlich niedrigere Expression auf als im juvenilen und adulten Hoden. Im Gegensatz dazu war die Expression in Leydig-Zellen deutlich höher im downregulierten Hoden im Vergleich zum adulten, unterschied sich aber nicht vom juvenilen Hoden. Bezüglich der Expression in den peritubulären Zellen entsprachen juvenile und downregulierte Hoden einander, wiesen aber eine deutlich höhere Färbeintensität als die peritubulären Zellen im adulten Hoden auf. Die hier nachgewiesenen Lokalisationen (Sertoli-, Leydig- und peritubuläre Zellen) konnten von Barakat et al. (2008) während der gesamten Hodenentwicklung bei Mäusen beobachtet werden. Die Ratte zeigte schon während der fetalen Hodenentwicklung immunopositive Signale in Leydig- und Sertoli-Zellen. Während der ersten 9 Tage post partum gelang zudem der Proteinnachweis u. a. in Sertoli- und peritubulären Zellen (Meehan et al. 2000). Beide Arbeitsgruppen wiesen, wie auch in der vorliegenden Studie, die Proteinuntereinheit zusätzlich in Gonozyten nach (Barakat et al. 2008; Meehan et al. 2000).

Die niedrigere Proteinexpression der β_B-Subunit im juvenilen und downregulierten Hoden ist möglicherweise auf die Tatsache zurückzuführen, dass der Nachweis dieser Subunit ausschließlich in Keimzellen, aber in allen Entwicklungsstadien gelang. Im Vergleich zu einer kompletten Spermatogenese im adulten Hoden mit 5 Keimzelltypen sind im downregulierten Hoden nur maximal 2 (Spermatogonien und

Spermatozyten), im juvenilen Hoden nur Gonozyten vorhanden, was bereits hinsichtlich der Quantität an Keimzellen Unterschiede erklären kann. Fraglich bleibt bei dieser Begründung allerdings, warum auf mRNA-Ebene die Expression höher als im adulten Hoden war. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits für Maus und Mensch postuliert: So wurden bei Mäusen in der ersten Woche der Spermatogenese die höchsten mRNA-Werte gemessen, die ab dem 10. Tag post partum stetig sanken. Barakat et al. vermuteten einen Zusammenhang zwischen dem Absinken der mRNA-Werte und der beginnenden Differenzierung der Sertoli-Zellen bzw. dem Eintritt der Meiose in den Keimzellen (Barakat et al. 2008). In den ersten 15 Tagen post partum zeigten sich auf Proteinebene Gonozyten, Spermatogonien und Spermatozyten immunopositiv. Im Gegensatz dazu waren im adulten Hoden einzig elongierende Spermatiden positiv; sowohl die zuvor positven Zellen, als auch runde Spermatiden waren negativ. Die β_B-Subunit konnte während der gesamten Hodenentwicklung in Sertoli- und Leydig-Zellen immunhistologisch nachgewiesen werden (Barakat et al. 2008). Anders als bei der Maus waren beim Mensch bei vollständiger Spermatogenese pachytäne Spermatozyten bis runde Spermatiden gefärbt (Andersson et al. 1998; Marchetti et al. 2003). Präpubertär gelang der immunhistologische Nachweis beim Mensch ausschließlich in den Sertoli-Zellen (Andersson et al. 1998). Entgegen den bereits genannten Studien wiesen Anderson et al. (1998) die Inhibin β_B-Untereinheit nur in Sertoli- und Leydig-Zellen nach.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass der downregulierte Hoden in Bezug auf die Expression der drei Inhibin-Subunits dem juvenilen stark ähnelt, es aber auch Unterschiede, v. a. bezüglich der β_A–Subunit Proteinexpression in den Sertoli-Zellen, gibt.

Der relativ oder signifikant höhere Nachweis aller Subunits auf mRNA- und/oder Proteinebene im juvenilen und downregulierten Hoden im Vergleich zum adulten Hoden deutet darauf hin, dass Inhibin, wie bei Ratte (Rivier et al. 1988) und Bulle (Matsuzaki et al. 2001) beschrieben, in höheren Konzentrationen vorliegt und somit vermutlich essentiell für die Regulation beim juvenilen und downregulierten Hoden ist. Gleichzeitig fällt insbesondere im downregulierten Hoden (aber auch begrenzt im juvenilen Hoden) auf, dass die relative Expression der α- und der β_A–Subunit relativ niedrig ist, während die β_B-Subunit am höchsten exprimiert wird. Das könnte auf die Möglichkeit hindeuten, dass vermehrt Aktivin B sezerniert wird, welches stimulierend auf die FSH-Sekretion und damit Spermatogenese wirkt (Mather et al. 1990)

(Gregory und Kaiser 2004). Inwieweit dies ausschließlich eine Folge nicht vollständig downregulierter FSH-Konzentrationen ist (Slow release GnRH-Implantate haben einen signifikanteren Einfluss auf die LH- als auf die FSH-Sekretion (Millar 2005) die nachweislich die Sekretion beeinflussen), oder ursächlich mit dem raschen Anlaufen nach Aufhebung der Downregulation in Zusammenhang stehen könnte, bedarf weiterführender Untersuchungen. Hierzu erscheinen Untersuchungen am selben Tiermodell mit frequenterer Probenentnahme, d. h. nach Aufhebung der Downregulation z. B. Kastrationen in 3-4-tägigem Abstand bis Woche 3 (oder 9), sinnvoll. Ziel wäre, am Material die zeitliche Abfolge der Subunit-Expression, aber auch die biologische Bedeutung der Subunits und ihre Interaktion näher zu untersuchen. Um die letztgenannten Faktoren näher zu studieren, könnte auch die Bestimmung der Inhibin bzw. Aktivin-Konzentrationen im peripheren Blut zu den entsprechenden Zeitpunkten weitere Klärung bringen. Leider gelang es trotz intensiver Vorarbeiten mit 2 kommerziell verfügbaren Kits nicht, für den Hund funktionierende Testsysteme zur Bestimmung der genannten Konzentrationen ausfindig zu machen, so dass die Bestimmung Ziel weiterer Forschung sein muss. Des Weiteren erscheint es sinnvoll, die entsprechenden Rezeptoren für Aktivin und Inhibin sowie in die Signaltransduktion involvierte Proteine, wie z.B. für Aktivin relevante rezeptor-regulierte, "common" und inhibierende SMAD-Proteine, nachzuweisen (Lebrun et al. 1999; Nakao et al. 1997; Wu et al. 1997).

5.2.3 Vergleich downregulierter Hoden vs. saisonaler Hoden

In der Literatur finden sich nur wenige Arbeiten über die Expression der Inhibin-Subunits am saisonalen Hoden und diese sind auf die Rötelmaus (Tähkä et al. 1998), den japanischen Schwarzbären (Weng et al. 2006a), den Marderhund (Weng et al. 2006) und wilde Erdhörnchen (Sheng et al. 2012; Sheng et al. 2008) beschränkt. Zudem wurden mit Ausnahme der Daten bei der Rötelmaus ausschließlich Daten auf Proteinebene gewonnen und in keinem Fall die Spezifität der Antikörper mittels Western Blot verifiziert.

Ähnlich wie beim downregulierten Hoden wurde bei der Rötelmaus außerhalb der Reproduktionssaison die β_B-Subunit auf mRNA-Ebene vermehrt exprimiert. Anders als im downregulierten Hoden war aber auch die Expression der α-Subunit erhöht, wohingegen die β_A-Subunit nicht nachweisbar war (Tähkä et al. 1998). Hinsichtlich der Proteinexpression weisen Schwarzbär, Erdhörnchen und Marderhund ähnliche

Expressionsmuster mit einem Nachweis aller Subunits in Sertoli- und Leydig-Zellen zur Fortpflanzungszeit auf (Sheng et al. 2012; Sheng et al. 2008; Weng et al. 2006a; Weng et al. 2006b). Die Daten außerhalb der Reproduktionssaison zeigen bei Erdhörnchen eine ausschließliche Expression der Subunits in den Sertoli-Zellen, beim Marderhund eine alleinige Expression in den Leydig-Zellen. Im Gegensatz zu den eigenen Daten, bei denen die Expression der β_A–Subunit zudem in peritubulären Zellen und der β_B–Subunit ausschließlich in Keimzellen gelang, wiesen in keiner der genannten Studien Keimzellen oder peritubuläre Zellen unabhängig vom Funktionszustand des Hodens ein immunopositives Signal auf. Eine Aussage zur Intensität der Immunreaktion, d. h. der Proteinexpression, machen ausschließlich Sheng et al. (2008), die in der Reproduktionszeit eine intensivere Färbung für die α- und β_B-Subunit beobachteten als außerhalb der Saison, wohingegen die β_A-Subunit keine erwähnenswerten saisonalen Expressions-unterschiede aufwies. Bezogen auf diese Beobachtungen auf Proteinebene liegt demnach keine Übereinstimmung mit dem downregulierten Hoden vor. Die Beobachtungen auf mRNA-Ebene für die Rötelmaus entsprechen jedoch den hier gemachten Beobachtungen, so dass eine allgemeine Aussage bezüglich der Ähnlichkeit des downregulierten Hodens im Vergleich zum saisonalen Hoden außerhalb der Reproduktionszeit nicht getroffen werden kann. Insgesamt lassen die erhobenen Ergebnisse aber im Gegensatz zu bisherigen Beobachtungen am downregulierten Hoden (Gentil 2012; Röhrs 2013) eher den Schluss zu, dass der Hoden nach Downregulation bezüglich der Expression der Inhibin α-, β_A- und β_B-Subunits mehr dem juvenilen als dem saisonalen Hoden gleicht. Eine ausführliche Diskussion hierzu findet sich unter Kapitel 5.2.2.

5.2.4 Diskussion der Rekrudeszenz der Spermatogenese nach Aufhebung der Downregulation (Wo 0-24, DGA-D) im Vergleich zur adulten Kontrollgruppe

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich nach Implantatentfernung während der Rekrudeszenz der Spermatogenese sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine ähnliche Entwicklung für die α- und β_A-Subunits, die eine vornehmliche Bereitstellung von Inhibin A bzw. Aktivin A vermuten lassen. Während zum Zeitpunkt der Downregulation (Wo 0/DG A) nur sehr niedrige mRNA-Expressionen beider Subunits nachweisbar waren, waren in Woche 3 die höchsten Konzentrationen messbar. Diese rasche, zeitlich eng beschränkte Aufregulation war gefolgt von einem

Abfall der relativen mRNA-Expression, was auf einen „Rebound-Effekt“ hindeuten könnte, der für das Anlaufen einer koordinierten, aber nicht „überschießenden“ Spermatogenese von Bedeutung sein könnte. Aufgrund der raschen Aufregulation von StAR und P450scc (Gentil 2012), die sich in einem signifikanten Anstieg der Testosteronkonzentrationen innerhalb der ersten 3 Wochen der Rekrudeszenz nach Implantatentfernung widerspiegelt (Goericke-Pesch et al. 2009), könnte eine ausgeprägte Stimulierung der Sertoli-Zell-Aktivität die Folge sein, die in einer vermehrten Synthese der Untereinheiten für Inhibin A resultieren könnte, um eine überschießende Stimulation der Spermatogenese zu verhindern (s.o.) (de Kretser und Robertson 1989; Ling et al. 1985; Miyamoto et al. 1985; Robertson et al. 1985; Schwall 1998b; Weiss et al. 1993).

Die maximale Aufregulation der Inhibin α und β_A- Subunits während der 3. Woche der Rekrudeszenz der Spermatogenese auf mRNA- und Proteinebene bzw. 6. Woche bezüglich der β_A-Protein-Expression in den Sertoli-Zellen war gefolgt von einem stetigen Expressionsabfall bis auf Werte, die annähernd der Kontrollgruppe entsprachen. Inwieweit eine eventuelle Inhomogenität der Färbung, wie auf Proteinebene für die Inhibin α-Subunit in Sertoli-Zellen der DG A beobachtet, auf individuelle Unterschiede und kleine Gruppengröße zurückzuführen ist, bedarf weiteren Untersuchungen. Ebenso interessant und weiterer Untersuchungen bedürfend erscheint das Phänomen, dass die β_A-Untereinheit in der frühen Rekrudeszenz in den Spermatogonien nachweisbar war, sich das Expressionsmuster aber zugunsten der Sertoli-Zelle veränderte. Im Gegensatz dazu gelang der Proteinachweis bei der Ratte in Sertoli-, Leydig- (de Winter et al. 1994; Lee et al. 1989) und peritubulären Zellen (de Winter et al. 1994). Bei der Maus konnte ab dem 1. Lebenstag ein immunhistologisches Signal in Sertoli-, Leydig- und peritubulären Zellen nachgewiesen werden, so wie u. a. in den ersten Lebenstagen in den Spermatogonien, während beim adulten Tier lediglich die pachytänen Spermatozyten der Keimzellen gefärbt waren (Barakat et al. 2008). Eine Verifizierung der veränderten zellulären Expression mittels Doppelfärbung z.B. mit einer zusätzlichen Vimentin-Färbung zur eindeutigen Charakterisierung der Sertoli-Zellen, wäre wünschenswert.

Bei Betrachtung der Inhibin β_B-Untereinheit lag zum Zeitpunkt der Implantatentfernung (Wo 0/DG A) und bei Betrachtung der DGs zudem unmittelbar danach, in DG B, die höchste Expression vor. Inwieweit dies auf eine erhöhte

Expression von Inhibin B oder Aktivin B zurückzuführen ist, bedarf weiterer Untersuchungen und wurde bereits unter Kapitel 5.2.2 erwähnt. Im Folgenden zeitlichen Verlauf kam es zu einer kontinuierlichen Abnahme der Expression der β_B-Untereinheit, so dass nach erfolgter Rekrudeszenz keine Unterschiede zwischen dem vormals downregulierten Hoden und den adulten Kontrollhoden vorlagen. Bei der Signalauswertung der histologischen Schnitte fiel auf, dass neben den primär gefärbten Spermatogonien alle weiteren Keimzellstadien gefärbt waren, allerdings mit nach luminal abnehmender Farbintensität. Die Frage, ob es sich hierbei um eine Verschleppung des Proteins bis zu den reifen Spermatiden handelt oder ob die mRNA der Subunit tatsächlich exprimiert wird, könnte mit gewisser Sicherheit mit Hilfe des Laser-assisted cell pickings geklärt werden, bei dem der mRNA-Nachweis auf zellulärer Ebene erfolgen kann.

5.2.5 Zusammenfassung der Diskussion

Aus der Gesamtheit der Ergebnisse lässt sich festhalten, dass alle 3 Inhibin-Subunits im juvenilen, downregulierten und adulten Hoden sowie während der Rekrudeszenz exprimiert werden. Die erhaltenen Ergebnisse bezüglich der Lokalisation der Proteinexpression deuten darauf hin, dass beim Rüden vermutlich Inhibin A von größter biologischer Bedeutung ist. Inwieweit ein Austausch der Subunits zwischen Keim- und Sertoli-Zellen ebenso eine Produktion von Inhibin B ermöglicht, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht klar. Die hohe mRNA-Expression der β_B-Untereinheit steht möglicherweise in kausalem Zusammenhang mit einer schnellen Aufregulation der Aktivin B-Konzentrationen, die das rasche Wiederanlaufen der Spermatogenese nach Aufhebung der Downregulation durch Entfernung der Implantate ermöglichen. Die vorliegende Arbeit gibt weiterhin Hinweise darauf, dass Inhibin A am Anfang der Rekrudeszenz der Spermatogenese im caninen Hoden möglicherweise eine bedeutende Rolle zukommt, um eine überschießende Stimulation durch die bereits während der Downregulation bzw. unmittelbar danach vorliegenden, erhöhten Aktivin B-Konzentrationen zu verhindern.

Nachfolgeuntersuchungen sollten sich - möglichst an frequenter gewonnenem Material in der frühen Rekrudeszenz bis Woche 9 - neben der zeitlichen Abfolge der Expression der Inhibin-Subunits zudem mit der biologischen Relevanz der Ergebnisse beschäftigen. Dazu sollte auch die Expression der entsprechenden Rezeptoren und Signaltransduktionspathways sowie die peripheren

Blutkonzentrationen der Inhibine und Aktivine am Modell des downregulierten Rüden und der Rekrudeszenz der Spermatogenese nach Aufhebung der Downregulation detailliert bearbeitet werden.

6 Zusammenfassung

Die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse ist für die neuroendokrine Regulation der Reproduktion verantwortlich. Infolge eines negativen Feedback-Mechanismus reguliert Testosteron die Gonadotropin-Sekretion (Luteinisierendes Hormon, LH, und Follikelstimulierendes Hormon, FSH). Die Feinregulation der FSH-Sekretion erfolgt durch die Glykoproteine Aktivin (stimulierend) und Inhibin (hemmend) bzw. Follistatin (hemmend auf Aktivin), welche demnach einen gravierenden Einfluss auf die Kontrolle des Keimepithelzyklus ausüben.

Ziel der Arbeit war es, die Expression von Aktivin und Inhibin im caninen Hoden zum Zeitpunkt der Downregulation infolge der Behandlung mit einem slow-release GnRH-Agonist-Implantat und während der Rekrudeszenz der Spermatogenese näher zu charakterisieren. Hierzu wurden Untersuchungen zum Nachweis der drei Subunits Inhibin α, β_A und β_B, auf mRNA- und Proteinebene durchgeführt. Nach einer fünfmonatigen Behandlungsdauer mit einem Gonazon®-Implantat (18,5 mg Azagly-Nafarelin) wurden 37 adulte Beagle-Rüden in Gruppen von 3-4 Tieren in dreiwöchigem Abstand (Woche 0, 3, 6, 9,…, 24) chirurgisch kastriert. Um den Einfluss des GnRH-Agonisten auf den Status der Downregulation näher zu untersuchen, wurden je drei Rüden mit einem 4,7 mg Deslorelin (Suprelorin®, SG)- Implantat bzw. einem 6,3 mg Buserelin-Implantat (Profact® Depot, PG) behandelt und nach fünf Monaten kastriert. Die Ergebnisse wurden mit einer adulten, unbehandelten Kontrollgruppe (n = 5, CG) sowie juvenilen Tieren (n = 3, JG) verglichen. Die Gruppeneinteilung der Hunde erfolgte zum einen anhand der Kastrationszeitpunkte (Woche 0, 3, 6, 9, 12, 24) und zum anderen anhand histologischer Kriterien, d. h. anhand der am weitesten entwickelten Keimzellen [DG A (Spermatozyten), DG B (runde Spermatiden), DG C (elongierende Spermatiden) und DG D (elongierte Spermatiden)].

Auf mRNA-Ebene gelang mittels RT-PCR und qPCR in allen Gruppen zum Zeitpunkt der Downregulation und während der Rekrudeszenz der Spermatogenese, aber auch in der adulten und juvenilen Kontrollgruppe, der Expressionsnachweis aller drei Subunits. Für die α-Subunit konnten im Gruppen-Wochen Vergleich statistisch signifikante Unterschiede nachgewiesen werden ($p = 0{,}0039$), wobei die Expression in Wo 3 signifikant höher war als in Wo 9, 24 und in CG ($p < 0{,}01$-$0{,}05$). Beim Vergleich der downregulierten Tiere (Wo 0, SG, PG) mit der CG und JG waren

ebenfalls signifikante Unterschiede verifizierbar ($p = 0,0463$), mit einer signifikant höheren Expression in SG verglichen mit CG ($p < 0,05$). Für die β_A-Subunit war zwischen den Wochen-Gruppen verglichen mit CG ein signifikanter Unterschied nachweisbar ($p = 0,0026$), wobei im Tukey-Test keine weiteren Signifikanzen verifiziert werden konnten, aber tendenziell die Expression in Woche 3 am höchsten war und dann bis Woche 24 abfiel. Die Expression der β_B-Subunit war beim Vergleich der DG mit CG signifikant verschieden ($p = 0,0158$), wobei sie bei DG A und B signifikant höher als in CG war ($p < 0,05$). Tendenziell konnte eine stete Abnahme der Expression auch im Wochen-Gruppen Vergleich gezeigt werden. Ebenso ergaben sich beim Vergleich der downregulierten Hoden mit CG und JG signifikante Differenzen ($p = 0,0135$) mit einer signifikant höheren Expression in Wo 0 und PG verglichen mit CG ($p < 0,05$).

Im Western Blot erwiesen sich die verwendeten Antikörper als spezifisch. In der Immunhistochemie zeigte sich auf Proteinebene für die Inhibin α-Subunit ein immunopositives Signal im Zytoplasma der Leydig- und Sertoli-Zellen. In den Sertoli-Zellen waren die immunopositiven Signale in DG B und JG besonders deutlich zu beobachten, während das Signal in CG am schwächsten war. Eine positive Farbreaktion zeigte sich für die β_A-Subunit in den peritubulären Zellen, den Sertoli-Zellen (außer Wo 0 und PG), Leydig-Zellen und Gonozyten (JG) bzw. Spermatogonien (außer DG D und CG). Für die Inhibin β_B-Subunit konnte bei allen Hunden eine Färbung der Gonozyten (JG) bzw. Spermatogonien und den je nach Entwicklungsstand der Spermatogenese weiter vorhandenen Keimzellen bis zu runden Spermatiden beobachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Inhibin A und Aktivin A von Sertoli- und Leydig-Zellen produziert werden, Aktivin A zudem von peritubulären Zellen und Spermatogonien. Im Gegensatz dazu ist die Produktion von Aktivin B auf die Keimzellen beschränkt. Der erhöhte Nachweis von insbesondere Aktivin B zum Zeitpunkt der Downregulation und der frühen Rekrudeszenz deutet auf eine mögliche Rolle für die schnelle Aufregulation der Spermatogenese und auch das schnelle Anlaufen der Steroidbiosynthese hin. Den hohen Aktivin B-Konzentrationen folgt bereits in Woche 3 eine Aufregulation von Inhibin A, dem beim Hund dominanten Inhibin, welcher möglicherweise einer überschießenden Stimulation entgegensteuert.

7 Summary

The hypothalamus-pituitary-gonadal axis is responsible for the neuroendocrine regulation of reproduction. Testosterone secretion regulates secretion of the gonadotropins (Luteinising Hormone, LH, and follicle stimulating hormone, FSH) by a negative feedback mechanism. The fine-tuning of FSH secretion is by the glycoproteins activin (stimulating) and inhibin (inhibiting) and follistatin (inhibiting activin), respectively, that consequently have an important influence on the control of the cycle of the seminiferous epithelium.

The aim of the present thesis was to characterise the expression of activin and inhibin in the canine testis at the time of downregulation after treatment with a slow-release GnRH agonist implant and during recrudescence of spermatogenesis. Investigations were performed on the mRNA and protein level to proof the presence of the three subunits inhibin α, β_A and β_B. Following a 5-month treatment with a Gonazon® implantat (18.5 mg azagly-nafarelin), 37 adult male Beagle dogs were randomly assigned to groups of 3-4 animals and were castrated in 3-week intervals (week, W, 0, 3, 6, 9,…, 24). To further study the influence of the GnRH agonist on the state of downregulation, three dogs each were either treated with an implant containing 4.7 mg deslorelin (Suprelorin®, SG) or 6.3 mg buserelin (Profact® Depot, PG) and castrated 5 months later. The results obtained were compared to an untreated control group (n = 5, CG) and to juvenile animals (n = 3, JG). Grouping of dogs was according to their week of castration (week 0, 3, 6, 9, 12, 24) or according to the most developed germ cell observed [DG A (spermatocytes), DG B (round spermatids), DG C (elongating spermatids) and DG D (elongated spermatids)].

On the mRNA level, we could proof the presence of all three subunits at the time of downregulation and during recrudescence but also in CG and JG using RT-PCR and qPCR. Significant differences were found comparing the week-of-castration groups ($p = 0.0039$) with a significantly higher ratio in week 3 compared to week 9, 24 and CG ($p < 0.01$-0.05). Significant differences between groups were also identified when comparing the downregulated animals (W0, SG, PG) with CG and JG ($p = 0.0463$), with a significantly higher expression in SG compared to CG ($p < 0.05$). The ratio of the β_A-subunit was significantly different between weeks of castration compared to CG ($p = 0.0026$) whereas no further differences could be verified using the Tukey test, but there was a clear tendency of the highest expression in week 3 and a

decreasing expression until week 24. Expression of the β_B-subunit was significantly different comparing DGs and CG ($p = 0.0158$) with a significantly higher ratio in DG A and B compared to CG ($p < 0.05$). Comparing the week of castration-groups with CG, a clear tendency of a continuous decrease of the expression could be shown. Significant differences were further identified between the downregulated testes, CG and JG ($p = 0.0135$) with a significantly higher expression in week 0 and PG compared with CG ($p < 0.05$).

Western Blot confirmed the specificity of the antibodies used. On the protein level, immunohistochemistry for the inhibin α-subunit revealed immunopositive staining in the cytoplasm of Leydig and Sertoli cells. In the Sertoli cells, strongest signals were detected in DG B and JG, lowest signals in CG. Positive immunostaining for the β_A-subunit was found in peritubular cells, Sertoli cells (except for week 0 and PG), Leydig cells, gonocytes (JG) and spermatogonia (except for DG D and CG). Immunopositive signals for the inhibin β_B -subunit were identified in gonocytes (JG) and spermatogonia and further germ cells stages up to round spermatids (if present).

In conclusion, inhibin A and activin A are produced by Sertoli and Leydig cells; activin A is also produced by peritubular cells and spermatogonia. In contrast, production of activin B is restricted to germ cells. The proof of high concentrations of especially activin B at the time of downregulation and during the early recrudescence points to a possible role for the rapid upregulation of spermatogenesis and the rapid restart of steroidogenesis. High concentrations of activin B are followed by an upregulation of inhibin B, the predominant inhibin in the dog that might counteract an exaggerated stimulation.

8 Literaturverzeichnis

Abdollah, S., Macias-Silva, M., Tsukazaki, T., Hayashi, H., Attisano, L. and Wrana, J.L., 1997. TbetaRI phosphorylation of Smad 2 or Ser465 and Ser467 is required for Smad 2-Smad 4 complex formation and signaling. Biological Chemistry 272, 27678-27685.

Akingbemi, B.T., Ge, R.-S. and Hardy, M.P., 1999. Leydig cells. In: Knobil, E. and Neill, J.D. (Eds.), Encyclopedia of Reproduction. Academic Press, San Diego, pp. 1021-1033.

Amann, R.P., 1986. Reproductive physiology and endocrinology of the dog. In: Morrow, D.A. (Ed.), Current therapy in theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals. Saunders, Philadelphia, pp. 532-538.

Amory, J.K. and Bremner, W., 2001. Endocrine regulation of testicular function in men: implications for contraceptive development. Molecular and Cellular Endocrinology 182, 175-179.

Anawalt, B.D., Bebb, R.A., Matsumoto, A.M., Groome, N.P., Illingworth, P.J., McNeilly, A.S. and Bremner, W.J., 1996. Serum inhibin B levels reflect sertoli cell function in normal men and men with testicular dysfunction. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 81, 3341-5.

Anderson, R.A., Irvine, D.S., Balfour, C., Groome, N.P. and Riley, S.C., 1998. Inhibin B in seminal plasma: testicular origin and relationship to spermatogenesis. Human Reproduction 13, 920-6.

Andersson, A.M., Muller, J. and Skakkebaek, N.E., 1998. Different roles of prepubertal and postpubertal germ cells and sertoli cells in the regulation of serum inhibin B levels. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 83, 4451-8.

Attisano, L., Carcamo, J., Ventura, F., Weis, F.M., Massague, J. and Wrana, J.L., 1993. Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. Cell 75, 671-680.

Attisano, L. and Wrana, J.L., 1998. Mads and Smads in TGF beta signalling. Current Opinion in Cell Biology 10, 188-94.

Attisano, L., Wrana, J.L., Cheifetz, S. and Massague, J., 1992. Novel activin receptors: distinct genes and alternative mRNA splicing generate a repertoire of serine/threonine kinase receptors. Cell 68, 97-108.

Baker, J.C. and Harland, R.M., 1997. From receptor to nucleus: the Smad pathway. Current Opinion in Genetics & Development 7, 467-473

Bamberg, E., 1994a. Biochemie der gonadalen Steroidhormone. In: Döcke, F. (Ed.), Veterinärmedizinische Endokrinologie. Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart, pp. 411-418.

Bamberg, E., 1994b. Wirkungen der Keimdrüsenhormone. In: Döcke, F. (Ed.), Veterinärmedizinsche Endokrinologie. Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttart, Jena, pp. 418-444.

Banco, B., Giudice, C., Veronesi, M.C., Gerosa, E. and Grieco, V., 2010. An immunohistochemical study of normal and neoplastic canine sertoli cell. Journal of Comparative Pathology 143, 239-247.

Barakat, B., O'Connor, A.E., Gold, E., de Kretser, D.M. and Loveland, K.L., 2008. Inhibin, activin, follistatin and FSH serum levels and testicular production are highly modulated during the first spermatogenic wave in mice. Reproduction 136, 345-59.

Bardin, C.W., Morris, P.L., Shaha, C., Feng, Z.M., Rossi, V., Vaughan, J., Vale, W.W., Voglmayr, J. and Chen, C.L., 1989. Inhibin structure and function in the testis. Annals of the New York Academy of Sciences 564, 10-23.

Belchetz, P.E., Plant, T.M., Nakai, Y., Keogh, E.J. and Knobil, E., 1978. Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypopthalamic gonadotropin-releasing hormone. Science 202, 631-3.

Bergmann, M., 2005. Spermatogenese Physiologie und Pathophysiologie. Urologe 44, 1131-1138.

Bergmann, M., 2006. Physiology of Spermatogenesis. In: Schill, W.-B., Comhaire, F.H. and Hargreave, T.B. (Eds.), Andrology for the Clinician. Springer, Berlin.

Bernard, D.J., Chapman, S.C. and Woodruff, T.K., 2002. Inhibin binding protein (InhBP/p120), betaglycan, and the continuing search for the inhibin receptor. Molecular Endocrinology 16, 207-12.

Bicsak, T.A., Vale, W., Vaughan, J., Tucker, E.M., Cappel, S. and Hsueh, A.J., 1987. Hormonal regulation of inhibin production by cultured sertoli cells. Molecular and Cellular Endocrinology 49, 211-217.

Blottner, S., Hingst, O. and Meyer, H.H., 1996. Seasonal spermatogenesis and testosterone production in roe deer (Capreolus capreolus). Journal of Reproduction & Fertility 108, 299-305.

Bockers, T.M., Nieschlag, E., Kreutz, M.R. and Bergmann, M., 1994. Localization of follicle-stimulating hormone (FSH) immunoreactivity and hormone receptor mRNA in testicular tissue of infertile men. Cell & Tissue Research 278, 595-600.

Boissin-Agasse, L., Boissin, J. and Ortavant, R., 1982. Circadian photosensitive phase and photoperiodic control of testis activity in the mink (Mustela vison Peale and Beauvois), a short-day mammal. Biology of Reproduction 26, 110-9.

Boitani, C., Stefanini, M., Fragale, A. and Morena, A.R., 1995. Activin stimulates sertoli cell proliferation in a defined period of rat testis development. Endocrinology 136, 5438-5444.

Bousfield, G.R., 1998. LH (Luteinizing Hormone). In: Knobil, E. and Neill, J.D. (Eds.), Encyclopedia of Reproduction. Academic Press, pp. 1034-1054.

Brehm, R., 2005. The adult sertoli cell. In: Brehm, R. and Steger, K. (Eds.), Regulation of sertoli cell and germ cell differentiation. Springer Verlag GmbH, Berlin, pp. 7-36.

Brehm, R. and Steger, K., 2005. Regulation of sertoli cell and germ cell differentiation. Advances in Anatomy, Embryology & Cell Biology 181, 1-93.

Bruchovsky, N. and Wilson, J.D., 1968. The intranuclear binding of testosterone and 5-alpha-androstan-17-beta-ol-3-one by rat prostate. Journal of Biological Chemistry 243, 5953-60.

Chapman, S.C. and Woodruff, T.K., 2001. Modulation of activin signal transduction by inhibin B and inhibin-binding protein (InhBP). Molecular Endocrinology 15, 668-79.

Cheifetz, S., Andres, J.L. and Massague, J., 1988. The transforming growth factor-beta receptor type III is a membrane proteoglycan. Domain structure of the receptor. Journal of Biological Chemistry 263, 16984-91.

Cheifetz, S., Weatherbee, J.A., Tsang, M.L., Anderson, J.K., Mole, J.E., Lucas, R. and Massague, J., 1987. The transforming growth factor-beta system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. Cell 48, 409-15.

Chong, H., Pangas, S.A., Bernard, D.J., Wang, E., Gitch, J., Chen, W., Draper, L.B., Cox, E.T. and Woodruff, T.K., 2000. Structure and expression of a membrane component of the inhibin receptor system. Endocrinology 141, 2600-7.

Courot, M. and Ortavant, R., 1981. Endocrine control of spermatogenesis in the ram. Journal of Reproduction & Fertility - Supplement 30, 47-60.

Cuevas, P., Ying, S.Y., Ling, N., Ueno, N., Esch, F. and Guillemin, R., 1987. Immunohistochemical detection of inhibin in the gonad. Biochemical & Biophysical Research Communications 142, 23-30.

Danzo, B.J., Eller, B.C. and Orgebin-Crist, M.C., 1974. Studies on the site of origin of the androgen binding protein present in epididymal cytosol from mature intact rabbits. Steroids 24, 107-22.

de Kretser, D.M. and Robertson, D.M., 1989. The isolation and physiology of inhibin and related proteins. Biology of Reproduction 40, 33-47.

de Winter, J.P., Vanderstichele, H.M., Timmerman, M.A., Blok, L.J., Themmen, A.P. and de Jong, F.H., 1993. Activin is produced by rat sertoli cells in vitro and can act as an autocrine regulator of sertoli cell function. Endocrinology 132, 975-82.

de Winter, J.P., Vanderstichele, H.M., Verhoeven, G., Timmerman, M.A., Wesseling, J.G. and de Jong, F.H., 1994. Peritubular myoid cells from immature rat testes secrete activin-A and express activin receptor type II in vitro. Endocrinology 135, 759-67.

DePalatis, L., Moore, J. and Falvo, R.E., 1978. Plasma concentrations of testosterone and LH in the male dog. Journal of Reproduction & Fertility 52, 201-7.

Dixon, W.J., 1993. BMDP Statistical Software Manual. University of California Press Berkeley, Los Angeles, London.

Döcke, F., 1994. Keimdrüsen. In: Döcke, F. (Ed.), Veterinärmedizinische Endokrinologie. Gustav Fischer, Jena, pp. 399-498.

Dufau, M.L., Baukal, A.J. and Catt, K.J., 1980. Hormone-induced guanyl nucleotide binding and activation of adenylate cyclase in the leydig cell. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 77, 5837-41.

Dufau, M.L., Winters, C.A., Hattori, M., Aquilano, D., Baranao, J.L., Nozu, K., Baukal, A. and Catt, K.J., 1984. Hormonal regulation of androgen production by the leydig cell. Journal of Steroid Biochemistry 20, 161-73.

Dym, M., 1973. The fine structure of the monkey (Macaca) sertoli cell and its role in maintaining the blood-testis barrier. The Anatomical Record 175, 639-656.

Dym, M. and Cavicchia, J.C., 1977. Further observations on the blood-testis barrier in monkeys. Biology of Reproduction 17, 390-403.

Dym, M. and Clermont, Y., 1970. Role of spermatogonia in the repair of the seminiferous epithelium following x-irradiation of the rat testis. American Journal of Anatomy 128, 265-282.

Ebner, R., Chen, R.H., Lawler, S., Zioncheck, T. and Derynck, R., 1993. Determination of type I receptor specificity by the type II receptors for TGF-beta or activin. Science 262, 900-902.

Ebner, V.v., 1888. Zur Spermatogenese bei den Säugetieren. Archiv für Mikroskopische Anatomie 31, 236-292.

Fang, J., Yin, W., Smiley, E., Wang, S.Q. and Bonadio, J., 1996. Molecular cloning of the mouse activin beta E subunit gene. Biochemical & Biophysical Research Communications 228, 669-74.

Fijak, M. and Meinhardt, A., 2006. The testis in immune privilege. Immunological Reviews 213, 66-81.

Foote, R.H., Swierstra, E.E. and Hunt, W.L., 1972. Spermatogenesis in the dog. Anatomical Record 173, 341-51.

Foreman, D., 2007. Inhibin may be involved in negative feedback in the prairie dog (Cynomys ludovicianus). Journal of Experimental Zoology Part A-Ecological Genetics & Physiology 307, 67-74.

Forti, G., Vannelli, T., Barni, G., Balboni, C., Orlando, C. and Serio, M., 1992. Sertoli-germ cells interactions in the human testis. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology Biol 43, 419-422.

French, F.S. and Ritzén, E.M., 1973. A high affinity androgen-binding protein (ABP) in rat testis: evidence for secretion into efferent duct fluid and absorption by epididymis. Endocrinology 93, 88-95.

Fukuda, M., Miyamoto, K., Hasegawa, Y., Nomura, M., Igarashi, M., Kangawa, K. and Matsuo, H., 1986. Isolation of bovine follicular fluid inhibin of about 32 kDa. Molecular & Cellular Endocrinology 44, 55-60.

Gentil, M., 2012. Wiedereinsetzen der Steroidbiosynthese nach Downregulation der Hodenfunktion beim Rüden: Expression von StaR-Protein, P450scc und P450c17. Dr. med. vet. Justus-Liebig Universität, Gießen.

Gentil, M., Hoffmann, B., Spang, A., Failing, K. and Goericke-Pesch, S., 2012. Restart of steroidogenesis in dogs during recrudescence of testicular function following downregulation with a GnRH-agonist implant. Cell & Tissue Research 350, 513-23.

Gloyna, R.E., Siiteri, P.K. and Wilson, J.D., 1970. Dihydrotestosterone in prostatic hypertrophy. II. The formation and content of dihydrotestosterone in the hypertrophic canine prostate and the effect of dihydrotestosterone on prostate growth in the dog. Journal of Clinical Investigation 49, 1746-53.

Gobello, C., 2007. New GnRH analogs in canine reproduction. Animal Reproduction Science 100, 1-13.

Goericke-Pesch, S., Gentil, M., Spang, A., Kowalewski, M.P., Failing, K. and Hoffmann, B., 2013. Status of the down-regulated canine testis using two different GnRH agonist implants in comparison with the juvenile testis. Reproduction 146, 517-526.

Goericke-Pesch, S., Georgiev, P., Antonov, A., Albouy, M. and Wehrend, A., 2011. Clinical efficacy of a GnRH-agonist implant containing 4.7 mg deslorelin, Suprelorin, regarding suppression of reproductive function in tomcats. Theriogenology 75, 803-10.

Goericke-Pesch, S., Spang, A., Schulz, M., Ozalp, G., Bergmann, M., Ludwig, C. and Hoffmann, B., 2009. Recrudescence of spermatogenesis in the dog following downregulation using a slow release GnRH agonist implant. Reproduction in Domestic Animals 44 Suppl 2, 302-8.

Goericke-Pesch, S., Wilhelm, E., Ludwig, C., Desmoulins, P.O., Driancourt, M.A. and Hoffmann, B., 2010. Evaluation of the clinical efficacy of Gonazon implants in the treatment of reproductive pathologies, behavioral problems, and suppression of reproductive function in the male dog. Theriogenology 73, 920-6.

Goeritz, F., Quest, M., Wagener, A., Fassbender, M., Broich, A., Hildebrandt, T.B., Hofmann, R.R. and Blottner, S., 2003. Seasonal timing of sperm production in roe deer: interrelationship among changes in ejaculate parameters, morphology and function of testis and accessory glands. Theriogenology 59, 1487-502.

Gregory, S.J. and Kaiser, U.B., 2004. Regulation of gonadotropins by inhibin and activin. Seminars in Reproductive Medicine 22, 253-67.

Grino, P.B., Griffin, J.E. and Wilson, J.D., 1990. Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. Endocrinology 126, 1165-72.

Gudermann, T., Nurnberg, B. and Schultz, G., 1995. Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 1. G-protein-coupled receptors: structure and function. Journal of Molecular Medicine 73, 51-63.

Günzel-Apel, A., Brinckmann, H.-G. and Hoppen, H.-O., 1990. Dynamik der LH- und Testosteron-Sekretion bei Beagle-Rüden verschiedener Altersgruppen. Reproduction in Domestic Animals 25, 78-86.

Günzel-Apel, A.R., Hille, P. and Hoppen, H.O., 1994. Spontaneous and GnRH-induced pulsatile LH and testosterone release in pubertal, adult and aging male beagles. Theriogenology 41, 737-45.

Hagenäs, L., Ritzén, E.M., Plöen, L., Hansson, V., French, F.S. and Nayfeh, S.N., 1975. Sertoli cell origin of testicular androgen-binding protein (ABP). Molecular and Cellular Endocrinology, 339-350.

Hammond, G.L., Underhill, D.A., Smith, C.L., Goping, I.S., Harley, M.J., Musto, N.A., Cheng, C.Y. and Bardin, C.W., 1987. The cDNA-deduced primary structure of human sex hormone-binding globulin and location of its steroid-binding domain. FEBS Letters 215, 100-104.

Hansson, V., Reusch, E., Trygstad, O., Torgersen, O., Ritzen, E.M. and French, F.S., 1973. FSH stimulation of testicular androgen binding protein. Nature - New Biology 246, 56-8.

Hayes, F.J., DeCruz, S., Seminara, S.B., Boepple, P.A. and Crowley, W.F., Jr., 2001. Differential regulation of gonadotropin secretion by testosterone in the human male: absence of a negative feedback effect of testosterone on follicle-stimulating hormone secretion. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 86, 53-8.

Hess, R.A. and Franca, L.R., 2005. Structure of the sertoli cell. In: Skinner, M.K. and Griswold, M.S. (Eds.), Sertoli Cell Biology. Elsevier Academic Press, pp. 19-40.

Hiipakka, R.A. and Liao, S., 1998. Dihydrotestosterone. In: Knobil, E. and Neill, J.D. (Eds.), Encyclopedia of Reproduction. Academic Press San Diego, pp. 872-879.

Hikim, A.P., Bartke, A.J. and Russell, L.D., 1988. The seasonal breeding hamster as a model to study structure-function relationships in the testis. Tissue & Cell 20, 63-78.

Hoffmann, B., 2003. Andrologie, Physiologie, Pathologie und Biotechnologie der männlichen Fortplanzung. LOB.de-Lehmanns Media.

Holstein, A.F., Schulze, W. and Davidoff, M., 2003. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. Reproductive Biology & Endocrinology 1, 107.

Hötten, G., Neidhardt, H., Schneider, C. and Pohl, J., 1995. Cloning of a new member of the TGF-β family: A putative new Activin β_C chain. Biochemical & Biophysical Research Communications 206, 608-613.

Hsu, S.M., Raine, L. and Fanger, H., 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. Journal of Histochemistry & Cytochemistry 29, 577-80.

Ibach, B., Weissbach, L. and Hilscher, B., 1976. Stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the dog. Andrologia 8, 297-307.

Illingworth, P.J., Groome, N.P., Byrd, W., Rainey, W.E., McNeilly, A.S., Mather, J.P. and Bremner, W.J., 1996. Inhibin-B: a likely candidate for the physiologically important form of inhibin in men. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 81, 1321-5.

Inaba, T., Umehara, T., Mori, J., Torii, R., Tamada, H. and Sawada, T., 1996. Reversible suppression of pituitary-testicular function by a sustained-release formulation of a GnRH agonist (leuprolide acetate) in dogs. Theriogenology 46, 671-7.

Itoh, S., Ericsson, J., Nishikawa, J., Heldin, C.H. and ten Dijke, P., 2000. The transcriptional co-activator P/CAF potentiates TGF-beta/Smad signaling. Nucleic Acids Research 28, 4291-8.

James, R.W., Crook, D. and Heywood, R., 1979. Canine pituitary-testicular function in relation to toxicity testing. Toxicology 13, 237-47.

Johnson, L., 1995. Efficiency of spermatogenesis. Microscopy Research & Technique 32, 385-422.

Johnson, M.H., 1970. An immunological barrier in the guinea-pig testis. Journal of Pathology 101, 129-139.

Jones, G.E. and Boyns, A.R., 1974. Effect of gonadal steroids on the pituitary responsiveness to synthetic luteinizing hormone releasing hormone in the male dog. Journal of enndrocrinology 61, 123-131.

Junaidi, A., Williamson, P.E., Cummins, J.M., Martin, G.B., Blackberry, M.A. and Trigg, T.E., 2003. Use of a new drug delivery formulation of the gonadotrophin-releasing hormone analogue deslorelin for reversible long-term contraception in male dogs. Reproduction, Fertility, & Development 15, 317-22.

Junaidi, A., Williamson, P.E., Martin, G.B., Blackberry, M.A., Cummins, J.M. and Trigg, T.E., 2009. Dose-response studies for pituitary and testicular function in male dogs treated with the GnRH superagonist, deslorelin. Reproduction in Domestic Animals 44, 725-34.

Junaidi, A., Williamson, P.E., Martin, G.B., Stanton, P.G., Blackberry, M.A., Cummins, J.M. and Trigg, T.E., 2007. Pituitary and testicular endocrine responses to exogenous gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and luteinising hormone in male dogs treated with GnRH agonist implants. Reproduction, Fertility and Development 19, 891-898.

Kaipia, A., Penttila, T.L., Shimasaki, S., Ling, N., Parvinen, M. and Toppari, J., 1992. Expression of inhibin beta A and beta B, follistatin and activin-A receptor messenger ribonucleic acids in the rat seminiferous epithelium. Endocrinology 131, 2703-10.

Key, M., 2009a. Immunihistochemistry staining methods. In: Rudbeck, G.L.K.u.L. (Ed.), Education guide - Immunohistochemical staining methods. Dako, Carpinteria.

Key, M., 2009b. Pathology- Education Guide - Immunihistochemical Staining Methods. Dako Carpinteria.

Kingsley, D.M., 1994. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. Genes & Development 8, 133-46.

Kliesch, S., Penttila, T.L., Gromoll, J., Saunders, P.T., Nieschlag, E. and Parvinen, M., 1992. FSH receptor mRNA is expressed stage-dependently during rat spermatogenesis. Molecular & Cellular Endocrinology 84, R45-9.

Klonisch, T., Schon, J., Hombach-Klonisch, S. and Blottner, S., 2006. The roe deer as a model for studying seasonal regulation of testis function. International Journal of Andrology 29, 122-8.

Kluin, P.M., Kramer, M.F. and de Rooij, D.G., 1984. Proliferation of spermatogonia and sertoli cells in maturing mice. Anatomy and Embryology 169, 73-78.

Knol, B.W., Dieleman, S.J., Bevers, M.M. and van den Brom, W.E., 1993. GnRH in the male dog: dose-response relationships with LH and testosterone. Journal of Reproduction & Fertility 98, 159-61.

Kogawa, K., Nakamura, T., Sugino, K., Takio, K., Titani, K. and Sugino, H., 1991. Activin-binding protein is present in pituitary. Endocrinology 128, 1434-40.

Lebelo, S.L. and van der Horst, G., 2010. The ultrastructure of the sertoli cell of the vervet monkey, Chlorocebus aethiops. Tissue & Cell 42, 348-354.

Lebrun, J.J., Takabe, K., Chen, Y. and Vale, W., 1999. Roles of pathway-specific and inhibitory Smads in activin receptor signaling. Molecular Endocrinology 13, 15-23

Lebrun, J.J. and Vale, W.W., 1997. Activin and inhibin have antagonistic effects on ligand-dependent heteromerization of the type I and type II activin receptors and human erythroid differentiation. Molecular & Cellular Biology 17, 1682-91.

Lee, W., Mason, A.J., Schwall, R., Szonyi, E. and Mather, J.P., 1989. Secretion of activin by interstitial cells in the testis. Science 243, 396-8.

Leversha, L.J., Robertson, D.M., de Vos, F.L., Morgan, F.J., Hearn, M.T.W., Wettenhall, R.E.H., Findlay, J.K., Burger, H.G. and de Kretser, D.M., 1987. Isolation of inhibin from ovine follicular fluid. Journal of Endocrinology 113, 213-221.

Lewis, K.A., Gray, P.C., Blount, A.L., MacConell, L.A., Wiater, E., Bilezikjian, L.M. and Vale, W., 2000. Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. Nature 404, 411-4.

Leydig, F.v., 1850. Zur Anatomie der männlichen Geschlechtsorgane und Analdrüsen der Säugetiere. Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie 2, 1-57.

Liebich, H.-G., 1999. Männliche Geschlechtsorgane (Organa genitalia masculina). In: Liebich, H.-G. (Ed.), Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, pp. 262-283.

Ling, N., Ying, S.Y., Ueno, N., Esch, F., Denoroy, L. and Guillemin, R., 1985. Isolation and partial characterization of a Mr 32,000 protein with inhibin activity from porcine follicular fluid. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 82, 7217-21.

Ling, N., Ying, S.Y., Ueno, N., Shimasaki, S., Esch, F., Hotta, M. and Guillemin, R., 1986. Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin. Nature 321, 779-82.

Ludwig, C., 2008. Downregulation der hypophysären GnRH-Rezeptoren mit einem neuen GnRH-Implantat beim Rüden. Dr. med. vet. Justus-Liebig Universität, Gießen.

Ludwig, C., Desmoulins, P.O., Driancourt, M.A., Goericke-Pesch, S. and Hoffmann, B., 2009. Reversible downregulation of endocrine and germinative testicular function (hormonal castration) in the dog with the GnRH-agonist azaglynafarelin as a removable implant "Gonazon"; a preclinical trial. Theriogenology 71, 1037-45.

Majdic, G., McNeilly, A.S., Sharpe, R.M., Evans, L.R., Groome, N.P. and Saunders, P.T., 1997. Testicular expression of inhibin and activin subunits and follistatin in the rat and human fetus and neonate and during postnatal development in the rat. Endocrinology 138, 2136-47.

Marchetti, C., Hamdane, M., Mitchell, V., Mayo, K., Devisme, L., Rigot, J.M., Beauvillain, J.C., Hermand, E. and Defossez, A., 2003. Immunolocalization of inhibin and activin alpha and betaB subunits and expression of corresponding messenger RNAs in the human adult testis. Biology of Reproduction 68, 230-5.

Marino, G. and Zanghi, A., 2012. Activins and Inhibins: Expression and role in normal and pathological canine reproductive organs: A review. Anatomia, Histologia, Embryologia. 42, 1-8.

Martens, J.W., de Winter, J.P., Timmerman, M.A., McLuskey, A., van Schaik, R.H., Themmen, A.P. and de Jong, F.H., 1997. Inhibin interferes with activin signaling at the level of the activin receptor complex in Chinese hamster ovary cells. Endocrinology 138, 2928-36.

Massague, J. and Like, B., 1985. Cellular receptors for type beta transforming growth factor. Ligand binding and affinity labeling in human and rodent cell lines. Journal of Biological Chemistry 260, 2636-45.

Massague, J. and Wotton, D., 2000. Transcriptional control by the TGF-β/Smad signaling system. The Embo Journal 19, 1745-1754.

Mather, J.P., Attie, K.M., Woodruff, T.K., Rice, G.C. and Phillips, D.M., 1990. Activin stimulates spermatogonial proliferation in germ-sertoli cell cocultures from immature rat testis. Endocrinology 127, 3206-14.

Mather, J.P., Woodruff, T.K. and Krummen, L.A., 1992. Paracrine regulation of reproductive function by inhibin and activin. Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine 201, 1-15.

Mathews, L.S. and Vale, W.W., 1991. Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. Cell 65, 973-82.

Mathews, L.S., Vale, W.W. and Kintner, C.R., 1992. Cloning of a second type of activin receptor and functional characterization in Xenopus embryos. Science 255, 1702-5.

Matsuzaki, S., Uenoyama, Y., Okuda, K., Watanabe, G., Kitamura, N., Taya, K., Cruzana, M.B. and Yamada, J., 2001. Prepubertal changes in immunoreactive inhibin concentration in blood serum and testicular tissue in Holstein bull calves. Journal of veterinary medical science 63, 1303-1307.

McLachlan, R.I., Matsumoto, A.M., Burger, H.G., De Kretser, D.M. and Bremner, W.J., 1988. Relative roles of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in the controle of inhibin secretion in normal men. Journal of Clinical. Investigation 82, 880-884.

McLachlan, R.I., O'Donnell, L., Meachem, S.J., Stanto, P.G., De Kretser, D.M. and Robertson, D.M., 1996. The endocrine regulation of spermatogenesis: Independent roles for testosteron and FSH. Journal of endocrinology 148, 1-9.

Meehan, T., Schlatt, S., O'Bryan, M.K., De Kretser, D.M. and Lakoski Loveland, K., 2000. Regulation of germ cell and sertoli cell development by activin, follistatin, and FSH. Developmental Biology 220, 225-237.

Meinhardt, A., O'Bryan, M.K., McFarlane, J.R., Loveland, K.L., Mallidis, C., Foulds, L.M., Phillips, D.J. and de Kretser, D.M., 1998. Localization of follistatin in the rat testis. Journal of Reproduction & Fertility 112, 233-41.

Mellor, S.L., Cranfield, M., Ries, R., Pedersen, J., Cancilla, B., de Kretser, D., Groome, N.P., Mason, A.J. and Risbridger, G.P., 2000. Localization of activin beta(A)-, beta(B)-, and beta(C)-subunits in humanprostate and evidence for formation of new activin heterodimers of beta(C)-subunit. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 85, 4851-8.

Meunier, H., Rivier, C., Evans, R.M. and Vale, W., 1988. Gonadal and extragonadal expression of inhibin alpha, beta A, and beta B subunits in various tissues predicts diverse functions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 85, 247-51.

Millar, R.P., 2005. GnRHs and GnRH receptors. Animal Reproduction Science 88, 5-28.

Miyamoto, K., Hasegawa, Y., Fukuda, M., Nomura, M., Igarashi, M., Kangawa, K. and Matsuo, H., 1985. Isolation of porcine follicular fluid inhibin of 32 kDa. Biochemical & Biophysical Research Communications 129, 396-403.

Mruk, D.D. and Cheng, C.Y., 2004. Sertoli-sertoli and sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. Endocrine Reviews 25, 747-806.

Munell, F., Suarez-Quian, C.A., Selva, D.M., Tirado, O.M. and Reventos, J., 2002. Androgen-binding protein and reproduction: where do we stand? Journal of Andrology 23, 598-609.

Nakamura, T., Takio, K., Eto, Y., Shibai, H., Titani, K. and Sugino, H., 1990. Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. Science 247, 836-8.

Nakao, A., Imamura, T., Souchelnytskyi, S., Kawabata, M., Ishisaki, A., Oeda, E., Takami, K., Hanai, J., Heldin, C.H., Miyazono, K. and Ten Dijke, P., 1997. TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. EMBO 16, 5353-5362.

Noguchi, J., Hikono, H., Sato, S., Watanabe, G., Taya, K., Sasamoto, S. and Hasegawa, Y., 1997. Ontogeny of inhibin secretion in the rat testis: secretion of inhibin-related proteins from fetal leydig cells and of bioactive inhibin from sertoli cells. Journal of Endocrinology 155, 27-34.

Oda, S., Nishimatsu, S., Murakami, K. and Ueno, N., 1995. Molecular cloning and functional analysis of a new activin beta subunit: a dorsal mesoderm-inducing activity in Xenopus. Biochemical & Biophysical Research Communications 210, 581-8.

Orth, J.M., 1982. Proliferation of sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. Anatomical Record 203, 485-492.

Padmanabhan, V., Evans, N.P., Dahl, G.E., McFadden, K.L., Mauger, D.T. and Karsch, F.J., 1995. Evidence for short or ultrashort loop negative feedback of gonadotropin-releasing hormone secretion. Neuroendocrinology 62, 248-58.

Padmanabhan, V., Karsch, F.J. and Lee, J.S., 2002. Hypothalamic, pituitary and gonadal regulation of FSH. Reproduction Supplement 59, 67-82.

Pangas, S.A. and Woodruff, T.K., 2000. Activin signal transduction pathways. Trends in Endocrinology & Metabolism 11, 309-14.

Peters, M.A., de Jong, F.H., Teerds, K.J., de Rooij, D.G., Dieleman, S.J. and van Sluijs, F.J., 2000. Ageing, testicular tumours and the pituitary-testis axis in dogs. Journal of Endocrinology 166, 153-61.

Petrusz, P., 2002. Androgen-binding protein. Encyclopedia of Molecular Medicine.

Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research 29, e45.

Pfaffl, M.W., 2004. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. Biospekturm.

Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. and Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Research 30, e36.

Piek, E., Heldin, C.H. and Ten Dijke, P., 1999. Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. FASEB Journal 13, 2105-24.

Pineda, M.H., 2003. Male reproductive system. In: Pineda, M.H. (Ed.), McDonalds veterinary endorinology and reproduction. Iowa State Press, Ames, Iowa:, pp. 239-282.

Raeside, J.I., Christie, H.L. and Renaud, R.L., 1999. Androgen and estrogen metabolism in the reproductive tract and accessory sex glands of the domestic boar (Sus scrofa). Biology of Reproduction 61, 1242-8.

Ramaswamy, S., Marshall, G.R., McNeilly, A.S. and Plant, T.M., 1999. Evidence that in a physiological setting sertoli cell number is the major determinant of circulating concentrations of inhibin B in the adult male rhesus monkey (Macaca mulatta). Journal of Andrology 20, 430-4.

Rannikki, A.S., Zhang, F.P. and Huhtaniemi, I.T., 1995. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in the rat testis and ovary. Molecular & Cellular Endocrinology 107, 199-208.

Reichert, J.L.E., 1998. FSH (follicle-stimulating hormone). In: Ernst Knobil, J.D.N. (Ed.), Encyclopedia of Reproduction. Academic Press, San Diego, pp. 418-422.

Riesenbeck, A., Klein, R. and Hoffmann, B., 2002. Downregulation, eine neue, reversible Möglichkeit zur Ausschaltung der Hodenfunktion beim Rüden. Praktischer Tierarzt 83, 512-520.

Riesenbeck, A., Vögler, D. and Hoffmann, B., 2001. Praxisnahe Bestimmung von Vitalitätsparametern zur Beurteilung von Rüdensperma. Tierarzt Praxis 29 (K), 116-120.

Ritzen, E.M., Boitani, C., Parvinen, M., French, F.C. and Feldman, M., 1982. Stage-dependent secretion of ABP by rat seminiferous tubules. Molecular & Cellular Endocrinology 25, 25-33.

Rivier, C., Cajander, S., Vaughan, J., Hsueh, A.J. and Vale, W., 1988. Age-dependent changes in physiological action, content, and immunostaining of inhibin in male rats. Endocrinology 123, 120-6.

Rivier, J., Spiess, J., McClintock, R., Vaughan, J. and Vale, W., 1985. Purification and partial characterization of inhibin from porcine follicular fluid. Biochemical & Biophysical Research Communications 133, 120-7.

Roberts, V., Meunier, H., Sawchenko, P.E. and Vale, W., 1989. Differential production and regulation of inhibin subunits in rat testicular cell types. Endocrinology 125, 2350-9.

Robertson, D.M., Foulds, L.M., Leversha, L., Morgan, F.J., Hearn, M.T., Burger, H.G., Wettenhall, R.E. and de Kretser, D.M., 1985. Isolation of inhibin from bovine follicular fluid. Biochemical & Biophysical Research Communications 126, 220-6.

Robertson, D.M., Klein, R., de Vos, F.L., McLachlan, R.I., Wettenhall, R.E., Hearn, M.T., Burger, H.G. and de Kretser, D.M., 1987. The isolation of polypeptides with FSH suppressing activity from bovine follicular fluid which are structurally different to inhibin. Biochemical & Biophysical Research Communications 149, 744-9.

Roelants, H., Schneider, F., Goritz, F., Streich, J. and Blottner, S., 2002. Seasonal changes of spermatogonial proliferation in roe deer, demonstrated by flow cytometric analysis of c-kit receptor, in relation to follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, and testosterone. Biology of Reproduction 66, 305-12.

Röhrs, L., 2013. Untersuchung der Blut-Hoden-Schranke während der Rekrudeszenz der Spermatogenese nach Downregulation mittels eines slow release GnRH-Implantates beim Rüden: Expression von Connexin 43, Occuldin, Claudin-3, -5 und -11. Dr. med. vet. Justus-Liebig Universität, Gießen.

Rone, M.B., Fan, J. and Papadopoulos, V., 2009. Cholesterol transport in steroid biosynthesis: Role of protein-protein interactions and implications in disease states. Biochimica et Biophysica Acta 1791, 646-658.

Russell, L., Ettlin, R.A., Sinha Hikim, A.P. and Clegg, E.D., 1990a. Histological and histopathological evaluation of the testis. Cache River Press St. Louis.

Russell, L.D., 1993. Role in spermiation. In: Russell, L.D. and Griswold, M.D. (Eds.), The sertoli cell. Cache River Press, Clearwater, pp. 269-304.

Russell, L.D., Bartke, A. and Goh, J.C., 1989. Postnatal development of the sertoli cell barrier, tubular lumen, and cytoskeleton of sertoli and myoid cells in the rat, and their relationship of tubular fluid secretion and flow. American Journal of Anatomy 184, 179-189.

Russell, L.D., Ettlin, R.A., Shinha Hikim, A.P. and Clegg, E.D., 1990b. Mammalian Spermatogenesis. In: Russell, L.D., Ettlin, R.A., Sinha Hikim, A.P. and Clegg, E.D. (Eds.), Histological and histopathological evaluation of the testis. Cache River Press, St. Louis.

Russell, L.D. and Frank, B., 1978. Characterization of rat spermatocytes after plastic embedding. Archieves of Andrology 1, 5-18.

Russell, L.D., Tallon-Doran, M., Weber, J.E., Wong, V. and Peterson, R.N., 1983. Three-dimensional reconstruction of a rat stage V sertoli cell: III. A study of specific cellular relationships. American Journal of Anatomy 167, 181-192.

Savage, C., Das, P., Finelli, A.L., Townsend, S.R., Sun, C.Y., Baird, S.E. and Padgett, R.W., 1996. Caenorhabditis elegans genes sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93, 790-4.

Schallenberger, E., 1990. Characterization of the secretion rhythm of gonadotropins and ovarian steroids during the oestrous cycle, pregnancy and post partum in cattle. Advances in Veterinary Medicine 40, 117 pp.

Schally, A.V., Arimura, A., Baba, Y., Nair, R.M., Matsuo, H., Redding, T.W. and Debeljuk, L., 1971. Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. Biochemical & Biophysical Research Communications 43, 393-9.

Schally, A.V., Arimura, A. and Kastin, A.J., 1973. Hypothalamic regulatory hormones - At least nine substances from the hypothalamus control the secretion of pituitary hormones. Science 179, 341-350.

Schams, D. and Barth, D., 1982. Annual profiles of reproductive hormones in peripheral plasma of the male roe deer (Capreolus capreolus). Journal of Reproduction & Fertility 66, 463-8.

Schneyer, A.L., Hall, H.A., Lambert-Messerlian, G., Wang, Q.F., Sluss, P. and Crowley, W.F., Jr., 1996. Follistatin-activin complexes in human serum and follicular fluid differ immunologically and biochemically. Endocrinology 137, 240-7.

Schnorr, B. and Kressin, M., 2006. Embryologie der Haussäugetiere. Enke Verlag, MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co. KG Stuttgart.

Schön, J., Goritz, F., Streich, J. and Blottner, S., 2004. Histological organization of roe deer testis throughout the seasonal cycle: variable and constant components of tubular and interstitial compartment. Anatomy & Embryology 208, 151-9.

Schwall, R.H., 1998a. Inhibin. In: Knobil, E. and Neill, J.D. (Eds.), Encyclopedia of Reproduction. Academic Press, pp. 832-839.

Schwall, R.H., 1998b. Activin and activin receptors. In: Knobil, E. and Neill, J.D. (Eds.), Encylopedia of Reproduction. Academic Press, pp. 26-35.

Segarini, P.R. and Seyedin, S.M., 1988. The high molecular weight receptor to transforming growth factor-beta contains glycosaminoglycan chains. Journal of Biological Chemistry 263, 8366-70.

Sekelsky, J.J., Newfeld, S.J., Raftery, L.A., Chartoff, E.H. and Gelbart, W.M., 1995. Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in Drosophila melanogaster. Genetics 139, 1347-58.

Sempere, A.J. and Boissin, J., 1981. Relationship between antler development and plasma androgen concentrations in adult roe deer (Capreolus capreolus). Journal of Reproduction & Fertility 62, 49-53.

Sempere, A.J., Mauget, R. and Bubenik, G.A., 1992. Influence of photoperiod on the seasonal pattern of secretion of luteinizing hormone and testosterone and on the antler cycle in roe deer (Capreolus capreolus). Journal of Reproduction & Fertility 95, 693-700.

Setchell, B.P., 1967. The blood-testicular fluid barrier in sheep. Journal of Physiology 189, 63P-65P.

Shaha, C., Morris, P.L., Chen, C.L., Vale, W. and Bardin, C.W., 1989. Immunostainable inhibin subunits are in multiple types of testicular cells. Endocrinology 125, 1941-50.

Sharpe, R.M., McKinnell, C., Kivlin, C. and Fisher, J.S., 2003. Proliferation and functional maturation of sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. Reproduction 125, 769-84.

Sharpe, R.M., Turner, K.J., McKinnell, C., Groome, N.P., Atanassova, N., Millar, M.R., Buchanan, D.L. and Cooke, P.S., 1999. Inhibin B levels in plasma of the male rat from birth to adulthood: effect of experimental manipulation of sertoli cell number. Journal of Andrology 20, 94-101.

Sheng, X., Zhang, H., Zhang, M., Zhang, W., Hu, X., Song, M., Zhou, J., Xu, M., Weng, Q., Watanabe, G. and Taya, K., 2012. Seasonal changes in immunoreactivity of activin signaling component proteins in wild ground squirrel testes. Journal of Reproduction & Development 58, 126-131.

Sheng, X., Zhang, H., Zhang, W., Song, M., Zhang, M., Li, B., Weng, Q., Watanabe, G. and Taya, K., 2008. Seasonal changes in spermatogenesis and immunolocalization of inhibin/activin subunits in the wild male ground squirrel (Citellus dauricus Brandt). Journal of Reproduction & Development 54, 460-4.

Shimasaki, S., Koga, M., Esch, F., Mercado, M., Cooksey, K., Koba, A. and Ling, N., 1988. Porcine follistatin gene structure supports two forms of mature follistatin produced by alternative splicing. Biochemical & Biophysical Research Communications 152, 717-23.

Shimonaka, M., Inouye, S., Shimasaki, S. and Ling, N., 1991. Follistatin binds to both activin and inhibin through the common subunit. Endocrinology 128, 3313-5.

Short, R.V. and Mann, T., 1966. The sexual cycle of a seasonally breeding mammal,the roebuck (Capreolus capreolus). Journal of Reproduction & Fertility 12, 337-51.

Simoni, M. and Nieschlag, E., 1995. FSH in therapy: physiological basis, new preparations and clinical use. Reproductive Medicine Review 4, 163-177.

Sinowatz, F., 2001. Morphologie und Histologie der männlichen Genitalorgane. In: Busch, W. and Holzmann, A. (Eds.), Veterinärmedizinische Andrologie. F. K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, pp. 1-22.

Skinner, M.K., 2005. Sertoli cell secreted regulatory factors. In: Skinner, M.K. and Griswold, M.D. (Eds.), Sertoli Cell Biology. Elsevier Academic Press, pp. 107-120.

Souchelnytskyi, S., Tamaki, K., Engstrom, U., Wernstedt, C., Ten Dijke, P. and Heldin, C.H., 1997. Phosphorylation of Ser465 and Ser467 in the C terminus of Smad2 mediates interaction with Smad4 and is required for transforming growth factor-beta signaling. Biological Chemistry 272, 28107-28115

Steinberger, A. and Steinberger, E., 1976. Secretion of an FSH-inhibiting factor by cultured sertoli cells. Endocrinology 99, 918-21.

Steinberger, E., 1971. Hormonal control of mammalian spermatogenesis. Physiological Reviews 51, 1-22.

Steinlechner, S., 1992. Impact of photoperiod and melatonin on reproduction in small mammals. Animal Reproduction Science 30, 1-28.

Su, L., Cheng, C.Y. and Mruk, D.D., 2009. Drug transporter, P-glycoprotein (MDR1), is an itegrated component of the mammalian blood-testis barrier. International Journal of Biochemistry & Cell Biology 41, 2578-87.

Sugino, K., Kurosawa, N., Nakamura, T., Takio, K., Shimasaki, S., Ling, N., Titani, K. and Sugino, H., 1993. Molecular heterogeneity of follistatin, an activin-binding protein. Higher affinity of the carboxyl-terminal truncated forms for heparan sulfate proteoglycans on the ovarian granulosa cell. Journal of Biological Chemistry 268, 15579-87.

Tähkä, K.M., Kaipia, A., Toppari, J., Tähkä, S., Tuuri, T. and Tuohimaa, P., 1998. Hormonal and photoperiodic modulation of testicular mRNAs coding for inhibin/activin subunits and follistatin in Clethrionomys glareolus, Schreber. The Journal of experimental zoology 281, 336-345

Tähkä, K.M., Ruokonen, A., Wallgren, H. and Teräväinen, T., 1983. Temporal changes in testicular histology and steroidogenesis in juvenile bank voles (Clethrionomys glareolus, Schreber) subjected to different photoperiods. Endocrinology 112, 1420-6.

Taniyama, H., Hirayama, K., Nakada, K., Numagami, K., Yaosaka, N., Kagawa, Y., Izumisawa, Y., Nakade, T., Tanaka, Y., Watanabe, G. and Taya, K., 2001. Immunohistochemical detection of inhibin-alpha, -betaB, and -betaA chains and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in canine testicular tumors and normal testes. Veterinary Pathology 38, 661-6.

Ten Dijke, P., Ichijo, H., Franzén, P., Schulz, P., Saras, J., Toyoshima, H., Heldin, C.H. and Miyazono, K., 1993. Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. Oncogene 8, 2879-2887.

Thun, R., 1995. Physiologie und Pathophysiologie der Fortpflanzungsregulation. In: Busch, W. and K., Z. (Eds.), Fruchtbarkeitskontrolle bei Groß- und Kleintieren. Gustav Fischer Verlag Jena, pp. 19-39.

Tilbrook, A.J., Clarke, I.J. and de Kretser, D.M., 1995. Human recombinant follistatin-288 suppresses plasma concentrations of follicle-stimulating hormone but is not a significant regulator of luteinizing hormone in castrated rams. Biology of Reproduction 53, 1353-8.

Toebosch, A.M., Robertson, D.M., Trapman, J., Klaassen, P., de Paus, R.A., de Jong, F.H. and Grootegoed, J.A., 1988. Effects of FSH and IGF-I on immature rat sertoli cells: inhibin alpha- and beta-subunit mRNA levels and inhibin secretion. Molecular & Cellular Endocrinology 55, 101-5.

Tremblay, Y. and Belanger, A., 1984. Reversible inhibition of gonadal functions by a potent gonadotropin-releasing hormone agonist in adult dog. Contraception 30, 483-97.

Tremblay, Y., Belanger, A., Labrie, F., Frenette, G., Dube, J.Y. and Tremblay, R.R., 1984. Characteristics of the inhibitory effect of chronic treatment with an LHRH agonist on testicular steroidogenesis in the dog. Prostate 5, 631-8.

Tsuchida, K., Mathews, L.S. and Vale, W., 1993. Cloning and characterization of a transmembrane serine kinase that acts as an activin type I receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90, 11242-11246.

Tsuchida, K., Sawchenko, P.E., Nishikawa, S. and Vale, W.W., 1996. Molecular cloning of a novel type I receptor serine/threonine kinase for the TGF beta superfamily from rat brain. Molecular & Cellular Neurosciences 7, 467-78.

Ueno, N., Ling, N., Ying, S.Y., Esch, F., Shimasaki, S. and Guillemin, R., 1987. Isolation and partial characterization of follistatin: a single-chain Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 84, 8282-6.

Ultee-van Gessel, A.M. and De Jong, F.H., 1987. Inhibin-like activity in sertoli cell culture media and testicular homogenates from rats of various ages. Journal of Endocrinology 113, 103-110.

Ultee-van Gessel, A.M., Leemborg, F.G., de Jong, F.H. and van der Molen, H.J., 1986. In-vitro secretion of inhibin-like activity by sertoli cells from normal and prenatally irradiated immature rats. Journal of Endocrinology 109, 411-418.

Vale, W., Rivier, J., Vaughan, J., McClintock, R., Corrigan, A., Woo, W., Karr, D. and Spiess, J., 1986. Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. Nature 321, 776-9.

van Alphen, M.M., van de Kant, H.J. and de Rooij, D.G., 1988. Follicle-stimulating hormone stimulates spermatogenesis in the adult monkey. Endocrinology 123, 1449-55.

van der Molen, H.J. and Eik-Nes, K.B., 1971. Biosynthesis and secretion of steroids by the canine testis. Biochimica et Biophysica Acta 248, 343-62.

Verhoeven, G. and Franchimont, P., 1983. Regulation of inhibin secretion by sertoli cell-enriched cultures. European Journal of Endocrinology 102, 136-143.

Vickery, B.H., 1985. Comparisons of the potential utility of LHRH agonists and antagonists for fertility control. Journal of Steroid Biochemistry 23, 779-91.

Vickery, B.H., McRae, G.I. and Bonasch, H., 1982. Effect of chronic administration of a highly potent LHRH agonist on prostate size and secretory function in geriatric dogs. Prostate 3, 123-30.

Vickery, B.H., McRae, G.I., Briones, W., Worden, A., Seidenberg, R., Schanbacher, B.D. and Falvo, R., 1984. Effects of an LHRH agonist analog upon sexual function in male dogs. Suppression, reversibility, and effect of testosterone replacement. Journal of Andrology 5, 28-42.

Vliegen, M.K., Schlatt, S., Weinbauer, G.F., Bergmann, M., Groome, N.P. and Nieschlag, E., 1993. Localization of inhibin/activin subunits in the testis of adult nonhuman primates and men. Cell & Tissue Research 273, 261-8.

Wattenberg, L.W., 1958. Microscopic histochemical demonstration of steroid-3 beta-ol dehydrogenase in tissue sections. Journal of Histochemistry & Cytochemistry 6, 225-32.

Weber, J.E., Russell, L.D., Wong, V. and Peterson, R.N., 1983. Three-dimensional reconstruction of a rat stage V sertoli cell: II. Morphometry of sertoli--sertoli and sertoli--germ-cell relationships. American Journal of Anatomy 167, 163-179.

Weiss, J., Crowley, W.F., Jr., Halvorson, L.M. and Jameson, J.L., 1993. Perifusion of rat pituitary cells with gonadotropin-releasing hormone, activin, and inhibin reveals distinct effects on gonadotropin gene expression and secretion. Endocrinology 132, 2307-11.

Weng, Q., Medan, M.S., Okano, T., Murase, T., Tsubota, T., Xu, M., Watanabe, G. and Taya, K., 2006a. Changes in serum inhibin levels and immunolocalization of inhibin/activin subunits during the breeding season in the wild male Japanese black bear (Ursus thibetanus japonicus). Endrocrine 29, 345-350.

Weng, Q., Medan, M.S., Xu, M., Tsubota, T., Watanabe, G. and Taya, K., 2006. Seasonal changes in immunolocalization of inhibin/activin subunits and testicular activity in wild male raccoon dogs (Nyctereutes procyonoides). Journal of Reproduction & Development 52, 503-10.

Weng, Q., Medan, M.S., Xu, M., Tsubota, T., Watanabe, G. and Taya, K., 2006b. Seasonal changes in immunolocalization of inhibin/activin subunits and testicular activity in wild male raccoon dogs (Nyctereutes procyonoides). Journal of Reproduction & Development 52, 503-10.

Wilbert, D.M., Griffin, J.E. and Wilson, J.D., 1983. Characterization of the cytosol androgen receptor of the human prostate. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 56, 113-20.

Winter, M., Falvo, R.E., Schanbacher, B.D. and Verholtz, S., 1983. Regulation of gonadotopin secretion in the male dog of estradiol. Journal of Andrology 4, 319-323.

Winter, M., Pirmann, J., Falvo, R.E., Schanbacher, B.D. and Miller, J., 1982. Steroidal control of gonadotrophin secretion in the orchidectomized dog. Journal of reproduction and fertility 64, 449-455.

Wong, V. and Russell, L.D., 1983. Three-dimensional reconstruction of a rat stage V sertoli cell: I. Methods, basic configuration, and dimensions. American Journal of Anatomy 167, 143-161.

Woodruff, T.K., 1999. Hope, hypothesis, and the inhibin receptor. Does specific inhibin binding suggest there is a specific inhibin receptor? Endocrinology 140, 3-5.

Wu, R.Y., Zhang, Y., Feng, X.H. and Derynck, R., 1997. Heteromeric and homomeric interactions correlate with signaling activity and functional cooperativity of Smad 3 and Smad4/DPC4. Molecular & Cellular Biology 17, 2521-2528

Xu, J., McKeehan, K., Matsuzaki, K. and McKeehan, W.L., 1995. Inhibin antagonizes inhibition of liver cell growth by activin by a dominant-negative mechanism. Journal of Biological Chemistry 270, 6308-13.

Yazama, F., 2008. Continual maintenance of the blood-testis barrier during spermatogenesis: the intermediate compartment theory revisted. Journal of Reproduction & Development 54, 299-305.

Zimmermann, C.M. and Mathews, L.S., 1996. Activin receptors: cellular signalling by receptor serine kinases. Biochemical Society Symposia 62, 25-38.

9 Anhang

9.1 Stoffe und Reagenzien

Agarose	Bioline GmbH, Luckenwalde
Ammoniumperoxidisulfat / APS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
AmpliTaqGOLD™	Applied Biosystems by Life Technologies, Warrington, UK
Avidin	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
Biotin	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
ß-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Chloroform	Roti® Solv HPLC, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth, D
DNase I / RNase frei	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, D
dNTP	Applied Biosystems by Life Technologies, Warrington, UK
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
GelGreen™	Biotium, Inc. Hayward, CA, USA
Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder Plus	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth, D
Hämatoxylin-Lösung	Merck KGaA, Darmstadt, D
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Isotypenkontrolle	
Inhibin α: Isotypenkontrolle Mouse IgG2a	LINARIS biologische Produkte GmbH, Dossenheim

Inhibin $\beta_{A/B}$: Isotypenkontrolle Rabbit IgG 1000	Vector Laboratories Inc., Burlinghame, CA, USA
Ladepuffer	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth, D
Low Range DNA Ladder	Larova GmbH, Teltow, D
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, D
Nova Red™ Substrate Kit	Vector® Laboratories, Inc.; Burlingame, CA USA
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth, D
PCR-Puffer	Applied Biosystems by Life Technologies, Warrington, UK
Pferdeserum	Eigene Herstellung
Polymerase	Applied Biosystems by Life Technologies, Warrington, UK
Ponceau S	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Primärantikörper	
Inhibin α monoklonaler Antikörper, Maus-anti Mensch, 32 kDa	AbD Seritec, UKm, Katalog-Nr. MCA851ST
Inhibin β_A polyklonale Antikörper Kaninchen-anti Mensch, 47,4 kDa	Protein Tech Group, Inc., Chicago Katalog-Nr. 10651-1-AP
Inhibin β_B polyklonale Antikörper Kaninchen-anti Mensch, 45 kDa	Protein Tech Group, Inc., Chicago Katalog-Nr. 17577-1-AP
Proteinase Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
QIA-quick® PCR-Purification Kit 50	QIAGEN GmbH-Deutschland, Hilden, D
Random Hexamers	Applied Biosystems by Life Technologies, Warrington, UK
Reverse Transkriptase	Applied Biosystems by Life Technologies, Warrington, UK
RNaseAWAY®	Molecular BioProducts Inc., USA-San Diego
RNase Inhibitor	Applied Biosystems by Life Technologies, Warrington, UK
Rotiphorese® 10xSDS-PAGE	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe,

	D
Rotiphorese® 10xTAE-Puffer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
SDS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Sekundärantikörper	
Biotinylierter Pferd-anti-Maus IgG	Vector Laboratories, Inc., Burglingame
BA 2000	
Biotinylierter Ziegen-anti-Kaninchen	Vectastain® Elite ABC Kit Rabbit
IgG Antikörper	Vector Laboratories, Inc., Burglingame
SYBR Green	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
TAE-Puffer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
TEMED	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Thimerosal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Triton® X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
TRIzol® Reagent	Invitrogen, USA-Carlsbad
Tween®20	Sigma Ultra Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Wasserstoffperoxid	Merck KGaA, Darmstadt, D
Xylene	VWR International S.A.S.,ProLabo® Fontenay sous Bois, F
Ziegenserum	Vectastain® Rabbit IgG Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Inc.; USA

9.2 Verbrauchsmaterialien

Aluminiumfolie Alu-Laborfolie, 0,03mm stark, MAGV GmbH, Rabenau-Londorf, D

Assistent-Histokit Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH + Co KG, Sondheim/Rhön, D

DakoPen Dako Deutschland GmbH, Hamburg, D

Deckgläschen IDL GmbH & Co. KG, Nidderau, D

Filterpapier, dick Mini Trans-Blot® Filter Paper, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D

Glasröhrchen Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D

KimTech Tuch Kimberley Clark Prfessional, Dallas, USA

Kunststoff-Einmalküvetten UVette® Eppendorf AG, Hamburg, D

Microseal® ´B´Film Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Nitril-Handschuhe Nitrile Gloves N-DEX®, Best Manufacturing Company, Menlo, USA

Objekträger Superfrost®Plus Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, D

Objekträger IDL GmbH & Co. KG, Nidderau, D

Parafilm American National Can Group Inc. Chicago, IL, USA

Pipettenspitzen nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe, D

Pipetten Applied Biosystems by Life Technologies, Warrington, UK

PVDF-Membran Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, D

Thermo fast 96 skirted PCR Plate Themo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

Tubes 0,6 ml Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D

Tubes 2 ml Eppendorf AG, Hamburg, D

Schwammtuch gut & günstig, EDEKA Krenschker, Gießen, D

Skalpellklinge Aesculap AG, Tuttlingen, D

9.3 Verwendete Geräte

C1000TM thermal cycler Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA

Durchlichtmikroskop Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, D

Einmalklingen Disbosable Microtom Plade Leica, Wetzlar, D

Elektrophoresekammer Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA

Färbeschale und -gestell für Objektträger aus Glas mit Drahtbügel, Assistent Osterode, D

Feuchte Kammer Frischhaltebox, Curver, Niedercorn, L

Gelelektrophoresekammer EasyPhor Medi Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D

Histoembeeder 1160 Leica Biosystem Nussloch GmbH, Nussloch, D

Magnetrührer Janke & Kunkel GmbH + Co. KG, IKA-Werke, Staufen, D

Mighty Small SE245 Dual Gel Caster Hoefer® Inc., Holliston, MA, USA

Mikrowelle COMPACT Y50, Moulinex GmbH, Solingen, D

pH-Meter inoLab pH Level, Wissenschaftlich technische Werkstätten WTW, Weilheim, D

Porzellanmörser und -pistill Reibefläche rau, Carl Roth GmbH & Co, KG, Karlsruhe, D

Pumpe Thermonix 1419 B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D

Rotationsmikrotom RM2125 Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, D

Schüttler KL2 Edmund Bühler GmbH, Hechingen, D

T Personal Thermocycler Biometra GmbH, Göttingen, D

Tank-Blot-Apparatur Mini Trans Blot® Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA

Tissueflotation Bath TFB 45.000 Medite Medizintechnik, Burgdorf, D

Transilluminator 312nm Biostep GmbH, Jahnsdorf, D

Ultra Turrax® IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D

UV-Photometer Eppendorf AG, Hamburg, D

Vakuumpumpe VDE 0530 KNF Neuberger GmbH, Freiburg, D

Vortex-Mixer Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, D

Waage Mettler-Toledo GmbH, Gießen, D

Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q biocel, Millipore GmbH, Eschborn, D

Zentrifuge Mikro 22R Hettich Instruments, Berverly, MA, USA

9.4 Software

BioEdit Tom Hall, Ibis Biosciences/Abbott Laboratories, Carlsbad, CA, USA http://mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit. html

BLAST National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

BMDP/Dynamics Release 8.1, Statistische Auswertung der Ergebnisse, Statisticl Solutions Ltd., IE-Cork

CFX Manager™ Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA

Cytel Studio StatXact Version 9.0.0, 2010, Statistical Software for Exact Nonparametric Inference, User Manual. CYTEL Inc., Cambridge, MA 02139,

U.S.A.)

Image Manager IM1000 V.1.20 Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, D

Image Tool (IT) Version 3.0, Bildbearbeitung, http://compdent.uthscsa.edu/dig/itdesc.html, University of Texas, Health Science Center, San Antonio, USA

Microsoft® Office Excel 2003 Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA

Microsoft® Office Word 2003 Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA

Oligo Explorer 1.1.0 Teemu Kuulasmaa, University of Eastern Finland, Kuopio, Finland

Phoretix Grabber Version 3.01, Dokumentation von Agarose-Gelen, biostep GmbH, Jahnsdorf, D

9.5 Puffer und Lösungen
9.5.1 Proteinextraktion und Western-Blot

ABC-Lösung

ICC-Puffer	2,5 ml	s.u.
Lösung A	45 µl	Vector® Laboratories, Inc.; Burlingame, CA, USA
Lösung B	45 µl	Vector® Laboratories, Inc.; Burlingame, CA, USA

10 % APS

APS	1 g	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Aqua bidest.	1 ml	

Avidin-Lösung

Avidin	2 Tr.	Vector® Laboratories, Inc.; Burlingame, CA, USA
PBS	5 ml	s.u.

Biotin-Lösung

Biotin	2 Tr.	Vector® Laboratories, Inc.; Burlingame, CA, USA
PBS	5 ml	s.u.

Blockinpuffer

Milchpulver	5 g	J. M. Gabler Saliter GmbH & Co. KG -Milchwerk, Obergünzburg, D
PBS-Puffer	100 ml	s. u.
2 % Thimerosal	1 ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D

Elektrodenpuffer

Glycin	144 g	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
SDS	10 g	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Tris-Base	30 g	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D

Aqua bidest.	ad 1000 ml

NovaRED	Vector® Laboratories, Inc.; Burlingame, CA, USA
Aqua bidest.	5ml
Lösung 1	3 Tr.
Lösung 2	2 Tr.
Lösung 3	2 Tr.
H_2O_2	2 Tr.

PBS-Puffer

Stammlösung		
NaCl	41 g	Merck KGaA, Darmstadt,D
Na_2HPO_4 x H_2O	11 g	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
KH_2PO_4	2,75 g	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Aqua bidest.	1000 ml	
Gebrauchslösung		
Stammlösung	200 ml	
Aqua bidest.	1000 ml	

PBST-Puffer

Tween®20	1 ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
PBS-Gebrauchslösung	1000 ml	s.o.

Ponceau-Färbung

Stammlösung		
Ponceau-S	2 g	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Trichloressigsäure	30 g	Merck Millipore, Merck KgaA, Darmstadt, D
Sulfosalicylsäure	30 g	Fluka™Analytical, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Arbeitslösung		
Stammlösung	1 ml	
Aqua bidest.	9 ml	

Probenpuffer Loading Dye

Sammelgelpuffer	1,75 ml	s.u.
Glycerin	1,5 ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
10 % SDS	5,0 ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
β-Mercaptoethanol	0,5 ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Bromphenolblau	1,25 ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D

Proteinase-Inhibitor-Cocktail

1 x PBS	10 ml	s.o.
Complete Mini	1 Tbl.	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D

Sammelgel 5 % Acrylamid

Rotiphorese® Gel 30	0,417 ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Sammelgelpuffer	0,313 ml	s.u.
Aqua bidest.	1,731 ml	
10 % SDS-Stammlösung	25 µl	s.u.
10 % APS	13 µl	s.u.
TEMED	3 µl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D

Sammelgelpuffer

Tris	7,88 g	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Aqua bidest.	ad 1000 ml	

10 % SDS Stammlösung

SDS	10 g	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Aqua bidest.	100 ml	

Transferpuffer

Tris-Base	3,03 g	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Glycin	14,4 g	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Methanol	100 ml	Merck KgaA, Darmstadt, D
Aqua bidest.	ad 1000 ml	

Trenngel 7,5 % Acrylamid

Rotiphorese® Gel 30	1,875 ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D

Trenngelpuffer	2,813 ml	s.u.
Aqua bidest.	2,675 ml	
10 % SDS Stammlösung	75 µl	s.u.
10 % APS	60 µl	s.u.
TEMED	6 µl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D

Trenngelpuffer

Tris	23,64 g	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Aqua bidest.	ad 100 ml	

9.5.2 Immunhistochemie

ABC-Lösung

ICC-Puffer	2,5 ml	s.u.
Lösung A	45 µl	Vector® Laboratories, Inc.; Burlingame, CA, USA
Lösung B	45 µl	Vector® Laboratories, Inc.; Burlingame, CA, USA

Citratpuffer

<u>Stammlösung A</u>		
$C_6H_8O_7 \times H_2O$	10,505 g	Merck KGaA, Darmstadt, D
Aqua bidest.	500 ml	
<u>Stammlösung B</u>		
$C_6H_5O_7Na_3 \times H_2O$	29,41 g	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Aqua bidest.	1000 ml	
<u>Gebrauchslösung</u>		
Stammlösung A	9 ml	
Stammlösung B	41 ml	

99,6 %iges Ethanol

Aqua bidest.	0,8 ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Ethanol	199,2 ml	

96 %iges Ethanol

Aqua bidest.	8 ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Ethanol	192 ml	

70 %iges Ethanol

Aqua bidest.	60 ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Ethanol	140 ml	

Hämatoxylin (1:1)

Hämatoxylin-Lösung	100 ml	Merck KGaA, Darmstadt, D
Aqua bidest.	100 ml	

ICC Puffer

Aqua bidest.	2000 ml	
Na_2HPO_4	2,4 g	Merck KgaA, Darmstadt, D
KH_2PO_4	0,4 g	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
KCl	0,4 g	Merck KgaA, Damstadt, D
NaCl	16,0 g	Merck KgaA, Darmstadt, D
HCl	ad pH 7,2-7,4	Fluka™ Analytical, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Triton®X-100	6 ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D

NovaRED		Vector® Laboratories, Inc.; Burlingame, CA, USA
Aqua bidest.	5 ml	
Lösung 1	3 Tr.	
Lösung 2	2 Tr.	
Lösung 3	2 Tr.	
H_2O_2	2 Tr.	

0,3 %-iges Wasserstoffperoxid in Methanol

H_2O_2 30 %	0,20 ml	Merck KGaA, Darmstadt, D
Methanol	ad 200 ml	Merck KGaA, Darmstadt, D

3 %-iges Wasserstoffperoxid in Methanol

H_2O_2 30 %	20 ml	Merck KGaA, Darmstadt, D
Methanol	ad 200 ml	Merck KGaA, Darmstadt, D

9.5.3 RNA-Isolierung und PCR

Agarose-Gel

Agarose	1,82 g	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
TAE-Puffer	91 ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
GelGreen	9,1 µl	Biotium, Inc. Hayward, CA, USA

10 Ratio der mRNA-Expression von Inhibin α, β_A, β_B Einzelwerte der untersuchten Rüden

Ratio				
Gruppe	Hund	Inhibin α (Effizienz 1,78)	Inhibin β_A (Effizienz 1,95)	Inhibin β_B (Effizienz 1,97)
DG A	Elias	1,73945968	0,944824474	7,804962706
	Nick	2,437031128	2,0577066	22,44415811
	Percy	0,85157256	0,33443154	4,956438928
	Luca	1,616678985	2,082250337	10,57733014
DG B	Leo Boes	5,501954658	3,052958765	8,485621672
	Joni	1,906224118	1,748679381	12,84221041
	Theo	2,253411038	2,025508682	10,6077033
DG C	Speedy	2,374924659	1,909945833	4,115334883
	Spikey	1,086199618	2,620008748	3,882314396
	Snoopy	2,46421074	2,393596354	2,254762453
	Strolch	1,633729336	1,028892786	11,45422738
	Leo Stürmer	3,664282083	1,856998723	13,04927356
	Mortimer	1,416274721	0,726863051	8,815561483
DG D	Bruno	0,739247652	0,686619961	4,707280934
	Joschi F.	0,525394177	0,621092867	0,650156034
	Shy	1,779900948	1,597699317	3,74222592
	Kirk	0,94276931	0,775485812	0,379858961
	Elliott	1,014389346	0,993297339	0,867686712
	Berry	4,027181916	3,135923529	31,75894105
	Feivel	2,826456055	1,960979107	3,551835261
	Sydney	0,946680148	0,970032012	6,409642514
	Theo Jensch	0,788370889	0,747490449	1,130658299
	Joschi P.	0,509364215	0,583726776	0,638855653
Profact	Sid	1,582633464	0,61750971	28,96319578
	Hansi	2,166123001	0,676166915	7,223114546
	Floh	1,284935165	0,898288379	15,80146177
Adult	Ben	0,974741009	1,283338058	4,02269973
	Tom	0,928618497	0,8844185	4,209182892
	Charly	1,066378714	1,035061366	0,601038937
	Soto	1,066959058	0,935551148	1,579835723
	Horst	0,964325779	0,765632685	1,278372068
Juvenil	Jack	0,867564286	0,736643501	4,145429827
	Wiliam	1,731029988	1,609027797	8,927346185
	Averell	1,23070945	1,193166009	8,995555107
Suprelorin	Jan	5,798685794	5,353159948	2,305085708
	Bruce	1,38510586	0,550271883	2,52351591
	Findus	2,913791285	2,309280853	9,785925759

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei vielen Menschen bedanken, die mich während der Erstellung dieser Arbeit in jeglicher Art unterstützt haben und somit zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben:

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. A. Wehrend bedanken, der mir durch das Überlassen des Themas und die viele Unterstützung die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit gegeben hat.

Mein besonderer Dank geht an meine Betreuerin Frau Prof. Dr. S. Goericke-Pesch, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und jederzeit ein offenes Ohr für mich hatte. Vielen Dank auch für die Geduld, die lösungsorientierte Diskussionsbereitschaft und nicht zuletzt die vielen Einladungen und schönen Stunden bei Euch Zuhause.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern sowie Kolleginnen und Kollegen der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Univeristät Gießen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit immer wieder motiviert und unterstützt haben.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. M. Bergmann aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen für die vielen fachlichen Anregungen bedanken.

Ein weiterer Dank gilt der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung, insbesondere Herrn Dr. K. Failing und Frau M. Sparenberg, die mir bei der statistischen Auswertung zur Seite standen und stets geduldig offene Fragen beantwortet haben.

Ganz besonders möchte ich meinen Mitdoktoranden Sven und Lena für die vielen gemeinsamen Stunden, gegenseitige Hilfe und Unterstützung, viele Telefonate und konstruktiven Diskussionen bedanken. Vielen Dank für Eure Freundschaft!

Vielen Dank an Martina und Richard, die sich als Fachfremde tapfer durch das Korrekturlesen geschlagen haben.

Zu allerletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich in jeglicher Hinsicht unterstützt hat, mich immer wieder motiviert und mir den Rücken freigehalten hat und zu jeder Zeit für mich da war. Danke!