



Altersabhängige Expression und Lokalisation des Progesteron- und Östrogenrezeptors- im Eberhoden

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Christoph Kohler

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

3-89687-699-6

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2004

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

1st Edition 2004

© 2004 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

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

Betreuer: Prof. Dr. Dr. h. c. B. Hoffmann

**Altersabhängige Expression und Lokalisation des Progesteron- und
Östrogenrezeptors- α im Eberhoden**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Christoph Kohler

Tierarzt aus Trier

Gießen 2004

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Bergmann

Tag der mündlichen Prüfung: 20. 7. 2004

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1. Einleitung und Aufgabenstellung	4
2. Literaturübersicht	6
2.1. Anatomie und Histologie des Eberhodens	6
2.1.1 Lage und Aufbau des Hodens	6
2.1.2 Kurze Übersicht der Histologie des Hodens	8
2.1.2.1 Leydigzellen	8
2.1.2.2 Sertolizellen	10
2.1.2.3 Lamina propria	12
2.1.2.4 Entwicklung des Keimepithels bis zur Geschlechtsreife	13
2.2. Spermatogenese	15
2.2.1 Spermatogoniogenese	15
2.2.2 Spermatozytogenese	17
2.2.3 Spermiohistogenese	18
2.3. Testikuläre Steroidhormonsynthese	19
2.3.1 Syntheseort und Synthese	19
2.4. Neuroendokrine Regulation der Hodenfunktion	23
2.5. Biologische Wirkungen testikulärer Steroidhormone	23
2.5.1 Endokrine Wirkungen	23
2.5.2 Parakrine/autokrine Wirkungen	25
2.5.2.1 Parakrine Wirkungen von Progesteron im Hoden	25
2.5.2.2 Parakrine Wirkungen von Östrogen im Hoden	26
2.5.2.3 Parakrine Wirkungen von Androgenen im Hoden	26
2.5.3 Steroidhormonrezeptoren	27
2.5.3.1 Progesteronrezeptoren	29
2.5.3.2 Östrogenrezeptoren	31
2.5.3.3 Regulation der Expression von PR und ER	32
2.5.4 Nichtgenomische Wirkungen von Steroidhormonen	33
3. Material und Methoden	35
3.1. Versuchsaufbau	35
3.2. Tiermaterial und Kontrollgewebe	35
3.3. Orchidektomie	35
3.4. Fixierung und Einbettung der Proben für die Immunhistochemie	36

Inhaltsverzeichnis

3.5.	Immunhistochemische Darstellung des Progesteronrezeptors	36
3.5.1	Vorbereitung	36
3.5.2	Rezeptornachweis	37
3.5.3	Qualitative und Quantitative Auswertung der Immunhistochemie	38
3.5.4	Statistische Verfahren	42
3.6.	Nachweis der Expression des Progesteronrezeptors und des Östrogenrezeptors-α mittels RT-PCR	44
3.6.1	Extraktion der mRNA	44
3.6.1.1	Aufarbeitung des Gewebes	44
3.6.1.2	Gewinnung und Verdünnung der mRNA	44
3.6.2	Durchführung der RT-PCR	45
3.6.2.1	Primer	45
3.6.2.2	Probeninterne Kontrolle	46
3.6.2.3	One Step RT-PCR	46
3.6.3	Elektrophoretische Auftrennung der Amplifikate	47
3.6.3.1	Anfertigung des Ethidiumbromidagarosegels	47
3.6.3.2	Elektrophorese	48
3.6.3.3	Gelauswertung	48
3.6.4	Sequenzierung der Amplifikate	48
3.7.	Materialien und Geräte	50
3.7.1	Immunhistochemie	50
3.7.1.1	Verwendete Antikörper	50
3.7.1.2	Puffer und Lösungen	50
3.7.1.3	Auflistung besonderer Geräte	53
3.7.2	RT-PCR	54
3.7.2.1	Primer	54
3.7.2.2	Lösungen und Reagenzien	55
3.7.2.3	Auflistung besonderer Geräte	57
4.	Ergebnisse	59
4.1.	Nachweis des Progesteronrezeptors im Eberhoden	59
4.1.1	Immunhistochemische Untersuchungen	59
4.1.1.1	Ergebnisse Kontrolluntersuchungen	59
4.1.1.2	Expression im Hoden juveniler Tiere (Gruppe A)	59
4.1.1.3	Expression im Hoden geschlechtsreifer Tiere (Gruppe B)	63

Inhaltsverzeichnis

4.1.1.4	Eber in der Pubertät; Expression in den Hoden der 100 und 150 Tage alten Tiere (Gruppe C)	70
4.1.2	Nachweis der Expression der mRNA des Progesteronrezeptor im Eberhoden	71
4.1.2.1	Ergebnisse der RT-PCR	71
4.1.2.2	Ergebnisse der Sequenzierung der Progesteronrezeptor cDNA	72
4.2.	Nachweis des Östrogenrezeptors-α im Eberhoden	74
4.2.1	Nachweis der Expression der m-RNA des Östrogenrezeptor- α im Eberhoden	74
4.2.1.1	Ergebnisse der RT-PCR	74
4.2.1.2	Ergebnisse der Sequenzierung der Östrogenrezeptor- α cDNA	75
5.	Diskussion	77
5.1.	Diskussion des Versuchsaufbaus	77
5.2.	Diskussion der Methodik	77
5.2.1	Immunhistochemischer Rezeptornachweis	77
5.2.2	Rezeptornachweis mittels RT-PCR und Sequenzierung	78
5.3.	Diskussion der Ergebnisse	79
5.3.1	Progesteronrezeptor	79
5.3.1.1	Progesteronrezeptornachweis	79
5.3.1.2	Östrogenrezeptor- α Nachweis	83
6.	Zusammenfassung	84
7.	Summary	86
8.	Literaturverzeichnis	88
9.	Anhang	119
9.1.	Absolute und relative Zahlen – ohne Arcus-Sinus-Transformation – der immunhistochemischen Ergebnisse	119
9.2.	Immunhistochemische Ergebnisse nach Arcus-Sinus-Transformation	123
9.3.	Wahrscheinlichkeitswerte der zweifaktoriellen Varianzanalyse und T-Tests	125
9.4.	Nukleotidsequenzen des Progesteronrezeptors und des Östrogenrezeptors- α	126
	Danksagung	130

1. Einleitung und Aufgabenstellung

Neben der germinativen Funktion erfüllt der Hoden auch endokrine Aufgaben. So werden von ihm die für den männlichen Organismus notwendigen Sexualsteroiden produziert. Im Vordergrund steht dabei die Synthese von Testosteron in den Leydigzellen (Colenbrander et al., 1978), wobei dieses Steroidhormon nicht nur rein endokrin sondern auch parakrin auf die Sertolizellen wirkt und über diese indirekt in die germinative Funktion der Spermienbildung eingreift (Vornberger et al., 1994; Goyal et al., 1997; Kotula et al., 2000).

Neben der Synthese des Testosterons wurde schon in den Dreißiger Jahren über eine mögliche testikuläre Östrogenproduktion diskutiert (Hauer, 1933; Küst, 1934). Für den Eber beschreiben diese Claus und Hoffmann (1980) als die Produktion von freiem und konjugiertem Estron.

In weiterführenden, die testikuläre Sexualhormonproduktion beim Eber charakterisierenden Untersuchungen, konnten Rostalski et al. (2000) erstmals zeigen, dass auch Progesteron als Sekretionsprodukt in Erscheinung tritt. Damit ergab sich die Frage, ob Progesteron lediglich als Zwischenprodukt der Testosteron- und Estronsynthese fungiert, oder ob ihm – analog zu Testosteron – auch eine Bedeutung bei der Regulation der Hodenfunktion zukommt. Eine entsprechende Frage stellte sich auch hinsichtlich der testikulären Estrogenproduktion, deren Bedeutung für die Rückresorption der tubulären Flüssigkeit im Nebenhodenkopf zwar klar gezeigt werden konnte, für die Hodenfunktion selbst jedoch noch weitgehend unklar ist. Insbesondere nachdem in zahlreichen Berichten eine negative Wirkung der östrogenwirksamen „Endocrine Disruptions“ auf die Spermatogenese postuliert wird, erscheint die Situation beim Eber dahingehend interessant, ob eine hohe tägliche Spermienproduktion mit einer hohen testikulären Östrogensekretion verbunden werden kann.

Ziel vorliegender Arbeit war es daher, durch Nachweis der Expression des Progesteronrezeptors und des Östrogenrezeptors- α im Eberhoden diesen als ein mögliches Zielorgan der testikulären Progesteron- und Estronproduktion darzustellen, wobei die Charakterisierung in Abhängigkeit vom Alter durchgeführt wurde. Der Nachweis sollte zunächst für beide Rezeptoren auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR erfolgen. Im Hinblick auf die Zuordnung der den Rezeptor exprimierenden Zellen

Einleitung und Aufgabenstellung

fokussierte vorliegende Arbeit auf den Progesteronrezeptor, der Nachweis der Rezeptorlokalisierung erfolgte mittels Immunhistochemie.

2. Literaturübersicht

2.1. Anatomie und Histologie des Eberhodens

2.1.1 Lage und Aufbau des Hodens

Beim männlichen Säugetier dienen die paarig angelegten Hoden der Samenzellbildung und der Steroidbiosynthese. Sie liegen beim Eber, umgeben von den Hodenhüllen und dem Skrotum, an der Kaudalfläche der Hinterschenkel.

Das Skrotum besteht aus der äußeren Haut, der zur Haut gehörenden muskulös-elastischen Tunica dartos und der zweischichtigen Fascia spermatica externa, die der oberflächlichen und tiefen Rumpffaszie entstammt. Von der Tunica dartos wird das Septum Scroti gebildet, das Skrotum und beide Hoden trennt; an der äußeren Haut stellt sich das Septum Scroti als Raphe scroti dar.

Der Fascia spermatica externa liegt der Musculus cremaster als Abgang des schiefen inneren Bauchmuskels und des queren Bauchmuskels an und zieht beim Eber als flaches Band an die laterale Seite des Processus vaginalis, dabei wird der Musculus cremaster von der Fascia cremasterica bedeckt. Die beiden inneren Schichten des Skrotums bilden die Fascia spermatica interna und die Lamina parietalis des Processus vaginalis. Diese überzieht als Lamina visceralis auch die Hoden.

Ein Hoden kann bei ausgewachsenen Ebern ein Gewicht bis zu 400g erreichen. Der seröse Überzug (Lamina visceralis) ist fest mit dessen Organkapsel, der Tunica albuginea testis, verbunden. Die Tunica albuginea ist die starke fibröse, kollagenfaserreiche Haut, die das Hodenparenchym umgibt und unter Druck hält. In sie sind meanderförmig Gefäßäste der Arteria testicularis und Anastomosen der Vena testicularis eingelagert. Von der Tunica albuginea strahlen starke bindegewebige Septula testis in das Hodenparenchym ein, wo sie zentral einen axial durch das Organ verlaufenden Bindegewebskörper, das Mediastinum testis bilden, in dem die Kanälchen des Rete testis, sowie große Blut- und Lymphgefäße liegen. Dieser Bindegewebskörper ist bei vielen Haussäugetieren, so zum Beispiel dem Eber, dem Rüden und den männlichen Wiederkäuern vorhanden; Ausnahmen sind der Hengst, der Kater und Nagetiere, bei denen er nur in der Extremitas capitata gebildet wird.

In den das Hodenparenchym in Lobuli testis aufteilenden Septula testis verlaufen Blutgefäße und Nerven; die Hodenläppchen bestehen aus in Gruppen liegenden, stark gewundenen Samenkanälchen, den Tubuli seminiferi contorti. Ihre gerade verlaufenden Endabschnitte werden als Tubuli recti bezeichnet, wobei

Literaturübersicht

zwischen den septalen und mediastinalen Tubuli recti unterschieden wird. Die septalen Tubuli recti verlaufen konvergierend und verbinden dabei die Tubuli seminiferi contorti mehrerer Hodenläppchen miteinander, die mediastinalen Tubuli recti ziehen radiär zum Mediastinum und münden dort in das Rete testis. Das Hodennetz hat wiederum Anschluß über die Ductuli efferentes testis zum Kopf des Nebenhodens.

In den intertubulären Räumen der Lobuli testis befinden sich lockeres Bindegewebe sowie Blut- und Lymphgefäße, Fibrozyten, mononukleäre Zellen und interstitielle Leydigzellen.

Die Blutversorgung des Hodens geschieht über die Arteria testicularis, die aus dem Rankenkonvolut des Samenstrangs kommend an der Extremitas capitata auf den Hoden trifft und als Marginalarterie vom Nebenhoden bedeckt, bis zur Extremitas caudata des Hodens verläuft. Dort teilt sich die Arterie in einen lateralen und medialen Ast, von denen je eine Hodenhälfte versorgt wird. Diesen oberflächlichen Arterien entspringen zentripetal verlaufende Arterien, die an den Septula testis in das Hodeninnere ziehen, wo sie sich im Mediastinum testis aufknäulen und wieder als Zentrifugarterien zur Tunica albuginea zurücklaufen. Diesen Gefäßen entspringen Arteriolen und Kapillaren. Der größte Teil des venösen Blutes wird über radiäre und intertubuläre Parenchymvenen zur Hodenkapsel geleitet, von wo es in die Äste der Vena testicularis und den Plexus pampiniformis abfließt. Zusätzlich fließt noch ein geringer Anteil des Blutes durch Venen ab, die mit den Ductuli efferentes den Hoden an der Extremitas capitata verlassen.

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

eine Tasche die Bursa testicularis (Übersicht siehe bei Schummer und Vollmerhaus, 1987; Wrobel, 1998).

2.1.2 Kurze Übersicht der Histologie des Hodens

2.1.2.1 Leydigzellen

Die auch als *Endocrinocytus interstitialis* bezeichneten Zellen des Hodeninterstitiums tragen den nach ihrem Entdecker Leydig (1821-1908) genannten und allgemein gebräuchlicheren Namen „Leydigzellen“. Es sind azidophile, polygonale interstitielle Zellen von zum Teil variierender Größe mit einem oder mehreren runden, euchromatischen und azentral liegenden Kernen und deutlichem Nukleolus. Leydigzellen sind sowohl einzeln als auch in Gruppen im Gewebe vorhanden, dabei haben sie meist Kontakt zu Blutgefäßen, können aber auch an der Wand der Tubuli seminiferi als elongierte spindelförmige Zellen liegen. Desweiteren sind diese Zellen endokrin aktiv (Schulze, 1984; Liebich, 1993).

Die fetale und frühe postnatale Entwicklung der Leydigzellen wurde 1959 von Roosen-Runge et al. beispielhaft am Hoden der Ratte untersucht. So wird beschrieben, dass sich am 15. Tag des fetalen Lebens dicht gepackte runde oder polygonale Zellen zwischen den frühen Tubuli seminiferi bilden, wobei die Kerngestalt noch variiert. Bis zum 17. Tag haben sich zwei Typen von interstitiellen Zellen gebildet, die runden oder polygonalen Frühformen der Leydigzellen, die in unregelmäßigen Gruppen liegen und den Interstitialraum ausfüllen, sowie die spindelförmigen Fibroblasten, die diese umgeben und abtrennen. In der weiteren fetalen Ausdifferenzierung erhalten die Leydigzellfrühformen eine einheitliche Form und Größe. Im Gegensatz zu den Fibroblasten steigt ihre Zahl bis zur Geburt schnell an.

Nach der Geburt treten starke Veränderungen auf, so dass sich die Morphologie der Leydigzellen ändert, und sie ihr einheitliches Aussehen verlieren. Während der ersten postnatalen Tage gruppieren sich Fibroblasten um die Leydigzellgruppen und kapseln diese ab. In der zweiten postnatalen Woche beginnt eine neue Entwicklungsphase in der die Fibroblastenkapsel weniger in Erscheinung tritt und die Leydigzellen beginnen sich an den Gefäßen entlang zu verteilen (Roosen-Runge und Anderson, 1959).

Während Chamindrani Mendis-Handagana und Siril Ariyaratne (2000) die postnatale Entwicklung der Leydigzellen aufgrund ihrer Untersuchungen bei Ratten in fünf Entwicklungsphasen einteilen, charakterisieren Dierichs et al. (1973) die

Literaturübersicht

postnatale Ontogenese der Leydigzellen beim Schwein mit einem wellenförmigen Verlauf von vier Entwicklungsphasen. So beschreibt er eine früh-postnatale Proliferationsphase, in der sich die beim Schwein noch spindelförmigen Zellen in polygonale Leydigzellen umwandeln; danach folgt die präpubertäre Hypertrophie, in der die Leydigzellen ihren größten Durchmesser erreichen. Die anschließende präpubertäre Regression wird durch Zelldegeneration und Größenabnahme der Zellen bestimmt, danach nimmt der Durchmesser in der pubertären Proliferation wieder zu. Beim postnatalen Rinderhoden kann Sinowatz et al. (1983) einen ähnlichen vierphasigen Entwicklungsverlauf beschreiben.

Bereits ab dem vierten Tag post partum erkennen Dierichs und Wrobel (1973) im Schweinehoden einen spindelförmigen nicht zur Basalmembran der Tubuli seminiferi gehörenden Zelltyp mit ovalem Kern, der sich von einem in Nestern liegenden polygonalen Zelltyp unterscheidet. Die folgende morphologische Veränderung stellt die Differenzierung zur neu geformten adulten Leydigzelle da. Dabei ändert sich die Form von der spindelförmigen Stammzelle zu einer polymorphen Leydigzelle; dies vollzieht sich beim Schwein zwischen dem zehnten und vierzehnten Lebenstag während der oben beschriebenen „früh-postnatalen Proliferationsphase“ (Dierichs et al. 1973; Dierichs und Wrobel, 1973); hieran anschließend erreichen am 25. Tag die porcinen Leydigzellen ihren größten Durchmesser, beim Rind wurde dieser Vorgang in der 8. bis 20. Lebenswoche als Proliferationsphase beschrieben (Sinowatz et al., 1983).

Die neugebildeten und noch unreifen „adulten Leydigzellen“ sind kleiner als die späteren, reifen „adulten Leydigzellen“, von denen sie sich aufgrund ihrer geringeren Größe, dem spärlichen Zytoplasmagehalt und einem großen, prominenten Nukleolus unterscheiden; weiterhin haben sie wenige oder gar keine Lipidtropfen eingelagert. Gleichzeitig verlagern sich die neu geformten „adulten Leydigzellen“ in das Zentrum des Interstitiums. In der folgenden beim Schwein als „präpubertäre Regression“ und beim Rind als „Präpubertätsphase“ bezeichneten Entwicklung (Dierichs et al., 1973; Sinowatz et al., 1983) ändert sich an der Zellmorphologie wenig, die Zellgröße nimmt jedoch ab. Der letzte Schritt der Entwicklung findet in der „Pubertätsphase“ statt und ist die Transformation der unreifen „adulten“ zu den reifen „adulten Leydigzellen“, was durch einen erneuten Anstieg der Zellgröße und einem Verschwinden der Lipidtropfen gekennzeichnet ist; gleichzeitig steigt auch die

Fähigkeit zur Testosteronbildung aufgrund der in größerer Zahl vorhandenen Zellorganellen und der erhöhten Empfindlichkeit auf zirkulierendes LH deutlich an.

Eine etwas andere Einteilung der Leydigzellentwicklung beim Schwein wird von Van Straaten und Wensing (1978) beschrieben; so teilten diese die fetale und postnatale Entwicklung in insgesamt nur drei Phasen auf: Eine vorübergehende fetale Entwicklungsphase, eine vorübergehende postnatale Entwicklungsphase und eine entgültige Entwicklungsphase nach der Pubertät.

Untersuchungen beim Schwein von Dorst und Sajonski (1974) und Van Straaten und Wensing (1977/1978) zeigten übereinstimmend, dass während der Leydigzellentwicklung die absolute Zahl und das Volumen der Leydigzellen fortschreitend ansteigt, im Verhältnis zu anderen Hodenkomponenten nach der vierten Lebenswoche jedoch ein Abfall eintritt.

2.1.2.2 Sertolizellen

Die als *Epitheliocytus sustentans* bezeichneten Stützzellen des Keimepithels wurden 1865 von Sertoli entdeckt und beschrieben. Als Trivialname tragen diese Zellen den Namen ihres Entdeckers und werden „Sertolizellen“ genannt.

Hierbei handelt es sich um große, hochprismatische, breitflächig auf der Basalmembran der Tubuli seminiferi fussende Zellen, die pyramidenförmig in das Tubuluslumen hineinragen. Sie liegen zwischen den sich differenzierenden Zellen des Keimepithels; dabei bilden sie seitliche Zytoplasmafortsätze, die die Spermatozyten und Spermatisden umschließen. Durch die intensive Vernetzung des Zytoplasmas mit den Keimzellen wird das Keimepithel gestützt und ernährt. Durch enge Zellkontakte zwischen den Sertolizellen wird die eigentliche Blut-Hoden-Schranke gebildet, die das Tubulusepithel in ein die Spermato gonien umfassendes basales Kompartiment und ein luminales Kompartiment, bestehend aus Spermatozyten und Spermatisden, aufteilt. Dabei schützt die Bluthodenschranke die Spermatozyten und Spermatisden vor Autoimmunreaktionen und exogenen Schadstoffen; sie ist auch mitverantwortlich, dass die von den Sertolizellen intratubulär sezernierten Flüssigkeit, in der die Spermatozyten und Spermatisden ein optimales Entwicklungsmilieu vorfinden, in den Tubuli verbleibt. Luminal werden vom Zytoplasma Taschen gebildet in denen Bündel reifer Spermatisden stecken. Außerdem nimmt das Zytoplasma mit seinen Fortsätzen aktiv an dem Transport und der Abgabe der Spermatisden teil (Schulze, 1984; Liebich, 1993). Im Zytoplasma treten Mitochondrien und gut entwickelte Golgi-Apparate sowie

Literaturübersicht

rauhes und glattes endoplasmatisches Retikulum auf. Besonders beim Schwein und Wiederkäuern ist das rauhe endoplasmatische Retikulum stark ausgeprägt, das glatte endoplasmatische Retikulum liegt bei den meisten Haustieren in Stapeln oder Wirbeln vor (Hadziselimovic und Seguchi, 1974; Liebich, 1993). Weitere Funktionen der Sertolizellen sind die Phagozytose von degenerierten Keimzellen und von Zytoplasmaresten, die Synthese des Anti-Müller-Hormons während der Fetalperiode (Van Vorstenbosch et al., 1984) und die Synthese von androgenbindendem Protein, Inhibin und dem transferrinlike-Protein (Liebich, 1993).

Der stark gelappte, ovale Zellkern besitzt prominente Nucleoli und liegt in der Mitte des Zytoplasmas, dabei befindet er sich meist in der zweiten Lage des Keimepithels über den Spermatogonien (Schulze, 1984; Liebich, 1993).

Während der Embryonalphase werden die soliden und lumenlosen Geschlechtsgänge durch die Gonozyten und die sie umgebenden Sertolizellvorläuferzellen gebildet (Livera et al., 2000; Magre und Jost, 1980), die den dominierenden Zelltyp darstellen. Die Differenzierung der Sertolizellvorläuferzellen beginnt bei der Ratte um den 13. Tag post conceptionem (Livera et al., 2000; Pelliniemi et al., 1993) und beim Schwein um den 35 Tag. Die Zellen sind in dieser Phase von konischer Form und sitzen bereits der Basalmembran auf; der Zellkern ist unregelmäßig geformt und besitzt ein bis zwei Nucleoli (Van Vorstenbosch et al., 1984). Durch mitotische Teilung steigt die Zahl der Sertolizellvorläuferzellen bis zum 52. Tag post conceptionem beim Schwein stark an. Die Vermehrung schwächt sich dann bis zur Geburt ab, wobei zu diesem Zeitpunkt sogar ein leichter Rückgang der Zellzahl festzustellen war (Van Vorstenbosch et al., 1984).

Am Beginn der postnatalen Hodenentwicklung wird bei verschiedenen Spezies (Mensch, Maus, Ratte, Hamster, Rind) die kubische oder säulenförmige Sertolizellvorläuferzelle mit einem längsovalen Zellkern übereinstimmend als der Hauptzelltyp der Tubuli seminiferi beschrieben. Diese Zellen stehen senkrecht zur Basalmembran, die Nucleoli liegen in den Randbereichen des Zellkerns (Nistal et al., 1983; Flickinger, 1967; Solari und Fritz, 1978; Miething, 1989; Sinowatz und Amselgruber, 1986).

Das Zytoplasma juveniler Sertolizellen besitzt Mitochondrien vom Crista-Typ, Golgi-Apparate, Ribosomen, Lysosomen, Mikrotubuli sowie glattes und rauhes endoplasmatisches Retikulum (Sinowatz und Amselgruber, 1986).

Die postnatalen und noch unreifen Sertolivorläuferzellen vermehren sich durch mitotische Teilungen. Tierartlich unterschiedlich beginnt diese Phase bei der Maus und beim Goldhamster in der ersten Lebenswoche (Flickinger, 1967; Miething, 1989), beim Schwein wird der erste Lebensmonat als Beginn der Sertolizellentwicklung mit einer Versechsfachung der Sertolizellzahl beschrieben (Franca et al. 2000), wohingegen Sinowatz und Amselgruber (1986) erst nach acht Wochen eine diesbezügliche Veränderung beim Rind beschreibt. Während der fortschreitenden Vermehrung reifen die Zellen aus und werden zu reifen „adulten Sertolizellen“. So wurde bei der Maus beschrieben, dass ab der zweiten Woche die Sertolizellen Zytoplasmafortsätze ausbilden, mit denen sie untereinander und auch mit denen sie umgebenden spermatogenetischen Zellen Kontakt aufnehmen; die Sertolizellentwicklung ist nach vier bis sechs Wochen beendet (Flickinger, 1967). Beim Schwein wird die Entwicklung und Ausreifung der Sertolizellen in zwei Perioden eingeteilt: Eine frühe Periode von der Geburt bis Ende des ersten Monats, in dem sowohl die Zellzahl als auch die Zellgröße zunimmt, gefolgt von einer Ruhephase, in der sich bis zum dritten Monat die Zellform verändert und der Zelldurchmesser ansteigt. Die zweite Entwicklungsperiode findet zwischen dem dritten und vierten Monat statt, in der eine Steigerung der Sertolizellzahl um 80 Prozent beobachtet wurde; danach bleibt die Sertolizellzahl im Hoden konstant (Franca, et al. 2000).

Während der Sertolizellentwicklung des Menschen wurden von Hadziselimovic und Seguchi (1974) drei Sertolizellformen beschrieben. Die Sa-Zelle als eine juvenile Sertolizellvorläuferzelle, aus der sich die Sb-Zelle und während der Pubertät die Sc-Zelle entwickelt.

Andere Untersuchungen unterscheiden die Sertolizellen in Zellen mit einem hellen und einem dunklen Zytoplasma (Miething, 1989).

2.1.2.3 Lamina propria

Die Basalmembran ist die innerste Schicht der Lamina propria, die als Hüllschicht die Tubuli seminiferi umschließt. Diese ist durch kollagene und elastische Fasern mit den Peritubulären Zellen verbunden, die eine Schicht aus mehreren Zellagen bilden. Tierartlich unterschiedlich entwickelt sich aus den Mesenchymzellen der spätere kontraktile Zelltyp. So entwickeln sich beim Eber glatte Muskelzellen und in anderen Spezies Myoidzellen. Die Peritubularzellen beteiligen sich mit ihrer

Kontraktilität an der Spermiation und dem Transport der Spermien durch den Tubulus, weiterhin bilden sie auch einen Teil der Blut-Hoden-Schranke, indem sie die Passage von Proteinen in die nichtzellulären Anteile der Lamina propria begrenzen. Die äußerste Schicht der Lamina propria besteht aus Fibrozyten und Kollagenfasern (Wrobel, 1998). Untersuchungen beim Schwein (Dierichs und Wrobel, 1973) haben gezeigt, dass die als einheitliche Schicht ausgebildete Basalmembran von mehreren konzentrisch angeordneten Lagen spindelförmiger Zellen umgeben wird. Die peripheren Zellen dieser Schicht sind Vorläufer der Leydigzellen, sie besitzen einen kugligen bis ovalen Kern (s. Kap. 2.1.2.1).

Die Basalmembran ist bereits embryonal angelegt und mit zwei bis vier Schichten peritubulär anliegender Zellen mit längsovalen Kernen versehen (van Vorstenbosch, 1984). Während der weiteren Entwicklung nimmt die Filamentdichte der peritubulären Zellen zu, wobei sich die Filamente parallel zur Zelloberfläche anordnen. Um den hundertsten Tag post partum werden beim Schwein die peritubulären Zellen durch interzelluläre Substanz miteinander verbunden, weiterhin hat sich eine zweite Basalmembran an der interstitiellen Seite der peritubulären Zellen gebildet. Durch Größenzunahme der Tubuli seminiferi und Dehnung der äußeren Schichten flacht sich bis zum 140. Lebenstag die peritubuläre Zellhülle zu einer einschichtigen Lage ab (Dierichs und Wrobel, 1973).

2.1.2.4 Entwicklung des Keimepithels bis zur Geschlechtsreife

Während der Embryonalphase wandern die Primordialkeimzellen - die auch als „wandernde Entodermzellen“ (Holstein und Wartenberg, 1970) bezeichnet werden - in die sich entwickelnden Gonaden ein. Dort vermehren sie sich durch mehrfache mitotische Teilungen. Die Bezeichnung der Teilungsprodukte ist nicht ganz einheitlich; so werden sie nach Beaumont und Mandl (1963) weiterhin als Primordialkeimzellen, nach Holstein und Wartenberg (1970) als Gonozyten und nach Hilscher et al. (1972) als I-Gonozyten bezeichnet. In einer danach folgenden Ruhephase kommt es zu einem Größenwachstum, wonach ihnen die Bezeichnung Gonozyten, fetale Spermatogonien (Holstein und Wartenberg, 1970) oder II-Gonozyten (Hilscher et al., 1972) gegeben wurde.

Diese Entwicklung findet nach Hilscher et al. (1974) in der sogenannten „Prägonadalen Periode“ statt. In der sich anschließenden „PräspERMATOGENESE-Phase“ proliferieren die Gonozyten zu M-Prospermatogonien (multiplying

prospermatogonia), wobei diese für Hilscher et al. (1974) mit den I-Gonozyten identisch sind. Hieraus entstehen durch erneute Teilung T₁-Prospermatogonien (primary transitional prospermatogonia), die auch als II-Gonozyten bezeichnet werden. Nach Hilscher et al. (1974) teilen sich diese bei der Ratte um den 5. Tag post partum zu T₂-Prospermatogonien (secondary transitional prospermatogonia) die als Vorläufer der A-Spermatogonien betrachtet werden.

In den Tubuli seminiferi finden sich vor der Geschlechtsreife zwei Zelltypen, die auf der Basalmembran liegenden Sertolivorläuferzellen und die zentral liegenden Gonozyten (Sapsford, 1962; Steger und Wrobel, 1996), wobei die Gonozyten gegenüber den Sertolivorläuferzellen deutlich in der Minderzahl sind. Dieses Bild zeigt sich einheitlich bei Maus, Ratte, Hamster, Katze, Mensch und Rind (Flickinger, 1967; Solari und Fritz, 1978; Miething, 1989; Sanchez et al., 1993; Hadziselimovic, 1976; Sinowatz et al., 1983). Van Vorstenbosch et al. (1984) beschreiben diesen Tubulusaufbau schon ab dem 35. Tag post conceptionem beim Schwein.

Ebenfalls übereinstimmend wird beschrieben, dass sich die Gonozyten oder PräspERMATOGONIE auf Grund ihrer Gestalt und ihres Aussehens deutlich von den Sertolivorläuferzellen unterscheiden. Flickinger (1967) beschreibt sie bei neugeborenen Mäusen als runde bis polygonale Zellen von etwa 20µm Durchmesser mit einem runden Kern, der ein bis zwei deutliche Nukleoli enthält. Im Zuge der Entwicklung der Gonozyten zu den Spermatogonien wandern die PräspERMATOGONIE vom noch lumenlosen Zentrum des Tubulus in die Peripherie, um sich dort an der Basalmembran anzulagern. Diese Migration findet während der präpubertären Hodenentwicklung statt. Miething (1989) beobachtete diesen Vorgang beim Hamster ab dem achten Lebenstag, Sanchez et al. (1993) beim Kater im fünften bis sechsten Lebensmonat. Für das Schwein und den Menschen beschreiben Van Vorstenbosch (1984) und Hadziselimovic (1976) bereits einen fetalen Beginn dieser PräspERMATOGONIEwanderung. Der Mechanismus, durch den die PräspERMATOGONIE an die Basalmembran gelangen, wird unterschiedlich beurteilt. Sinowatz et al. (1983) gehen davon aus, dass die PräspERMATOGONIE keine kontraktilen Elemente besitzen, und es sich folglich um eine rein passive Positionsänderung der Spermatogonien durch die sich aktiv verformenden Sertolizellen handelt. Bei Hadziselimovic (1976) werden pseudopodienähnliche Fortsätze beschrieben, die für eine aktive Bewegung verantwortlich gemacht werden.

Nach Erreichen der Basalmembran, was bei der Maus und dem Hamster (Flickinger, 1967; Miething, 1989) etwa zwischen dem 10.-14. Lebenstag, beim Schafbock um die 13. Lebenswoche (Steger und Wrobel, 1996) geschehen ist, werden die Prä spermatogonien übereinstimmend als A-Spermatogonien bezeichnet (Flickinger, 1967; Miething, 1989; Sinowatz et al., 1983; Hadziselimovic, 1976; Steger und Wrobel, 1996). Nach de Rooij (2001) sind die A-Spermatogonien die Stammzellen der Spermatogenese; diese beginnt mit Einsetzen der Geschlechtsreife (s. Kap.2.2)

2.2. Spermatogenese

Die Spermatogenese ist ein kontinuierlich fortlaufender Prozeß der mit Eintritt der Pubertät einsetzt. Sie ist zu unterteilen in drei Entwicklungsphasen: Spermatogoniogenese, Spermatozytogenese und Spermatohistogenese. Durch den synchronisierten Ablauf dieser drei Phasen entwickelt sich im geschlechtsreifen Hoden ein aus verschiedenen Zelltypen und mehreren Zellgenerationen bestehendes mehrschichtiges Keimepithel. Bei den meisten Säugetieren sind vier aufeinander folgende Zellgenerationen vorhanden, die dabei zugrunde liegende Zeitspanne wird als Keimepithelzyklus bezeichnet. Die Dauer der Keimepithelzyklen und folglich auch die Dauer der Spermatogenese ist tierartlich unterschiedlich. Die Keimepithelzyklen des Rindes dauern 13,5 Tage, die Spermatogenese 54 Tage, wogegen der Keimepithelzyklus beim Eber nur 8,5 Tage andauert und die Spermatogenese 34 Tage (Busch et al., 1991).

2.2.1 Spermatogoniogenese

Die der Basallamina anliegenden Stammspermatogonien sind – ausgenommen bei Mensch und Rhesusaffen – kleiner als ihre Vorgänger, die Prä spermatogonien (Hadziselimovic, 1976; Van Wagenen und Simpson, 1954); sie haben einen heterochromatischen Kern mit einem zentralliegenden, prominenten Nukleolus (Kreff, 1999).

Die Stammspermatogonien sind einzeln liegende A_s (A-single) Spermatogonien (de Rooij, 2001). Diese können bei einer mitotischen Teilung erneut zu zwei einzelnen A_s Spermatogonien werden, oder es entstehen aus ihnen zwei Tochterzellen, die über Zytoplasmabrücken verbunden bleiben. Diese Form wird als

Literaturübersicht

paarige A-Spermatogonien A_{pr} (A-paired) bezeichnet. Bei weiteren Teilungen der paarigen A-Spermatogonien bleiben diese über Zytoplasmabrücken verbunden, so dass Spermatogonienketten A_{al} (A-aligned) entstehen (Frankenhuis et al., 1982; de Rooij, 2001), die sich durch weitere Teilungen verlängern können. Frankenhuis et al. (1982) bezeichnen die A_s , A_{pr} und A_{al} als undifferenzierte A-Spermatogonien, während die aus Teilung der A_{al} -Spermatogonien hervorgegangenen A_1 , A_2 , A_3 und A_4 -Spermatogonien als differenzierte Spermatogonien bezeichnet werden. Nach de Rooij (2001) verändert sich bei diesen die Teilungsdynamik; so verkürzt sich bei den differenzierten A-Spermatogonien die Dauer des Zellzyklus, die Teilungen der A_1 -Spermatogonien bis zu den B-Spermatogonien verlaufen im Gegensatz zu denen der undifferenzierten A-Spermatogonien synchronisiert ab. In den letzten Teilungsschritten bilden sich aus den A_4 -Spermatogonien die Intermediären Spermatogonien, die sich wiederum zu den B-Spermatogonien teilen, wobei Liebich (1993) die B-Spermatogonien noch mit einem B_1 - und B_2 -Typ beschreibt. Morphologisch werden die A-Spermatogonien als die größten Spermatogonien mit ausgeprägtem, parallelverlaufendem Kontakt (Wrobel, 1998) zur Basalmembran beschrieben. Sie sind von flach-ovaler Form und besitzen einen hellen Kern mit einem oder mehreren prominenten Nukleoli (Pier, 1985; Liebich, 1993; Krefft, 1999). Die Intermediärspermatogonien gleichen den A-Spermatogonien, haben aber im Gegensatz zu diesen einen kleineren, verdichteteren, ovalen Kern, der einen dunklen Nukleolus enthält; weiterhin weisen sie unregelmäßig verteilte Chromatinschollen auf. Die B-Spermatogonien haben den Kontakt zur Basallamina verloren, ihre Gestalt ist nicht mehr flach-oval sondern „birnenförmig“ (Liebich, 1993), der Zellkern erscheint noch dunkler als bei den Intermediärspermatogonien, das Chromatin liegt verdichtet im Kern, und es ist meist nur ein Nukleolus vorhanden (Liebich, 1993).

Eine andere Zuordnung der einzelnen Spermatogonien-Teilungsstadien gibt Swierstra (1968), indem er die Spermatogonien in „helle A-Spermatogonien“, „dunkle A-Spermatogonien“ und „B-Spermatogonien“ einteilt. Nach Frankenhuis et al (1982) entsprechen die „hellen A-Spermatogonien“ den undifferenzierten und differenzierten A-Spermatogonien, während die „dunklen A-Spermatogonien“ den Intermediärspermatogonien entsprechen.

2.2.2 Spermatozytogenese

Aus den B-Spermatogonien werden durch erneute mitotische Teilung die primären Spermatozyten.

Diese Spermatozyten erster Ordnung beginnen die meiotischen Prophase zu durchlaufen. Diese mehrere Stadien umfassende Phase der ersten Reifeteilung besteht aus den Phasen: Präleptotän, Leptotän, Zygotän, Pachytän, Diplotän und der Diakinese (Wrobel, 1998).

Im Präleptotän ist der Zellkern kleiner als der der B-Spermatogonien und das Chromatin liegt gewunden im Kern. Der Kern der Spermatozyten erscheint im folgenden Leptotän dunkel und unregelmäßig, die Chromosomen werden zu dünnen Strängen und das Chromatin verdichtet und verkürzt sich. Während des anschließenden Zygotäns lagern sich die homologen Chromosomen aneinander und paaren sich; dabei erscheint der Kern unregelmäßig gefärbt und chromatinfreie Bereiche entstehen. Nach dem Zygotän durchlaufen die Spermatozyten das lang andauernde Pachytän, in dem das Chromatin eine netzartige Struktur des Kerns verursacht; in dieser Phase findet das sogenannte „crossing-over“ statt, wobei Chromosomenabschnitte getauscht werden. Im Diplotän wandern die Chromosomen auseinander, hängen aber noch an den Cross-over-Stellen zusammen. In der Diakinese verkürzen und verbreitern sich die Chromosomen; vier einzelne Chromatiden je Chromosom entstehen, und die Kernmembran verschwindet. Während der Prophase nehmen die Zellkerne um etwa das dreifache an Größe zu. In der dann folgenden schnell ablaufenden Metaphase, Anaphase und Telophase reihen sich die gepaarten Chromosomen in der Äquatorialebene auf und werden zu den gegenüberliegenden Polen auseinadergezogen, wobei sich die Chromosomen auf die Tochterzellen aufteilen. Es entstehen aus einer primären Spermatozyte zwei sekundäre Spermatozyten mit einem haploiden Chromosomensatz bei $2n$ (Wrobel, 1998; Foote et al., 1972). Die in der Keimepithelschichtung über den primären Spermatozyten liegenden sekundären Spermatozyten sind kleiner als die primären. Sie treten nur sehr kurz auf und teilen sich nach einem kurzen Interkinesestadium ohne DNA-Verdoppelung in der zweiten meiotischen Teilung zu runden Spermatiden (haploider Chromosomensatz, $1n$).

2.2.3 Spermiohistogenese

Die aus der zweiten meiotischen Teilung hervorgegangenen Spermatiden sind von runder bis eckiger Gestalt und werden auch als sphärische Spermatiden bezeichnet (Wrobel, 1998). Eine Besonderheit stellen die mehrkernigen „polyenergid“ Spermatiden da, die aus nicht synchronen Teilungen herrühren sollen. Im weiteren Verlauf der Spermio-genese sollen aus ihnen normale Spermien entstehen; dieses Phänomen wurde bei Säugtieren und Vögeln beobachtet, wobei es besonders häufig beim Eber auftritt (Menger und Menger, 1981).

Aus den neugebildeten sphärischen Spermatiden wird während eines in vier Phasen eingeteiltem Reifungsvorganges das Spermium. Die Spermatiden liegen zu Beginn dieser Entwicklung nahe dem Tubuluslumen, wandern dann aber Richtung Basalmembran um gegen Ende des Entwicklungsprozesses das Tubuluslumen wieder zu erreichen. Die erste Phase, die die Spermatiden durchlaufen, ist die Golgi-Phase. In ihr bilden sich Vesikeln die mit glykoproteinreichen Granula gefüllt sind. Diese Vesikel verschmelzen und bilden das sogenannte akrosomale Bläschen, das an die Kernmembran wandert und damit eine polare Richtung der Spermatide vorgibt. In der anschließenden Kappenphase bildet sich aus dem akrosomalen Bläschen die Akrosomenkappe; diese umgibt dabei mehr als die Hälfte des Kerns. Gleichzeitig verdichtet sich das Chromatin im Kern und das Zytoplasma verlagert sich distal des Kerns gegenüber dem Akrosom. Das Zentriol nimmt Kontakt mit der Kernmembran auf und buchtet in ihm die Implantationsgrube aus. In der Akrosomalen Phase flacht sich der Spermatidenkern in dorsoventraler Richtung ab, das Chromatin kondensiert und die Akrosomenkappe wird zum Akrosom. Zeitgleich beginnt sich die Spermatidenzelle um 180° zu drehen, so dass das Akrosom auf die Basalmembran ausgerichtet wird. Die fibrilläre Hülle des Hauptstücks der Zelle beginnt sich aus dem Mikrotubuluskörper zu bilden. Durch diese morphologischen Veränderungen erhält die Spermatide ein längliches Aussehen. Im Übergang von der Akrosomalen Phase zur Reifungsphase formieren sich um das aus dem distalen Zentriol entstandenen Flagellum die „Outer Dense Fibers“. Gleichzeitig beginnt sich auch der Schlußring zu bilden. Im weiteren Verlauf der Reifungsphase endet die Kondensation des Kerns, die Bildung der Akrosomenkappe ist beendet, sie umschließt jetzt zwei Drittel des Kerns. Die Geißel ist ausgebildet und die Mitochondrien haben sich als Spermienmittelstück um das Flagellum gelegt. Das restliche Zytoplasma wird als Restkörper abgeschnürt und von den Sertolizellen phagozytiert. Es hat sich jetzt ein ausdifferenziertes aber

noch nicht befruchtungsfähiges Spermium gebildet, das erst nach der Spermiation in das Tubuluslumen während der Nebenhodenpassage seine Befruchtungsfähigkeit erhält (Übersicht siehe bei Liebich, 1993; Hoffmann, 2003).

2.3. Testikuläre Steroidhormonsynthese

2.3.1 Syntheseort und Synthese

Ort der testikulären Steroidhormonsynthese sind die Leydigzellen. (Bamberg, 1994a/b). Abb. 1 zeigt das Grundschemata der steroidal Biosynthese. Das speziesübergreifend für den Hoden charakteristische Endprodukt ist das androgen wirksame Testosteron. Für die normale Entwicklung und Ausdifferenzierung des männlichen Geschlechts ist die rechtzeitige Aufnahme der embryonalen und fetalen Testosteronsekretion notwendig.

Beim Schwein weist dabei sowohl die pränatale als auch die postnatale Testosteronsekretion ein charakteristisches Muster auf. Pränatal zeigte sich zunächst ein Anstieg des Testosterons bis zum 60. Tag post conceptionem, gefolgt von einem Abfall bis kurz vor die Geburt. Postnatal steigt der Testosteron Gehalt wieder an, Maximalwerte ergeben sich in der dritten Lebenswoche. Danach erfolgte ein erneuter Abfall bis zur 18. Woche, wonach ein weiterer aber deutlich höherer Testosteronanstieg verzeichnet werden konnte (Colenbrander et al., 1978; Franca et al. 2000). Allrich et al. (1983) bestätigten den Testosteronanstieg zwischen dem 130.-160. Lebenstag beim Eber, gleichzeitig konnten sie in dieser Zeit erhöhte Estradiol-Werte messen.

Colenbrander et al. (1977) gehen davon aus, dass der erste postnatale Anstieg des Testosterons auf die Zunahme des Leydigzellvolumens und die in dieser Zeit erhöhten LH-Spiegel sowie die erhöhte Zahl an LH-Rezeptoren (Peyrat et al., 1981) je Zelle zurückzuführen ist. Franca et al. (2000) begründen den zweiten starken Testosteronanstieg mit der Pubertät. Hier ist die Synthesekapazität aufgrund erhöhter Leydigzellgröße und höherem Gehalt an glattem endoplasmatischem Retikulum gesteigert (Lunstra et al., 1986).

Speziesübergreifend ist der Hoden auch zur Östrogensynthese fähig, wobei in Abhängigkeit von der Spezies jedoch erhebliche qualitative und quantitative Unterschiede vorliegen.

Literaturübersicht

Erste Hinweise auf eine mögliche testikuläre Östrogensynthese geben Hauer (1933) und Küst (1934) für den Eber und Zondek (1934) für den Hengst aufgrund des Vorhandenseins großer Östrogenmengen im Urin. In Bestätigung dieser Befunde konnten Bedrak und Samuels (1969) das Enzym Cytochrom P₄₅₀-Aromatase im Hengsthoden nachweisen, das Androstendion zu Estron aromatisiert. Velle (1958) weist beim Eber erstmals den testikulären Ursprung dieser Östrogene nach, Claus und Hoffmann (1980) zeigen den unmittelbaren Zusammenhang der testikulären Östrogen-, Testosteron- und Androstenonproduktion auf, wobei Estron als das eigentliche testikuläre Östrogen bezeichnet wird. Hinsichtlich der Lokalisation der Östrogensynthese im Hoden ergibt sich kein einheitliches Bild. Dorrington und Armstrong (1975) berichten, dass Sertolizellen im unreifen Hoden bei Vorhandensein von FSH in der Lage seien sollen, Östrogene aus Testosteron zu bilden. Dies wird durch den Nachweis der Cytochrom P₄₅₀-Aromatase in den Sertolizellen von Ratte, Maus, Rötelmaus und Bär gestützt (Fraczek et al., 2000). Eine besondere Situation besteht beim Hund bei dem durch sogenannte Sertolizelltumoren große Mengen an Estradiol-17 β gebildet werden (Kawakami et al., 2001; Mischke et al., 2002).

Raese und Renaud (1983), sowie Hall (1988) weisen jedoch die Leydigzellen als Syntheseort der testikulär gebildeten Androgene und Östrogene bei adulten Tieren nach. Entsprechend sind für Payne und Youngblood (1995) nur Leydigzellen, unabhängig vom Alter der Tiere, zur Produktion von Steroidhormonen im Hoden befähigt. Darüber hinausgehend berichten Nitta et al. (1993) auch von einer Expression der Cytochrom P₄₅₀-Aromatase in den Spermatiden der Maus. Bei neueren Untersuchungen am Hoden der Ratte und Rötelmaus gelang es, die Expression der Cytochrom P₄₅₀-Aromatase mRNA in Zellen des Keimepithels, insbesondere den pachytänen Spermatozyten und Spermatiden nachzuweisen (Bilinska et al., 2000; Lanzino et al., 2001; Carreau, 2001).

Wie Abb. 1 zeigt, ist Cholesterin das Ausgangssubstrat der Steroidbiosynthese. Dabei ergibt sich die Besonderheit, dass der Hoden, im Gegensatz zu anderen steroidbildenden Geweben, nur in sehr begrenztem Maße in der Lage ist, Cholesterin aus dem Blut aufzunehmen. Daher wird der größte Teil des zur testikulären Steroidsynthese nötigen Cholesterins in den Leydigzellen selbst gebildet (Bamberg, 1994b).

Tierartlich unterschiedlich ist auch, inwieweit der sogenannte Δ 4- oder Δ 5-Syntheseweg eingeschlagen wird. Dies ist im Wesentlichen abhängig von der

katalytischen Aktivität und vom Verhältnis der Cytochrom P₄₅₀ c17 α -Hydroxylase-C17, 20 Lyase zur 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase sowie der Substratspezifität der 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase. Daraus ergibt sich inwieweit das noch gemeinsame Substrat Pregnenolon entweder via 17 α -Hydroxy-Pregnenolon in Dehydroepiandrosteron oder in Progesteron umgewandelt wird. So ist bei Pferd, Schwein, Ratte und Maus der Δ 4-Syntheseweg ausgebildet, wohingegen bei Primaten und Wiederkäuern die Synthese über den Δ 5-Syntheseweg verläuft (Conley und Bird, 1997).

Die Bedeutung des Δ 4-Syntheseweges für den Eber ergibt sich auch daraus, dass Rostalski et al. (2000) erstmals Progesteron als Sekretionsprodukt des Hodens nachweisen konnten.

Beide Synthesewege münden schließlich in die Bildung von Androstendion, das die unmittelbare Vorstufe von Testosteron darstellt, das aber auch direkt zu Estron via P₄₅₀-Aromatase katalysiert werden kann; nach Aromatisierung entsteht aus Testosteron Estradiol-17 β (Conley und Bird, 1997; Hall, 1988; Schuler, 2000).

Weitere im Hoden des Ebers gebildete Steroide gehören zur Gruppe der Pheromone (Claus, 1979/1994; Claus und Hoffmann, 1980).

Sie umfasst das für den typischen Ebergeruch verantwortliche Androstenon sowie die Verbindungen 3- α und 3- β Androstenol. Diese drei testikulären Pheromone werden auch als Δ 16 Steroide bezeichnet, da bei ihnen im D-Ring eine Doppelbindung von C₁₆ nach C₁₇ vorliegt. Wie bei den anderen testikulären Steroiden ist auch für die Pheromone das Cholesterol bzw. in dessen Folge das Pregnenolon und Progesteron die Ausgangssubstanz. Es konnte nachgewiesen werden, dass die gleichzeitige Synthese von Pheromonen und Hodensteroiden korreliert zueinander abläuft (Claus und Alsing, 1976; Claus und Hoffmann, 1980; Claus, 1994).

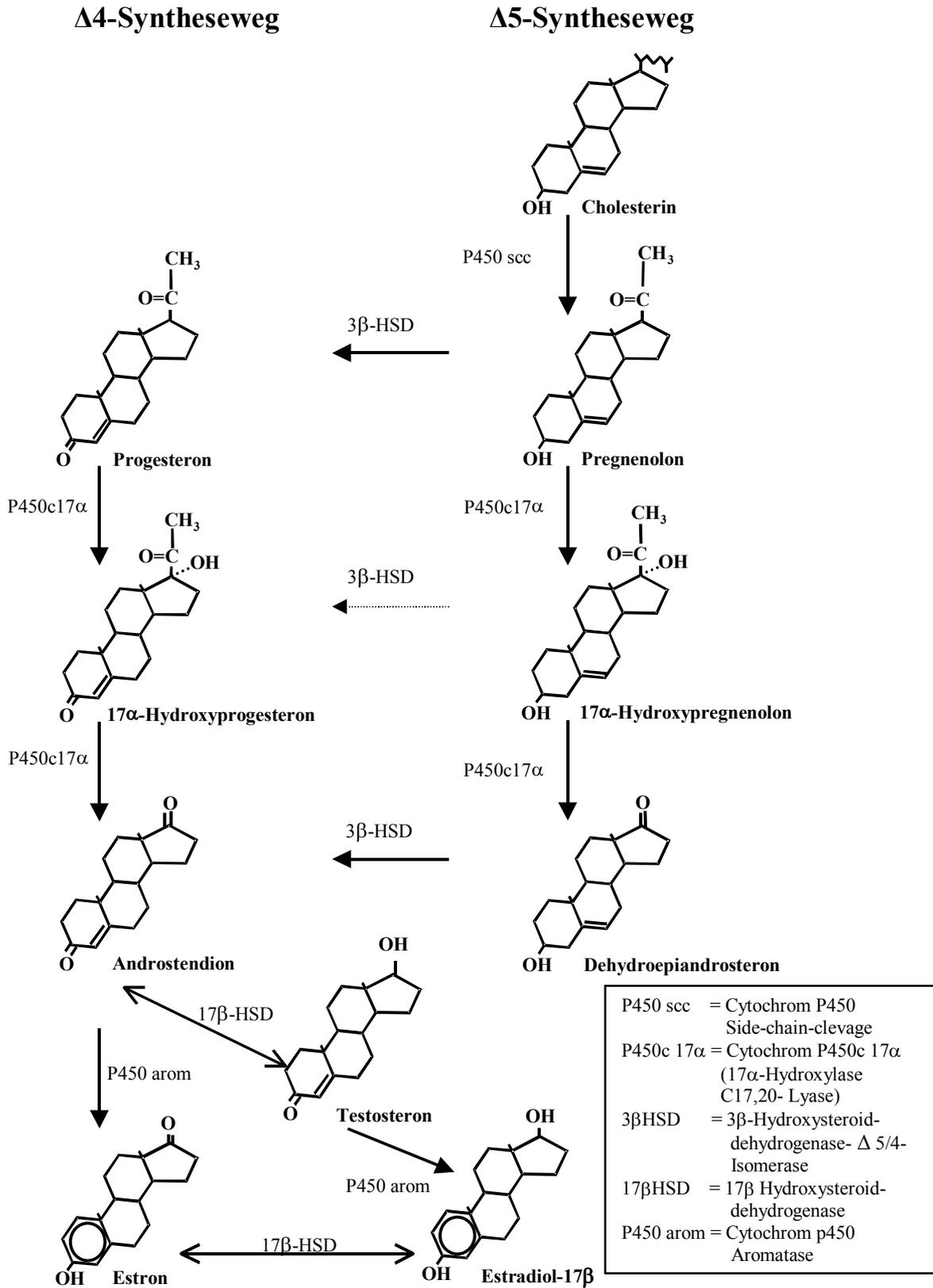


Abb. 1: Darstellung der Testosteron-, Östrogen- und Progesteronsynthese

2.4. Neuroendokrine Regulation der Hodenfunktion

Die endokrinen und germinativen Leistungen des Hodens unterliegen einem zentralen, neuroendokrinen Regelmechanismus, wobei zusätzlich parakrine und autokrine Regelmechanismen eine Rolle spielen (Döcke, 1994; Bellve und Zheng 1989; Sordoillet et al., 1992).

Zentraler Regelfaktor ist das im Hypothalamus gebildete und zu den Peptidhormonen gehörende *Gonadotrope Releasing Hormon* (GnRH), das über das hypothalamische Pfortadersystem in die Adenohypophyse gelangt und dort die Synthese und Sekretion der gonadotropen Hormone stimuliert. (Clapper und Conn, 1985; Conn et al., 1987). Die beiden gonadotropen Hormone, das Follikel stimulierende Hormon (FSH) und das Luteinisierende Hormon (LH) gehören zu den Glykoproteinen und werden in den basophilen Zellen der Adenohypophyse produziert. Sie bestehen aus zwei Untereinheiten, wobei die α -Untereinheit bei den hypophysären Glykoproteinen einheitlich und die β -Einheit hormonspezifisch ist (Döcke, 1994).

Das LH entfaltet seine Wirkung durch Bindung an spezifische Membranrezeptoren in den Leydigzellen (Payne und Youngblood, 1995) und das FSH an Membranrezeptoren in den Sertolizellen (Bardin et al., 1988). Dadurch werden die Leydigzellen zur Produktion testikulärer Steroide und die Sertolizellen u.a. zur Sekretion von Inhibin angeregt. Dabei schließen die testikulären Steroide und das Inhibin den neurohormonellen Regelkreis mit einem negativen Feedback. Die Steroidhormone (Testosteron) hemmen die Sekretion von GnRH, FSH und LH (Döcke, 1994). Inhibin, ein Glykoprotein das aus zwei Peptidketten besteht, hemmt selektiv die Bildung und Sekretion von FSH in der Hypophyse (Bardin et al., 1988)

2.5. Biologische Wirkungen testikulärer Steroidhormone

2.5.1 Endokrine Wirkungen

Die gonadalen Steroide üben ihre endokrinen Wirkungen im Wesentlichen bei der Entwicklung und Steuerung der Genitalorgane, der Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale, aber auch bei nicht mit der Sexualfunktion in Verbindung stehenden Organen aus.

So stimulieren Androgene die morphologische Ausbildung und Erreichung der Funktionsfähigkeit von Penis, Skrotum, akzessorische Geschlechtsdrüsen und

Nebenhoden. Nur unter Einfluß von Androgenen erhält der Penis seine Erektionsfähigkeit und das Epithel des Nebenhodens, wie auch die akzessorische Geschlechtsdrüsen, werden zur Produktion spezifischer Sekrete angeregt.

Weiterhin üben die Androgene Einfluß auf die Ausgestaltung sekundärer, männlicher Geschlechtsmerkmale des Körperbaus aus. So beeinflussen sie das Skelettwachstum, die Bemuskelung, die subkutane Fettverteilung und das Haarwachstum, so dass ein „maskulines“ Erscheinungsbild entsteht. Ebenfalls durch Androgene induziert und zentralnervös vermittelt ist das Sexual- und Aggressionsverhalten männlicher Tiere. Zusätzlich zu den geschlechtsspezifischen Ausprägungen üben die Androgene einen Einfluß auf verschiedene Stoffwechselabläufe aus; so wirken sie sich anabol auf Organe wie z.B. das Herz und die Leber aus, stimulieren das Knochenwachstum und hemmen den Fettstoffwechsel (Bamberg, 1994c).

Den testikulären Östrogenen konnte im männlichen Genitale eine Verstärkung der Androgenwirkungen zugeordnet werden; Ganjam und Amann (1976) beschreiben, dass die androgeninduzierten Effekte bei den akzessorischen Geschlechtsdrüsen beim Bullen durch Östrogene verstärkt werden.

In Versuchen mit Östrogenrezeptor- α -Knock-out Mäusen konnte gezeigt werden, dass männliche Mäuse, obwohl die Hoden und Nebenhoden während der Pubertät eine normale Morphologie aufwiesen, infertil waren. Nach der Geschlechtsreife zeigte sich in den Nebenhoden eine gestörte Resorption der luminalen Flüssigkeit; dabei wiesen die Nebenhoden eine geringe Spermienkonzentration auf, im weiteren Verlauf atrophierten die Hoden. Hess et al. (1997/2000) postulieren, dass die Ursache der Atrophie in dem erhöhten luminalen Druck infolge mangelnder Resorption zu suchen ist, weiterhin begründen sie die Infertilität mit der starken Verdünnung der Spermien.

Ebenfalls am Modell von Östrogenrezeptor- α -Knock-out Mäusen zeigten Mahato et al. (2000/2001), dass Spermien dieser Tiere nur eine geringe Motilität aufwiesen und in in vitro Versuchen nicht fertil waren. Weiterhin konnte Mahato et al. (2001) zeigen, dass im Gegensatz zu den Östrogenrezeptor- α -Knock-out Mäusen Östrogenrezeptor- β -Knock-out Mäuse fertil sind.

2.5.2 Parakrine / autokrine Wirkungen

Parakrine Wirkungen beschreiben im Gegensatz zu den endokrinen Wirkungen die direkte Zellkommunikation unmittelbar benachbarter Zellen via Hormon und Hormonrezeptor, i.d.R. in einem definierten Organ. Autokrine Wirkungen liegen vor, wenn das sezernierte Hormon einen Einfluß auf die Zelle hat, in der es gebildet wurde.

Der Nachweis der Expression eines Rezeptors und der Synthese seines Liganden im gleichen Organ, lassen auf eine parakrine Wirkung schließen (Weinbauer und Wessels, 1999).

2.5.2.1 Wirkungen von Progesteron im Hoden

Progesteron ist Zwischenprodukt des Δ^4 -Syntheseweges, als eigenständiges testikuläres Sekretionsprodukt konnte es bisher aber nur beim Eber nachgewiesen werden (Rostalski et al., 2000). In verschiedenen Untersuchungen dagegen konnte die Expression des Progesteronrezeptors im Hoden gezeigt werden. So beschreiben bereits Galena et al. (1974) das Vorkommen von Progesteronbindungsstellen in primären Spermatozyten und Spermatischen der Ratte. Schmidt und Danzo (1980) konnten deren Vorkommen auch in den Sertolizellen der Ratte nachweisen, Pino und Valladares (1988) berichten über deren Vorkommen in den Leydigzellen und sprechen von einem zytosolischen Rezeptor. Heikinheimo et al. (1995) konnten mittels RT-PCR die Progesteronrezeptor mRNA im Hoden von Javaneraffen (*Macaca fascicularis*) nachweisen. Konrad et al. (1998) konnten bei der Ratte eine Expression des Progesteronrezeptors während der Hodenentwicklung in den Kernen der germinativen Zellen, den peritubulären Zellen und den Leydigzellen mittels Immunhistochemie feststellen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Weber et al. (2002), die ebenfalls bei der Ratte das Vorkommen des Progesteronrezeptors in den Zellkernen von Spermatogonien, Sertolizellen und Leydigzellen nachwiesen, allerdings nicht in den peritubulären Zellen. Die Bedeutung von Progesteron bzw. die seiner Rezeptoren wird nicht einheitlich beurteilt; so vermuten Konrad et al. (1998) sowie Weber et al. (2002) einen Einfluß des Progesterons auf die Spermatogenese. In ähnlicher Weise äußern sich auch Heikinheimo et al. (1995), die einen Einfluß auf die Ausreifung der Spermien für möglich halten. Als weitere mögliche Wirkung wird sein Einfluß auf die Steroidbiosynthese diskutiert. So beobachtet El-Hefnawy et al. (1998) bei der Maus, dass Progesteron an der Down-Regulierung des LH-Rezeptors in den Leydigzellen beteiligt ist. Ebenfalls eine Wirkung auf die Steroidbiosynthese wird von Rossato et al.

(1999) angedacht, da er Progesteronbindungsstellen an der Plasmamembran der Leydigzellen fand, über die durch Progesteronbindung die Steroidbildung der Leydigzellen gesteigert wurde.

2.5.2.2 Wirkung von Östrogen im Hoden

Die Expression des Östrogenrezeptors- α als auch des Östrogenrezeptors- β konnte im Rete Testis bei Maus, Ratte und Ziegenbock nachgewiesen werden. Übereinstimmend wird von einer Beeinflussung der Resorption der Tubulusflüssigkeit berichtet (Ergun et al., 1997; Goyal et al., 1997; Lee et al., 2000; Mahato et al., 2001, Mansour et al., 2001).

Weiterhin konnte die Expression des Östrogenrezeptor- α (Zhai et al., 1996; Hess et al., 1997) und des Östrogenrezeptor- β (Rosenfeld et al., 1998) in den Leydigzellen bei der Ratte wie auch in Spermatiden beim Mann gezeigt werden. Zhai et al. (1996) vermuten, dass Östrogene die Entwicklung der Leydigvorläuferzellen zu reifen Leydigzellen beeinflussen. Anhand von Östrogenrezeptor- α -Knock-out Mäusen war es Mahato et al. (2001) möglich zu zeigen, dass zur Bildung fertiler Spermien der Östrogenrezeptor- α benötigt wird.

Shughrue et al. (1998) gelang es in den Sertolizellen und Spermatozyten der Ratte den Östrogenrezeptor- β darzustellen, konnte ihm aber keine Funktion zuweisen.

2.5.2.3 Wirkung von Androgenen im Hoden

Androgenrezeptoren wurden bei der Ratte und der Maus in den Leydigzellen, der glatten Muskulatur der Gefäße, den Sertolizellen, den peritubulären Zellen sowie den Spermatogonien und Spermatiden nachgewiesen, wobei die Verteilung des Androgenrezeptors offensichtlich abhängig war vom Stadium der Spermatogenese (Vornberger et al., 1994; Konrad et al. 1998; Weber et al., 2002).

Auch beim Mann wurde die Expression des Androgenrezeptors in den Leydig-, Sertoli- und peritubulären Zellen nachgewiesen, wobei sich ebenfalls eine Abhängigkeit der Expression des Androgenrezeptors in den Sertolizellen von der Spermatogenese ergab (Suarez-Quian et al., 1999). In Untersuchungen von Goyal et al. (1997) bei Schafböcken, von Kotula et al. (2000) bei Ebern sowie von Suarez-Quian et al. (1999) beim Mann konnte die Expression von Androgenrezeptoren in den Spermatogonien und Spermatiden jedoch nicht bestätigt werden.

Spezifische Hinweise über die Art der zu unterstellenden parakrinen Wirkung testikulärer Androgene liegen bisher nicht vor. Vermutet wird allerdings, dass die Androgene in der postnatalen Entwicklung die Reifung der Myoid- und Sertolizellen fördern (Weinbauer und Wessels, 1999). Übereinstimmend wird weiterhin den Androgenen eine fördernde oder kontrollierende Funktion der Spermatogenese über ihre Wirkung auf die Sertolizellen zugesprochen (Vornberger et al., 1994; Goyal et al., 1997; Kotula et al., 2000). Weiterhin wird eine Androgen-kontrollierte Mitwirkung der peritubulären Zellen bei der Regulation der Spermatogenese wie auch die direkte Wirkung der Androgene auf die germinativen Zellen diskutiert. Hinsichtlich der Lokalisation der Androgenrezeptoren in den Leydigzellen wird davon ausgegangen, dass es sich hierbei um einen sehr schnellen autokrinen Rückkopplungsmechanismus handelt, der die Differenzierung und Funktion der Leydigzellen steuert (Vornberger et al., 1994; Kotula et al., 2000).

2.5.3 Steroidhormonrezeptoren

Steroidhormone, wie auch Thyroxin und Vitamin D₃, entfalten ihre Wirkung durch Bindung an spezifische, intrazellulär exprimierte Rezeptoren der Zielzellen (Evans, 1988).

Diese Rezeptoren bilden insgesamt eine Superfamilie, wobei die einzelnen Rezeptoren von ihrer Struktur und ihrer Funktionsweise sehr einheitlich aufgebaut sind. Die Rezeptormoleküle sind in verschiedene Molekülabschnitte oder Domänen untergliedert, die die Bezeichnungen A-F tragen (s. Abb. 2). Diesen Domänen kommen unterschiedliche Funktionen zu; so ist die DNA-bindende Domäne die Domäne C, die Bindung des Liganden erfolgt an der Hormon-Bindungsdomäne E. Der C-(Carboxy)-Terminus des Rezeptors mit der Domäne F beinhaltet eine Transkriptions-Aktivierende Funktion-2 (TAF 2) und übt damit eine modulierende Wirkung auf die transskriptionellen Aktivitäten aus. Den N-(Amino)-Terminus des Rezeptors bilden die Domänen A/B; häufig befindet sich in diesem Bereich eine Ligand-unabhängige Transkriptions-Aktivierende Funktion-1 (TAF 1) (Kumar et al., 1987; Evans, 1988; Beato, 1989; O'Malley, 1990; Landers und Spelsberg, 1992).

Hinsichtlich der DNA-Bindungsstelle (C-Domäne) besteht eine hohe Homologie zwischen den einzelnen Subtypen der Rezeptorfamilie. Werden für einen Liganden, wie z.B. für Östrogene, mehrere Rezeptoren exprimiert, besteht i.d.R. auch eine hohe Homologie in der Ligandbindungsstelle (Domäne E).

Literaturübersicht

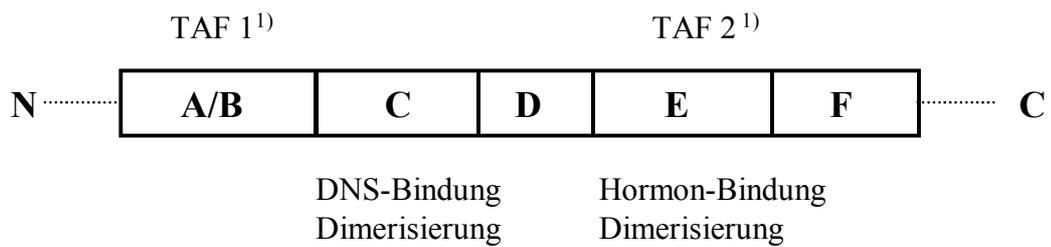


Abb. 2: Struktur des humanen Östrogenrezeptors; Domänen und ihre Funktion (nach Hoffmann und Schuler, 2000)

¹⁾ Transkriptionsaktivierende Funktionen

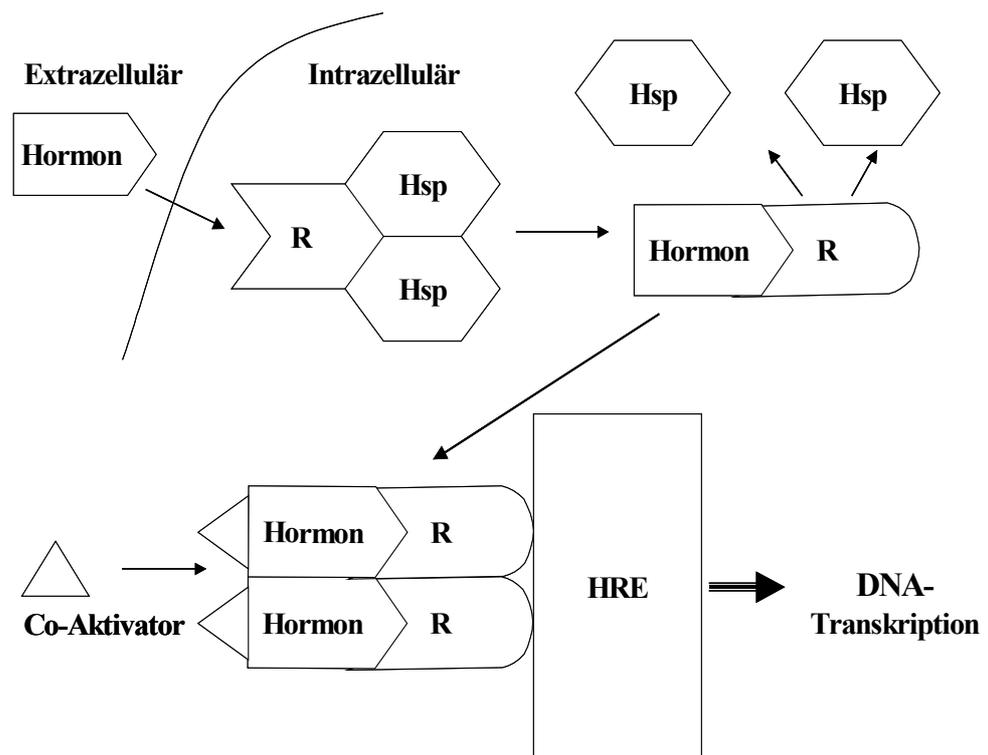


Abb. 3: Schematische Darstellung der Ligand – Steroidrezeptor – DNA - Interaktion: R: Rezeptor; Hsp.: Hitzeschockproteine; Hre.: Hormon responsive element

Aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften können die Steroide die Zellmembran ungehindert passieren und so in die Zelle bzw. in den Zellkern einwandern.

Lange wurde unterstellt, dass die Steroidhormonrezeptoren im Zytosol der Zellen lokalisiert sind und erst nach Bindung mit dem Liganden in den Kern wandern. Mittels immunhistochemischer Techniken konnte jedoch für Steroidhormone die nukleäre Lokalisation der Rezeptoren nachgewiesen werden (Greene et al., 1984; Perrot-Appianat et al., 1986; Renoir et al., 1990).

Wie Abb. 3 zeigt, kommt es nach Interaktion des Liganden mit dem Rezeptor (Aporezeptor) innerhalb weniger Minuten zu dessen Aktivierung und Konformationsänderung. Unter Abgabe gebundener Heat-Shock-Proteine erfolgt eine Rezeptor-Dimerisierung, es bildet sich ein stabiler Hormon-Rezeptor-Komplex (Holorezeptor). Gleichzeitig interagiert ein Transkriptions-Coaktivator-Komplex mit dem Rezeptor. Die Konformationsänderung überträgt sich auf die DNA-Bindungsdomäne, in dem diese demaskiert wird. Die jetzt nicht mehr blockierten Zinkfinger des Rezeptors können nun an spezifischen DNA-Erkennungssequenzen binden und so die Transkription modulieren (Carson-Jurica et al., 1990; O'Malley, 1990; Landers und Spelsberg, 1992; Peterson, 2000).

2.5.3.1 Progesteronrezeptoren

Abweichend von der in Abb. 2 dargestellten Struktur des Östrogenrezeptors fehlt dem Progesteronrezeptor die F-Domäne.

Das Progesteronrezeptorgen ist mehr als 90 Kilobasenpaare groß und enthält acht Exons. Dabei kodiert das erste Exon den N-Terminus des Rezeptors, die DNA Bindungsdomäne C wird durch zwei Exons kodiert. Die verbleibenden fünf Exons kodieren die Hormonbindungsdomäne E. Die Ligand-unabhängige Transkriptions-Aktivierende Funktion-1 ist im N-Terminus lokalisiert und die Ligand-abhängige Transkriptions-Aktivierende Funktion-2 liegt in der C-Domäne (Gronemeyer, 1992; Landers und Spelsberg, 1992, Misrahi et al., 1987/1993). Der C-Terminus des Rezeptormoleküls soll nach Xu et al. (1996) eine Repressor-Funktion beinhalten, die in Abhängigkeit des Liganden, z.B. Progesteron oder Antigestagen, die Transkription fördert oder hemmt.

Die Aminosäuresequenzen des Progesteronrezeptors sind hochkonserviert. So besteht bei der DNA-Bindungsdomäne für Mensch, Maus und Kaninchen eine komplette Homologie, auch mit dem Huhn besteht noch eine 99%-ige Identität. Auch

Literaturübersicht

die Steroidbindungsdomäne weist mit einer Homologie von 96% eine hohe Übereinstimmung zwischen Maus, Mensch und Kaninchen auf; sie liegt bei 86% für den Progesteronrezeptor des Huhnes. Auch der C-Terminus des Menschen und Kaninchen unterscheiden sich in nur einer Aminosäure (Connely et al., 1986; Loosfelt et al., 1986; Schott et al., 1991; Misrahi et al., 1993).

Der Progesteronrezeptor existiert in mehreren Isoformen. So beschreiben Vegeto et al. (1993) für den humanen Progesteronrezeptor die zwei Isoformen A und B. Die Isoform A des Progesteronrezeptors ist gegenüber der Isoform B um 164 Aminosäuren am N-Terminus verkürzt; dabei wird der Progesteronrezeptor A mit 94 kDa und der Progesterorezeptor B mit 114 kDa (Giangrande et al, 1997) bzw. 120 kDa (Mohamed et al., 1994) Molekulargewicht angegeben. Beim Schwein wiesen Slomczynska et al. (2000) die Isoform B mit 120 kDa und die Isoform A mit 86 kDa nach.

Nach Sartorius et al. (1994) soll der bei der Isoform A fehlende Abschnitt aus 164 Aminosäuren die Ursache für funktionelle Unterschiede der beiden Rezeptortypen sein; sie postulieren, dass auf diesem Segment eine dritte Transkriptions-Aktivierende Funktion liegt. Nach Mohamed et al. (1994) liegen beim Menschen beide Rezeptorformen in den Zielgeweben vor, so dass es durch Dimerisierung zu Bildung von Homo- und Heterodimeren in Form von A/A, B/B und A/B kommen kann, die dann unterschiedlich die Transkription regulieren.

Beide Progesteronrezeptorisoformen werden von demselben Gen kodiert, das Auftreten der zwei verschiedenen Formen liegt daran, dass bei der Translation derselben mRNA zwei verschiedenen Startkodonen benutzt werden (Vegeto et al., 1993; Ogle et al., 1997; Peterson, 2000). Kastner et al. (1990) beschreiben für die beiden Promotoren eine Östrogenabhängigkeit.

Dem humanen Progesteronrezeptor A wird überwiegend eine Transkriptions-Repressorfunktion der DNA-Bindung zugesprochen, die sich auf alle Steroidhormonrezeptorarten erstreckt, wohingegen die Isoform B bei Progesteron abhängigen Genen als Transkriptionsaktivator wirkt. Auch Funktionsunterschiede in Abhängigkeit von der Spezies wurden beschrieben; so aktiviert der Progesteronrezeptor A beim Huhn die Transkription (Vegeto et al., 1993; Wen et al. 1994; Giangrande et al, 1997).

Eine dritte Progesteronrezeptorvariante wurde von Wei et al. (1996/1997) beschrieben. Diese am N-Terminus weiter verkürzte und mit C bezeichnete Isoform

hat beim Menschen ein Molekulargewicht von ca. 60 kDa. Auch diese Isoform C kann Heterodimere mit den A und B Varianten eingehen.

Für eine weitere Isoform des Progesteronrezeptors, die Isoform S, beschreiben Hirata et al. (2000) eine neue cDNA und deren mRNA, die sie in ejakulierten Spermien des Mannes aber auch im Endometrium der Frau nachweisen konnten. Das Molekulargewicht der Isoform S wird von den Untersuchern auf 29 kDa geschätzt. Weitere Angaben zur Funktion liegen nicht vor.

2.5.3.2 Östrogenrezeptoren

Zur Zeit sind zwei Formen von Östrogenrezeptoren bekannt. Der als Östrogenrezeptor- α bezeichnete Rezeptor wurde 1962 von Jensen und Jacobsen entdeckt. Sie fanden ein intrazelluläres, uterines Protein, das in der Lage war, Estradiol-17 β zu binden. In der Folge wurde dieser Rezeptor als Östrogen-, Estradiol- oder als klassischer Östrogenrezeptor bezeichnet.

Nach der Entdeckung eines zweiten Östrogenrezeptors durch Kuiper et al. (1996) und Mosselmann et al. (1996) wurde der bisher bekannte Östrogenrezeptor als Östrogenrezeptor- α und der neu gefundene Rezeptor als Östrogenrezeptor- β bezeichnet. Mosselmann et al. (1996) entdeckten den Östrogenrezeptor- β beim Menschen, Kuiper et al. (1996) gelang es, diesen Rezeptor bei der Ratte zu klonieren. Zwischenzeitlich wurde der Rezeptor bei verschiedenen Spezies nachgewiesen, unter anderem auch beim Schwein und Rind (Slomczynska et al., 2001; Schuler et al., 2004 submitted).

Obwohl beide Östrogenrezeptoren denselben Liganden binden und ihr Aufbau eine hohe Homologie aufweist, werden sie von zwei unabhängigen Genen kodiert, die beim Menschen auf zwei verschiedenen Chromosomen lokalisiert und kodiert sind (Enmark et al., 1997). Das Gen des Östrogenrezeptors- β ist mit 40 Kilobasenpaaren deutlich kleiner als das den Östrogenrezeptor- α kodierende Gen, das eine Größe von 140 Kilobasenpaaren hat. Beide Rezeptoren sind entsprechend dem Grundmuster von Steroidhormonrezeptoren aufgebaut (s. Abb. 2). Der humane Östrogenrezeptors- α umfasst 596 Aminosäuren, sein Molekulargewicht beträgt 67 kDa. Der Östrogenrezeptor- β umfasst 530 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 57 kDa. Beide Östrogenrezeptoren weisen für die DNA-Bindungsdomäne einen hohen Homologiegrad von 96% auf, die Homologie der Ligand-Bindungsdomäne beträgt

58% (Mosselmann et al., 1996; Enmark et al., 1997; Ogawa et al., 1998). Bei Vergleichen der Aminosäuresequenzen innerhalb verschiedener Spezies sowohl des Östrogenrezeptors- α (Engel, 1991; Green und Chambon, 1991), wie auch des Östrogenrezeptors- β (Rosenfeld et al., 1999) zeigte sich, dass auch hier eine hohe Homologie besteht.

Desweiteren konnten Hirata et al. (2002) die cDNA einer neuen Isoform des Östrogenrezeptors- α im Hoden und Spermatischen des Mannes wie auch in weiteren Organen klonieren. Dieser als „Östrogenrezeptors- α Isoform S“ bezeichnete Rezeptor hat eine Größe von 39 kDa, er besitzt eine unidentifizierte 5' Sequenz die von einem neuen als S-Exon bezeichneten Abschnitt codiert wird.

Pace et al. (1997), Petterson et al. (1997) und Ogawa et al. (1998) zeigten, dass die Östrogenrezeptoren- α und β in der Lage sind, auch Heterodimere zu bilden. Kuiper et al. (1997) sehen darin einen dritten Weg der Signaltransduktion. Beide Östrogenrezeptoren haben eine ähnlich hohe Affinität zu Estradiol-17 β .

2.5.3.3 Regulation der Expression von PR und ER

Die Expression von Progesteron- und Östrogenrezeptoren unterliegt einem komplexen Regelmechanismus.

In zahlreichen Untersuchungen wurde gezeigt, dass Östrogene die Expression der eigenen Östrogenrezeptoren (Leavitt und Takeda, 1986; Bergman et al., 1992; Ing und Tornesi, 1997; Xiao und Goff, 1999) wie auch die der Progesteronrezeptoren aufregulieren (Katzenellenbogen und Norman, 1990; Aronica und Katzenellenbogen, 1991; Kraus und Katzenellenbogen, 1993; Ing und Tornesi, 1997; Xiao und Goff, 1999). Dabei liegt zugrunde, dass das Gen des Progesteronrezeptors Östrogenrezeptor vermittelt reguliert wird; so konnten Kraus et al. (1994) mehrere Östrogen „responsive“ Regionen im Gen des Progesteronrezeptors lokalisieren. Allerdings konnte auch nachgewiesen werden, dass Östrogene in der Lage sind, die Expression ihres eigenen Rezeptors zu reduzieren (Perrot-Applanat et al. 1994; Kraus und Katzenellenbogen, 1993; Parandoosh et al., 1995). Generell gilt jedoch, dass die Östrogenrezeptoren nicht nur durch Östrogene sondern durch das Progesteron negativ beeinflusst werden; das heißt, erhöhte Progesteronkonzentrationen unterdrücken durch Phosphorylierung die Expression von Östrogenrezeptoren (Leavitt und Takeda, 1986; Evans und Leavitt, 1980; Perrot-Applanat et al., 1994). Bei hoher

Progesteronkonzentration wird daher auch eine durch Östrogene induzierte Expression des Progesteronrezeptors gehemmt (Katzenellenbogen, 1980; Leavitt und Takeda, 1986; Kraus und Katzenellenbogen, 1993; Xiao und Goff, 1999).

Neben der Östrogen-abhängigen Expression des Progesteronrezeptors wird diese aber offensichtlich auch durch Progesteron reguliert, da Progesteron im Dezidugewebe bei Ratten die Expression des Progesteronrezeptors förderte (Ogle et al., 1990/1998). Weitere Informationen über derartige „gewebsspezifische“ Regulationsmechanismen konnten nicht gefunden werden.

2.5.4 Nichtgenomische Wirkungen von Steroidhormonen

Neben den oben beschriebenen genomischen Wirkungen, bei denen es nach der Hormon-Rezeptorbindung zu einer DNA-Transskription und mRNA-Translation kommt, sind auch noch sogenannte nichtgenomische Wirkungen bekannt. Bei diesen findet im Gegensatz zu genomischen Wirkungen keine Transskription statt, daher lassen sich diese Wirkungen nicht durch Transskriptions- und Translationsinhibitoren wie Cykloheximid und Aktinomycin D hemmen. Charakteristisch ist der deutlich schnellere Wirkungseintritt als bei genomischen Wirkungen.

Bei nichtgenomischen Wirkungen wird unterschieden zwischen spezifischen, rezeptorvermittelten und unspezifischen, nicht rezeptorvermittelten Wirkungen. Spezifische, nichtgenomische Wirkungen sind abhängig von der Art und Affinität, sowie der Bindungskapazität des jeweiligen Rezeptors; nichtspezifische, nichtgenomische Wirkungen hingegen benötigen eine hohe Ligandenkonzentration und ergeben sich aus Wechselwirkungen zwischen Ligand und der Lipophilie sowie Polarität der Zellmembranen (Wehling, 1997). Eine der ersten, die auf solche nichtgenomische östrogenvermittelte Wirkung hinweisen, sind Jungblut et al. (1991).

Für Progesteron konnte ein fördernder Einfluß auf die Akrosomenreaktion der Spermien bei Mann (Meinzel und Turner, 1991; Sabeur et al., 1996), Hengst (Cheng et al., 1998) und Rüden (Sirivaidyapong et al., 1999/2001) als nichtgenomische Wirkung nachgewiesen werden. Hierzu bindet Progesteron an einen Rezeptor, der in der Plasmamembran der Spermien lokalisiert ist. Die folgende Akrosomenreaktion wird sehr rasch, beim Mann innerhalb einer Minute (Meinzel und Turner, 1991), durch eine Beschleunigung des Kalzium- und Chloridionenaustauschs der Zelle vermittelt.

Eine Aktivitätssteigerung der Leydigzellen bei der Steroidsynthese wiesen Rossato et al. (1999) als spezifische, nichtgenomische Wirkung von Progesteron nach,

Literaturübersicht

bei der es infolge der Rezeptorbindung an der Plasmamembran durch schnellen Natriumioneneinstrom zu einer Depolarisation der Zelle kommt.

Desweiteren werden für Östrogene nichtgenomische Wirkungen beschrieben. Morley et al. (1992) konnten beim Huhn nachweisen, dass Estradiol-17 α , Estradiol-17 β , Estron und Estriol einen steigernden Effekt der intrazellulären Kalziumfreisetzung aus Granulosazellen hat.

Auch bei der Steuerung des Blutdrucks spielen Östrogen induzierte nichtgenomische Wirkungen eine Rolle; so tritt nach Östrogenbindung, durch Blockade der Kalziumkanäle und Hemmung der extrazellulären Kalziummobilisation, eine Vasodilatation ein (Farhat et al., 1996). Cho et al. (2003) beschreiben hingegen einen Kalziumeinstrom in die Endothelzellen; der zu einem Anstieg der Stickoxidproduktion mit anschließender Vasodilatation führt.

Braun und Thomas (2003) beschreiben eine dosisabhängige, rezeptorvermittelte Reduzierung der Estradiol-Produktion der Ovarien beim Atlerfisch durch Androgene.

3. Material und Methoden

3.1. Versuchsaufbau

Zur Verfügung standen die Hoden von je 5 Ebern im Alter von 50, 100, 150, 200 und mehr als 250 Tagen. Nach der Gewinnung wurde das Gewebe für die Immunhistochemie und den mRNA-Nachweis konserviert mit dem Ziel, die Expression des Progesteronrezeptors auf mRNA- und Proteinebene darzustellen. In Ergänzung dazu sollte auch der Versuch des Nachweises der Expression des Östrogenrezeptors- α auf mRNA-Ebene unternommen werden.

3.2. Tiermaterial und Kontrollgewebe

Genutzt wurde das Hodengewebe von 25 geschlechtsgesunden Ebern unterschiedlicher Rassen. Die Tiere stammen sowohl aus dem Patientengut der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Giessen, als auch aus dem Tierbestand der Lehr- und Forschungsstation Oberer Hardthof der Justus-Liebig-Universität Giessen.

Für Positivkontrollen wurde Uterus bzw. Endometrium von Schlachtschweinen verwandt, die am Schlachthof Giessen geschlachtet worden waren.

3.3. Orchidektomie

Die Narkose der 50 Tage alten Eber erfolgte mittels intramuskulärer Injektion einer Kombination aus 20 mg/kg KGW Azaperon (Stresnil[®]), 0,5 mg/kg KGW Levomethadon (Polamivet[®]) und 20 mg/kg KGW Ketamin.

Zur Narkose der älteren Eber wurde ein venöser Zugang in die Vena auricularis gelegt, über den das Narkotikum Surital[®] als vierprozentige oder zehnprozentige Lösung in einer Dosierung von 17,4 mg /kg KGW injiziert wurde.

Präscrotal wurde ein Schnitt in der Medianen geführt, in die Wunde wurde ein Hoden von caudal aus dem Skrotum vorgelagert und für eine unbedeckte Kastration freipräpariert. Nach Aufsetzen einer Klemme auf den Samenstrang (Funiculus spermaticus) wurde dieser mit einer Durchstichligatur zweimal ligiert und der Hoden mit einem Emaskulator abgesetzt. Der zweite Hoden wurde in gleicher Weise durch den vorhanden Schnitt entfernt, anschließend wurde die Wunde mit liegenden U-Heften verschlossen.

3.4. Fixierung und Einbettung der Proben für die Immunhistochemie

Die Hoden wurden mit PBS-Puffer (pH 7,5) gespült, und das Hodengewebe mit einer Skalpellklinge in Würfel mit circa 10 mm Kantenlänge geschnitten. Die Gewebestücke wurden zur Fixation für 20-24 Stunden in 4%-igem Formol nach Lillie (1951) fixiert. Danach wurden sie bis zur Einbettung in Paraffin eine Woche mit einem 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,2) gewaschen. Die Einbettung in Paraffin geschah mit einem Einbettungsautomaten am „Institut für Veterinäranatomie der Justus-Liebig-Universität Gießen“ (Gerät: Einbettungsautomat Microm Laborgeräte GmbH, Heidelberg mit dazugehörigem Histoembedder EG1160 Leica Instruments GmbH, Nussloch). Der als positives Kontrollgewebe dienende Uterus wurde in gleicher Weise behandelt.

3.5. Immunhistochemische Darstellung des Progesteronrezeptors

Der immunhistochemische Nachweis des Progesteronrezeptors erfolgte in Anlehnung an die bei Hoffmann und Büttner (1998) und Schuler et al. (1999) beschriebenen Methoden.

3.5.1 Vorbereitung

3µm starke Gewebeschnitte wurden auf mit Aminopropyl-triethoxysilan (APES) beschichteten Objektträgern aufgezogen und 24 Stunden bei 37°C im Wärmeschrank getrocknet. Danach wurden die Präparate in einer absteigenden Xylol-Ethanol-Reihe entparaffiniert und rehydriert. Die Entparaffinierung erfolgte 2 x 20 Minuten in reinem Xylol, daran anschließend folgte die Rehydrierung für 2 x 10 Minuten in reinem Ethanol und dann absteigend für jeweils 5 Minuten in 96%-igem, 80%-igem, 70%-igem und 50%-igem Ethanol. An die Alkoholreihe schloß sich eine Spülung von 5 Minuten in Aqua dest. an.

Nach Durchlaufen der Alkoholreihe wurden die Schnitte für die immunhistologische Nachweisreaktion vorbereitet. Da das zur Fixierung des Gewebes eingesetzte Formol die Epitope der Rezeptoren vernetzt, müssen diese zur Steigerung ihrer Antigenität demaskiert werden. Dazu wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für 5 Minuten in Citratpuffer (10mM, pH 6,0) inkubiert und anschließend für 3 x 5 Minuten in der Mikrowelle bei 560 Watt in vorgeheiztem Citratpuffer gekocht, während des Kochens verdunstete Flüssigkeit wurde mit Aqua dest. ersetzt, um eine

Aufkonzentrierung der Citratpufferlösung und gleichzeitig ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern. Nach dem Kochen verblieben die Schnitte für 20 Minuten bei Raumtemperatur in der erhitzten Citratpufferlösung, sie wurden im Anschluß daran 2 x 2 Minuten in Aqua dest. gespült.

Um die im Gewebe enthaltenen endogenen Peroxidasen zu deaktivieren, wurden die Schnitte danach über fünf Minuten in einer 2%-igen Wasserstoffperoxidlösung inkubiert. Hierauf folgte eine jeweils fünfminütige Spülung mit Aqua dest. und PBS-Puffer (pH 7,2). Danach wurden die Objektträger in eine feuchte Kammer gelegt und die noch anhaftende Restflüssigkeit abgesaugt.

Zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen wurden die Schnitte danach für 45 Minuten mit 10%-igem, inaktivierten Pferdeserum in PBS-Puffer überschichtet. Zur gleichzeitigen Inaktivierung des im Hodengewebe enthaltenen endogenen Biotins wurden dem Pferdeserum je Milliliter Lösung vier Tropfen der Avidin-Lösung eines Avidin-Biotin-Blocking Kit zugesetzt. Dazu wurde zuvor die PBS-Puffer-Serumlösung um die Menge an zuzusetzender Avidin-Lösung vermindert.

3.5.2 Rezeptornachweis

Die immunhistochemische Darstellung des Progesteronrezeptors erfolgte mittels einer indirekten Immunperoxidase-Färbung. Zur Verstärkung des Bindungssignals wurde die Avidin-Biotin Technik nach Sternberger (1967) angewandt.

Nach Absaugen der Blockierungslösung (s.o.), wurden die Schnitte mit einem progesteronrezeptorspezifischen monoklonalen Primärantikörper überschichtet und für 20–24 Stunden bei 4°C in einer feuchten Kammer im Kühlschrank inkubiert. Der in PBS-Puffer gelöste Primärantikörper war das murine IgG_{2α} (Proteingehalt 70µg/ml) mit der Klonbezeichnung 10A9. Der Antikörper ist gegen die Aminosäuren 922 –933 des hochkonservierten Carboxyendes der Hormonbindungsdomäne E des humanen Progesteronrezeptors gerichtet. Er ist daher in der Lage, alle Isotypen von Progesteronrezeptoren zu binden. Zur zehnpromzentigen Antikörperlösung wurden nach Entnahme von 4 Tropfen PBS-Puffers je Milliliter vier Tropfen der Biotin-Lösung des Avidin-Biotin-Blocking Kit zugegeben.

Die Inkubation wurde mit dem Absaugen der Primärantikörper-PBS-Lösung von den Schnitten beendet. Danach wurden die Präparate nach folgendem Schema mit

einer 0,1 prozentige Tween 20-PBS-Lösung unter Schütteln gespült: 1x fünf Minuten, 1x zwanzig Minuten, 1x fünfzehn Minuten. Es folgte eine weitere Waschung in reinem PBS-Puffer für nochmals fünf Minuten.

Zur Detektion des an die spezifischen Epitope gebundenen Primärantikörpers, wurden die Präparate im nächsten Schritt mit einem vom Pferd stammenden und gegen Maus IgG gerichteten biotinylierten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:200) überschichtet und für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Antikörperlösung abgesaugt und die Objektträger in der oben beschriebenen Weise gespült. Danach wurden die Präparate 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer mit einem Peroxidase-konjugiertem Avidin-Biotin-Komplex (Verdünnung: 1:55,5) inkubiert, wonach die Lösung abgesaugt und die Schnitte erneut nach obigem Schema gewaschen wurden. Zur Sichtbarmachung des an den Sekundärantikörper gebundenen Avidin-Biotin-Komplexes folgte eine ein bis zwei minütige Inkubation in einer frisch angesetzten 3-3'-Diaminobenzidin-Lösung (DAB). Hierzu wurden 100mg DAB in 200ml Imidazol-Puffer gelöst und durchfiltriert, kurz vor der Inkubation wurden noch 70µl einer 30%-igen H₂O₂-Lösung zugegeben. Im Anschluß daran wurden die Präparate 2 x 10 Minuten in Aqua dest. gewaschen und eine Sekunde in 1:2 verdünntem Haematoxylin nach Harris gegengefärbt und 15 Minuten in fließendem Leitungswasser „gebläut“. Eingedeckt wurden die Präparate indem einige Tropfen KAISERS Glyceringelatine auf die Schnitte getropft und ein Deckglas aufgelegt wurde; die überschüssige Gelatine wurde entfernt. Zur Härtung des Eindeckmediums wurden die Objektträger in den Kühlschrank gelegt.

Kontrollproben: Zur Überprüfung auf unspezifische Färbungen wurde von jeder Gewebeprobe eine negative Kontrolle durchgeführt. Dazu wurde anstatt des spezifischen Primärantikörpers ein irrelevantes (Nonsense) Maus- IgG_{2α} (Klon 7T4-1F5) in der Verdünnung 1µl:1419µl PBS-Puffer eingesetzt.

Die Positivkontrolle wurde wie Hodengewebe behandelt.

3.5.3 Qualitative und Quantitative Auswertung der Immunhistochemie

Die Immunhistologischen Schnitte wurden lichtmikroskopisch bei 400-facher Vergrößerung stets durch die gleiche Person beurteilt und digitalphotographisch

erfasst; die Auszählung und Differenzierung der einzelnen Zellen geschah zum Teil mittels Ölimmersion bei 1000-facher Vergrößerung.

Progesteronrezeptor-positive Zellen waren eindeutig an dem braunen Präzipitat im Bereich des Zellkerns zu erkennen.

Da die Auswertung vor allem das Keimepithel betraf, wurden zur Auszählung Progesteronrezeptor-positiver Zellen nur Tubuli seminiferi herangezogen, die annähernd kreisrund angeschnitten waren, um eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Zellen bei der Auszählung zu gewährleisten.

Im Hinblick auf das Alter der Eber und damit dem Entwicklungszustand der Hoden und das sich daraus ergebende histologische Bild, konnte zwischen drei Gruppen differenziert werden:

Gruppe A: *Präpubertäre Tiere*

Hierunter fielen die fünf 50 Tage alten Eber sowie drei 100 Tage alte Tiere, bei denen die Tubuli seminiferi noch kein Lumen aufwiesen und die Wanderung der Prä spermatogonien an die Basalmembran noch nicht abgeschlossen war. Erfasst wurde der Prozentsatz der den Progesteronrezeptor exprimierenden Prä spermatogonien, indem mindestens 150 Prä spermatogonien ausgezählt wurden.

Bei den Gesichtsfeldern zur Auszählung der Prä spermatogonien wurde auch die Gesamtzahl der Sertolizellen erfasst und der Anteil der Progesteronrezeptor-positiven Zellen bestimmt.

Gruppe B: *Geschlechtsreife Tiere*

In diese Gruppe fielen alle 200 und mehr als 250 Tage alten Tiere, bei denen sich ein ungestörter Ablauf der Spermatogenese zeigte. Um mögliche Abhängigkeiten der Expression des Progesteronrezeptors von der Spermatogenese zu erkennen, erfolgte in Anlehnung an den Keimepithelzyklus eine Einteilung der Spermatogenese in drei Phasen, denen die jeweiligen Befunde zugeordnet wurden. Die einzelnen Phasen waren durch folgende Zuordnung charakterisiert (s. Abb. 4):

Phase I: A-Spermatogonien, pachytäne Spermatozyten, runde Spermatiden und Spermatiden in der Elongation mit viel Zytoplasma

Material und Methoden

Phase II: A-Spermatogonien, B-Spermatogonien, pachytäne Spermatozyten, runde Spermatisden und elongierte Spermatisden kurz vor der Abgabe in das Tubuluslumen

Phase III: A-Spermatogonien, präleptotäne, leptotäne, pachytäne und diplotäne Spermatozyten, runde oder sich elongierende Spermatisden

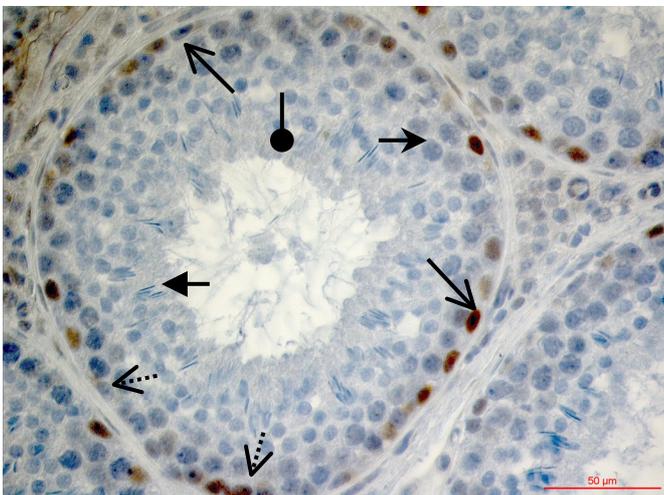
Zur quantitativen Bewertung wurden jeweils 150 A-Spermatogonien, in Phase II zusätzlich noch 150 B-Spermatogonien ausgezählt und der Anteil Progesteronrezeptor-positiver Zellen berechnet.

Wie bei Gruppe A wurden pro Gesichtsfeld auch die Sertolizellen ausgezählt und der Anteil Progesteronrezeptor-positiver Zellen berechnet.

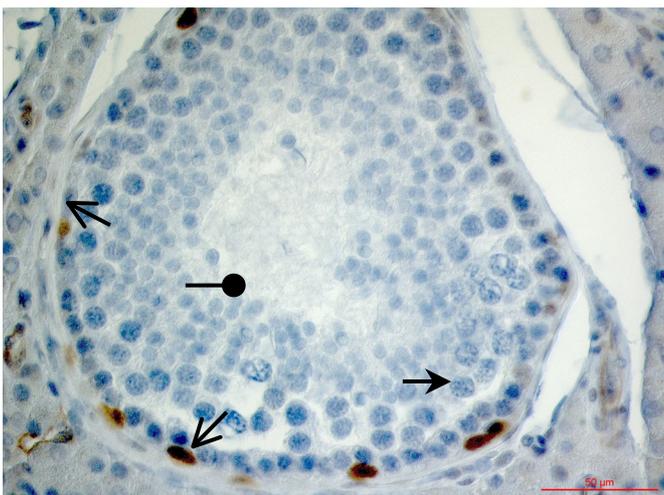
Um eine subjektive Beeinflussung bei der Auszählung der Präparate, insbesondere durch die altersabhängig verschiedene Morphologie zu vermeiden, wurde die Reihenfolge der Auszählung der Präparate nach dem Zufallsprinzip vorgenommen.



Phase I: A-Spermatogonien, pachytäne Spermatozyten, runde Spermatiden und Spermatiden in der Elongation mit viel Zytoplasma



Phase II: A-Spermatogonien, B-Spermatogonien, pachytäne Spermatozyten, runde Spermatiden und elongierte Spermatiden kurz vor der Abgabe in das Tubuluslumen



Phase III: A-Spermatogonien, präleptotäne, leptotäne, pachytäne und diplotäne Spermatozyten, runde oder sich elongierende Spermatiden

Abb. 4: Zuordnung des Ablaufs des Keimepithelzyklus zu den Phasen I, II, III am Hoden eines geschlechtsreifen 200 Tage alten Ebers; bei 400-facher Vergrößerung nach immunhistochemischer Darstellung des PR; (A-/B-Spermatogonien gefärbt und ungefärbt)
 A- Spermatogonie \rightarrow , B-Spermatogonie $\cdots\rightarrow$, pachytäne Spermatozyte \rightarrow ,
 runde Spermatide $\cdots\bullet$, elongierte Spermatide \rightarrow

Gruppe C: Tiere in der Pubertät

Diese umfasste zwei der 100 Tage alten Tiere sowie alle 150 Tage alten Tiere, bei denen aufgrund des Entwicklungsstandes der Tubuli seminiferi contorti eine eindeutige Zuordnung nach „präpubertär“ nicht mehr und nach „geschlechtsreif“ noch nicht möglich war. Die Auswertung dieser Gruppe erfolgte deskriptiv.

3.5.4 Statistische Verfahren

Die statistische Auswertung der quantitativ ermittelten und in Prozent angegebenen Zahlenwerte für gefärbte Spermatogonien und Sertolizellen wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe „Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen“ durchgeführt. Es wurde das Statistikprogramm BMDP/Dynamic, Release 7.0 (Dixon, 1993) verwendet.

Zur Bewertung der Expression des Progesteronrezeptors in den zentralen und basalen Prä-spermatogonien in den Hoden der juvenilen 50 und 100 Tage alten Tiere wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung im Faktor Position durchgeführt. Aufgrund der rechtsschiefen Verteilung der in Prozent erfassten Werte musste vor der Varianzanalyse jeder einzelne Wert zuerst Arcus-Sinus-transformiert werden. Bei der Bewertung der Gesamtprä-spermatogonienzahl der juvenilen Tiere im T-Test für unabhängige Stichproben wurde keine Transformation durchgeführt.

Bei der Bewertung der Gesamtsertolizellzahl der juvenilen Eber mit einem T-Test für unabhängige Stichproben musste ebenfalls eine Arcus-Sinus-Transformation durchgeführt werden.

Bei den adulten 200 Tage und 250 Tage alten Tieren wurde zur Bewertung der Progesteronrezeptorexpression in den A-Spermatogonien in Abhängigkeit zum Spermatogenesestadium und dem Alter der Tiere eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung im Faktor Phase durchgeführt. Zum Vergleich der Expression des Progesteronrezeptors in den A- und B-Spermatogonien der Phase II wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung im Faktor Typ angewandt.

Auch für die statistische Bearbeitung der Sertolizellverteilung mussten die erhaltenen Daten zuvor Arcus-Sinus-transformiert werden.

Material und Methoden

Auch hier wurde für die phasenabhängige Beurteilung eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung im Faktor Phase und für die Gesamtsertolizellzahl der T-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt.

In den Fällen, in denen eine Arcus-Sinus-Transformation durchgeführt werden musste wurde folgende Formel verwandt:

$$\text{arc sin} = \sqrt{\text{Prozentzahl} / 100}$$

Zur Darstellung der jetzt dimensionslosen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden diese nach folgender Formel in eine Prozentzahl rücktransformiert, die im Text angegebenen Mittelwerte $[\bar{X} \pm \text{SD}]$ entsprechen demzufolge nicht dem normalen arithmetischen Mittelwert, sondern sind entsprechend als „rt $\bar{X} \pm \text{SD}$ “ zu verstehen.

$$\text{Prozentzahl} = [\sin (X)]^2 \times 100$$

3.6. Nachweis der Expression des Progesteronrezeptors und des Östrogenrezeptors- α mittels RT-PCR

Für diesen qualitativen Nachweis erfolgten die Untersuchungen an jeweils einem Hoden aus jeder Altersgruppe.

3.6.1 Extraktion der mRNA

3.6.1.1 Aufarbeitung des Gewebes

Die bei der Kastration gewonnenen Hoden wurden in einem eiskalten PBS-Puffer (pH 7,5) gespült. Die Gewebestücke wurden auf Eis aus dem Parenchym des Hodens so präpariert, dass keine Tunica albuginea, kein Rete testis und keine Anteile des Nebenhodens anhafteten. Gewebestücke mit einer Größe von etwa 1 cm x 1 cm x 1 cm wurden in dreilagige Aluminiumfolie gewickelt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -85°C gelagert.

3.6.1.2 Gewinnung und Verdünnung der mRNA

Die bei -85°C gelagerten Gewebeproben wurden im gefrorenen Zustand grob zerkleinert und dabei immer wieder in flüssigen Stickstoff getaucht. Danach wurde die mRNA Aufreinigung nach dem RNeasy-Mini-Kit Protokoll der Firma Qiagen® (Qiagen, 2001) vorgenommen.

Von den Gewebestückchen wurden 20mg in ein RNasefreies PCR-Röhrchen eingewogen und dann mit 600 μ l RLT-Puffer® überschichtet, dem zuvor zur besseren Lösung der RNA aus dem Gewebe 10 μ l β -Mercaptoethanol je Milliliter zusetzt worden waren. Weiterhin enthält der RLT-Puffer® Guanidinthiocyanat zur Verminderung der im Gewebe enthaltenen RNasen.

Mit einem Ultra-Turrax® (T8-Homogenisator, S8 N-5G Einsatz) wurde das Gewebe homogenisiert; das erhaltene Homogenat wurde drei Minuten lang bei 10285g zentrifugiert und der Überstand zusammen mit 600 μ l 70%-igem Ethanol in ein neues PCR-Röhrchen verbracht (der Alkoholzusatz verbessert im nächsten Schritt die Bindung der RNA an die Silica-Gel Membran der Aufreinigungssäule). Danach wurde die Lösung zur weiteren Isolierung der RNA auf eine entsprechende Aufreinigungssäule aufgetragen. Über eine Zentrifugation von 15 Sekunden bei 8000g

wurde die flüssige Phase abgeschieden, die RNA blieb an die Silica-Gel Membran der Aufreinigungssäule gebunden. Die gebundene RNA wurde nun mit 350µl RW-1 Puffer[®] gewaschen (Zentrifugation bei 8000g über 15 Sekunden), wonach zur Verminderung möglicher DNasen die noch an der Silica-Gel-Membran gebundene RNA bei Raumtemperatur über 15 Minuten mit einem Gemisch aus 70µl RDD-Puffer[®] und 10µl DNase I[®] inkubiert wurde. Hierauf folgte zur Entfernung der DNase Lösung eine erneute Zentrifugation über 15 Sekunden bei 8000g mit 350µl RW-1 Puffer[®]. Nach Umsetzen der Aufreinigungssäule in ein neues PCR-Röhrchen, wurde diese nochmals mit 500µl ethanolhaltigem RPE-Puffer[®] gespült (Zentrifugation bei 8000g über 15 Sekunden); es folgte eine anschließende Reinigung mit 500µl RPE-Puffer[®] (Zentrifugation bei 8000g für zwei Minuten). Hierauf folgte die Trocknung der Säule mit einer einminütigen Zentrifugation bei 10285g. Zur Eluierung der mRNA wurde die Säule in ein 1,5ml PCR-Röhrchen gesetzt und zweimal mit 30µl RNase-freiem Wasser für eine Minute bei 8000g zentrifugiert.

Danach wurde die erhaltene mRNA mit einem Eppendorf-BioPhotometer 6131 mit den Wellenlängen 230nm, 260nm und 280nm gemessen und ihre Konzentration in Mikrogramm pro Milliliter sowie ihre Reinheit bestimmt. Ein Teil der mRNA wurde mit DEPC Wasser auf 200µg pro Milliliter verdünnt. Die reine mRNA wurde bei -85°C tiefgefroren und die verdünnte mRNA in der RT-PCR weiterverarbeitet.

3.6.2 Durchführung der RT-PCR

3.6.2.1 Primer

Zum Nachweis der Expression des Progesteronrezeptors in porcinem Gewebe wurde auf das von Ying et al. (2000) beschriebene Primerpaar zurückgegriffen. Dieses war bereits erfolgreich zum Nachweis des Progesteronrezeptors bei Schweineembryonen eingesetzt worden und wurde ursprünglich beim Huhn cloniert (Connely et al., 1986; Jeltsch et al., 1986). Vorwärts- und Rückwärtsprimer entsprechen zu 100% der porcinen Progesteronrezeptorsequenz.

Der Progesteronrezeptor-Vorwärts-Primer hat eine Schmelztemperatur von $T_m = 62,1^\circ\text{C}$, eine Molmasse von 6606 g/mol und die Basenfolge 5'-CCT AGC TCA CAG CGT TTC TAC C-3'; der Progesteronrezeptor-Rückwärts-Primer hat die Basenfolge 5'-CAT CCC TGC CAA TAT CTT GG-3', eine Schmelztemperatur von $T_m = 57,3^\circ\text{C}$

und eine Molmasse von 6028 g/mol. Die mit ihrer Hilfe amplifizierte Sequenz hat eine Größe von 179 Basenpaaren.

Zum Nachweis der Expression des Östrogenrezeptor- α im Eberhoden wurde ein Primerpaar eingesetzt, bei dem die Basenfolge des Vorwärts- und Rückwärts-Primers zu 100% der entsprechenden Sequenz des porcinen Östrogenrezeptors- α entspricht.

Der Vorwärts- Primer hat eine Schmelztemperatur von $T_m = 55,3^\circ\text{C}$ und eine Molmasse von 6163 g/mol; seine Basenabfolge ist 5'-GAG ATC CTG ATG ATT GGT CT-3'. Der Rückwärts-Primer hat eine Molmasse von 6062 g/mol, eine Schmelztemperatur von $T_m = 59,4^\circ\text{C}$; die Basenabfolge ist 5'- CAT CTC CAG CAG CAG GTC AT-3'. Dieser Östrogenrezeptor- α -Primer wurde auch beim Rind eingesetzt (Malayer et al., 1998) und erzeugte dort ein 477 Basenpaare großes Fragment der Hormonbindungsdomäne.

3.6.2.2 Probeninterne Kontrolle

Zur Kontrolle des Ablaufs der RT-PCR wurde die Expression von dem zur Gruppe der „Housekeeping gene“ gehörenden β -Aktin herangezogen.

Mit einer Schmelztemperatur von $T_m = 61,4^\circ\text{C}$ und einer Molmasse von 6118 g/mol ist die Basenfolge des β -Aktin Vorwärts-Primers 5'-GAG CTA TGA GCT GCC TGA CG-3'; die Basenabfolge des β -Aktin Rückwärts-Primers ist bei der Schmelztemperatur $T_m = 61,4^\circ\text{C}$ und der Molmasse von 6158 g/mol 5'-AGC ACT TGC GGT CCA CGA TG-3'. Die von Vorwärts- und Rückwärts-Primer amplifizierte cDNA umfasst 410 Basenpaare.

Auch dieser Primer wurde bereits erfolgreich bei Schweineembryonen verwandt (Ying et al., 2000; Wu et al., 1992).

3.6.2.3 One Step RT-PCR

Alle Untersuchungen wurden im Doppelansatz durchgeführt.

Die reverse Transskription der mRNA und die sich daran anschließende Amplifikation der cDNA wurden mit Hilfe des One-Step-RT-PCR Kit gemäß dem Protokoll der Herstellerfirma (Qiagen, 1999) in einer einzigen Reaktion durchgeführt.

Jeder Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen: 1,5 μl mRNA, (entspricht 300ng mRNA); 10 μl RT-PCR-Puffer; 2 μl dNTP-Fertigmischung; 1 μl

Primergemisch (entweder für den Progesteronrezeptor, den Östrogenrezeptor- α oder β -Aktin) bestehend aus Vorwärts- und Rückwärts-Primer in einer Konzentration von zusammen 10pmol/ μ l; 2 μ l RT-PCR Enzymmischung; 0,25 μ l RNase-Inhibitor. Jeder Reaktionsansatz wurde auf ein Gesamtvolumen von 50 μ l mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt.

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

Anstelle der mRNA wurden bei jedem Ansatz einmal 1,5 μ l Wasser als negative Kontrolle eingesetzt. Danach wurden die Reaktionsansätze in den Thermo Cycler überführt (Biometra Personal Cycler 20 mit Heizdeckel) und folgendem Temperaturregime unterzogen.

a) Zur Reversen Transskription wurden die Proben über 30 Minuten auf 50°C aufgeheizt; die danach folgende Inaktivierung der Reversen Transskriptase erfolgte durch einen weiteren Temperaturanstieg auf 95°C über 15 Minuten.

b) Die cDNA wurde eine Minute bei 94°C denaturiert, das Primerannealing, d.h. die Anlagerung der Primer an die cDNA-Einzelstränge, erfolgte dann bei 55°C und einer Minute Reaktionsdauer, gefolgt von einer eine Minute dauernden Elongation der Primer bei 72°C. Diesen Temperaturzyklus (55°C/72°C) durchliefen die Proben insgesamt 35 Mal. Hieran folgte eine abschließende Polymerisation von 10 Minuten bei 72°C und danach eine Kühlung der erhaltenen Amplifikate auf 4°C.

3.6.3 Elektrophoretische Auftrennung der Amplifikate

Die erhaltenen Amplifikate wurden in einem 2%-igen Ethidiumbromidagarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

3.6.3.1 Anfertigung des Ethidiumbromidagarosegels

1,82g Agarose wurden mit 91 ml Tris-Borsäure-EDTA Puffer (TBE-Puffer) gemischt und durch zweimaliges Aufkochen in der Mikrowelle bei 560 Watt gelöst.

Unter leichtem Schwenken wurde die Lösung zunächst abgekühlt, wonach 1,9 μ l Ethidiumbromid zugesetzt wurden [das Ethidiumbromid interkaliert mit den Basen der Nukleinsäuren und leuchtet nach Anregung durch UV-Licht orange auf; die

Position der Nukleinsäuren im Gel kann somit erkannt werden (Gassen und Schimpf, 1999)]. Das dann noch flüssige Gel wurde in eine mit einem Kamm versehene Gießkammer gegossen.

3.6.3.2 Elektrophorese

Nach Erstarren des Gels wurde der Kamm entfernt, das Gel entnommen und in eine horizontale submarine Elektrophoresekammer gelegt, wo es mit TBE-Puffer überschichtet wurde. Die im Gel vorhandenen Taschen wurden mit 15µl cDNA – gemischt mit 1,5µl Ladepuffer – beschickt. Für den Marker (Gene Ruler™) wurden 7µl DEPC-Wasser und 1,5µl Ladepuffer mit 1,5µl eines 100 Basenpaarmarkers der Konzentration 100ng DNA/µl angesetzt. Der Marker und die Probenlösungen wurden nacheinander in die Taschen des Gels pipettiert.

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

3.6.3.3 Gelauswertung

Zur Sichtbarmachung der „DNA-Banden“ wurde das Gel in einen Illuminator der Firma Biostep® verbracht und dort mit UV-Licht (365 nm) bestrahlt. Das Gel mit dem sichtbar gemachten Bandenmuster wurde mit einer Pieper FK 7512 IQ-IR Kamera, die an einen AMD K6 III Computer mit dem Betriebssystem Windows NT angeschlossen war, aufgenommen. Die für die Kamera notwendige Software war das Programm Phoretix Grabber 3.01.

3.6.4 Sequenzierung der Amplifikate

Zur Überprüfung, ob die nach Durchführung der RT-PCR erhaltenen Amplifikate der Sequenz des porcinen Progesteronrezeptor bzw. Östrogenrezeptors- α entsprachen, wurde die cDNA aufgereinigt und sequenziert. Für den Progesteronrezeptor erfolgte dies anhand eines Amplifikates der 250-Tage Gruppe, für den Östrogenrezeptor- α anhand eines Amplifikates der 50-Tage Gruppe. Entsprechend wurden Amplifikate aus dem als Kontrollgewebe verwendeten Endometrium untersucht.

Die Aufreinigung und Sequenzierung geschah in einem kommerziellen Labor der Firma Qiagen®, das hierzu 25µl der erhaltenen cDNA jeder Probe und 10µl Primer

Material und Methoden

in einer Konzentration von 10pmol/μl benötigte. Qiagen[®] arbeitet mit der von Sanger et al. (1977) entwickelten Methode (Qiagen, 1998), bei der die zu sequenzierende DNA als Matritze für die neuzubildende DNA dient. An ihr werden Deoxynukleotide und markierte Dideoxynukleotide eingebaut, die anschließend sichtbar gemacht werden. An den Stellen der eingebauten Dideoxynukleotide bricht die Verlängerung ab. Durch Vergleich der Teilstücke wird die Basenabfolge ermittelt. Diese Nukleotide können mit Radioisotopen, Chemilumineszenzfarbstoffen und Fluoreszenzmarkern markiert sein.

3.7. Materialien und Geräte

3.7.1 Immunhistochemie

3.7.1.1 Verwendete Antikörper

PR 10A9 (Primärantikörper)

Maus IgG_{2α} - Antikörper gegen humanen PR

Firma: Coulter-Immunotech®

Krefeld-Deutschland

BA-2000 (Sekundärantikörper)

Pferd biotinyliertes Anti-Maus IgG

Firma: Vector Laboratories®

Burlingame-USA

Klon 7T4-1F5 (Nonsense-Antikörper)

Maus-IgG_{2α}

Firma: Coulter-Immunotech®

Krefeld-Deutschland

3.7.1.2 Puffer und Lösungen

Avidin-Biotin Blocking Kit SP-2001

Avidin-Solution: *Je Milliliter Blockingserum 4 Tropfen bei gleichzeitiger PBS-Puffer-Reduktion zugeben.*

Biotin-Solution: *Je Milliliter Primärantikörperlösung 4 Tropfen bei gleichzeitiger PBS-Puffer-Reduktion zugeben.*

Firma: Vector Laboratories®

Burlingame-USA

Material und Methoden

10 mM Citratpuffer (pH 6,0)

Lösung A:

Citronensäure-Monohydrat ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)	21,01	g
Aqua dest.	ad 1000,00	ml

Lösung B:

Trinatriumcitrat-Dihydrat ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$)	29,41	g
Aqua dest.	ad 1000,00	ml

18 ml Lösung A und 82 ml Lösung B mit 900 ml Aqua dest. mischen.

DAB (Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid)-Lösung

0,1 N Imidazol-HCL (pH 7.08)	200,00	ml
Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid	0,10	g

Die Lösung darf erst kurz vor Gebrauch angesetzt werden

H ₂ O ₂ 30%-ig	70,00	µl
--------------------------------------	-------	----

Formol nach Lillie 4%-ig, gepuffert (pH 7,0):

40%-iges Formaldehyd	500,00	ml
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ($Na_2H_2PO_4 \cdot H_2O$)	20,00	g
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	32,50	g
Aqua dest.	ad 5000,00	ml

0,1 N Imidazol-HCL-Lösung (pH 7.08):

Imidazol	8,51	g
1N HCL	60,00	ml
Aqua dest.	ad 2000,00	ml

Material und Methoden

0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,2):

Lösung A:

Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	13,80	g
Aqua dest.	ad 1000,00	ml

Lösung B:

Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	17,80	g
Aqua dest.	ad 1000,00	ml

Für 100 ml Natriumphosphatpuffer werden 28,3 ml Lösung A mit 71,7 ml Lösung B gemischt.

PBS-Puffer zur Gewebespülung (pH 7,5):

Natriumchlorid	16,00	g
Dinatriumhydrogenphosphat.Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	2,88	g
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	0,40	g
Aqua dest.	ad 2000,00	ml

Lösung sterilisieren

PBS-Puffer Stammlösung für Immunhistologie:

Natriumchlorid	41,00	g
Dinatriumhydrogenphosphat.Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	11,00	g
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	2,75	g
Aqua dest.	ad 1000,00	ml

Für die Gebrauchslösung (pH 7,2) muß die Stammlösung im Verhältnis 1:4 verdünnt werden.

PBS-Tween 20-Lösung

Tween 20	1,00	ml
PBS-Puffer Gebrauchslösung (pH 7,2)	ad 1000,00	ml

Material und Methoden

Vectastain[®] ABC-Kit, Peroxidase Standard PK-4000

Lösung A:	9,00	µl
Lösung B:	9,00	µl
PBS-Puffer-Gebrauchslösung (pH 7,2)	ad 1000,00	µl
Firma: Vector Laboratories [®]		
Burlingame-USA		

Wasserstoffperoxidlösung 2%-ig

30%-iges H ₂ O ₂	13,33	ml
Aqua dest.	ad 200,00	ml

3.7.1.3 Auflistung besonderer Geräte

- ◆ Bildbearbeitungsprogramm: IM 1000 V 1.20 (Leica Mikroskopie GmbH, Wetzlar)
- ◆ Einbettungsautomat (Microm Laborgeräte GmbH, Heidelberg) mit Histoembedder EG 1160 (Leica Instruments GmbH, Nussloch)
- ◆ Farbvideokamera TK-1070E, F Nr. 06052298 (JVC Professional Products GmbH, Friedberg)
- ◆ Feuchte Kammer: 20 x 20 cm große Blechkeksdose mit Deckel
- ◆ Haushaltsmikrowellenherd Compact Y50, F.Nr. 25027231 (Moulinex, Solingen)
- ◆ Leitz-Mikroskop DM-R mit Digitalkamera Leitz DC 300 (Leica Mikroskopie GmbH, Wetzlar)
- ◆ Leitz-Mikroskop DM-RB (Leica Mikroskopie GmbH, Wetzlar)
- ◆ Magnetrührer MR 2002 (Heidolph Instruments GmbH & Co KG Kehlheim)
- ◆ Pumpe Typ N 035.1.2AN.18 (KnF Neuberger, Freiburg)
- ◆ Vortex-Evaporator (Fa.Haake-Buchler Meßtechnik GmbH, Karlsruhe)

3.7.2 RT-PCR

3.7.2.1 Primer

Schweinespezifischer Progesterorezeptorprimer

Vorwärts-Primer: 5'-CCT AGC TCA CAG CGT TTC TAC C-3'

Molmasse: 6606 g/mol

GC-Anteil: 54,5%

Schmelztemperatur: 62,1°C

Rückwärts-Primer: 5'-CAT CCC TGC CAA TAT CTT GG-3'

Molmasse: 6028 g/mol

GC-Anteil: 50,0%

Schmelztemperatur: 57,3°C

Schweinespezifischer Östrogenrezeptor- α -Primer

Vorwärts-Primer: 5'-GAG ATC CTG ATG ATT GGT CT-3'

Molmasse: 6163 g/mol

GC-Anteil: 45,0%

Schmelztemperatur: 55,3°C

Rückwärts-Primer: 5'-CAT CTC CAG CAG CAG GTC AT-3'

Molmasse: 6062 g/mol

GC-Anteil: 55,0%

Schmelztemperatur: 59,4°C

β-Aktin -Primer

Vorwärts-Primer: 5'-AGC ACT TGC GGT CCA CGA TG-3'

Molmasse: 6118 g/mol

GC-Anteil: 60,0%

Schmelztemperatur: 61,4°C

Rückwärts-Primer: 5'-GAG CTA TGA GCT GCC TGA CG-3'

Molmasse: 6158 g/mol

GC-Anteil: 60,0%

Schmelztemperatur: 61,4°C

Primer-Oligonukleotide hergestellt bei:

MWG BIOTECH AG

Ebersberg-Deutschland

3.7.2.2 Lösungen und Reagenzien

EDTA 0,5M

EDTA 18,61 g

Aqua dest. 80,00 ml

NaOH 2,00 g

Einstellen auf pH 8,0 um das EDTA zu lösen.

Aqua dest ad 100,00 ml

Ethidiumbromid 1%

Firma: Carl Roth®

Karlsruhe-Deutschland

Gene Amp® RNA PCR Kit

RNase Inhibitor 20 U/μl

Firma: Applied Biosystems®

Foster City-USA

Material und Methoden

Ladepuffer

Loading dye Solution (6x)

Firma: MBI-Fermentas[®]

St. Leon Rot-Deutschland

Homogenisationslösung

β-Mercaptoethanol 10,00 µl

RLT-Puffer 1,00 ml

100 Bp Marker

Gene Ruler[™] 100 bp DNA Ladder Plus

0,5 mg DNA/ml

Firma: MBI-Fermentas

St. Leon Rot-Deutschland

One Step RT-PCR Kit

One Step RT-PCR Enzyme-Mix

One Step RT-PCR –Puffer

Q-Solution

dNTP-Mix (mM)

RNase-freies Wasser

Firma: Qiagen[®]

Hilden-Deutschland

PBS-Puffer zur Gewebespülung (pH 7,5):

Natriumchlorid 16,00 g

Dinatriumhydrogenphosphat.Dihydrat (Na₂HPO₄•2H₂O) 2,88 g

Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄) 0,40 g

Aqua dest. ad 2000,00 ml

Lösung sterilisieren

RNeasy-Mini-Kit

RLT-Puffer[®]

RW 1-Puffer[®]

RPE-Puffer[®]

RNase-freies Wasser

Firma: Qiagen[®]

Hilden-Deutschland

RNA-Waschlösung

Ethanol (reinst) 20,00 ml

RPE-Puffer[®] Konzentrat 5,00 ml

RNase-freies DNase-Set

DNase-Stammlösung

RDD-Puffer[®]

Firma: Qiagen[®]

Hilden-Deutschland

TBE-Puffer, (10x)

Tris 108,00 g

Borsäure 55,00 g

EDTA (pH 8,0) 40,00 ml

DEPC-Wasser

DEPC 1,00 ml

Aqua dest. 1000,00 ml

In autoklavierter Flasche über 10 Stunden rühren.

3.7.2.3 Auflistung der Geräte

- ◆ 2301 Macrodrive 1 Powersupply (LKB Bromma, Golden, USA)
- ◆ Computer Windows NT, AMD K6 III mit Bildbearbeitungssoftware Phoretix Grabber 3.01
- ◆ Digitalkamera Pieper FK 7512 IQ-IR

Material und Methoden

- ◆ Flachgel-Elektrophoresekammer „Midi“ 100x150 mm (Keutz Labortechnik GmbH, Reiskirchen)
- ◆ Gießkammer für Flachgel-Elektrophoresekammer „Midi“ 100x150 mm (Keutz Labortechnik GmbH, Reiskirchen)
- ◆ Gießkammer für Hoefer[®] HE 33 Mini Horizontal Submarine Unit 7x10cm (Pharmacia Biotech, Freiburg);
- ◆ Hoefer[®] HE 33 Mini Horizontal Submarine Unit Elektrophoresekammer 7x10cm (Pharmacia Biotech, Freiburg);
- ◆ Thermocycler Biometra Personal Cycler 20 (biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen)
- ◆ Ultra-Turrax[®] T-8 mit Dispergierwerkzeug S8 N-5G, (IKA-Werke GmbH, Staufen)
- ◆ UV Belichter Biostep, (Biostep[®] GmbH, Jahnsdorf)
- ◆ Zentrifuge Mikro 22 R (Hettich[®] Zentrifugen, Tuttlingen)

4. Ergebnisse

4.1. Nachweis des Progesteronrezeptors im Eberhoden

4.1.1 Immunhistochemische Untersuchungen

4.1.1.1 Ergebnisse der Kontrolluntersuchungen

Bei allen mit dem irrelevanten Isotypenantikörper inkubierten Proben zeigte sich unabhängig vom Alter und Gewebetyp keinerlei Präzipitatbildung im Gewebe, wohingegen bei den Positivkontrollen am Schweineuterus eine deutliche Rezeptormarkierung auftrat.

4.1.1.2 Expression im Hoden juveniler Tiere (Gruppe A)

Die Hoden der 50 und 100 Tage alten Eber zeigen den erwarteten typischen Aufbau eines juvenilen, präpubertären Hodenparenchyms.

Die Tubuli seminiferi sind klein und besitzen einen Durchmesser von etwa 70–100 μm . Ihnen liegt auf der Basallamina ein dichter hochprismatischer Saum von Sertolizellen mit längsovalen Zellkernen auf. Im noch lumenlosen Zentrum der Tubuli seminiferi liegen große rundliche Prä spermatogonien, die im Laufe der Entwicklung zur Basallamina wandern. Ein Teil der Prä spermatogonien hat die Wanderung bereits beendet und steht – nachdem diese sich zwischen die Sertolizellen geschoben haben – mit der Basallamina in Kontakt. Die Tubuli seminiferi sind von interstitiären Leydigzellen umgeben (s. Abb. 5).

In beiden Altersgruppen ergab sich ein deutlich positives nukleäres Signal in den Prä spermatogonien. Dabei zeigt sich, wie aus Abb. 5 und 6 hervorgeht, dass die Expression des Progesteronrezeptors hauptsächlich in solchen Prä spermatogonien zu beobachten ist, die bereits in Kontakt mit der Basallamina standen. So waren bei den 50 Tage alten Tieren von den zentral liegenden Prä spermatogonien im Mittel $18,21 \pm 2,26\%$ und bei den an der Basallamina liegenden Prä spermatogonien $85,15 \pm 0,67\%$ Progesteronrezeptor-positiv. In der Altersgruppe der 100 Tage alten Tiere wurde der Progesteronrezeptor dann im Mittel in $2,06 \pm 2,26\%$ der zentralen und in $92,06 \pm 1,7\%$ der basalen Prä spermatogonien exprimiert (Tab 1). Dieser Unterschied im Anteil Progesteronrezeptor-positiver Prä spermatogonien und damit der Effekt der Lokalisation war mit $p < 0,0001$ hochsignifikant.

Die Expression des Progesteronrezeptors in den Prä spermatogonien war zwischen den beiden Altersgruppen nicht unterschiedlich. Hinsichtlich der

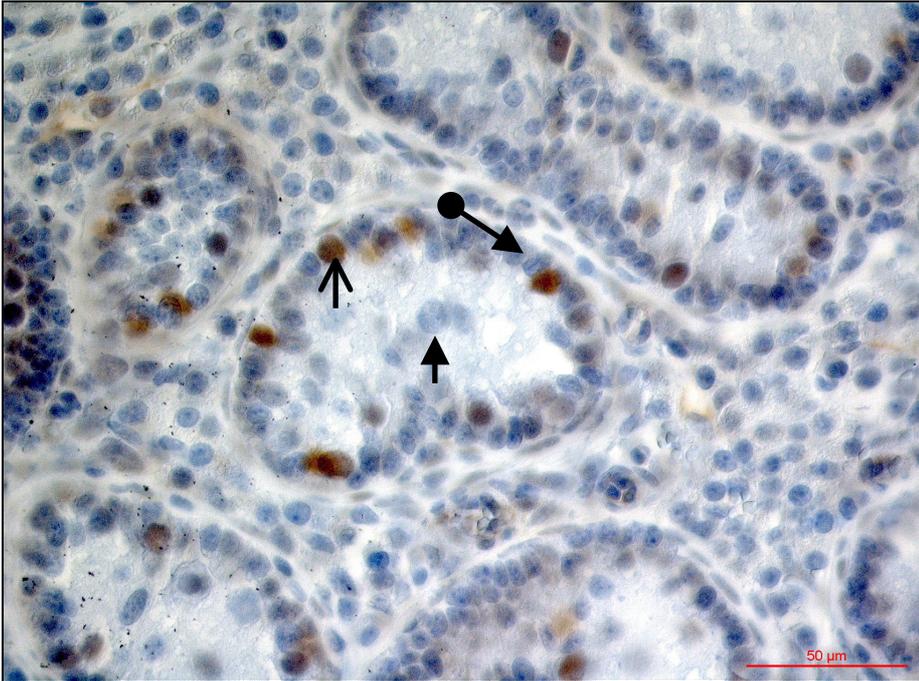
Ergebnisse

Wechselwirkung zwischen den beiden Altersgruppen, zeigte sich ein signifikanter Trend ($p= 0,0029$) zur verstärkten Expression des Progesteronrezeptors mit fortschreitendem Alter nach Erreichen der Basalmembran.

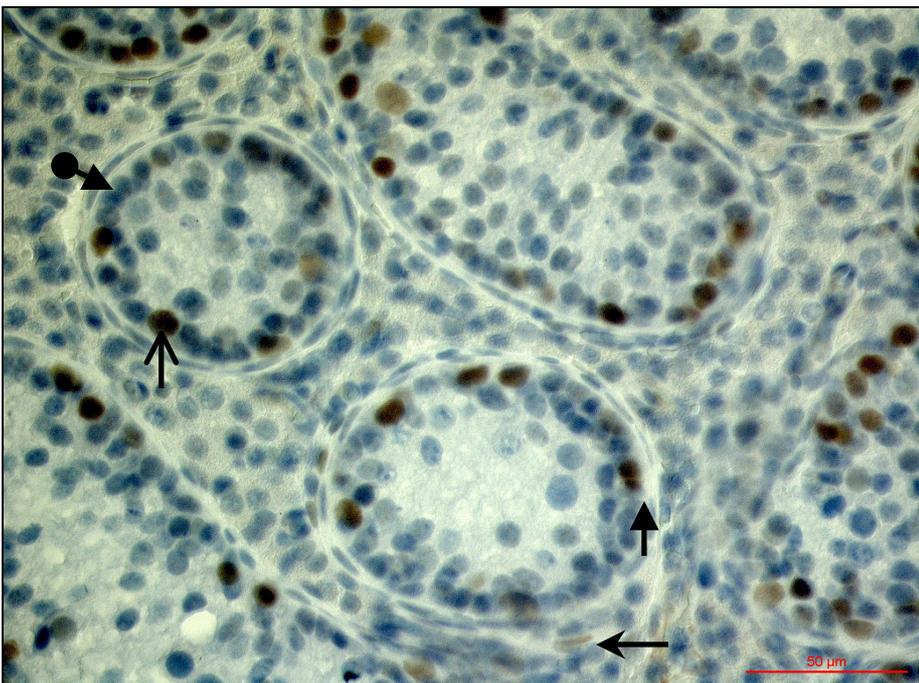
In den Sertolizellen der juvenilen Tiere konnte nur in geringer Zahl eine Expression des Progesteronrezeptors festgestellt werden. Dabei war die Färbeintensität deutlich schwächer als bei den Prä spermatogonien. So waren im Mittel bei den 50 Tage Tieren $0,09 \pm 0,09\%$ und bei den 100 Tage alten Tieren $0,52 \pm 0,08\%$ der Sertolizellen markiert; es bestanden keine Unterschiede in Abhängigkeit vom Alter (s. Tab 2).

In seltenen Einzelfällen waren auch Markierungen in den Peritubulären Zellen sowie in den Endothelzellen der Blutgefäße zu sehen. Eine Expression des Progesteronrezeptor in den Leydigzellen konnte nicht aufgezeigt werden.

Ergebnisse



Eberhoden im Alter von 50 Tagen



Eberhoden in Alter von 100 Tagen

Abb.5: Expression des PR im Hoden präpubertärer Eber. Tubuli seminiferi Querschnitte bei 400-facher Vergrößerung: Positiv markiert sind gefärbte Zellen basale Spermatogonie \rightarrow ; zentrale Präspematogonie \rightarrow ; Sertolizelle $\bullet \rightarrow$, Perizyten \rightarrow

Ergebnisse

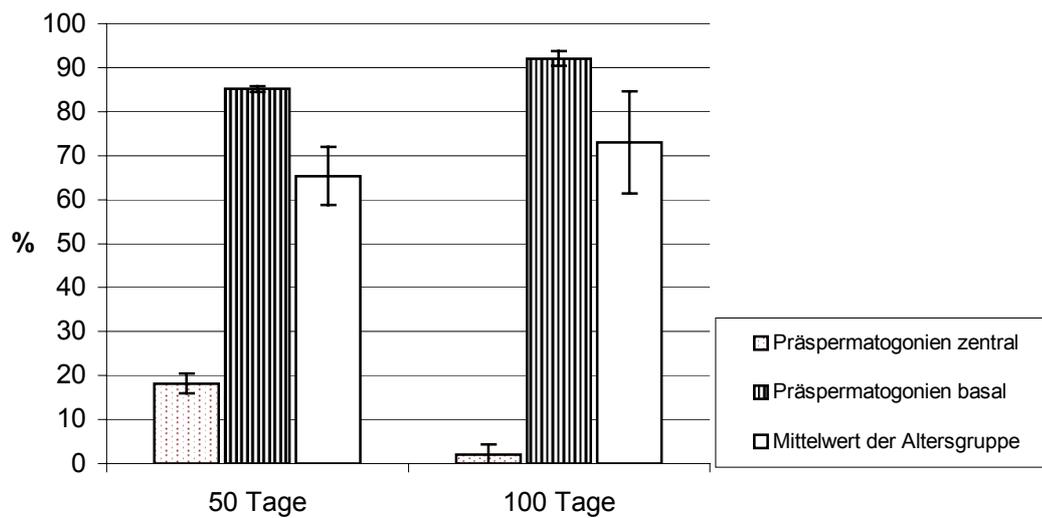


Abb. 6: Prozentuale Verteilung [$\bar{X} \pm SD$] der den Progesteronrezeptor exprimierenden Präspmatogonien beim präpubertären Eber in Abhängigkeit von der Lokalisation.

Tab. 1: Prozentuale Verteilung [$\bar{X} \pm SD$] der den Progesteronrezeptor exprimierenden Präspmatogonien präpubertärer Eber in Abhängigkeit von der Lokalisation.

Position-Präspermatogonien	Alter (Tage)		Mittelwert beider Altersgruppen \bar{x}
	50	100	
Präspermtogonien zentral \bar{x}	18,21	2,06	10,47
SD	2,26	2,26	4,25
Präspermatogonien basal \bar{x}	85,15	92,06	87,96
SD	0,67	1,7	1,19
Mittelwert Alter \bar{x}	65,34	72,96	68,2
SD	6,6	11,59	8,88

Tab. 2: Prozentualen Häufigkeit [$\bar{X} \pm SD$] der Expression des Progesteronrezeptors in den Sertolizellen präpubertärer Eber.

Sertolizellen	Alter (Tage)		Mittelwert beider Altersgruppen \bar{x}
	50	100	
\bar{x}	0,09	0,52	0,2
SD	0,09	0,08	0,11

4.1.1.3 Expression im Hoden geschlechtsreifer Eber (Gruppe B)

Bei den adulten Ebern im Alter von 200 und 250 Tagen war das Hodenparenchym dadurch gekennzeichnet, dass die Tubuli seminiferi deutlich an Größe zugenommen hatten und sie ein voll ausgebildetes, aus mehreren Schichten aufgebautes Keimepithel besaßen.

Bezogen auf die Gruppe der germinativen Zellen konnte eine Expression des Progesteronrezeptors nur in den Kernen der A- und B-Spermatogonien nachgewiesen werden, Spermatozyten und Spermatisden waren stets negativ. Dies zeigen die Abb. 7 und 8, in denen bei der Auswertung auch zwischen den in Kap. 3.5.3. definierten drei Phasen des Keimepithelzyklus unterschieden wird. Die quantitative Auswertung ergab folgende Ergebnisse:

Von den A-Spermatogonien in der Gruppe der 200 Tage alten Tiere zeigten im Mittel in Phase I $78,92 \pm 1,56\%$, in Phase II $78,88 \pm 2,07\%$ und in Phase III $78,16 \pm 3,18\%$ eine deutliche Expression des Progesteronrezeptors; bei den 250 Tage alten Tieren ergaben sich folgende Werte in Phase I $77,82 \pm 4,14\%$, Phase II $75,82 \pm 4,22\%$ Phase III $77,42 \pm 3,96\%$. Die statistische Auswertung ergab hinsichtlich des Alters keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Auch hinsichtlich der drei Phasen (Zuordnung zum Keimepithelzyklus) ergaben sich keine Unterschiede innerhalb sowie zwischen den Altersgruppen. Demnach konnten beide Gruppen mit dem Ergebnis zusammengefasst werden, dass bei den adulten Tieren im Mittel $77,84 \pm 3,23\%$ der A-Spermatogonien den Progesteronrezeptor exprimierten.

Für die B-Spermatogonien der Phase II ergab sich, dass bei den 200 Tage alten Tieren im Mittel $80,04 \pm 2,73\%$ und bei den 250 Tage alten Tieren $78,24 \pm 3,45\%$ den Rezeptor exprimierten. Unterschiede zwischen den beiden Altersgruppen zeigten sich nicht.

Damit ergibt sich, dass im Mittel $79,14 \pm 3,08\%$ der B-Spermatogonien den Progesteronrezeptor exprimierten.

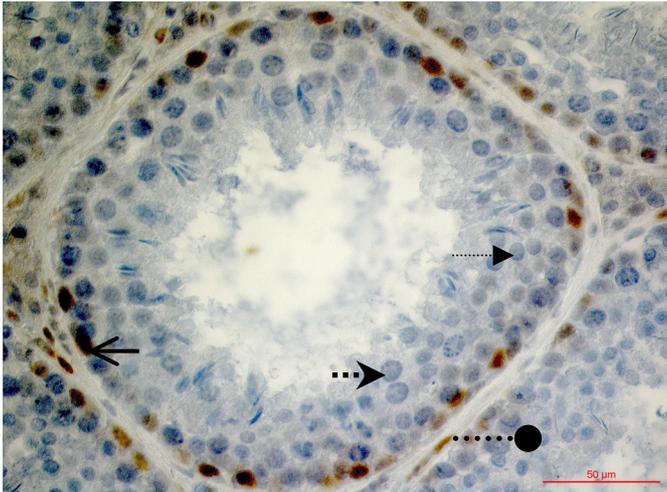
Auch in den Sertolizellen konnten schwache Progesteronrezeptor-positive nukleäre Signale, festgestellt werden. Bezogen auf die Phasen I, II und III ergaben sich folgende Ergebnisse. Bei den 200 Tage alten Tieren exprimierten im Mittel in der Phase I $9,85 \pm 1,28\%$, der Phase II $11,14 \pm 1,19\%$ und der Phase III $11,08 \pm 2,62\%$ der Sertolizellen den Progesteronrezeptor. In der Altersgruppe von 250 Tagen lagen die entsprechenden Werte bei von $7,49 \pm 3,66\%$ (Phase I), $8,52 \pm 1,76\%$ (Phase II) und

Ergebnisse

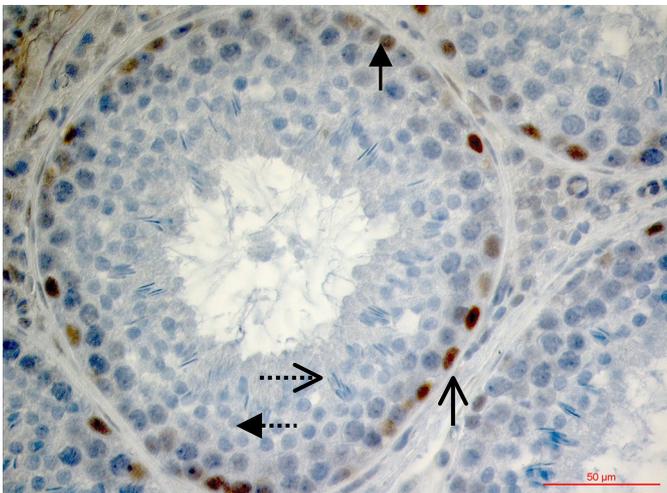
6,52 ± 3,71% (Phase III). Zwischen beiden Altersgruppen sowie zwischen den einzelnen Phasen ergaben sich keine Unterschiede.

Wie schon bei den juvenilen Tieren war auch hier vereinzelt ein Expressionssignal in den Endothelzellen der Blutgefäße zu sehen, in seltenen Fällen auch in den peritubulären Zellen. Kein Signal wurde in den Leydigzellen gefunden.

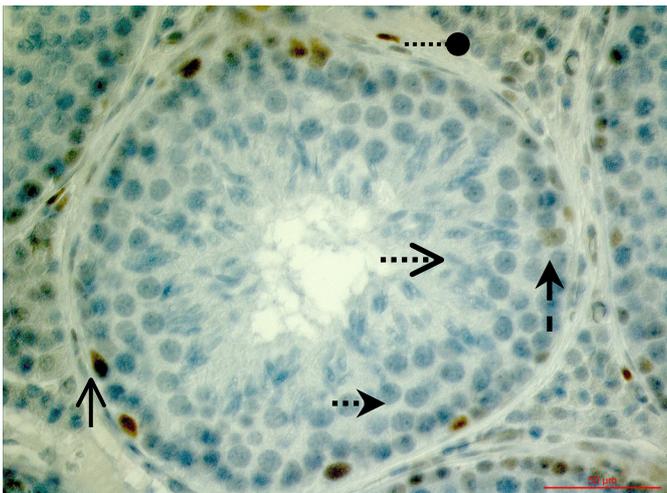
Ergebnisse



Phase I: A-Spermatogonien, pachytäne Spermatozyten, runde Spermatiden und Spermatiden in der Elongation mit viel Zytoplasma



Phase II: A-Spermatogonien, B-Spermatogonien, pachytäne Spermatozyten, runde Spermatiden und elongierte Spermatiden kurz vor der Abgabe in das Tubuluslumen



Phase III: A-Spermatogonien, präleptotäne, leptotäne, pachytäne und diplotäne Spermatozyten, runde oder sich elongierende Spermatiden

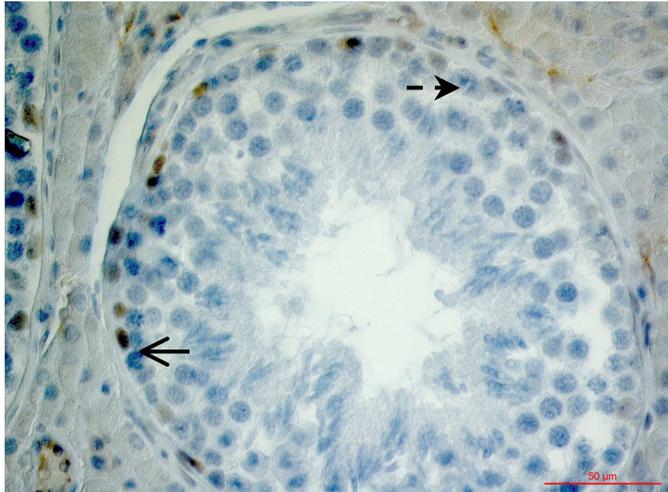
Eberhoden im Alter von 200 Tagen

Abb. 7: Expression des Progesteronrezeptors im Hoden geschlechtsreifer Eber

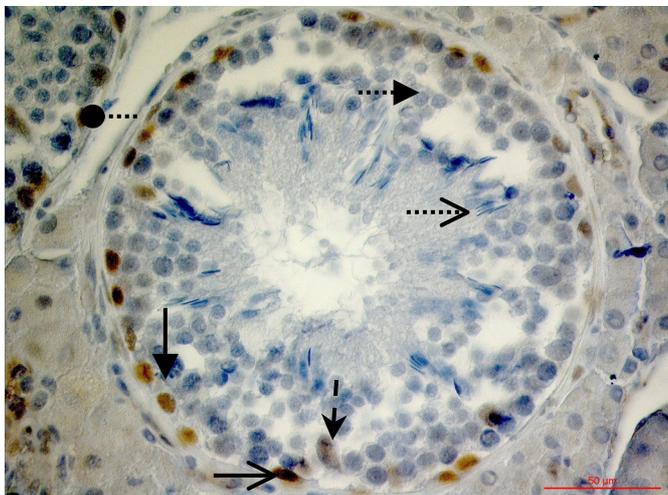
400- fache Vergrößerung:

A- Spermatogonie \rightarrow , B-Spermatogonie \rightarrow , Sertolizelle \dashrightarrow , Perizyte \bullet
 pachytäne Spermatozyte \dashrightarrow , runde Spermatide \dashrightarrow , elongierte Spermatide \dashrightarrow

Ergebnisse



Phase I: A-Spermatogonien, pachytäne Spermatozyten, runde Spermatisden und Spermatisden in der Elongation mit viel Zytoplasma



Phase II: A-Spermatogonien, B-Spermatogonien, pachytäne Spermatozyten, runde Spermatisden und elongierte Spermatisden kurz vor der Abgabe in das Tubuluslumen



Phase III: A-Spermatogonien, präleptotäne, leptotäne, pachytäne und diplotäne Spermatozyten, runde oder sich elongierende Spermatisden

Eberhoden im Alter von 250 Tagen

Abb. 8: Expression des Progesteronrezeptors im Hoden geschlechtsreifer Eber

400- fache Vergrößerung:

A- Spermato gonie \rightarrow , B-Spermato gonie \rightarrow , Sertolizelle \dashrightarrow , Perizyte \bullet
 pachytäne Spermatozyte \dashrightarrow , runde Spermatisde \dashrightarrow , elongierte Spermatisde \dashrightarrow

Ergebnisse

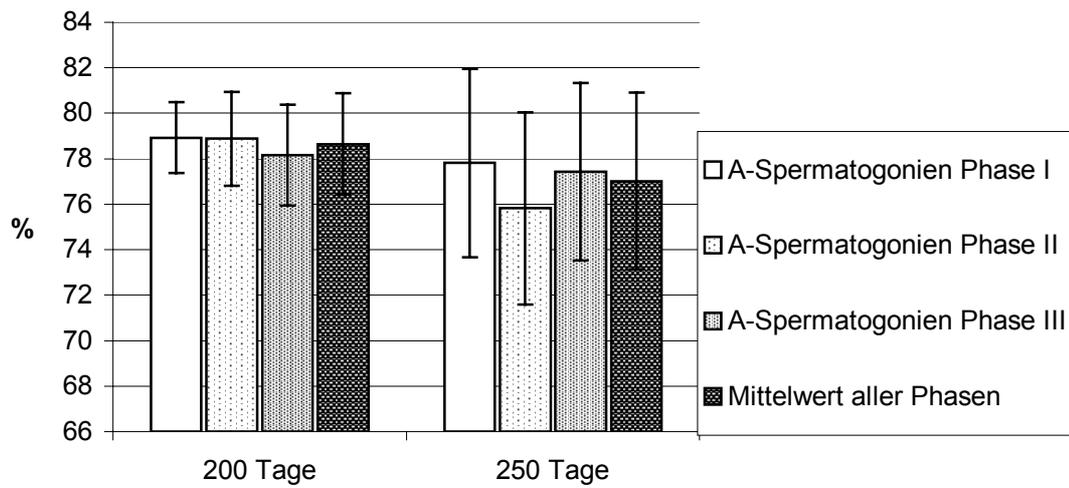


Abb. 9: Prozentuale Verteilung [$\bar{X} \pm SD$] der den Progesteronrezeptor exprimierenden A-Spermatogonien beim adulten Eber während des Keimepithelzyklus.

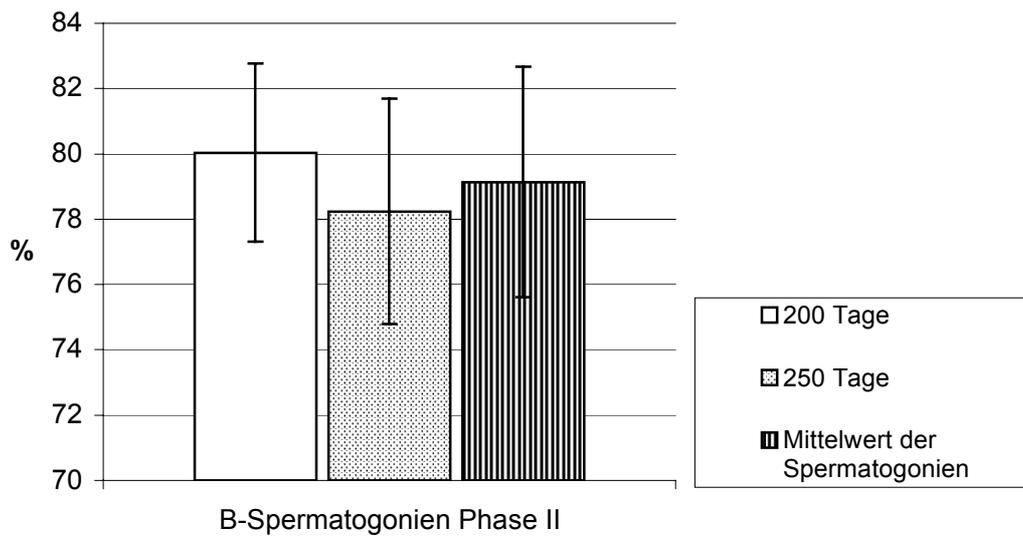


Abb.10: Prozentuale Verteilung [$\bar{X} \pm SD$] der den Progesteronrezeptor exprimierenden B-Spermatogonien beim adulten Eber in Phase II.

Ergebnisse

Tab. 3: Prozentuale Verteilung [$\bar{X} \pm SD$] der den Progesteronrezeptor exprimierenden A-Spermatogonien beim adulten Eber während des Keimepithelzyklus.

Phaseverteilung	Alter (Tage)		Mittelwert beider Altersgruppen \bar{x}
	200	250	
A-Spermatogonien Phase I \bar{x}	78,92	77,82	78,37
SD	1,56	4,14	3
A-Spermatogonien Phase II \bar{x}	78,88	75,82	77,35
SD	2,07	4,22	3,53
A-Spermatogonien Phase III \bar{x}	78,16	77,42	77,79
SD	3,18	3,96	3,4
Mittelwert aller Phasen \bar{x}	78,65	77,02	77,84
SD	2,22	3,9	3,23

Tab. 4: Prozentuale Verteilung [$\bar{X} \pm SD$] der den Progesteronrezeptor exprimierenden A- und B-Spermatogonien II beim adulten Eber in Phase II.

	Alter (Tage)		Mittelwert beider Altersgruppen \bar{x}
	200	250	
A-Spermatogonien Phase II \bar{x}	78,88	75,82	77,35
SD	2,07	4,22	3,53
B-Spermatogonien Phase II \bar{x}	80,04	78,24	79,14
SD	2,73	3,45	3,08
Mittelwert Altersgruppen \bar{x}	79,46	77,03	78,26
SD	2,37	3,85	3,35

Ergebnisse

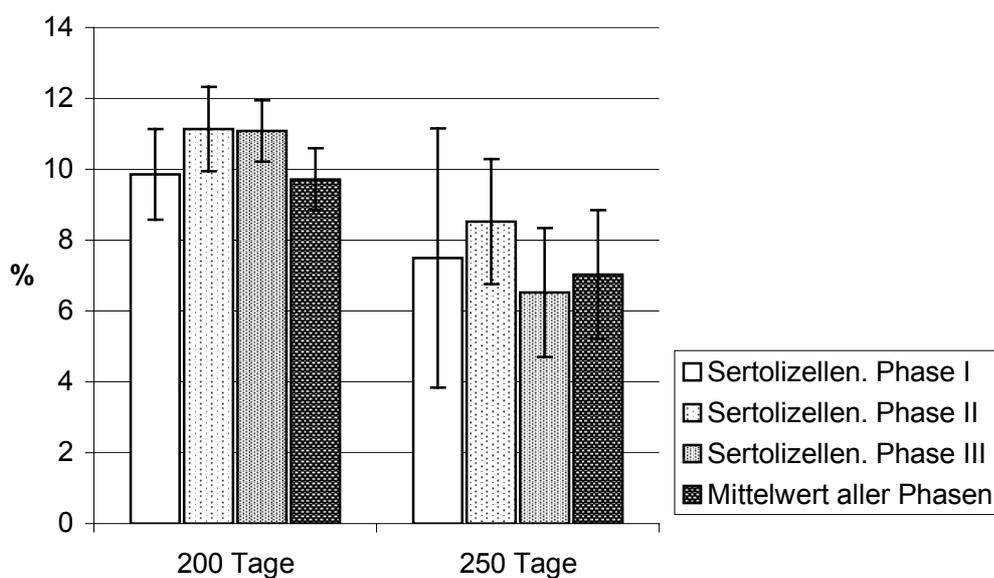


Abb.11: Prozentuale Verteilung [$\bar{X} \pm SD$] der den Progesteronrezeptor exprimierenden Sertolizellen beim adulten Eber.

Tab. 5: Prozentuale Verteilung [$\bar{X} \pm SD$] der den Progesteronrezeptor exprimierenden Sertolizellen beim adulten Eber.

Phasenverteilung	Alter (Tage)		Mittelwert beider Altersgruppen \bar{x}
	200	250	
Sertolizellen Phase I \bar{x}	9,85	7,49	8,63
SD	1,28	3,66	2,25
Sertolizellen Phase II \bar{x}	11,14	8,52	9,79
SD	1,19	1,76	1,36
Sertolizellen Phase III \bar{x}	11,08	6,52	8,67
SD	2,62	3,71	2,99
Mittelwert aller Phasen \bar{x}	9,72	7,02	8,33
SD	0,87	1,82	1,26

4.1.1.4 Eber in der Pubertät; Expression in den Hoden der 100 und 150 Tage alten Tiere (Gruppe C)

Die Hoden der dieser Gruppe zugeordneten Tiere wiesen einen inhomogenen Entwicklungszustand auf. So zeigten sich im histologischen Schnitt eines Hodens Areale in denen die Tubuli seminiferi contorti in ihrer Ausbildung noch der Situation bei juvenilen Tieren entsprachen, andere Areale dagegen zeigten den Entwicklungsstand adulter Tiere. An anderen Stellen wiederum hatte sich bereits ein Lumen gebildet, die Spermatogenese war über das Anfangsstadium der Spermatozytogenese jedoch nicht hinausgekommen.

Eine systematische Auszählung und statistische Auswertung war daher nicht sinnvoll, die Bewertung erfolgte rein deskriptiv.

Positive nukleäre Reaktionen wiesen auch hier bei allen Tieren die Spermato gonien auf, wobei bei den dem präpubertären Entwicklungsstand entsprechenden Tubuli seminiferi contorti insbesondere die der Basalmembran aufsitzenden „Präspermato gonien“ positive Signale zeigten.

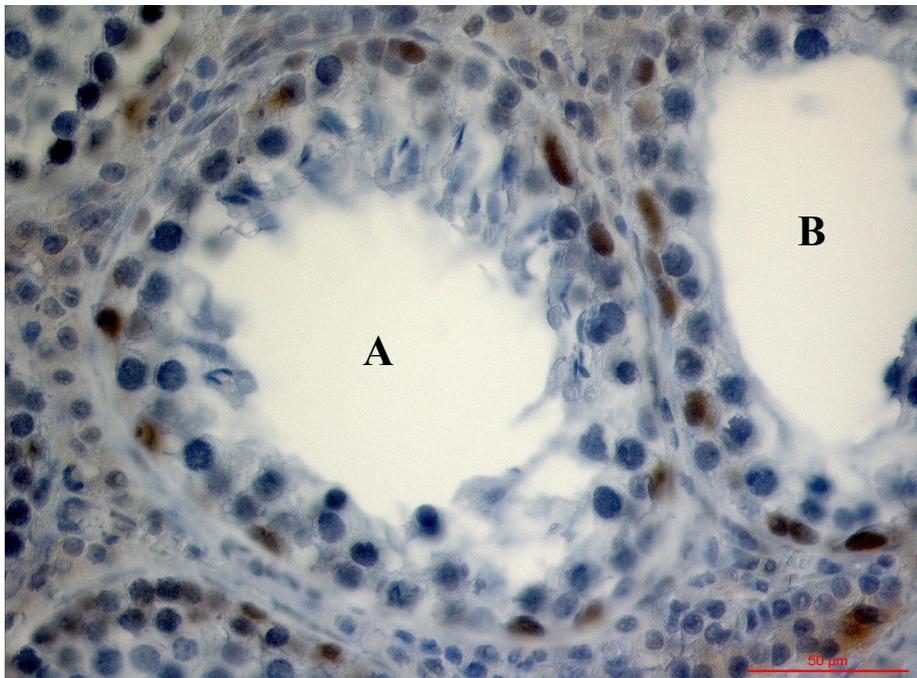


Abb.12: Expression des PR im Eberhoden bei die Pubertät durchlaufenden 100 und 150 Tage alten Tieren mit noch nicht einheitlich ausgebildeten Keimepithel.

A. Tubuli seminiferi contorti mit Keimepithelzyklus

B. Tubuli seminiferi contorti mit beginnender Spermatozytogenese

4.1.2 Nachweis der Expression der mRNA des Progesteronrezeptor im Eberhoden

4.1.2.1 Ergebnisse der RT-PCR

Untersucht wurde Hodengewebe der fünf Altersgruppen (50, 100, 150, 200, 250 Tage) sowie als positive Kontrolle Endometrium vom Schwein.

Wie Abb. 13 zeigt, ergaben sich nach der elektrophoretischen Auftrennung der Amplifikate und Illumination des Gels für die mRNA des Progesteronrezeptors für Endometrium und Hoden identische Banden, die alle auf einer Höhe von knapp 200 Bp. verliefen und damit im erwarteten Bereich von 179 Bp. (Ying et al., 2000) lagen. Doppelbanden und verlaufende Schlieren waren nicht zu erkennen. In den Wasserleerproben waren keine Banden nachweisbar. Das Ergebnis kann demnach als spezifisch für den Progesteronrezeptor angesehen werden.

Auch die Expression der β -Aktin - mRNA war bei allen sechs Geweben gut zu erkennen; gemessen am Marker wiesen die Amplifikate etwas mehr als 400 Bp. auf und entsprachen damit ebenfalls dem erwarteten Bereich von 410 Bp. (Ying et al., 2000), was ebenfalls auf den korrekten Ablauf der RT-PCR schließen lässt.

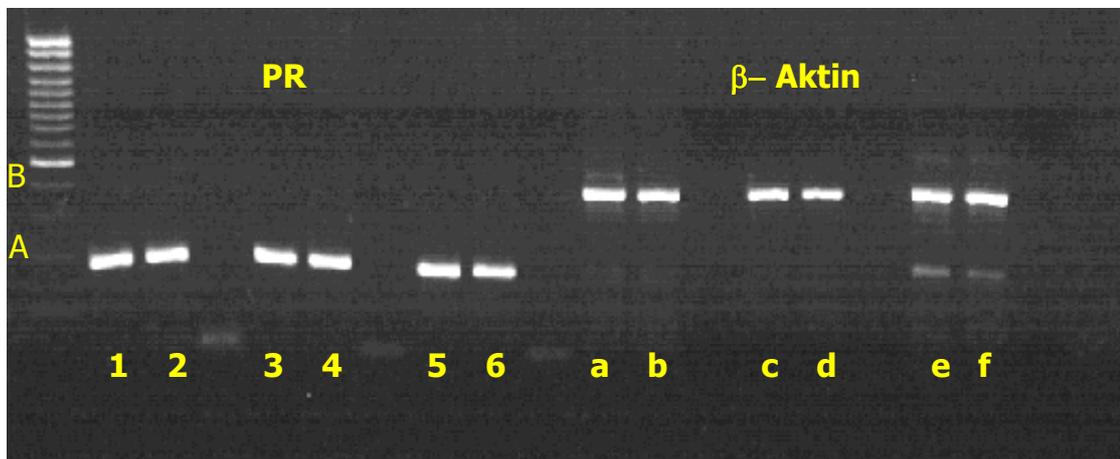


Abb. 13: Expression der mRNA des Progesteronrezeptors (PR) im Eberhodens

Gelelektrophoretischer Nachweis der Amplifikate

A:200 Bp, B: 400 Bp; 1/a = Endometrium; 2/b = 50 Tage Eberhodens; 3/c = 100 Tage Eberhodens; 4/d = 150 Tage Eberhodens; 5/e = 200 Tage Eberhodens; 6/f = 250 Tage Eberhodens

4.1.2.2 Ergebnisse der Sequenzierung der Progesteronrezeptor cDNA

Die cDNA des Endometriums und stellvertretend für alle Hodenproben die cDNA des 250 Tage alten Eberhodens wurde sowohl in 5'-3'-Richtung als auch in 3'-5'-Richtung sequenziert. Das Ergebnis zeigt Abb. 14.

Bei den Sequenzierungen in 5'-3'-Richtung fehlte den Sequenzen aus Endometrium und Hoden die Primersequenzen, zusätzlich fehlten in der Sequenz aus der Hoden cDNA die ersten 16 Basen, in der cDNA des Endometriums fehlten die ersten 7 Basen. Bei beiden Sequenzen (Hoden, Endometrium) war zwischen den Basen Nr. 54 und Nr. 55 zusätzlich die Base Thymin eingebaut. Ansonsten ergab sich für beide Sequenzen bis zum Ende des 178 Basen langen Teilstücks des porcinen Progesteronrezeptorgens inklusive der Sequenz des Antisense-Primers, eine absolute Identität; insgesamt lag die Homologie im Vergleich zur Referenzsequenz bei 99%.

Um zu überprüfen, ob bei den beiden Amplifikaten die in 5'-3'-Richtung fehlenden Basen vorhanden sind, und ob es sich bei dem zusätzlichen Thymin um einen Sequenzierungsfehler oder einen Fehler bei der Amplifikation handelt, wurde die cDNA beider Proben in umgekehrter Richtung sequenziert.

Da aus 3'-5'-Richtung sequenziert wurde, muß man, um die Basenabfolge korrekt vergleichen zu können, nach dem Sequenzieren die Basen in ihre komplementären Basen übersetzen und dann in umgekehrter Richtung lesen. Hierbei fehlten im 3'-5'-Richtung neben den Primersequenzen jeweils die ersten 21 Basen nach dem Primer. In beiden cDNA Proben konnten jedoch die in 5'-3'-Richtung fehlenden Basen und ihre Primer in der richtigen Folge nachgewiesen werden, weiterhin war das an Position 54/55 überzählige Thymin nicht vorhanden. Beiden Sequenzen wurde eine Stelle vor dem Vorwärts-Primer noch ein Thymin vorgehängt, das nicht in der Referenzsequenz vorkommt.

Die Sequenz aus dem Eberhoden zeigt somit nach Abzug des irregulär eingebauten Thymins eine 100%-ige Homologie mit dem porcinen Progesteronrezeptor auf.

In die Sequenz des Endometriums war zwischen die Positionen sechs und sieben ein Cytosinmolekül eingebaut, das in der porcinen Referenzsequenz nicht vorkommt. Abgesehen von diesem irregulären Cytosin ergab sich eine 100% Homologie.

Trotz einzelner kleiner Fehler in der Basenabfolge der cDNA bei beiden Schreibrichtungen besteht sowohl für das Endometrium aber insbesondere auch für

Ergebnisse

den Hoden eine ausreichend hohe Homologie mit dem porcinen Progesteronrezeptor, so dass die gewonnene cDNA als porciner Progesterorezeptor anzusehen ist.

Abb. 14:

Porcine Referenzsequenz für den Progesteronrezeptor:

**5'-CCT AGC TCA CAG CGT TTC TAC CAG CTT ACA AAA CTT CTT
GAT AAC TTG CAT GAT CTT GTC AAA CAA CTT CAT CTG TAC TGC
TTG AAT ACA TTT ATC CAG TCC CGG GCA CTG AGT GTT GAA TTT
CCA GAA ATG ATG TCT GAG GTT ATT GCT GCA CAA TTA CCC AAG
ATA TTG GCA GGG ATG-3'**

Sequenzierergebnis in 5'-3'-Richtung mit PR-Vorwärtsprimer:

Kontrollgewebe Endometrium Schwein: 99% Homologie

**5'[------]A AAA CTT
CTT GAT AAC TTG CAT GAT⁵⁴ TC⁵⁵TT GTC AAA CAA CTT CAT CTG
TAC TGC TTG AAT ACA TTT ATC CAG TCC CGG GCA CTG AGT GTT
GAA TTT CCA GAA ATG ATG TCT GAG GTT ATT GCT GCA CAA TTA
CCC AAG ATA TTG GCA GGG ATG-3'**

Testgewebe Eberhoden im Alter von 250 Tagen: 99% Homologie

**5'[------]
-----]T GAT AAC TTG CAT GAT⁵⁴ TC⁵⁵TT GTC AAA CAA CTT CAT CTG
TAC TGC TTG AAT ACA TTT ATC CAG TCC CGG GCA CTG AGT GTT
GAA TTT CCA GAA ATG ATG TCT GAG GTT ATT GCT GCA CAA TTA
CCC AAG ATA TTG GCA GGG ATG-3'**

4.2. Nachweis des Östrogenrezeptors- α im Eberhoden

4.2.1 Nachweis der Expression der mRNA des Östrogenrezeptor- α im Eberhoden

4.2.1.1 Ergebnisse der RT-PCR

Untersucht wurde auch hier Hodengewebe aller fünf Altersgruppen sowie Endometrium. Als Housekeeping Gene Kontrolle diente β -Aktin. Das Ergebnis zeigt Abb. 15.

Für alle Hodenproben, sowie das Endometrium ergab sich eine deutliche Bande, die zwischen 400 und 500 Bp. auf gleicher Höhe lag. In der Wasserleerprobe war keine cDNA nachweisbar. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass es sich hierbei um den Nachweis der mRNA des Östrogenrezeptors- α handelt, für den ein Amplikon mit 477 Bp. erwartet wurde (Malayer und Woods, 1998).

Für die Expression der β -Aktin mRNA ergab sich eine ähnlich homologes Ergebnis; die Amplifikate lagen auf einer Reihe knapp über der 400 Basenpaarlinie die erwartete Größe liegt bei 410 Bp. (Ying et al., 2000). Dieses Ergebnis lässt auf einen korrekten Ablauf der PCR schließen.

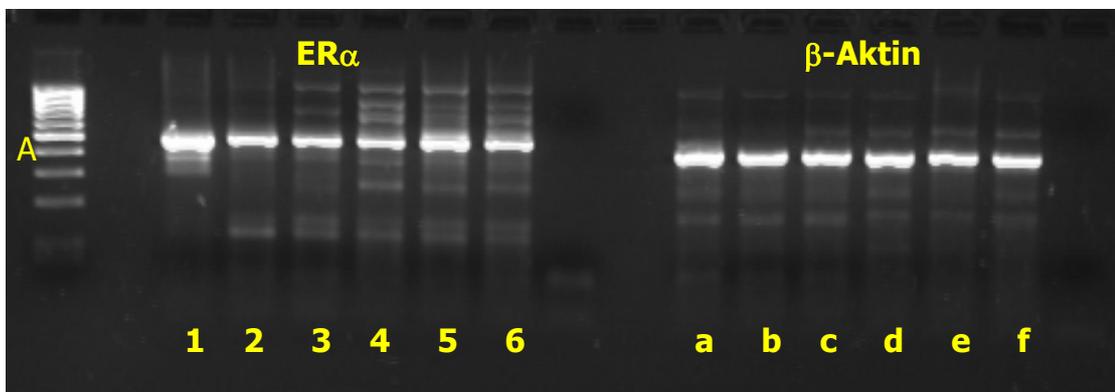


Abb. 15: Expression der mRNA des Östrogenrezeptors- α im Eberhoden,

Gelelektrophoretischer Nachweis der Amplifikate

A: 400 Bp; 1/a = Endometrium; 2/b = 50 Tage Eberhoden; 3/c = 100 Tage Eberhoden; 4/d = 150 Tage Eberhoden; 5/e = 200 Tage Eberhoden; 6/f = 250 Tage Eberhoden

4.2.1.2 Ergebnisse der Sequenzierung der Östrogenrezeptor- α cDNA

Sequenziert wurden je ein Amplifikat des Endometriums und stellvertretend für alle Hoden die cDNA des 50 Tage alten Eberhodens. Das Ergebnis zeigt Abb. 16.

Die Sequenzierung in 5'-3'-Richtung der aus dem Endometrium gewonnenen cDNA ergab ein Fragment von einer Länge von 459 Basenpaaren. Beim Vergleich der erhaltenen Sequenz mit der Referenzsequenz des porcinen Östrogenrezeptors- α war festzustellen, dass in der gewonnenen cDNA an Position 125 und 455 ein Guanin- bzw. Adeninmolekül zuviel eingebaut worden waren. Die cDNA wies damit eine Homologie von 99% zum porcinen Östrogenrezeptor- α auf.

Die Sequenz der aus dem Hoden gewonnenen cDNA umfasste eine Länge von 463 Basenpaaren. Die Homologie mit dem porcinen Östrogenrezeptor- α lag bei 98%. Die 2% Abweichung ergibt sich daraus, dass an den Positionen 3 und 119 jeweils ein Guaninmolekül, an den Positionen 20, 51 und 449 ein Adeninmolekül und an den Positionen 63, 70 und 80 je ein Thyminmolekül zuviel eingebaut wurde. An den Positionen 17, 19 und 32 wurde Basen vertauscht und Thyminmoleküle eingebaut.

Nach Vergleich der cDNA beider Proben ist trotz einzelner Sequenzierfehler, insbesondere beim Amplifikat des Hodens, aufgrund der hohen Homologie aber dennoch davon auszugehen, dass es sich sowohl im Endometrium als auch im Hoden um den Nachweis der Expression der mRNA des Östrogenrezeptors- α handelt.

Abb. 16:

Porcine Referenzsequenz für den Östrogenrezeptor- α :

```
5'- TGG ATC CTG ATG ATT GGT CTT GTC TGG CGC TCC ATG GAG CAC  
CCA GGG AAG CTC CTG TTT GCT CCT AAC TTG CTC CTG GAC AGG AAC  
CAG GGC AAG TGT GTC GAG GGA ATG GTG GAG ATC TTT GAC ATG TTG  
CTG GCT ACA TCA TCT CGC TTC CGT ATG ATG AAT CTC CAG GGA GAG  
GAG TTT GTG TGC CTC AAA TCC ATC ATT TTG CTT AAT TCT GGA GTG  
TAC ACG TTT CTG TCC AGC ACC CTG AAG TCT CTG GAA GAG AAG GAC  
CAT ATC CAC CGT GTC CTG GAC AAG ATC ACA GAC ACC TTG ATC CAC  
CTG ATG GCC AAA GCG GGC CTG ACT CTG CAG CAG CAG CAC CGG CGT  
CTC GCG CAG CTC CTC CTC ATC CTG TCT CAC TTC AGG CAC ATG AGT  
AAC AAA GGC ATG GAG CAT CTG TAC AAC ATGA AGT GCA AGA ACG  
TGG TGC CCC TCT ATG ACC TGC TGC TGG AGA TG -3'
```

Ergebnisse

Sequenzierergebnis in 5'-3'-Richtung mit ER α -Vorwärtsprimer:

Kontrollgewebe Endometrium Schwein: Homologie 99%

5'- TGT CTG GCG CTC CAT GGA GCA CCC AGG GAA GCT CCT GTT TGC
TCC TAA CTT GCT CCT GGA CAG GAA CCA GGG CAA GTG TGT CGA GGG
AAT GGT GGA GAT CTT TGA CAT GTT GCT GGC TAC ATC A^{G125}T CTC
GCT TCC GTA TGA TGA ATC TCC AGG GAG AGG AGT TTG TGT GCC TCA
AAT CCA TCA TTT TGC TTA ATT CTG GAG TGT ACA CGT TTC TGT CCA
GCA CCC TGA AGT CTC TGG AAG AGA AGG ACC ATA TCC ACC GTG TCC
TGG ACA AGA TCA CAG ACA CCT TGA TCC ACC TGA TGG CCA AAG CGG
GCC TGA CTC TGC AGC AGC AGC ACC GGC GTC TCG CGC AGC TCC TCC
TCA TCC TGT CTC ACT TCA GGC ACA TGA GTA ACA AAG GCA TGG AGC
ATC TGT ACA ACA TGA AGT GCA AGA ACG TGG TGC CCC TCT ATG ACC
TGC TGC TGG A^{A455}G ATG-3'

Testgewebe Eberhoden im Alter von 50 Tagen: Homologie 98%

5'- TG^{G3} TCT GGC GCT C (--) TG G^{T17}G ^{T19}AC CCA GGG AA^{A20}GCT CCT GTT
TG^{T32} CCT AAC TTG CTC CTG GA^{A51} CAG GAA CCA GG^{T63} GCA AGT ^{T70}GT
GTC GAG G^{T80}G AAT GGT GGA GAT CTT TGA CAT GTT GCT GGC TAC ATC
A^{G119}T CTC GCT TCC GTA TGA TGA ATC TCC AGG GAG AGG AGT TTG
TGT GCC TCA AAT CCA TCA TTT TGC TTA ATT CTG GAG TGT ACA CGT
TTC TGT CCA GCA CCC TGA AGT CTC TGG AAG AGA AGG ACC ATA TCC
ACC GTG TCC TGG ACA AGA TCA CAG ACA CCT TGA TCC ACC TGA TGG
CCA AAG CGG GCC TGA CTC TGC AGC AGC AGC ACC GGC GTC TCG CGC
AGC TCC TCC TCA TCC TGT CTC ACT TCA GGC ACA TGA GTA ACA AAG
GCA TGG AGC ATC TGT ACA ACA TGA AGT GCA AGA ACG TGG TGC CCC
TCT ATG ACC TGC TGC TGG A^{A449}G ATG -3

5. Diskussion

5.1. Diskussion des Versuchsaufbaus

Vorliegenden Untersuchungen lag die These zugrunde, dass neben einer endokrinen Wirkung testikulär sezerniertes Progesteron und testikuläre Östrogene auch parakrine Wirkungen haben. Die Stimmigkeit dieser These sollte daran überprüft werden, ob und inwieweit im Eberhoden der Progesteronrezeptor und der Östrogenrezeptor- α exprimiert werden, da von einer genomischen und einer nicht genomischen Wirkung ausgegangen wurde. Weiterhin sollten eventuelle Zusammenhänge zum Alter der Tiere erkannt werden. Im Vordergrund stand dabei die Darstellung der Expression des Progesteronrezeptors auf Protein- und mRNA- Ebene. Komplementär zu diesen zunächst erhaltenen Befunden wurde auch die Expression der mRNA des Östrogenrezeptors- α untersucht.

5.2. Diskussion der Methodik

5.2.1 Immunhistochemischer Rezeptornachweis

Die Darstellung des Progesteronrezeptors wurde mit Hilfe der Immunhistochemie durchgeführt. Bei dieser Methode ist von Vorteil, dass nur wenig Probenmaterial benötigt wird, um ein gesuchtes Protein nachweisen zu können und seine genaue Lokalisation zu identifizieren (Thorpe, 1987; Helin et al., 1989; Pertschuk et al., 1990). Im Gegensatz zu Rezeptorligandbindungstests ist jedoch keine quantitative Auswertung hinsichtlich der Rezeptorkonzentration möglich.

Bei der Durchführung des immunhistochemischen Nachweises wurden Kontrollen mitgeführt. So wurde von jeder Probe ein Schnitt nicht mit dem antigenspezifischen Primärantikörper sondern mit einem Nonsenseantikörper, d.h. mit einem „irrelevanten Antikörper“ gleichen Isotyps, der gegen ein Antigen gerichtet ist, das nicht bei der untersuchten Spezies, hier also beim Schwein vorkommt, inkubiert. Bei einem negativen Ergebnis kann ausgeschlossen werden, dass die nach Verwendung des Primärantikörpers beobachteten Farbreaktionen durch dessen Bindung an ein unspezifisches Protein hervorgerufen wird. Ein negatives Ergebnis schließt weiterhin aus, dass das zweite Detektionssystem, also sekundärer Antikörper und ABC-System, ein unspezifisches Signal erzeugen. Die in den vorliegenden Untersuchungen erhaltenen negativen Ergebnisse bestätigen die Spezifität der

Immunreaktion. In Vorversuchen hatte sich weiterhin gezeigt, dass zur Beseitigung einer unspezifischen Hintergrundfärbung der Einsatz eines kommerziellen Avidin-Biotin-Blocking Kits bessere Ergebnisse brachte, als eine in vielen immunhistochemischen Färbeprotokollen benutzte Magermilch-Lösung.

Desweiteren wurde in jeder Testserie eine „positive“ Kontrolle, d.h. ein Gewebeschnitt mitgeführt, in denen das gesuchte Antigen erwartungsgemäß vorhanden ist. In vorliegender Untersuchung diente Schweineuterus als Kontrollgewebe; die erwarteten positiven Reaktionen traten ein.

Die Spezifität des angewandten immunhistologischen Verfahrens ergibt sich auch daraus, dass der zum Nachweis des Progesteronrezeptors eingesetzte Antikörper gegen die letzten 12 Aminosäuren des Carboxyendes des humanen Progesteronrezeptors gerichtet ist und diese hochkonservierte Sequenz bei Mensch (Misrahi et al., 1987), Maus (Schott et al., 1991), Huhn (Conneely et al., 1986), Kaninchen (Loosfelt et al., 1986), Ratte (Park und Mayo, 1991) und Hund (Latinga-van Leeuwen et al., 2000) identisch ist.

Bisher sind beim Schwein die ersten fünf der erwarteten zwölf Aminosäuren bekannt, diese aber sind mit den bei den anderen Tierarten sequenzierten Aminosäuren deckungsgleich, so dass auch für diese Spezies mit einer entsprechenden Homologie zu rechnen ist (Iwai et al., 1991). Allerdings ist nicht davon auszugehen, dass der verwendete Antikörper zwischen den einzelnen Progesteronrezeptor-Isoformen unterscheiden kann, da die Aminosäuresequenz am Carboxyterminus nicht betroffen ist (s. Kap. 2.5.3.1).

5.2.2 Rezeptornachweis mittels RT-PCR und Sequenzierung

Zur Bestätigung der immunhistochemischen Befunde wurde mittels RT-PCR die Expression des Progesteronrezeptors mit anschließender Sequenzierung aufgezeigt.

Auch zum Nachweis des Östrogenrezeptors- α wurde die RT-PCR mit anschließender Sequenzierung gewählt.

Die angewandte RT-PCR gestattet bei hoher Sensitivität einen qualitativen Nachweis der Expression der mRNA, der Nachweis ist organ- und nicht zellspezifisch.

Ausschlaggebend für die Qualität der RT-PCR sind die zur Amplifikation verwendeten Primer.

Die zum Nachweis des porcinen Progesteronrezeptors im Schweinehoden benutzten Primer sind Sequenzen, die für den hochkonservierten Progesteronrezeptor schon beim Huhn eingesetzt wurden (Connely et al., 1986; Jeltsch et al., 1986). Desweiteren wurden sie mit Erfolg auch in porcinem Gewebe verwendet (Ying et al., 2000). Die in der Literatur zu diesem Primer zu findenden Angaben beschreiben die cDNA-Amplifikate mit einer Größe von 179 Basenpaaren. Die Primer die zum Nachweis des Östrogenrezeptors- α eingesetzt wurden sind Sequenzen, die ein Fragment der ebenfalls hochkonservierten Ligandbindungsdomäne des bovinen Östrogenrezeptors- α kodieren. Die Primer wurden von Malayer und Woods (1998) sowie Schuler et al. (2002) erfolgreich beim Rind eingesetzt. Das amplifizierte cDNA Fragment hat eine Größe von 477 Basenpaaren. Der Ablauf der RT-PCR Reaktion wurde durch Amplifikation des Housekeeping Gene β -Aktin kontrolliert. Das verwendete Primerpaar wurde zuvor schon bei der Maus (Wu et al., 1992) und beim Schwein (Ying et al., 2000) erfolgreich eingesetzt. Die Größe der erhaltenen Amplifikate wird mit 410 Basenpaaren angegeben.

Alle Amplifikate wiesen die erwartete Größe an Basenpaaren auf, die Sequenzierung der Amplifikate für den Progesteronrezeptor und den Östrogenrezeptor- α wiesen eine nahezu 100%-ige Homologie mit der erwarteten Sequenz auf, so dass auch die Spezifität der durchgeführten RT-PCR als gesichert anzusehen ist.

5.3. Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 Progesteronrezeptor

5.3.1.1 Progesteronrezeptornachweis

Mittels RT-PCR konnte erstmalig für den Eber bei allen Altersgruppen (50.- > 250. Lebensstag) eine Expression des Progesteronrezeptors im Hoden nachgewiesen werden. Entsprechende Angaben liegen bisher nur für den Affen vor (Heikinheimo et al., 1995).

Darüber hinausgehend konnte mittels der Immunhistochemie die Art der Verteilung und Lokalisation der rezeptorpositiven Zellen aufgezeigt werden.

Bei den präpubertären Tieren (Gruppe A) im Alter von 50 und 100 Tagen konnte die Expression des Progesteronrezeptors eindeutig in den Präspmatogonien nachgewiesen werden. Dabei zeigten nur die Zellkerne eine deutliche Markierung, so

Diskussion

dass von einer rein nukleären Lokalisation auszugehen ist. Die Expression des Progesteronrezeptors wies eine hochsignifikante ($p < 0,0001$) Abhängigkeit von der Lokalisation der Prä spermatogonien auf. So zeigte sich, dass die Expression nur in wenigen von den zentral in den noch lumenlosen Tubuli seminiferi contorti liegenden Prä spermatogonien auftritt, sondern überwiegend in den Prä spermatogonien, die bereits in Kontakt mit der Basallamina standen. Mit fortschreitender Entwicklung vom 50. zum 100. Lebensstag verdeutlichte sich diese Entwicklung ($p = 0,0029$). Diese Beobachtungen legen den Schluß nahe, dass es erst nach Kontaktaufnahme der Prä spermatogonien mit der Basalmembran bzw. dem peritubulären Gewebe zur Expression des Progesteronrezeptors kommt. Gegen diesen Schluß spricht jedoch, dass circa 10% ($10,47 \pm 4,25\%$) der noch luminal liegenden Prä spermatogonien ebenfalls Progesteronrezeptor-positiv sind. Allerdings kann trotz des Bemühens nur exakt querschnittene Tubuli seminiferi auszuzählen nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass nicht auch diese Zellen bereits mit der Basalmembran in Kontakt standen, da schon bei geringer Verzerrung der Querschnitte die Prä spermatogonien unterhalb der sichtbaren Ebene Kontakt zur Basalmembran haben können, obwohl es bei Draufsicht aussieht, als stünden sie noch nicht mit dieser in Kontakt. Die vorliegenden Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Konrad et al. (1998) am sich entwickelnden postnatalen Rattenhoden, die ebenfalls den Progesteronrezeptor in den „germinativen Zellen“ nachwiesen, allerdings keine weiteren Angaben zur Art der Zelle und deren Lokalisation machten. In weiterführenden Untersuchungen an ebenfalls juvenilen Rattenhoden geben Weber et al. (2002) an, dass sie den Progesteronrezeptor in den Spermatogonien nachweisen konnten.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung bei den geschlechtsreifen Ebern (Gruppe B) haben gezeigt, dass von den germinativen Zellen ausschließlich die A- und B-Spermatogonien Progesteronrezeptor-positiv sind (A-Spermatogonien $77,84 \pm 3,23\%$ und B-Spermatogonien $79,14 \pm 3,08\%$). Das Signal verschwindet, sobald die Entwicklung zu den Spermatozyten einsetzt. Es ergeben sich keine Altersabhängigkeiten innerhalb der Gruppe der geschlechtsreifen Tiere, eine Beziehung zum Keimepithelzyklus konnte nicht aufgezeigt werden. Damit zeigt sich die Situation anders als bei der Ratte, wo Galena et al. (1974) den Progesteronrezeptor auch in primären Spermatozyten und Spermatischen fanden. In Übereinstimmung mit den eigenen Befunden konnten Sirivaidyapong et al. (2001) beim Hund den

Diskussion

Progesteronrezeptor nicht in den Spermatiden wohl aber in den reifen Spermien nachweisen.

Auch bei den in der Pubertät befindlichen Tieren (Gruppe C) war die Expression des Progesteronrezeptors an die Spermatogonien gebunden, wobei sich bei dem noch lumenlosen Tubuli seminiferi contorti ein Bild wie bei den juvenilen Tieren ergab, bei ausgebildetem Lumen und beginnendem Keimepithelzyklus entsprach das Bild dem der geschlechtsreifen Tiere.

Auch in den Sertolizellen ergab sich ein Präzipitat, das auf ein Vorhandensein des Progesteronrezeptors schließen lässt. Allerdings waren die Färbesignale deutlich schwächer als bei den Prä-spermatogonien sowie A- und B-Spermatogonien, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass ein subjektiver Auswertefehler vorliegt. Ein solcher könnte sich zum Beispiel ergeben, wenn gefärbte Spermatogonien Sertolizellen überlagern und so einen gefärbten Sertolizellkern vortäuschen. Im Hinblick auf diese Möglichkeit und den niedrigen Prozentsatz Progesteronrezeptor-positiver Sertolizellen (juvenile Tiere $0,2 \pm 0,11\%$, geschlechtsreife Tiere $8,33 \pm 1,26\%$), wobei sich bei den geschlechtsreifen Tieren keine Beziehungen zum Keimepithelzyklus erkennen ließen, bedarf dieser Befund einer weiteren Verifizierung. Hinsichtlich der Expression des Progesteronrezeptors bei anderen Tierarten liegen nur wenig Befunde vor; so beschreiben Schmidt und Danzo (1980) sowie Weber et al. (2002) das Vorkommen des Progesteronrezeptors in den Sertolizellen der Ratte, ein Befund der von Konrad et al. (1998) nicht bestätigt werden konnte.

In Übereinstimmung mit Befunden von Konrad et al. (1998) bei der Ratte konnten in vorliegenden Untersuchungen, unabhängig vom Alter der Tiere, auch in einigen peritubulären Zellen positive Färbesignale entdeckt werden. Die Tatsache, dass die vorhandenen Expressionssignale sich klar und kräftig darstellten lässt es als wahrscheinlich erscheinen, dass es sich hierbei um eine zwar seltene aber tatsächliche Expression des Progesteronrezeptors handelt. Die Seltenheit dieses Ereignisses könnte erklären, warum Weber et al. (2002), die Ergebnisse von Konrad et al. (1998) nicht bestätigen konnte.

Unabhängig vom Alter, erwiesen sich auch die Leydigzellen stets als Progesteronrezeptor-negativ. Möglicherweise handelt es sich hier um eine speziesspezifische Situation, nachdem Konrad et al. (1998) und Weber et al. (2002) beim juvenilen Rattenhoden sowie Pino und Valladares (1988) und Rossato et al.

(1999) an Ratten-Leydigzell-Zellkulturen eine Expression des Progesteronrezeptors aufzeigten.

In vorliegenden Untersuchungen wurden weiterhin bei allen Altersgruppen vereinzelt Progesteronrezeptor-positive Endothelzellen nachgewiesen. Dies entspricht Erkenntnissen aus Untersuchungen von Bergqvist et al. (1993) sowie Perrot-Applanat et al. (1995), in denen der Progesteronrezeptor in den peripheren Gefäßen sowohl beim Menschen nachgewiesen wurde, sowie von Falkenstein et al. (1996), die den Progesteronrezeptor in glatten Muskelzellen von Blutgefäßen des Schweins gefunden haben.

Der Nachweis des Progesteronrezeptors im Eberhoden lässt es als wahrscheinlich erscheinen, dass dem testikulären Progesteron eine rezeptorvermittelte lokale, parakrine Bedeutung zukommt.

Die durchgeführten Untersuchungen haben als die im Vordergrund stehenden potentiellen Zielzellen eindeutig die Gruppe der Spermatogonien erkannt.

Dabei fällt auf, dass die Prä-spermatogonien erst nach Kontaktaufnahme mit den peritubulären Zellen bzw. der Basalmembran den Rezeptor exprimieren, ein Vorgang, der bei Eintritt in die Spermatozytogenese wieder verloren geht. Dies lässt auf eine hohe Spezifität des beobachteten Vorgangs schließen und legt nahe, dass Progesteron als parakriner Regelfaktor an der Spermatogoniogenese beteiligt ist. Keine Aussagen können jedoch darüber getroffen werden, ob die mitotische Aktivität selbst oder andere, den Zellstoffwechsel steuernde Vorgänge beeinflusst werden.

In Übereinstimmung mit Beobachtungen anderer Autoren bei der Ratte bzw. Mensch und Schwein, geben die eigenen Untersuchungen Hinweise, dass der Progesteronrezeptor – allerdings in deutlich geringerem Umfang – auch in andern Zellen des Hodens (Perizyten, Sertolizellen, Gefäßendothelzellen) exprimiert wird (Schmidt und Danzo, 1980; Pino und Valladares, 1988; Bergqvist et al., 1993; Perrot-Applanat et al., 1995; Falkenstein et al., 1996; Konrad et al., 1998; Rossato et al., 1999; Weber et al., 2002). Eine parakrine Wirkung von Progesteron auf diese Zellen kann daher unterstellt werden, die geringe Häufigkeit der Expression des Progesteronrezeptors bei diesen Zellen, lässt jedoch auf einen biologischen Vorgang von eher untergeordneter Bedeutung schließen.

In vorliegenden Untersuchungen waren die Leydigzellen stets Progesteronrezeptor-negativ. Eine Down-Regulierung des LH-Rezeptors dieser Zellen

durch Progesteron, wie es von El-Hefnawy und Huhtaniemi (1998) für die Maus beschrieben wurde, kann demnach für den Eber ausgeschlossen werden.

5.3.1.2 Östrogenrezeptor- α - Nachweis

Die Expression des Progesteronrezeptors und die vorausgegangene Genaktivierung hängen von einer Aktivierung des Östrogenrezeptors ab (Savouret et al., 1991; Kraus et al., 1994) ab.

Der mittels RT-PCR und anschließender Sequenzierung erstmals gelungene Nachweis der mRNA Expression des Östrogenrezeptors- α im Eberhoden zeigt, dass die Schaltstellen dieses Regelkreises beim Eber vorhanden sind. Dabei ist zu unterstellen, dass die Expression des Östrogenrezeptor- α durch die hohe testikuläre Östrogenproduktion sichergestellt ist.

Die eigenen Untersuchungen geben keine Hinweise auf die Lokalisation des Östrogenrezeptor- α . Untersuchungen anderer Autoren haben jedoch gezeigt, dass beim „Channel Catfish“ der Östrogenrezeptor- α sowohl in den primären und sekundären Spermatozyten als auch Spermatischen exprimiert wird (Wu et al., 2001). Bilinska et al. (2000) wiesen den Östrogenrezeptor- α in den Leydigzellen der Rötelmaus nach.

Eindeutig nachgewiesen dagegen wurde die Expression des Östrogenrezeptor- α in den Epithelzellen des Ductus epidymidis, insbesondere im Nebenhodenkopf, sowie im Rete testis (Lee et al., 2000; Hess et al., 2000). Die hier über den Rezeptor vermittelte Wirkung ist eine extratestinale und ergibt sich aus der Resorption der Tubulusflüssigkeit (Hess et al., 2000).

Insgesamt weisen die vorliegenden Untersuchungen auf eine parakrine Wirkung der testikulären Progesteron- und Östrogenproduktion hin. Die Bedeutung der testikulären Östrogene kann dabei möglicherweise vor allem in einer Aufregulation der Progesteronrezeptorsynthese während der Spermatogoniogenese gesehen werden. Darüber hinaus wurde postuliert, dass der Östrogenrezeptor- α in den somatischen Zellen notwendig für eine geregelte Samenzellbildung und Erreichung der Fruchtbarkeit ist (Mahato et al., 2001).

Voraussetzung für die Erkennung klarer, funktionaler Beziehungen sind jedoch auch hier weiterführende Untersuchungen, wobei insbesondere ergänzende Studien hinsichtlich der Lokalisation des Östrogenrezeptors- α im Hoden des Ebers noch ausstehen.

6. Zusammenfassung

Neben Östrogenen konnte in vorausgehenden Untersuchungen auch Progesteron als ein Produkt der testikulären Steroidproduktion erkannt werden. Für beide Steroide stellt sich die Frage nach deren Relevanz für die endokrine und germinative Hodenfunktion. Vorliegende Arbeit fokussiert auf Progesteron, ihr liegt die These zugrunde, dass es sich dabei – wie auch bei Estron – um einen parakrin/autokrin wirksamen Regelfaktor handelt. Als eine erste Stütze dieser These wird der Nachweis des Progesteronrezeptors und Östrogenrezeptors- α im Hoden angesehen.

Die Untersuchungen zum Nachweis des PR erfolgten mittels Immunhistochemie und RT-PCR, die zum Nachweis des ER- α nur mit RT-PCR. Der RT-PCR schloß sich eine Sequenzierung der Amplifikate an.

Zur Verfügung standen jeweils Hoden von fünf 50, 100, 150, 200 und mehr als 250 Tage alten Ebern. Für die Immunhistochemie wurden ca. 1 x 1 x 1 cm große Würfel aus dem Hodenparenchym geschnitten, in 4%-igem Formol nach Lillie für 20-24 Stunden fixiert und in Paraffin eingebettet. Für die RT-PCR wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -85°C gelagert. Als Kontrolle diente ein entsprechend behandelter Schweineuterus.

Nach alkoholischer Entparaffinierung in einer absteigenden Xylol-Ethanol-Reihe und Rehydrierung wurden $3\mu\text{m}$ starke Schnitte zur Demaskierung der antigenen Epitope in Citratpuffer in der Mikrowelle erhitzt. Danach folgte eine Inaktivierung der endogenen Peroxidasen in einer 2%-igen H_2O_2 -Lösung. Für die Darstellung des PR kam der monoklonale Antikörper (Klon 10A9; Immunotech[®]) zur Anwendung, der gegen das hochkonservierte Carboxyende des humanen PR gerichtet ist. Die Darstellung erfolgte via zweiten Antikörper und einem Avidin-Biotin Detektionssystem. Positivkontrolle und Negativkontrolle (Verwendung eines irrelevanten Isotypenantikörpers) bestätigten die Spezifität der Immunreaktion. Die Auswertung und Auszählung der Schnitte erfolgten bei 400-facher und 1000-facher Vergrößerung, die statistische Auswertung mit dem Statistikprogramm BMDP/Dynamic, Release 7.0 (Dixon, 1993).

Die Aufbereitung der Gewebeproben zum Nachweis des PR und ER- α mittels RT-PCR geschah in gleicher Weise unter Verwendung des RNeasy-Kit der Firma Qiagen[®]. Die RT-PCR wurde in einer einstufigen Reaktion mit dem One-Step RT-

Zusammenfassung

PCR Kit (Qiagen®) durchgeführt. Zur Amplifikation des Progesteron- und Östrogenrezeptors- α wurden für das Schwein bzw. für das Rind spezifische Primerpaare eingesetzt (Malayer und Woods, 1998; Ying et al., 2000). Als Kontrolle diente die Erfassung der Expression des Housekeeping Genes β -Aktin für das ebenfalls ein spezifischer Primer zur Verfügung stand (Ying et al., 2000). Die Sequenzierung der Amplifikate eines Hodens aus der 250 Tage – bzw. 50 Tage Gruppe ergab eine nahezu 100%-ige Homologie mit der erwarteten Sequenz für den Progesteron- bzw. Östrogenrezeptor- α . Ein entsprechendes Ergebnis ergab sich für das Endometrium.

Mittels RT-PCR konnte die Expression des PR und ER- α bei allen fünf Altersgruppen nachgewiesen werden. Immunhistochemisch zeigte sich die Expression des PR vor allem in den Spermatogonien, wobei bei den präpubertären Tieren (50 und 100 Tage alt) die Expression offensichtlich an die Kontaktaufnahme der zur Peripherie wandernden Prä-spermatogonie mit der Basalmembran gebunden ist; der Effekt war mit $p < 0,0001$ hochsignifikant, $65,34 \pm 6,6\%$ der 50 Tage Gruppe und $72,96 \pm 11,59\%$ der 100 Tage Gruppe waren PR positiv. Bei den adulten Tieren (Tag 200 und 250) waren $77,8 \pm 3,2\%$ der A- und $79,1 \pm 3,0\%$ der B-Spermatogonien PR-positiv. Nach Teilung der B-Spermatogonien in die primären Spermatozyten verlor sich die Expression. Es waren keine Expressionsunterschiede in Abhängigkeit vom Alter (Tag 200 und 250) und zum Stand der Spermatogenese nachzuweisen. In keiner Altersgruppe ergaben sich Hinweise auf eine Expression des PR in den Leydigzellen, die Expressionen des PR in den Sertolizellen und den peritubulären Zellen bedarf einer weiteren Untersuchung.

Die Befunde lassen auf eine parakrine Bedeutung von Progesteron bei der Spermatogenese schließen.

7. Summary

In previous investigations apart from oestrogens also progesterone was identified as a product of testicular secretory activity. Both steroids raise the question in respect to their importance for testicular endocrine and germinal function. The present thesis focuses on progesterone with the hypothesis that progesterone – like oestrogens – acts as a paracrine/autocrine regulatory factor. Demonstration of testicular expression of the progesterone- and oestrogenreceptor- α are seen as a support of this hypothesis.

Detection of the PR was by immunohistochemistry and RT-PCR, of the oestrogenreceptor- α by RT-PCR only.

Investigations were performed with testes from groups of 5 boars aged 50, 100, 200 and >250 days. For immunohistochemistry testicular tissue was cut into approximately 1 x1 cm cubes, which were fixated in 4% formol by Lillie for 20-24 hours prior to embedding in paraffin. For RT-PCR tissue was shock frozen and stored at -85°C until further use. Pig uterine tissue served for control purposes. 3 μm slices were cut, deparaffinized and rehydrated; antigenic epitops were demasced by heating in citrate-buffer in a microwave oven. Endogenous peroxydases were then inactivated by treatment with a 2% H_2O_2 -solution. For detection of the progesterone receptor the monoclonal antibody Klon 10A9 (Immunotech[®]) was used. This antibody is directed against the highly conserved carboxyterminus of the human progesterone receptor. Detection was via a 2nd antibody and the avidin-biotin-system. Specificity of the immunereaction was proven by adequate positive (uterus) and negative controls, also using a nonsense antibody. Slices were examined at a 400- and 1000- fold magnification, where appropriate statistical evaluation was by the program BMDP/Dynamic, Release 7.0 (Dixon, 1993).

For RT-PCR of the progesterone- and oestrogenreceptor- α the mRNA was obtained by using the RNeasy-Kit (Qiagen[®]). Following transcription (One-step, Qiagen[®]) and amplification the amplicons were visulized after electrophoresis on an ethidium-bromide gel. The primers used were specific for the porcine progesterone (Ying et al., 2000) and bovine oestrogenreceptor- α (Malayer und Woods, 1998), sequencing of the amplicons from a 250 day (PR) and 50 day (ER α) old boar yielded an almost 100% homology with the expected sequences. Similar results were obtained

Summary

with the uterine control tissue, RT-PCR of the housekeeping gene β -Actin confirmed correctness of the RT-PCR.

By RT-PCR expression of the PR and ER α could be demonstrated at all age groups. Immunohistochemistrily located the PR particularly in spermatogonia. As was shown in prepubertal boars (50, 100 days), centrally located pre-spermatogonia were largely negative and only expressed the PR after having moved to and getting in contact with the basal lamina ($p < 0,0001$); $65.3 \pm 6.6\%$ and $72.9 \pm 11.6\%$ of the pre-spermatogonia of the 50 and 100 day old boars, respectively, were PR-positive. In adult boars (200 and >250 days) $77.8 \pm 3.2\%$ of the A-spermatogonia und $79.1 \pm 3.9\%$ of the B-spermatogonia expressed the PR. There were no differences between age groups or relations to the stage of spermatocytogenesis. Expression was lost after entering the stage of spermatogenesis. Leydig cells were constantly negative, only few sertoli cells and peritubular cells occasionally stained positive, an observation needing further investigation.

It is concluded that progesterone acts as a paracrine factor involved in the regulation of spermatogoniogenesis

8. Literaturverzeichnis

ALLRICH R.D., CHRISTENSON R.K., FORD J.J., ZIMMERMANN D.R. (1983)

Pubertal development of the boar: age-related changes in testicular morphology and in vitro production of testosterone and estradiol-17beta.

Biol. Reprod., 28: 902-909

ARONICA S. M., KATZENELLENBOGEN B. S. (1991)

Progesterone Receptor Regulation in Uterine Cells: Stimulation by Estrogen, Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate, and Insulin-Like Growth Factor I and Suppression by Antiestrogens and Protein Kinase Inhibitors

Endocrinology, 128: 2045-2052

BAMBERG E. (1994a)

„Chemie, Biochemie und Nachweis der Steroidhormone.“ in:

„Veterinärmedizinische Endokrinologie“ Döcke F.(ed.)

Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart: pp 31-40

BAMBERG E. (1994b)

„Biochemie der gonadalen Steroidhormone.“ in:

„Veterinärmedizinische Endokrinologie“ Döcke F.(ed.)

Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart: pp 411-416

BAMBERG E. (1994c)

„Wirkungen der Keimdrüsenhormone.“ in:

„Veterinärmedizinische Endokrinologie“ Döcke F.(ed.)

Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart: pp 418-443

BARDIN C. W., CHENG C. Y., GUNSLAUS G. L., MUSTO N. A., (1988)

„The Sertoli Cell“ in

„The Physiology of Reproduction“ Knobil E., Neill J. (eds.)

Raven Press, Ltd., New York: pp 933-974

BEATO M. (1987)

Gene Regulation by Steroid Hormones.

Cell 56: 335-344

BEAUMONT H.M., MANDL A.M. (1963)

A quantitative study of primordial germ cells in the male rat.

J. Embryol. Exp. Morph. 11: 715-740

BEDRAK E., SAMUELS L.T. (1969)

Steroid biosynthesis of the equine testis.

Endocrinology 85: 34-38

BELLVE A. R. , ZHENG W. (1989)

Growth factors as autocrine and paracrine modulators of male gonadal functions.

J. Reprod. Fert. 85: 771-793

BERGMAN M.D., SCHLACHTER B.S., KARELUS K., COMBATSIARIS E.P., GARCIA T., NELSON J.F. (1992)

Up-regulation of the uterine estrogen receptor and its messenger ribonucleic acid during the mouse estrous cycle: the role of estradiol.

Endocrinology 130: 1923-1930

BERGQVIST A., BERGVIST D., FERNO M. (1993)

Estrogen and Progesterone receptors in vessel walls. Biochemical and immunochemical assays.

Acta. Obstet. Gynecol. Scand. 72: 10-16

BILINSKA B., SCHMALZ-FRANCZEK B., SADOWSKA J., CARREAU S. (2000)

Localization of cytochrome P450 aromatase and estrogen receptor α and β in testicular cells- an immunohistochemical study of the bank vole.

Acta. Histochem. 102: 167-181

BRAUN AM., THOMAS P. (2003)

Androgens inhibit estradiol-17beta synthesis in Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) ovaries by a nongenomic mechanism initiated at the cell surface.

Biol. Reprod. 69: 1642-1650

BUSCH W., LÖHLE K., PETER W. (1991)

„Künstliche Besamung bei Nutztieren“

2. Auflage, Gustav Fischer Verlag: pp 187-195

CARREAU S. (2001)

Germ cells: a new source of estrogens in the male gonad.

Mol. Cell. Endocrinol. 178: 65-72

CARSON-JURICA M.A., SCHRADER W.T., O'MALLEY B.W. (1990)

Steroid Receptor Family: Structure and Functions.

Endocr. Rev. 11: 201-20

CHAMINDRANI MENDIS-HANDAGAMA S.M.L., SIRIL ARIYARATNE H.B. (2001)

Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis.

Biol. Reprod. 65: 660-671

CHENG F-P., GADELLA B.M., VOORHOUT W.F., FAZELI A., BEVERS M.M., COLEBRANDER B. (1998)

Progesterone-induced Acrosome Reaction in Stallion Spermatozoa is Mediated by a Plasma Membrane Progesterone Receptor.

Biol. Reprod. 59: 733-742

CHO J.J., CADET P., SALMON E., MANTIONE K.J., STEFANO G.B., (2003)

The nongenomic protective effects of estrogen on the male cardiovascular system: clinical and therapeutic implications in aging men.

Med. Sci. Monit. 9: 63-68

CLAPPER D.L., CONN P.M. (1985)

Gonadotropin-releasing hormone stimulation of pituitary gonadotrope cells produces an increase in intracellular calcium.

Biol. Reprod. 32: 269-278

CLAUS R. (1979)

Pheromone bei Säugetieren unter besonderer Berücksichtigung des Ebergeruchstoffes und seiner Beziehung zu anderen Hodensteroiden.

Fortschr. Tierphysiologie und Tierernährung, Beiheft 10. Paul-Parey: 1-136

CLAUS R. (1994)

„Pheromone.“ in:

„Veterinärmedizinische Endokrinologie“ Döcke F.(ed.)

Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart: pp 691-712

CLAUS R., ALSING W. (1979)

Occurance of 5 α -androst-16-en-3-one, a boar pheromone in man and its relationship to testosterone.

J. Endocrinol. 68: 483-484

CLAUS R., HOFFMANN B. (1980)

Oestrogens, compared to other steroids of the testicular origin, in blood plasma of the boars.

Acta Endocrinol. 94: 404-411

COLENBRANDER B. DE JONG F.H., WENSING C.J.G (1978)

Changes in serum testosterone concentrations in the male pig during development.

J. Reprod. Fert. 53: 377-380

COLENBRANDER B., KRUIP A.M., DIELEMANN S.J., WENSING C.J.G. (1977)

Changes in development of the boar: testosterone, estradiol-17 β , cortisol and LH concentrations during normal and abnormal sexual development in the pig.

Biol. Reprod. 17: 506-513

CONLEY A.J., BIRD I.M. (1997)

The role of Cytochrome P450 17 α Hydroxylase and 3 β - Hydroxysteroid Dehydrogenase in the Integration of Gonadal and Adrenal Steroidogenesis via Δ 5 and Δ 4 Pathways of Steroidogenesis in Mammals.

Biol. Reprod. 56: 789-799

CONN M., MC ARDLE C.A., ANDREWS W.V., HUCKLE W.R. (1987)

The molecular basis of gonadotropin-releasing hormone action in the pituitary gonadotrope.

Biol. Reprod. 36: 17-35

CONNELY O.M., SULLIVAN W.P., TOFT D.O.; BIRNBAUMER M.; COOK R.G.; MAXWELL B.L., ZARUCKI-SCHULZ T., GREENE G.L. (1986)

Molecular cloning of the chicken progesterone receptor.

Science 233: 767-770

DE ROOIJ D.G. (2001)

Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells.

Reprod. 121: 347-354

DIERICHS R., WROBEL K.-H., (1973)

Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an den peritubulären Zellen des Schweinehodens während der postnatalen Entwicklung.

Z. Anat. Entwickl.-Gesch. 143: 49-64

DIERICHS R., WROBEL K.-H., SCHILLING E. (1973)

Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an den Leydigzellen des Schweins während der postnatalen Entwicklung.

Z. Zellforsch. 143: 207-227

DIXON W.J. (1993)

„BMDP Statistical Software Manual, Vol 1 and 2”

University of California Press, Berkley, Los Angeles, London

DÖCKE F (1994)

„Grundlagen der Regulation im Endokrinium.“ in:

„Veterinärmedizinische Endokrinologie“ Döcke F.(ed.)

Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart: pp 92-105

DORRINGTON J.H., ARMSTRONG D.T. (1975)

Follicle-stimulating hormone stimulates estradiol-17 β synthesis in cultured Sertoli cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. 72: 2677-2681

DORST J., SAJONSKI H. (1974)

Zur Qualität der Gewebekomponenten des Schweinehodens während der postnatalen Entwicklung.

Monatsh. Veterinärmed. 29: 650-652

EL-HEFNAWY T., HUHTANIEMI I. (1998)

Progesterone can participate in down-regulation of the luteinizing hormone receptor gene expression and function in cultured murine Leydig cells.

Mol Cell Endocrinol., 137: 127-138.

ENGEL P. (1991)

Immunhistochemische Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation des Östradiolrezeptors in Abhängigkeit vom hormonellen Stimulus; Inaugural-Dissertation, Fachbereich Chemie der Universität Hannover

**ENMARK E., PELTO-HUIKKO M., GRANDIEN K., LAGECRANTZ S.,
LAGERCRANTZ J., FRIED G., NORDENSKJOLD M.,
GUSTAFFSON J.A. (1997)**

Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 82: 4258-4265

ERGUN S., UNGEFROREN H., HOLSTEIN A.F., DAVIDOFF M.S. (1997)

Estrogen and progesterone receptors and estrogen receptor-related antigen (ER-D5) in human epididymis.

Mol. Reprod. Dev. 47: 448-55

EVANS R.M. (1988)

The Steroid and Thyroid Hormone Receptor Superfamily

Science 240: 889-895

EVANS R.W., LEAVITT W.W. (1980)

Progesterone inhibition of uterine nuclear estrogen receptor: dependence on RNA and protein synthesis.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 77: 5856-5860

**FALKENSTEIN E., MEYER C., EISEN C., SCRIBA P., WEHLING M.
(1996)**

Full-length cDNA of a Progesterone Membrane-Binding Protein from Vascular Smooth Muscle Cells.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 229: 86-89

FARHAT MY., ABI-YOUNES S., RAMWELL PW., (1996)

Non-genomic effects of estrogen and the vessel wall.

Biochem. Pharmacol. 51:571-576

FLICKINGER C.J. (1967)

The Postnatal Development of the Sertoli Cells of the Mouse.

Zeitschr. Zellforsch. 78: 92-112

FOOTE R.H., SWIERSTRA E.E. HUNT W.L. (1972)

Spermatogenesis in the Dog.

Anat Rec. 173: 341-351

**FRACZEK B., KOTULA-BALAK M., WOJITUSIAK A., PIERSCINSKI
A., BILINSKA B. (2000)**

Cytochrome p450 aromatase in the testis of immature and mature pigs.

Reprod. Biol. vol.1; No.1: 51-59

**FRANCA L.R., SILVA V.A.; CHIARINI-GARCIA H., GARCIA S.K.,
DEBELJUK L. (2000)**

Cell Proliferation and Hormonal Changes During Postnatal Development of the Testis
in the Pig.

Biol. Reprod. 63: 1629-1636

FRANKENHUIS M.T., KRAMER M.F., DE ROOIJ D.G. (1982)

Spermatogenesis in the boar.

The Veterinary Quarterly 4: 57-61

GALENA HJ, PILLAI AK, TERNER C. (1974)

Progesterone and androgen receptors in non-flagellate germ cells of the rat testis.

J Endocrinol. 63: 223-237

GANJAM V. K., AMANN R. P., (1976)

Steroid in fluids and sperm entering and leaving the bovine epididymis, epididymal
tissue, and accessory gland secretions.

Endocrinology 99: 1618-1630

GASSEN H.G., SCHIMPF G. (1999)

„Gentechnische Methoden“

2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer 50: pp 64-65; 338

GIANGRANDE PH, POLLIO G, Mc DONNELL DP (1997)

Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor.

J. Biol. Chem. 272: 32889-32900

GOYAL H.O., BARTOL F.F., WILEY A.A., NEFF C.W. (1997)

Immunolocalization of Receptors for Androgen and Estrogen in Male Caprine Reproductive Tissues: Unique Distribution of Estrogen Receptors in Efferent Ductule Epithelium.

Biol. Reprod. 56: 90-101

GREEN S., CHAMBON P. (1991)

„The oestrogen receptor: from perception to mechanism.“ in:

„Nuclear Hormone Receptors“ Parker M. G. (ed.)

Academic Press Inc., San Diego: pp 15-38

GREENE G.L., SOBEL N.B., KING W.J., JENSEN E.V. (1984)

Immunochemical studies of estrogen receptors.

J. Steroid. Biochem. 20: 51-56

GRONEMEYER H. (1992)

Control of transcription activation by steroid hormone receptors.

FASEB J. 6: 2524-2529

HADZISELIMOVIC´ F. (1976)

Elektronenmikroskopische Untersuchung über die Entwicklung des Tubulus seminiferus unmittelbar nach der Geburt bis zum vollendeten ersten Lebensjahr.

Acta. Anat. 95: 287-299

HADZISELIMOVIC´F., SEGUCHI H. (1974)

Ultramikroskopische Untersuchungen an Tubuli Seminiferi bei Kindern von der Geburt bis zur Pubertät.

Verh. Anat. Ges. 68: 149-161

HALL P.F. (1988)

„Testicular steroid synthesis: Organization and regulation“ in:

„The Physiology of Reproduction“. Knobil E., Neill J. (eds.)

Raven Press; Ltd.; New York: pp 975-997

HAUER J. (1933)

Zur Trächtigkeitsdiagnose beim Schwein durch den Nachweis des Ovarialhormons im Harn.

Wien. Tierärztl. Wochenschr. 20: 210-218

HEIKINHEIMO O., MAHONY M.C., GORDON K., HSIU J.G., HODGEN G.D., GIBBONS W.E. (1995)

Estrogen and progesterone receptor mRNA are expressed in distinct pattern in male primate reproductive organs.

J. Assist. Reprod. Genet. 12:198-204

HELIN HJ, HELLE MJ, KALLIONIEMI OP, ISOLA JJ. (1989)

Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptors in human breast carcinoma. Correlation with histopathology and DNA flow cytometry.

Cancer 63:1761-1767

HESS R.A., BUNICK D., BAHR J (2001)

Oestrogen, its receptors and function in the male reproductive tract- a review.

Mol. Cell. Endocrinol. 178: 29-38.

HESS R.A., BUNICK D., LEE K.-H., BAHR J., TAYLOR J.A., KORBACH K.S., LUBAHN D.B. (1997)

A role for oestrogens in the male reproductive system.

Nature 390: 509-511

HESS R.A., BUNICK D., LUBAHN D.B., ZHOU Q., BOUMA J. (2000)

Morphologic Changes in Efferent Ductules and Epididymis in Estrogen Receptor- α Knockout Mice.

J. Androl. 21: 107-121

HILSCHER B., HILSCHER W., DELBRÜCK G., LEROUGE-BENARD B. (1972)

Autoradiographische Bestimmung der S-Phasen-Dauer der Gonozyten bei der Wistarratte durch Einfach-und Doppelmarkierung.

Z. Zellforsch. 125: 229-251

HILSCHER B., HILSCHER W.; BÜLTHOFF-OHNOLZ B.; KRÄMER U., BIRKE A., PELZER H., GAUSS G. (1974)

Kinetics of Gametogenesis I. Comparative Histological and Autoradiographic Studies of Oocytes and Transitional Prospermatogonia during Oogenesis and Prespermatogenesis

Cell. Tiss. Res. 154: 443-470

HIRATA S., SHODA T., KATO J., HOSHI K. (2000)

The novel Isoform of the Progesterone Receptor cDNA in the Human Testis and Detection of its mRNA in the Human Uterine Endometrium.

Oncology 59: (Suppl. 1): 39-44

HIRATA S., SHODA T., KATO J., HOSHI K. (2002)

The novel exon, exon T, of the human progesterone receptor gene and the genomic organization of the gene.

J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 80: 365-7.

HOFFMANN B, (2003)

„Andrologie: Physiologie, Pathologie und Biotechnologie der männlichen Fortpflanzung“

Lehmanns Media: pp 35-39

HOFFMANN B., BÜTTNER G. (1998)

Biochemical and immunohistochemical investigations on the occurrence of the estrogen receptor in the canine uterus during the oestrus cycle.

Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes 106(Suppl. 1): p 42

HOFFMANN B., SCHULER G. (2000)

Receptor blockers-general aspects with respect to their use in domestic animal reproduction.

Animal. Reprod. Sci. 60-61: 295-312

HOLSTEIN A.F., WARTENBERG H: (1970)

On the cytomorphology of the human spermatogenesis.

Fortschritte der Andrologie 1: 8-12

ING N.H., TORNESI M.B. (1997)

Estradiol Up-Regulates Estrogen Receptor and Progesterone Receptor Gene Expression in Specific Ovine Uterine Cells.

Biol. Reprod. 56: 1205-1215

IWAI M., YASUDA K., FUKUOKA M., IWAI T., TAKAKURA K., TAI S., NAKANISHI S., MORI T. (1991)

Lutenizing hormone induces progesterone receptor gene expression in cultured porcine granulosa cells.

Endocrinology 129: 1621-1627

JELTSCH JM, KROZOWSKI Z, JACOB F & CHAMBON P (1986)

Cloning of the chicken progesterone receptor.

PNAS 83: 5324-5428

JENSEN E.V., JACOBSEN H.I. (1962)

Basic guides to the mechanism of estrogen action.

Recent. Prog. Horm. Res. 18: 387-414

**JUNGBLUT P.W., ADAMSKI J., ENGEL P., HENNING M., HOHLS E.,
JAKOB F., KALLWEIT E., SZENDRO P., THOLE H., SIERRALTA
W.D. (1991)**

Differentiation between receptor-mediated actions of estradiol and effects of estradiol metabolism.

Advances in Reprod. Biol. Beijing (1991): pp 106-118

Proc. of Acad. Sinica Symposion Oct. 1990

**KASTNER P., KRUST A., TURCOTTE B., STROPP U., TORA L.,
GRONEMEYER H., CHAMBON P. (1990)**

Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B.

EMBO J. 9:1603-1614

KATZENELLENBOGEN B.S. (1980)

Dynamics of steroid hormone receptor action.

Ann. Rev. Physiol. 42: 17-35

KATZENELLENBOGEN B.S., NORMAN M.J. (1990)

Multihormonal Regulation of the Progesterone Receptor in MCF-7 Human Breast Cancer Cells: Interrelationships among Insulin/Insulin-Like Growth Factor-I, Serum, and Estrogen.

Endocrinology 126: 891-898

KAWAKAMI E., HORI T., TSUTSUI (2001)

Relationship between Testicular Transferrin and Plasma Estradiol-17 β Concentration of Gods with Azoospermia and dods with Sertoli Cell Tumors.

J. Vet. Med. Sci. 63: 579-581

**KONRAD L., WEBER M.A., GROOS S., ALBRECHT M., AUMULLER G.
(1998)**

Paracrine interaction in testicular somatic cells.

Ital. J. Anat. Embryol. 103(4 Suppl. 1): 139-52

**KOTULA M., TUZ R., FR CZEK B., WOJTUSIAK A., BILINSKA B.
(2000)**

Immunolocalization of androgen receptors in testicular cells of prepubertal and pubertal pigs.

Folia Histochem. Cytobiol. 38: 157-162

KRAUS W.L., KATZENELLENBOGEN B.S. (1993)

Regulation of Progesterone Receptor Gene Expression and Growth in the Rat Uterus:
Modulation of Estrogen Actions by Progesterone and Sex Steroid Hormone
Antagonists.

Endocrinology 132: 2371-2379

KRAUS W.L., MONTANO M.M., KATZENELLENBOGEN B.S. (1994)

Identification of multiple, widely spaced estrogen-responsive regions in the rat progesterone receptor gene.

Mol. Endocrinol. 8: 952-969

KREFFT G. (1999)

Die postnatale Entwicklung des Hodens des Katers (Felis catus)

Inaugural-Dissertation, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin

**KUIPER G.G., ENMARK E., PELTO-HUIKKO., NILSSON S.,
GUSTAFSSON J.-A. (1996)**

Cloning of a novel estrogen receptor expressed in the rat prostate and ovary.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 5925-5930

KUIPER G.G., GUSTAFSSON J.A. (1997)

The novel estrogen receptor-beta subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens.

FEBS Lett. 410: 87-90

KUMAR V., GREEN S., STACK G., BERRY M., JIN J.-R., CHAMBON P. (1987)

Functional Domains of the Human Estrogen Receptor.

Cell 51: 941-951

KÜST D. (1934)

Die Sexualhormone bei den Haustieren.

Klin. Wochenschr. 13: 1782

LANDERS J.P., SPELSBERG T.C. (1992)

New Concepts in Steroid Hormone Action: Transcription Factors, Proto-Oncogenes, and the Cascade Model for Steroid Regulation of Gene Expression.

Critical Reviews in Eukariontic Gene Expression 2: 19-63

LANZINO M., CATALANO S., GENISSEL C., ANDO S., CARREAU S., HAMRA K., Mc PHAUL M.J. (2001)

Aromatase RNA is Derived from the Promoter of the Aromatase Gene in Leydig, Sertoli, and Germ Cells of the Rat Testis.

Biol. Reprod. 64: 1439-1443

LATINGA-VAN LEEUWEN I.S., VAN GARDEREN E., MOL J.A. (2000)

Molecular cloning and cellular localization of the canine progesterone receptor.

Gene library- PUBMED Nr.: AAGO 9292

LEAVITT W.W., TAKEDA A. (1986)

Hormonal Regulation of Estrogen and Progesterin Receptors in Decidual Cells.

Biol. Reprod. 35: 475-484

LEE K.H., HESS R.A., BAHR J.M., LUBAHN D.B., TAYLOR J., BUNICK D. (2000)

Estrogen receptor alpha has a functional role in the mouse rete testis and efferent ductules.

Biol Reprod. 63: 1873-1880

LIEBICH H.-G. (1993)

„Funktionelle Histologie“

2. Auflage, F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbh: pp 233-245

LILLIE R.D. (1951)

Histopathologic Technic and Practical Histochemistry.

The Blakiston Company, New York

LIVERA G., ROUILLER-FABRE V., DURAND P., HABERT R. (2000)

Multiple Effects of Retinoids on the Development of Sertoli, Germ, and Leydig Cells of the Fetal and Neonatal Rat Testis in Culture

Biol. Reprod. 62: 1303-1314

LOOSFELT H., ATGER M., MISRAHI M., GUIOCHON-MANTEL A., MERIEL C., LOGEAT F., BENAROUS R., MILGROM E. (1986)

Cloning and sequence analysis of rabbit progesterone-receptor complementary DNA.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 9045-9049

LUNSTRA D.D., FORD J.J., CHRISTENSON R.K., ALLRICH R.D. (1986)

Changes in Leydig cell ultrastructure and function during pubertal development in the boar.

Biol. Reprod. 34: 145-158

MAGRE S., JOST A. (1980)

The initial phases of testicular organogenesis in the rat. An electron microscopy study.

Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp. 69: 297-318

MAHATO D., GOULDING E.H., KORACH K.S., EDDY E.M. (2001)

Estrogen receptor-alpha is required by the supporting somatic cells for spermatogenesis.

Mol. Cell. Endocrinol. 178: 57-63

MAHATO D., GOULDING E.H., KORACH K.S., EDDY E.M.. (2000)

Spermatogenic cells do not require estrogen receptor-alpha for development or function.

Endocrinology 141: 1273-1276

MALAYER J.R., WOODS V.M. (1998)

Development of oestrogen expression and hormone response in the uterus of the bovine fetus.

J. Reprod. Fert. 112: 289-300

**MANSOUR M.M., MACHEN M.R., TARLETON B.J., WILEY A.A.,
WOWER J., BARTOL F. F., GOYAL H.O. (2001)**

Expression and Molecular Characterization of Estrogen Receptor Alpha Messenger RNA in Male Reproductive Organs of Adult Goats.

Biol. Reprod. 64: 1432-1438

MEIZEL S., TURNER KO. (1991)

Progesterone acts at the plasma membrane of human sperm.

Mol. Cell. Endocrinol. 77: R1-5

MENGER H., MENGER S. (1981)

Vergleichende licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Ablauf der Spermio-genese beim Rammler (Kaninchen), Eber und Schafbock.

Arch. Exper. Vet. med. 35: 359-374

MIETHING A. (1989)

Morphological studies on the prespermatogonia and the pre-Sertoli cells in the testes of 6-to 11- day-old golden hamsters.

Anat. Embryol. 179: 503-510

**MISCHKE D., MEURER D., HOPPEN UEBERSCHAR S., HEWICKER-
TRAUTWEIN M. (2002)**

Blood plasma concentrations of oestradiol-17 beta, testosterone and testosterone/oestradiol ratio in dogs with neoplastic and degenerative testicular diseases.

Res. Vet. Sci. 73: 267-272

**MISRAHI M., ATGER M., D'AURIOL L., LOOSFELT H., MERIL C.,
FRIDLANSKY F., GUICHON-MANTEL A., GALIBERT F.,
MILGROM E. (1987)**

Complete amino acid sequence of the human progesterone receptor deduced from cloned cDNA.

Biochem. Biophys. Research Communications 143: 740-748

**MISRAHI M., VENENCIE P.Y., SAUGIER-VEBER P., SAR S., DESSEN
P., MILGROM E. (1993)**

Structure of the human progesterone receptor gene.

Biochem. Biophys. Acta. 1216: 289-292

MOHAMED M.K., TUNG L., TAKIMOTO G.S., HORWITZ K.B. (1994)

The leucine zippers of c-fos and c-jun for progesterone receptor dimerization: A-dominance in the A7B heterodimer.

J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 51: 241-250

**MORLEY P., WHITFIELD JF., VANDERHYDEN BC., TSANG BK.,
SCHWARTZ JL., (1992)**

A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium

Endocrinology 131:1305-1312

MOSSELMANN S., POLMAN J., DIJKEMA R. (1996)

ER beta: Identification and characterization of a novel human estrogen receptor.
FEBS Lett 392: 49-53

NISTAL M., PANIAGUA R. (1983)

The Postnatal Development of the Human Sertoli Cells.
Z. mikrosk.-anat. Forsch. 97: 739-752

**NITTA H., BUNICK D., HESS R.A., JANULIS L., NEWTON S.C.,
MILLETTE C.F., OSAWA Y., SHIZUTA Y., TODA K., BAHR J.M.
(1993)**

Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase.
Endocrinology 132:1396-1401

NUKLEOTIDSEQUENZ

www.ncbi.nlm.nih.gov:80/blast/Blast.cgi
[gi/233792/gb/S49016.1/S49016](http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/blast/Blast.cgi?gi=233792&gb=S49016.1/S49016) Progesterone receptor [swine, mRNA Partial, 352 nt]

NUKLEOTIDSEQUENZ

[www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/question_nucleotide & lists_uids =02665827 & dopt = Gen Bank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/question_nucleotide&lists_uids=02665827&dopt=GenBank)
AF 035775. Sus scrofa estradiol receptor [gi: 2665827]

O'MALLEY B. (1990)

The steroid Receptor Superfamily: More Excitement Predicted for the Future.
Mol. Endocrinol. 4: 363-369

**OGAWA S., INOUE S., WATANABE T., HIROI H., ORIMO A., HOSOI
T., OUCHI Y., MURAMATSU M. (1998)**

The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 243:122-126

OGLE T.F., DAI D., GEORGE P., MAHESH V.B. (1997)

Stromal cell progesterone and estrogen receptors during proliferation and regression of the decidua basalis in the pregnant rat.

Biol. Reprod. 57: 495-506

OGLE T.F., DAI D., GEORGE P., MAHESH V.B. (1998)

Regulation of the progesterone receptor and estrogen receptor in decidua basalis by progesterone and estradiol during pregnancy.

Biol. Reprod. 58: 1188-1198

OGLE T.F., MILLS T.M., COSTOFF A. (1990)

Progesterone maintenance of the placental progesterone receptor and placental growth in ovariectomized rats.

Biol. Reprod. 43: 276-284

PACE P., TAYLOR J., SUNTHARALINGHAM S., COOMBES C., ALI S. (1997)

Human Estrogen Receptor β Binds DNA in a Manner Similar to and Dimerizes with Estrogen Receptor α .

J. Biol. Chem. 272: 25838-25838

PARANDOOSH Z., CROMBIE D.L., TETZKE T.A., HAYES J.S., HEAP R.B., WANG M.W. (1995)

Progesterone and oestrogen receptors in the decidualized mouse uterus and effects of different types of anti-progesterone treatment.

J. Reprod. Fertil. 105: 215-220

PARK O.K., MAYO K.E. (1991)

Transient expression of progesterone receptor messenger RNA in ovarian granulosa cells after the preovulatory luteinizing hormone surge.

Mol. Endocrinol. 5: 967-978

PAYNE A.H., YOUNGBLOOD G.L. (1995)

Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells.

Biol. Reprod. 52: 217-225

PELLINIEMI L.J., FRÖDJMAN K., PARANKO J. (1993)

„Embryological and prenatal development and function of Sertoli cells.” in:

„The Sertoli Cell”. Russell LD, Griswold MD (eds)

Vienna IL: Cache River Press: pp 88-113

**PERROT-APPLANAT M., COHEN.SOLAL K., KILGROM E., FINET M.
(1995)**

Progesterone receptor expression in human saphenous veins.

Circulation 92: 2975-2983

**PERROT-APPLANT M., DENG M., FERNANDEZ H., LELAIDER C.,
MEDURI G., BOUCHARD P. (1994)**

Immunohistochemical Localization of Estradiol and Progesterone Receptors in Human Uterus throughout Pregnancy: Expression in Endometrial Blood Vessels.

J. Clin. Endocrinol.Metab. 78: 216-224

**PERROT-APPLANT M., GROYER-PICARD M.-T., LOGEAT F.,
MILGROM E. (1986)**

Ultrastructural Localization of the Progesterone Receptor by an Immunogold Method: Effect of Hormone Administration.

J. Cell Biology 102: 1191-1199

**PERTSCHUK LP, KIM DS, NAYER K, FELDMAN JG, EISENBERG KB,
CARTER AC, RONG ZT, THELMO WL, FLEISHER J, GREENE
GL., (1990)**

Immunocytochemical estrogen and progestin receptor assays in breast cancer with monoclonal antibodies. Histopathologic, demographic, and biochemical correlations and relationship to endocrine response and survival.

Cancer 66: 1663-1670

PETERSON C.M. (2000)

Estrogen and Progesterone Receptors: An overview From the year 2000.

J. Soc. Gynecol. Investig. 7(1 Suppl.): 3-7

**PETTERSSON K., GRANDIEN K., KUIPER G.G., GUSTAFSSON J.A.
(1997)**

Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha.

Mol. Endocrinol. 11: 1486-1496

PEYRAT J.-P., MEUSEY_DESSOLLE N., GARNIER J. (1981)

Changes in Leydig cell and luteinizing hormone receptors in porcine testis during postnatal development in boar.

Biol. Reprod. 34: 145-158

PIER, C. (1985)

Der Samenepithelzyklus des Katers.

Inaugural-Dissertation, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin

PINO A.M., VALLADARES L.E. (1988)

Evidence for a Leydig cell Progesteron receptor in the rat.

J. Steroid Biochem. 29: 709-714

QIAGEN (1998)

The Qiagen Guide to Template Purification and DNA Sequenzig.

QIAGEN (1999)

One step RT-PCR Kit Handbuch

QIAGEN (2001)

RNeasy Mini Handbook

RAESIDE J.I., RENAUD R.L. (1983)

Estrogen and androgen production by purified Leydig cells of mature boars.
Biol. Reprod. 28: 727-733

**RENOIR J.-M., RADANYI C., JUNG-TESTAS I., FABER L. E.,
BAULIEAU E.-E. (1990)**

The Nonactivated Progesterone Receptor Is a Nuclear Heterooligomer.
J. Biological Chem. 265: 14402-14406

ROOSEN-RUNGE E.C., ANDERSON D. (1959)

The development of the interstitial cells in the testis of the albino rat.
Acta Anat. 37: 125-137

**ROSENFELD C.S., GANJAM V.K., TAYLOR J.A., YUAN X., STIEHR
J.R., HARDY M.P., LUBAHN D.B. (1998)**

Transcription and translation of estrogen receptor-beta in the male reproductive tract
of estrogen receptor-alpha knock-out and wild-type mice.
Endocrinology 139: 2982-2987

**ROSENFELD C.S., YUAN X., MANIKAM M., CALDER M.D.,
GARVERICK H.A., LUBAHN D.B. (1999)**

Cloning sequencing, and localization of bovine estrogen receptor-beta within the
ovarian follicle.
Biol. Reprod. 60: 691-697

**ROSSATO M., NOGARA A., MERICO M., FERLIN A., FORESTA C.
(1999)**

Identification of functional binding sites for progesterone in rat Leydig cell plasma
membrane.
Steroids 64: 168-175

**ROSTALSKI, A., HOFFMANN, B., RIESENBECK, A., SCHULER, G.
(2000)**

Investigations on the testicular production of free and conjugated oestrogens in the boar.

Andrologia 32: 193

SABEUR K., EDWARDS DP., MEIZEL S. (1996)

Human sperm plasma membrane progesterone receptor(s) and the acrosome reaction.

Biol. Reprod. 54:993-1001

SANCHEZ B.; PIZARRO M.; GARCIA P., FLORES J.M. (1993)

Postnatal development of seminiferous tubules in the cat.

J. Reprod. Fert. (Suppl.) 47: 343-348

SANGER F., NICKELN S., COULSON A.R. (1977)

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467

SAPSFORD CS. (1962)

The development of the testis of the merino ram with special reference to the origin of the adult stem cells.

Austr. J. Agr. Res. 13: 487-505

**SARTORIUS C.A., MELVILLE M.Y., HOVLAND A.R., TUNG L.,
TAKIMOTO G.S., HORWITZ K.B. (1994)**

A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform.

Mol. Endocrinol. 8: 1347-1360

**SAVOURET FL., BAILLY A., MISRAHI M., REDUILH G.,
CHAUCHEREA A., MILGROM E., (1991)**

Characterization of the hormone responsive element involved in the regulation of the Progesterone receptor gene.

EMBO J. 10: 1875-1883

SCHMIDT W.N, DANZO B.J. (1980)

Androgen and progesterone binding components in cytosol prepared from cultures enriched in Sertoli cells from immature rat testes.

Biol Reprod. 23: 495-506.

SCHOTT D.R., SHYAMALA G., SCHNEIDER W., PARRY G. (1991)

Molecular cloning, sequence analyses, and expression of complementary DNA encoding murine progesterone receptor.

Biochemistry 30: 7014-7020

SCHULER G (2000)

Plazentäre Steroide beim Rind: Biosynthese und Beziehungen zu Wachstum und Differenzierung der Plazentome.

Habilitationsschrift, Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen

**SCHULER G., WIRTH C., KLISCH K., PFARRER C., LEISER R., HOFFMANN B.
(1999)**

Immunolocalization of progesterone receptors in bovine placentomes throughout mid and late gestation and at parturition.

Biol. Reprod. 61: 797-801

**SCHULER G., WIRTH C., TEICHMANN U., FAILING K., LEISER R.,
THOLE H., HOFFMANN B. (2002)**

Occurrence of estrogen receptor alpha in bovine placentomes throughout mid and late gestation and at parturition.

Biol. Reprod. 66: 976-982

SCHULZE C. (1984)

Sertoli Cells and Leydig Cells in Man.
Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol. 88: 7-30

SCHUMMER A., VOLLMERHAUS B. (1987)

„Lehrbuch der Anatomie der Haustiere“: in:
„Band II Eingeweide“ Nickel R., Schummer A., Seiferle E. (eds.)
6. Auflage, Paul Parey Verlag: pp 327-333, 355-356.

SHUGHRUE PJ, LANE MV, SCRIMO PJ, MERCHENTHALER I. (1998)

Comparative distribution of estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the rat pituitary, gonad, and reproductive tract.
Steroids 63: 498-504

SINOWATZ F. AMSELGRUBER W. (1986)

Postnatal development of bovine Sertoli cells.
Anat. Embryol. 174: 413-423

SINOWATZ F., WROBEL K.-H., FISCHLEITNER F., SCHILLING E. (1983)

Morphologische Aspekte der postnatalen Hodendifferenzierung.
Wien. Tierärztl. Mschr. 70: 194-197

SIRIL ARIYARATNE H.B., MENDIS-HANDAGAMA S., BUCHANAN HALES D., IAN MASON J., (2000)

Studies on the onset of Leydig precursor cell differentiation in the prepubertal rat testis.
Biol. Reprod. 63: 165-171

SIRIVAIDYAPONG S, BEVERS M.M, COLENBRANDER B. (1999)

Acrosome reaction in dog sperm is induced by a membrane-localized progesterone receptor.
J. Androl. 20: 537-544

SIRIVAIDYAPONG S, BEVERS M.M, GADELLA B.M, COLENBRANDER B. (2001)

Induction of the acrosome reaction in dog sperm cells is dependent on epididymal maturation: the generation of a functional progesterone receptor is involved.

Mol. Reprod. Dev. 58: 451-459

SLOMCZYNSKA M., DUDA M., GALAS J. (2001)

Estrogen receptor alpha and beta expression in the porcine ovary.

Folia Histochem. Cytobiol. 39: 137-138

SLOMCZYNSKA M., KROK M., PIERSCINSKI A. (2000)

Localization of the progesterone receptor in the porcine ovary.

Acta Histochem. 102: 183-191

SOLARI A.J., FRITZ I.B. (1978)

The ultrastructure of Immature Sertoli Cells. Maturation-Like Changes During Culture and the Maintenance of Mitotic Potentiality.

Biol. Reprod. 18: 329-345

SORDOILLET C., CHAUVIN M.A., HENDRICK J.C., FRANCHIMONT P., MORERA A. M., BENAHMED M., (1992)

Sites of interaction between epidermal growth factor and transforming growth factor- β 1 in the control of steroidogenesis in cultured porcine Leydig cells.

Endocrinology 130: 1352-1358

STEGER K., WROBEL. (1996)

Postnatal development of ovine seminiferous tubules: an electron microscopical and morphometric study.

Ann. Anat. 178: 201-213

STERNBERGER L. A. (1967)

Electron microscopic immunocytochemistry: a review.

J. Histochem. Cytochem. 115: 139-159

**SUAREZ-QUIAN C.A., MARTINEZ-GARCIA F., NISTAL M.,
REGADERA J. (1999)**

Androgen receptor distribution in adult human testis.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 84: 350-358.

SWIERSTRA E.E. (1968)

Cytology und Duration of the Seminiferous Epithelium of the Boar: Duration of the Spermatozoan Transit Through the Epididymis.

Anat. Rec. 161: 171-186

THORPE S. A. (1987)

Monoconal antibody technique for detection of estrogen receptors in human breast cancer: greater sensitivity and more accurate classification of receptor status than the dextran- coated charcol method.

Cancer Res. 47: 6572-6575

VAN STRAATEN H.W.N., WENSING C.J.G. (1977)

Histomorphometric Aspects of Testicular Morphogenesis in the pig.

Biol. Reprod. 17: 467-472

VAN STRAATEN H.W.N., WENSING C.J.G. (1978)

Leydig Cell Development in the Testis of the Pig.

Biol. Reprod. 18: 86-93

**VAN VORSTENBOSCH C.J.A.H.V., SPEK E., COLENBRANDER B.,
WENSING C.J.G. (1984)**

Sertoli Cell Development of the Pig Testis in the Fetal and Neonatal Period.

Biol. Reprod. 31: 565-577

VAN WAGENEN G., SIMPSON M.E. (1954)

Testicular development in the Rhesus Monkey.

Anat. Rec. 118: 231-243

VEGATO E., SHAHBAZ M.M., WEN D.X., GOLDMAN M.E., O'MALLEY B.W., Mc DONNELL D.P. (1993)

Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function.

Mol. Endocrinol. 7: 1244-1255

VELLE W (1958)

Further studies on urinary oestrogen excretion by the boar.

Acta Endocrinol. 89: 33-46

VORNBERGER W., PRINS G., MUSTO N.A., SUAREZ-QUIAN C.A. (1994)

Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis.

Endocrinology 134: 2307-2316.

WEBER M. A., GROOS S., AUMÜLLER G., KONRAD L. (2002)

Post-natal development of the rat testis: steroid hormone receptor distribution and extracellular matrix deposition.

Andrologia 34: 41-54

WEHLING M. (1997)

Specific, nongenomic actions of steroid hormones.

Ann. Rev. Physiol. 59: 365-393

WEI L.L., HAWKINS P., BAKER C., NORRIS B., SHERIDAN P.L., QUINN P.G. (1996)

An amino-terminal truncated progesterone receptor isoform, PR-C, enhances progestin-induced transcriptional activity.

Mol. Endocrinol. 10: 1379-1387

WEI L.L., NORRIS B., BAKER C. (1997)

An N-terminally truncated third progesterone receptor protein, PR(C), forms heterodimers with PR(B) but interferes in PR(B)-DNA binding.

J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 62: 287-297

WEINBAUER G.F., WESSELS J. (1999)

'Paracrine' control of spermatogenesis.

Andrologia 31: 249-262

WEN D.X., XU Y.F., MAIS D.E., GOLDMAN M.E., McDONNELL D.P. (1994)

The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells.

Mol. Cell. Biol. 14: 8356-8364

WROBEL K.H. (1998)

„Male Reproductive System” in:

„Textbook of Veterinary Histology” Dellman H.D., Eurell J. (eds.)

5. Auflage, Williams&Wilkins Company: pp 226-227

WU C., PATINO R., DAVIS K.B., CHANG X. (2001)

Localization of estrogen receptor α and β RNA in Germinal and Nongerminal Epithelia of the Channel Catfish Testis.

Gen. and Com. Endocrinol. 124: 12-20

WU T.-C., WANG L. & WAN Y.-J. (1992)

Expression of estrogen receptor gene in mouse oocyte and during embryogenesis.

Mol. Reprod. Dev. 33: 407-412

XIAO C.W., GOFF A.K. (1999)

Hormonal regulation of oestrogen and progesterone receptors in cultured bovine endometrial cells.

J. Reprod. Fertil. 115: 101-109

XU J., NAWAZ Z., TSAI S.Y., TSAI M.-J., O'MALLEY B. (1996)

The extreme C terminus of progesterone receptor contains a transcriptional repressor domain that functions through a putative corepressor.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 12195-12199

YING C., YANG Y-C., HONG W-F., CHENG W. T.K., HSU W-L. (2000)

Progesterone receptor gene expression in preimplantation pig embryos.

Eur. J. Endocrinol. 143: 697-703

ZHAI J., LANCLOS K.D., ABNEY T.O. (1996)

Estrogen receptor messenger ribonucleic acid changes during Leydig cell development.

Biol. Reprod. 55: 782-788

ZONDEK (1934)

Mass excretion of oestrogenic hormone in the urine of the stallion.

Nature 133: 209-210

9. Anhang

9.1 Absolute und relative Zahlen – ohne Arcus-Sinus-Transformation – der immunhistochemischen Ergebnisse

Tierkennung	Eber 6	Eber 7	Eber 8	Eber 9	Eber 10
Luminale Spermatogonien gefärbt	3	14	11	16	3
Luminale Spermatogonien ungefärbt	36	45	29	36	37
Luminale Spermatogonien Gesamt	39	59	40	52	40
Luminale Spermatogonien (%)	7,6	23,7	27,5	30,7	7,5
Basale Spermatogonien gefärbt	90	72	100	90	98
Basale Spermatogonien ungefärbt	24	20	12	9	15
Basale Spermatogonien Gesamt	114	92	112	99	113
Basale Spermatogonien (%)	78,9	78,2	89,2	90,9	86,7
Spermatogonien gefärbt	93	86	111	106	101
Spermatogonien ungefärbt	60	65	41	45	52
Spermatogonien Gesamt	153	151	152	151	153
Spermatogonien (%)	60,7	56,9	73	70,1	66
Sertolizellen Gesamt gefärbt	1	0	3	0	2
Sertolizellen Gesamt ungefärbt	562	627	630	461	648
Sertolizellen Gesamt	563	627	633	461	650
Sertolizellen Gesamt (%)	0,1	0	0,4	0	0,3

Tab. 6 : Alter: 50 Tage

Anhang

Tierkennung	Eber 6	Eber 8	Eber 10
Luminale Spermatogonien gefärbt	1	3	0
Luminale Spermatogonien ungefärbt	55	31	0
Luminale Spermatogonien Gesamt	56	34	0
Luminale Spermatogonien (%)	1,7	8,8	0
Basale Spermatogonien gefärbt	89	112	126
Basale Spermatogonien ungefärbt	5	4	27
Basale Spermatogonien Gesamt	94	116	153
Basale Spermatogonien (%)	94,6	96,5	82,3
Spermatogonien gefärbt	90	115	126
Spermatogonien ungefärbt	60	35	27
Spermatogonien Gesamt	150	150	153
Spermatogonien (%)	60	76,6	82,3
Sertolizellen Gesamt gefärbt	1	3	4
Sertolizellen Gesamt ungefärbt	489	550	364
Sertolizellen Gesamt	490	553	368
Sertolizellen Gesamt (%)	0,2	0,5	1

Tab. 7: Alter 100 Tage

Anhang

Tierkennung	Eber 1	Eber 3	Eber 5	Eber 6	Eber 7
A-Spermatogonien gefärbt Phase I	122	122	127	119	121
A-Spermatogonien ungefärbt Phase I	32	28	36	35	32
A-Spermatogonien Gesamt Phase I	154	150	163	154	153
A-Spermatogonien gefärbt Phase I (%)	79,2	81,3	77,9	77,2	79
A-Spermatogonien gefärbt Phase II	136	143	183	146	134
A-Spermatogonien ungefärbt Phase II	31	42	48	45	33
A-Spermatogonien Gesamt Phase II	167	185	231	191	167
A-Spermatogonien gefärbt Phase II (%)	81,4	77,2	79,2	76,4	80,2
B-Spermatogonien gefärbt Phase II	129	115	121	123	120
B-Spermatogonien ungefärbt Phase II	24	34	29	31	33
B-Spermatogonien Gesamt Phase II	153	149	150	154	153
B-Spermatogonien gefärbt Phase II (%)	84,3	77,1	80,6	79,8	78,4
A-Spermatogonien gefärbt Phase III	125	124	132	127	113
A-Spermatogonien ungefärbt Phase III	27	35	33	38	40
A-Spermatogonien Gesamt Phase III	152	159	165	165	153
A-Spermatogonien gefärbt Phase III (%)	82,2	77,9	80	76,9	73,8
Sertolizellen gefärbt Phase I	4	16	14	27	35
Sertolizellen ungefärbt Phase I	202	172	114	131	194
Sertolizellen Gesamt Phase I	206	188	128	158	229
Sertolizellen gefärbt Phase I (%)	1,9	8,5	10,9	17	15,2
Sertolizellen gefärbt Phase II	8	17	42	39	54
Sertolizellen ungefärbt Phase II	251	188	267	181	261
Sertolizellen Gesamt Phase II	259	205	309	220	315
Sertolizellen gefärbt Phase II (%)	3	8,2	13,5	17,7	17,1
Sertolizellen gefärbt Phase III	9	19	35	53	7
Sertolizellen ungefärbt Phase III	199	175	116	168	226
Sertolizellen Gesamt Phase III	208	194	151	221	273
Sertolizellen gefärbt Phase III (%)	4,3	9,7	23,1	23,9	2,5
Sertolizellen gefärbt Gesamt	21	52	91	119	96
Sertolizellen ungefärbt Gesamt	673	587	588	599	817
Sertolizellen Gesamt	694	639	679	718	913
Sertolizellen gefärbt Gesamt (%)	3	8,1	13,4	16,5	10,5

Tab. 8: Alter: 200 Tage

Anhang

Tierkennung	Eber 1	Eber 2	Eber 4	Eber 5	Eber 6
A-Spermatogonien gefärbt Phase I	116	116	136	117	112
A-Spermatogonien ungefärbt Phase I	36	37	24	34	38
A-Spermatogonien Gesamt Phase I	152	153	160	151	150
A-Spermatogonien gefärbt Phase I (%)	76,3	75,8	85	77,4	74,6
A-Spermatogonien gefärbt Phase II	129	128	146	114	115
A-Spermatogonien ungefärbt Phase II	41	42	32	36	49
A-Spermatogonien Gesamt Phase II	170	170	178	150	164
A-Spermatogonien gefärbt Phase II (%)	75,8	75,2	82	76	70,1
B-Spermatogonien gefärbt Phase II	119	111	120	127	118
B-Spermatogonien ungefärbt Phase II	34	39	32	40	35
B-Spermatogonien Gesamt Phase II	153	150	152	167	153
B-Spermatogonien gefärbt Phase II (%)	77,7	74	78,9	83,5	77,1
A-Spermatogonien gefärbt Phase III	115	113	124	125	132
A-Spermatogonien ungefärbt Phase III	37	43	37	33	27
A-Spermatogonien Gesamt Phase III	152	156	161	158	159
A-Spermatogonien gefärbt Phase III (%)	75,6	72,4	77	79,1	83
Sertolizellen gefärbt Phase I	6	16	0	16	26
Sertolizellen ungefärbt Phase I	165	145	144	106	84
Sertolizellen Gesamt Phase I	171	161	144	122	110
Sertolizellen gefärbt Phase I (%)	3,5	9,9	0	13,1	23,6
Sertolizellen gefärbt Phase II	9	35	4	36	22
Sertolizellen ungefärbt Phase II	253	190	218	164	202
Sertolizellen Gesamt Phase II	262	225	222	200	224
Sertolizellen gefärbt Phase II (%)	3,4	15,5	1,8	18	9,8
Sertolizellen gefärbt Phase III	3	18	0	24	34
Sertolizellen ungefärbt Phase III	179	192	166	136	131
Sertolizellen Gesamt Phase III	182	210	166	160	165
Sertolizellen gefärbt Phase III (%)	1,6	8,5	0	15	20,6
Sertolizellen gefärbt Gesamt	18	69	4	76	82
Sertolizellen ungefärbt Gesamt	615	596	532	482	499
Sertolizellen Gesamt	633	665	536	558	581
Sertolizellen gefärbt Gesamt (%)	2,8	10,3	0,7	13,6	14,1

Tab. 9: Alter: 250 Tage

9.2 Immunhistochemische Ergebnisse nach Arcus-Sinus-Transformation

Abb.17: Verteilung [$\bar{X} \pm SD$] nach Arcus-Sinus Transformation der den Progesteronrezeptor exprimierenden Präspematogonien präpubertärer Eber.

Position-Präspematogonien	Alter (Tage)		Mittelwert beider Altersgruppen \bar{x}
	50	100	
Präspematogonien zentral \bar{x}	0,44088	0,14398	0,32955
SD	0,15098	0,15103	0,20774
Präspematogonien basal \bar{x}	1,17527	1,28515	1,21647
SD	0,08207	0,13075	0,10939

Abb.18: Prozentuale Häufigkeit [$\bar{X} \pm SD$] der Expression des Progesteronrezeptors in den Präspematogonien präpubertärer Eber.

Präspematogonien	Alter (Tage)		Präspematogonien beider Altersgruppen \bar{x}
	50	100	
\bar{x}	65,34	73	68,2
SD	6,6	11,59	8,88

Abb.19: Häufigkeit [$\bar{X} \pm SD$] nach Arcus-Sinus Transformation der Expression des Progesteronrezeptors in den Sertolizellen präpubertärer Eber.

Sertolizellen	Alter (Tage)		Sertolizellen beider Altersgruppen \bar{x}
	50	100	
\bar{x}	0,0299	0,0719	0,04567
SD	0,0297	0,0277	0,03457

Abb.20: Verteilung [$\bar{X} \pm SD$] nach Arcus-Sinus Transformation der den Progesteronrezeptor exprimierenden Sertolizellen geschlechtsreifer Eber.

Phasenverteilung	Alter (Tage)		Mittelwert beider Altersgruppen \bar{x}
	200	250	
Sertolizellen Phase I \bar{x}	0,31921	0,27718	0,2982
SD	0,11333	0,19249	0,15056
Sertolizellen Phase II \bar{x}	0,34026	0,29625	0,31825
SD	0,10912	0,13304	0,11703
Sertolizellen Phase III \bar{x}	0,33931	0,2583	0,2988
SD	0,16262	0,19373	0,17395
Mittelwert aller Phasen \bar{x}	0,3171	0,2682	0,2927
SD	0,0935	0,1352	0,11257

Abb.21: Häufigkeit [$\bar{X} \pm SD$] nach Arcus-Sinus Transformation der Expression des Progesteronrezeptors in den Sertolizellen geschlechtsreifer Eber.

Sertolizellen	Alter (Tage)		Sertolizellen beider Altersgruppen \bar{x}
	200	250	
\bar{x}	0,3171	0,2682	0,2927
SD	0,0935	0,1352	0,11257

9.3 Wahrscheinlichkeitswerte der zweifaktoriellen Varianzanalyse und T-Tests

Zweifaktorielle Varianzanalyse	P-Wert
Spermatogonien 200 und 250 Tage	
Alter: 200 Tage gegen 250 Tage	P= 0,2672
Phasen gegeneinander	P= 0,7695
Alter gegen Phasen	P= 0,679
Sertolizellen 200 und 250 Tage	
Alter: 200 Tage gegen 250 Tage	P= 0,5467
Phasen gegeneinander	P= 0,8207
Alter gegen Phasen	P= 0,8327
A- und B-Spermatogonien Phase II	
Alter: 200 und 250 Tage	P= 0,1836
Spermatogonientypen A und B	P= 0,1638
Alter gegen Spermatogonientypen	P= 0,6042
Spermatogonien 50 und 100 Tage	
Alter: 50 Tage gegen 100 Tage	P= 0,3075
Positionen: zentral gegen basal	P< 0,0001
Positionen gegen Alter	P= 0,0029
T-Test unabhängiger Stichproben	
Sertolizellen 200 und 250 Tage	P= 0,5246
Spermatogonien 50 und 100 Tage	P= 0,2699
Sertolizellen 50 und 100 Tage	P= 0,0954

P > 0,05 nicht signifikant
P ≤ 0,05 schwach signifikant
P ≤ 0,01 signifikant
P ≤ 0,001 hoch signifikant

Abb.22: Wahrscheinlichkeitswerte der zweifaktoriellen Varianzanalyse und des T-Tests der den Progesteronrezeptor exprimierenden Prä-spermatogonien, Spermatogonien und Sertolizellen präpubertärer und geschlechtsreifer Eber in Abhängigkeit vom Alter der Tiere, der Position der Zellen und der Phasenverteilung

9.4 Nukleotidsequenzen des Progesteronrezeptors und des Östrogenrezeptors- α

Abb.23: Progesteronrezeptor Schwein

Primer:

PR- Vorwärts: 5'-**CCT AGC TCA CAG CGT TTC TAC C** -3

PR- Rückwärts: 5'-**CAT CCC TGC CAA TAT CTT GG** -3

Porcine Referenzsequenz für den Progesteronrezeptor:

**5'-CCT AGC TCA CAG CGT TTC TAC CAG CTT ACA AAA CTT CTT GAT
AAC TTG CAT GAT CTT GTC AAA CAA CTT CAT CTG TAC TGC TTG
AAT ACA TTT ATC CAG TCC CGG GCA CTG AGT GTT GAA TTT CCA
GAA ATG ATG TCT GAG GTT ATT GCT GCA CAA TTA CCC AAG ATA
TTG GCA GGG ATG-3'**

Sequenzierergebnis in 5'-3'-Richtung mit PR-Vorwärtsprimer:

Kontrollgewebe Endometrium Schwein: 99% Homologie

**5'[------]A AAA CTT
CTT GAT AAC TTG CAT GAT⁵⁴ TC⁵⁵TT GTC AAA CAA CTT CAT CTG
TAC TGC TTG AAT ACA TTT ATC CAG TCC CGG GCA CTG AGT GTT
GAA TTT CCA GAA ATG ATG TCT GAG GTT ATT GCT GCA CAA TTA
CCC AAG ATA TTG GCA GGG ATG-3'**

Testgewebe Eberhoden im Alter von 250 Tagen: 99% Homologie

**5'[------]T
GAT AAC TTG CAT GAT⁵⁴ TC⁵⁵TT GTC AAA CAA CTT CAT CTG TAC
TGC TTG AAT ACA TTT ATC CAG TCC CGG GCA CTG AGT GTT GAA
TTT CCA GAA ATG ATG TCT GAG GTT ATT GCT GCA CAA TTA CCC
AAG ATA TTG GCA GGG ATG-3'**

Fettgedruckt am Ende die Basenfolge des Rückwärts-Primers.

Anhang

Sequenzierungsergebnis mit PR-Rückwärtsprimer:

Kontrollgewebe Endometrium Schwein: 99% Homologie

CAG ACA TCA TTT CTG GAA ATT CAA CAC TCA GTG CCC GGG ACT
GTC TGT AGT AAA GAC CTT TAA GTT GTG AGT CAC GGG CCC TGA
GGA TAA ATG TAT TCA AGC AGT ACA GAT GAA GTT GTT TGA CAA
CCT ATT TAC ATA AGT TCG TCA TGT CTA CTT CAA CAA ACT GTT
GAT CAT GCA AGT TAT CAA GAA GTT TTG TAA GCT GGT AGA AAC
CTA GTA CGT TCA ATA GTT CTT CAA AAC ATT CGA CCA TCT TTG
GCT GTG AG **G** CTA GG
*CGA CAC T C **C** GAT CC*

Testgewebe Eberhoden im Alter von 250 Tagen: 100% Homologie

CAG ACA TCA TTT CTG GAA ATT CAA CAC TCA GTG CCC GGG ACT
GTC TGT AGT AAA GAC CTT TAA GTT GTG AGT CAC GGG CCC TGA
GGA TAA ATG TAT TCA AGC AGT ACA GAT GAA GTT GTT TGA CAA
CCT ATT TAC ATA AGT TCG TCA TGT CTA CTT CAA CAA ACT GTT
GAT CAT GCA AGT TAT CAA GAA GTT TTG TAA GCT GGT AGA AAC
CTA GTA CGT TCA TAT CAA GAA GTT TTG TAA GCT CCA TCT TTG
GCT GTG AGC TAG G
CGA CAC TCG ATC C

Obere Zeile original Basensequenz; kursiv: analoge Übersetzung der Basen.

Nicht sequenziert die Sequenz des Rückwärtsprimers

Abb.24: Östrogenrezeptor α Schwein:

Primer:

ER α - Vorwärts: 5'-GAG ATC CTG ATG ATT GGT CT -3'

ER α - Rückwärts: 5'-CAT CTC CAG CAG CAG GTC AT -3'

Porcine Referenzsequenz für den Östrogenrezeptor- α :

5'- TGG ATC CTG ATG ATT GGT CTT GTC TGG CGC TCC ATG GAG CAC
CCA GGG AAG CTC CTG TTT GCT CCT AAC TTG CTC CTG GAC AGG AAC
CAG GGC AAG TGT GTC GAG GGA ATG GTG GAG ATC TTT GAC ATG TTG
CTG GCT ACA TCA TCT CGC TTC CGT ATG ATG AAT CTC CAG GGA GAG
GAG TTT GTG TGC CTC AAA TCC ATC ATT TTG CTT AAT TCT GGA GTG
TAC ACG TTT CTG TCC AGC ACC CTG AAG TCT CTG GAA GAG AAG GAC
CAT ATC CAC CGT GTC CTG GAC AAG ATC ACA GAC ACC TTG ATC CAC
CTG ATG GCC AAA GCG GGC CTG ACT CTG CAG CAG CAG CAC CGG CGT
CTC GCG CAG CTC CTC CTC ATC CTG TCT CAC TTC AGG CAC ATG AGT
AAC AAA GGC ATG GAG CAT CTG TAC AAC ATGA AGT GCA AGA ACG
TGG TGC CCC TCT **ATG ACC TGC TGC TGG AGA TG -3'**

Sequenzierergebnis in 5'-3'-Richtung mit ER α -Vorwärtsprimer:

Kontrollgewebe Endometrium Schwein: Homologie 99%

5'- TGT CTG GCG CTC CAT GGA GCA CCC AGG GAA GCT CCT GTT TGC
TCC TAA CTT GCT CCT GGA CAG GAA CCA GGG CAA GTG TGT CGA GGG
AAT GGT GGA GAT CTT TGA CAT GTT GCT GGC TAC ATC **AG¹²⁵** T CTC
GCT TCC GTA TGA TGA ATC TCC AGG GAG AGG AGT TTG TGT GCC TCA
AAT CCA TCA TTT TGC TTA ATT CTG GAG TGT ACA CGT TTC TGT CCA
GCA CCC TGA AGT CTC TGG AAG AGA AGG ACC ATA TCC ACC GTG TCC
TGG ACA AGA TCA CAG ACA CCT TGA TCC ACC TGA TGG CCA AAG CGG
GCC TGA CTC TGC AGC AGC AGC ACC GGC GTC TCG CGC AGC TCC TCC
TCA TCC TGT CTC ACT TCA GGC ACA TGA GTA ACA AAG GCA TGG AGC
ATC TGT ACA ACA TGA AGT GCA AGA ACG TGG TGC CCC TCT ATG ACC
TGC TGC TGG **AA⁴⁵⁵G ATG-3'**

Testgewebe Eberhoden im Alter von 50 Tagen: Homologie 98%

5'- TG^G³ TCT GGC GCT C (--) TG GT¹⁷G T¹⁹AC CCA GGG AA^A²⁰GCT CCT GTT
TG^T³² CCT AAC TTG CTC CTG GA^A⁵¹ CAG GAA CCA GG^T⁶³ GCA AGT T⁷⁰GT
GTC GAG GT⁸⁰G AAT GGT GGA GAT CTT TGA CAT GTT GCT GGC TAC ATC
AG¹¹⁹T CTC GCT TCC GTA TGA TGA ATC TCC AGG GAG AGG AGT TTG
TGT GCC TCA AAT CCA TCA TTT TGC TTA ATT CTG GAG TGT ACA CGT
TTC TGT CCA GCA CCC TGA AGT CTC TGG AAG AGA AGG ACC ATA TCC
ACC GTG TCC TGG ACA AGA TCA CAG ACA CCT TGA TCC ACC TGA TGG
CCA AAG CGG GCC TGA CTC TGC AGC AGC AGC ACC GGC GTC TCG CGC
AGC TCC TCC TCA TCC TGT CTC ACT TCA GGC ACA TGA GTA ACA AAG
GCA TGG AGC ATC TGT ACA ACA TGA AGT GCA AGA ACG TGG TGC CCC
TCT ATG ACC TGC TGC TGG AA^A⁴⁴⁹G ATG -3'

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zu allererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann für die Überlassung des Themas sowie der Unterstützung und Förderung bei der Planung, Durchführung und Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Bei Herrn PD Dr. Schuler möchte ich mich für seinen immer gewährten Rat und seine Hilfe bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. Riesenbeck für die Betreuung während der Durchführung der experimentellen Arbeiten bedanken.

Mein Dank gilt auch allen Doktoranden und Kollegen im Haus, die mich immer mit Rat und Tat unterstützt haben.

Ich möchte mich auch bei dem Institut für Veterinäranatomie der Justus-Liebig-Universität für die technische Unterstützung bei der Versuchsdurchführung, sowie Herrn Prof. Dr. Bergmann und Herrn PD Dr. Steeger für ihren Rat bedanken.

Den Mitarbeitern der Lehr-und Forschungsstation Oberer Hardthof der Justus-Liebig-Universität Giessen möchte ich mich für die Zusammenarbeit bei der Beschaffung der Eber und der Probengewinnung bedanken.

Den Mitarbeitern der Abteilung für Biomathematik und Datenverarbeitung, insbesondere Herrn Dr. Failing, danke ich für ihre Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Zum Schluß gilt mein Dank meinen Eltern und meinen Freunden, die mich immer wieder unterstützt und motiviert haben.

Mein besonderer Dank gilt auch der H. Wilhelm Schaumann-Stiftung, die die Durchführung dieser Arbeit durch Gewährung eines Stipendiums sowie von Sachmitteln erst möglich gemacht hat.