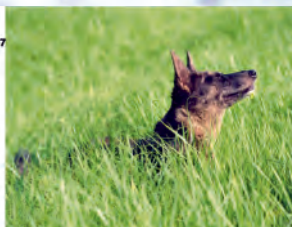
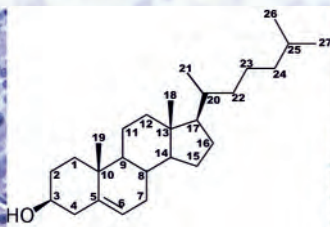
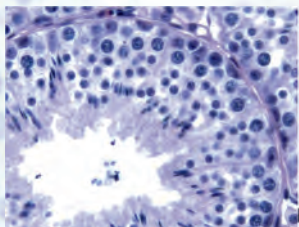


Michaela Gentil

Wiedereinsetzen
der Steroidbiosynthese
nach Downregulation der
Hodenfunktion beim Rüden:
Expression von StAR-Protein,
P450scc und P450c17



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

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation
in der Deutschen Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2012

© 2012 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**, Gießen
Printed in Germany

ISBN 978-3-86345-097-7

Verlag: DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17
35392 Gießen
0641/24466
geschaeftsstelle@dvg.net
www.dvg.net

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

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

**Wiedereinsetzen der Steroidbiosynthese
nach Downregulation der Hodenfunktion beim Rüden:
Expression von StAR-Protein, P450scc und P450c17**

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

eingereicht von
Michaela Gentil geb. Schulz
Tierärztin aus Dettelbach

Gießen 2012

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

Dekan:

Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. Dr. h.c. Bernd Hoffmann

Prof. Dr. Ernst Petzinger

Tag der Disputation: 20. Juni 2012

Meinen Eltern
in Liebe und Dankbarkeit

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

Michaela Gentil

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse wurden zum Teil in folgenden Publikationen veröffentlicht bzw. zur Publikation eingereicht:

GOERICKE-PESCH, S.; SPANG, A.; **SCHULZ, M.**; ÖZALP, G.;
BERGMANN, M.; LUDWIG, C. und HOFFMANN, B. (2009):
Recrudescence of spermatogenesis in the dog following
downregulation using a slow release GnRH agonist implant.
Reproduction in domestic animals 44, Supplement 2, 302–308

SCHULZ, M.; GOERICKE-PESCH, S.; SPANG, A. und HOFFMANN, B. (2009):
Expression of StAR-protein and P450scc during recrudescence of
spermatogenesis in the dog following downregulation with a GnRH-implant.
Reproduction in domestic animals 44, Supplement 1, 33–34

SCHULZ, M.; SPANG, A.; GOERICKE-PESCH, S. und HOFFMANN, B. (2010):
Restart of steroid-biosynthesis during recrudescence of spermatogenesis
following downregulation of testicular function in the dog.
Reproduction in domestic animals 45, Supplement 1, 50

GENTIL, M.; HOFFMANN, B.; SPANG, A.; FAILING, K.
und GOERICKE-PESCH, S. (2012):
Restart of steroidogenesis in the dog during recrudescence of testicular
function following downregulation with a GnRH agonist implant.
Cell and tissue research (eingereicht)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	9
2 Literaturübersicht	11
2.1 Neuroendokrine Regulation der Hodenfunktion	11
2.1.1 Gonadotropin-releasing Hormon	11
2.1.2 Follikel-stimulierendes Hormon und Luteinisierendes Hormon	13
2.1.3 Inhibin, Aktivin und Follistatin	15
2.1.4 Gonadale Steroidhormone	18
2.1.5 Androgen-bindendes Protein	21
2.2 Möglichkeiten zur Blockierung der Hodenfunktion beim Hund	23
2.2.1 Immunisierung gegen GnRH	23
2.2.2 Immunisierung gegen Gonadotropine	26
2.2.3 Einsatz von GnRH-Analoga	27
2.2.4 Anwendung von Gestagenen	31
2.2.5 Anwendung von Östrogenen	32
2.2.6 Anwendung von Androgenen	33
2.2.7 Gabe von 5 α -Reduktase-Hemmer	34
2.2.8 Verabreichung von Androgenrezeptor-Blockern	35
2.2.9 Verabreichung von Östrogenrezeptor-Blockern	36
2.2.10 Schlussfolgerungen für die eigenen Untersuchungen	36
2.3 Testikuläre Steroidbiosynthese	37
2.3.1 Ausgangssubstrat Cholesterol	37
2.3.2 P450 _{scc} und Transduceosom	40
2.3.3 P450 _{c17} und 3 β HSD	45
2.3.4 17 β HSD	48
2.3.5 Möglichkeiten der Metabolisierung von Testosteron	48
2.3.6 Regulation der Steroidbiosynthese	49
3 Material und Methoden	53
3.1 Versuchsdesign	53

3.2	Tierversuchsantrag	54
3.3	Einteilung der Hunde in Gruppen und Zuordnung zu Kollektiv 1 und 2 .	54
3.4	Probengewinnung und -konservierung	57
3.5	Hormonanalytik	58
3.5.1	Bestimmung von Testosteron im Blutplasma	58
3.5.2	Bestimmung von LH im Blutplasma	58
3.5.3	Bestimmung von FSH im Blutplasma	59
3.6	Ausmessung der Fläche der Leydigzellkerne	59
3.6.1	Vorbereitung der Gewebeschnitte	59
3.6.2	Hämatoxylin-Eosin (HE) - Färbeprotokoll	59
3.6.3	Messung der Zellkerne	60
3.7	Western Blot zur Überprüfung der Spezifität der in der Immunhistochemie eingesetzten Primärantikörper	62
3.7.1	Herstellung von Gesamtproteinextrakten aus Gewebe	62
3.7.2	Isolierung von Mitochondrien aus Gewebe	62
3.7.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	63
3.7.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	64
3.7.5	Elektroblotting	65
3.7.6	Überprüfung des Proteintransfers mittels Ponceau-S-Färbung . .	66
3.7.7	Nachweisreaktion	66
3.8	Immunhistochemischer Nachweis von StAR-Protein, P450scc und P450c17	68
3.8.1	Vorbereitung der Gewebeschnitte	68
3.8.2	Immunhistochemisches Färbeprotokoll	68
3.8.3	Auswertung der Immunhistochemie	70
3.9	Qualitativer Nachweis von Zielgen-mRNA mittels RT-PCR	75
3.9.1	RNA-Isolierung aus Gewebe	75
3.9.2	Bestimmung der RNA-Konzentration	75
3.9.3	DNase-Behandlung	76
3.9.4	Reverse Transkription (RT)	77
3.9.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	78
3.9.6	Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte	80
3.9.7	Isolierung und Sequenzierung von PCR-Produkten	80
3.10	Bestimmung der relativen mRNA-Expression mittels RT-qPCR	81
3.10.1	Vorbereitung der Proben	81
3.10.2	Vorbereitung der Primer-Sonden-Systeme	81
3.10.3	Prinzip der RT-qPCR mit Hydrolyse-Sonden	82
3.10.4	Durchführung der RT-qPCR	83
3.10.5	Ermittlung der Effizienz der PCR-Reaktion	85
3.10.6	Auswertung der RT-qPCR-Ergebnisse	87
3.11	Statistische Auswertung	87

4	Ergebnisse	89
4.1	Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse	89
4.2	Hormonanalytik	89
4.2.1	Bestimmung von Testosteron im Blutplasma	91
4.2.2	Bestimmung von LH im Blutplasma	91
4.2.3	Bestimmung von FSH im Blutplasma	93
4.3	Ausmessung der Fläche der Leydigzellkerne	96
4.4	Prozentuale Verteilung der Kompartimente im Hodengewebe	98
4.5	StAR-Protein	100
4.5.1	Expression auf Protein-Ebene	100
4.5.2	Expression auf mRNA-Ebene	107
4.6	P450scc	109
4.6.1	Expression auf Protein-Ebene	109
4.6.2	Expression auf mRNA-Ebene	116
4.7	P450c17	118
4.7.1	Expression auf Protein-Ebene	118
4.7.2	Expression auf mRNA-Ebene	125
5	Diskussion	127
5.1	Diskussion der Methodik	127
5.2	Diskussion der Ergebnisse	133
6	Zusammenfassung	141
7	Summary	143
8	Literaturverzeichnis	145
Anhang		161
A.1	Eingesetzte Chemikalien	161
A.2	Verbrauchsmaterialien	165
A.3	Verwendete Geräte	167
A.4	Software	169
A.5	Puffer und Lösungen	170
A.5.1	Probengewinnung und -konservierung	170
A.5.2	HE-Färbung und Immunhistochemie	170
A.5.3	Protein-Extraktion und Western Blot	172
A.5.4	RNA-Isolierung und PCR	176

Abbildungsverzeichnis

1	Neuroendokrine Regulation der Hodenfunktion	22
2	Strukturformel von Cholesterol	38
3	Transduceosom-Komplex	41
4	Schematische Darstellung der testikulären Steroidbiosynthese	51
5	Entwicklungsstadien der Rekrudescenz der Spermatogenese	55
6	Beispielhafte Darstellung der Vermessung der Leydigzellkerne	61
7	Beispielhafte Darstellung der Vermessung der Tubulusfläche	72
8	Beispielhafte Darstellung der Bearbeitung eines Bildes mit „ImageTool“	74
9	Regressionsgeraden zur Ermittlung der PCR-Effizienz	86
10	Testosteron-Konzentration im Blutplasma in ng/ml	92
11	LH-Konzentration im Blutplasma in ng/ml	94
12	FSH-Konzentration im Blutplasma in ng/ml	95
13	Fläche A der Leydigzellkerne in μm^2	97
14	Verteilung der Kompartimente im Hodengewebe	99
15	Western Blot StAR-Protein	100
16	IHC StAR-Protein, Grauwert der immunopositiven Pixel	102
17	IHC StAR-Protein, Flächenanteil der immunopositiven Bezirke	103
18	Immunhistochemischer Nachweis des StAR-Proteins	104
19	Qualitativer Nachweis von StAR-Protein-mRNA mittels RT-PCR	107
20	Relative Expression der StAR-Protein-mRNA (ratio)	108
21	Western Blot P450scc	109
22	IHC P450scc, Grauwert der immunopositiven Pixel	111
23	IHC P450scc, Flächenanteil der immunopositiven Bezirke	112
24	Immunhistochemischer Nachweis von P450scc	113
25	Qualitativer Nachweis von P450scc-mRNA mittels RT-PCR	116
26	Relative Expression der P450scc-mRNA (ratio)	117
27	Western Blot P450c17	118
28	IHC P450c17, Grauwert der immunopositiven Pixel	120
29	IHC P450c17, Flächenanteil der immunopositiven Bezirke	121
30	Immunhistochemischer Nachweis von P450c17	122
31	Qualitativer Nachweis von P450c17-mRNA mittels RT-PCR	125
32	Relative Expression der P450c17-mRNA (ratio)	126

Tabellenverzeichnis

1	Zuordnung der Hunde zu den Kastrationszeitpunkten	56
2	Gruppeneinteilung der Hunde	56
3	Zusammensetzung des DNase-Mixes	76
4	Zusammensetzung des RT-Mixes	77
5	Zusammensetzung des PCR-Mixes	78
6	In der qualitativen RT-PCR verwendete Primer	79
7	In der RT-qPCR verwendete Primer und Hydrolyse-Sonden	84
8	Zusammensetzung des RT-qPCR-Mixes	85
9	Ergebnisse der Verdünnungsreihe zur Bestimmung der PCR-Effizienz . .	86
10	Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse	90
11	Testosteron-Konzentration im Blutplasma in ng/ml	92
12	LH-Konzentration im Blutplasma in ng/ml	94
13	FSH-Konzentration im Blutplasma in ng/ml	95
14	Fläche A der Leydigzellkerne in μm^2	97
15	Verteilung der Kompartimente im Hodengewebe	99
16	IHC StAR-Protein, Grauwert der immunopositiven Pixel	102
17	IHC StAR-Protein, Flächenanteil der immunopositiven Bezirke	103
18	Relative Expression der StAR-Protein-mRNA (ratio)	108
19	IHC P450scc, Grauwert der immunopositiven Pixel	111
20	IHC P450scc, Flächenanteil der immunopositiven Bezirke	112
21	Relative Expression der P450scc-mRNA (ratio)	117
22	IHC P450c17, Grauwert der immunopositiven Pixel	120
23	IHC P450c17, Flächenanteil der immunopositiven Bezirke	121
24	Relative Expression der P450c17-mRNA (ratio)	126

Abkürzungsverzeichnis

A	Fläche
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ABP	androgen-binding protein
ACAT	Acyl-Coenzyme A Cholesterol-Acyltransferase
ACBD1	Acyl-Coenzyme A Binding Domain containing 1
ACBD3	Acyl-Coenzyme A Binding Domain containing 3
ANT	Adenine Nucleotide Transporter
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AR	Androgen-Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
3 β HSD	3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -Isomerase
17 β HSD	17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BPH	benigne Prostatahyperplasie
BSA	bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CG	control group
C_q	quantification cycle
CRAC-Domain	Cholesterol Recognition Amino acid Consensus-Domain
DBI	Diazepam Binding Inhibitor
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DES	Diethylstilbestrol
DG	developmental group
d. h.	das heißt
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHT	Dihydrotestosteron
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E</i>	Effizienz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	Enzym-Immuno-Assay
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay

ER	Östrogen-Rezeptor
EU	Europäische Union
6-FAM	6-Carboxy-Fluorescein
for	forward primer
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
HDL	high density Lipoproteine
HE	Hämatoxylin-Eosin
HSL	Hormon-sensitive Lipase
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IMM	inner mitochondrial membran
IMS	intermembrane space
inkl.	inklusive
JG	juvenile group
kDa	Kilodalton
LDL	low density Lipoproteine
LH	Luteinisierendes Hormon
max.	maximal
min.	minimal
MPA	Medroxyprogesteronacetat
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
n. s.	nicht signifikant
NTC	no template control
o. g.	oben genannt
OMM	outer mitochondrial membran
P450arom	Cytochrom P450 Aromatase
P450c17	Cytochrom P450 17 α -Hydroxylase/17,20-Lyase
P450scc	Cytochrom P450 side chain cleavage
PAP7	PBR-associated Protein 7
PBR	Peripheral-type Benzodiazepine Receptor
PBS-Puffer	phosphatgepufferte Salzlösung
PBST-Puffer	PBS-Puffer mit Tween®20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PG	Profact group
PKA	Proteinkinase A
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion
rev	reverse primer

RIA	Radio-Immuno-Assay
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Reverse Transkription
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SF	Streufaktor
sog.	sogenannt
SR-BI	Scavenger Receptors class B type I
SREBP	Sterol Response Element Binding Proteins
StAR-Protein	Steroidogenic Acute Regulatory Protein
START-Domain	StAR-related lipid Transfer-Domain
T	Testosteron
T_A	Annealing-Temperatur
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin
TBE-Puffer	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TSH	Thyreidea-stimulierendes Hormon
TSPO	Translocator Protein
U	Unit
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
v. a.	vor allem
VDAC	Voltage-Dependent Anion Channel
vgl.	vergleiche
$\bar{x}$	arithmetischer Mittelwert
$\bar{x}_g$	geometrischer Mittelwert
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
z. T.	zum Teil

1 Einleitung

Der Hoden hat zwei wichtige, sich gegenseitig ergänzende Funktionen: Die Produktion von Samenzellen (Spermatogenese) und die Synthese von Steroidhormonen (Steroidbiosynthese), insbesondere von Testosteron (AMANN, 1986; MCLACHLAN et al., 1996; AMORY und BREMNER, 2001; PINEDA, 2003). Diese beiden Funktionen sind nach bisherigem Kenntnisstand eng miteinander verknüpft, aber räumlich getrennt (AMANN, 1986): Die Spermatogenese findet in den Tubuli seminiferi contorti statt (AMANN, 1986; KERR et al., 2006); dort befinden sich neben den verschiedenen Keimzell-Stadien (Spermatogonien, Spermatozyten, Spermatiden) die Sertoli-Zellen, die wichtige Nähr- und Stützfunktionen für die Keimzellen aufweisen (SETCHELL und BREED, 2006) und die Blut-Hodenschranke ausbilden (AMANN, 1986). Das interstitielle Kompartiment zwischen den Tubuli seminiferi contorti enthält Blut- und Lymphgefäße, Nerven, Zellen der Immunabwehr (u. a. Makrophagen) sowie Leydigzellen (SAEZ, 1994; KERR et al., 2006). In den Leydigzellen findet die Steroidbiosynthese statt (AMANN, 1986; STOCCO, 1996; PINEDA, 2003).

Die grundlegenden Prinzipien der beiden Hodenfunktionen beim Säugetier sind heute hinreichend bekannt, die zugrunde liegenden Mechanismen ihrer Regulation dagegen sind komplex und noch nicht vollständig erforscht.

Vorversuche haben gezeigt, dass beim Rüden mittels GnRH-Implantat eine Downregulation der Spermatogenese und Steroidbiosynthese erzielt werden kann, die nach Entfernung bzw. Wirkverlust des Implantats reversibel ist, d. h. es kommt zu einem erneuten Ingangkommen der Hodenfunktion (u. a. VICKERY et al., 1984; RIESENBECK et al., 2002; LUDWIG et al., 2009). Das Modell des „downregulierten Rüden“ bietet sich daher an, durch gezielte Verfolgung dieses Ingangkommens neue Erkenntnisse zur Steuerung der Hodenfunktion zu erhalten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Wiedereinsetzen der Steroidbiosynthese im Verlauf der Rekrudescenz der Spermatogenese nach Downregulation der Hodenfunktion näher zu charakterisieren. Neben einer morphologischen Charakterisierung der Leydigzellen und der Bestimmung des Flächenanteils des Interstitiums auf histologischer

Ebene erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten der Rekrudescenz der Spermatogenese der Nachweis der Expression der „Cytochrom P450 side chain cleavage“ (P450scc) und der „Cytochrom P450 17 α -Hydroxylase/17,20-Lyase“ (P450c17), beides Enzyme der Steroidbiosynthese, sowie des „Steroidogenic Acute Regulatory-Proteins“ (StAR-Protein) auf mRNA-Ebene mittels qualitativer und quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die Expression auf Proteinebene und die zelluläre Lokalisation dieser Proteine wurden mittels Immunhistochemie (IHC) erfasst. Parallel dazu wurde die Konzentration von Testosteron, Luteinisierendem Hormon (LH) und Follikel-stimulierendem Hormon (FSH) im peripheren Blut gemessen.

2 Literaturübersicht

2.1 Neuroendokrine Regulation der Hodenfunktion

Die beiden Funktionen des Hodens – Spermatogenese und Steroidbiosynthese – werden endokrin über das zentrale Nervensystem in Form von Feedback-Mechanismen gesteuert; Schlüsselhormone sind dabei die beiden Gonadotropine Follikel-stimulierendes Hormon (FSH) und Luteinisierendes Hormon (LH). Diese stehen unter der Kontrolle des Gonadotropin-releasing Hormons (GnRH) (SCHALLY et al., 1971, 1973; CONN et al., 1984; AMORY und BREMNER, 2001; MCLACHLAN et al., 2002). Zielzellen von LH sind in erster Linie die Leydigzellen im Interstitium, in denen die Steroidbiosynthese vorwiegend stattfindet. FSH dagegen wirkt hauptsächlich auf Sertoli- und Keimzellen und fördert die Spermatogenese (STEINBERGER, 1971; AMORY und BREMNER, 2001). Daneben wird die Hodenfunktion aber auch von einer großen Zahl auto- und parakriner Faktoren gesteuert. Diese endokrinen, parakrinen und autokrinen Faktoren regulieren sich gegenseitig direkt oder indirekt (YING, 1989; HULEIHEL und LUNENFELD, 2004).

2.1.1 Gonadotropin-releasing Hormon (GnRH)

Das Gonadotropin-releasing Hormon (GnRH) ist ein Dekapeptid (SCHALLY et al., 1971). Aufgrund des schnellen Abbaus durch Proteasen beträgt seine Halbwertszeit im Organismus lediglich 2-5 Minuten (GORDON und HODGEN, 1992; CONN und CROWLEY, 1994; GOBELLO, 2007). Bisher wurden 23 verschiedene GnRH-Isoformen bei wirbellosen Spezies und Wirbeltieren nachgewiesen. Die Sequenz des NH₂-terminalen und COOH-terminalen Endes ist mit wenigen Ausnahmen über alle Isoformen konserviert, was die Vermutung nahelegt, dass diesen Abschnitten eine entscheidende funktionelle Rolle zukommt (MILLAR, 2005). Das NH₂-terminale Ende ist an Rezeptorbindung und -aktivierung beteiligt, während das COOH-terminale Ende nur für die Rezeptorbindung relevant ist (SCHALLY und COMARU-SCHALLY, 1980; MILLAR, 2005).

Nach heutigen Erkenntnissen stellt sich bei Säugetieren die Situation hinsichtlich der GnRH-Isoformen wie folgt dar: GnRH I reguliert in erster Linie die Sekretion von

Gonadotropinen über die Hypothalamus-Hypophysenachse, während GnRH II und GnRH III das Sexualverhalten stimulieren. Aufgrund der großen Verbreitung im zentralen und peripheren Nervensystem scheint GnRH II ein Neurotransmitter/-modulator zu sein (CHEN et al., 1998; HERBST, 2003; MILLAR, 2003, 2005; CHEUNG und WONG, 2008). CHEN et al. (1998) konnten größere Mengen GnRH II bei Ratten, Mäusen und Menschen v. a. im Mittelhirn und im Hypophysenstiel nachweisen. Aber auch außerhalb des Gehirns, z. B. in Niere, Knochenmark und Prostata ist GnRH II vorhanden (CHEUNG und WONG, 2008). Laut RAMAKRISHNAPPA et al. (2005) ist GnRH II sogar hauptsächlich in anderen Geweben, auch im Reproduktionstrakt, exprimiert. YAHALOM et al. (1999) beschreiben das Vorkommen von GnRH III, welches strukturell eine hohe Homologie zu einer zuerst bei Lachsen nachgewiesenen Isoform (sGnRH) aufweist, im Mittelhirn und Hypothalamus von Kälbern, Ratten und Menschen. Die exakte physiologische Rolle von GnRH II und III ist noch unklar (YAHALOM et al., 1999; NAZ et al., 2005; CHEUNG und WONG, 2008).

GnRH I wird von spezialisierten Neuronen des Hypothalamus gebildet und in Granula gespeichert. Die Ausschüttung aus den Nervenenden in das hypophysäre Pfortadersystem erfolgt in synchronisierten Pulsen und stimuliert, nach Bindung an spezifische GnRH-Rezeptoren, die Biosynthese und Sekretion von FSH und LH im Hypophysenvorderlappen (SCHALLY et al., 1971, 1973; CONN et al., 1984; HERBST, 2003; MILLAR, 2005).

Die Resonanz der Hypophyse auf GnRH ist abhängig von der Frequenz und Amplitude der pulsatilen GnRH-Ausschüttung. GnRH in niedrigen, physiologischen Konzentrationen induziert in der Hypophyse seine eigenen Rezeptoren. Ist die Hypophyse allerdings kontinuierlich hohen Konzentration von GnRH ausgesetzt, kommt es zu einer Desensibilisierung der Hypophyse durch GnRH-Rezeptorverlust und damit Reduzierung der hypophysären Gonadotropin-Produktion und -Ausschüttung (BELCHETZ et al., 1978; CLAYTON, 1982; CONN et al., 1984; MURASE et al., 2005)

Die genannten Isoformen unterscheiden sich lediglich in 3 bzw. 2 Aminosäuren:

GnRH I: pGlu-His-Trp-Ser-**Tyr**-Gly-**Leu**-**Arg**-Pro-Gly-NH₂ (MATSUO et al., 1971)

GnRH II: pGlu-His-Trp-Ser-**His**-Gly-**Trp**-**Tyr**-Pro-Gly-NH₂ (MIYAMOTO et al., 1984)

sGnRH: pGlu-His-Trp-Ser-**Tyr**-Gly-**Trp**-**Leu**-Pro-Gly-NH₂ (YAHALOM et al., 1999)

GnRH-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (MILLAR, 2005). Diese bestehen aus 7 hydrophoben Transmembran-Domänen, die über 3 extrazelluläre und 3 intrazelluläre Loops verbunden sind, und einem langen extrazellulären N-terminalen Ende (MILLAR, 2005; MEDURI et al., 2008). Bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sind

die extrazellulären Bereiche und oberflächlichen Anteile der Transmembran-Domänen bei der Bindung von Peptidhormonen, wie z. B. GnRH, beteiligt. Die Transmembran-Domänen sind durch Änderung der Konformation an der Rezeptor-Aktivierung involviert, während die intrazellulären Bereiche mit G-Proteinen und anderen Proteinen interagieren, die für die intrazelluläre Signal-Transduktion verantwortlich sind (MILLAR, 2005).

Entsprechend den verschiedenen GnRH-Isoformen gibt es unterschiedliche GnRH-Rezeptoren, wobei Kreuzreaktionen zwischen den Liganden und den Rezeptoren nachgewiesen sind (YAHALOM et al., 1999; MILLAR, 2003, 2005). Die Aminosäuresequenz des Typ I GnRH-Rezeptors ist bei Mensch, Ratte, Schaf, Rind und Schwein zu 80 % identisch (MILLAR, 2005). Auch in Geweben außerhalb der Hypophyse, z. B. in Gonaden, Plazenta und Prostata, konnten Typ I GnRH-Rezeptoren gefunden werden (HSUEH und JONES, 1983; CONN et al., 1984; CHEUNG und WONG, 2008), allerdings ist dort die Rezeptor-Expression im Vergleich zur Hypophyse niedrig (CHEUNG und WONG, 2008).

Die Expression von Typ II GnRH-Rezeptor-mRNA ist in vielen Geweben vorhanden. Ein voll-funktionsfähiger Typ II GnRH-Rezeptor konnte bisher jedoch bei Mensch, Rind, Pferd, Schaf, Ratte und Maus nicht nachgewiesen werden, während er bei verschiedenen Affenarten und beim Schwein vorhanden ist (HERBST, 2003; MILLAR, 2005; CHEUNG und WONG, 2008). Er ist hoch selektiv für GnRH II (RAMAKRISHNAPPA et al., 2005). Im Gegensatz dazu kann GnRH II aber auch mit hoher Affinität an Typ I GnRH-Rezeptoren binden. Die dabei induzierte Signalkaskade unterscheidet sich merklich im Vergleich zur Bindung von GnRH I. Dieses Phänomen wird als „ligand-induced-selective-signalling“ bezeichnet (HERBST, 2003; MILLAR, 2005). Zu einem geringen Prozentsatz kann GnRH II dadurch auch die Gonadotropin-Ausschüttung stimulieren, allerdings scheint das nicht die primäre Funktion von GnRH II zu sein (CHEUNG und WONG, 2008). Da Typ II GnRH-Rezeptoren im Gehirn in Bereichen nachgewiesen wurden, die das Sexualverhalten beeinflussen, wird GnRH II eine entsprechende Rolle zugeschrieben (RAMAKRISHNAPPA et al., 2005).

2.1.2 Follikel-stimulierendes Hormon (FSH) und Luteinisierendes Hormon (LH)

Den Gonadotropinen FSH und LH kommen bei der Steuerung der Spermatogenese und der testikulären Steroidbiosynthese eine essentielle Bedeutung zu (CONN et al., 1984; CONN und CROWLEY, 1994; HERBST, 2003). Beide sind notwendig, um eine quantitativ normale Spermatogenese aufrechtzuerhalten (MCLACHLAN et al., 1988).

FSH und LH werden in den gonadotrophen Zellen des Hypophysenvorderlappens gebildet und in unterschiedliche sekretorische Granula verpackt (PADMANABHAN et al., 2002). Die Ausschüttung in den peripheren Blutkreislauf kann unabhängig voneinander erfolgen (SCHAMS et al., 1974; PADMANABHAN et al., 2002), zugrunde liegen verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege (PADMANABHAN et al., 2002).

Beide sind Glykoprotein-Hormone, die aus einer Gonadotropin α -Untereinheit, die bei beiden Hormonen identisch ist, und einer differierenden β -Untereinheit (LH β , FSH β) bestehen (GRAY, 1988; CONN und CROWLEY, 1994; CHIBA et al., 1997; PADMANABHAN et al., 2002; WALKER und CHENG, 2005). Die Heterodimer-Struktur ist zwar für die Rezeptorbindung notwendig, die spezifische Aktivität des jeweiligen Hormons wird aber durch die β -Untereinheit festgelegt (GRAY, 1988; CHIBA et al., 1997). Aufgrund unterschiedlicher Glykosylierung entstehen verschiedene FSH-Isoformen mit unterschiedlicher biologischer Halbwertszeit (PADMANABHAN et al., 2002).

FSH stimuliert das Größenwachstum der Tubuli seminiferi contorti während der Entwicklung des Hodens und ist essentiell für die Initiation der Spermatogenese während der Pubertät. Beim adulten Individuum ist FSH erforderlich, um eine quantitativ normale Spermatogenese aufrechtzuerhalten (AMORY und BREMNER, 2001; McLACHLAN et al., 2002; KUTZLER und WOOD, 2006). Dies geschieht durch den positiven Einfluss von FSH auf die Anzahl/Teilung der Spermatogonien und die Reifung der Spermatozyten (McLACHLAN et al., 1996). Außerdem unterstützt FSH die Sertoli-Zell-Proliferation im präpubertären Hoden (STEINBERGER, 1971; McLACHLAN et al., 2002; WALKER und CHENG, 2005; ABEL et al., 2008) und damit indirekt die Keimzell-Proliferation, da jede Sertoli-Zelle nur eine begrenzte Anzahl an Keimzellen versorgen kann (HULEIHEL und LUNENFELD, 2004; ABEL et al., 2008). Allerdings ist die Verfügbarkeit von FSH keine absolute Voraussetzung für Fertilität, da Individuen, denen FSH oder FSH-Rezeptoren fehlen, zwar eine verminderte Sertoli- und Keimzellanzahl aufweisen, aber fertil sind (AMORY und BREMNER, 2001; ABEL et al., 2008; MEDURI et al., 2008). Darüber hinaus agiert FSH indirekt über die Sertoli-Zellen als regulierender Faktor für die Leydigzell-Entwicklung und -funktion (SAEZ, 1994; O'SHAUGHNESSY et al., 2005).

LH stimuliert in erster Linie die Steroidbiosynthese in den Leydigzellen (STEINBERGER, 1971; SAEZ, 1994; WALKER und CHENG, 2005; KUTZLER und WOOD, 2006), hat allerdings auch einen gewissen stimulierenden Effekt auf die Sertoli-Zellen und die Spermatogenese. Dieser ist wahrscheinlich vermittelt über einen Anstieg des intratestikulären Testosteron-Gehalts (AMORY und BREMNER, 2001; PINEDA, 2003). LH ist absolut

notwendig für die Erhaltung Leydigzell-spezifischer Strukturen und Funktionen (SAEZ, 1994), wobei schon sehr geringe Mengen LH in den Leydigzellen zu einer steroidogenen Aktivität führen (SETCHELL et al., 2002).

Verschiedene Regulationsmechanismen sind für die Produktion und Ausschüttung von LH und v. a. FSH maßgeblich. Dazu zählen sowohl Faktoren, die im Hypothalamus und in den Gonaden ausgeschüttet werden, als auch solche, die lokal in der Hypophyse gebildet werden (PADMANABHAN et al., 2002).

Der wichtigste hypothalamische Regelfaktor ist das GnRH, dem eine pulsatile Ausschüttung zugrunde liegt (vgl. Abschnitt 2.1.1). Die Ausschüttung des in der Hypophyse gespeicherten LH ist direkt an die Freisetzung von GnRH gekoppelt. Die FSH-Sekretion ist dagegen komplexer reguliert. FSH wird eher kontinuierlich ausgeschüttet und seine Sekretionsrate ist daher auch abhängig von der Biosyntheserate (PADMANABHAN et al., 2002; HERBST, 2003; MILLAR, 2005; GOBELLO, 2007). Außerdem hat FSH eine deutlich längere Halbwertszeit als LH; auch deshalb sind die FSH-Pulse im peripheren Blut weniger deutlich erkennbar als die von LH (AMANN, 1986; PADMANABHAN et al., 2002).

Zu den in den Gonaden sezernierten Faktoren zählen die gonadalen Steroidhormone sowie die Proteine Inhibin, Aktivin und Follistatin. Letztere werden z. T. auch lokal in der Hypophyse gebildet und wirken dort parakrin bzw. autokrin (PADMANABHAN et al., 2002). Auf diese Faktoren wird in den entsprechenden Abschnitten im Detail eingegangen.

Beide Gonadotropine unterliegen einem Proteinhoron-Rezeptor-Mechanismus. FSH- und LH-Rezeptoren sind hormonspezifische, G-Protein-gekoppelte, membranständige Rezeptoren (vgl. Abschnitt 2.1.1) (REICHERT und DATTATREYAMURTY, 1989; AMORY und BREMNER, 2001; McLACHLAN et al., 2002).

Im Hoden sind FSH-Rezeptoren in Sertoli-Zellen exprimiert (AMANN, 1986; McLACHLAN et al., 2002; WALKER und CHENG, 2005; MEDURI et al., 2008), während LH-Rezeptoren in Leydigzellen vorhanden sind (SAEZ, 1994; WALKER und CHENG, 2005).

2.1.3 Inhibin, Aktivin und Follistatin

Neben den gonadalen Steroidhormonen nehmen die Proteine Inhibin, Aktivin und Follistatin eine wichtige Rolle als Regulator der Gonadotropin-Ausschüttung ein (PADMANABHAN et al., 2002; GREGORY und KAISER, 2004).

Inhibin ist das vorwiegende Protein-Hormon des Hodens. Es existieren 2 Isoformen:

Inhibin A und B. Diese bestehen jeweils aus einer α - und einer β -Untereinheit, die durch Disulfid-Brücken verbunden sind. Die α -Untereinheit ist bei beiden Isoformen identisch, die β -Untereinheit liegt in 2 sehr ähnlichen, aber unterscheidbaren Varianten vor: β_A und β_B (Inhibin A: α - β_A , Inhibin B: α - β_B) (DE KRETZER und ROBERTSON, 1989; YING, 1989; GREGORY und KAISER, 2004)

Die α - und β -Untereinheiten sind homolog zueinander und zählen zur „transforming growth factor- β “ (TGF β)-Familie von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (YING, 1989; DE KRETZER et al., 2002; PADMANABHAN et al., 2002; O'CONNOR und DE KRETZER, 2004).

Bei den meisten Spezies ist Inhibin B beim männlichen Geschlecht die im Vordergrund stehende Isoform; die Synthese erfolgt in den Sertoli-Zellen. Die Inhibin-Produktion und -Ausschüttung wird in erster Linie durch FSH stimuliert (v. a. die Produktion von α -Untereinheiten), während Inhibin wiederum einen negativ-rückkoppelnden Effekt auf die hypophysäre FSH-Ausschüttung hat (DE KRETZER und ROBERTSON, 1989; AMORY und BREMNER, 2001; HULEIHEL und LUNENFELD, 2004; O'CONNOR und DE KRETZER, 2004). Diese Rückkopplung findet im Vergleich zum schnellen Wirkungseintritt von GnRH und Gonadotropinen zeitlich verzögert statt. Die LH-Ausschüttung wird, ebenso wie die Sekretion anderer Hypophysen-Hormone wie Thyreoidea-stimulierendes Hormon (TSH) und Prolaktin, durch Inhibin nicht beeinflusst (YING, 1989). Der exakte zugrunde liegende Wirkmechanismus von Inhibin ist bisher unklar, ein Inhibin-Rezeptor konnte noch nicht identifiziert werden (TILBROOK und CLARKE, 2001; O'CONNOR und DE KRETZER, 2004). PADMANABHAN et al. (2002) postulieren, dass Inhibin die Fähigkeit hat, Aktivin-Rezeptoren als Antagonist zu besetzen und somit die Wirkung von Aktivin zu verhindern. Der Inhibin B-Gehalt im peripheren Blut ist bei adulten Individuen positiv korreliert mit der Sertoli-Zell-Anzahl und -Funktion sowie der Spermienzahl, wie bei Ratten, nicht-humanen Primaten und Menschen gezeigt werden konnte (PIERIK et al., 1998; DE KRETZER et al., 2004; O'CONNOR und DE KRETZER, 2004).

Ein dem Inhibin sehr ähnliches Protein mit gegensätzlicher endokriner Funktion ist das Aktivin. Es besteht aus 2 β -Untereinheiten von Inhibin und liegt in verschiedenen Formen vor (Aktivin A: β_A - β_A , Aktivin B: β_B - β_B , Aktivin AB: β_A - β_B) (YING, 1989; DE KRETZER et al., 2002; GREGORY und KAISER, 2004). Im Gegensatz zu Inhibin, welches in erster Linie in den Gonaden synthetisiert wird und endokrin über den zirkulierenden Blutkreislauf am Zielorgan Hypophyse wirkt, wird Aktivin in einem breiteren Gewebespektrum gebildet und wirkt v. a. lokal über parakrine und autokrine Mechanismen als Wachstums-

faktor. In der Hypophyse wird Aktivin (v. a. Aktivin B) direkt in gonadotropen Zellen produziert und stimuliert dort über membranständige Aktivin-Rezeptoren spezifisch die FSH-Biosynthese und -Sekretion (DE KRETZER et al., 2002, 2004; GREGORY und KAISER, 2004). Außerdem hat Aktivin dort einen inhibitorischen Effekt auf die Produktion von β -Untereinheiten, übt also einen negativen Feedback-Mechanismus auf seine eigene Biosynthese aus (GREGORY und KAISER, 2004).

Neben der direkten Regulation von FSH spielt Aktivin aber auch eine wichtige Rolle in der Modulation von GnRH durch Aufregulation der GnRH-Rezeptoren in der Hypophyse, und damit indirekt für die Biosynthese und Ausschüttung von LH. Damit nimmt Aktivin eine entscheidende Stellung in der neuroendokrinen Steuerung der Hodenfunktion ein (GREGORY und KAISER, 2004; XIA und SCHNEYER, 2009).

Auch im Hodengewebe sind Aktivine und Aktivin-Rezeptoren in verschiedenen Zelltypen nachweisbar. Bisher ist bekannt, dass Aktivin die Sertoli-Zell-Proliferation in der frühen Entwicklung des Hodens fördert und somit einen Einfluss auf die Gesamtzahl an Sertoli-Zellen und damit einhergehend auf die spätere Hodengröße und -funktion hat. Die Transformation von Gonozyten zu Spermatogonien wird ebenfalls durch Aktivin beeinflusst. Mögliche weitere Funktionen sind noch nicht im Detail definiert (DE KRETZER et al., 2001, 2004; XIA und SCHNEYER, 2009).

Follistatin, ein strukturell nicht mit Inhibin und Aktivin verwandtes Protein, ist ein einkettiges Glykoprotein-Hormon. Seine Wirkung beruht auf der Fähigkeit, Aktivin mit hoher Affinität reversibel zu binden (DE KRETZER et al., 2002; GREGORY und KAISER, 2004; XIA und SCHNEYER, 2009). Follistatin bindet an den Teil des Aktivins, der für die Bindung an den Aktivin-Rezeptor relevant ist und verhindert damit eine Rezeptorbindung und die daraus resultierende Signalkaskade (PADMANABHAN et al., 2002; GREGORY und KAISER, 2004). Dadurch werden die meisten Effekte von Aktivin, u. a. die FSH-stimulierenden, neutralisiert (DE KRETZER et al., 2002; GREGORY und KAISER, 2004; XIA und SCHNEYER, 2009). Darüber hinausgehende Funktionen sind noch unklar. Follistatin wird in Aktivin-produzierenden Zellen oder dazu benachbarten Zellen gebildet (DE KRETZER et al., 2002; XIA und SCHNEYER, 2009) und wirkt v. a. parakrin und autokrin (GREGORY und KAISER, 2004). Die Expression von Follistatin in der Hypophyse wird durch Aktivin stimuliert, durch Inhibin unterdrückt. Follistatin selbst stimuliert wiederum die Synthese von Aktivin (GREGORY und KAISER, 2004).

Inhibin, Aktivin und Follistatin spielen nicht nur bei der neuroendokrinen Regulation der Hodenfunktion eine Rolle, sondern sind in vielen weiteren Regelkreisen (z. B. Immun-

antwort, Erythropoese) von Bedeutung (DE KRETZER und ROBERTSON, 1989; YING, 1989; XIA und SCHNEYER, 2009). Darauf wird im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen.

2.1.4 Gonadale Steroidhormone

Gonadale Steroidhormone sind die im Hoden gebildeten Steroide, zu denen insbesondere Testosteron, Dihydrotestosteron (DHT) und Estradiol zählen (PADMANABHAN et al., 2002). Ihre Synthese wird in Abschnitt 2.3 im Detail erläutert. Den Steroidhormonen kommt eine wichtige Rolle in der Regulation der Gonadotropin-Sekretion zu (JONES und BOYNS, 1974). Sie kontrollieren die Produktion und Ausschüttung von GnRH, LH und FSH durch direkte Effekte sowohl im Hypothalamus als auch in der Hypophyse und sie modifizieren die Ansprechbarkeit der Hypophyse bezüglich GnRH (JONES und BOYNS, 1974; PADMANABHAN et al., 2002).

Testosteron wird, nach Stimulation durch LH, von den Leydigzellen synthetisiert und pulsatil ausgeschüttet (GÜNZEL-APEL et al., 1994; AMORY und BREMNER, 2001; MCLACHLAN et al., 2002; PINEDA, 2003). Durch das Enzym 5 α -Reduktase kann es zum potenteren DHT metabolisiert werden (COHEN et al., 1995; PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996), welches eine deutlich höhere Affinität zum Androgen-Rezeptor (AR) aufweist als Testosteron (MCLACHLAN et al., 1996, 2002). Die Bildung von DHT aus Testosteron ist letztendlich entscheidend für die Entwicklung des männlichen Reproduktionstrakts (HOLDCRAFT und BRAUN, 2004; WALKER und CHENG, 2005), während Testosteron das aktive Androgen im Hoden darstellt, welches die Spermatogenese reguliert (MCLACHLAN et al., 2002; WALKER und CHENG, 2005). Testosteron liegt im Hoden in einer 5-fach höheren Konzentration als DHT vor, weshalb angenommen wird, dass Testosteron der hauptsächliche Ligand für den testikulären AR ist (MCLACHLAN et al., 1996). Dagegen ist DHT das aktive Androgen außerhalb des Hodens, v. a. in der Prostata (COHEN et al., 1995; MCLACHLAN et al., 2002). Testosteron ist absolut notwendig für die Aufrechterhaltung der Spermatogenese (MCLACHLAN et al., 2002; HOLDCRAFT und BRAUN, 2004; WALKER und CHENG, 2005); im Speziellen kommt ihm eine essentielle Rolle bei der Meiose und der Reifung der Spermatiden (Elongation) zu (STEINBERGER, 1971; MCLACHLAN et al., 1996; HOLDCRAFT und BRAUN, 2004; HULEIHEL und LUNENFELD, 2004; ABEL et al., 2008), weiterhin unterstützt es, ebenso wie FSH, aber weniger effizient, die Sertoli-Zell-Proliferation (WALKER und CHENG, 2005).

Der Testosteron-Gehalt im Hodengewebe ist, wie Untersuchungen bei Nagetieren, Hunden und Primaten inkl. dem Menschen gezeigt haben, aufgrund der lokalen Produktion in etwa 100-fach höher als im peripheren Blut (PETERS et al., 2000; McLACHLAN et al., 2002). Die physiologischen Vorteile dieses lokal erhöhten Testosteron-Spiegels sind noch unbekannt. Ein geringerer Testosteron-Gehalt führt allerdings zu einer reduzierten Spermatogenese-Leistung (McLACHLAN et al., 2002; WALKER und CHENG, 2005).

Testosteron übt eine negativ-rückkoppelnde Wirkung auf die hypophysäre LH- und FSH-Ausschüttung aus (SCHALLY et al., 1973; FALVO und VINCENT, 1980; WINTER et al., 1982; PINEDA, 2003). Einerseits bewirkt es eine negative Rückkopplung auf die GnRH-Sekretion direkt im Hypothalamus, andererseits beeinflusst es in der Hypophyse die Gonadotropin-Sekretion, u. a. durch Regulation der GnRH-Rezeptor-Expression (SCHALLY et al., 1973; AMORY und BREMNER, 2001; PADMANABHAN et al., 2002). DHT dagegen hat keinen Einfluss auf die LH- und FSH-Sekretion, wie WINTER et al. (1982) beim Hund zeigen konnten.

Auch Östrogene üben, unabhängig von Testosteron, ein negatives Feedback auf die Ausschüttung von Gonadotropinen aus (STEINBERGER, 1971; WINTER et al., 1982, 1983), indem sie die Ansprechbarkeit der Hypophyse auf GnRH modifizieren (JONES und BOYNS, 1974; TILBROOK und CLARKE, 2001). Besonders die hypophysäre Sekretion von LH wird durch Estradiol gehemmt (WINTER et al., 1983; PETERS et al., 2000). Im Hinblick auf die inhibierenden Effekte auf die Gonadotropin-Sekretion sind Östrogene weitaus potenter als Androgene (JONES und BOYNS, 1974; PINEDA, 2003).

Östrogene stammen im männlichen Organismus aus den im Hoden gebildeten Androgenen, die lokal oder peripher (auch im zentralen Nervensystem) durch Aromatisierung (vgl. Abschnitt 2.3) in Östrogene umgewandelt werden können (WINTER et al., 1983; TILBROOK und CLARKE, 2001; HESS, 2003). Bei verschiedensten Tierarten, wie z. B. Schwein, Pferd und Ratte, konnte das Enzym Cytochrom P450 Aromatase (P450arom) bei adulten Tieren in Leydigzellen nachgewiesen werden (CARREAU et al., 1999; HESS, 2003; SIERENS et al., 2005). Die Leydigzellen stellen somit die primäre Quelle für testikuläre Östrogene dar (HOFFMANN et al., 2010). Bei einigen Spezies, wie beispielsweise Maus, Ratte und Mensch, ist P450arom auch in Keimzellen und in Spermien im Nebenhoden vorhanden (HESS, 2003).

Die testikuläre Östrogensekretion weist starke tierartliche Unterschiede auf. So werden bei Eber (CLAUS und HOFFMANN, 1980; RAESIDE und RENAUD, 1983; HOFFMANN et al., 2010) und Hengst (RAESIDE und CHRISTIE, 1997; HOFFMANN und LANDECK, 1999;

HESS, 2003) große Östrogen-Mengen gebildet, wobei Estron und v. a. Estronsulfat überwiegen. Dagegen ist der Östrogen-Gehalt z. B. bei männlichen Mäusen, Ratten, Hunden und Menschen im peripheren Blut gering und Estradiol ist das Hauptsyntheseprodukt (EIK-NES, 1971; CARREAU et al., 1999; HESS, 2003; PINEDA, 2003).

Östrogene regulieren im männlichen Reproduktionstrakt die Flüssigkeitsresorption v. a. in den Ductuli efferentes und erhöhen damit die Konzentration der Spermien, bevor diese in den Nebenhoden gelangen (HESS, 2003; HOLDCRAFT und BRAUN, 2004). Sie erzielen aber auch einen direkten Effekt auf die Funktion der Leydigzellen (HESS, 2003); so hemmt Estradiol auf parakrinem Wege die Androgen-Sekretion in den Leydigzellen (PINEDA, 2003). In den Keimzellen reduzieren Östrogene die Häufigkeit von Apoptose, weshalb SIERENS et al. (2005) Östrogene als „germ cell survival factor“ bezeichnen. Die genauen, zugrunde liegenden Mechanismen sind in vielerlei Hinsicht noch unklar (SIERENS et al., 2005).

Steroidhormone diffundieren durch die Zellmembran in die Zielzellen, wo sie mit hoher Affinität an spezifische, intrazelluläre Rezeptorproteine binden. Diese Rezeptoren sind im Zytoplasma und/oder dem Zellkern lokalisiert (HOFFMANN und SCHULER, 2000; WALKER und CHENG, 2005).

Im Hoden scheint die Expression von Androgen-Rezeptoren (AR) nach bisherigen Untersuchungen auf Sertoli-Zellen, peritubuläre Zellen und Leydigzellen begrenzt zu sein (MCLACHLAN et al., 1996, 2002; HOLDCRAFT und BRAUN, 2004; O'SHAUGHNESSY et al., 2005; WALKER und CHENG, 2005). Untersuchungen bei der Ratte ergaben in den Sertoli-Zellen ein vom Spermatogenese-Zyklus abhängiges Expressionsmuster (HOLDCRAFT und BRAUN, 2004; WALKER und CHENG, 2005). Da die Keimzellen keinen AR aufweisen, muss der Einfluss von Testosteron auf die Spermatogenese, ähnlich wie der von FSH, über die Sertoli-Zellen vermittelt werden (MCLACHLAN et al., 2002). Der Einfluss von Androgenen auf die Funktion der Leydigzellen ist komplex. Besonders für eine normale Leydigzell-Entwicklung sind Androgene, entweder in Form einer autokrinen Regulation oder vermittelt über die peritubulären Zellen, essentiell (O'SHAUGHNESSY et al., 2005).

Zwei unterschiedliche Östrogen-Rezeptoren (ER) sind beschrieben: $ER\alpha$ und $ER\beta$. $ER\alpha$ ist in erster Linie im Epithel der Ductuli efferentes sowie in den Leydigzellen lokalisiert, während $ER\beta$ im Hoden nahezu in allen Zelltypen, in den Ductuli efferentes und im Nebenhoden vorhanden ist (CARREAU et al., 1999; HESS, 2003; SIERENS et al., 2005). Für die Aufrechterhaltung der Fertilität spielt allerdings nur $ER\alpha$ eine Rolle, wie Untersuchungen bei Mäusen gezeigt haben (HESS, 2003; HOLDCRAFT und BRAUN, 2004;

SIERENS et al., 2005).

Da die Synthese der gonadalen Steroidhormone von den Gonadotropinen LH und FSH unter dem Einfluss von GnRH gesteuert wird und deren Ausschüttung wiederum von den gonadalen Steroidhormonen moduliert wird, entsteht ein enger Feedback-Mechanismus zwischen Hypothalamus, Hypophyse und Gonaden (CONN et al., 1984; PADMANABHAN et al., 2002). Diese Regelkreise sind schematisch in Abbildung 1 dargestellt.

2.1.5 Androgen-bindendes Protein

Das „androgen-binding protein“ (ABP) ist ein im Hoden ausschließlich in den Sertoli-Zellen produziertes Glykoprotein, welches bisher bei Maus, Ratte, Kaninchen, Schaf, Affe und Mensch nachgewiesen werden konnte (HANSSON et al., 1975; MUNELL et al., 2002). Es bindet mit hoher Affinität DHT, Testosteron und Estradiol, die Affinität für andere biologisch aktive Steroidhormone ist sehr gering (MUNELL et al., 2002).

ABP spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Androgen-Aktivität im Hoden (WALKER und CHENG, 2005) und im Nebenhoden (MUNELL et al., 2002). Ca. 80 % des von den Sertoli-Zellen produzierten ABP werden lumenwärts, die restlichen 20 % basal sezerniert. Mittels Endozytose kann ABP vom Nebenhodenepithel aufgenommen werden (MUNELL et al., 2002). Die Sekretion von ABP durch die Sertoli-Zellen wird durch FSH (HANSSON et al., 1975; RITZEN et al., 1982; MUNELL et al., 2002) und Testosteron (McLACHLAN et al., 1996) stimuliert.

ABP dient dazu, die in den Leydigzellen gebildeten Androgene für die in den Tubuli seminiferi contorti gelegenen intrazellulären AR verfügbar zu machen. Auf diesem Weg steigert FSH indirekt den Transport der Androgene aus dem Interstitium in die Tubuli. Eventuell bietet die Bindung der Androgene an ABP auch einen Schutz vor weiterer Metabolisierung (HANSSON et al., 1975). ABP dient auch dazu, den im Hoden vorhandenen, hohen Testosteron-Gehalt aufrechtzuerhalten (PINEDA, 2003). RITZEN et al. (1982) konnten bei der Ratte zeigen, dass ABP in den Sertoli-Zellen abhängig vom Spermatogenese-Zyklus unterschiedlich stark exprimiert wird. Die funktionelle Aktivität der Sertoli-Zellen variiert also im Verlauf der Spermatogenese (RITZEN et al., 1982).

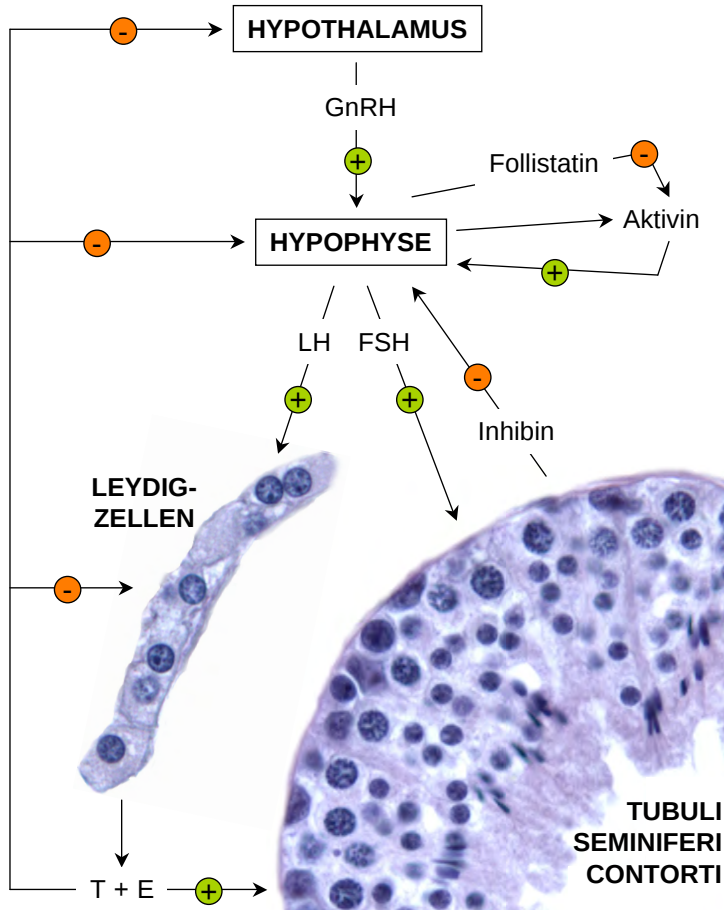


Abbildung 1: Schematische Darstellung der neuroendokrinen Regulation der Hodenfunktion, GnRH: Gonadotropin releasing Hormon, LH: Luteinisierendes Hormon, FSH: Follikel-stimulierendes Hormon, T: Testosteron, E: Östrogene

2.2 Möglichkeiten zur Blockierung der Hodenfunktion beim Hund

Es gibt eine Vielzahl von Gründen, warum beim Haustier Hund, z. B. in Abhängigkeit von den Haltungsbedingungen, dem Verhalten oder der Rasse, eine Ausschaltung der Hodenfunktion und damit auch eine Unterdrückung des Sexualverhaltens indiziert sein kann. Neben irreversiblen Methoden wie der Orchiectomie (chirurgische Kastration), der intratestikulären bzw. intraepididymalen Injektion von z. B. sklerosierenden Substanzen (chemische Kastration) oder der thermischen Zerstörung des Hodengewebes durch hochenergetische Ultraschallwellen (mechanische Kastration), haben in letzter Zeit v. a. reversible Methoden an Bedeutung gewonnen, die in den Hormonhaushalt eingreifen; man spricht daher auch von einer hormonellen Kastration (PINEDA, 1986; KUTZLER und WOOD, 2006; LUDWIG, 2008). Dabei liegen unterschiedliche theoretische Ansätze zugrunde: Zum einen ist eine Beeinflussung der hormonellen Regelkreise der neuroendokrinen Steuerung der Hodenfunktion (vgl. Abschnitt 2.1) möglich; Ziel dabei ist es, die Freisetzung bzw. Wirkung von GnRH, FSH und/oder LH zu verringern oder im besten Fall zu verhindern, was folglich zu einer Reduktion der Gonadenfunktion führt. Das kann durch Immunisierung gegen GnRH oder Gonadotropine, durch Anwendung von GnRH-Analoga und durch Verabreichung bestimmter Steroidhormone erreicht werden. Zum anderen kann peripher die Wirkung von Steroidhormonen, z. B. durch Verabreichung von Steroidhormon-Rezeptor-Blockern oder durch Hemmung von Enzymen der Steroidbiosynthese (vgl. Abschnitt 2.3), beeinflusst werden (RIESENBECK et al., 2002).

2.2.1 Immunisierung gegen GnRH

GnRH selbst ist aufgrund seiner niedrigen molekularen Masse nicht immunogen (LADD et al., 1994; THOMPSON, 2000; NAZ et al., 2005). Es gehört jedoch zur Gruppe der Haptene, d. h. nach Konjugation an ein Trägerprotein lassen sich via Immunisierung gegen das Epitop „GnRH“ spezifische Antikörper erzeugen (THOMPSON, 2000). Im Gegensatz zu Impfungen, die vor infektiösen Erkrankungen schützen sollen, soll hierbei eine Immunantwort gegen im Organismus physiologisch vorhandene Moleküle erzielt werden (HARDY und BRAID, 2007).

Es ist sowohl eine aktive als eine auch passive Immunisierung möglich. Nach Aus-

schüttung aus dem Hypothalamus wird GnRH unmittelbar über das Portal-Venenblut zur Hypophyse transportiert. Sollen die GnRH-Moleküle auf diesem kurzen Weg von spezifischen Antikörpern abgefangen werden, müssen diese in ausreichend hohen Konzentrationen vorliegen. Durch die Bindung von GnRH an die Antikörper wird dieses „neutralisiert“; dem liegt zugrunde, dass der GnRH-Antikörper-Komplex aufgrund seiner Größe nicht mehr durch die Kapillarwand diffundieren kann, außerdem wird die Rezeptorbindungsstelle des GnRH-Moleküls durch den Antikörper maskiert (THOMPSON, 2000). Ausreichend hohe Antikörperspiegel gegen GnRH führen also zu einer Unterdrückung der Synthese und Sekretion der Gonadotropine LH und FSH sowie infolgedessen zu einer Hemmung der Produktion gonadaler Steroidhormone (vgl. Abschnitt 2.1). Es tritt eine Atrophie der Hoden und ein Arrest der Spermatogenese ein (LADD et al., 1994; KUTZLER und WOOD, 2006).

LADD et al. (1994) immunisierten Mischlingsrüden gegen ein an Tetanus-Toxoid konjugiertes synthetisches GnRH. Das Immunisierungsschema bestand aus einer initialen Immunisierung und Booster-Impfungen 2 sowie 6 Wochen nach der ersten Immunisierung. 3 Wochen nach der ersten Injektion war die Serum-Testosteron-Konzentration auf durchschnittlich 30 % der Ausgangswerte gefallen, nach 10 Wochen erreichte sie Kastrationswerte bei den meisten, aber nicht allen Hunden. Die Hodengröße verringerte sich um 30 %, histologisch konnte in unterschiedlichem Ausmaß eine Hodenatrophie festgestellt werden. Diese Effekte waren reversibel. Das Sexualverhalten, die Ejakulationsqualität sowie Serum-Gonadotropin-Konzentrationen wurden in der genannten Studie nicht untersucht.

Zusätzlich konnten LADD et al. (1994) zeigen, dass eine Reimmunisierung nach Abfallen der Antikörpertiter auf Basalniveau (nach ca. 7–10 Monaten) möglich ist. Diese erneute Immunisierung resultierte in einer schnellen Bildung von Antikörpern schon vor der ersten Boosterung, während bei der Erst-Immunisierung entsprechend hohe Antikörpertiter erst nach ca. 4 Wochen nachzuweisen waren.

FERRO et al. (2004) konnten diese Beobachtungen allerdings nur bedingt bestätigen. In ihren Untersuchungen wurden männliche Mäuse, Ratten und Hunde 4 mal bzw. Schafe 3 mal mit einem Tetanus-Toxoid-konjugierten, modifizierten GnRH in vierzehntägigem (bzw. dreiwöchigem) Abstand immunisiert. Als Adjuvans wurde Aluminium-Hydroxid verwendet. Nach einem Zeitraum von 3 Monaten wurden die Tiere euthanasiert und das Hodengewebe für die Histologie konserviert. Während die Spermatogenese v. a. bei der Ratte, in geringerem Maß aber auch bei Maus und Schaf signifikant reduziert war, zeigte

sich beim Hund lediglich eine geringere Anzahl an Spermatiden und Spermien in den Tubuli seminiferi contorti im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren. Der Skrotum-Durchmesser sowie die Plasma-Testosteron-Konzentration waren beim Hund im Vergleich zu den Werten vor der 1.Immunisierung ebenfalls unverändert. Als Ursache für diese unterschiedlichen Reaktionen wurde der Verlauf des Antikörperspiegels angenommen: Bei Maus und Ratte war dieser ab Woche 4 gleichbleibend hoch, während bei Hund und Schaf in Woche 4 ein Peak beobachtet wurde, wonach der Antikörperspiegel wieder deutlich abnahm. FERRO et al. (2004) führten diese spezie-spezifisch unterschiedlichen Ergebnisse auf die Auswahl des Adjuvans zurück.

JUNG et al. (2005) immunisierten jeweils zwei 12 Wochen alte Beagle-Rüden mit rekombinanten Fusionsproteinen, bestehend aus GnRH und dem T-Helfer-Zell-Epitop p35 aus caninem Staupevirus (GST-p35-GnRH) bzw. nur aus GnRH (GST-GnRH). Nach nur einer Boosterung 4 Wochen später waren die Antikörperspiegel bei den beiden mit GST-p35-GnRH-immunisierten Hunden fast doppelt so hoch wie bei den mit GST-GnRH-immunisierten Hunden. Im Alter von 30 Wochen wurden die Rüden kastriert: Das Hodengewicht war bei den GST-p35-GnRH-Tieren signifikant verringert, histologisch zeigten sich kleine Tubuli seminiferi contorti, ein Arrest der Spermatogenese auf Ebene der Spermatogonien bzw. Spermatozyten sowie eine Atrophie der Leydigzellen. Bei den mit GST-GnRH-immunisierten Hunden konnte histologisch eine normale Spermatogenese nachgewiesen werden.

Inzwischen sind einige veterinärmedizinische Vakzine zur aktiven Immunisierung gegen GnRH kommerziell verfügbar, die allerdings keine Zulassung für den Hund beinhalten: In Australien sind „Equity™“ (Pfizer Australia Pty Ltd) zur Östrusunterdrückung bei Stuten und „Bopriva“ (Pfizer Australia Pty Ltd) zur temporären Unterdrückung von Testosteron bei postpubertären, nicht zur Zucht eingesetzten Bullen zugelassen. „Vaxstrate™“ (Arthur Webster Pty Ltd) – inzwischen vom Markt genommen – sollte in Mastbetrieben das unerwünschte Trächtigwerden von Färsen bzw. Kühen verhindern. Pfizer hat mit „Improvac®“ eine weitere GnRH-Vakzine auf dem Markt, die im Mai 2009 die EU-Zulassung zur Vermeidung von Geschlechtsgeruch bei nicht-kastrierten Ebern erhalten hat.

2.2.2 Immunisierung gegen Gonadotropine

Neben der Immunisierung gegen das übergeordnete GnRH ist auch eine Immunisierung gegen Gonadotropine möglich.

LUNNEN et al. (1974) untersuchten den Effekt einer aktiven Immunisierung von Beagle-Rüden gegen bovines LH. Dabei bekamen die Hunde über 3 Monate hinweg insgesamt 12 (Wiederholungs-) Impfungen. Trotz einer individuell sehr variablen Reaktion auf die Immunisierung konnte eine signifikante Verkleinerung von Hoden, Nebenhoden und Prostata im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe beobachtet werden. Histologisch zeigte sich eine deutliche Atrophie und Fibrose der genannten Organe. Libido und die Fähigkeit zur Erektion waren bei den immunisierten Hunden nicht beeinträchtigt, jedoch konnte ab 2–5 Wochen nach der ersten Immunisierung zu den meisten Untersuchungszeitpunkten kein Ejakulat mehr gewonnen werden. Der Testosterongehalt im peripheren Blut war im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigt. Bei 3 von 4 Hunden waren die beschriebenen Veränderungen auch noch 1 Jahr nach der 1. Impfung vorhanden.

Auch PINEDA (1986) beschreibt, dass eine aktive Immunisierung gegen LH und/oder ovine Gonadotropine bei Hunden in einer Atrophie der Hoden und anderer Androgen-abhängiger Organe resultiert. Entsprechende Vakzine zur aktiven Immunisierung von Rüden gegen Gonadotropine wurden bisher offensichtlich nicht zugelassen.

Neben der grundsätzlichen Möglichkeit, eine Reduktion der Hodenfunktion beim Rüden über die oben beschriebenen aktiven Immunisierungen gegen GnRH und Gonadotropine zu erreichen, werden von PINEDA (1986), GONZALEZ et al. (1989) sowie HARDY und BRAID (2007) jedoch auch einige limitierende Faktoren dieser Vorgehensweise genannt:

- eine hohe Variabilität in der qualitativen wie quantitativen Immunantwort zwischen den verschiedenen Spezies
- eine hohe Variabilität zwischen Individuen einer Spezies
- die Notwendigkeit von Wiederholungsimpfungen
- die Unbeständigkeit der Antikörper-Titer
- die Gefahr von Entzündungsreaktionen sowie Abszedierung an der Injektionsstelle aufgrund notwendiger Adjuvantien
- die Möglichkeit der Entwicklung einer Immunkomplex-Nephritis

Über eine passive Immunisierung gegen GnRH, Gonadotropine oder gonadale Steroidhormone zur kurzzeitigen Fertilitätskontrolle beim Hund wurde bisher nicht berichtet.

2.2.3 Einsatz von GnRH-Analoga

Unter der Bezeichnung GnRH-Analoga werden GnRH-Agonisten und -Antagonisten zusammengefasst (VICKERY, 1985; PADULA, 2005; ENGEL und SCHALLY, 2007; FONTAINE und FONTBONNE, 2011). Seit der Charakterisierung des natürlich vorkommenden GnRHs durch MATSUO et al. (1971) wurden mehr als 3000 synthetische Analoga durch den Austausch von Aminosäuren entwickelt. Die daraus resultierende Erhöhung der Rezeptoraffinität und Verringerung des Abbaus bzw. Verzögerung der Ausscheidung führte zu einer bis um das 200-fache gesteigerten Wirksamkeit und zu einer längeren Halbwertszeit (GORDON und HODGEN, 1992; GOBELLO, 2007). GnRH-Agonisten unterscheiden sich in ihrer Struktur nur sehr wenig von natürlichem GnRH, in der Regel sind nur 1–2 Aminosäuren ausgetauscht. Im Gegensatz dazu weichen bei GnRH-Antagonisten 5–7 von den 10 Aminosäuren des natürlichen GnRHs ab (ENGEL und SCHALLY, 2007; GOBELLO, 2007). Allen GnRH-Analoga ist gemeinsam, dass sie parenteral verabreicht werden müssen, da sie aufgrund ihrer Peptid-Struktur und der daraus resultierenden Anfälligkeit für einen enzymatischen Abbau im Gastrointestinaltrakt nur eine geringe orale Bioverfügbarkeit aufweisen (CHRISP und GOA, 1990; PADULA, 2005; FONTAINE und FONTBONNE, 2011).

GnRH-Agonisten

GnRH-Agonisten imitieren die Wirkung von endogenem GnRH. Abhängig von Dosis und Dauer der Verabreichung kommt es entweder zu fertilitätsfördernden oder -hemmenden Effekten (VICKERY, 1985; PADULA, 2005; GOBELLO, 2007). Durch verlängerte, kontinuierliche Gabe von GnRH-Agonisten (z. B. in Form von slow-release-Implantaten) kommt es, nach anfänglicher Stimulation der GnRH-Rezeptoren, zu einer Desensibilisierung und infolgedessen zu einer Downregulierung und Verminderung der GnRH-Rezeptoren in der Hypophyse (BELCHETZ et al., 1978; VICKERY, 1985; GORDON und HODGEN, 1992; PADULA, 2005; ENGEL und SCHALLY, 2007). Daraus resultiert zunächst ein initialer Anstieg von LH und FSH und folglich Testosteron, der von einem Abfall dieser Hormone bis unter die Nachweisgrenze gefolgt sein kann (PADULA, 2005; GOBELLO, 2007).

Die ersten Untersuchungen über die Auswirkungen einer längerfristigen Anwendung von GnRH-Agonisten auf die Hodenfunktion beim Hund erfolgten durch VICKERY et al. (1981, 1984). Seit diesem Zeitpunkt wurde eine Vielzahl an Arbeiten dazu publiziert, u. a. von TREMBLAY und BELANGER (1984), DUBÉ et al. (1987), PARAMO et al. (1993),

INABA et al. (1996), RIESENBECK et al. (2002), TRIGG et al. (2006), JUNAIDI et al. (2009) sowie LUDWIG et al. (2009). Dabei kamen unterschiedliche GnRH-Agonisten und Applikationsformen (u. a. tägliche Injektionen, Depotpräparate zur einmaligen Injektion und slow-release-Implantate) zur Anwendung.

Zusammenfassend kann man die in den genannten Studien beobachteten Effekte wie folgt beschreiben:

Unmittelbar nach Behandlungsbeginn erfolgt ein initialer Anstieg von FSH, LH und Testosteron im Blutplasma. Spätestens nach 1–3 Wochen sind diese Werte deutlich und z. T. bis unter die Nachweisgrenze (Testosteron) gefallen. Zeitgleich mit dem Abfall des Testosterongehalts kommt es zu einer Reduzierung des Ejakulat-Volumens, der Spermienmotilität und -gesamtzahl. Die Anzahl der pathomorphologisch veränderten Spermien steigt an, wobei es sich v. a. um sekundäre Veränderungen handelt. Nach durchschnittlich 4–6 Wochen sind im Ejakulat keine Spermien mehr nachweisbar (Azoospermie) oder es kann kein Ejakulat mehr gewonnen werden (Aspermie), obwohl in manchen Fällen eine Erektion provozierbar ist. Unabhängig vom verwendeten Wirkstoff wird eine Veringerung des Hodenvolumens um 50–65 % und eine Veränderung der Hodenkonsistenz von prall-elastisch zu weich 4–5 Wochen nach Behandlungsbeginn beobachtet. Ebenso reduziert sich die Größe der Prostata in diesem Zeitraum um etwa 50 %. Nach 17 Wochen waren die Hoden in den Untersuchungen von LUDWIG et al. (2009) im Durchschnitt sogar 80 % kleiner als vor Behandlungsbeginn. Histologisch kommt es nach etwa 5–7 Wochen zu einer Atrophie der Tubuli seminiferi contorti und einer Unterbrechung der Spermatogenese (VICKERY et al., 1984; PARAMO et al., 1993), diese sistiert auf der Ebene der Spermatogonien/Spermatozyten (DUBÉ et al., 1987; PARAMO et al., 1993; RIESENBECK et al., 2002).

In den aufgeführten Studien wurden keine behandlungsbedingten, systemischen Nebenwirkungen oder lokalen Entzündungsreaktionen beobachtet. Allerdings bestehen große Unterschiede im Hinblick auf die Dauer der inhibitorischen Effekte, die zum einen von Wirkstoff, Dosierung und Formulierung abhängig sind, zum anderen aber auch großen individuellen Schwankungen unterliegen (JUNAIDI et al., 2009; FONTAINE und FONTBONNE, 2011). So berichten JUNAIDI et al. (2009) für den Wirkstoff Deslorelin in Implantatform dosisabhängig über einen Zeitraum von bis zu 750 Tagen, in dem die Hodenfunktion unterdrückt wurde. Bei LUDWIG et al. (2009) ist für das Implantat „Gonazon®“, welches 18,5 mg Azagly-nafarelin als Wirkstoff enthält, eine Wirkdauer von 223 bis mehr als 365 Tagen beschrieben. Allerdings zeigen einige Rüden deutlich

verzögerte oder keine Reaktionen. So wird bei TRIGG et al. (2006) über einen Hund berichtet, der erst nach einem Zeitraum von 43 Tagen einen entsprechenden basalen Testosterongehalt im Plasma aufwies. Auch GOERICHKE-PESCH et al. (2010b) berichten über ähnliche Beobachtungen.

Eine Verlängerung der Wirkdauer kann durch eine wiederholte Verabreichung eines Implantats sowohl vor als auch nach Wiedereinsetzen der Hodenfunktion erzielt werden; nach bisherigen Beobachtungen ist dies bis zu 4 mal ohne Nebenwirkung möglich (RIESENBECK et al., 2002; TRIGG et al., 2006).

Alle beschriebenen Effekte sind nach Absetzen des GnRH-Agonisten voll reversibel (TREMBLAY und BELANGER, 1984; VICKERY et al., 1984; INABA et al., 1996; RIESENBECK et al., 2002; JUNAIDI et al., 2009; LUDWIG et al., 2009). Der Testosterongehalt im peripheren Blut steigt innerhalb von 1–3 Wochen nach Aufhebung der Wirkung des GnRH-Agonisten (z. B. durch Entfernen des GnRH-Implantats) auf Normalwerte an (VICKERY et al., 1984; RIESENBECK et al., 2002). Auch das Wiedereinsetzen der Spermatogenese geht schnell vonstatten (VICKERY, 1985). Wenn die endokrine und germinative Hodenfunktion durch die Langzeitanwendung von GnRH-Agonisten vollständig downreguliert war, dauert es etwa 9 Wochen, bis wieder Spermien im Ejakulat nachweisbar sind (TREMBLAY und BELANGER, 1984; VICKERY et al., 1984). Dies entspricht in etwa dem beim Hund für einen vollständigen Spermatogenese-Zyklus erforderlichen Zeitfenster (FOOTE et al., 1972; AMANN, 1986). Zeitgleich kommt es zu einer Größenzunahme von Hoden und Prostata bis hin zu den Werten vor Behandlungsbeginn etwa ab der 6. Woche nach Absetzen des GnRH-Agonisten (VICKERY et al., 1984; LUDWIG et al., 2009).

In der Humanmedizin werden GnRH-Agonisten bei der Behandlung der Pubertas praecox und der steroidhormon-abhängigen Endometriose, aber auch als begleitende Therapie bei verschiedenen Tumorerkrankungen (Brustkrebs, Leiomyom, Prostata-Karzinom) eingesetzt (CHRISP und GOA, 1990; ENGEL und SCHALLY, 2007). Beim Rüden ist die Anwendung von slow-release-GnRH-Implantaten derzeit die Methode der Wahl für eine erfolgreiche, reversible und praxisorientierte Blockierung der Hodenfunktion (LUDWIG et al., 2009). Zusätzlich dazu konnten GOERICHKE-PESCH et al. (2010b) zeigen, dass GnRH-Agonisten beim Rüden auch zur Behandlung der benignen Prostatahyperplasie (BPH) und zur Therapie von Verhaltensauffälligkeiten, wie Hypersexualität und Aggressivität, geeignet sind. Um die beschriebene initiale Stimulation der Testosteronsynthese und eine z. B. damit einhergehende Verschlechterung des klinischen Zustands bei einer BPH zu unterbinden, ist eine kombinierte Gabe von GnRH-Agonisten mit GnRH-Antagonisten,

Anti-Androgenen oder Progestagenen möglich (RIESENBECK et al., 2002; GOBELLO, 2007; GARCÍA ROMERO et al., 2009).

Für den Hund sind aktuell 2 GnRH-Agonisten in Implantatform zur subkutanen Anwendung zugelassen: „Suprelorin®“ (Virbac Tierarzneimittel GmbH) enthält 4,7 mg bzw. 9,4 mg Deslorelinacetat und besitzt eine EU-Zulassung zur Erzielung einer vorübergehenden Unfruchtbarkeit bei gesunden, nicht kastrierten, geschlechtsreifen Rüden. „Gonazon®“ (18,5 mg Azagly-nafarelin, Intervet International B.V.) ist dagegen zur Unterdrückung der Gonadenfunktion bei Hündinnen zugelassen. Allerdings ist zur Zeit nur „Suprelorin®“ kommerziell erhältlich. Ein im Bereich der Humanmedizin zugelassener GnRH-Agonist in Implantatform namens „Profact® Depot“ (6,6 mg Buserelinacetat, Sanofi-Aventis) wurde ebenfalls erfolgreich in umfangreichen Studien beim Rüden getestet (RIESENBECK et al., 2002; GOERICKE-PESCH et al., 2010a).

GnRH-Antagonisten

GnRH-Antagonisten binden an GnRH-Rezeptoren, ohne sie zu aktivieren, und hemmen damit kompetitiv die Bindung von endogenen GnRH-Molekülen. Dies führt dosisabhängig zu einer unmittelbaren Blockade der Gonadotropinsekretion (CONN et al., 1984; GORDON und HODGEN, 1992; CONN und CROWLEY, 1994; KUTZLER und WOOD, 2006; ENGEL und SCHALLY, 2007). Die 1. und 2. Generation von GnRH-Antagonisten musste allerdings täglich in hohen Dosen verabreicht werden und führte zudem zu lokalen und systemischen Nebenwirkungen (u. a. einer übermäßigen Ausschüttung von Histamin). Diese Probleme konnten im Zuge der Entwicklung der 3. Generation von GnRH-Antagonisten, zu der z. B. die Wirkstoffe Teverelix, Abarelix, Cetrorelix und Acyline zählen, überwunden werden (GORDON und HODGEN, 1992; CONN und CROWLEY, 1994; HERBST, 2003; GOBELLO, 2007). Zudem wurden einige humanmedizinische Depotpräparate entwickelt (HERBST, 2003). Die Reversibilität der Effekte wurde weitreichend untersucht und bestätigt (CONN und CROWLEY, 1994; VALIENTE et al., 2007).

GnRH-Antagonisten werden in der Humanmedizin v. a. bei hormonabhängigen Erkrankungen wie z. B. dem Prostatakarzinom oder im Rahmen der In-vitro-Fertilisation eingesetzt, bei denen eine sofortige Ruhigstellung der Hypophyse notwendig ist (HERBST, 2003; ENGEL und SCHALLY, 2007). Über die Anwendung von GnRH-Antagonisten beim Hund existieren bisher nur wenige Informationen (GARCÍA ROMERO et al., 2009). Als Anwendungsbereiche sind jedoch Prostata-Hyperplasien, Perianaltumoren und uner-

wünschtes Testosteron-abhängiges Verhalten denkbar (GOBELLO, 2007).

In den ersten Studien beim Hund verwendete VICKERY (1985) den Wirkstoff Detirelix (GnRH-Antagonist der 2. Generation); dosisabhängig kam es zu einem Abfall des Testosterongehalts im peripheren Blut für ca. 24 Stunden und zu einer Unterbrechung der Spermatogenese. Angaben zu Nebenwirkungen finden sich in dieser Arbeit nicht.

Angaben über die Applikation einer einzelnen, hochdosierten, subkutanen Gabe von Acyline (GnRH-Antagonist der 3. Generation) bei adulten Rüden finden sich bei CORRADA et al. (2006) und VALIENTE et al. (2007). Die Reaktion auf die Behandlung variierte deutlich zwischen den einzelnen Tieren. In einem Beobachtungszeitraum von 8 Wochen nach Anwendung von Acyline verringerte sich die Hodengröße und -konsistenz nur geringfügig, Libido sowie Erektionsfähigkeit waren bei allen Hunden reduziert, aber blieben fast ausnahmslos erhalten. Dagegen waren Ejakulatvolumen, Spermienkonzentration und -motilität im Vergleich zu den Untersuchungen vor Anwendung von Acyline signifikant verringert. Die niedrigsten Werte wurden ca. 2 Wochen nach Injektion beobachtet, in den folgenden 6 Wochen erreichten die Parameter wieder nahezu die Ausgangswerte. Bei keinem der Tiere konnten lokale oder systemische Nebenwirkungen festgestellt werden (CORRADA et al., 2006; VALIENTE et al., 2007).

In einer weiterführenden Studie von GARCÍA ROMERO et al. (2009) lag der Fokus auf dem Effekt einer Einzeldosis Acyline auf die Serum-Konzentration von FSH, LH und Testosteron. Unmittelbar nach Injektion von Acyline verringerte sich der FSH-, LH- und Testosteron-Gehalt im peripheren Blut, wobei die niedrigsten Werte nach 9 Tagen gemessen wurden. Im nachfolgenden Untersuchungszeitraum von 20 Tagen stiegen die Hormonkonzentrationen bis über die Ausgangswerte an. Die Autoren schließen daraus, dass für das Erreichen eines längerfristigen Effektes eine regelmässige Anwendung von Acyline im Abstand von ca. 10 Tagen notwendig wäre (GARCÍA ROMERO et al., 2009).

Aktuell sind für die Anwendung im Bereich der Veterinärmedizin keine GnRH-Antagonisten zugelassen.

2.2.4 Anwendung von Gestagenen

Gestagene wirken negativ-rückkoppelnd auf die hypophysäre Gonadotropinausschüttung (FSH und LH), wodurch es zu einer Reduktion der Gonadenfunktion kommt. Allerdings, so berichten RIESENBECK et al. (2002), ist dieser negativ-rückkoppelnde Effekt beim Rüden deutlich schwächer ausgeprägt als bei der Hündin. Schon JONES und BOYNS (1974)

konnten zeigen, dass beim Rüden die Gabe von Progesteron eine durch GnRH-Injektion induzierte Stimulation der LH-Ausschüttung nicht verhindert. Dennoch kam es in einer Studie von ENGLAND (1997) nach Anwendung von Megestrolacetat bzw. Medroxyprogesteronacetat (MPA) dosisabhängig und zeitlich begrenzt zu einer Reduzierung der Spermaqualität, während die LH-Ausschüttung und Libido nicht beeinflusst wurden. Ein signifikanter Effekt konnte allerdings erst bei einer Dosis beobachtet werden, die 10-fach höher war als die zur Kontrazeption bei der Hündin eingesetzte. In erster Linie stieg durch die Behandlung nach einigen Tagen die Anzahl der pathomorphologisch veränderten Spermien, was indirekt zu einer Beeinträchtigung der Beweglichkeit führte. Der große Anteil sekundärer Spermienveränderungen deutet darauf hin, dass die Gestagenbehandlung v. a. eine Auswirkung auf den Nebenhoden bzw. auf die Reifung der Spermien im Nebenhoden hat (ENGLAND, 1997). Auch PARAMO et al. (1993) konnten mit der gewählten niedrigen Dosierung von MPA beim Rüden keine signifikanten Effekte auf die Hodenfunktion feststellen.

Eine einmalige Gestagenbehandlung hat bei Rüden nur einen begrenzten Effekt auf die LH-Ausschüttung und Samenqualität (ENGLAND, 1997). Außerdem birgt eine längerfristige Anwendung, in Abhängigkeit von der Art des angewendeten Gestagens und der Dosierung, grundsätzlich das Risiko von Nebenwirkungen, worauf an verschiedenen Stellen hingewiesen wird (SELMAN et al., 1997; RIESENBECK et al., 2002; LUDWIG, 2008).

Im Bereich der Veterinärmedizin ist die Injektionssuspension „Delvosteron®“ (Intervet Deutschland GmbH, 100 mg Proligeston als Langzeitformulierung) zugelassen, Anwendungsgebiete sind, neben Östrus-Verhütung oder -Unterdrückung bei Hündinnen und Kätzinnen, auch die Hypersexualität bei Rüde und Kater. Weitere zugelassene Präparate betreffen ausschließlich die Anwendung bei weiblichen Tieren. Es handelt sich dabei um „Perlutex“ und „Sedometril®“ (5 mg MPA in Tablettenform, Selectavet Dr.Otto Fischer GmbH bzw. Albrecht GmbH) mit den Indikationen Verhinderung und Unterbrechung der Brunst bei Kätzinnen und Hündinnen.

2.2.5 Anwendung von Östrogenen

Wie bereits in Abschnitt 2.1.4 beschrieben, weisen auch Östrogene einen negativ-rückkoppelnden Effekt auf die hypophysäre Sekretion von FSH und LH auf. JONES und BOYNS (1974) konnten bei männlichen Hunden zeigen, dass sowohl Estradiol-17 β als auch Diethylstilbestrol (DES) einen LH-Anstieg nach Injektion von GnRH nahezu vollständig

blockieren. Diese Studie zeigte auch, dass Estradiol-17 β einen wesentlich stärkeren Einfluss auf die durch GnRH stimulierte LH-Ausschüttung hatte als Testosteron. Auch WINTER et al. (1983) wiesen beim Rüden diesen Effekt von Estradiol auf die LH-Sekretion nach.

Mit den Handelspräparaten „Incurin“ (1 mg Estriol in Tablettenform, Intervet Deutschland GmbH) bzw. „Menformon-K“ (0,2 mg Estradiolbenzoat, Injektionslösung, Intervet Deutschland GmbH) sind östrogen-wirksame Arzneimittel zur Behandlung von hormonbedingter Harninkontinenz bzw. zur Nidationsverhütung sowie bei Prostata-Hyperplasie für den Hund zugelassen.

Allerdings besteht beim Hund die Gefahr einer östrogen-induzierten Schädigung des Knochenmarks und damit der Myelopoese, die zu einer nicht-regenerativen Anämie, Thrombozytopenie und Leukopenie mit z. T. letalem Ausgang führt (SONTAS et al., 2009). Daneben ist im Zusammenhang mit der Anwendung von Östrogenen beim Rüden eine Zystenbildung in der Prostata zu erwarten (SIRINARUMITR et al., 2001; CORRADA et al., 2004). Die Anwendung von Östrogenen beim Hund wird heute daher als kontraindiziert angesehen.

2.2.6 Anwendung von Androgenen

Nach Anwendung von Testosteron kommt es durch die negativ-rückkoppelnde Wirkung von Androgenen auf die hypophysäre Sekretion von FSH und v. a. LH (vgl. Abschnitt 2.1.4) zu einem verminderten intratestikulären Testosterongehalt, während die Testosteron-Konzentration im peripheren Blut aufgrund des exogenen Testosterons erhalten bleibt (ENGLAND, 1997).

Die tägliche Verabreichung von Methyltestosteron über einen Zeitraum von 90 Tagen führte in einer Studie von FRESHMAN et al. (1990) zu verringerten Serum-FSH- und -LH-Werten. Außerdem wurde eine, nach Ende der Behandlung reversible, Abnahme der Spermiegesamtzahl und der Hodenlänge beobachtet. Auch ENGLAND (1997) beschrieben diesen Effekt beim Rüden: ca. 3 Wochen nach einer einmaligen, parenteralen Testosteron-Gabe kam es zu einer signifikanten Abnahme der Spermienmotilität und -gesamtzahl sowie des prozentualen Anteils lebender, pathomorphologisch nicht veränderter Spermien. In erster Linie wurden primäre Spermienveränderungen nachgewiesen, was auf eine direkte Beeinflussung der Spermatogenese hinweist. Während diese Auswirkungen über einen Zeitraum von ca. 7 Wochen beobachtet werden konnten, waren Libido und Sexualverhalten

zu keinem Studienzeitpunkt beeinflusst. Androgene induzieren beim Rüden also einen langanhaltenden, negativen Effekt auf die Spermaqualität (ENGLAND, 1997).

Androgene mit dem Ziel, die Reproduktion beim Rüden zu beeinflussen, sind zur Zeit nicht zugelassen und auch nicht weiter erprobt.

2.2.7 Gabe von 5 α -Reduktase-Hemmer

Das Enzym 5 α -Reduktase wandelt Testosteron irreversibel zum potenteren Androgen Dihydrotestosteron (DHT) um (vgl. Abschnitt 2.1.4 und Abschnitt 2.3). DHT ist in der Prostata das hauptsächlich wirksame Androgen, während Testosteron dort in erster Linie als Vorstufe dient (COHEN et al., 1995). 5 α -Reduktase-Hemmer, wie z. B. das synthetische Steroid Finasteride, verhindern also spezifisch die Umwandlung von Testosteron zu DHT (IGUER-OUADA und VERSTEGEN, 1997), wodurch sie sich beim Hund in erster Linie für die Therapie der benignen Prostatahyperplasie (BPH) eignen, da DHT als Schlüsselhormon für das Größenwachstum der Prostata angesehen wird (SIRINARUMITR et al., 2001).

Die Anwendung von steroidalen 5 α -Reduktase-Hemmern führt beim Hund zu einer signifikanten Reduktion der Prostatagröße (COHEN et al., 1995; HÄUSLER et al., 1996; IGUER-OUADA und VERSTEGEN, 1997). Während die Serum-Testosteron-Konzentration nicht beeinflusst und die Serum-DHT-Konzentration nur geringfügig verringert wird, kommt es in der Prostata zu einem Abfall des DHT-Gehalts und zu einem Anstieg des Testosteron-Gehalts (COHEN et al., 1995). In einer Studie von IGUER-OUADA und VERSTEGEN (1997) wurden die Auswirkungen von Finasteride auf Spermaqualität, Libido und Fertilität in den Fokus gestellt: Etwa 8 Wochen nach Beginn der Behandlung war das Ejakulatvolumen signifikant verringert, zeitgleich stieg aber die Spermienkonzentration an. Diese Beobachtung ist auf die Reduzierung des Prostata-Sekrets zurückzuführen. Aufgrund der hohen Spermienkonzentration war die Spermienmotilität eingeschränkt, in verdünnten Proben war eine normale Motilität vorhanden. Erektions- und Zeugungsfähigkeit blieben während des gesamten Studienzeitraumes erhalten. Etwa 10 Wochen nach Absetzen von Finasteride waren die beobachteten Effekte wieder verschwunden (IGUER-OUADA und VERSTEGEN, 1997). Entsprechende Ergebnisse erzielten SIRINARUMITR et al. (2001).

5 α -Reduktase-Hemmer führen demnach zu einer reversiblen Atrophie der Prostata ohne dabei Spermatogenese und Sexualverhalten zu beeinflussen. Allerdings ist der Wirkstoff

Finasteride, welcher in der Humanmedizin z. B. unter den Handelsnamen „Proscar®“ (5 mg, Merck & Co., Corp.) und „Propecia®“ (1 mg, Merck & Co., Corp.) zugelassen ist, teuer und es kann bis zu 2 Monaten dauern, bis sich ein klinischer Effekt eingestellt hat (CORRADA et al., 2004).

2.2.8 Verabreichung von Androgenrezeptor-Blockern

Androgenrezeptor (AR)-Blocker hemmen kompetitiv die Bindung von Androgenen am AR, indem sie selbst an den Rezeptor binden, ohne ihn zu aktivieren (HOFFMANN und SCHULER, 2000; GOBELLO, 2006). Dabei kann man zwischen steroidal (z. B. Cyproteronacetat, Osateronacetat) und nicht-steroidal (z. B. Flutamid) rezeptorbindenden Anti-Androgenen unterscheiden.

Beim Rüden werden AR-Blocker in erster Linie zur Behandlung der benignen Prostatahyperplasie (BPH) eingesetzt, ohne dass dabei die Spermaqualität und Libido beeinflusst werden (NERI, 1989; GOBELLO, 2006). Eine tägliche, orale Verabreichung von Flutamid führt ab einer Dosis von 5 mg/kg zu einer signifikanten Reduktion der Prostatagröße, wobei etwa 2 Monate nach Unterbrechung der Therapie die Größe wieder zunimmt (NERI, 1989). Der Einfluss von Osateronacetat, einem neueren Anti-Androgen, auf die BPH wurde von TSUTSUI et al. (2000, 2001) untersucht: Ab einer oralen Dosis von 0,2 mg/kg, verabreicht über 7 Tage, kam es innerhalb einer Woche zu einer signifikanten Verkleinerung der Prostata und zu einer deutlichen Verbesserung der klinischen Symptomatik. Diese Wirkung war über einen Zeitraum von 3–5 Monaten zu beobachten, während der LH-Gehalt im Plasma nicht beeinflusst und der Testosterongehalt im Plasma nur geringfügig erniedrigt war (TSUTSUI et al., 2000, 2001). Die Spermaqualität war im Hinblick auf Ejakulatvolumen, Spermiengesamtzahl und -motilität unverändert, lediglich der prozentuale Anteil pathomorphologisch veränderter Spermien erhöhte sich etwa 3 Wochen nach Behandlungsbeginn (TSUTSUI et al., 2001).

Das Präparat „Ypozane®“ (Virbac Tierarzneimittel GmbH), welches Osateronacetat enthält, ist in 4 unterschiedlichen Größen von 1,875 mg bis 15 mg in Tablettenform erhältlich und für die Behandlung der BPH beim Rüden zugelassen. Delmadinonacetat ist ein Progesteronderivat mit ausgeprägten antiandrogenen Eigenschaften und im Bereich der Tiermedizin als Handelspräparat „Tardastrex“ (10 mg Delmadinonacetat, Injektions-suspension, Pfizer GmbH) zur Behandlung von Rüden mit Prostatahypertrophie oder sexueller Hyperaktivität erhältlich.

2.2.9 Verabreichung von Östrogenrezeptor-Blockern

Synthetische, nicht-steroidale, anti-östrogen-wirksame Substanzen wie Clomiphen oder Tamoxifen blockieren kompetitiv Östrogen-Rezeptoren, weisen dabei aber abhängig von der untersuchten Spezies und dem untersuchten Gewebe bzw. Zelltyp sowohl antagonistische als auch agonistische Effekte auf (HOFFMANN und SCHULER, 2000). Beim Hund scheinen die agonistischen Effekte zu überwiegen (HOFFMANN und SCHULER, 2000; GOBELLO, 2006).

CORRADA et al. (2004) verabreichten Tamoxifen-Citrat über 28 Tage in einer täglichen oralen Dosis von etwa 0,2 mg/kg an 7 Beagle-Rüden. Bereits 2 Wochen nach Behandlungsbeginn kam es zu einer signifikanten Verringerung von Libido, Hoden- und Prostatagröße. Nach etwa einem Spermatogenese-Zyklus reduzierte sich die Spermiengesamtzahl und -motilität, während zu diesem Zeitpunkt der prozentuale Anteil primärer Spermienveränderungen signifikant angestiegen war. Die genannten Effekte waren spätestens 5 Monate nach Absetzen von Tamoxifen vollständig reversibel und sind wahrscheinlich auf eine Unterdrückung der hypophysären Gonadotropin-Sekretion (vgl. Abschnitt 2.1.4) zurückzuführen. Nebenwirkungen, v. a. auf das hämatopoetische System, wie sie für die Anwendung von Östrogenen beschrieben sind, konnten nicht beobachtet werden (CORRADA et al., 2004).

Der Wirkstoff Tamoxifen ist als Bestandteil einiger Humanpräparate verfügbar, veterinärmedizinisch sind aktuell jedoch keine Östrogenrezeptor-Blocker zugelassen.

2.2.10 Schlussfolgerungen für die eigenen Untersuchungen

Abgesehen von der Anwendung von 5 α -Reduktase-Hemmer sowie von Androgenrezeptor- und Östrogenrezeptor-Blockern verläuft der Wirkmechanismus aller anderen in Abschnitt 2.2 beschriebenen Verfahren zur Unterdrückung der Hodenfunktion (beim Rüden) über eine Hemmung der Hypothalamus-Hypophysenfunktion, d. h. die Freisetzung von GnRH und LH wird gehemmt. Der Wirkungsgrad der einzelnen Verfahren im Hinblick auf die Beeinflussung der Spermatogenese und Libido ist jedoch deutlich unterschiedlich.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, Informationen zum Wiedereinsetzen der Steroidbiosynthese nach Downregulation der Hodenfunktion beim Rüden zu erhalten. Der erreichte Zustand der Downregulation war also für die gegebene Fragestellung von grundlegender Bedeutung; weiterhin war entscheidend, dass die zur Downregulation führenden Mechanismen gezielt aufgehoben werden konnten. Wie aus Abschnitt 2.2.3 her-

vorgeht, werden nach Anwendung von GnRH-Agonisten in Form von Implantaten durch Hemmung der germinativen und endokrinen Hodenfunktion die an eine Downregulation gestellten Ansprüche erfüllt. Das entfernbare Implantat „Gonazon®“ gestattet darüber hinaus die gezielte Aufhebung der die Downregulation herbeiführenden Mechanismen.

2.3 Testikuläre Steroidbiosynthese

Als Steroidbiosynthese oder auch Steroidogenese wird die Bildung von Steroidhormonen in spezialisierten Zellen in spezifischen Geweben bezeichnet (STOCCO, 2001). Sie stellt einen grundlegenden Prozess für lebenswichtige physiologische Funktionen dar (LAVOIE und KING, 2009). So sezerniert die Nebennierenrinde zum einen Glukokortikoide, die u. a. den Kohlenhydrat-Stoffwechsel regulieren, zum anderen Mineralokortikoide, die den Mineralstoffhaushalt steuern (CONLEY und BIRD, 1997; STOCCO, 2001). Im Ovar werden Gestagene und Östrogene gebildet, welche die Fortpflanzungsfunktion und die Ausprägung sekundärer Geschlechtsmerkmale bei weiblichen Individuen regulieren. In männlichen Individuen wird dies durch die im Hoden produzierten Androgene gesteuert (CONLEY und BIRD, 1997; STOCCO, 2001). In Abhängigkeit von der Spezies werden teilweise auch in der Plazenta Gestagene und Östrogene gebildet (STOCCO, 2001; LAVOIE und KING, 2009). Sogenannte Neurosteroidoide werden im zentralen und peripheren Nervensystem synthetisiert und wirken dort parakrin (STOCCO, 2001; PAYNE und HALES, 2004).

2.3.1 Ausgangssubstrat Cholesterol

Obwohl Steroidhormone deutlich unterschiedliche Funktionen innehaben, sind die initialen Schritte ihrer Synthese identisch (STOCCO, 2001). Ausgangssubstrat für jegliche Steroidbiosynthese in allen steroidogenen Geweben ist Cholesterol. Die Herkunft des Cholesterols variiert dabei zwischen verschiedenen Spezies und auch zwischen verschiedenen steroidogenen Geweben (HALL, 1988; STOCCO und MCPHAUL, 2006). Letztlich nutzen steroidogene Zellen aber sowohl exogene als auch endogene Quellen für Cholesterol (LISCUM und DAHL, 1992).

Die wichtigste endogene Quelle ist die „de novo“-Synthese von Cholesterol aus Acetat in der Zelle (LISCUM und DAHL, 1992; SAEZ, 1994; STOCCO und MCPHAUL, 2006). Diese lokale Produktion findet im endoplasmatischen Retikulum statt (LISCUM und DAHL, 1992; RONE et al., 2009). Mehrere Schritte sind für die Umwandlung von Acetat zu Cholesterol

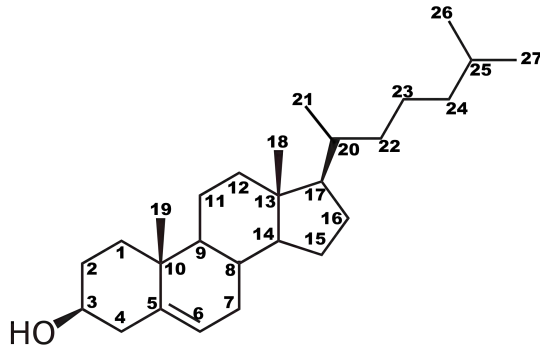


Abbildung 2: Strukturformel von Cholesterol mit Nummerierung der Kohlenstoff-Atome

notwendig und erfordern sowohl zytoplasmatische als auch membrangebundene Enzyme (STOCCO und MCPHAUL, 2006).

Exogenes Cholesterol wird in Form von zirkulierenden Lipoproteinen aus dem Serum in die Zelle aufgenommen (SAEZ, 1994; FREEMAN und ROMMERTS, 1996; STOCCO und MCPHAUL, 2006). Dies geschieht über die Interaktion der Lipoproteine mit spezifischen Oberflächenrezeptoren (STOCCO und MCPHAUL, 2006). Nach Bindung von „low density Lipoproteinen“ (LDL) an LDL-Rezeptoren an der Zellmembran wird der gesamte LDL-Rezeptor-Komplex mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen (STOCCO und MCPHAUL, 2006; RONE et al., 2009). Das LDL-enhaltende Endosom fusioniert anschließend mit Lysosomen, die Proteasen und Lipasen enthalten. Nach Abbau von Protein- und Lipid-Bestandteilen durch diese Enzyme steht das freie Cholesterol entweder direkt für die Steroidbiosynthese zur Verfügung oder wird in Form von Lipidtröpfchen im Zytoplasma gespeichert (STOCCO und MCPHAUL, 2006). Der Prozess der Aufnahme über LDL-Rezeptoren wird als nicht-selektiv bezeichnet (RONE et al., 2009), er weist eine hohe Affinität, aber eine geringe Kapazität auf (STOCCO und MCPHAUL, 2006). Daneben ist eine selektive Aufnahme über sog. „scavenger receptors class B type I“ (SR-BI) möglich. SR-BI ist in der Plasmamembran lokalisiert und bindet sowohl LDL als auch „high density Lipoproteine“ (HDL) (RONE et al., 2009). Das in den Lipoproteinen vorhandene Cholesterol wird direkt in die Plasmamembran überführt (RONE et al., 2009). Diese Form der Cholesterolaufnahme ist wesentlich effektiver als die durch LDL-Rezeptoren (FREEMAN und ROMMERTS, 1996; STOCCO und MCPHAUL, 2006).

In steroidogenen Zellen wird Cholesterol in zytoplasmatischen Lipidtröpfchen gespeichert (FREEMAN und ROMMERTS, 1996). Dafür wird Cholesterol durch das Enzym „Acyl-Coenzyme A Cholesterol-Acyltransferase“ (ACAT) in Cholesterol-Ester umgewandelt (LISCUM und DAHL, 1992; MILLER, 2007b; RONE et al., 2009). ACAT wird durch einen hohen Cholesterol-Gehalt aktiviert (RONE et al., 2009). Die so gespeicherten Cholesterol-Ester können mittels Hydrolyse wieder mobilisiert werden (HALL, 1988; LISCUM und DAHL, 1992; STOCCO und MCPHAUL, 2006; MILLER, 2007b), ein Prozess der schnell vonstatten geht (FREEMAN und ROMMERTS, 1996) und von dem Enzym „Hormon-sensitive Lipase“ (HSL) katalysiert wird (RONE et al., 2009). Mithilfe dieser beiden Enzyme hält die Zelle ein Gleichgewicht zwischen freiem und veresterten Cholesterol aufrecht (LISCUM und DAHL, 1992). Im Vergleich zu anderen steroidogenen Zellen speichern Leydigzellen wenig Cholesterol in der veresterten Form, auch Lipidtröpfchen sind in Leydigzellen nicht so stark ausgeprägt wie beispielsweise in adrenokortikalen Zellen. Dagegen besitzen Leydigzellen aufgrund ihres ausgeprägten endoplasmatischen Retikulums große Kapazitäten für die Cholesterol-Synthese (FREEMAN und ROMMERTS, 1996).

Cholesterol ist außerdem ein essentieller, struktureller Bestandteil von zellulären Membranen und notwendig für die Aufrechterhaltung der Membranfunktion (LISCUM und DAHL, 1992; RONE et al., 2009), insbesondere für die Beweglichkeit von Membranen (MILLER, 2007b). Die Plasmamembran enthält große Anteile von freiem, zellulärem Cholesterol (LISCUM und DAHL, 1992; FREEMAN und ROMMERTS, 1996; RONE et al., 2009), während das endoplasmatische Retikulum sowie mitochondriale Membranen insgesamt wenig Cholesterol enthalten (FREEMAN und ROMMERTS, 1996). Dies liegt daran, dass Cholesterol eine höhere Affinität zur Plasmamembran als zu anderen zellulären Membranen aufweist (LISCUM und DAHL, 1992). Zwischen dem Zellinneren und der Plasmamembran findet ein konstanter Austausch von Cholesterol statt (FREEMAN und ROMMERTS, 1996).

Im Vergleich zu Mitochondrien in nicht-steroidogenen Geweben ist der Cholesterolgehalt in der äußeren mitochondrialen Membran (outer mitochondrial membrane, OMM) in Leydigzellen relativ hoch (LISCUM und DAHL, 1992), während die innere mitochondriale Membran (inner mitochondrial membrane, IMM) dagegen so gut wie frei von Cholesterol ist (STOCCO, 2001). Trotzdem ist der Transport von extramitochondrialem Cholesterol zu den Mitochondrien für die Steroidbiosynthese erforderlich (LISCUM und DAHL, 1992). Der Austausch von Cholesterol zwischen Membranen kann mittels Diffusion erfolgen

(LISCUM und DAHL, 1992). Da Cholesterol ein fast unlösliches Molekül ist (MILLER, 2007b), ist das ein langsamer Prozess (LISCUM und DAHL, 1992; SAEZ, 1994). Für einen schnelleren Austausch sind aktive Transport-Systeme notwendig (LISCUM und DAHL, 1992). Dafür stehen intrazellulär ein vesikuläres Transportsystem sowie verschiedene Transport-Proteine zur Verfügung (LISCUM und DAHL, 1992; FREEMAN und ROMMERTS, 1996; RONE et al., 2009).

Der intrazelluläre Cholesterolhaushalt wird weitestgehend durch eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die als „sterol response element binding proteins“ (SREBP) benannt wurden, reguliert (MILLER, 2007b; RONE et al., 2009). Daneben stimulieren Gonadotropine die Aufnahme von LDL-Cholesterol sowie die „de novo“-Produktion von Cholesterol aus Acetat (MILLER, 2002).

2.3.2 Cytochrom P450 side chain cleavage und Transducesom

Die initiale Reaktion in der Biosynthese aller Steroidhormone in allen steroidogenen Geweben ist die Umwandlung von Cholesterol zu Pregnenolon, die durch das Enzym Cytochrom P450 side chain cleavage (P450scc) an der IMM katalysiert wird (HALL, 1988; SAEZ, 1994; PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996; STOCCO, 1996, 2001; STOCCO und MCPHAUL, 2006; RONE et al., 2009).

P450scc wird daher als limitierender enzymatischer Faktor bezeichnet (CLARK et al., 1994; STOCCO, 1996; PAYNE und HALES, 2004; STOCCO und MCPHAUL, 2006), wobei der wahre limitierende Faktor der Transport von Cholesterol aus dem Zytoplasma in das Innere der Mitochondrien, genauer gesagt der Transport von der OMM zur IMM, ist (LISCUM und DAHL, 1992; CLARK et al., 1994; SAEZ, 1994; STOCCO, 1996, 2001; STOCCO und MCPHAUL, 2006; LAVOIE und KING, 2009; RONE et al., 2009). Der hydrophile Zwischenraum zwischen diesen beiden Membranen (intermembrane space, IMS) kann vom hydrophoben Cholesterol nur sehr langsam mittels Diffusion überwunden werden (STOCCO, 1996, 2001; STOCCO und MCPHAUL, 2006; MIDZAK et al., 2011). Um einen zügigen Transport von Cholesterol zu gewährleisten, besitzen steroidogene Zellen eine aus mehreren Proteinen bestehende Vorrichtung, die RONE et al. (2009) und MIDZAK et al. (2011) als Transducesom bezeichnen (vgl. Abbildung 3). Zu diesem Proteinkomplex zählen die zytoplasmatischen Proteine „Proteinkinase A“ (PKA), „Acyl-Coenzyme A Binding Domain containing 1“ (ACBD1) und „Acyl-Coenzyme A Binding Domain containing 3“ (ACBD3), die mitochondrialen Proteine „Voltage-Dependent Anion

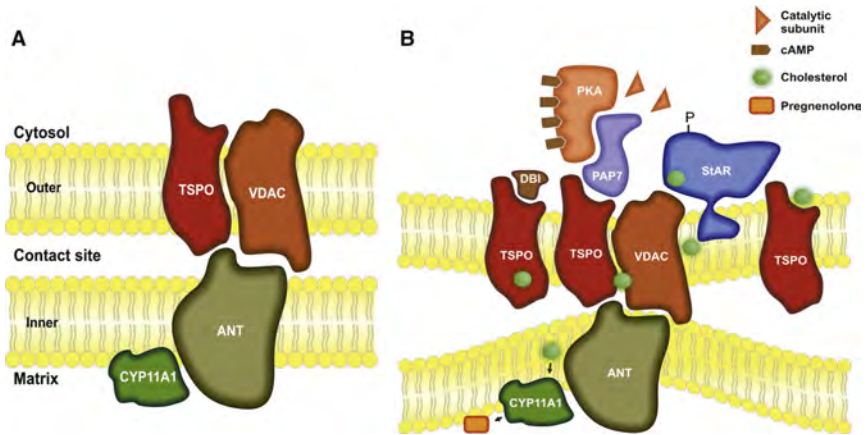


Abbildung 3: (A) Ruhezustand der Protein-Protein-Interaktionen von TSPO, VDAC und ANT in der mitochondrialen Membran, (B) Transduceosom-Komplexbildung nach akuter hormoneller Stimulation

TSPO: Translocator Protein, VDAC: Voltage-Dependent Anion Channel, ANT: Adenine Nucleotide Transporter, CYP11A1 (P450sc): Cytochrom P450 side chain cleavage, DBI (ACBD1): Acyl-Coenzyme A Binding Domain containing 1, PKA: Proteinkinase A, PAP7 (ACBD3): Acyl-Coenzyme A Binding Domain containing 3, StAR: Steroidogenic Acute Regulatory Protein, cAMP: zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat

Quelle: RONE et al., 2009 mit Genehmigung von Elsevier

Channel“ (VDAC), „Translocator Protein“ (TSPO) und „Steroidogenic Acute Regulatory-Protein“ (StAR-Protein), welche sich an der OMM befinden, sowie die mitochondrialen Proteine „Adenine Nucleotide Transporter“ (ANT) und P450sc, die sich an der IMM befinden (MIDZAK et al., 2011). Das Transduceosom vermittelt den Transport von Cholesterol über den Zwischenraum (IMS) an Kontaktstellen zwischen der OMM und IMM (RONE et al., 2009; MIDZAK et al., 2011). Steroidogene Zellen können daher die Menge der produzierten Steroide kontrollieren, indem sie die Verfügbarkeit von Cholesterol für P450sc limitieren (MIDZAK et al., 2011).

TSPO, welches früher als „Peripheral-type Benzodiazepine Receptor“ (PBR) bezeichnet wurde, ist in der OMM lokalisiert (LISCUM und DAHL, 1992; STOCO und MCPHAUL, 2006; MILLER, 2007b; RONE et al., 2009; MIDZAK et al., 2011). Es besteht aus

5 Transmembran-Domänen, die die OMM überspannen (MILLER, 2007a,b; RONE et al., 2009) und einen Kanal bilden, dessen Innenraum ein Cholesterol-Molekül aufnehmen kann (RONE et al., 2009). C-terminal enthält TSPO eine sog. „Cholesterol Recognition Amino acid Consensus (CRAC) domain“, die ins Zytoplasma ragt (MILLER, 2007a,b; RONE et al., 2009). TSPO ist in den meisten Zelltypen vorhanden, hohe Konzentrationen können allerdings v. a. in steroidogenen Geweben nachgewiesen werden (PAPADOPOULOS und BROWN, 1995; STOCCO, 1996; MILLER, 2007a).

ACBD1, früher als „Diazepam Binding Inhibitor“ (DBI) bezeichnet, ist intrazellulärer Ligand für TSPO (CLARK et al., 1994; SAEZ, 1994; STOCCO, 1996; STOCCO und MCPHAUL, 2006; RONE et al., 2009). Durch Bindung von ACBD1 an TSPO wird der Cholesterol-Transport von der OMM zur IMM stimuliert (LISCUM und DAHL, 1992; CLARK et al., 1994; STOCCO und MCPHAUL, 2006; MILLER, 2007b; RONE et al., 2009). ACBD1 wird in vielen, aber hauptsächlich in steroidogenen Geweben exprimiert und befindet sich im Zytoplasma im Kontakt mit der OMM (PAPADOPOULOS und BROWN, 1995; RONE et al., 2009).

ACBD3 wurde früher als „PBR-associated Protein 7“ (PAP7) bezeichnet und bindet an TSPO (RONE et al., 2009). Außerdem bindet es die PKA, wodurch diese in eine räumliche Nähe zu den cholesteroltransport-vermittelnden Proteinen gelangt (vgl. Abschnitt 2.3.6) (RONE et al., 2009). Es weist ein ähnliches Expressionsmuster wie TSPO auf (RONE et al., 2009) und wird nach hormoneller Stimulation vom Golgi-Apparat zu den Mitochondrien transportiert (RONE et al., 2009; MIDZAK et al., 2011).

Diese 3 zytoplasmatischen Komponenten regulieren die Anordnung des Transduceosoms und dessen Cholesterol-Transport-Aktivität (MIDZAK et al., 2011).

TSPO fungiert als Cholesterolspeicher, der Cholesterol zurückhält, bis es durch Bindung des Liganden freigesetzt wird. Bei Anwesenheit seines Liganden wird TSPO zum Cholesterol-Translokator (RONE et al., 2009). Nach Stimulation gruppieren sich 4–6 TSPOs an der OMM (RONE et al., 2009), das steigert die Bindung von Liganden sowie die Bildung von Kontaktstellen zwischen OMM und IMM (STOCCO und MCPHAUL, 2006; RONE et al., 2009). Außerdem wird durch diese Ansammlung von TSPOs wahrscheinlich die Cholesterolkonzentration lokal in der OMM erhöht, was den Zutritt von Cholesterol in die OMM erleichtert, da freies Cholesterol leichter in Gebiete mit hoher Cholesterolkonzentration hinein- und herausdiffundieren kann (RONE et al., 2009).

VDAC ist ein in der OMM lokalisiertes, kanal-bildendes Protein, welches die Passage von Ionen und kleinen Molekülen durch die OMM reguliert, wodurch vielseitige zelluläre

Prozesse wie Apoptose und Energietransduktion beeinflusst werden (RONE et al., 2009; MIDZAK et al., 2011). ANT dagegen befindet sich in der IMM. Die Interaktion von ANT mit VDAC und TSPO verankert wahrscheinlich Kontaktstellen zwischen der OMM und der IMM (RONE et al., 2009; MIDZAK et al., 2011).

Das in der OMM lokalisierte, für die Steroidogenese verfügbare Cholesterol ist an TSPO gebunden, welches nach Bindung von ACBD1 freigelassen wird, um zur IMM zu gelangen (RONE et al., 2009). Da diese Cholesterolmengen aber nicht für eine kontinuierliche Produktion großer Steroidmengen ausreichen, muss zusätzlich Cholesterol aus der Zelle zum Mitochondrium transportiert werden (RONE et al., 2009). Das geschieht mit Hilfe von Proteinen, die an ihrem C-terminalen Ende eine sog. „StAR-related lipid transfer (START) domain“ enthalten (STOCCO, 2001; RONE et al., 2009). Dieses Aminosäure-Muster bildet einen Kern aus β -Faltblattstrukturen, der von 2 α -Helices umgeben ist (RONE et al., 2009). Daraus resultiert eine hydrophobe Tasche, welche ein Cholesterol-Molekül mit einer Ratio von 1:1 binden kann (STOCCO, 2001; MILLER, 2007a; RONE et al., 2009). Die START-Domain ist in einer großen Familie von Lipid-Transfer-Molekülen zu finden (STOCCO, 2001; MILLER, 2007b; RONE et al., 2009), das zuerst identifizierte und am besten untersuchte Protein aus dieser Familie ist das StAR-Protein (STRAUSS et al., 2003). Es wird als 37 kDa große, zytoplasmatische Vorstufe synthetisiert und aufgrund seiner N-terminalen mitochondrialen Zielsequenz zügig zu den Mitochondrien transportiert (CLARK et al., 1994; STOCCO, 1996, 2001; STRAUSS et al., 2003; MIDZAK et al., 2011). Das StAR-Protein interagiert nur vorübergehend mit der OMM, bevor es mit Hilfe von VDAC und TSPO ins Mitochondrium importiert wird (RONE et al., 2009; MIDZAK et al., 2011). Beim Import wird die StAR-Protein-Vorstufe durch proteolytische Reaktionen zu einem 30 kDa großen Protein umgewandelt (CLARK et al., 1994; STOCCO, 2001; MIDZAK et al., 2011) und von seinem eigentlichen Wirkort entfernt (STRAUSS et al., 2003); im IMS und in der Mitochondrien-Matrix ist es inaktiv (BOSE et al., 2002; MIDZAK et al., 2011). Die Aktivität des StAR-Proteins hängt daher von seiner Verweildauer an der OMM ab (BOSE et al., 2002; MILLER, 2007a; RONE et al., 2009). Dies ermöglicht steroidogenen Zellen, die Steroidbiosynthese innerhalb von Minuten anzuregen bzw. zu beenden, indem die Geschwindigkeit des StAR-Protein-Importes reguliert wird (BOSE et al., 2002). In der Mitochondrien-Matrix wird das StAR-Protein anschließend mit einer Halbwertszeit von 4 bis 5 Stunden degradiert (MIDZAK et al., 2011).

Zwischen StAR-Protein und TSPO besteht eine funktionelle Interaktion (STOCCO und MCPHAUL, 2006; HAIDER, 2007; MILLER, 2007a,b). Die Übergabe des Cholesterols vom

StAR-Protein auf TSPO an der OMM erfolgt wahrscheinlich aufgrund einer unterschiedlich hohen Bindungsaffinität für Cholesterol. Dafür müssen sich die beiden Proteine nur in räumlicher Nähe befinden (RONE et al., 2009). Laut STOCCO (1996, 2001) ist die Synthese des StAR-Proteins eine unentbehrliche Komponente in der Produktion von Steroidhormonen.

Die Expression des StAR-Proteins ist auf steroidogene Gewebe beschränkt (CLARK et al., 1994; STOCCO, 1996, 2001; MILLER, 2007b; RONE et al., 2009). Sowohl die Nukleotid- als auch die Aminosäuresequenz ist zwischen verschiedenen Spezies hochkonserviert (STOCCO, 1996; MILLER, 2007b; KOWALEWSKI und HOFFMANN, 2008).

Das Enzym P450scc ist für 3 einzelne, schnell aufeinanderfolgende Reaktionen verantwortlich: Hydroxylierung an C₂₂, Hydroxylierung an C₂₀ und Spaltung zwischen C₂₀ und C₂₂. Alle 3 Schritte werden durch ein einziges Protein an einer einzigen aktiven Bindungsstelle katalysiert (MILLER, 1987; HALL, 1988; PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996; MILLER, 2002; STOCCO und MCPHAUL, 2006). Dabei wird aus dem C₂₇-Molekül Cholesterol das C₂₁-Steroid Pregnenolon gebildet (PAYNE, 1990; PAYNE und YOUNGBLOOD, 1995). Als Spaltprodukt entsteht Isocaproaldehyd, was zu Isocaproonsäure oxidiert wird (PAYNE und HALES, 2004). Die entstehenden Zwischenstufen sind fest an das Enzym gebunden (HALL, 1988; STOCCO und MCPHAUL, 2006), erst das Endprodukt Pregnenolon dissoziiert von der aktiven Bindungsstelle (HALL, 1988).

Für die genannten Reaktionen werden 3 Sauerstoff-Moleküle, 3 Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)-Moleküle und ein mitochondriales Elektronen-Transfer-System benötigt. Letzteres besteht aus Adrenodoxin-Reduktase und Adrenodoxin (SAEZ, 1994; PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996; PAYNE und HALES, 2004; STOCCO und MCPHAUL, 2006; STORBECK et al., 2007), auch Ferredoxin-Reduktase bzw. Ferredoxin genannt (PAYNE und HALES, 2004). Die Elektronen, die für diese Reaktionen benötigt werden, werden von NADPH auf die Adrenodoxin-Reduktase, anschließend von der Adrenodoxin-Reduktase auf Adrenodoxin und letztlich von Adrenodoxin auf P450scc übertragen (MILLER, 1987; PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996; PAYNE und HALES, 2004; STORBECK et al., 2007; MIDZAK et al., 2011). Für die funktionelle Aktivität von P450scc ist das physiologische Milieu der Mitochondrien essentiell (PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996; STORBECK et al., 2007).

P450scc ist das einzige Enzym, das Cholesterol zu Pregnenolon umwandeln kann, also Steroide „de novo“ synthetisieren kann. Daher wird eine Zelle als steroidogen bezeichnet,

wenn sie P450scc exprimiert (MILLER, 2007b). Die Expression von P450scc ist entsprechend auf klassische steroidogene Gewebe begrenzt (PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996; PAYNE und HALES, 2004). Im Hoden ist P450scc ausschließlich in den Leydigzellen lokalisiert (SAEZ, 1994; PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996; STOCCO, 1996; PAYNE und HALES, 2004), wo es bereits basal, also in unstimulierten Zellen, in großen Mengen exprimiert wird (LAVOIE und KING, 2009) und aktiv ist (STOCCO, 2001).

Ein einziges Gen namens „CYP11A1“ codiert für das Enzym P450scc (MILLER, 1987; PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996; PAYNE und HALES, 2004). Zwischen verschiedenen Spezies besteht eine hohe Homologie von 71 % und mehr, sowohl in der Nukleotid- als auch in der Aminosäuresequenz (MILLER, 1987; PAYNE und HALES, 2004).

CYP11A1 codiert für eine Protein-Vorstufe, die am N-terminalen Ende eine Sequenz enthält, die den Transport aus dem Zytoplasma zum Mitochondrium steuert. An der IMM wird dieses N-terminale Ende dann durch spezifische, mitochondriale Peptidasen abgespalten, woraus das reife Protein resultiert (STORBECK et al., 2007). P450scc wird vollständig in die mitochondriale Matrix importiert (MIDZAK et al., 2011) und ist daher zwar eng mit der IMM verbunden, aber nicht darin integriert (STORBECK et al., 2007; MIDZAK et al., 2011).

2.3.3 Cytochrom P450 17 α -Hydroxylase/17-20 Lyase und 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -Isomerase

Das durch P450scc gebildete Pregnenolon, welches im Gegensatz zu Cholesterol löslich ist (MILLER, 2007b), diffundiert anschließend aus dem Mitochondrium ins Zytoplasma und weiter zum glatten, endoplasmatischen Retikulum (PAYNE und YOUNGBLOOD, 1995; STOCCO und MCPHAUL, 2006), wo es in Abhängigkeit von der im entsprechenden Gewebe vorhandenen Enzym-Zusammensetzung zu einer Vielzahl von Steroidhormonen umgewandelt werden kann (STOCCO, 2001).

Im Hoden sind 2 verschiedene Pfade für die anschließende Steroidbiosynthese möglich: Beim Δ^5 -Weg wird Pregnenolon über die Zwischenstufen 17 α -Hydroxypregnenolon, Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Androstendion zu Testosteron umgewandelt, während beim Δ^4 -Weg Pregnenolon zuerst zum Δ^4 -Steroid Progesteron umgewandelt wird und Testosteron dann über die Zwischenstufen 17 α -Hydroxyprogesteron und Androstendion gebildet wird (siehe Abbildung 4) (HALL, 1988; CONLEY und BIRD, 1997). Die Wahl des Pfades ist nicht zufällig (HALL, 1988; STOCCO und MCPHAUL, 2006),

sondern abhängig von Alter (SAEZ, 1994; PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996) und Tierart (PURVIS et al., 1981; HALL, 1988; SAEZ, 1994; PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996; CONLEY und BIRD, 1997; STOCCO und MCPHAUL, 2006). Maus und Ratte nutzen fast ausschließlich den Δ^4 -Weg (HALL, 1988; SAEZ, 1994; PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996; STOCCO und MCPHAUL, 2006). Bei Kaninchen, Schwein, Hund und Mensch wird Pregnenolon sowohl über den Δ^4 - als auch über den Δ^5 -Weg zu Testosteron umgewandelt (VAN DER MOLEN und EIK-NES, 1971), wobei vorwiegend der Δ^5 -Weg genutzt wird (HALL, 1988; SAEZ, 1994; PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996; STOCCO und MCPHAUL, 2006). Beim Hund konnten bereits EIK-NES und KEKRE (1963) nachweisen, dass die bevorzugte Route für die Androgensynthese über 17α -Hydroxypregnenolon, also über den Δ^5 -Weg verläuft.

Die für den Δ^4 - bzw. Δ^5 -Weg notwendigen Reaktionen werden durch die beiden Enzyme Cytochrom P450 17α -Hydroxylase/ 17 - 20 Lyase (P450c17) und 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -Isomerase (3β HSD) katalysiert, welche im glatten endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind (MILLER, 1987; PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996; MILLER, 2002; STOCCO und MCPHAUL, 2006). P450c17 wandelt C_{21} -Steroide zu C_{19} -Steroiden um, also entweder Pregnenolon zu DHEA oder Progesteron zu Androstendion (HALL, 1991; PAYNE und HALES, 2004), während 3β HSD die für alle biologisch aktiven Steroidhormone essentielle Umwandlung von Δ^5 - 3β -Hydroxysteroiden zu Δ^4 - 3 -Ketosteroiden katalysiert (PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996; PAYNE und HALES, 2004; STOCCO und MCPHAUL, 2006). Für letzteres sind 2 aufeinanderfolgende Reaktionen notwendig: Der Entzug von Wasserstoff an der 3β -Hydroxy-Gruppe und anschließend die Isomerisierung der Doppelbindung zwischen C_5 und C_6 auf C_4 und C_5 (PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996; STOCCO und MCPHAUL, 2006). Beide Enzym-Aktivitäten sind in einem einzigen Protein zu finden (PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996; STOCCO und MCPHAUL, 2006), die Zwischenstufe verläßt dabei das Enzym nicht (PAYNE und HALES, 2004). Als Substrat für 3β HSD sind sowohl C_{21} - als auch C_{19} -Steroide möglich (SAEZ, 1994). Abhängig vom Zelltyp (PAYNE und HALES, 2004) sind auch mitochondriale Formen von 3β HSD vorhanden (STOCCO, 2001; PAYNE und HALES, 2004; STOCCO und MCPHAUL, 2006), dann kann eine Umwandlung von Pregnenolon zu Progesteron auch direkt in den Mitochondrien stattfinden (STOCCO, 2001; STOCCO und MCPHAUL, 2006). Das Enzym 3β HSD ist sowohl in allen klassischen steroidogenen Geweben als auch in einer Vielzahl nicht-steroidogener Gewebe exprimiert (PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996). Im Hoden ist die Expression von 3β HSD auf die Leydigzellen begrenzt (SAEZ,

1994; PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996; STOCCO, 1996). Speziesabhängig wurden verschiedene 3 β HSD-Isoformen beschrieben (PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996; PAYNE und HALES, 2004; STOCCO und MCPHAUL, 2006), die zwar zueinander eine sehr homologe Aminosäuresequenz aufweisen, aber durch verschiedene Gene kodiert sind (PAYNE und HALES, 2004). Die Expression der verschiedenen Isoformen ist gewebe- und zellspezifisch (PAYNE und HALES, 2004).

Das Enzym P450c17 katalysiert 2 Reaktionen: 17 α -Hydroxylierung und Spaltung zwischen C₁₇ und C₂₀ (MILLER, 1987; HALL, 1988; PAYNE, 1990; HALL, 1991; SAEZ, 1994; PAYNE und YOUNGBLOOD, 1995; STOCCO und MCPHAUL, 2006), wobei die Aktivität der einzelnen Reaktionen in Abhängigkeit des Substrates und der Tierart stark variiert (PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996; CONLEY und BIRD, 1997; STOCCO und MCPHAUL, 2006). Deutliche Unterschiede sind besonders im Hinblick auf die Verwertung der verschiedenen Substrate für die Lyase-Aktivität zu beobachten (CONLEY und BIRD, 1997; PAYNE und HALES, 2004). Diese Unterschiede in der P450c17-Aktivität könnten zumindest teilweise die tierarten-spezifische Wahl des Δ^4 - bzw. Δ^5 -Wegs erklären (PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996).

Daneben bestimmt das Vorhanden- oder Nicht-Vorhandensein der Lyase-Aktivität, ob die Steroidbiosynthese z. B. in der Nebennierenrinde in Richtung des C₂₁-Steroids Cortisol oder in den Gonaden in Richtung der C₁₉-Sexualhormone abläuft (HALL, 1991; MILLER, 2002). Bei vollständiger Abwesenheit dieses Enzyms – wie beispielsweise in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde – werden C₂₁ 17-Deoxysteroide wie Aldosterone gebildet (MILLER, 2002). Während das „rate-limiting“ Transducesom/P450scc-System den quantitativen Regulator der Steroidbiosynthese darstellt, entspricht P450c17 daher dem qualitativen Regulator, der bestimmt, welche Klasse von Steroidhormonen produziert wird (MILLER, 2002; STOCCO und MCPHAUL, 2006). P450c17 ist das einzige bisher beschriebene Cytochrom P450 Enzym, bei dem die multiplen Enzymaktivitäten durch physiologische Prozesse unabhängig voneinander reguliert werden (MILLER, 2002).

Für die beiden aufeinanderfolgenden Reaktionen gibt es eine einzige, aktive Stelle am Enzym (HALL, 1991; PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996; MILLER, 2002). Das Zwischenprodukt verläßt dabei das Enzym nicht (PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996). Als Spaltprodukt der Lyase-Reaktion entsteht Acetaldehyd (HALL, 1991; PAYNE und HALES, 2004). Microsomale P450-Enzyme benötigen, im Gegensatz zu mitochondrialen P450-Enzymen, lediglich eine einzige Flavoprotein-Reduktase, um Elektronen von NADPH auf das Enzym zu übertragen (PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996; STOCCO

und MCPHAUL, 2006). Jede Reaktion benötigt ein NADPH- und ein Sauerstoff-Molekül (PAYNE und HALES, 2004).

Die Expression von P450c17 ist auf steroidogene Gewebe beschränkt, wobei speziesspezifische Unterschiede im Bezug auf die Gewebe-spezifische Expression bestehen (PAYNE, 1990; PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996; PAYNE und HALES, 2004). Im Hoden konnte P450c17-Aktivität bei allen bisher untersuchten Tierarten lediglich in den Leydigzellen nachgewiesen werden (PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996; PAYNE und HALES, 2004). Für das Enzym P450c17 kodiert ein einziges Gen, CYP17 (PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996; MILLER, 2002).

2.3.4 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase

Das microsomale Enzym 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (17 β HSD) katalysiert den finalen Schritt in der Testosteron-Biosynthese, nämlich die Umwandlung von Androstendion zu Testosteron (PURVIS et al., 1981; HALL, 1988; PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996; STOCCO und MCPHAUL, 2006). 17 β HSD wird auch als 17-Ketosteroid-Reduktase bezeichnet (SAEZ, 1994; PAYNE und YOUNGBLOOD, 1995), da sie inaktive 17-Ketosteroide in die aktive 17 β -Hydroxyform umwandelt (PAYNE und HALES, 2004). Diese Reaktion ist reversibel (HALL, 1988; PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996; STOCCO und MCPHAUL, 2006). 17 β HSD wird durch die Anwesenheit des Produkts aktiviert, d. h. Testosteron fördert die Umwandlung von Androstendion zu Testosteron und umgekehrt (HALL, 1988; STOCCO und MCPHAUL, 2006). Viele verschiedene Isoenzyme sind beschrieben, die sich in Enzymaktivität, Substratspezifität und Gewebe-spezifischer Expression unterscheiden (PAYNE und HALES, 2004). Die Isoformen 1, 3 und 7 spielen bei der Biosynthese aktiver, gonadaler Steroidhormone eine Rolle (PAYNE und HALES, 2004), wobei die Typ 3-Isoform spezifisch für Hodengewebe ist (PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996; PAYNE und HALES, 2004; STOCCO und MCPHAUL, 2006).

2.3.5 Möglichkeiten der Metabolisierung von Testosteron

Bei den meisten Tierarten ist Testosteron das hauptsächlich von den Leydigzellen sezernierte Androgen. Dennoch ist eine weitere Metabolisierung von Testosteron durch die Enzyme 17 β HSD (s. o.), 5 α -Reduktase, Cytochrom P450 Aromatase (P450arom) und 7 α -Hydroxylase u. a. in den Leydigzellen möglich (vgl. Abbildung 4), wodurch die Aktivität und Funktion von C₁₉-Steroiden beeinflusst wird (PAYNE und O'SHAUGHNESSY,

1996).

Das Enzym 5 α -Reduktase wandelt Δ^4 -3-Ketosteroid irreversibel zu 5 α -Dihydro-3-Ketosteroiden um (SAEZ, 1994). Im Fall von Testosteron führt dies zur Bildung von Dihydrotestosteron (DHT) (SAEZ, 1994; PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996; STOCCO und MCPHAUL, 2006). Eine 5 α -Reduktase-Aktivität ist v. a. in androgenen Zielgeweben wie der Prostata, aber auch im Hoden vorhanden (SAEZ, 1994; PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996; STOCCO und MCPHAUL, 2006). Besonders während der Entwicklung des Hodens wird dieses Enzym in Leydigzellen exprimiert (PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996). (Vgl. auch Abschnitt 2.1.4)

Durch das Enzym P450arom können C₁₉-Androgene irreversibel zu C₁₈-Östrogenen aromatisiert werden (PAYNE und HALES, 2004). Dadurch wird Testosteron zu Estradiol umgewandelt (PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996). Die Expression von P450arom ist in vielen Geweben nachweisbar (CARREAU et al., 1999; CONLEY und HINSHELWOOD, 2001; PAYNE und HALES, 2004; STOCCO und MCPHAUL, 2006), im Hoden wird P450arom abhängig von Tierart und Alter in Leydigzellen, Sertoli-Zellen und Keimzellen exprimiert (PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996; CONLEY und HINSHELWOOD, 2001; STOCCO und MCPHAUL, 2006). (Vgl. auch Abschnitt 2.1.4)

In der Leber katalysiert das Enzym 7 α -Hydroxylase die irreversible Umwandlung von Testosteron zu 7 α -Hydroxy-Testosteron. Dadurch wird die androgene Aktivität eliminiert. Bei der Ratte konnte dieses Enzym auch im Hoden nachgewiesen werden (PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996).

2.3.6 Regulation der Steroidbiosynthese

Steroidhormone werden nicht in signifikanten Mengen in steroidogenen Zellen gespeichert, eine Steroidsekretion ist daher direkt mit der „de novo“-Synthese von Steroidhormonen verbunden (MILLER, 2002, 2007b). Diese „de novo“-Steroidbiosynthese wird sowohl akut als auch chronisch reguliert. Die akute Regulation findet dabei auf Stufe der Verfügbarkeit von Substraten für die steroidogenen Enzyme, insbesondere durch den Cholesteroltransport ins Mitochondrium, statt, während die chronisch regulierte Stufe die verfügbare Menge dieser Enzyme aufgrund der Transkription der entsprechenden Gene darstellt (MILLER, 2002; HAIDER, 2007; MILLER, 2007b; MIDZAK et al., 2011).

LH ist dabei der wichtigste physiologische Regulator der Androgenproduktion im Hoden (HALL, 1988). Es stimuliert die Steroidbiosynthese in den Leydigzellen (VAN DER

MOLEN und EIK-NES, 1971; PURVIS et al., 1981; AMANN, 1986; HALL, 1988; PAYNE, 1990; LAVOIE und KING, 2009), und zwar schon vor der Pregnenolon-Synthese in den Mitochondrien (VAN DER MOLEN und EIK-NES, 1971; HALL, 1988). LH stimuliert also den Transport von Cholesterol zur IMM (HALL, 1988; MIDZAK et al., 2011). LH fördert außerdem die Synthese von steroidogenen Enzymen (HALL, 1988) und von StAR-Protein (CLARK et al., 1994; AMORY und BREMNER, 2001; STOCCO und MCPHAUL, 2006). Eine chronische LH-Stimulation der Leydigzellen ist essentiell für die optimale Expression der steroidogenen P450 Enzyme (PAYNE, 1990; PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996).

LH bindet an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Leydigzellen, das resultiert in vermehrter Produktion von intrazellulärem zyklischen 3',5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) (PURVIS et al., 1981; HALL, 1988; PAYNE, 1990). cAMP wird nach Aktivierung der Adenylatzyklase aus Adenosintriphosphat (ATP) gebildet und bindet dann an die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A (PKA) (PURVIS et al., 1981). Diese katalysiert daraufhin die Phosphorylierung von intrazellulären Proteinen (PURVIS et al., 1981; HALL, 1988; RONE et al., 2009). Durch diese posttranslationale Modifikation wird die Funktion von Proteinen verändert (HALL, 1988), so werden z. B. die HSL (HALL, 1988; LISCUM und DAHL, 1992; CLARK et al., 1994; RONE et al., 2009) und die cholesteroltransport-vermittelnden Proteine des Transducesoms cAMP-abhängig mittels Phosphorylierung aktiviert (RONE et al., 2009). cAMP spielt also eine zentrale Rolle bei Produktion und Sekretion von testikulären Steroiden (EIK-NES, 1971; VAN DER MOLEN und EIK-NES, 1971; HALL, 1988). Es führt zu erhöhter Lipid- und Proteinsynthese (RONE et al., 2009).

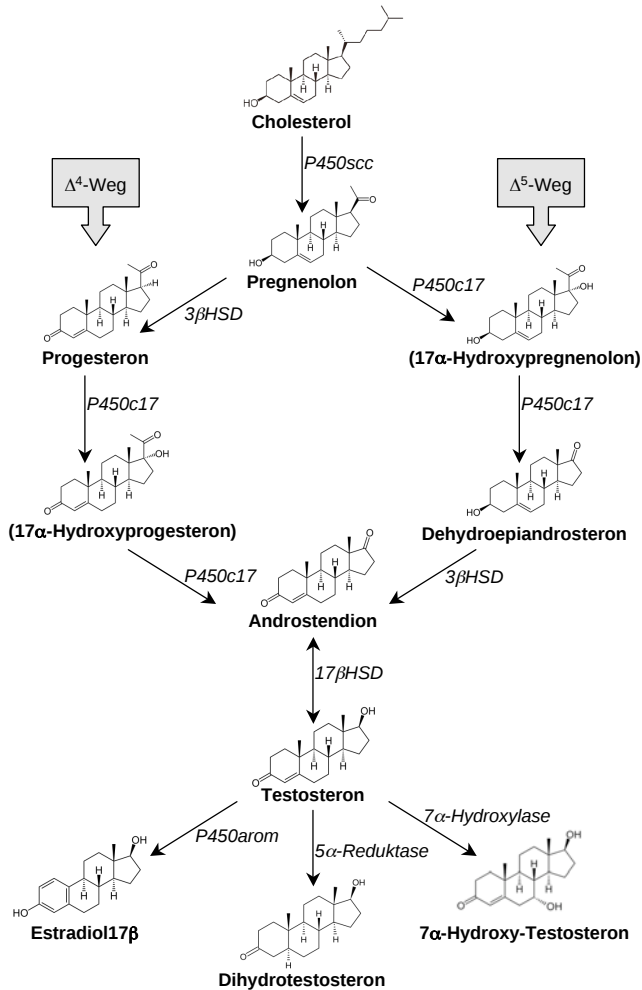


Abbildung 4: Schematische Darstellung der testikulären Steroidbiosynthese
P450scc: Cytochrom P450 side chain cleavage, 3 β HSD: 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -Isomerase, P450c17: Cytochrom P450 17 α -Hydroxylase/17,20-Lyase, 17 β HSD: 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, P450arom: Cytochrom P450 Aromatase

3 Material und Methoden

Eine Beschreibung aller verwendeten Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Puffer und Lösungen sowie spezieller verwendeter Geräte findet sich im Anhang.

3.1 Versuchsdesign

Zur reversiblen Downregulation der endokrinen und germinativen Hodenfunktion (vgl. Abschnitt 2.2) wurde bei 30 adulten, geschlechtsgesunden Beagle-Rüden ein entfernbares slow-release-Implantat („Gonazon[®]“) subkutan in der Paraumbilicalgegend platziert, welches als Wirkstoff 18,5 mg des GnRH-Agonisten „Azagly-nafarelin“ enthielt. Vor sowie 4 und 8 Wochen nach Einsetzen des Implantats wurde den Hunden Blut zur Hormonanalyse entnommen.

Entsprechend den bei LUDWIG et al. (2009) gemachten Erfahrungen wurde das Implantat 5 Monate später, im Zustand der Downregulation, unter Lokalanästhesie entfernt. Zur Erfassung des danach einsetzenden Ingangkommens der Hodenfunktion (Rekrudescenz) wurden nachfolgend jeweils 3–4 Rüden im Abstand von 3 Wochen chirurgisch kastriert und die Hoden für die weiterführenden morphologischen und molekularbiologischen Untersuchungen konserviert (siehe Abschnitt 3.4). Weiterhin wurden im Zeitraum ab der Entfernung des Implantats bis zur Kastration wöchentlich Blutproben zur Hormonanalyse entnommen. Die Zuordnung der Rüden zu den Kastrationszeitpunkten (siehe Tabelle 1) erfolgte randomisiert.

Statt „Gonazon[®]“ kam bei 3 weiteren Beagle-Rüden das den GnRH-Agonisten Buserelinacetat (6,6 mg) enthaltende Implantat „Profact[®] Depot“ zur Anwendung. Die chirurgische Kastration erfolgte ebenfalls nach 5 Monaten im Zustand der Downregulation, ebenso wie Blutprobenentnahmen zur Hormonanalytik zum Zeitpunkt der Implantat-Applikation, 4 und 8 Wochen danach sowie bei der Kastration.

Als Kontrolle dienten die Hoden von 5 unbehandelten, adulten, geschlechtsgesunden Beagle-Rüden, bei denen vor der Kastration eine Blutentnahme stattgefunden hatte.

Auch die Hoden der mit „Profact[®] Depot“-behandelten Hunde sowie der Kontrollhunde

wurden, wie in Abschnitt 3.4 beschrieben, für weiterführende Untersuchungen konserviert.

In Zusammenarbeit mit der Klinik für Geburtshilfe und Gynäkologie, Veterinärmedizinische Fakultät der Uludag Universität (Bursa, Türkei) konnten von 3 zur Kastration vorgestellten, 2 Monate alten, juvenilen Mischlingsrüden die Hoden gewonnen werden. Die Fixierung der Hoden fand vor Ort nach dem in Abschnitt 3.4 beschriebenen Protokoll und unter Verwendung von Fixierlösungen der gleichen Zusammensetzung statt.

3.2 Tierversuchsantrag

Der Tierversuch (subkutane Applikation eines GnRH-haltigen Implantats, Implantatentfernung, Blutprobenentnahmen und chirurgische Kastration der Rüden zu definierten Zeitpunkten) wurde bei der zuständigen Behörde (Regierungspräsidium Gießen) angezeigt und unter dem Aktenzeichen AZ V54-19c20/15c GI18/14 genehmigt.

3.3 Einteilung der Hunde in Gruppen und Zuordnung zu Kollektiv 1 und 2

Die randomisierte Zuführung der einzelnen, mit „Gonazon®“ behandelten Rüden zu den Kastrationszeitpunkten ergibt sich aus Tabelle 1. Entgegen den ursprünglichen Erwartungen wiesen die einem Kastrationszeitpunkt zugeordneten Tiere z. T. erhebliche Unterschiede hinsichtlich der Rekrudescenz der Spermatogenese auf.

Die Zuordnung dieser Rüden zu Gruppen erfolgte demnach, basierend auf den histomorphologischen Untersuchungen von SPANG (2012, in Vorbereitung), nach dem Stand der Spermatogenese, wobei folgende Entwicklungsgruppen („developmental group“, DG), orientiert an den am weitesten entwickelten Stadien der Spermatogenese, definiert wurden:

- DG A Spermatozyten
- DG B runde Spermatiden
- DG C elongierende Spermatiden
- DG D elongierte Spermatiden

Die mit „Profact® Depot“ behandelten und die 2 Monate alten, unbehandelten Hunde wurden jeweils als eigene Gruppe erfasst („Profact group“, PG bzw. „juvenile group“, JG). Als Kontrollgruppe („control group“, CG) dienten die adulten, unbehandelten Beagle-Rüden. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die Zuordnung der Hunde und die daraus

resultierenden Gruppengrößen. Diese zeigt eine ungleiche Verteilung der Hunde auf die DGs mit einer Häufung in Gruppe DG D. Um eine annähernde Gleichgewichtung der Gruppen bei der späteren statistischen Auswertung zu erhalten, wurden daher aus der Gruppe DG D 5 Tiere nach dem Zufallsprinzip ausgewählt (in Tabelle 2 *kursiv* dargestellt) und in die weiteren Untersuchungen einbezogen.

In zwei ersten Mitteilungen (SPANG et al., 2008; GOERICKE-PESCH et al., 2009) wurde über diese den vorliegenden Untersuchungen zugrunde liegenden Zuordnungs- und Auswahlkriterien berichtet. Dort findet sich auch Abbildung 5, in der exemplarisch die Entwicklungsstadien der Rekrudescenz der Spermatogenese dargestellt sind.

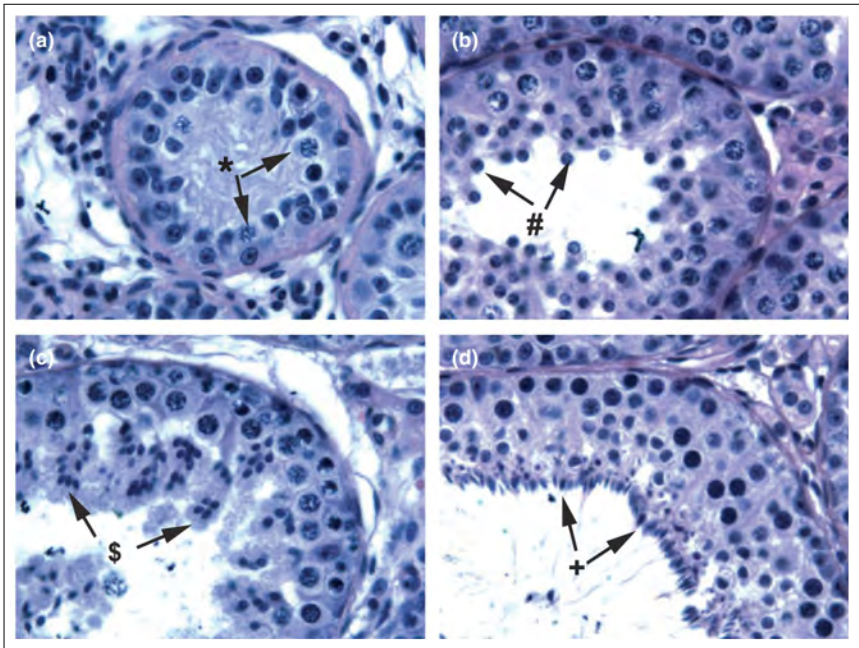


Abbildung 5: Entwicklungsstadien der Rekrudescenz der Spermatogenese,
 (a) DG A, * Spermatozyten, (b) DG B, # runde Spermatiden,
 (c) DG C, \$ elongierende Spermatiden, (d) DG D, + elongierte Spermatiden,
 400-fache Vergrößerung, Quelle: GOERICKE-PESCH et al., 2009

Tabelle 1: Zuordnung der Hunde zu den Kastrationszeitpunkten

Kastrationszeitpunkt	Hunde
Woche 0 (Entfernung des Implantats)	Percy, Nick, Luca
Woche 3 nach Entfernen des Implantats	Elias, Speedy, TheoH, LeoB
Woche 6 nach Entfernen des Implantats	Spikey, Strolch, Snoopy, LeoS
Woche 9 nach Entfernen des Implantats	Joni, Mortimer, Bruno, JoschiF
Woche 12 nach Entfernen des Implantats	Shy, Captain Kirk, Elliot
Woche 15 nach Entfernen des Implantats	Kaspar, Berry, Monty
Woche 18 nach Entfernen des Implantats	Bobby, Lucky, Lex
Woche 21 nach Entfernen des Implantats	Pawlow, Feivel, Bogus
Woche 24 nach Entfernen des Implantats	TheoJ, JoschiP, Sydney

Tabelle 2: Gruppeneinteilung der Hunde

Gruppe	Hunde	Anzahl
JG	Jack, William, Averell	3
PG	Sid, Floh, Hansi	3
DG A	Elias, Nick, Percy, Luca	4
DG B	LeoB, Joni, TheoH	3
DG C	Speedy, Spikey, Snoopy, Strolch, LeoS, Mortimer	6
DG D	<i>Bruno*</i> , JoschiF, <i>Shy*</i> , Captain Kirk, Elliott, Kaspar, <i>Berry*</i> , Monty, Bobby, Lucky, Lex, Pawlow, <i>Feivel*</i> , Bogus, TheoJ, Joschi, <i>Sydney*</i>	17 bzw. 5*
CG	Ben, Tom, Charly, Soto, Horst	5

*) für die weiteren Untersuchungen herangezogene Tiere

Im Hinblick auf die Erfassung von Änderungen in der Steroidogenesekapazität im Verlauf der Rekrudescenz der Spermatogenese wurden die Gruppen DG A, B, C und D sowie CG als „Kollektiv 1“ bezeichnet; zur näheren Charakterisierung des Zustandes der Downregulation wurden die Gruppen JG, PG und DG A als „Kollektiv 2“ bezeichnet wurden.

3.4 Probengewinnung und -konservierung

Die chirurgische Kastration der Beagle-Rüden fand nach dem in der Klinik etablierten Standardverfahren unter Allgemeinnarkose statt. Die Kastration erfolgte bedeckt. Unmittelbar nach Entnahme wurde das Präparat zunächst in 4 °C-kaltem Phosphatpuffer gewaschen, wonach der Hoden freipräpariert wurde. Dieser wurde anschließend mit einer sterilen Skalpellklinge zur Längsrichtung geviertelt, ohne das Gewebe unnötig zu quetschen und die Viertel wurden in max. $1,0 \times 1,0 \times 1,0$ cm große Stücke geschnitten.

Ein Teil dieser Gewebestücke wurde in frisch angesetzter Bouin'scher Lösung in Probenröhrchen 24 Stunden bei 4 °C fixiert. Zum Auswaschen des Fixans wurden sie anschließend 3 Tage lang täglich, danach bis zur Einbettung in Paraffin alle 2 Tage mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und in 70 %-igem Ethanol bei 4 °C gelagert. Die Einbettung in Paraffin erfolgte mit Hilfe eines Einbettautomaten und einer Paraffinausgießstation am Institut für Veterinär Anatomie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die Paraffinblöcke lagerten nachfolgend bei 4 °C.

Ein weiterer Teil der Gewebestücke wurde zügig für die RNA- und Proteinextraktion konserviert. Dazu wurde das Gewebe nach Entfernung der Tunica albuginea mit einer Skalpellklinge auf einer sterilen Aluminiumfolie in kleine Würfel mit einer Kantenlänge von max. 0,5 cm geschnitten und 24 Stunden bei 4 °C in der 7-fachen Menge RNAlater® in 15 ml-Tubes inkubiert. Nachfolgend wurde die RNAlater®-Lösung entfernt, das Gewebe in kleinen Portionen in sterile Aluminiumfolie verpackt und bis zur weiteren Verarbeitung bei –80 °C gelagert.

Aus dem Patientengut der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere sowie dem Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie stammten das Ovar bzw. Corpus luteum einer Hündin, ein Teil einer Rinderplazenta sowie die Hoden von Maus, Ratte und Rind. Das Institut für Veterinär-Pathologie stellte außerdem die Nebenniere eines Hundes zur Verfügung. Alle Proben wurden wie oben beschrieben konserviert.

Für die Hormonanalysen wurde das Blut nach lege artis-Punktion der Vena cephalica antebrachii in Lithium-Heparin-Röhrchen (4,5 ml) aufgefangen, bei 4000 rpm (1500g) und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand in Kunststoffröhrchen verbracht. Das so gewonnene Plasma wurde bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C aufbewahrt.

3.5 Hormonanalytik

Die Bestimmung von Testosteron, LH und FSH im Blutplasma erfolgte durch das Endokrinologische Labor der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere der Justus-Liebig-Universität Gießen nach etablierten Methoden (Standard Operating Procedures), die in der Routinediagnostik eingesetzt werden.

3.5.1 Bestimmung von Testosteron im Blutplasma

Die Konzentration von Testosteron wurde nach Extraktion mit Toluol mittels eines kompetitiven Radio-Immuno-Assay (RIA) – wie bei RÖCKEN et al. (1995) beschrieben – bestimmt. Das verwendete Antiserum (Gi-Testosteron-I) war gegen 4-Androsten 11 α , 17 β -diol-3on-11-HS-BSA gerichtet und stammte vom Kaninchen. Als Tracer wurde ^3H -Testosteron verwendet. Nach Abtrennung des freien Testosterons mittels Kohlesuspension und Zentrifugation, wurde der Überstand mit Szintillationsflüssigkeit versetzt und die ^3H -Impulse in einem Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

Die Standardkurve bestand aus 8 Kurvenpunkten im Bereich von 0,06–7,4 ng/ml. Der Assay wies eine untere Nachweisgrenze im Bereich von 0,1 ng/ml auf, die Intra- und Interassayvariationskoeffizienten lagen zwischen 7,8 und 9,0 % (LUDWIG, 2008).

Folgende Kreuzreaktionen sind bei RÖCKEN et al. (1995) beschrieben: Dihydrotestosteron 47 %, Androstendion 0,84 %, 17 α -Hydroxyprogesteron 0,49 %, Progesteron 0,02 %, Estradiol-17 β 0,04 %, Estron, Estriol, Cortisol, Pregnenolon, Dehydroepiandrosteron jeweils unter 0,01 %.

3.5.2 Bestimmung von LH im Blutplasma

Für die Ermittlung der LH-Konzentration wurde ein im oben genannten Labor etablierter heterologer, kompetitiver Enzym-Immuno-Assay (EIA) verwendet (JÄGER, 2006).

Für diesen „Solid-Phase-Assay“ wurden Mikrotiterplatten mit einem Ziege-anti-Maus IgG Fc-spezifischen-Antikörper beschichtet, als 1. Antikörper diente ein monoklonaler Antikörper aus der Maus, der gegen bovines LH gerichtet war. Biotinyliertes bovines LH wurde als Tracer, ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat für die Umsetzung des Farbsubstrates Phenylendiamin und canines LH als Standard verwendet. Nach Abstopfung der Farbreaktion durch Zugabe von H_2SO_4 wurde die Extinktion bei 450 nm gemessen (JÄGER, 2006).

Die Standardkurve erstreckte sich über einen Bereich von 0,2–6,4 ng/ml, die mittlere untere Nachweisgrenze lag im Bereich von 0,1 ng/ml, der Interassayvariationskoeffizient zwischen 12,7 und 17,3 % (LUDWIG, 2008). Der Intraassayvariationskoeffizient befand sich laut JÄGER (2006) zwischen 9,77 und 18,59 %.

3.5.3 Bestimmung von FSH im Blutplasma

Für die Bestimmung von FSH kam ein kommerziell erhältlicher, hundespezifischer FSH-Enzyme-linked Immunosorbent-Assay (ELISA) (EIA-4536, DRG International Inc.) zum Einsatz. Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerangaben.

Die im Test-Kit enthaltenen Mikrotiterplatten waren mit einem monoklonalen Maus-anti-Hund FSH-Antikörper beschichtet. Ein zweiter peroxidase-konjugierter, monoklonaler Maus-anti-Hund FSH-Antikörper und das Farbsubstrat Tetramethyl-Benzidine dienten zur Detektion des an den ersten Antikörper gebundenen FSHs. Durch Zugabe der „Stop Solution“ (H_2SO_4) wurde die Farbumsetzung beendet und die Farbintensität anschließend in einem Photometer bei 450 nm gemessen.

Für die Standardkurve wurde das mitgelieferte canine FSH in einem Bereich von 0–50 ng/ml verwendet. Die untere Nachweisgrenze lag im Bereich von 0,1 ng/ml, die Intra- bzw. Interassayvariation laut Herstellerangaben zwischen 3,5 und 7,8 % bzw. 3,95 und 10,06 %.

Der Assay wies laut Herstellerangaben folgende Kreuzreaktivitäten auf: Canines FSH 100 %, Canines LH 6,2 %, Canines TSH 8,7 %

3.6 Ausmessung der Fläche der Leydigzellkerne

3.6.1 Vorbereitung der Gewebeschnitte

Die Vermessung der Leydigzellkerne erfolgte an bouinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe, von dem 5 µm dicke Gewebeschnitte mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms angefertigt und auf kommerziell erhältliche, beschichtete Objektträger aufgezogen wurden.

3.6.2 Hämatoxylin-Eosin (HE) - Färbeprotokoll

Zum Entparaffinieren wurden die Schnitte 20 Minuten in Xylol inkubiert und anschließend in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert. Dazu wurden die Schnitte jeweils 5 Minuten

in 99,8 %-, 96 %-, 80 %-, 70 %-, 60 %- und 50 %-igem Ethanol inkubiert und anschließend 5 Minuten lang in Aqua bidest gespült.

Für den ersten Färbeschritt wurden die Schnitte mit jeweils 100 µl Hämatoxylin (1:1) überschichtet. Der positiv geladene Farbstoff bindet an negativ geladene DNA-Bestandteile, wodurch v. a. die Zellkerne blau angefärbt werden (LANG, 2006). Nach der 10-minütigen Inkubationszeit wurden die Gewebeschnitte 10 Minuten lang in fließendem Leitungswasser „gebläut“.

Der zweite Färbeschritt bestand aus einer 5-minütigen Inkubation in 1 %-igem Eosin. Dieser rote Farbstoff ist negativ geladen, dadurch färbt er positiv geladene Gewebestandteile (LANG, 2006). Überschüssiger Farbstoff wurde anschließend durch eine kurze Spülung in Leitungswasser entfernt.

Zur Dehydrierung wurden die Schnitte kurz in 80 %- und 96 %-igem Ethanol und 5 Minuten in 99,8 %-igem Ethanol inkubiert. Nach 2×10 Minuten Inkubation in Xylol wurden die Gewebeschnitte mit ASSISTENT-Histokitt eingedeckelt und nach ca. 10 Minuten mit Bleiklötzchen beschwert.

3.6.3 Messung der Zellkerne

Für die mikroskopischen Untersuchungen standen ein Durchlichtmikroskop inklusive Kameraaufsatz der Firma Leica sowie ein Pentium PC mit Bildschirm und die Software „Leica Image Manager IM1000“ zur Verfügung.

Jedes HE-gefärbte Präparat wurde lichtmikroskopisch bei 400-facher Vergrößerung määnderförmig durchmustert. Dabei wurden solche Gesichtsfelder digitalphotographisch festgehalten, in denen Leydigzellen gut und eindeutig zu identifizieren waren. Kriterien für die Differenzierung von Leydigzellen waren in Anlehnung an HALL (1988)

runde bis ovale Zellkerne,
1–2 deutlich sichtbare Nucleoli,
sowie das Vorhandensein eines Heterochromatinsaumes am Zellkern und
eines deutlichen, eosinophilen Zytoplasmas mit teilweise sichtbaren Vesikeln.

An den abgespeicherten Bildern wurden pro Hund 100 Leydigzellkerne vermessen. Bei jedem Zellkern wurden der Längsdurchmesser (a) und der Querdurchmesser (b) in µm erfasst, wobei die beiden Messlinien a und b annähernd im rechten Winkel zueinander stehen mussten (Abbildung 6). Diese Auswertung erfolgte ebenfalls mit der

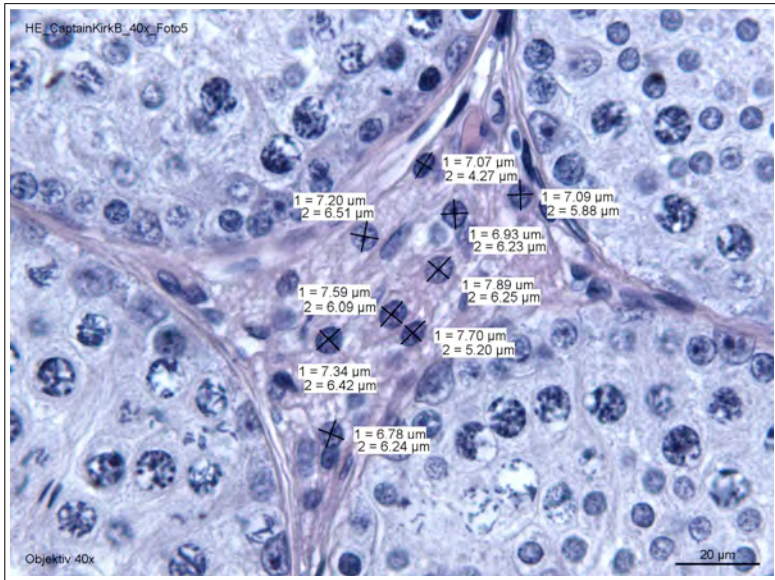


Abbildung 6: Beispielhafte Darstellung der Vermessung der Leydigzellkerne in HE-gefärbten Gewebeschnitten, 400-fache Vergrößerung

Software „Leica IM1000“. Anschließend wurden die Flächen A der einzelnen Zellkerne näherungsweise mit Formel 1 berechnet. Aus den 100 Einzelwerten resultierte für jeden Hund der arithmetische Mittelwert $\bar{x}$ und die Standardabweichung SD .

$$A = \frac{1}{2}a \times \frac{1}{2}b \times \pi \quad (1)$$

3.7 Western Blot zur Überprüfung der Spezifität der in der Immunhistochemie eingesetzten Primärantikörper

3.7.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten aus Gewebe

Eine erste Zerkleinerung des in Aluminiumfolie verpackten, bei -80°C gelagerten Gewebes erfolgte durch 1–2 Hammerschläge auf einem sauberen Untergrund. Die entstandenen Gewebesplitter wurden schnell aus der Aluminiumfolie entnommen, in einen mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten, sterilen Porzellanmörser verbracht und mit einem sterilen Porzellanpistill in flüssigem Stickstoff weiter zerrieben. Bis zu 200 mg des entstandenen Gewebepulvers wurden in ein 2 ml-Reaktionsgefäß abgewogen und mit 1 ml kaltem Protease-Inhibitor-Cocktail vermischt. Dieses Puffer-Gewebepulver-Gemisch wurde 3×20 Sekunden mit einem Ultra Turrax® homogenisiert. Anschließend wurde 50 mg SDS dazugegeben und das Homogenat nach kräftigem Schütteln 10 Minuten lang im Wasserbad gekocht. Danach wurden noch verbliebene gröbere Bestandteile über 10 Minuten bei 3500 rpm (1200g) und 4°C abzentrifugiert, der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Vom Kochschritt abgesehen, fanden alle Arbeitsschritte möglichst auf Eis statt. Der Protease-Inhibitor-Cocktail wurde am Tag der Extraktion frisch hergestellt und wie die verwendeten Behältnisse und Geräte auf Eis gekühlt.

3.7.2 Isolierung von Mitochondrien aus Gewebe

Die Extraktion von mitochondrialem Protein wurde in Anlehnung an ein von BUSTAMANTE et al. (1977) beschriebenes Protokoll durchgeführt. Auch hierfür wurde in Aluminiumfolie verpacktes, bei -80°C gelagertes Gewebe – wie in Abschnitt 3.7.1 beschrieben – vorzerkleinert und in flüssigem Stickstoff gemörsert. Bis zu 500 mg des daraus resultierenden Gewebepulvers wurden in einen Glashomogenisator gegeben, mit 2 ml 4°C -kaltem Tris-Sucrose-Puffer überschichtet und 20×1 Sekunde mit dem dazugehörigen Teflon-Pistill bei 1000 rpm homogenisiert.

Das Gewebehomogenat wurde auf zwei 2 ml-Reaktionsgefäße verteilt und 3 Minuten bei 3200 rpm (1100g) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, das Pellet wurde in 0,5 ml Tris-Sucrose-Puffer (4°C) resuspendiert, mit Hilfe eines Micropistills manuell homogenisiert und erneut bei 3200 rpm (1100g) zentrifugiert. Dieser Arbeitsschritt wurde $1 \times$ wiederholt, wobei die Überstände in einem

Reaktionsgefäß gepoolt wurden und das letzte Pellet, welches v. a. Zellkerne und nicht homogenisierte Zellmassen enthielt, verworfen wurde.

Der gesammelte Überstand wurde 15 Minuten lang bei 8200 rpm (6800*g*) zentrifugiert, der Überstand verworfen, das entstandene Pellet in 1 ml Tris-Sucrose-Puffer (4 °C) resuspendiert und für 10 Minuten bei 14000 rpm (20000*g*) zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen, das Pellet in 1 ml Tris-Sucrose-Puffer (4 °C) resuspendiert und bei 5400 rpm (3000*g*) 3 Minuten lang zentrifugiert.

Danach wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, das Pellet in 1 ml Tris-Sucrose-Puffer (4 °C) gewaschen und erneut bei 5400 rpm (3000*g*) 3 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde in das neue Reaktionsgefäß dazupipettiert und das entstandene Pellet, welches u. a. die restlichen Zellkerne enthielt, wurde verworfen.

Um nun die Mitochondrien abzutrennen, wurde der gesammelte Überstand für 15 Minuten bei 14000 rpm (20000*g*) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das resultierende Pellet in 1 ml Tris-Sucrose-Puffer (4 °C) resuspendiert und 20 Minuten lang bei 14000 rpm (20000*g*) zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen, das Pellet enthielt die aufgereinigten Mitochondrien. Diese wurden in 100 µl NET-2-Gebrauchslösung resuspendiert und dadurch aufgelöst.

Alle Arbeitsschritte fanden, wenn möglich, auf Eis und die Zentrifugationsschritte bei 4 °C statt.

3.7.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe eines UV-Photometers. Nach Kalibrierung des Photometers mit einem Albumin-Standard (2000 µg/ml) wurde die Extinktion bei 280 nm in Kunststoff-Einmalküvetten gemessen und durch das Photometer in die entsprechende Proteinkonzentration umgerechnet. Als Nullwert („blank“) wurde Protease-Inhibitor-Cocktail bzw. NET-2-Gebrauchslösung verwendet.

Anhand der gemessenen Konzentration wurde mit 1×PBS-Puffer eine Arbeitsverdünnung in der Konzentration 10 µg/µl hergestellt. Da die Isolierung von mitochondrialem Protein zu einer vergleichsweise niedrigen Proteinkonzentration führte, wiesen die entsprechenden Arbeitsverdünnungen teilweise eine geringere Proteinkonzentration auf. Alle Arbeitsverdünnungen wurden bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C aufbewahrt; der unverdünnte Proteinextrakt wurde aliquotiert und bei –80 °C gelagert.

3.7.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese – Auftrennung der Proteine nach molekularer Masse

Zur Herstellung der Polyacrylamid-Mini-Gele in der Größe $100 \times 105 \times 0,75$ mm fand die Gießvorrichtung Mighty Small™ SE 245 Dual Gel Caster Verwendung. Vor dem Zusammenbau gemäß den Angaben des Herstellers wurden alle Bestandteile der Gießvorrichtung, die mit dem Gel in Berührung kommen, gründlich gereinigt und mit einem in 99,8 %-iges Ethanol getränkten, fusselfreien Tuch entfettet. Für das Trenngel wurden Acrylamidlösung, Trenngelpuffer und Aqua bidest zuerst in einem Erlenmeyerkolben mit Vakuumausgang vermischt und dann 3 Minuten lang im Wasserstrahlvakuum entgast. Erst danach erfolgte die Zugabe und Untermischung von SDS, APS und TEMED. Die so hergestellte Trenngellösung wurde sofort luftblasenfrei in die Gelkassette eingefüllt, sodass der Flüssigkeitsspiegel bis ca. 3 cm unter den oberen Rand der Gelkassette reichte, und mit 1 ml Isopropanol überschichtet, damit sich eine ebene Grenzfläche während der Polymerisation ausbildete.

Nach der 45-minütigen Polymerisation bei Raumtemperatur wurde das Isopropanol abgegossen und mit Aqua bidest ausgespült, Flüssigkeitsreste wurden mit einem Filterpapier entfernt. Nachfolgend wurde die Sammelgellösung (Herstellung wie für die Trenngellösung beschrieben) bis zum oberen Rand der Gelkassette eingefüllt und die kammförmige Schablone für die Ausbildung der Probestaschen eingesetzt.

Nach 30 Minuten Polymerisationszeit wurde die Schablone vorsichtig entfernt und die Probestaschen mit $1 \times$ Elektrodenpuffer gespült. Die Gelkassette wurde dann aus der Gießvorrichtung entnommen und nach Herstellerangaben in die vertikale Elektrophoresekammer Mighty Small™ SE 260 eingespannt, die anschließend mit auf 4°C -geköhltem $1 \times$ Elektrodenpuffer gefüllt wurde.

Während der Polymerisation des Sammelgels fand die Vorbereitung der Proteinproben für die Elektrophorese statt. Die Arbeitsverdünnungen (Proteinkonzentration $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) wurden auf Eis aufgetaut und die benötigte Menge (pro Probestasche 50–100 μg Protein) im Verhältnis 3:1 (Probe:Puffer) mit Probenauftragspuffer vermischt. Unmittelbar im Anschluss daran erfolgte die Hitzedenaturierung der Proben für 3 Minuten bei 100°C im Wasserbad.

Die so vorbereiteten Proteinproben wurden, ebenso wie ein Proteinstandard, durch den $1 \times$ Elektrodenpuffer hindurch auf den Boden der Probestaschen pipettiert. Nach Schließen der Elektrophoresekammer wurde die Elektrophorese (unter Kühlung laut

Herstellerangaben) bei einer konstanten Stromstärke von 15 mA und einer maximalen Spannung von 300 V gestartet. Nachdem die Bromphenolblau-Front (aus dem Probenauftragspuffer) das Trenngel erreicht hatte, wurde die Stromstärke auf 25 mA erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Bromphenolblau-Front den unteren Gelrand erreicht hatte.

3.7.5 Elektroblothing – Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Membran

Direkt nach Beenden der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mit Hilfe der Tank-Blot-Apparatur Mini Trans-Blot® aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen.

Dafür wurde ein entsprechend großes Stück PVDF-Membran zugeschnitten, 10 Sekunden lang in Methanol geschwenkt und 20 Minuten lang in Transferpuffer äquilibriert. Ebenso wurden 4 zurechtgeschnittene, handelsübliche Schwammtücher und 4 dicke Filterpapiere für 20 Minuten in Transferpuffer getränkt.

Die Gel-Kassette wurde aus der Elektrophoresekammer entnommen und geöffnet, das Sammelgel mit einem Skalpell abgetrennt und das Trenngel 10 Minuten lang in Transferpuffer geschwenkt. Das zur Tank-Blot-Apparatur gehörige Kunststoffgitter wurde in eine ca. 1 cm hoch mit Transferpuffer gefüllte Schale gelegt und die einzelnen Komponenten des sog. Blot-Sandwich wurden in folgender Reihenfolge luftblasenfrei aufeinander platziert:

- Kunststoffgitter (schwarze Seite)
- 2 Schwammtücher
- 2 Filterpapiere
- Trenngel
- PVDF-Membran
- 2 Filterpapiere
- 2 Schwammtücher

Daraufhin wurde das Blot-Sandwich mit der durchsichtigen Seite des Kunststoffgitters zusammengepresst und mit dem Verschluss verriegelt. Die Tank-Blot-Apparatur wurde mit 4 °C-kaltem Transferpuffer gefüllt, Blot-Sandwich und zugehöriges Kühlelement nach Angaben des Herstellers in der Halterung befestigt und der Transfertank verschlossen. Auf dem Boden der Apparatur befand sich ein Magnetrührstab und die gesamte Apparatur stand auf einen Magnetrührer, um eine gleichmäßige Kühlung des Transferpuffers zu

gewährleisten. Der Proteintransfer erfolgte über 1 Stunde bei einer konstanten Spannung von 100 V. Die maximale Stromstärke wurde auf 300 mA festgesetzt.

Nach Beenden des Blottingvorgangs wurde das Blot-Sandwich aus der Apparatur genommen und geöffnet. Die PVDF-Membran wurde vorsichtig mit der dem Gel zugewandten Seite nach oben auf ein Filterpapier gelegt und bei Raumtemperatur mindestens 30 Minuten lang vollständig getrocknet.

3.7.6 Überprüfung des Proteintransfers mittels Ponceau-S-Färbung

Ponceau-S färbt unspezifisch Proteine auf der Membran an, sodass kontrolliert werden kann, ob Proteine auf die Membran übertragen worden sind. Zusätzlich fixiert die in der Färbelösung enthaltene Trichloressigsäure die Proteine auf der Membran (REHM und LETZEL, 2010). Nach kurzem Schwenken in Methanol wurde die PVDF-Membran 3 Minuten lang in Ponceau-S-Arbeitslösung inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde unter visueller Kontrolle etwa 1 Minute lang mit reichlich Aqua bidest ausgewaschen, bis nur noch die Proteinbanden angefärbt waren. Anschließend wurde die Membran zügig, ohne zu trocknen, mit einer Skalpellklinge zugeschnitten und in $1 \times$ PBS-Puffer vollständig entfärbt.

3.7.7 Nachweisreaktion

Dem angewandten Protein-Nachweisverfahren lag folgendes Reaktionsschema zugrunde:

1. Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen
2. Bindung des Primärantikörpers an Epitope
3. Bindung eines biotinylierten Sekundärantikörpers an den Primärantikörper
4. Bindung eines peroxidase-konjugierten Avidin-Biotin-Komplexes an Biotin-Moleküle des Sekundärantikörpers, Signalverstärkung durch Avidin-Biotin-System
5. Substratumsetzung durch Peroxidase, Visualisierung der gebundenen Reagenzien

Im Einzelnen wurde wie folgt vorgegangen:

Zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen inkubierte die Membran über Nacht bei 4°C in PBS-Blotto. Am nächsten Tag wurde die Membran kurz in 0,2%-igem PBST-Puffer gewaschen und anschließend 2 Stunden lang bei Raumtemperatur in einer kleinen Inkubationsschale mit dem jeweiligen Primärantikörper, verdünnt in PBS-Blotto,

geschwenkt. Dabei musste die Membran von der Antikörperlösung ausreichend bedeckt sein.

Folgende Primärantikörper wurden verwendet:

- StAR-Protein: polyklonaler Kaninchen-anti-Maus Antikörper,
Prof. D.M. Stocco, Lubbock, USA (CLARK et al., 1994), Verdünnung 1:1000
- P450scc: polyklonaler Kaninchen-anti-Ratte Antikörper,
USBiological, Katalog-Nr. C9095-26 (ROBY et al., 1991), Verdünnung 1:500
- P450c17: polyklonaler Kaninchen-anti-Rind Antikörper,
Prof. A.J. Conley, Davis, USA (PETERSON et al., 2001), Verdünnung 1:500

Nach der 2-stündigen Inkubationszeit wurde die Membran 3×5 Minuten lang mit PBST-Puffer gewaschen, wobei zwischen den einzelnen Waschschritten der Puffer gewechselt wurde.

Zur Detektion des gebundenen Primärantikörpers wurde die Membran über 1 Stunde bei Raumtemperatur unter langsamen Schwenken in der Sekundärantikörperlösung inkubiert. Als Sekundärantikörper diente ein biotinylierter Ziege-anti-Kaninchen-IgG Antikörper (aus Vectastain® Rabbit IgG Elite ABC Kit) in der Verdünnung 1:1000 in PBS-Blotto. Die Entfernung des ungebundenen Antikörpers erfolgte wieder mit drei 5-minütigen Waschungen in PBST-Puffer.

Bei Verwendung des Proteinstandards „Roti®-Mark WESTERN Set“ schloss sich eine 1-stündige Inkubation mit dem 1:1000 verdünnten, gegen den Marker gerichteten und mit Peroxidase konjugiertem Antikörper an, woraufhin die Membran wieder 3×5 Minuten lang mit PBST-Puffer gewaschen wurde.

Im letzten Inkubationsschritt wurde die Membran zur Detektion des biotinylierten Sekundärantikörpers 30 Minuten lang in einem peroxidase-konjugiertem Avidin-Biotin-Komplex (aus Vectastain® Rabbit IgG Elite ABC Kit) geschwenkt, der aus je 2 Tropfen der Lösungen A und B in 10 ml $1 \times$ PBS-Puffer bestand und gemäß Herstellerangaben 30 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert wurde. Daran schloss sich die oben beschriebene Waschung der Membran an. Die Visualisierung der gebundenen Reagenzien erfolgte mit Hilfe einer Farbreaktion. Die Vector® NovaRED™-Substratlösung wurde unmittelbar vor Benutzung nach Herstellerangaben in Aqua bidest angesetzt. Die Anfärbung der Membran fand unter langsamem Schwenken und unter visueller Kontrolle 2–6 Minuten lang bis zur gewünschten Intensität statt. Um die Farbreaktion zu stoppen, wurde die Membran aus der Inkubationsschale mit der Substratlösung entnommen und 5 Minuten

lang in einer Schale mit reichlich Aqua bidest gewaschen. Unmittelbar nach Trocknung der Membran auf einem Filterpapier bei Raumtemperatur wurden die Resultate mittels einer Digitalkamera dokumentiert.

Bei jedem Versuch wurde eine Negativkontrolle angefertigt; statt in der Primärantikörperlösung wurde diese in PBS-Blotto ohne Antikörper inkubiert. Alle weiteren Schritte waren identisch. Dadurch konnten unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers bzw. des Avidin-Biotin-Komplexes von den spezifischen Signalen abgegrenzt werden.

3.8 Immunhistochemischer Nachweis von StAR-Protein, P450scc und P450c17

3.8.1 Vorbereitung der Gewebeschnitte

Die immunhistochemischen Untersuchungen zum Nachweis des StAR-Proteins und der steroidogenen Enzyme P450scc und P450c17 erfolgten an dem bouinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebe. Pro Hund wurden einen Tag vor Durchführung der Immunhistochemie zwei 5 µm dicke Gewebeschnitte von 2 unterschiedlichen, zufällig ausgewählten, gekühlten Paraffinblöcken auf einen beschichteten Objektträger aufgezogen und 1 Stunde bei 37 °C im Wärmeschrank getrocknet.

3.8.2 Immunhistochemisches Färbeprotokoll

Für jeden untersuchten Parameter wurden alle Gewebeschnitte an einem Tag immunhistochemisch angefärbt, um die Vergleichbarkeit zu wahren. Zum Entparaffinieren wurden die Schnitte 2 × 10 Minuten in Xylol inkubiert und anschließend in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert. Dazu wurden die Schnitte 2 × 2 Minuten in 99,8%-igem Ethanol und jeweils 3 Minuten in 96 %-, 80 %-, 70 %- und 60 %-igem Ethanol inkubiert. Darauf folgte eine 5-minütige Spülung in Aqua bidest.

Zur Demaskierung der durch die Fixierung vernetzten Epitope wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für 5 Minuten in Citratpuffer inkubiert und anschließend für 3 × 5 Minuten in einer Mikrowelle bei 560 W in vorgeheiztem Citratpuffer gekocht. Verdampfter Puffer wurde ersetzt, um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern. Nach dem Kochen verblieben die Schnitte für 20 Minuten im sich abkühlenden Citratpuffer. Im Anschluss daran wurden sie 10 Minuten lang in 1×PBS-Puffer unter Rütteln gewaschen. Um die im Gewebe enthaltenen endogenen Peroxidasen zu deaktivieren, folgte eine

30-minütige Inkubation in 3%-igem Wasserstoffperoxid in Methanol. Hierauf wurden die Schnitte wieder 10 Minuten lang in 1×PBS-Puffer unter Rütteln gewaschen.

Die nun folgende Nachweisreaktion beruhte auf dem in Abschnitt 3.7.7 aufgelisteten Prinzip. Die Objektträger wurden aus der Küvette entnommen und überschüssiger Puffer wurde durch Aufschlagen auf Papiertücher und Abtrocknen der Objektträger mit fusselfreien Tüchern entfernt, wobei ein vollständiges Austrocknen der Gewebeschnitte unbedingt zu vermeiden war. Die Gewebeschnitte wurden auf der Oberfläche der Objektträger mehrmals mit einem PapPen umfahren, um ein Auslaufen der nachfolgenden Inkubationslösungen zu verhindern, und die Objektträger wurden in feuchten Kammern aufgereiht.

Zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen im Gewebe wurden die Schnitte mit jeweils 90 µl Blockierungslösung, bestehend aus 5 % BSA und 1,5 % Ziegeserum (aus Vectastain® Rabbit IgG Elite ABC Kit) in 1×PBS-Puffer, überschichtet und 30 Minuten bei Raumtemperatur in feuchten Kammern inkubiert.

Nach Absaugen der Blockierungslösung mit Hilfe einer Vakuumpumpe wurden die Schnitte mit jeweils 90 µl in 1×PBS-Puffer verdünnter Primärantikörperlösung überschichtet und im Fall der P450sc 1,5 Stunden, im Fall des StAR-Proteins und der P450c17 1 Stunde in einer feuchten Kammer bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert.

Folgende Verdünnungen der im Western Blot auf Spezifität überprüften Primärantikörper (vgl. Abschnitt 3.7.7) kamen zur Anwendung:

- StAR-Protein: 1:4000
- P450sc: 1:500
- P450c17: 1:2000

Nach dem Abklopfen des Primärantikörpers auf Papiertücher wurden die Schnitte 2 × 10 Minuten in 0,1 %-igem PBST-Puffer und 1 × 5 Minuten in 1×PBS-Puffer auf einem Rüttler gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger aus dem Puffer genommen und – wie oben beschrieben – von überschüssigem Puffer befreit. Falls notwendig, erfolgte zusätzlich eine Trocknung der PapPen-Markierung mit einem fusselfreien Tuch.

Zur Detektion des an die spezifischen Epitope gebundenen Primärantikörpers wurden die Schnitte im nächsten Schritt mit jeweils 90 µl eines biotinyliertem Ziege-anti-Kaninchen-IgG Antikörpers (aus Vectastain® Rabbit IgG Elite ABC Kit) überschichtet, der zuvor 1:200 mit o.g. Blockierungslösung verdünnt worden war. Nach Ablauf der 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur in feuchten Kammern wurde die

Sekundärantikörperlösung auf Papiertücher abgeklopft, die Schnitte wurden – wie oben beschrieben – gewaschen und die PapPen-Markierung getrocknet.

Zur Detektion des Sekundärantikörpers wurden die Schnitte anschließend mit jeweils 90 µl eines peroxidase-konjugiertem Avidin-Biotin-Komplexes (aus Vectastain® Rabbit IgG Elite ABC Kit) überschichtet, der zuvor nach Herstellerangaben in 1×PBS-Puffer angesetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert worden war. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde der Avidin-Biotin-Komplex auf Papiertücher abgeklopft, die Schnitte wieder wie oben beschrieben gewaschen und getrocknet.

Zur Sichtbarmachung des an den Sekundärantikörper gebundenen Avidin-Biotin-Komplexes, wurden die Schnitte mit jeweils 90 µl der unmittelbar vor Gebrauch nach Herstellerangaben vorbereiteten Substratlösung Vector® NovaRED™ überschichtet. Nach exakt 3 Minuten (P450scc, P450c17) bzw. 2 Minuten (StAR-Protein) wurde die Farb-reaktion durch 5-minütiges Waschen in Aqua bidest gestoppt. Anschließend wurden die Gewebeschnitte für den Nachweis von P450scc 10 Sekunden lang in Hämatoxylin (1:8) schwach gegengefärbt und 5 Minuten in fließendem Leitungswasser „gebläut“. Die Schnitte für den StAR-Protein- und P450c17-Nachweis wurden nicht gegengefärbt.

Schließlich wurden die Schnitte über eine aufsteigende Ethanolreihe dehydriert. Dazu wurden sie jeweils 1 Minute in 50 %-, 70 %-, 80 %-, 96 %-igem Ethanol, 2 × 2 Minuten in 99,8 %-igem Ethanol und 2 × 5 Minuten in Xylol inkubiert. Die Eindeckelung erfolgte mittels ASSISTENT-Histokitt.

Bouinfixierte Gewebeschnitte von Ovar und Nebenniere eines Hundes wurden als Positivkontrollen auf dieselbe Weise wie Hodengewebe immunhistochemisch angefärbt. Als Negativkontrolle dienten zusätzliche Gewebeschnitte (Hoden, Ovar), bei denen der Primärantikörper durch nach Herstellerangaben verdünntes Kaninchen-IgG ersetzt wurde.

3.8.3 Auswertung der Immunhistochemie

In die Auswertung der immunhistologischen Präparate wurde ausschließlich gut erhaltenes Gewebe ohne Artefakte einbezogen. Der Randbereich der Präparate wurde von der Auswertung ausgeschlossen.

Zum einen wurden die Präparate lichtmikroskopisch mäanderförmig bei 400-facher Vergrößerung durchmustert. Dabei lag das Hauptaugenmerk darauf, qualitativ zu beurteilen, welche Zellarten eine positive Farbreaktion aufwiesen.

Zum anderen wurden für die quantitative Auswertung von jedem Hund 10 Gesichtsfelder (5 Gesichtsfelder pro Gewebeschnitt) in der 100-fachen (P450scc) bzw. 200-fachen (StAR-Protein, P450c17) Vergrößerung digitalphotographisch unter Verwendung der in Abschnitt 3.6.3 beschriebenen Gerätekombination der Firma Leica festgehalten. Die Gesichtsfelder für StAR-Protein und P450c17 wurden zusätzlich zur Durchlichtmikroskopie im Phasenkontrast abgelichtet. Zur Wahrung der Vergleichbarkeit wurden alle Aufnahmen pro Parameter innerhalb von max. 5 Tagen angefertigt, ohne Veränderungen an den Einstellungen des Mikroskops bzw. der Kamera vorzunehmen.

Die quantitative Auswertung erfolgte mit dem Bildanalyseprogramm „ImageTool“. Folgende Parameter wurden ausgewertet:

a) Prozentuale Verteilung der Kompartimente im Hodengewebe

Als Kompartimente wurden definiert: Interstitium, Tubuli seminiferi contorti, Gefäße. In jedem Gesichtsfeld wurde sowohl die Fläche der Tubuli seminiferi contorti als auch die Fläche von größeren Blut- und Lymphgefäßen ausgemessen. (Im Fall der nicht-gegengefärbten StAR-Protein- und P450c17-Schnitte fand diese Messung an den Phasenkontrastbildern statt). Dafür wurden diese Bereiche mit der Computermaus umfahren (Abbildung 7), die Software „ImageTool“ lieferte daraufhin die Fläche des umfahrenen Bereiches in der Einheit „Pixel“. Durch Aufsummieren der einzelnen Tubulus- bzw. Gefäßflächen erhielt man „Fläche Tubuli“ bzw. „Fläche Gefäße“ pro Gesichtsfeld. Durch Subtraktion dieser beiden Flächen von der Gesamtfläche des Bildes resultierte die „Fläche Interstitium“. Die Pixelwerte wurden anschließend in Prozentzahlen umgerechnet (Gesamtfläche des Bildes entspricht 100 %); für jeden Hund wurden der arithmetische Mittelwert $\bar{x}$ und die Standardabweichung SD aus den Einzelwerten der 10 Gesichtsfelder ermittelt. Nach Ende der Auswertungen aller 3 immunhistochemischen Färbungen (StAR-Protein, P450scc und P450c17) wurde für die ermittelten Flächenanteile wiederum das arithmetische Mittel $\bar{x}$ aus den 3 Mittelwerten berechnet.

b) Mittlerer Grauwert der immunpositiven Pixel (als Maßstab für die Intensität der Immunreaktion, Dimension 0–255)

Die farbigen, digitalen Aufnahmen der Gesichtsfelder wurden mit dem Befehl „Processing: Color-to-grayscale“ in Grauwertbilder umgewandelt, wobei die Software jedem einzelnen Bildpunkt entsprechend seiner optischen Dichte einen Grauwert

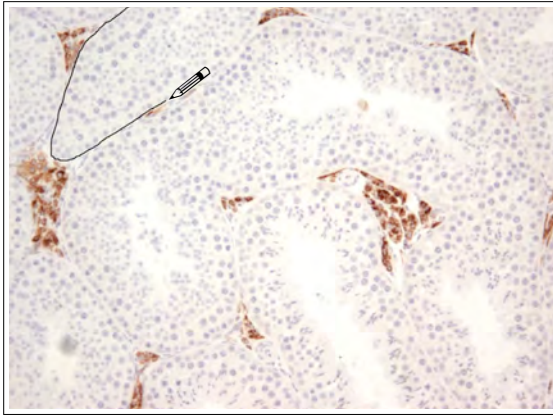


Abbildung 7: Beispielhafte Darstellung der Vermessung der Tubulusfläche: Umfahren der Tubuli seminiferi contorti mit der Computerm Maus, 100-fache Vergrößerung

zwischen „0“ und „255“ zuordnete. Der Wert „0“ bedeutete dabei weiß bzw. maximale Beleuchtung, der Wert „255“ bedeutete schwarz bzw. keine Beleuchtung.

Qualitative Voraussetzung für die weitere Auswertung mit der Software „Image-Tool“ war der hinreichende Kontrast zwischen positiver Farbreaktion (rotbraunes Präzipitat) und Hintergrund- bzw. Gegenfärbung. Aus diesem Grund wurden die Gewebeschnitte nur schwach bzw. nicht mit Hämatoxylin gegengefärbt.

Mit dem Befehl „Analysis: Object analysis: Find objects“ wurden von der Software Bezirke im Grauwertbild als „Objekte“ markiert und durchnummeriert, deren Grauwert über einem festgelegten Schwellenwert (threshold) lag. Dieser Schwellenwert hatte sich in Vorversuchen als ausreichend kontrastreich zum umliegenden Gewebe herausgestellt, so dass nur immunopositive Bezirke als „Objekte“ ausgewählt wurden. Vorhandene unspezifische Farbniederschläge im Tubuluslumen, die fälschlicherweise als „Objekte“ markiert wurden, wurden manuell entfernt.

Anschließend analysierte die Software mittels des Befehls „Analysis: Object analysis: Analyze“ die Größe (in Pixel) und den mittleren Grauwert dieser „Objekte“. Für jeden Hund wurde aus den Werten von jeweils 10 Gesichtsfeldern der mittlere Grauwert der immunopositiven Pixel berechnet, wobei dieser Wert der mittleren optischen Dichte des rotbraunen Präzipitates und damit der Intensität der Immun-

reaktion entsprach (NABORS et al., 1988). Die Intensität der Immunreaktion wurde somit als Grauwert zwischen „0“ (keine Immunreaktion) und „255“ (maximale Immunreaktion) dargestellt.

Als Schwellenwerte wurden festgelegt:

- StAR-Protein: 55
- P450scc: 125
- P450c17: 75

- c) Flächenanteil der immunpositiven Bezirke am Interstitium (als Maßstab für das Ausmaß der Immunreaktion, Dimension %)

Ausgehend von den Grauwertbildern wurde mit dem Befehl „Processing: Threshold: manual“ ein binarisiertes Bild erstellt (Abbildung 8). Allen Pixeln mit einem Grauwert unterhalb des Schwellenwertes wies die Software den Wert „0“ (weiß), allen Pixeln mit einem Grauwert oberhalb des Schwellenwertes den Wert „255“ (schwarz) zu. Dadurch ergab sich ein Bild mit ausschließlich schwarzen und weißen Bildpunkten, wobei schwarz die immunpositiven und weiß die immunonegativen Flächenanteile aufzeigten. Durch den Befehl „Analysis: Count Black / White Pixels“ wurde von der Software die Anzahl der schwarzen und weißen Pixel wiedergegeben.

Da die immunpositiven Farbreaktionen bei allen 3 untersuchten Parametern ausschließlich im Interstitium zu finden waren und der unterschiedliche Anteil der angeschnittenen Tubuli seminiferi contorti im Gesichtsfeld als Störfaktor ausgeschlossen werden sollte, bezogen sich die weiteren Berechnungen nur auf die Interstitium-Fläche. Mit der unter a) berechneten „Fläche Interstitium“ (in Pixel) und der Anzahl der im entsprechenden Gesichtsfeld vorhandenen schwarzen Pixel konnte der prozentuale Anteil der immunpositiven Fläche an der „Fläche Interstitium“ dargestellt werden. Pro Hund wurden auf diese Weise 10 Gesichtsfelder ausgewertet, aus den 10 Einzelwerten resultierten der arithmetische Mittelwert $\bar{x}$ und die Standardabweichung SD.

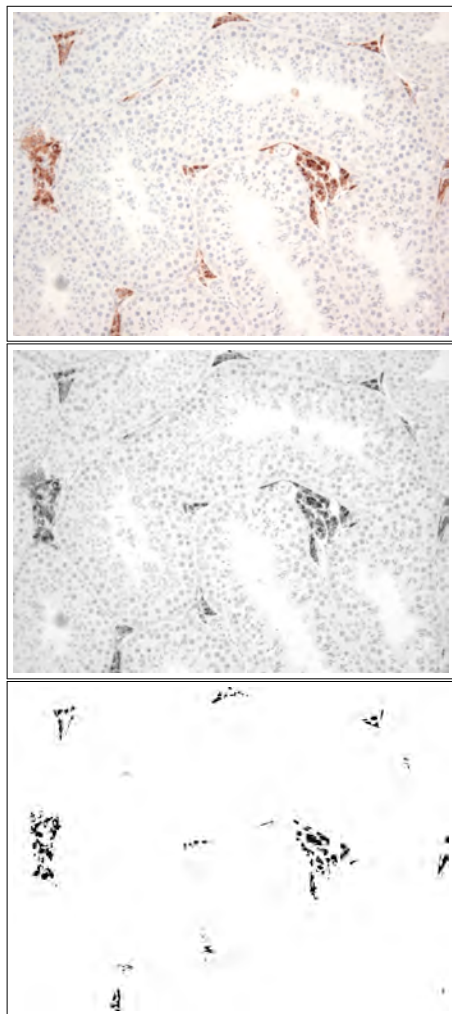


Abbildung 8: Beispielhafte Darstellung der Bearbeitung eines Bildes mit „ImageTool“, oben farbige Originalaufnahme, mittig Grauwertbild, unten binarisiertes Bild, 100-fache Vergrößerung

3.9 Qualitativer Nachweis von Zielgen-mRNA mittels RT-PCR

3.9.1 RNA-Isolierung aus Gewebe

Nach Reinigung des gesamten Arbeitsplatzes mit 70 %-igem Ethanol und RNaseAWAY® wurden die bei -80°C gelagerten Gewebeprobe – wie in Abschnitt 3.7.1 beschrieben – in flüssigem Stickstoff gemörsert. Etwa 100 mg Gewebepulver wurde in ein 2 ml-Reaktionsgefäß gegeben und, nach Zugabe von 1 ml TRIzol® Reagent, etwa 1 Minute lang mit einem Ultra Turrax® homogenisiert.

Die weitere Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte in Anlehnung an das Protokoll des TRIzol® Reagent-Herstellers. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden 200 µl eisgekühltes Chloroform dazugegeben und durch kräftiges Schütteln untergemischt. Nach weiteren 5 Minuten Inkubation auf Eis schloss sich die Trennung der Phasen durch 15-minütige Zentrifugation bei 14000 rpm (20000g) an. Die obere, farblose, wässrige Phase, die die RNA enthielt, wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zu dieser Phase wurden erneut 200 µl eisgekühltes Chloroform hinzugefügt und die Prozedur wiederholt. Die beiden unteren Phasen wurden verworfen.

Zur Fällung der RNA wurde die gewonnene obere Phase mit dem gleichen Volumenanteil eisgekühltem Isopropanol versetzt und nach kräftigem Schütteln 30 Minuten bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe aufgeschüttelt und 10 Minuten bei 14000 rpm (20000g) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das gel-artige Pellet wurde $2 \times$ mit 500 µl eisgekühltem 70 %-igem Ethanol gewaschen, wofür das Pellet-Ethanol-Gemisch jeweils 10 Minuten auf Eis stehen gelassen und 10 Minuten bei 14000 rpm (20000g) zentrifugiert wurde.

Das resultierende Pellet wurde im Wärmeschrank bei 37°C ca. 15 Minuten lang getrocknet und nachfolgend mit 50 µl autoklaviertem Aqua bidest durch eine 10-minütige Inkubation im 70°C -Wasserbad resuspendiert. Zum Schutz der RNA vor enzymatischem Abbau wurden 1,25 µl RNase-Inhibitor (entspricht einer Konzentration von 1 U pro ml RNA) zugesetzt. Alle Zentrifugationsschritte fanden bei 4°C statt.

3.9.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Ermittlung der RNA-Konzentration erfolgte mittels eines UV-Photometers. Dazu wurde 1 µl RNA-Stammlösung mit 99 µl autoklaviertem Aqua bidest vermischt und die Extinktion bei 260 nm in Kunststoff-Einmalküvetten gemessen. Aus der ermittelten

Tabelle 3: Zusammensetzung des DNase-Mixes

Komponente	Konzentration Stammlösung	Konzentration Gebrauchslösung	Volumen (µl) pro Ansatz
DNase-Puffer	10×	2×	2,00
DNase I	10 U/µl	1 U/µl	1,00
RNase-Inhibitor	40 U/µl	1 U/µl	0,25

Extinktion und unter Angabe der Verdünnung (Dilution $99 + 1$) berechnete das Photometer unter Anwendung des Extinktionskoeffizienten für RNA (40 µg/ml entspricht der Extinktion „1“) die Konzentration der RNA-Stammlösung in ng/µl. Autoklaviertes Aqua bidest diente als Leerwert.

Anhand der gemessenen RNA-Konzentration wurde eine Arbeitsverdünnung in der Konzentration 200 ng/µl hergestellt, die bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt wurde. Die unverdünnte RNA-Stammlösung lagerte bei -80°C .

3.9.3 DNase-Behandlung

Vor jeder RT-PCR wurde die gewonnene RNA mit einer DNA-spezifischen Endonuclease (DNase I) vorbehandelt, um falsch positive Ergebnisse durch Amplifikation eventuell noch vorhandener genomischer DNA zu verhindern. Dafür wurde ein DNase-Mix (Zusammensetzung siehe Tabelle 3) in der Menge hergestellt, die für die Gesamtzahl der zu verarbeitenden RNA-Proben nötig war. Von diesem DNase-Mix wurden jeweils 3,25 µl mit 6,65 µl RNA-Arbeitsverdünnung (RNA-Konzentration 200 ng/µl) in einem auf Eis platzierten 0,5 ml-Reaktionsgefäß vermischt.

Ein zusätzlicher Ansatz enthielt anstelle der RNA-Arbeitsverdünnung Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser. Dieser Ansatz wurde nachfolgend wie eine RNA-Probe behandelt und diente in der PCR als Negativkontrolle („no template control“, NTC). Dadurch konnten Kontaminationen ausgeschlossen werden.

Um alle Reagenzien auf den Boden des Reaktionsgefäßes zu sammeln, wurden die Proben kurz anzentrifugiert und anschließend in einem Thermocycler platziert.

Die DNase-Behandlung wurde mit folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

10 Minuten 37°C (DNase-Verdau)
 5 Minuten 75°C (Inaktivierung der DNase)
 abkühlen auf 4°C

Tabelle 4: Zusammensetzung des RT-Mixes

Komponente	Konzentration Stammlösung	Konzentration Gebrauchslösung	Volumen (µl) pro Ansatz
PCR-Puffer	10×	1×	6,0
MgCl ₂	25 mM	5 mM	12,0
dNTP-Mix	10 mM	1 mM	24,0
Random Hexamers	50 µM	2,5 µM	3,0
RNase Inhibitor	40 U/µl	1 U/µl	1,5
DEPC-Wasser	–	–	1,5
Reverse Transkriptase	50 U/µl	2,5 U/µl	3,0

Die Stabilität der RNA war nach der DNase-Behandlung nur für kurze Zeit gewährleistet, weshalb die RNA unmittelbar im Anschluss daran mit Hilfe der Reversen Transkription (RT) weiterverarbeitet wurde.

3.9.4 Reverse Transkription (RT)

Als Primer für die Synthese von komplementärer DNA (cDNA) aus der vorbehandelten RNA wurden sog. Random Hexamers verwendet, die aus 6 zufällig zusammengesetzten Nukleotiden bestanden. Diese Primer konnten entsprechend ihrer Sequenz an verschiedensten Stellen der RNA hybridisieren, wodurch gewährleistet war, dass die RNA vollständig in cDNA umgeschrieben wurde.

Nach Herstellung eines RT-Mixes (Zusammensetzung siehe Tabelle 4) in ausreichender Menge für alle Ansätze, wurden pro Ansatz 51 µl RT-Mix in ein 0,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben und 9 µl der DNase-behandelten RNA dazupipettiert. Ein Ansatz enthielt somit etwa 20 ng RNA pro µl. Alle Pipettierschritte fanden auf Eis statt. Nachdem die Proben gemischt und kurz anzentrifugiert waren, wurden die Reaktionsgefäße in den Thermocycler gestellt, der mit folgenden Reaktionsbedingungen programmiert war:

8 Minuten	21 °C	(Hybridisierung der Random Hexamers)
15 Minuten	42 °C	(Reverse Transkription)
5 Minuten	99 °C	(Inaktivierung der Reversen Transkriptase)
5 Minuten	5 °C	
abkühlen auf	4 °C	

Die gewonnene, stabile cDNA lagerte bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C.

3.9.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um nun die Transkription von bestimmten Genen nachzuweisen, wurden Abschnitte dieser Gene mit Hilfe einer thermostabilen Hot-Start DNA-Polymerase (AmpliTaq Gold™) amplifiziert. Die dafür verwendeten sequenzspezifischen Primerpaare (siehe Tabelle 6) wurden mit der Software „Oligo Explorer“ entworfen und mit dem Online-Programm „BLAST“ auf ihre Spezifität überprüft. Die Herstellung der Primer erfolgte durch die Firma biomers.net GmbH.

Bei jeder PCR wurde das Referenzgen GAPDH mitgeführt, um die Integrität der isolierten RNA und der daraus gewonnenen cDNA zu überprüfen. Als Negativkontrolle diente die in Abschnitt 3.9.3 beschriebene NTC.

Für jedes Primerpaar erfolgte die Herstellung eines PCR-Mixes (Zusammensetzung siehe Tabelle 5) für alle Ansätze auf Eis. Anschließend wurden für jeden Ansatz 40 µl dieses PCR-Mixes mit 10 µl cDNA vermischt, kurz anzentrifugiert und im Thermocycler platziert. Die PCR fand unter folgenden Reaktionsbedingungen und unter Verwendung der in Tabelle 6 genannten, primerabhängigen Annealing-Temperaturen (T_A) statt:

10 Minuten	95 °C	(Aktivierung AmpliTaq Gold™, Initiale Denaturierung)	} 35 Wiederholungen
45 Sekunden	94 °C	(Denaturierung)	
1 Minute	T_A	(Annealing)	
1 Minute	72 °C	(Elongation)	
5 Minuten	72 °C	(finale Elongation)	
abkühlen auf	4 °C		

Tabelle 5: Zusammensetzung des PCR-Mixes

Komponente	Konzentration Stammlösung	Konzentration Gebrauchslösung	Volumen (µl) pro Ansatz
DEPC-Wasser	–	–	32,75
PCR-Puffer	10×	1×	4,00
MgCl ₂	25 mM	1,25 mM	2,00
Primer-Mix	10 pmol/µl	0,2 pmol/µl	1,00
AmpliTaq Gold™	5 U/µl	0,025 U/µl	0,25

Tabelle 6: In der qualitativen RT-PCR verwendete, hundespezifische Primer,
for = Forward Primer, rev = Reverse Primer

Zielgen	Basensequenz (5' - 3')	Produktgröße	T _A	Accession Nr.
StAR-Protein				
for	GCT CTC TGC TTG GTT CTC G	295 bp	56 °C	NM_001097542
rev	ACC TCC TTG ACA TTC GGG			
P450 _{sec}				
for	CTG TTC CGT CTG TTC AAG	439 bp	54 °C	XM_535539
rev	CAT TTT CAA GGT ATC TCT GC			
P450 _{c17}				
for	TGT CTG ACA ACC AAA AGG	317 bp	54 °C	XM_535000
rev	TCC CAA AGT ATC CAA GAT G			
GAPDH				
for	GCC AAG AGG GTC ATC ATC TC	228 bp	54 °C bzw. 56 °C	AB038240
rev	GGG GCC GTC CAC GGT CTT CT			

3.9.6 Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte durch eine horizontale Agarose-Gelelektrophorese, bei der die DNA-Fragmente nach Größe aufgetrennt und mit dem fluoreszierenden, an Nukleinsäure bindenden Farbstoff GelRed™ unter UV-Licht sichtbar gemacht wurden.

1,82 g Agarose wurden in 91 ml 1×TBE-Puffer gelöst und in einer Mikrowelle bei 560 W kurz aufgekocht. Nach Zugabe und Untermischung von 8,0 µl GelRed™ wurde das flüssige Gel in die zur Elektrophoresekammer EasyPhor Medi gehörige Gießvorrichtung gegossen. Zur Ausbildung der erforderlichen Probestaschen wurde ein 20-zähliger Kamm eingesetzt und das Gel bis zum Erstarren bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde das 10,0 × 15,0 × 0,5 cm große, 2 %-ige Agarose-Gel mit dem Gelträger aus der Gießvorrichtung entnommen und in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Diese wurde mit 1×TBE-Puffer gefüllt, bis der Puffer das Gel ca. 0,5 cm hoch bedeckte.

Für die Elektrophorese wurden jeweils 15 µl PCR-Produkt mit 1,5 µl Ladepuffer vermischt und vorsichtig in die Probestaschen pipettiert. Zur späteren Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde ein geeigneter DNA-Größenstandard mitgeführt. Dafür wurden 1 µl des DNA-Größenstandards mit 1,5 µl Ladepuffer und 7 µl DEPC-Wasser vermischt und in eine separate Probestasche eingebracht. Die Auftrennung der DNA erfolgte, nach Schließen der Elektrophoresekammer, bei einer konstanten Spannung von 125 V und einer maximalen Stromstärke von 300 mA über die Dauer von 40 Minuten.

Mit Hilfe eines UV-Transilluminators mit integrierter Kamera, eines Pentium PCs mit Bildschirm und der Software „Phoretix Grabber“ konnten die aufgetrennten DNA-Fragmente bei einer Wellenlänge von 312 nm sichtbar gemacht und die fluoreszierenden Banden digitalphotographisch festgehalten werden.

3.9.7 Isolierung und Sequenzierung von PCR-Produkten

Die durch die PCR erhaltenen DNA-Fragmente wurden durch Sequenzierung auf ihre Spezifität überprüft. Dafür wurden die PCR-Produkte aus dem Agarose-Gel mit dem QIAEX® II Gel Extraction Kit in Anlehnung an das mitgelieferte Protokoll aufgereinigt.

Die Bande des elektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produktes wurde unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit einer sterilen Skalpellklinge möglichst exakt ausgeschnitten. Nach Überführen in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurde das Gewicht des gewonnenen Gelstückes bestimmt. Pro mg Gel wurden 3 µl (bei PCR-Produkten der Größe 100–4000 bp) bzw. 6 µl (bei PCR-Produkten unter 100 bp) QX1-Puffer zum Gel gegeben.

Zusätzlich wurden 30 µl QIAEX® II-Suspension, die vorher 30 Sekunden lang geschüttelt wurde, untergemischt. Dieser Ansatz wurde 10 Minuten lang in einem 50 °C-Wasserbad inkubiert, um die Agarose zu lösen und die DNA zu binden, und dabei alle 2 Minuten gründlich gemischt. Nach 30 Sekunden Zentrifugation bei 14000 rpm (20000g) wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 500 µl QX1-Puffer resuspendiert, um restliche Agarosebestandteile zu lösen. Nach erneuter Zentrifugation wurden diese mit dem Überstand entfernt.

Daran schlossen sich 2 Waschschritte an, für die jeweils das Pellet in 500 µl PE-Puffer resuspendiert, der Ansatz anschließend zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Das Pellet wurde dann, nach 20-minütiger Trocknung in einem 37 °C-Wärmeschrank, in 20 µl TE-Puffer aufgelöst und nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur ein letztes Mal 30 Sekunden bei 14000 rpm (20000g) zentrifugiert. Der Überstand, der nun die gelöste DNA enthielt, wurde vorsichtig abpipettiert, in ein neues 0,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und bis zur Sequenzierung durch die Firma SRD – Scientific Research and Development GmbH, Bad Homburg bei –20 °C gelagert.

Die erhaltenen Sequenzen wurden mittels dem Online-Programm „BLAST“ mit verfügbaren Gendatenbanken sowie manuell mit der entsprechenden Genbank-Sequenz verglichen, um die Spezifität der PCR-Produkte zu bestätigen.

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

3.10.1 Vorbereitung der Proben

Die Proben für die RT-qPCR wurden wie in Abschnitt 3.9.1 bis Abschnitt 3.9.4 beschrieben vorbereitet. Analog zur konventionellen RT-PCR wurde dabei die Gesamt-RNA mit TRIzol® Reagent isoliert, mit DNase behandelt und mittels Reverser Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben, wobei die DNase-Behandlung und die RT für alle Proben, die für die in dieser Arbeit beschriebenen RT-qPCR Untersuchungen verwendet wurden, in einem Durchgang stattgefunden haben.

3.10.2 Vorbereitung der Primer-Sonden-Systeme

Die Auswahl der für die RT-qPCR verwendeten sequenzspezifischen Primer-Sonden-Systeme für den Nachweis von P450scc und P450c17 erfolgte mit der Software „Beacon

Designer“. Nach Überprüfung der Spezifität mit Hilfe des Online-Programms „BLAST“ wurden die Primer und Sonden von der Firma biomers.net GmbH synthetisiert. Für den Nachweis von StAR-Protein und GAPDH standen bereits am Hund etablierte Systeme zur Verfügung (KOWALEWSKI und HOFFMANN, 2008). Die Sequenzen der verwendeten Primer und Hydrolyse-Sonden sind in Tabelle 7 gelistet.

Alle Primer wurden vor dem Einsatz in der RT-qPCR mittels konventioneller PCR (Abschnitt 3.9.5) auf ihre Funktionsfähigkeit hin getestet und die resultierenden PCR-Produkte auf ihre Spezifität, wie in Abschnitt 3.9.6 und Abschnitt 3.9.7 beschrieben, überprüft.

3.10.3 Prinzip der RT-qPCR mit Hydrolyse-Sonden

Als Hydrolyse-Sonden (auch Taqman[®]-Sonden genannt) dienen Oligonukleotide, die spezifisch zwischen den entsprechenden Primern an die Gensequenz hybridisierten. Diese Sonden waren am 5'-Ende mit dem fluoreszenten Reporter-Farbstoff „6-FAM“ und am 3'-Ende mit dem Quencher-Farbstoff „TAMRA“ markiert. Der Quencher unterdrückte die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes, solange er in räumlicher Nähe lokalisiert war.

Befand sich das gesuchte Zielgen im PCR-Ansatz, wurde die Sequenz analog zur konventionellen PCR ausgehend von den spezifisch gebundenen Primern durch die iTaq[™] DNA Polymerase (Bestandteil des iQ[™] Supermix) amplifiziert. Bei dieser Synthese traf die Polymerase auf die ebenfalls spezifisch gebundene Sonde, wodurch die Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase abgebaut wurde. Dieser Abbau bewirkte eine räumliche Trennung von 6-FAM und TAMRA. Das nun messbare Fluoreszenzsignal, welches positiv mit der Anzahl der Amplifikate korrelierte, konnte von einem real-time PCR Cycler in Echt-Zeit, also nach jedem PCR-Zyklus erfasst werden. Da die 5'-3'-Exonuklease lediglich an DNA-Doppelsträngen aktiv ist, konnten nur gebundene Sonden abgebaut werden. Der Abbau ungebundener Sonden und damit verbundene falsch positive Signale waren nicht möglich.

Die vom real-time PCR Cycler erfassten Fluoreszenzsignale wurden mit Hilfe der Software „CFX Manager[™]“ weiterverarbeitet. Zuerst wurde die Hintergrundfluoreszenz von der Software im Modus „baseline subtracted curve fit“ automatisch bestimmt und die gemessenen Fluoreszenzwerte entsprechend korrigiert. Danach wurden diese korrigierten Werte in logarithmierter Form gegen die jeweilige Zykluszahl dargestellt. In dem Bereich, in dem die resultierenden Amplifikationskurven in der Log-Darstellung linear ansteigend

waren, erfolgte die PCR-Reaktion mit der für das Primer-Sonden-System maximalen Effizienz. In diesem Bereich wurde ein Fluoreszenz-Schwellenwert (threshold) manuell für alle Proben festgelegt, der als Basis für die weitere Quantifizierung diente. Die Anzahl der Zyklen, die nötig waren, um diesen Schwellenwert zu erreichen, wurden als sog. quantification cycle (C_q) bezeichnet und von der Software für jeden Ansatz ermittelt. Dieser C_q -Wert war umgekehrt proportional zur ursprünglich im Ansatz vorhandenen Zielgen-Menge, wodurch eine relative Quantifizierung (Abschnitt 3.10.6) möglich wurde.

3.10.4 Durchführung der RT-qPCR

Nach Reinigung des Arbeitsplatzes mit 70 %-igem Ethanol erfolgte die Herstellung des RT-qPCR-Mixes (Zusammensetzung siehe Tabelle 8) für die Gesamtzahl der Proben auf Eis. Alle Proben wurden in Doppelbestimmung analysiert. Pro Doppelansatz wurden 40 μ l des RT-qPCR-Mixes mit 10 μ l der währenddessen auf Eis aufgetauten cDNA-Proben in 0,5 ml-Reaktionsgefäßen vermischt. Davon wurden jeweils 24 μ l in eine Vertiefung einer 96-well-Platte pipettiert.

Für jede Probe erfolgte auf der gleichen 96-well-Platte die Bestimmung der Expression des Referenzgens GAPDH (ebenfalls in Doppelbestimmung), um die Expressionsergebnisse des Zielgens normalisieren zu können. Sowohl in Vorversuchen als auch in den Hauptversuchen hatte sich herausgestellt, dass GAPDH im untersuchten Gewebe konstant und unabhängig von der Behandlung exprimiert wurde. Damit war GAPDH als Referenzgen geeignet. Außerdem wurde auf jeder Platte für jedes Primer-Sonden-System eine Negativkontrolle mitgeführt, bei der die cDNA-Probe durch die in Abschnitt 3.9.3 beschriebene NTC ersetzt wurde.

Nachdem alle Ansätze in die 96-well-Platte eingefüllt waren, wurde die Platte mit einer transparenten Klebefolie vorsichtig verschlossen und die einzelnen Vertiefungen dadurch abgedichtet. Die Platte wurde im real-time PCR Cyclyer platziert, der anschließend von der Software „CFX Manager™“ gesteuert wurde. In der Software ließen sich die Plattenbelegung und folgende Reaktionsbedingungen programmieren:

3 Minuten	95 °C	(Aktivierung iTaq™ Polymerase, Initiale Denaturierung)	} 40 Wiederholungen
15 Sekunden	95 °C	(Denaturierung)	
1 Minute	60 °C	(Annealing und Elongation)	

Tabelle 7: In der RT-qPCR verwendete, hundespezifische Primer und Hydrolyse-Sonden, for = Forward Primer, rev = Reverse Primer

Zielgen	Basensequenz (5' - 3')	Produktgröße	Accession Nr.
StAR-Protein			
for	CGAGGGCTCCACCTGTGTGT	65 bp	NM_001097542
rev	CCTTCTCTGCTCAGGCATCTC		
Sonde	6-FAM- CTGGCATGGCCACACATTTC -TAMRA		
P450scc			
for	TTACATGATTCCCGCCCAAGACG	204 bp	XM_535539
rev	AGGTCATCTCGAGCTCAGC		
Sonde	6-FAM- CCAGGCACTGCCGCACGCC -TAMRA		
P450c17			
for	AAGAAGATCCAGCAGGAGATTGATC	117 bp	XM_535000
rev	CCGAATGCCAAGCAGCTCTC		
Sonde	6-FAM- TGGCCGCATACCAACTATGAGTGACCGG -TAMRA		
GAPDH			
for	GCTGCCAAATATGACGACATCA	75 bp	AB038240
rev	GTAGCCACAGGATGCCCTTTGAG		
Sonde	6-FAM- TCCCCTCCGATGCCCTTCACTACCTT -TAMRA		

Tabelle 8: Zusammensetzung des RT-qPCR-Mixes

Komponente	Konzentration Stammlösung	Konzentration Gebrauchslösung	Volumen (µl) pro Ansatz
iQ™ Supermix	2×	1×	12,50
Forward Primer	20 pmol/µl	0,3 pmol/µl	0,375
Reverse Primer	20 pmol/µl	0,3 pmol/µl	0,375
Sonde	20 pmol/µl	0,2 pmol/µl	0,250
DEPC-Wasser	–	–	6,500

3.10.5 Ermittlung der Effizienz der PCR-Reaktion

Für jedes Primer-Sonden-System wurde mit Hilfe einer Verdünnungsreihe eine Standardkurve erstellt, anhand derer die real-time PCR-Effizienz berechnet werden konnte.

Für die Verdünnungsreihe wurde, wie von PFAFFL et al. (2002) beschrieben, eine Mischprobe (cDNA-Pool) aus allen zu untersuchenden cDNA-Proben erstellt, die nachfolgend in 10er Stufen mit DEPC-Wasser verdünnt wurde. Daraus resultierten folgende Verdünnungsstufen:

Stufe 1: entspricht 100 % cDNA-Pool

Stufe 2: entspricht 10 % cDNA-Pool

Stufe 3: entspricht 1 % cDNA-Pool

Stufe 4: entspricht 0,1 % cDNA-Pool

Diese Verdünnungsstufen wurden als Proben in Dreifachbestimmung in der RT-qPCR wie in Abschnitt 3.10.4 beschrieben für jedes Primer-Sonden-System eingesetzt. Für die Erstellung einer Standardkurve wurde der jeweils eingesetzte Gehalt an cDNA in logarithmierter Form gegen den mittleren C_q -Wert eines Dreifachansatzes (Tabelle 9) dargestellt. Aus der Standardkurve konnte eine Regressionsgerade $y = mx + y_o$ mit dem Bestimmtheitsmaß R^2 ermittelt werden, wobei m der Steigung der Geraden entspricht. Die Resultate sind in Abbildung 9 dargestellt.

Die Effizienz E der PCR-Reaktion, die einen Wert zwischen 1 und 2 annehmen kann, ließ sich nachfolgend mit Formel 2 berechnen (PFAFFL, 2001).

$$E = 10^{(-1/m)} \quad (2)$$

Tabelle 9: Ergebnisse der Verdünnungsreihe zur Bestimmung der PCR-Effizienz, mittlerer C_q -Wert

cDNA-Gehalt	C_q -Wert			
	GAPDH	StAR-Protein	P450scc	P450c17
100 %	20,61	24,28	24,87	20,85
10 %	24,66	27,77	28,37	24,48
1 %	28,35	31,29	32,09	28,13
0,1 %	31,86	34,74	35,51	32,18

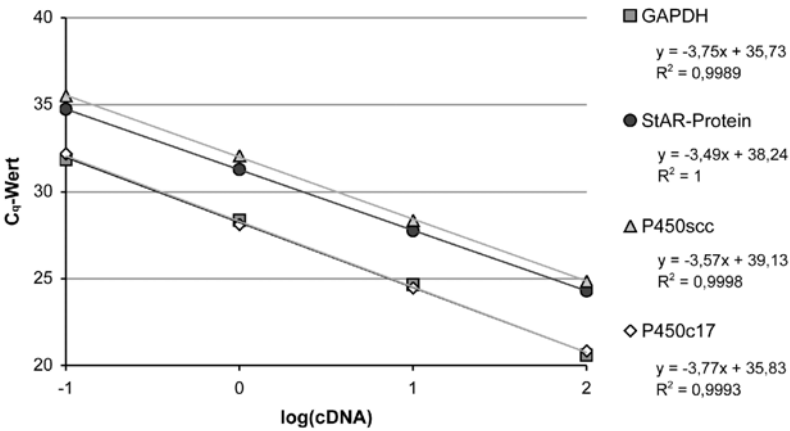


Abbildung 9: Regressionsgeraden zur Ermittlung der PCR-Effizienz, $y = mx + y_0$, Bestimmtheitsmaß R^2

Für die einzelnen Primer-Sonden-Systeme wurden auf diese Weise folgende PCR-Effizienzen E ermittelt:

GAPDH:	1,85
StAR-Protein:	1,93
P450scc:	1,91
P450c17:	1,84

3.10.6 Auswertung der RT-qPCR-Ergebnisse

Aufgrund der unterschiedlichen PCR-Effizienzen der einzelnen Primer-Sonden-Systeme wurde für die Auswertung der RT-qPCR-Daten eine effizienz-korrigierte relative Quantifizierung nach PFAFFL (2001) durchgeführt.

Der Expressionsunterschied „ratio“ einer Probe relativ zu einer Kontrolle und normalisiert zu einem nicht-regulierten Referenzgen ergab sich dabei auf Basis der in Abschnitt 3.10.5 berechneten PCR-Effizienzen und der von der Software „CFX Manager™“ ermittelten C_q -Werte:

$$ratio = \frac{(E_{Zielgen})^{\Delta C_q(Zielgen)}}{(E_{Referenzgen})^{\Delta C_q(Referenzgen)}} \quad (3)$$

ΔC_q wurde nach Formel 4 für die einzelnen Zielgene und das Referenzgen für jede Probe separat berechnet. $C_q(Probe)$ entsprach dabei bei jeder Probe dem mittleren C_q -Wert des Doppelansatzes. Als $C_q(Kontrolle)$ diente jeweils der Mittelwert der C_q -Werte des entsprechenden Gens der Kontrollgruppe CG. Mit dem resultierenden Wert „ratio“ wurde also die n -fache Expression eines Gens im Vergleich zur Kontrollgruppe CG angegeben.

$$\Delta C_q = C_q(Kontrolle) - C_q(Probe) \quad (4)$$

Die Beschreibung der RT-qPCR-Experimente in dieser Arbeit richtete sich nach den von BUSTIN et al. (2009) beschriebenen MIQE-Richtlinien („Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments“).

3.11 Statistische Auswertung

Die Datenhaltung und -auswertung sowie die Erstellung der graphischen Abbildungen im Rahmen der Ergebnispräsentation erfolgte an einem Apple iBook G3 mit Hilfe der

Software Microsoft® Excel. Die statistischen Berechnungen wurden von der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen unter Leitung von Dr. K. Failing auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk der Arbeitsgruppe mit Hilfe des Statistikprogrammpakets BMDP/Dynamic durchgeführt.

Bei annähernd normalverteilten, quantitativen Resultaten wurden zur Beschreibung der Daten arithmetische Mittelwerte ($\bar{x}$) und Standardabweichungen (SD) berechnet und tabellarisch sowie graphisch wiedergegeben. Bei rechtsschiefer Verteilung positiver quantitativer Merkmale wurde eine logarithmische Transformation ($y = \log(x)$) der Daten durchgeführt und die Datenbeschreibung mit Hilfe von geometrischen Mittelwerten ($\bar{x}_g$) und Streufaktoren (SF), dargestellt in Form von Intervallen ($\bar{x}_g/\text{SF}$, $\bar{x}_g \cdot \text{SF}$), vorgenommen. Bei binominalverteilten Zufallsvariablen erfolgte zur Annäherung an eine Normalverteilung und zur Varianzstabilisierung eine Arcus-Sinus-Transformation ($y = \arcsin(\sqrt{\frac{x}{100}})$) mit anschließender Berechnung und Darstellung des modifizierten 1s-Bereichs nach arcsin-Transformation.

Zur statistischen Prüfung des Gruppeneinflusses auf Signifikanz wurde bei den annähernd normalverteilten Merkmalen bzw. mit den wie oben beschrieben transformierten Werten eine einfaktorielle Varianzanalyse mit dem Programm BMDP7D durchgeführt. Im Speziellen wurden dabei zum einen die Gruppen DG A, B, C, D sowie CG (Kollektiv 1) zur Erfassung einer Änderung der Steroidogenesekapazität während des Ingangkommens der Spermatogenese verglichen; zum anderen erfolgte eine einfaktorielle Varianzanalyse über die Gruppen DG A, PG und JG (Kollektiv 2). Diese beinhaltet den Vergleich der Wirkung der beiden Implantate „Gonazon®“ und „Profact® Depot“. Beim Auftreten von Signifikanzen schloss sich das Tukey-Verfahren zum paarweisen Vergleich der genannten Gruppen an.

Bei der Bewertung der statistischen Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau $\alpha=0,05$ zugrunde gelegt, d.h. Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant, Ergebnisse mit $p \geq 0,05$ als nicht signifikant (n.s.) angesehen.

Im Rahmen der Ergebnispräsentation (vgl. Kapitel 4) sind die Resultate in Tabellenform sowie graphisch als Balkendiagramme dargestellt. Statistisch signifikante Ergebnisse sind in den Diagrammen (bzw. teilweise in den Tabellen) mit unterschiedlichen Buchstaben, nicht statistisch signifikante Ergebnisse mit dem Kürzel n.s. über den Balken gekennzeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse

Die Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse sind der Übersicht halber in Tabelle 10 zusammengefasst. Sie zeigt, dass für die erfassten Parameter bei Kollektiv 1 (DG A, B, C, D und CG) in 13 Fällen ein signifikanter Einfluss der Gruppe deutlich wurde; bei Kollektiv 2 (DG A, PG und JG) war dies bei 8 Parametern der Fall. In den folgenden Kapiteln wird auf diese Ergebnisse sowie die Ergebnisse der weiteren statistischen Berechnung mittels Tukey-Test im Einzelnen eingegangen.

4.2 Ergebnisse der Hormonanalytik

Im Rahmen dieser Arbeit bleibt die Darstellung der Testosteron-, LH- und FSH-Konzentrationen auf die Gruppen PG, DG A, B, C und D sowie auf die folgenden Entnahmepunkte beschränkt:

- vor Einsetzen des Implantats
- 8 Wochen nach Einsetzen des Implantats
- 5 Monate nach Einsetzen des Implantats
- zum Zeitpunkt der Kastration

Die einfaktorielle Varianzanalyse mit anschließendem Tukey-Test zur statistischen Prüfung des Gruppeneinflusses auf Signifikanz (vgl. Abschnitt 3.11) erfolgte separat für die einzelnen Zeitpunkte.

Eine detaillierte Beschreibung der Hormonwerte zu allen Untersuchungszeitpunkten findet sich in der Dissertation von SPANG (2012, in Vorbereitung).

Tabelle 10: Übersicht über die Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse,
 Kollektiv 1: DG A, B, C, D und CG (für Hormonanalytik: DG A, B, C, D),
 Kollektiv 2: DG A, PG und JG (für Hormonanalytik: DG A und PG)

Parameter	Kollektiv 1	Kollektiv 2
Testosteron (vor Implantat)	n.s.	n.s.
Testosteron (nach 8 Wochen)	—	n.s.
Testosteron (nach 5 Monaten)	n.s.	n.s.
Testosteron (bei Kastration)	$p < 0,001$	—
LH (vor Implantat)	n.s.	n.s.
LH (nach 8 Wochen)	n.s.	n.s.
LH (nach 5 Monaten)	n.s.	n.s.
LH (bei Kastration)	$p < 0,03$	n.s.
FSH (vor Implantat)	n.s.	n.s.
FSH (nach 8 Wochen)	n.s.	n.s.
FSH (nach 5 Monaten)	n.s.	n.s.
FSH (bei Kastration)	$p < 0,005$	n.s.
Fläche A der Leydigzellkerne	$p < 0,0001$	$p < 0,02$
Flächenanteil Tubuli	$p < 0,0001$	$p < 0,005$
Flächenanteil Interstitium	$p < 0,0001$	$p < 0,005$
Flächenanteil Gefäße	$p < 0,0005$	$p < 0,04$
Grauwert StAR-Protein	n.s.	n.s.
Flächenanteil StAR-Protein	$p < 0,02$	n.s.
ratio StAR-Protein	n.s.	$p < 0,03$
Grauwert P450scc	$p < 0,005$	n.s.
Flächenanteil P450scc	$p < 0,0005$	$p < 0,005$
ratio P450scc	$p < 0,05$	n.s.
Grauwert P450c17	$p < 0,05$	n.s.
Flächenanteil P450c17	$p < 0,0005$	$p < 0,01$
ratio P450c17	n.s.	$p < 0,001$

4.2.1 Bestimmung von Testosteron im Blutplasma

Vor Einsetzen des Implantats wurden Testosteron-Konzentrationen zwischen 0,59 und 7,87 ng/ml gemessen, der Durchschnitt ($\bar{x}_g(\text{SF})$) lag bei 2,47 (1,92) ng/ml. Zwischen den einzelnen Gruppen gab es keinen signifikanten Unterschied. Nach 8 Wochen war die endokrine Hodenfunktion bei allen Hunden downreguliert, der Testosterongehalt im Blutplasma lag mit Ausnahme des Hundes Bruno, DG D, der einen Wert von 0,11 ng/ml aufwies, unterhalb der Nachweisgrenze ($<0,10$ ng/ml). Diese downregulierende Wirkung des Implantats war auch nach 5 Monaten (zum Zeitpunkt der Implantatentfernung bzw. Kastration) nachweisbar. Alle Hunde, bis auf Spikey, DG C (0,11 ng/ml) und Shy, DG D (0,12 ng/ml), hatten einen Testosteronwert unterhalb der Nachweisgrenze ($<0,10$ ng/ml).

Zum Zeitpunkt der Kastration konnte für Kollektiv 1 (DG A, B, C und D) ein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit von der Gruppe beobachtet werden ($p < 0,001$). Während sich die Testosteron-Konzentrationen der Hunde in DG A, bis auf Elias (0,28 ng/ml), unterhalb der Nachweisgrenze ($<0,10$ ng/ml) befanden, war bereits in DG B im Durchschnitt ($\bar{x}_g(\text{SF})$) ein Wert von 2,12 (2,31) ng/ml messbar. Dieser Anstieg war statistisch signifikant (Tukey-Test, $p < 0,01$). Zwischen DG B, C und D war statistisch kein Unterschied nachweisbar. Die Hunde in PG wiesen alle einen Testosteronwert unterhalb der Nachweisgrenze ($<0,10$ ng/ml) auf und unterschieden sich statistisch nicht von DG A.

In Tabelle 11 und Abbildung 10 sind die mittleren Testosteron-Werte ($\bar{x}_g(\text{SF})$) zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten tabellarisch sowie graphisch wiedergegeben.

4.2.2 Bestimmung von LH im Blutplasma

Die LH-Konzentration im Blutplasma lag vor Einsetzen des Implantats in einem Bereich von unterhalb der Nachweisgrenze ($<0,10$ ng/ml) bis zu 6,00 ng/ml. Im Durchschnitt ($\bar{x}_g(\text{SF})$) betrug sie 1,68 (2,46) ng/ml. Statistisch unterschieden sich die LH-Werte der einzelnen Gruppen vor Einsetzen des Implantats nicht. Im Vergleich dazu war die LH-Konzentration 8 Wochen bzw. 5 Monate nach Einsetzen des Implantats verringert, durchschnittlich ($\bar{x}_g(\text{SF})$) lag sie bei 0,29 (2,06) ng/ml bzw. 0,20 (1,95) ng/ml, die höchsten gemessenen Einzelwerte betrugen zu diesen Zeitpunkten 0,70 ng/ml bzw. 0,80 ng/ml. Auch hier war kein statistisch signifikanter Gruppeneinfluss nachweisbar.

Tabelle 11: Testosteron-Konzentration im Blutplasma in ng/ml zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten, Gruppenmittelwerte ($\bar{x}_g$ (SF))

Gruppe	Testosteron-Konzentration in ng/ml ($\bar{x}_g$ (SF))			
	vor Implantat	nach 8 Wochen	nach 5 Monaten	bei Kastration
PG	2,85 (2,69)	0,09 (1,00)	0,09 (1,00) ¹	
DG A	2,70 (1,48)	0,09 (1,00)	0,09 (1,00)	0,12 (1,76)
DG B	3,15 (1,10)	0,09 (1,00)	0,09 (1,00)	2,12 (2,31)
DG C	2,23 (1,62)	0,09 (1,00)	0,09 (1,09)	1,62 (3,46)
DG D	2,07 (2,85)	0,09 (1,09)	0,10 (1,14)	3,31 (1,53)

¹⁾ identisch mit Zeitpunkt der Kastration

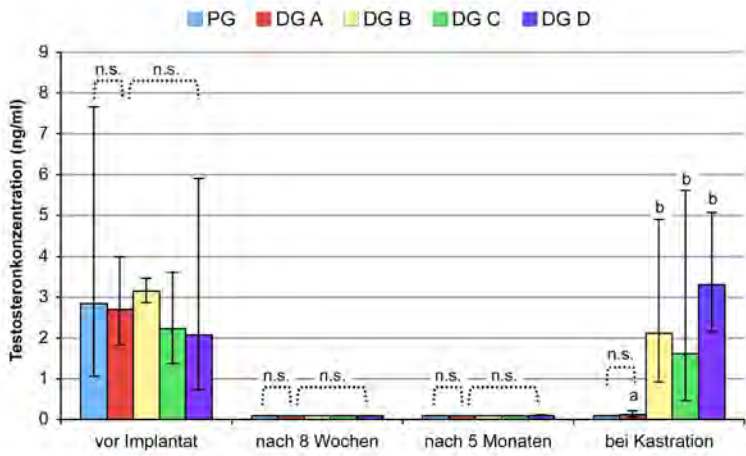


Abbildung 10: Testosteron-Konzentration im Blutplasma in ng/ml zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten, Gruppenmittelwerte ($\bar{x}_g \cdot SF^{\pm 1}$), Werte mit unterschiedlichen Buchstaben (ab) unterscheiden sich signifikant (Tukey-Test, $p < 0,01$)

In Abhängigkeit von der Gruppe ($p < 0,03$) war zum Zeitpunkt der Kastration in Kollektiv 1 (DG A, B, C und D) ein Anstieg der LH-Werte zu beobachten. In DG A wurde im Durchschnitt ($\bar{x}_g(\text{SF})$) ein Wert von 0,20 (2,89) ng/ml gemessen, die entsprechenden Werte für die anderen Gruppen ergaben sich wie folgt: DG B 1,11 (1,70) ng/ml, DG C 1,34 (2,65) ng/ml, DG D 1,00 (1,69) ng/ml. DG A und DG C unterschieden sich dabei statistisch signifikant (Tukey-Test, $p < 0,05$). PG wies durchschnittlich ($\bar{x}_g(\text{SF})$) eine LH-Konzentration von 0,46 (1,66) ng/ml auf. Der Unterschied zwischen DG A und PG war statistisch nicht signifikant.

Tabelle 12 und Abbildung 11 veranschaulichen die Ergebnisse der LH-Messung und die Resultate der statistischen Auswertung.

4.2.3 Bestimmung von FSH im Blutplasma

Vor Versuchsbeginn konnten im Blutplasma FSH-Konzentrationen zwischen 2,38 und 9,62 ng/ml gemessen werden, durchschnittlich ($\bar{x}_g(\text{SF})$) lag die FSH-Konzentration zu diesem Zeitpunkt bei 4,87 (1,50) ng/ml. Statistisch unterschieden sich die einzelnen Gruppen nicht. 8 Wochen nach Einsetzen des Implantats waren die FSH-Werte im Durchschnitt ($\bar{x}_g(\text{SF})$) auf 0,64 (3,42) ng/ml, 5 Monate nach Einsetzen des Implantats auf 0,39 (3,78) ng/ml gesunken. Auch hier war kein statistisch signifikanter Einfluss der Gruppen nachweisbar.

Zum Zeitpunkt der Kastration kam es in Kollektiv 1 (DG A, B, C und D) in Abhängigkeit von der Gruppe zu einem signifikanten Anstieg der FSH-Konzentrationen ($p < 0,005$). Während die FSH-Werte in DG A durchschnittlich ($\bar{x}_g(\text{SF})$) noch bei 1,56 (1,92) ng/ml lagen, konnte bereits in DG B im Durchschnitt ($\bar{x}_g(\text{SF})$) ein FSH-Gehalt von 6,37 (1,68) ng/ml gemessen werden (Tukey-Test, $p < 0,05$). Im weiteren Verlauf der Rekrudescenz der Spermatogenese wurden in DG C und DG D, wie in Tabelle 13 und Abbildung 12 zu sehen, niedrigere FSH-Konzentrationen als in DG B beobachtet, die Unterschiede zwischen DG B, C und D waren statistisch jedoch nicht signifikant. PG wies im Durchschnitt ($\bar{x}_g(\text{SF})$) einen FSH-Gehalt von 0,99 (3,58) ng/ml auf und war zu DG A nicht statistisch signifikant.

Tabelle 12: LH-Konzentration im Blutplasma in ng/ml zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten, Gruppenmittelwerte ($\bar{x}_g(SF)$)

Gruppe	LH-Konzentration in ng/ml ($\bar{x}_g(SF)$)			
	vor Implantat	nach 8 Wochen	nach 5 Monaten	bei Kastration
PG	3,22 (1,13)	0,17 (2,53)	0,46 (1,66) ¹	
DG A	1,54 (2,15)	0,17 (2,20)	0,14 (1,54)	0,20 (2,89)
DG B	1,56 (1,29)	0,35 (1,90)	0,26 (1,26)	1,11 (1,70)
DG C	2,19 (1,79)	0,40 (1,32)	0,18 (2,28)	1,34 (2,65)*
DG D	0,94 (4,54)	0,37 (2,26)	0,16 (1,71)	1,00 (1,69)**

1) identisch mit Zeitpunkt der Kastration, *) n=5, **) n=4

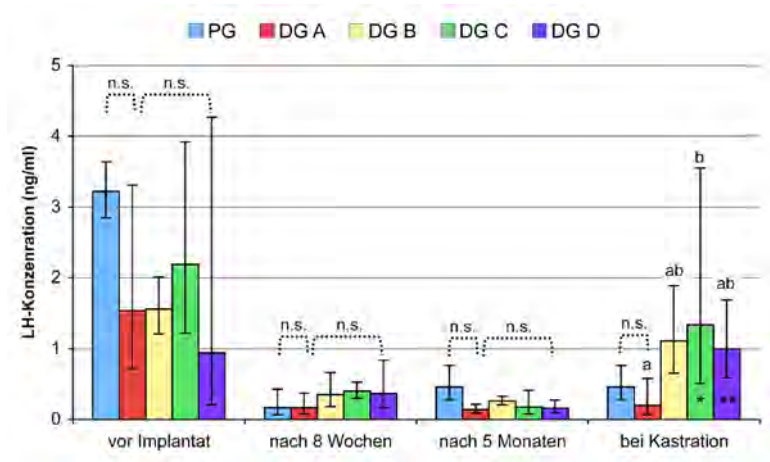


Abbildung 11: LH-Konzentration im Blutplasma in ng/ml zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten, Gruppenmittelwerte ($\bar{x}_g \cdot SF^{\pm 1}$), * n=5, ** n=4, Werte mit unterschiedlichen Buchstaben (ab) unterscheiden sich signifikant (Tukey-Test, $p < 0,05$)

Tabelle 13: FSH-Konzentration im Blutplasma in ng/ml zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten, Gruppenmittelwerte ($\bar{x}_g(\text{SF})$)

Gruppe	FSH-Konzentration in ng/ml ($\bar{x}_g(\text{SF})$)			
	vor Implantat	nach 8 Wochen	nach 5 Monaten	bei Kastration
PG	6,38 (1,65)	1,29 (4,86)	0,99 (3,58) ¹	
DG A	4,77 (1,55)	1,06 (5,02)	0,93 (3,33)	1,56 (1,92)
DG B	5,16 (1,38)	0,64 (4,07)	0,45 (4,69)	6,37 (1,68)
DG C	4,44 (1,59)	0,34 (2,23)	0,15 (2,34)	5,86 (1,37)*
DG D	4,56 (1,51)	0,59 (3,20)	0,31 (4,09)	3,96 (1,38)**

¹⁾ identisch mit Zeitpunkt der Kastration, *) n=5, **) n=4

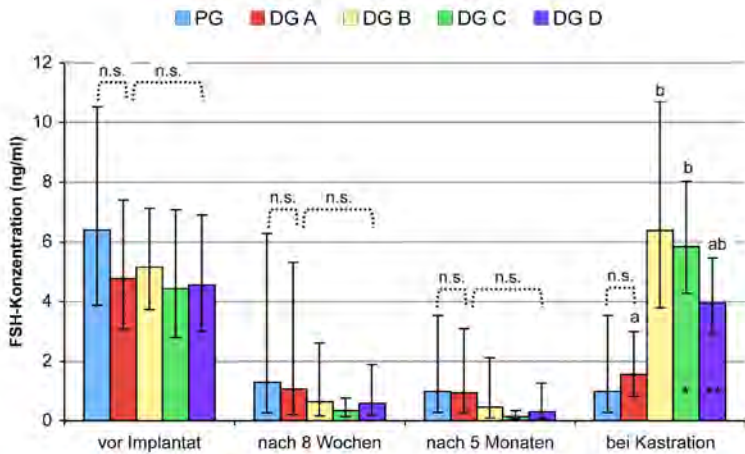


Abbildung 12: FSH-Konzentration im Blutplasma in ng/ml zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten, Gruppenmittelwerte ($\bar{x}_g \cdot \text{SF}^{\pm 1}$), * n=5, ** n=4, Werte mit unterschiedlichen Buchstaben (ab) unterscheiden sich signifikant (Tukey-Test, DG A : DG B $p < 0,05$, DG A : DG C $p < 0,01$)

4.3 Ausmessung der Fläche der Leydigzellkerne

Die Resultate der Vermessung der Leydigzellkerne sowie deren statistische Auswertung sind in Tabelle 14 und Abbildung 13 dargestellt. Mit $p < 0,0001$ bzw. $p < 0,02$ ergab sich ein signifikanter Einfluss der Gruppe sowohl für Kollektiv 1 (DG A, B, C, D und CG) als auch für Kollektiv 2 (DG A, PG und JG).

Die Leydigzellkerne in DG A waren mit einer Fläche von $21,93 \pm 2,27 \mu\text{m}^2$ signifikant kleiner als die der Gruppen CG, DG B, C und D mit einer durchschnittlichen Fläche von $32,34 \pm 2,09 \mu\text{m}^2$ (Tukey-Test, $p < 0,01$). DG B, C und D sowie CG unterschieden sich statistisch nicht.

In PG wurde im Durchschnitt eine Leydigzellkern-Fläche von $20,99 \pm 0,56 \mu\text{m}^2$ gemessen. Der Unterschied zwischen PG und DG A war statistisch nicht signifikant. Eine Zwischenstellung zwischen den adulten und den downregulierten Hunden nahm JG mit einer durchschnittlichen Fläche von $25,76 \pm 0,82 \mu\text{m}^2$ ein. Damit waren die Leydigzellkerne in JG signifikant größer als in DG A und PG (Tukey-Test, $p < 0,05$).

Tabelle 14: Fläche A der Leydigzellkerne in μm^2 , Gruppenmittelwerte ($\bar{x} \pm \text{SD}$), Werte mit unterschiedlichen Buchstaben (ab bzw. AB) unterscheiden sich signifikant (Tukey-Test, ab: $p < 0,01$, AB: $p < 0,05$)

Gruppe	Fläche A ($\bar{x} \pm \text{SD}$)
JG	$25,76 \pm 0,82^A$
PG	$20,99 \pm 0,56^B$
DG A	$21,93 \pm 2,27^{B,a}$
DG B	$31,69 \pm 3,14^b$
DG C	$32,04 \pm 1,35^b$
DG D	$33,19 \pm 2,80^b$
CG	$32,23 \pm 1,81^b$

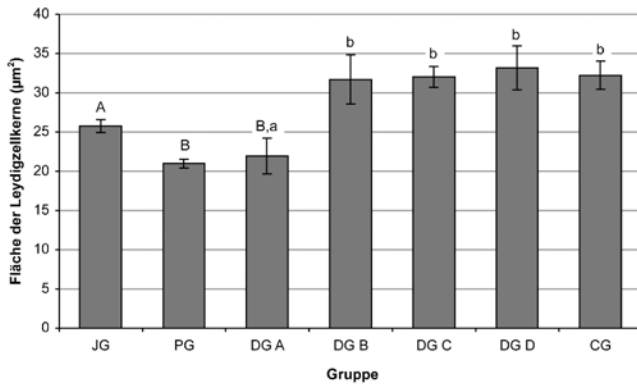


Abbildung 13: Fläche A der Leydigzellkerne in μm^2 , Gruppenmittelwerte ($\bar{x} \pm \text{SD}$), Werte mit unterschiedlichen Buchstaben (ab bzw. AB) unterscheiden sich signifikant (Tukey-Test, ab: $p < 0,01$, AB: $p < 0,05$)

4.4 Prozentuale Verteilung der Kompartimente im Hodengewebe

Tabelle 15 und Abbildung 14 geben Auskunft über die Ergebnisse der Ausmessung der Fläche der Tubuli seminiferi contorti und der Blut-/Lymphgefäße sowie der daraus resultierenden Fläche des Interstitiums (vgl. Abschnitt 3.8.3). Die einfaktorielle Varianzanalyse ergab mit $p < 0,0005$ einen signifikanten Einfluss der Gruppe bezüglich aller 3 Kompartimente für das Kollektiv 1 (DG A, B, C, D und CG). Für das Kollektiv 2 (DG A, PG und JG) konnte dies mit $p < 0,005$ für die Fläche der Tubuli und des Interstitiums sowie mit $p < 0,04$ für den Flächenanteil „Gefäße“ nachgewiesen werden.

Während die Tubuli in DG A $77,61 \pm 3,40\%$ des Hodenquerschnitts einnahmen, wurde in DG B ein Tubulus-Flächenanteil von $84,44 \pm 0,55\%$ gemessen. Dieser Anstieg war im paarweisen Gruppenvergleich statistisch signifikant (Tukey-Test, $p < 0,01$). Im weiteren Verlauf der Rekrudescenz der Spermatogenese stieg dieser Wert weiter an, in DG D bestanden $91,15 \pm 0,78\%$ des Hodengewebes aus Tubuli seminiferi contorti. DG D und CG ($89,73 \pm 1,46\%$) unterschieden sich statistisch nicht.

Entsprechend dazu nahm der Flächenanteil des Interstitiums im Verlauf der Rekrudescenz der Spermatogenese kontinuierlich ab. Die statistisch signifikanten Unterschiede entsprechen denen der Tubulusfläche (siehe Tabelle 15). Parallel dazu verringerte sich der prozentuale Flächenanteil der Gefäße von $2,77 \pm 0,80\%$ in DG A auf $0,97 \pm 0,17\%$ in DG D (Tukey-Test, $p < 0,01$).

Die prozentuale Verteilung der Kompartimente in PG wich nur geringfügig und nicht statistisch signifikant von der in DG A ab. In JG entsprachen $42,03\%$ des Hodenquerschnitts interstitiellem Gewebe (davon $1,82 \pm 0,37\%$ Gefäßfläche) und nur $57,97 \pm 7,45\%$ bestand aus Tubulusgewebe. Die Flächenanteile von Tubuli und Interstitium in JG unterschieden sich statistisch signifikant von DG A und PG (Tukey-Test, $p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$).

Tabelle 15: Prozentuale Verteilung der Kompartimente im Hodengewebe, Gruppenmittelwerte ($\bar{x} \pm \text{SD}$), Werte mit unterschiedlichen Buchstaben (abcd bzw. AB) unterscheiden sich signifikant (Tukey-Test, $p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$)

Gruppe	Flächenanteil in % ($\bar{x} \pm \text{SD}$)		
	Tubuli	Interstitium	Gefäße
JG	57,97 $\pm$ 7,45 ^A	40,21 $\pm$ 7,57 ^A	1,82 $\pm$ 0,37 ^A
PG	75,12 $\pm$ 5,39 ^B	21,51 $\pm$ 5,24 ^B	3,37 $\pm$ 0,26 ^B
DG A	77,61 $\pm$ 3,40 ^{B,a}	19,63 $\pm$ 2,90 ^{B,a}	2,77 $\pm$ 0,80 ^{AB,a}
DG B	84,44 $\pm$ 0,55 ^b	13,47 $\pm$ 0,40 ^b	2,09 $\pm$ 0,18 ^{ab}
DG C	87,48 $\pm$ 2,08 ^{bc}	11,00 $\pm$ 1,66 ^{bc}	1,52 $\pm$ 0,52 ^{bc}
DG D	91,15 $\pm$ 0,78 ^d	7,88 $\pm$ 0,87 ^d	0,97 $\pm$ 0,17 ^c
CG	89,73 $\pm$ 1,46 ^{cd}	9,11 $\pm$ 1,54 ^{cd}	1,16 $\pm$ 0,13 ^{bc}

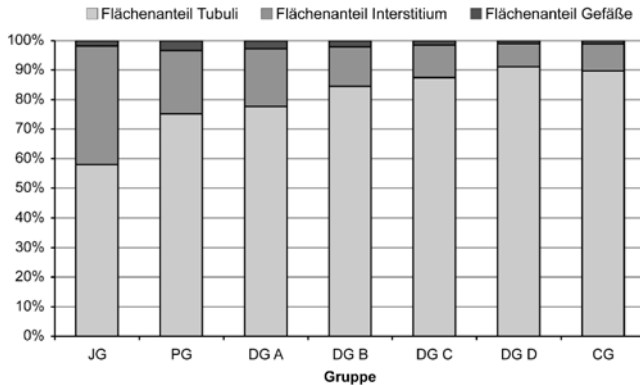


Abbildung 14: Prozentuale Verteilung der Kompartimente im Hodengewebe

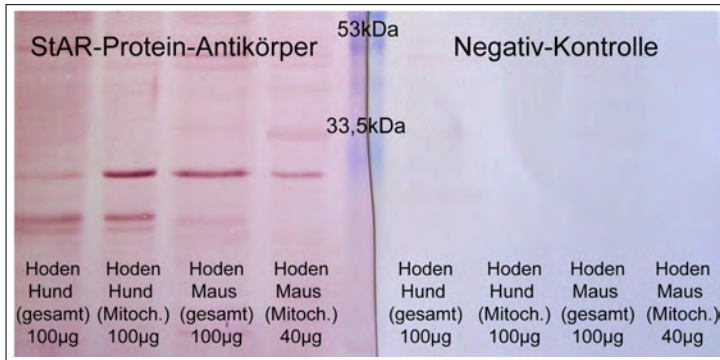


Abbildung 15: Überprüfung der Spezifität des StAR-Protein-Antikörpers im Western Blot, mittig: Proteinstandard (SDS-7B); alle Proben weisen eine Bande bei 30 kDa auf

4.5 StAR-Protein

4.5.1 Expression auf Protein-Ebene

Spezifität des verwendeten Kaninchen-anti-Maus StAR-Protein-Antikörpers

Die Spezifität des in der Immunhistochemie verwendeten Kaninchen-anti-Maus StAR-Protein-Antikörpers konnte im Western Blot bestätigt werden. Da das StAR-Protein in den Mitochondrien lokalisiert ist, wurde zusätzlich zum Gesamtproteinextrakt mitochondriales Protein im Western Blot eingesetzt. Als Positivkontrolle diente Hodengewebe einer Maus. In allen untersuchten Proben war, wie in Abbildung 15 zu sehen, eine Bande mit einer molekularen Masse von 30 kDa vorhanden.

Lokalisierung der immunhistochemischen Signale

Bei den immunhistochemischen Untersuchungen zum Nachweis des StAR-Proteins waren positive Farbreaktionen auf die Leydigzellen im Interstitium begrenzt. In JG, PG und DG A waren nur wenige Signale vorhanden, während in DG B, C und D sowie CG nahezu alle Leydigzellen immunopositive Signale enthielten. Corpus luteum-Gewebe einer Hündin stand als Positivkontrolle zur Verfügung; darin wurden die Luteinzellen immunhistochemisch angefärbt. In den mitgeführten Negativkontrollen waren keine

Signale existent. Abbildung 18 (a) – 18 (j) zeigt das Ergebnis der immunhistochemischen Färbung an je einem Beispiel pro Gruppe sowie für die Positiv- und Negativkontrollen. Da die für die weitere Auswertung verwendeten Gewebeschnitte nicht mit Hämatoxylin gegengefärbt waren, wurden für Abbildung 18 zusätzliche Gewebeschnitte nach dem in Abschnitt 3.8.2 beschriebenen Protokoll mit Gegenfärbung angefertigt.

Quantifizierung der immunhistochemischen Reaktion

- a) Mittlerer Grauwert der immunopositiven Pixel (als Maßstab für die Intensität der Immunreaktion, Dimension 0–255)

Die einfaktorielle Varianzanalyse ließ keinen Einfluss der Gruppe erkennen, weder für Kollektiv 1 noch für Kollektiv 2. Im direkten Vergleich zwischen DG A ($65,68 \pm 9,34$) und DG B ($73,39 \pm 3,17$) wurde jedoch ein Anstieg des mittleren Grauwerts beobachtet. Entsprechend kann man das Farbpräzipitat in DG B als dunkler im Vergleich zu DG A beschreiben.

Die immunopositiven Signale in PG waren mit einem mittleren Grauwert von $57,51 \pm 3,56$ der Tendenz nach heller als die in DG A. JG wies mit $63,61 \pm 0,13$ ebenfalls einen vergleichsweise niedrigen Grauwert auf (siehe Tabelle 16 und Abbildung 16), auch die Unterschiede zwischen JG, PG und DG A waren statistisch nicht signifikant.

- b) Flächenanteil der immunopositiven Bezirke am Interstitium (als Maßstab für das Ausmaß der Immunreaktion, Dimension %)

Wie zu Beginn dieses Abschnittes beschrieben, waren in JG, PG und DG A subjektiv nur wenige StAR-Protein-immunopositive Signale vorhanden. Entsprechend lag der prozentuale Anteil der immunopositiven Fläche in allen 3 Gruppen bei oder nur knapp über 0%. DG A, PG und JG unterschieden sich auch auf Gruppenebene statistisch nicht.

Für das Kollektiv 1 (DG A, B, C, D und CG) ergab sich ein signifikanter Einfluss der Gruppe ($p < 0,02$). In DG B waren 3,26 % der Fläche des Interstitiums immunhistochemisch angefärbt. Beim direkten Gruppenvergleich war der Anstieg von DG A (0,09 %) zu DG B allerdings statistisch nicht signifikant. Ein signifikanter Unterschied konnte lediglich zwischen DG A und DG D sowie zwischen DG A und CG nachgewiesen werden (Tukey-Test, $p < 0,05$; vgl. Tabelle 17 und Abbildung 17).

Tabelle 16: Immunhistochemischer Nachweis des StAR-Proteins, Mittlerer Grauwert der immunopositiven Pixel, Gruppenmittelwerte ($\bar{x} \pm SD$)

Gruppe	Grauwert ($\bar{x} \pm SD$)
JG	63,61 $\pm$ 0,13
PG	57,51 $\pm$ 3,56
DG A	65,68 $\pm$ 9,34
DG B	73,39 $\pm$ 3,17
DG C	68,76 $\pm$ 4,41
DG D	70,14 $\pm$ 3,77
CG	68,26 $\pm$ 2,59

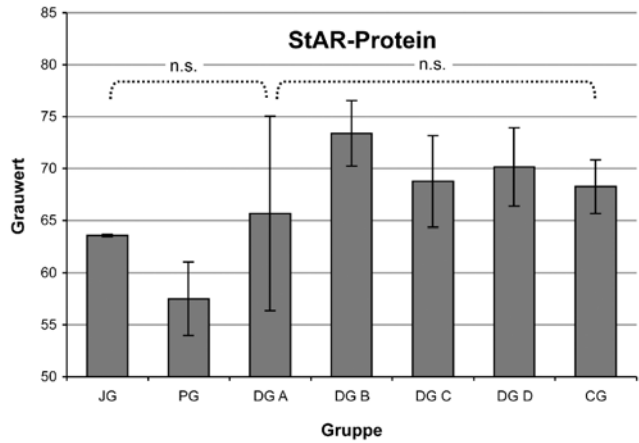


Abbildung 16: Immunhistochemischer Nachweis des StAR-Proteins, Mittlerer Grauwert der immunopositiven Pixel, Gruppenmittelwerte ($\bar{x} \pm SD$)

Tabelle 17: Immunhistochemischer Nachweis des StAR-Proteins, Flächenanteil der immunopositiven Bezirke am Interstitium in %, modif. 1s-Bereich nach arcsin-Transformation

Gruppe	prozentualer Flächenanteil (arcsin)
JG	0,02 (0,00-0,08)
PG	0,00 (0,00-0,00)
DG A	0,09 (0,00-0,42)
DG B	3,26 (0,97-6,82)
DG C	1,76 (0,30-4,41)
DG D	3,69 (2,31-5,39)
CG	3,33 (1,08-6,76)

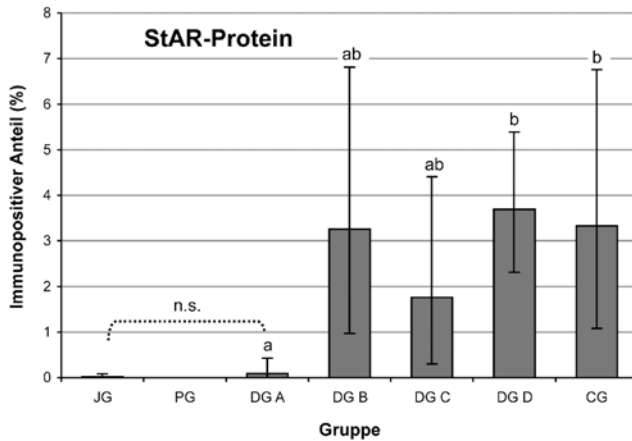


Abbildung 17: Immunhistochemischer Nachweis des StAR-Proteins, Flächenanteil der immunopositiven Bezirke am Interstitium in %, modif. 1s-Bereich nach arcsin-Transformation, Werte mit unterschiedlichen Buchstaben (ab) unterscheiden sich signifikant (Tukey-Test, $p < 0,05$)

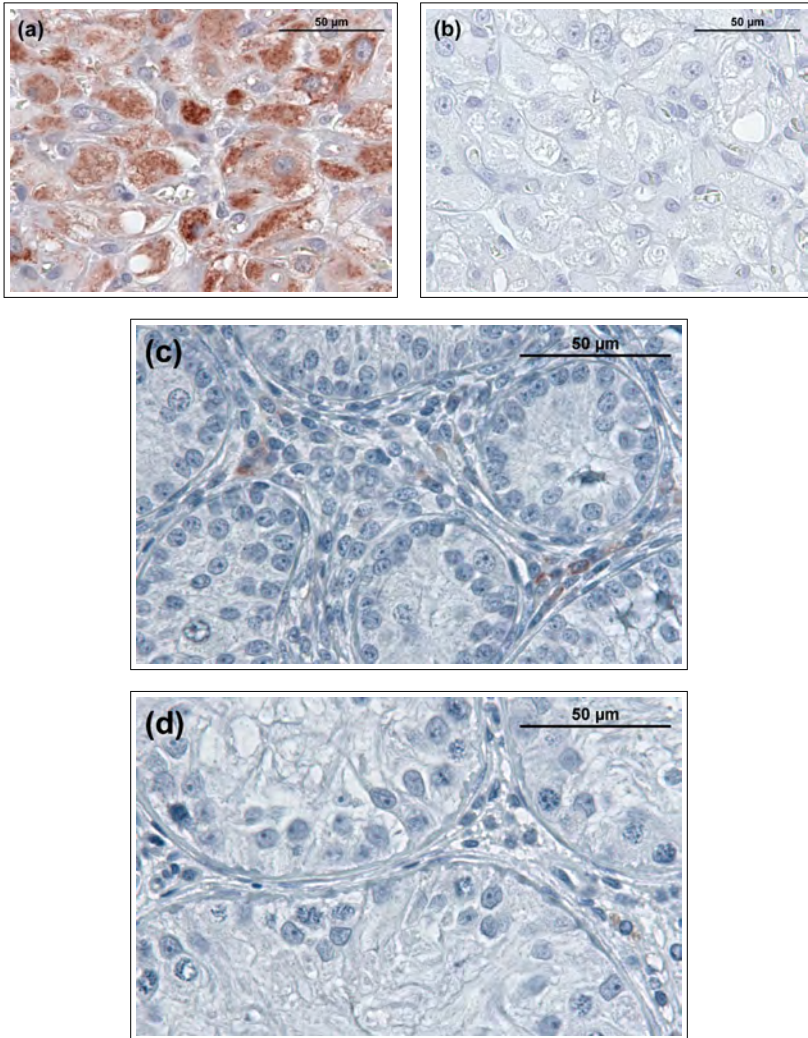


Abbildung 18: Immunhistochemischer Nachweis des StAR-Proteins, 400-fache Vergrößerung, (a) Positivkontrolle: Corpus luteum Hündin, (b) Negativkontrolle: Corpus luteum Hündin, (c) JG, Hund William, (d) PG, Hund Floh

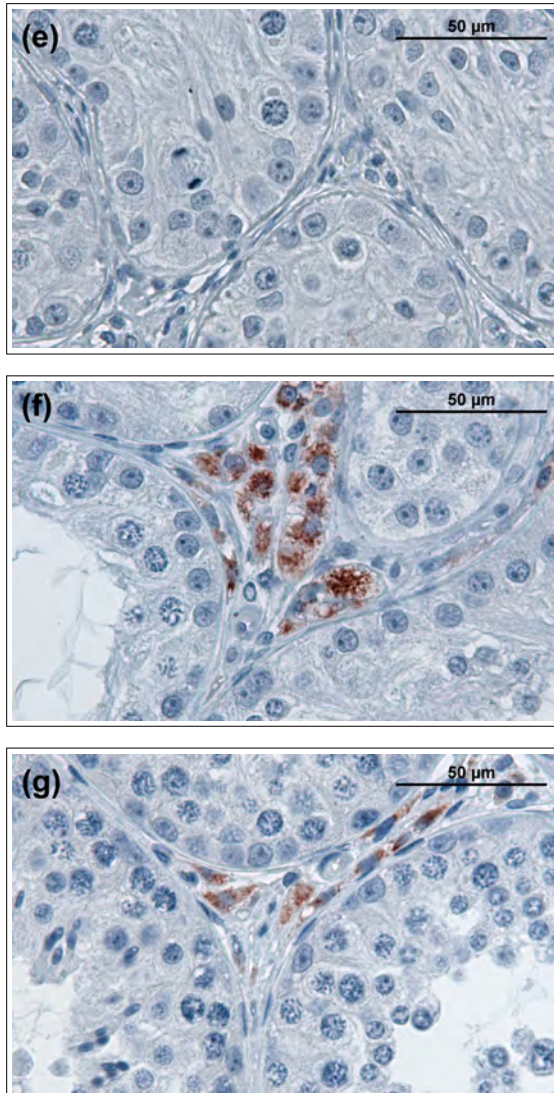


Abbildung 18: Fortsetzung Immunhistochemischer Nachweis des StAR-Proteins, 400-fache Vergrößerung, (e) DG A, Hund Nick, (f) DG B, Hund LeoB, (g) DG C, Hund Mortimer

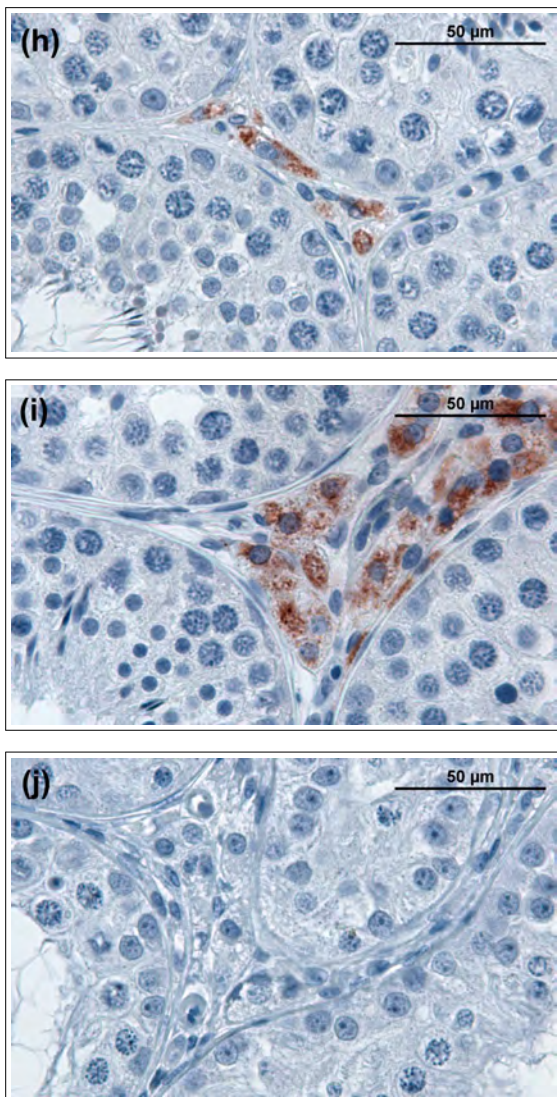


Abbildung 18: Fortsetzung Immunhistochemischer Nachweis des STAR-Proteins, 400-fache Vergrößerung, (h) DG D, Hund Berry, (i) CG, Hund Charly, (j) Negativkontrolle: DG B, Hund LeoB

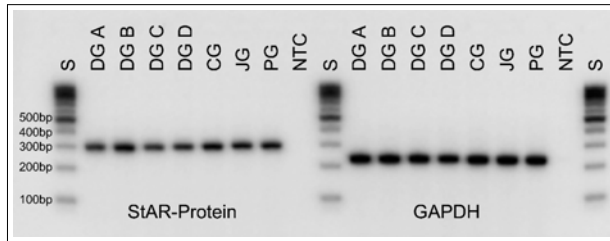


Abbildung 19: Qualitativer Nachweis von StAR-Protein-mRNA mittels RT-PCR, Analyse der PCR-Produkte durch gel-elektrophoretische Auftrennung und Sichtbarmachung unter UV-Licht, S = DNA-Größenstandard

4.5.2 Expression auf mRNA-Ebene

Nach der gel-elektrophoretischen Auftrennung der RT-PCR-Produkte aus der StAR-Protein-PCR war unter UV-Licht jeweils eine Bande in der zu erwartenden Größe von 295 bp zu sehen (Abbildung 19). Damit konnte die für das StAR-Protein kodierende mRNA qualitativ in allen Gruppen nachgewiesen werden. Parallel dazu wurden die RT-PCR-Produkte der GAPDH-PCR auf das Agarose-Gel aufgetragen. Diese PCR resultierte in allen Gruppen mit einer Bande bei 228 bp, womit die Integrität der RNA und der daraus gewonnenen cDNA bestätigt werden konnte. In den Negativkontrollen waren keine Banden sichtbar. Die Spezifität der PCR-Produkte konnte durch die nachfolgende Sequenzierung bestätigt werden.

Die Ergebnisse der RT-qPCR für das StAR-Protein sind in Tabelle 18 und Abbildung 20 dargestellt. Für jede in die RT-qPCR eingesetzte cDNA konnte mit Hilfe der Software „CFX ManagerTM“ ein C_q -Wert ermittelt werden. In den mitgeführten Negativkontrollen konnten keine Fluoreszenzsignale gemessen werden.

Mit dem Wert „ratio“ wurde in der RT-qPCR die n -fache Expression eines Genes im Vergleich zum Mittelwert der Kontrollgruppe CG berechnet (vgl. Abschnitt 3.10.6). In PG bzw. DG A war damit die StAR-Protein-mRNA mit einer ratio von $0,64 \pm 0,02$ bzw. $0,55 \pm 0,16$ geringer exprimiert als in CG. Im Gegensatz dazu war sie in DG B, C und D mit einer durchschnittlichen ratio von $1,41 \pm 0,68$ im Vergleich zu CG überexprimiert. Für Kollektiv 1 (DG A, B, C, D und CG) ergab sich mit $p = 0,14$ kein Einfluss der Gruppe, obwohl in DG A der niedrigste Wert gemessen wurde.

Der Gruppeneffekt war für das Kollektiv 2 (DG A, PG und JG) mit $p < 0,03$ signifikant. Im Speziellen unterschied sich JG signifikant von PG bzw. DG A (Tukey-Test, $p < 0,05$). Daneben war die StAR-Protein-Expression auf mRNA-Ebene in JG nahezu 4-fach höher als in CG.

Tabelle 18: Relative Expression der StAR-Protein-mRNA (ratio), Gruppenmittelwerte ($\bar{x} \pm SD$)

Gruppe	ratio ($\bar{x} \pm SD$)
JG	$3,98 \pm 2,49$
PG	$0,64 \pm 0,02$
DG A	$0,55 \pm 0,16$
DG B	$1,73 \pm 0,97$
DG C	$1,29 \pm 0,67$
DG D	$1,36 \pm 0,61$
CG	$1,07 \pm 0,38$

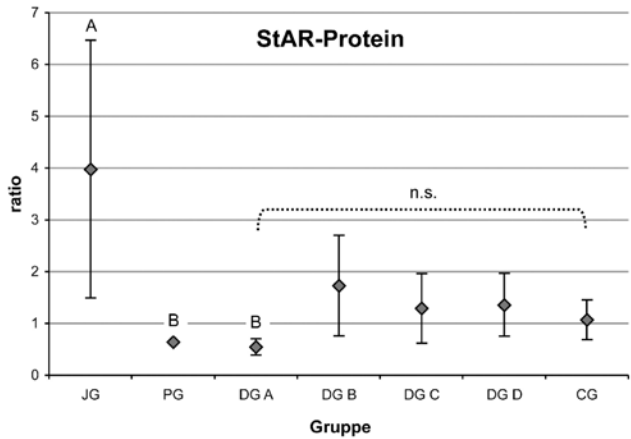


Abbildung 20: Relative Expression der StAR-Protein-mRNA (ratio), Gruppenmittelwerte ($\bar{x} \pm SD$), Werte mit unterschiedlichen Buchstaben (AB) unterscheiden sich signifikant (Tukey-Test, $p < 0,05$)

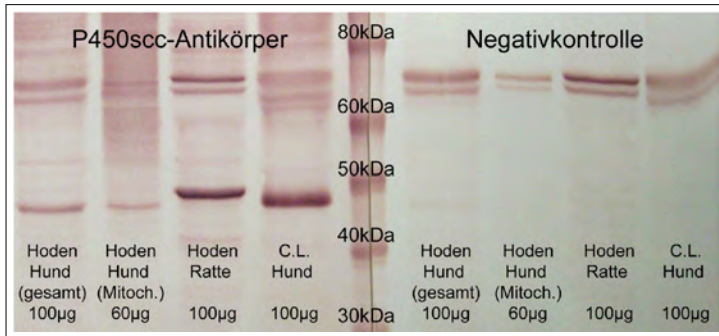


Abbildung 21: Überprüfung der Spezifität des P450scc-Antikörpers im Western Blot, mittig: Proteinstandard (Roti®-Mark WESTERN Set); alle Proben weisen eine Bande bei ca. 49 kDa auf

4.6 P450scc

4.6.1 Expression auf Protein-Ebene

Spezifität des verwendeten Kaninchen-anti-Ratte P450scc-Antikörpers

Im Western Blot konnte die Spezifität des in der Immunhistochemie verwendeten Kaninchen-anti-Ratte P450scc-Antikörpers bestätigt werden. Dieses Enzym befindet sich an der inneren mitochondrialen Membran, deswegen fand neben Gesamtproteinextrakt auch mitochondriales Protein eines Hundehodens im Western Blot Verwendung. Gesamtprotein von Hodengewebe einer Ratte und von caninem Corpus luteum dienten als Positivkontrolle. In allen untersuchten Proben war eine deutliche Bande im Bereich der erwarteten molekularen Masse von 49 kDa zu erkennen. Allerdings befand sich, wie in Abbildung 21 zu sehen, die Bande des Rattengewebes minimal höher als die Banden der Hundegewebe. Die Banden im Bereich zwischen 60 und 80 kDa waren ebenfalls in der Negativkontrolle sichtbar. Entsprechend mussten diese Banden als unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers bzw. des Avidin-Biotin-Komplexes bewertet werden.

Lokalisierung der immunhistochemischen Signale

Die Expression von P450scc im Hundehoden war, wie die immunhistochemischen Untersuchungen zeigten, auf die Leydigzellen im Interstitium beschränkt. In JG, DG B, C

und D sowie CG waren viele starke Signale, in PG und DG A nur wenige schwache Signale sichtbar. Als Positivkontrolle diente die Nebenniere eines Hundes; dort waren starke Signale in der Zona fasciculata und Zona reticularis, schwache Signale in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde lokalisiert. In den Negativkontrollen waren keine Farbreaktionen vorhanden. Die immunhistochemischen Färbeergebnisse sind in Abbildung 24 (a) – 24 (i) an je einem Beispiel pro Gruppe sowie für die Positiv- und Negativkontrolle dargestellt.

Quantifizierung der immunhistochemischen Reaktion

- a) Mittlerer Grauwert der immunopositiven Pixel (als Maßstab für die Intensität der Immunreaktion, Dimension 0–255)

Für das Kollektiv 1 (DG A, B, C, D und CG) ergab sich mit $p < 0,005$ ein signifikanter Einfluss der Gruppe. Mit einem mittleren Grauwert von $139,80 \pm 4,58$ waren die immunopositiven Signale in DG A signifikant heller als in DG B ($158,12 \pm 6,17$), DG C ($154,29 \pm 5,66$) und DG D ($155,85 \pm 7,39$) (Tukey-Test, $p < 0,01$). Zwischen diesen Gruppen konnte kein weiterer signifikanter Unterschied festgestellt werden. Das galt auch im Vergleich zu CG mit einem Grauwert von $150,61 \pm 3,94$ (Tabelle 19 und Abbildung 22).

In PG war die Intensität der Immunreaktion mit einem mittleren Grauwert von $137,05 \pm 1,20$ vergleichbar mit der in DG A. Der Grauwert in JG lag mit $146,03 \pm 3,37$ in einem mittleren Messbereich. Statistische Signifikanzen, auch im Hinblick auf den Effekt der Gruppe, zwischen PG, DG A und JG waren nicht vorhanden.

- b) Flächenanteil der immunopositiven Bezirke am Interstitium (als Maßstab für das Ausmaß der Immunreaktion, Dimension %)

Für das Kollektiv 1 (DG A, B, C, D und CG) bzw. Kollektiv 2 (DG A, PG und JG) ergab sich mit $p < 0,0005$ bzw. $p < 0,005$ ein signifikanter Einfluss der Gruppe. Der Anteil immunopositiver Bezirke zeigte von DG A zu DG B einen signifikanten Anstieg (Tukey-Test, $p < 0,01$). Während in DG A lediglich 0,07 % der Interstitiumfläche einen Grauwert oberhalb des Schwellenwertes aufwiesen, waren in DG B 6,70 % entsprechend immunhistochemisch angefärbt. Zu einem weiteren Anstieg kam es in DG C (9,83 %). Zwischen DG B, C und D sowie CG war kein signifikanter Unterschied erkennbar (vgl. Tabelle 20 und Abbildung 23).

DG A und PG (0,00 %) unterschieden sich statistisch nicht. Mit 3,87 % immunopositivem Flächenanteil ordnete sich JG zwischen die downregulierten und die adulten Hunde ein. Der Unterschied zwischen JG und DG A bzw. PG war statistisch signifikant (Tukey-Test, $p < 0,01$).

Tabelle 19: Immunhistochemischer Nachweis von P450scc, Mittlerer Grauwert der immunopositiven Pixel, Gruppenmittelwerte ($\bar{x} \pm SD$)

Gruppe	Grauwert ($\bar{x} \pm SD$)
JG	146,03 $\pm$ 3,37
PG	137,05 $\pm$ 1,20
DG A	139,80 $\pm$ 4,58
DG B	158,12 $\pm$ 6,17
DG C	154,29 $\pm$ 5,66
DG D	155,85 $\pm$ 7,39
CG	150,61 $\pm$ 3,94

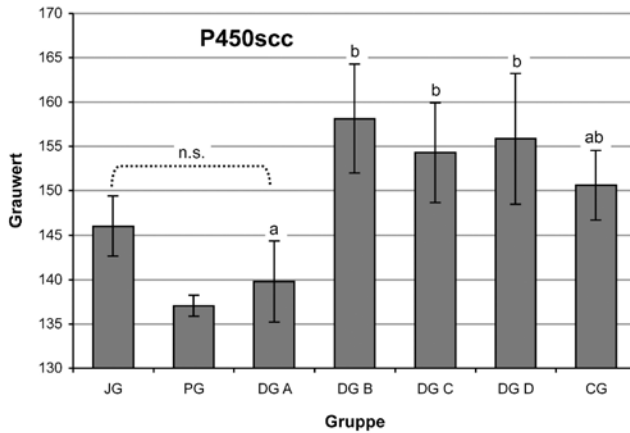


Abbildung 22: Immunhistochemischer Nachweis von P450scc, Mittlerer Grauwert der immunopositiven Pixel, Gruppenmittelwerte ($\bar{x} \pm SD$), Werte mit unterschiedlichen Buchstaben (ab) unterscheiden sich signifikant (Tukey-Test, $p < 0,01$)

Tabelle 20: Immunhistochemischer Nachweis von P450scc, Flächenanteil der immunopositiven Bezirke am Interstitium in %, modif. 1s-Bereich nach arcsin-Transformation

Gruppe	prozentualer Flächenanteil (arcsin)
JG	3,87 (1,39-7,52)
PG	0,00 (0,00-0,02)
DG A	0,07 (0,00-0,25)
DG B	6,70 (2,31-13,16)
DG C	9,83 (6,66-13,54)
DG D	8,17 (4,64-12,59)
CG	7,12 (3,70-11,56)

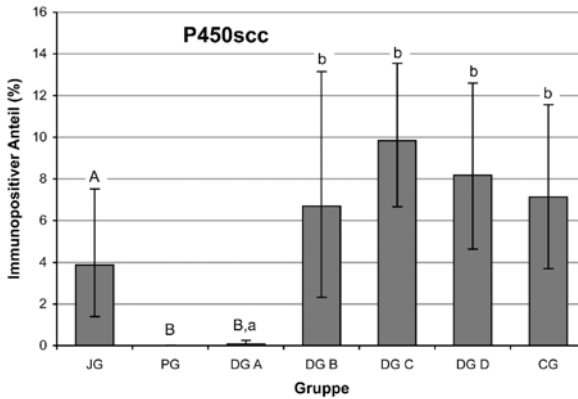


Abbildung 23: Immunhistochemischer Nachweis von P450scc, Flächenanteil der immunopositiven Bezirke am Interstitium in %, modif. 1s-Bereich nach arcsin-Transformation, Werte mit unterschiedlichen Buchstaben (ab bzw. AB) unterscheiden sich signifikant (Tukey-Test, $p < 0,01$)

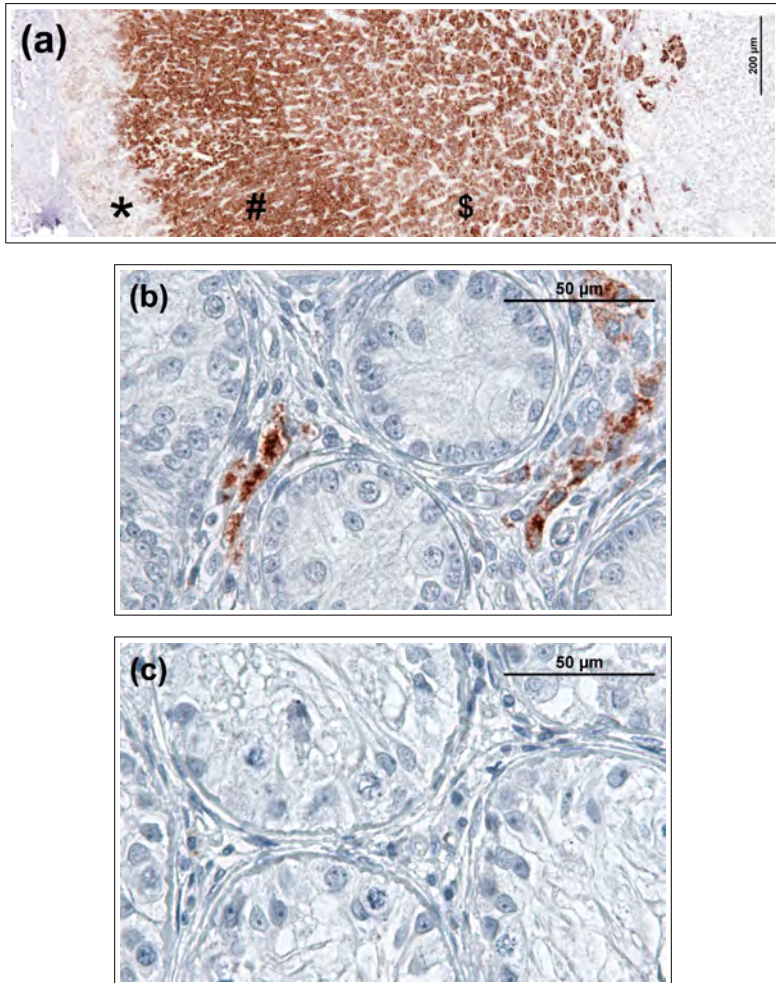


Abbildung 24: Immunhistochemischer Nachweis von P450scc, (a) Positivkontrolle: Nebenniere Hund, * Zona glomerulosa, # Zona fasciculata, \$ Zona reticularis, 100-fache Vergrößerung, (b) JG, Hund Averell, 400-fache Vergrößerung, (c) PG, Hund Floh, 400-fache Vergrößerung

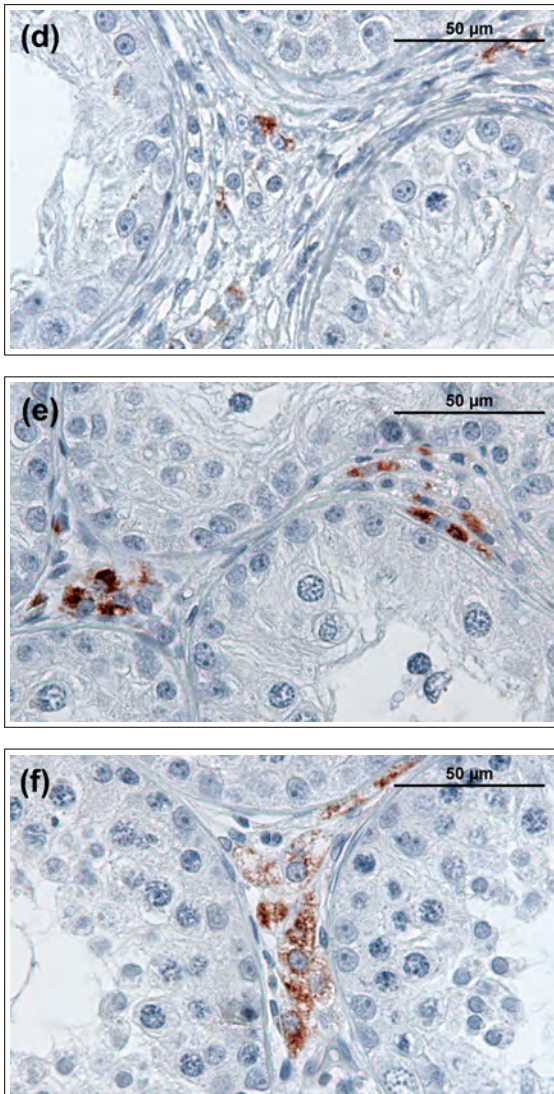


Abbildung 24: Fortsetzung Immunhistochemischer Nachweis von P450sc, 400-fache Vergrößerung, (d) DG A, Hund Elias, (e) DG B, Hund TheoH, (f) DG C, Hund LeoS

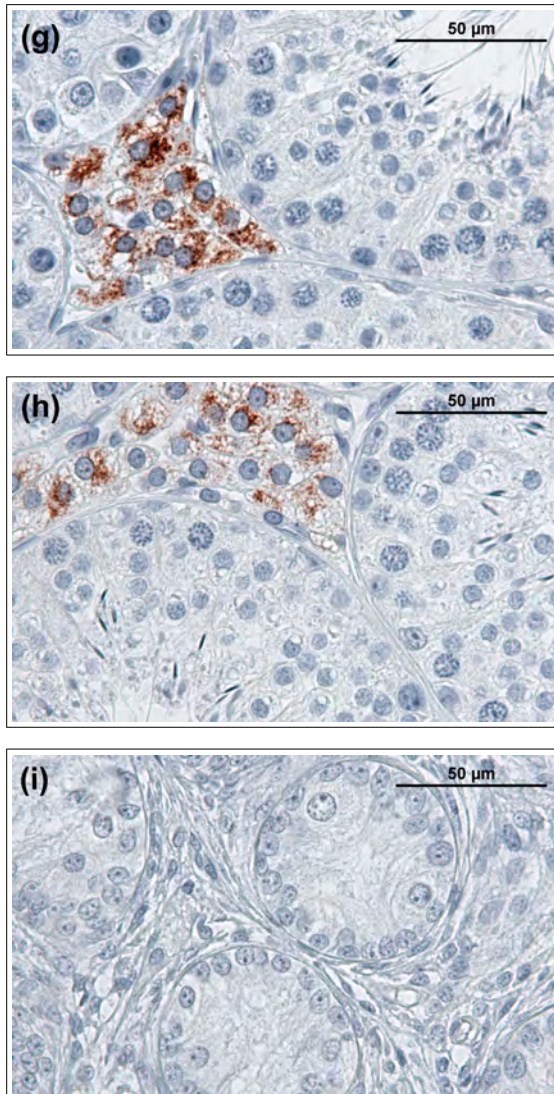


Abbildung 24: Fortsetzung Immunhistochemischer Nachweis von P450scc, 400-fache Vergrößerung, (g) DG D, Hund Sydney, (h) CG, Hund Soto, (i) Negativkontrolle: JG, Hund Averell,

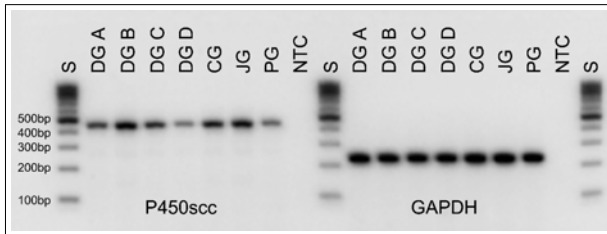


Abbildung 25: Qualitativer Nachweis von P450scc-mRNA mittels RT-PCR, Analyse der PCR-Produkte durch gel-elektrophoretische Auftrennung und Sichtbarmachung unter UV-Licht, S = DNA-Größenstandard

4.6.2 Expression auf mRNA-Ebene

Mittels RT-PCR konnte die Expression von P450scc-mRNA qualitativ in allen Gruppen nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 25 visualisiert, war unter UV-Licht nach gel-elektrophoretischer Auftrennung der RT-PCR-Produkte jeweils eine Bande in der erwarteten Größe von 439 bp vorhanden. Mittels Sequenzierung konnte die Spezifität der PCR-Produkte bestätigt werden. Die Ergebnisse für das Referenzgen GAPDH entsprechen denen in Abschnitt 4.5.2.

Tabelle 21 und Abbildung 26 fassen die Ergebnisse der RT-qPCR für P450scc zusammen. Für jede eingesetzte Probe ging dabei ein C_q -Wert hervor, in den Negativkontrollen konnten keine Fluoreszenzsignale detektiert werden.

Die P450scc-mRNA-Expression war in DG A mit einer ratio von $0,26 \pm 0,19$ geringer als in DG B mit einer ratio von $1,64 \pm 1,30$. In der einfaktoriellen Varianzanalyse für Kollektiv 1 (DG A, B, C, D und CG) zeigte sich ein signifikanter Gruppeneinfluss ($p < 0,05$), allerdings waren im Tukey-Test keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zu erkennen.

Mit einer ratio von $0,11 \pm 0,03$ wird P450scc-mRNA in PG geringer exprimiert als in DG A. In JG war die P450scc-mRNA im Vergleich zum Mittelwert der Kontrollgruppe 5,03-fach höher exprimiert. Der Einfluss der Gruppe war für Kollektiv 2 (DG A, PG und JG) mit $p = 0,062$ nicht mehr signifikant.

Tabelle 21: Relative Expression der P450scc-mRNA (ratio), Gruppenmittelwerte ($\bar{x} \pm \text{SD}$)

Gruppe	ratio ($\bar{x} \pm \text{SD}$)
JG	5,03 $\pm$ 4,50
PG	0,11 $\pm$ 0,03
DG A	0,26 $\pm$ 0,19
DG B	1,64 $\pm$ 1,30
DG C	1,56 $\pm$ 0,79
DG D	0,83 $\pm$ 0,15
CG	1,14 $\pm$ 0,59

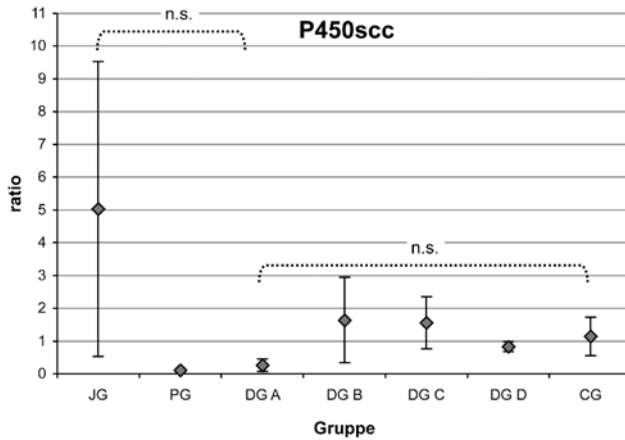


Abbildung 26: Relative Expression der P450scc-mRNA (ratio), Gruppenmittelwerte ($\bar{x} \pm \text{SD}$)

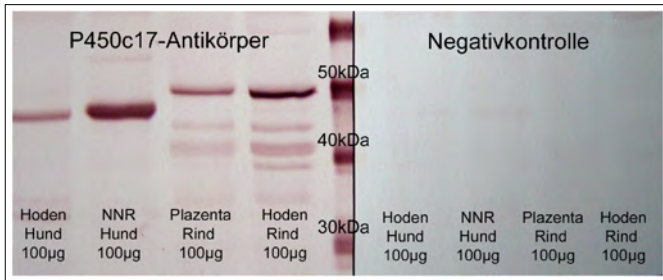


Abbildung 27: Überprüfung der Spezifität des P450c17-Antikörpers im Western Blot, mittig: Proteinstandard (Roti®-Mark WESTERN Set); alle Proben weisen eine einzige deutliche Bande auf (48 bzw. 50 kDa)

4.7 P450c17

4.7.1 Expression auf Protein-Ebene

Spezifität des verwendeten Kaninchen-anti-Rind P450c17-Antikörpers

Unter Verwendung von Gesamtprotein aus dem Hoden und der Nebenniere eines Hundes, sowie aus boviner Plazenta und aus dem Hoden eines Bullen konnte die Spezifität des Kaninchen-anti-Rind P450c17-Antikörpers im Western Blot verifiziert werden. Wie in Abbildung 27 zu sehen, war in allen untersuchten Proben eine einzige deutliche Bande vorhanden, wobei die Banden von caninem Gewebe unter den Banden der bovinen Gewebe (ca. 50 kDa) lagen.

Lokalisierung der immunhistochemischen Signale

In den immunhistochemischen Untersuchungen zum Nachweis von P450c17 zeigte sich, dass die Expression von P450c17 auf die Leydigzellen begrenzt ist. Das Ovar eines Hundes, in dem sich Thecazellen anfärbten, fungierte als Positivkontrolle. In den mitgeführten Negativkontrollen waren keine Signale sichtbar. Abbildung 30 (a) – 30 (j) zeigt das Ergebnis der immunhistochemischen Färbung an je einem Beispiel pro Gruppe sowie für die Positiv- und Negativkontrollen. Die Gewebeschnitte für die Anfertigung der Abbildung waren nach dem in Abschnitt 3.8.2 beschriebenen Protokoll mit Gegenfärbung angefertigt worden, da die für die Auswertung verwendeten Gewebeschnitte nicht gegengefärbt waren.

Quantifizierung der immunhistochemischen Reaktion

- a) Mittlerer Grauwert der immunopositiven Pixel (als Maßstab für die Intensität der Immunreaktion, Dimension 0–255)

Für das Kollektiv 1 (DG A, B, C, D und CG) ergab sich mit $p < 0,05$ ein signifikanter Einfluss der Gruppe, für das Kollektiv 2 (DG A, PG und JG) war ein solcher Einfluss nicht erkennbar. In DG A war die Intensität der Farbreaktion mit einem Grauwert von $93,18 \pm 5,04$ geringer als in DG B ($103,45 \pm 7,94$). Beim paarweisen Vergleich der Gruppen wurde für diesen Anstieg des Grauwertes eine statistische Signifikanz allerdings verfehlt, lediglich der Unterschied von DG A zu CG mit einem Grauwert von $104,88 \pm 7,55$ war statistisch signifikant (Tukey-Test, $p < 0,05$). Die immunopositiven Signale waren in DG A also signifikant heller als in CG.

PG unterschied sich mit einem mittleren Grauwert von $90,51 \pm 0,93$ nur geringfügig und nicht statistisch signifikant von DG A. Die Intensität der Immunreaktion war in JG mit einem Grauwert von $95,35 \pm 1,03$ ebenfalls vergleichsweise schwach und unterschied sich statistisch nicht von DG A bzw. PG. In Tabelle 22 und Abbildung 28 sind die Ergebnisse sowie die statistische Auswertung zusammengefasst.

- b) Flächenanteil der immunopositiven Bezirke am Interstitium (als Maßstab für das Ausmaß der Immunreaktion, Dimension %)

Für beide Kollektive (DG A, B, C, D und CG bzw. DG A, PG und JG) ergab sich mit $p < 0,0005$ bzw. $p < 0,01$ ein signifikanter Einfluss der Gruppe. Wie Tabelle 23 und Abbildung 29 zeigen, entsprach der Flächenanteil der immunopositiven Pixel in DG A etwas mehr als 2 %. In DG B waren im Durchschnitt 17,56 % der Interstitiumfläche immunhistochemisch angefärbt, der Anstieg von DG A zu DG B war statistisch signifikant (Tukey-Test, $p < 0,01$). Der weitere, im Verlauf der Rekrudescenz der Spermatogenese zu beobachtende Anstieg dieses prozentualen Flächenanteils bis hin zu DG D (23,59 %) war, ebenso wie der Vergleich zu CG (30,74 %), im paarweisen Gruppenvergleich nicht signifikant.

In JG konnte ein immunopositiver Flächenanteil von 11,12 % gemessen werden. JG unterschied sich damit statistisch signifikant zu PG bzw. DG A (Tukey-Test, $p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$). Im paarweisen Vergleich zwischen PG und DG A waren keine Signifikanzen erkennbar.

Tabelle 22: Immunhistochemischer Nachweis von P450c17, Mittlerer Grauwert der immunopositiven Pixel, Gruppenmittelwerte ($\bar{x} \pm SD$)

Gruppe	Grauwert ($\bar{x} \pm SD$)
JG	95,35 $\pm$ 1,03
PG	90,51 $\pm$ 0,93
DG A	93,18 $\pm$ 5,04
DG B	103,45 $\pm$ 7,94
DG C	100,43 $\pm$ 2,11
DG D*	103,48 $\pm$ 1,59
CG*	104,88 $\pm$ 7,55

*) n=4

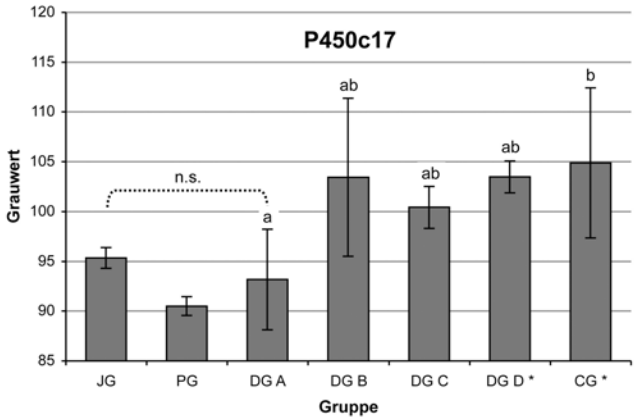


Abbildung 28: Immunhistochemischer Nachweis von P450c17, Mittlerer Grauwert der immunopositiven Pixel, Gruppenmittelwerte ($\bar{x} \pm SD$), * n=4, Werte mit unterschiedlichen Buchstaben (ab) unterscheiden sich signifikant (Tukey-Test, $p < 0,05$)

Tabelle 23: Immunhistochemischer Nachweis von P450c17, Flächenanteil der immuno-positiven Bezirke am Interstitium in %, modif. 1s-Bereich nach arcsin-Transformation

Gruppe	prozentualer Flächenanteil (arcsin)
JG	11,12 (7,33-15,58)
PG	2,15 (0,49-4,92)
DG A	2,03 (1,07-3,29)
DG B	17,56 (8,05-29,79)
DG C	22,32 (15,78-29,64)
DG D*	23,59 (17,90-29,79)
CG*	30,74 (20,10-42,53)

*) n=4

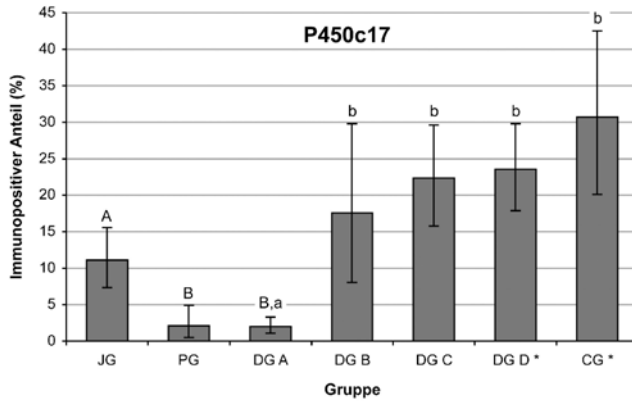


Abbildung 29: Immunhistochemischer Nachweis von P450c17, Flächenanteil der immuno-positiven Bezirke am Interstitium in %, modif. 1s-Bereich nach arcsin-Transformation, * n=4, Werte mit unterschiedlichen Buchstaben (ab bzw. AB) unterscheiden sich signifikant (Tukey-Test, ab: $p < 0,01$, AB: $p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$)

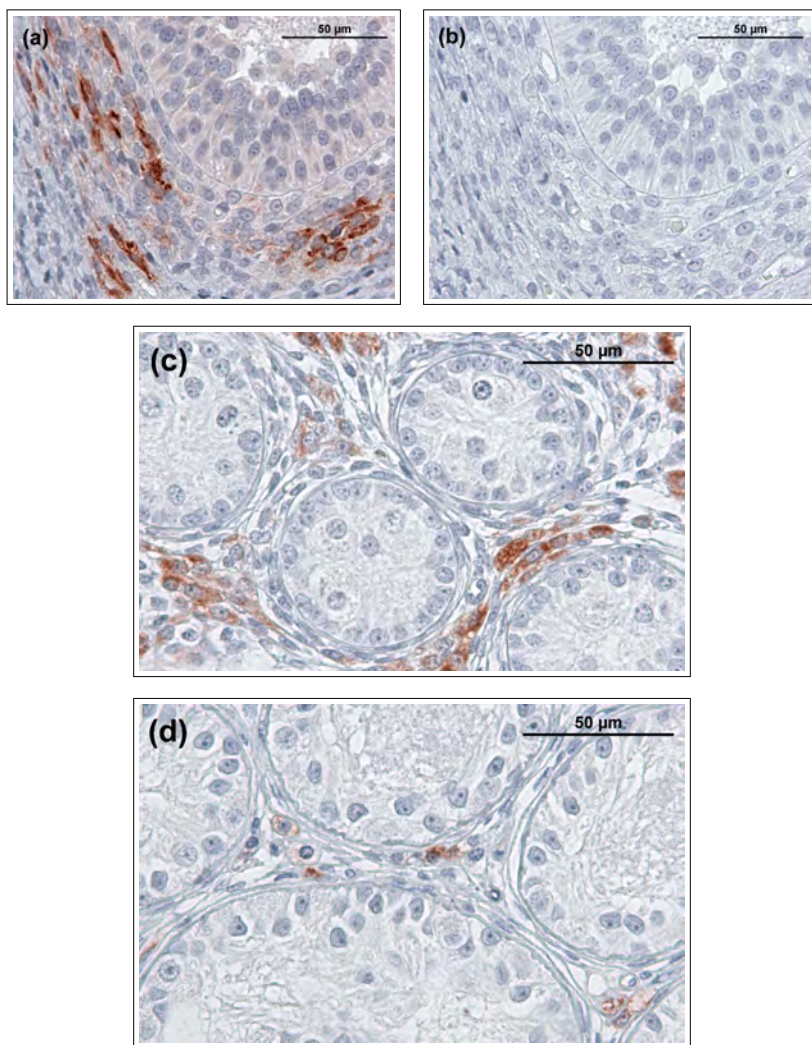


Abbildung 30: Immunhistochemischer Nachweis von P450c17, 400-fache Vergrößerung, (a) Positivkontrolle: Ovar Hund, (b) Negativkontrolle: Ovar Hund, (c) JG, Hund William, (d) PG, Hund Hansi

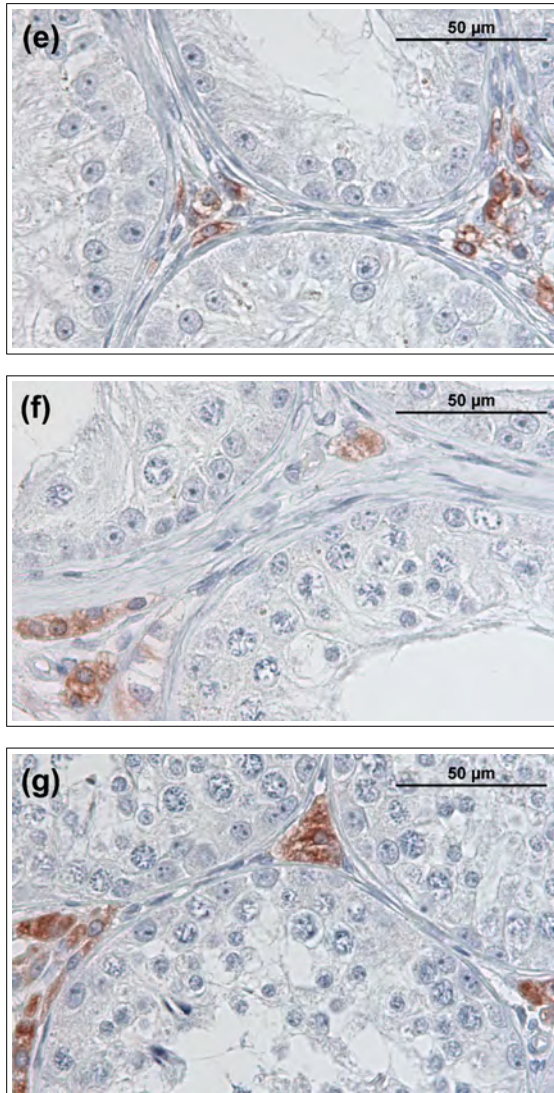


Abbildung 30: Fortsetzung Immunhistochemischer Nachweis von P450c17, 400-fache Vergrößerung, (e) DG A, Hund Elias, (f) DG B, Hund Joni, (g) DG C, Hund LeoS

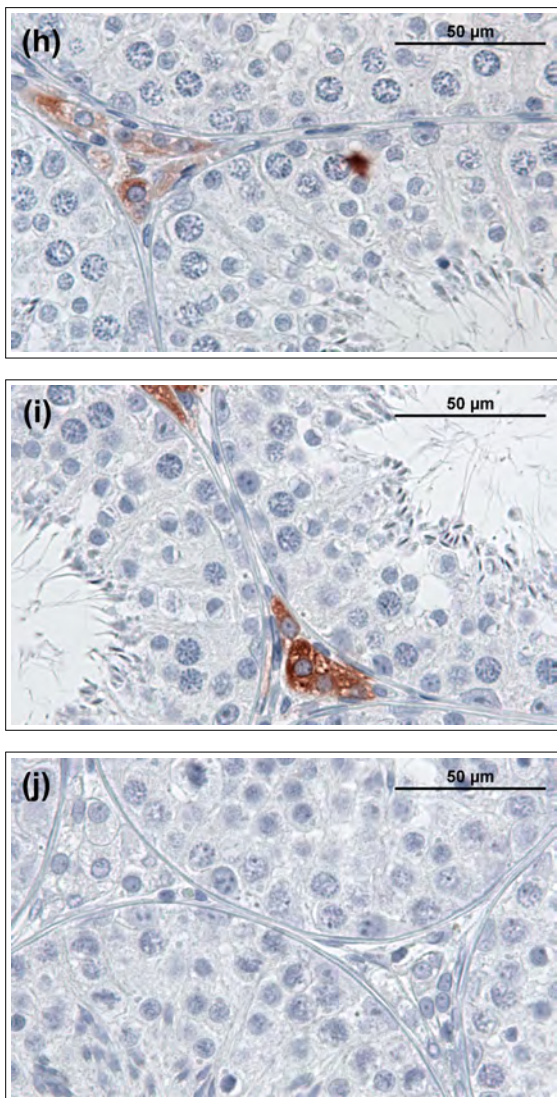


Abbildung 30: Fortsetzung Immunhistochemischer Nachweis von P450c17, 400-fache Vergrößerung, (h) DG D, Hund Bruno, (i) CG, Hund Charly, (j) Negativkontrolle: CG, Hund Charly

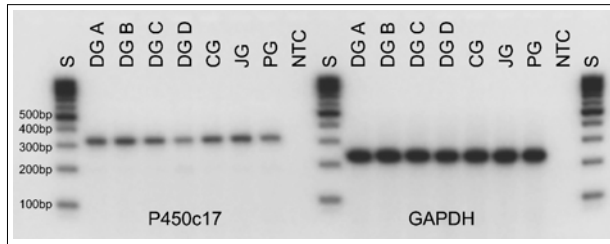


Abbildung 31: Qualitativer Nachweis von P450c17-mRNA mittels RT-PCR, Analyse der PCR-Produkte durch gel-elektrophoretische Auftrennung und Sichtbarmachung unter UV-Licht, S = DNA-Größenstandard

4.7.2 Expression auf mRNA-Ebene

Auf mRNA-Ebene konnte die Expression von P450c17 mittels RT-PCR qualitativ in allen Gruppen nachgewiesen werden. Nach gel-elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte war unter UV-Licht jeweils eine Bande in der Größe von 317 bp sichtbar (Abbildung 31). Nachfolgende Sequenzierung bestätigte die Spezifität der PCR-Produkte. Die Ergebnisse für das Referenzgen GAPDH sind in Abschnitt 4.5.2 beschrieben.

Für die Bestimmung der relativen Genexpression mittels RT-qPCR konnte für jede verwendete cDNA ein C_q -Wert ermittelt werden. In allen mitgeführten Negativkontrollen waren keine Fluoreszenzsignale nachweisbar.

Die Ergebnisse der P450c17-RT-qPCR sind in Tabelle 24 und Abbildung 32 dargestellt. Zwischen CG, DG A, B, C und D konnte kein statistisch signifikanter Gruppeneinfluss nachgewiesen werden. In DG A war die P450c17-mRNA-Expression mit einer ratio von $0,48 \pm 0,15$ allerdings geringer als in den anderen Gruppen, die jeweils im Durchschnitt eine ratio zwischen 0,99 und 1,14 aufwiesen.

Bei Kollektiv 2 (DG A, PG und JG) zeigte sich mit $p < 0,001$ hingegen ein signifikanter Einfluss der Gruppe. In PG wurde die P450c17-mRNA mit einer ratio von $0,37 \pm 0,11$ geringfügig, aber nicht signifikant weniger exprimiert als in DG A. Für JG ließ sich im Vergleich zu CG eine 7-fache Überexpression von P450c17 auf mRNA-Ebene ermitteln. Der Unterschied zwischen JG und DG A bzw. PG war im paarweisen Gruppenvergleich statistisch signifikant (Tukey-Test, $p < 0,01$).

Tabelle 24: Relative Expression der P450c17-mRNA (ratio), Gruppenmittelwerte ($\bar{x} \pm SD$)

Gruppe	ratio ($\bar{x} \pm SD$)
JG	$7,01 \pm 2,61$
PG	$0,37 \pm 0,11$
DG A	$0,48 \pm 0,15$
DG B	$1,07 \pm 0,66$
DG C	$1,14 \pm 0,57$
DG D	$0,99 \pm 0,26$
CG	$1,14 \pm 0,61$

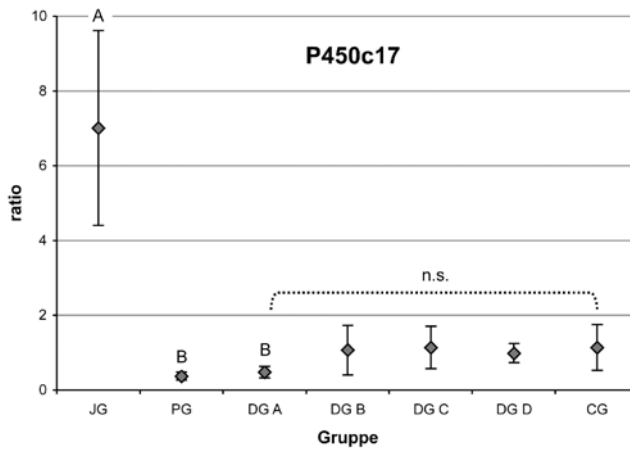


Abbildung 32: Relative Expression der P450c17-mRNA (ratio), Gruppenmittelwerte ($\bar{x} \pm SD$), Werte mit unterschiedlichen Buchstaben (AB) unterscheiden sich signifikant (Tukey-Test, $p < 0,01$)

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methodik

Versuchsdesign

Die Downregulation der Hodenfunktion mittels GnRH-Implantat beim Hund ist durch verschiedene Arbeitsgruppen hinreichend beschrieben (u. a. VICKERY et al., 1984; INABA et al., 1996; RIESENBECK et al., 2002; LUDWIG et al., 2009), allerdings sind die im Hoden ablaufenden Vorgänge nach Aufhebung der Downregulation bisher nicht in engen Zeitfenstern untersucht. Im Speziellen liegen keine Informationen über die zeitlichen Abläufe und die zugrunde liegenden Mechanismen in Bezug auf das Wiedereinsetzen der Steroidbiosynthese vor.

In der vorliegenden Studie wurden bis zur 24. Woche nach Entfernung des GnRH-Implantats „Gonazon®“ je 3–4 Hunde im Abstand von 3 Wochen kastriert. Bei der histologischen Untersuchung des Hodengewebes zeigte sich, anders als ursprünglich erwartet, eine stark variierende, individuell unterschiedlich schnelle Rekrudescenz der Spermatogenese; daher wurden die Hunde nicht anhand des Kastrationszeitpunktes, sondern anhand des histologisch am weitesten entwickelten Keimzellstadiums zu Gruppen („developmental groups“ DG) zusammengefasst (SPANG et al., 2008; GOERICKE-PESCH et al., 2009; SPANG, 2012, in Vorbereitung). Weiterhin erfolgte die Aufregulation der Hodenfunktion schneller als erwartet, spätestens 12 Wochen nach Entfernung des Implantats wiesen die Hunde bei der histologischen Untersuchung eine vollständige Spermatogenese auf. Aus diesen beiden, den Erwartungen nicht entsprechenden Beobachtungen ergibt sich, dass im Hinblick auf die ersten Phasen der Rekrudescenz nur relativ kleine Gruppen gebildet werden konnten, was wiederum zur Folge hatte, dass die Aussagekraft der statistischen Auswertung geschmälert ist. Allerdings ist davon auszugehen, dass die beobachteten Tendenzen dadurch nicht beeinträchtigt werden.

Zur Charakterisierung des Wiederanlaufs der Steroidbiosynthese wurden die Parameter StAR-Protein, P450scc und P450c17 untersucht. Diese 3 Parameter wurden ausgewählt, da sie Schlüsselfaktoren der testikulären Steroidbiosynthese darstellen (SAEZ,

1994; MILLER, 2002; STOCCO und MCPHAUL, 2006). Parallel dazu erfolgte die Bestimmung von Testosteron im Blutplasma und die Ausmessung der Fläche der Leydigzellkerne, um über die Expression der steroidogenen Enzyme hinausgehend die Funktionalität der Leydigzellen zu charakterisieren.

Probengewinnung und -konservierung

Die chirurgische Kastration der Rüden erfolgte nach dem in der Klinik etablierten Standardverfahren, wobei sowohl bei der Kastration als auch bei der nachfolgenden Präparation der Hoden besondere Sorgfalt darauf gelegt wurde, das Gewebe nicht zu quetschen. Von AMANN (1986) wird für histologische Untersuchungen von Hodengewebe eine Fixierung in Bouin'scher Lösung empfohlen. Auch eigene Vorversuche zeigten, dass die intratubuläre und v. a. die interstitielle Gewebestruktur durch die Bouin-Fixierung wesentlich besser erhalten wird, als durch eine Fixierung in phosphatgepuffertem Formaldehyd. Daher erfolgten alle histologischen und immunhistochemischen Versuche an bouinfixierten Gewebeschnitten.

Für die Untersuchungen auf mRNA-Ebene wurde ein Teil des Hodengewebes unmittelbar in RNAlater® konserviert. RNAlater® ist ein RNA-Stabilisierungsreagenz, welches zelluläre RNasen inaktiviert (SCHRÖDER, 2007). Dadurch ist es möglich, Gewebeproben auch über einen längeren Zeitraum ohne größere Einbußen in der RNA-Qualität und -Quantität zu lagern.

Hormonanalytik

Für die Bestimmung von Testosteron, LH und FSH im Blutplasma wurde auf Standard Operating Procedures zurückgegriffen. Testosteron und LH werden pulsatil ausgeschüttet, weswegen AMANN (1986) und GÜNZEL-APEL et al. (1990) die Verwertbarkeit von Einzelproben in Frage stellen und zur Beurteilung der Leydigzellfunktion Serienblutproben als erforderlich ansehen. Allerdings hat JÄGER (2006) punktuelle LH-Messungen mit den aus sog. Zeitfenstern gewonnenen Werten verglichen und damit gezeigt, dass Tendenzen auch in Einzelmessungen nachvollziehbar sind. Zudem gilt, dass die Pulsatilität mit Eintreten der Downregulation verschwindet (LUDWIG, 2008).

Ausmessung der Fläche der Leydigzellkerne

Als Übersichtsfärbung für histologische Untersuchungen hat sich weltweit die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung durchgesetzt (LANG, 2006). Ihr Vorteil liegt in der einfachen Durchführung und der kontrastreichen Darstellung von Zellkern und Zytoplasma.

Die im Interstitium des Hodens lokalisierten Leydigzellen wurden erstmalig 1850 von LEYDIG beschrieben. Das Erscheinungsbild von Leydigzellen sowie die Größe und Anzahl variieren von Tierart zu Tierart (HALL, 1988; SAEZ, 1994); generelle Merkmale sind allerdings die Anordnung in Gruppen entlang von Blut- und Lymphgefäßen (LEYDIG, 1850; SAEZ, 1994) und der große, runde bis ovale Zellkern, der deutlich sichtbare Nucleoli enthält und einen Heterochromatinsaum aufweist (HALL, 1988). Anhand dieser Kriterien waren Leydigzellen in den HE-gefärbten Gewebeschnitten nach kurzer Einarbeitung gut zu identifizieren.

Bereits KARG und KRONTHALER (1957) beschreiben die karyometrische Untersuchung an Leydigzellen als empfindlichen Indikator für die gonadotrope Hypophysenfunktion. Die Messung der Fläche der Leydigzellkerne ermöglicht es also, Regressions- bzw. Progressionserscheinungen quantitativ zu erfassen.

Western Blot

Der Western Blot diente in der vorliegenden Arbeit dazu, die Spezifität der Primärantikörper für die Immunhistochemie zu überprüfen. Für jeden Antikörper wurden zum einen Hundegewebe gewählt, in denen das gesuchte Protein erwartungsgemäß vorhanden war. Zum anderen wurden entsprechende Gewebe von den Tierarten verwendet, gegen die der jeweilige Antikörper ursprünglich gerichtet war. Für die in den Mitochondrien lokalisierten Parameter StAR-Protein und P450scc wurde zusätzlich zum Gesamtprotein, mitochondriales Protein aus Hodengewebe extrahiert. Zur Signalverstärkung wurde in der Nachweisreaktion auf die hinreichend etablierte Avidin-Biotin-Komplex (ABC) Technik zurückgegriffen (HSU et al., 1981; KEY, 2009). Um unspezifische Bindungen von Sekundärantikörper oder Avidin-Biotin-System von Bindungen des Primärantikörpers abgrenzen zu können, wurde bei jedem Testansatz eine Negativkontrolle angefertigt.

Immunhistochemie (IHC)

Bei der IHC handelt es sich um eine Methode zur Lokalisation von Proteinen in Gewebeschnitten, bei der spezifische Primärantikörper (Überprüfung der Spezifität vorab mittels Western Blot) zum Einsatz kommen, die gegen das nachzuweisende Protein gerichtet sind (FREY et al., 2007). Sie ermöglicht eine genaue Identifizierung der das entsprechende Protein exprimierenden Zellpopulation(en). Für die Sichtbarmachung der Antigen-Antikörperreaktion stehen verschiedene Techniken zur Verfügung. Allen liegt eine enzymatische Substratumsetzung zugrunde, die zu einem Farbpräzipitat führt. Die hier verwendete, indirekte Avidin-Biotin-Komplex (ABC) Technik ist aufgrund des hohen Enzym-Antikörper-Verhältnisses wesentlich sensitiver als direkte Nachweisverfahren (HSU et al., 1981; KEY, 2009).

In umfangreichen Vorversuchen wurde das im Labor vorhandene Färbeprotokoll auf die eigenen Bedürfnisse zugeschnitten und für die jeweiligen Hauptversuche standardisiert. Um eine Vergleichbarkeit für die nachfolgende computergestützte Auswertung zu gewährleisten, wurden alle Gewebeschnitte an einem Tag unmittelbar hintereinander immunhistochemisch angefärbt. Dadurch wurden Unterschiede beispielsweise in der Raumtemperatur vermieden. Zusätzlich wurde die Reihenfolge der Objektträger im Färbegestell randomisiert gewählt.

Bei jedem Testansatz wurden begleitend Positiv- und Negativkontrollen angefertigt: Als Positivkontrollen dienten Gewebeschnitte, in denen das gesuchte Protein erwartungsgemäß vorhanden war. Für die Negativkontrollen wurde der Primärantikörper durch einen in derselben Spezies hergestellten Antikörper ersetzt, der aus dem Serum gesunder Tiere gewonnen wurde (Kaninchen-IgG). Dadurch konnten unspezifische Signale durch Bindung des Sekundärantikörpers und der ABC-Lösung weitestgehend ausgeschlossen werden.

Für die Auswertung der immunhistochemisch angefärbten Gewebeschnitte wurde in Anlehnung an BÜSGES (2003) und HOFFMANN et al. (2004) ein standardisiertes, computergestütztes Analyseverfahren gewählt. Dessen Vorteile liegen in der Genauigkeit sowie Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Eine zentrale Rolle für diese Auswertung mit Hilfe der Software „ImageTool“ nahm der für jeden untersuchten Parameter separat festgelegte Schwellenwert (threshold) ein. Die Auswahl des Schwellenwertes erfolgte in Abhängigkeit von der Intensität der Hintergrund- bzw. Gegenfärbung, wobei ein ausreichender Kontrast zwischen dieser und dem rotbraunen Farbpräzipitat der Immun-

reaktion Voraussetzung war. Sehr schwache Farbreaktionen, deren optische Dichte mit der der Hintergrund- bzw. Gegenfärbung vergleichbar war und damit unterhalb des Schwellenwertes lag, wurden daher von der Software nicht als immunopositiv erkannt. Dafür erhielt man für die in die Auswertung einbezogenen, oberhalb des Schwellenwertes liegenden Farbreaktionen ein objektives und quantifizierbares Ergebnis.

Nach Durchführung der Auswertungen für den Parameter P450sc wurde das System für die beiden Parameter StAR-Protein und P450c17 erneut optimiert: Die Gewebeschnitte wurden bei diesen beiden Parametern nicht mit Hämatoxylin gegengefärbt, stattdessen wurden die einzelnen Gesichtsfelder zusätzlich im Phasenkontrast digitalphotographisch festgehalten, um die Ausmessung der 3 Kompartimente „Tubuli“, „Interstitium“ und „Gefäße“ zu ermöglichen. Weiterhin erfolgten die Aufnahmen in der 200-fachen statt in der 100-fachen Vergrößerung.

Mit Hilfe der Grauwert-Analyse wurde die optische Dichte der Immunreaktion quantifiziert. Der resultierende „mittlere Grauwert der immunopositiven Pixel“ entsprach dem Quotienten aus der Summe der Pixelgrauwerte und der Pixelanzahl (BÜSGES, 2003). Das Ergebnis ist eine absolute Zahl (0-255), welche proportional zur Immunreaktion des eingesetzten Antikörpers ist (NABORS et al., 1988; BASGEN et al., 1989).

Der „Flächenanteil der immunopositiven Bezirke“ wurde für jedes Gesichtsfeld relativ zur Fläche des Interstitiums berechnet, um einen Einfluss des in jedem Gesichtsfeld individuell unterschiedlichen Anteils angeschnittener Tubuli seminiferi contorti auszuschließen. Der resultierende Wert ist daher proportional zur Verbreitung des nachgewiesenen Proteins im Interstitium (BAUMGÄRTNER et al., 1992).

RT-PCR und RT-qPCR

Das Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist heute eine molekularbiologische Routinemethode, mit der nach RNA-Isolierung und Reverser Transkription (RT) z. B. die in einem Gewebe vorhandene Expression einer bestimmten mRNA qualitativ nachgewiesen werden kann (PFAFFL, 2004).

Eine Weiterentwicklung der qualitativen RT-PCR stellt die RT-quantitative real-time PCR (RT-qPCR) dar; diese wurde in der vorliegenden Arbeit dazu genutzt, Expressionsmuster der untersuchten Gene im Verlauf der Rekrudescenz der Spermatogenese zu erstellen. Das verwendete Hydrolyse-Sonden-Verfahren weist im Vergleich zu anderen qPCR-Methoden eine höhere Sensitivität und v.a. Spezifität auf.

Die Vorbereitung (DNase-Behandlung und RT) fand für alle Proben in einem Durchgang statt, um methodenbedingte Unterschiede im cDNA-Gehalt zu minimieren. Für jede Probe erfolgte parallel die Bestimmung der Expression des Referenzgens GAPDH auf der gleichen 96-well-Platte, um die Expressionsergebnisse des Zielgens später damit normalisieren zu können. GAPDH konnte als Referenzgen herangezogen werden, da es in den untersuchten Gruppen konstant und unabhängig von der Behandlung mit „Gonazon®“ oder „Profact® Depot“ exprimiert wurde. Durch mitgeführte Negativkontrollen (NTC) konnten Kontaminationen ausgeschlossen werden.

Die Bestimmung der PCR-Effizienz mittels Verdünnungsreihe erfolgte wie von PFAFFL et al. (2002) empfohlen anhand eines Pools aller verwendeten cDNAs. Aufgrund der unterschiedlichen PCR-Effizienzen der einzelnen Primer-Sonden-Systeme wurde für die Auswertung der RT-qPCR-Daten eine effizienz-korrigierte relative Quantifizierung nach PFAFFL (2001) durchgeführt. Durch die Normalisierung anhand eines nicht-regulierten Referenzgens (hier GAPDH) wird die Varianz der Expressionsergebnisse reduziert, da sich individuelle Probeneffekte (beispielsweise unterschiedliche RNA-Integrität oder RT-Effizienz) aufheben (PFAFFL, 2004). Der Vorteil der Effizienz-Korrektur besteht in einer exakteren Berechnung der tatsächlichen Expressionsunterschiede. Schon geringe Unterschiede in der PCR-Effizienz können aufgrund der exponentiellen Natur der PCR bei Berechnung ohne Effizienz-Korrektur dazu führen, dass der ursprüngliche RNA-Gehalt über- oder unterschätzt wird (PFAFFL et al., 2002).

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Vor Einsetzen des GnRH-Implantats „Gonazon®“ bzw. „Profact® Depot“ lag die Konzentration von Testosteron, LH und FSH im peripheren Blut bei allen Hunden in den in der Literatur beschriebenen physiologischen Bereichen (DEPALATIS et al., 1978; JAMES et al., 1979; GÜNZEL-APEL et al., 1990; RÖCKEN et al., 1995; PETERS et al., 2000).

Erwartungsgemäß führte die Implantat-Applikation aufgrund der daraus resultierenden verminderten Verfügbarkeit der gonadotropen Hormone zu einer Downregulation der endokrinen und germinativen Hodenfunktion. In den vorliegenden Untersuchungen war die Konzentration der Gonadotropine LH und FSH im peripheren Blut nach 8 Wochen deutlich verringert, wenn auch zu einem gewissen Grad noch verfügbar, während die Testosteron-Konzentrationen nach spätestens 8 Wochen bei allen Hunden (Ausnahme: Hund Bruno, DG D) unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Da die steroidogene Funktion der Leydigzellen primär durch LH aufrechterhalten wird (PURVIS et al., 1981), kann davon ausgegangen werden, dass LH unter einen kritischen Schwellenwert gesunken war.

Auch nach 5 Monaten Verweildauer des Implantats entsprachen die Hormonkonzentrationen annähernd den nach 8 Wochen gemessenen Werten. Zu diesem Zeitpunkt der Downregulation der Hodenfunktion wurden die „Gonazon®“-Implantate entfernt und die ersten Hunde kastriert.

Während TREMBLAY und BELANGER (1984) bei Hunden nach 4-monatiger Anwendung eines GnRH-Agonisten keine signifikanten, morphologischen Veränderungen an den Leydigzellen beobachten konnten, beschreiben DUBÉ et al. (1987) unter gleichen Versuchsbedingungen eine deutliche Atrophie der Leydigzellen mit Akkumulation von Lipidtröpfchen im Zytoplasma und Verkleinerung der Zellkerne; durchschnittlich reduzierte sich der Zellkerndurchmesser um 22,5 %. Dies stimmt in etwa mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werten überein: In DG A war die Leydigzellkernfläche um durchschnittlich 32 % kleiner als in der Kontrollgruppe CG. Zusammen mit den zu diesem Zeitpunkt unter bzw. nahe der Nachweisgrenze liegenden Testosteronwerten sind diese Veränderungen ein Maß für die Leydigzell-Aktivität (KARG und KRONTHALER, 1957), welche aufgrund der fehlenden Stimulation durch LH stark beeinträchtigt ist, da LH für die Erhaltung Leydigzell-spezifischer Strukturen und Funktionen absolut notwendig ist (SAEZ, 1994).

Wie in der vorliegenden Arbeit mittels Immunhistochemie und RT-qPCR auf Protein- bzw. mRNA-Ebene gezeigt werden konnte, liegt dem Verlust der steroidogenen Aktivität

der Leydigzellen eine eingeschränkte Verfügbarkeit von essentiellen Komponenten der Steroidbiosynthese zugrunde. Besonders die Verbreitung des jeweiligen Proteins im Interstitium, gemessen anhand des Flächenanteils der immunopositiven Bezirke, war in DG A im Vergleich zu CG für alle 3 untersuchten Parameter (StAR-Protein, P450scc und P450c17) signifikant reduziert. Die wenigen in DG A noch nachweisbaren immunopositiven Bezirke wiesen, wenn auch nur für P450c17 statistisch signifikant, einen kleineren Grauwert auf als in CG. Da die Immunreaktion eines Antikörpers mit der Expression des jeweiligen Proteins korreliert (NABORS et al., 1988; BASGEN et al., 1989), war also die Signalstärke pro Flächeneinheit bei den Hunden in DG A schwächer als in CG und – zumindest der Tendenz nach – auch schwächer als in DG B, C und D. Auch die Ergebnisse bei Erfassung der Expression der mRNA reflektierten diese Situation, allerdings waren die Unterschiede zwischen DG A und CG nicht signifikant. Insgesamt entsprechen diese Beobachtungen denen von PURVIS et al. (1981), die eine schnelle Depletion fast aller Schlüsselenzyme der Steroidbiosynthese nach Hypophysektomie als Folge eines Entzugs von LH beschrieben.

Bezogen auf die ausgemessenen Gesichtsfelder war in DG A im Vergleich zur Kontrollgruppe CG eine signifikante Zunahme des Flächenanteils „Interstitium“ sowie Abnahme des Flächenanteils „Tubuli“ zu beobachten. Es handelt sich dabei jedoch nicht um eine absolute, sondern um eine relative Zunahme des Interstitiums, die sich aus der Abnahme der Größe der Tubuli (siehe SPANG (2012, in Vorbereitung): Abnahme der Tubulusdurchmesser) und gleichzeitigen Verringerung der Hodengröße (siehe GOERICKE-PESCH et al., 2009) ergibt (KARG und KRONTHALER, 1957). Histologisch waren im Keimepithel der Gruppe DG A nur noch Spermatogonien und primäre Spermatozyten zu verzeichnen. Die germinative Hodenfunktion war also stark beeinträchtigt.

Nach Aufhebung der Downregulation durch Entfernung des Implantats kam es rasch zu einer erhöhten Verfügbarkeit der Gonadotropine LH und FSH. Ein signifikanter Anstieg war für FSH von DG A zu DG B und für LH von DG A zu DG C zu verzeichnen. Dabei wurde der zu einer Stimulation der Leydigzellfunktion notwendige kritische Schwellenwert der Verfügbarkeit von LH offensichtlich innerhalb weniger Tage überschritten, was sich in einem signifikanten Anstieg der Testosteron-Konzentrationen von DG A zu DG B widerspiegelte. Zwischen den Gruppen DG B, C und D gab es keine weiteren signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Hormonkonzentrationen; die vor Implantat-Applikation gemessenen Werte waren wieder erreicht (siehe GOERICKE-PESCH et al., 2009).

Parallel zum schnellen Anstieg von LH und Testosteron im peripheren Blut nach Entfernen des Implantats kam es zu einer signifikanten Größenzunahme der Leydigzellkerne: Bereits in DG B waren wieder Werte erreicht, die mit denen in CG vergleichbar waren. Dies entspricht einer unmittelbaren Reaktivierung der Leydigzellen aufgrund der wieder vorhandenen Stimulation durch LH.

Auch in den immunhistochemischen Untersuchungen konnte diese Reaktivierung der Leydigzellen beobachtet werden: Die Expression der beiden steroidogenen Enzyme P450scc und P450c17, gemessen anhand des Flächenanteils der immunopositiven Bezirke, stieg von DG A zu DG B signifikant an. Für die Expression des StAR-Proteins war dieser Anstieg erst im Vergleich zu DG D signifikant, allerdings wies bereits DG B mit 3,26 % im Vergleich zu DG A mit 0,09 % einen deutlich höheren immunopositiven Flächenanteil auf. Im Hinblick auf die Grauwert-Bestimmung war, außer für P450scc, kein signifikanter Anstieg von DG A zu DG B zu verzeichnen, wenn auch entsprechende Tendenzen ersichtlich waren. Die Ergebnisse der RT-qPCR zeigen – wie die Immunhistochemie – eine Aufregulation an, auch wenn diese auf mRNA-Ebene nicht signifikant war.

Zwischen den Gruppen DG B, C und D sowie im Vergleich dieser Gruppen zu CG waren für die Expression der 3 untersuchten Parameter keine signifikanten Unterschiede nachweisbar; eine vollständige Steroidbiosynthese war also bereits innerhalb von 3 Wochen nach Aufhebung der Downregulation wieder hergestellt. Eine Schlüsselrolle kommt dabei der durch LH (AMORY und BREMNER, 2001; STOCCO und MCPHAUL, 2006) induzierten Aufregulation der Synthese von StAR-Protein zu, wodurch eine ausreichende Versorgung der Mitochondrien mit Cholesterol als Ausgangssubstrat der Steroidbiosynthese gewährleistet wird (RONE et al., 2009). MIDZAK et al. (2011) bezeichnen das StAR-Protein daher als kritisches regulatorisches Element. Nach vorliegenden Untersuchungen findet zeitgleich mit der Aufregulation des StAR-Proteins die Aufregulation von P450scc und P450c17 statt. Das „physiologische“ Milieu der Mitochondrien (PAYNE und O'SHAUGHNESSY, 1996; STORBECK et al., 2007) war also sehr schnell wiederhergestellt. Der Anstieg von Testosteron von DG A zu DG B zeigt, dass auch die nachgeordneten Enzyme der Steroidbiosynthese in entsprechendem Umfang exprimiert werden.

Als „Rebound-Effekt“ wird die nach Absetzen der Medikation auftretende, zeitlich begrenzte, überschießende Sekretion von Gonadotropinen und folglich der gonadalen Steroidhormone beschrieben (DÖCKE, 1981). Auch in den eigenen Untersuchungen konnte für die Ausschüttung von LH und besonders FSH sowie für die Expression (mRNA- und Proteinebene) von StAR-Protein und P450scc ein solcher, wenn auch nicht statistisch

signifikanter Effekt beobachtet werden; die für die genannten Parameter ermittelten Werte waren in DG B bzw. DG C größer als in DG D und CG. Diesem Effekt liegt zugrunde, dass nach Aufhebung der Downregulation zunächst das negative Feedback der gonadalen Steroidhormone auf das Hypothalamus-Hypophysen-System fehlt (SCHALLY et al., 1973; FALVO und VINCENT, 1980; WINTER et al., 1982). Erst nach einiger Zeit ist das physiologische Gleichgewicht wiederhergestellt (DÖCKE, 1981).

Das Wiedereinsetzen der Steroidbiosynthese sowie die Verfügbarkeit von FSH hatten einen direkten Effekt auf die Spermatogenese: runde Spermatiden in DG B zeigten das Anlaufen der Spermatogenese an. Allerdings dauerte es, wie schon von TREMBLAY und BELANGER (1984) und VICKERY et al. (1984) beschrieben und entsprechend dem beim Hund für einen Spermatogenese-Zyklus erforderlichen Zeitfenster (FOOTE et al., 1972; AMANN, 1986), nach Implantatentfernung mindestens 9 Wochen bis wieder elongierte Spermatiden vorhanden waren. Alle Hunde in DG D wiesen eine vollständige Spermatogenese auf, auch im direkten Vergleich mit CG anhand der prozentualen Verteilung der von RUSSELL et al. (1990) beschriebenen Stages im Hodenquerschnitt (siehe GOERICKE-PESCH et al., 2009).

Im Verlauf der Rekrudescenz der Spermatogenese stieg der prozentuale Flächenanteil der Tubuli in den ausgemessenen Gesichtsfeldern stetig und signifikant an, während parallel dazu eine signifikante Abnahme des Flächenanteils „Interstitium“ zu beobachten war. Mit CG vergleichbare Werte waren in DG C erreicht. Entsprechend den oben gemachten Ausführungen handelt es sich dabei um eine absolute Zunahme der Größe der Tubuli (siehe SPANG, 2012, in Vorbereitung) sowie des Hodens (siehe GOERICKE-PESCH et al., 2009) und einer daraus resultierenden relativen Abnahme des Interstitiums.

Diskussion der Ergebnisse des Western Blots

Die Spezifität der für die immunhistochemischen Untersuchungen verwendeten Primärantikörper konnte im Vorfeld mittels Western Blot bestätigt werden:

Das StAR-Protein wird als 37 kDa große, zytoplasmatische Vorstufe synthetisiert, welche beim Import in die Mitochondrien durch proteolytische Reaktionen, teilweise über eine 32 kDa große Zwischenstufe, zu einem 30 kDa großen Protein umgewandelt wird. Die Halbwertszeit der beiden Vorstufen ist sehr kurz (CLARK et al., 1994; STOCCO, 1996; MILLER, 2007b). Dies ist vermutlich der Grund dafür, dass durch den verwendeten Kaninchen-anti-Maus Antikörper (CLARK et al., 1994) im Western Blot sowohl in

murinem als auch in caninem Gewebe lediglich das 30 kDa große Protein nachgewiesen werden konnte. Erwartungsgemäß war im mitochondrialen Proteinextrakt eine größere Menge StAR-Protein vorhanden.

Laut ROBY et al. (1991) erkennt der verwendete P450scc-Antikörper das gesamte, 49 kDa große Enzym P450scc in Nebennierengewebe der Ratte. Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Arbeit für Hodengewebe der Ratte bestätigt werden. Die sowohl in caninem Corpus luteum-Gewebe als auch in caninem Hodengewebe vorhandene, spezifische Bande wies eine etwas geringere molekulare Masse von etwa 48 kDa auf.

Der gegen bovines P450c17 gerichtete Antikörper (PETERSON et al., 2001) detektierte im Western Blot ein etwa 50 kDa großes Protein in boviner Plazenta und bovinem Hodengewebe. Auch in Nebennieren- und Hodengewebe eines Hundes war eine einzige, spezifische Bande vorhanden. Allerdings lag diese mit einer molekularen Masse von etwa 48 kDa deutlich unterhalb der in Rindergewebe sichtbaren Bande.

CONLEY et al. (2007) beschreiben eine ähnliche Beobachtung für das Enzym Cytochrom P450 Aromatase (P450arom) bei der Tüpfelhyäne: Im Vergleich zu humaner P450arom (etwa 50 kDa) weist das Enzym bei der Hyäne eine molekulare Masse von etwa 45 kDa auf. CONLEY et al. (2007) führen diesen Unterschied darauf zurück, dass die humane P450arom glykosiliert ist, während beispielsweise porcine P450arom mit einer molekularen Masse von 45 kDa nicht glykosiliert ist. Entsprechende posttranslationale Modifikationen sind als Ursache für die in dieser Arbeit beobachteten Unterschiede in der molekularen Masse und damit für die hundespezifische Expression von P450scc und P450c17 zu unterstellen.

Die in Abbildung 21 auch in der Negativkontrolle vorhandenen Banden im Bereich zwischen 60 und 80 kDa sowie eine Bande bei 120 kDa (in dieser Arbeit nicht abgebildet) konnten mit Hilfe weiterführender Untersuchungen auf unspezifische Bindungen des Avidin-Biotin-Komplexes zurückgeführt werden. In der Immunhistochemie waren diese unspezifischen Bindungen nicht vorhanden, wie anhand der Negativkontrollen gezeigt werden konnte.

Die Funktionalität der Primärantikörper wurde in der Immunhistochemie zusätzlich durch die mitgeführten Positivkontrollen bestätigt. Der StAR-Protein-Antikörper färbte dabei, wie in der Literatur beschrieben, Luteinzellen im Corpus luteum (u. a. KOWALEWSKI und HOFFMANN, 2008), der P450scc-Antikörper alle 3 Zonen der Nebennierenrinde (u. a. PAYNE und HALES, 2004) und der P450c17-Antikörper Thecazellen im Ovar (u. a. CONLEY und BIRD, 1997; PAYNE und HALES, 2004) an.

Vergleich der beiden Implantate „Gonazon®“ oder „Profact® Depot“

Nachdem in vorausgehenden Untersuchungen vielfach als GnRH-Analogen Buserelin-acetat in Form des Implantats „Profact® Depot“ (6,6 mg) zur Anwendung gekommen war (RIESENBECK et al., 2002; GOERICKE-PESCH et al., 2010a), wurde in der vorliegenden Arbeit in Ergänzung zum Hauptversuch bei 3 Beagle-Rüden dieses Implantat verabreicht, um Hinweise auf die Vergleichbarkeit des erreichten Zustands der Downregulation zu erhalten. Weiterführende, vergleichende Untersuchungen wurden nicht durchgeführt. Da es sich bei „Profact® Depot“ um ein nicht entfernbares Implantat handelt, wurden die 3 Rüden der Gruppe PG nach einer Implantatverweildauer von 5 Monaten – parallel zu den ersten mit „Gonazon®“ behandelten Rüden – kastriert. Im paarweisen Gruppenvergleich mittels Tukey-Test konnte für keinen der untersuchten Parameter ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen DG A und PG festgestellt werden. Allerdings machte sich, bis auf wenige Ausnahmen, der Trend bemerkbar, dass in PG die niedrigsten Werte erzielt wurden. Auch hinsichtlich der Hemmung der Spermatogenese zeigten sich keine Unterschiede, da, anders als von RIESENBECK et al. (2002) beschrieben, in den eigenen Untersuchungen in PG neben Spermatogonien auch primäre Spermatozyten beobachtet wurden.

Wenn auch nicht statistisch signifikant, so besteht durch die Gesamtheit der Ergebnisse dennoch der Eindruck, dass die durch „Profact® Depot“ initiierte Downregulation im Vergleich zu „Gonazon®“ stärker war. Da die Reaktion auf GnRH-Implantate individuell sehr variabel ist (FONTAINE und FONTBONNE, 2011), müssten entsprechende Untersuchungen an einem größeren Kollektiv durchgeführt werden, um eventuell vorhandene Unterschiede in der Wirkung der beiden Implantate zu verifizieren.

Beobachtungen an den juvenilen Hoden (JG)

Wie von KAWAKAMI et al. (1991) beschrieben, war der Durchmesser der Tubuli seminiferi contorti bei den ca. 8 Wochen alten Hunden (Gruppe JG) sehr klein und neben Sertoli-Zellen waren in den Tubuli lediglich Gonozyten vorhanden (siehe SPANG, 2012, in Vorbereitung). Dafür nahm das Interstitium mit 40 % einen verhältnismäßig großen Anteil des Hodenquerschnitts ein.

Adulte Leydigzellen werden postnatal durch Differenzierung von mesenchymalen Zellen gebildet (SAEZ, 1994; MENDIS-HANDAGAMA und ARIYARATNE, 2001; WU et al., 2007); dabei werden verschiedene Zwischenstufen durchlaufen. Je weiter die Zellen differenziert

sind, desto größere Mengen steroidogener Enzyme werden exprimiert und desto mehr Testosteron wird produziert (WU et al., 2007), wobei ein Anstieg von Testosteron im peripheren Blut bei Rüden erst ab einem Alter von 24 Wochen zu erwarten ist (KAWAKAMI et al., 1991).

In den eigenen Untersuchungen waren P450scc und P450c17 auf Proteinebene bei den juvenilen Hunden mengenmäßig geringer als in CG, aber höher als bei den downregulierten Hunden exprimiert, während das StAR-Protein auf Proteinebene, ähnlich wie in DG A und PG, nur in sehr geringen Mengen vorhanden war. Allerdings konnten für alle 3 Parameter mittels RT-qPCR große Mengen mRNA nachgewiesen werden: im Vergleich zu CG war das StAR-Protein 4-fach, P450scc 5-fach und P450c17 7-fach überexprimiert. Zusammen mit den in der Immunhistochemie nachgewiesenen, vergleichsweise geringen Proteinmengen weist dies auf eine posttranskriptionale Regulation der Expression dieser Proteine hin. Um genauere Einblicke in diese Regulationsmechanismen zu erhalten, sind allerdings weitere Untersuchungen notwendig.

Abschlussbetrachtung

Leydigzellen scheinen im Hoden des Hundes laut den Ergebnissen der Immunhistochemie die einzigen Zellen zu sein, in denen eine „de novo“-Steroidbiosynthese möglich ist. Anhand der Untersuchung verschiedener Komponenten der Steroidbiosynthese konnte gezeigt werden, dass sich die Downregulation der Hodenfunktion mittels GnRH-Implantat auf das gesamte System der Steroidbiosynthese auswirkt. Nach Aufhebung der Downregulation durch Entfernen des Implantats findet die Aufregulation der Steroidbiosynthese sowie der Beginn der Rekrudescenz der Spermatogenese unmittelbar und in einem sehr engen Zeitfenster statt. Bereits wenige Wochen nach Implantatentfernung ist eine vollständige Steroidbiosynthese wiederhergestellt, während die Rekrudescenz der Spermatogenese zu diesem Zeitpunkt lediglich die Stufe der runden Spermatiden erreicht hat. Um weitere Einblicke in die initialen Schritte und den zeitlichen Ablauf nach Aufhebung der Downregulation zu erhalten, sollte für weitere Studien ein auf die ersten 3 Wochen nach Implantatentfernung begrenzter Zeitraum gewählt werden.

6 Zusammenfassung

Wiedereinsetzen der Steroidbiosynthese nach Downregulation der Hodenfunktion beim Rüden: Expression von StAR-Protein, P450scc und P450c17

Die beiden Funktionen des Hodens – Steroidbiosynthese und Spermatogenese – sind hinreichend beschrieben, die Mechanismen ihrer Regulation hingegen sind komplex und noch nicht vollständig erforscht. Mittels slow-release GnRH-Implantat kann beim Rüden eine Downregulation der endokrinen und germinativen Hodenfunktion herbeigeführt werden, die nach Entfernung bzw. Wirkverlust des Implantats vollständig reversibel ist. Durch eine gezielte Verfolgung des Ingangkommens der Hodenfunktion nach Downregulation können daher neue Erkenntnisse zur Steuerung der Hodenfunktion gewonnen werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Wiedereinsetzen der Steroidbiosynthese im Verlauf der Rekrudescenz der Spermatogenese nach Downregulation der Hodenfunktion näher zu charakterisieren. Dazu wurde bei 30 adulten Beagle-Rüden das GnRH-Implantat „Gonazon®“ (18,5 mg Azagly-nafarelin) 5 Monate nach Applikation (im Zustand der Downregulation) entfernt, wodurch das Ingangkommen der Hodenfunktion eingeleitet wurde. Ab diesem Zeitpunkt wurden jeweils 3–4 Hunde im Abstand von 3 Wochen chirurgisch kastriert und die Hoden für weiterführende Untersuchungen fixiert. Aufgrund der individuell unterschiedlich schnellen Rekrudescenz der Spermatogenese erfolgte die Zuordnung zu 4 Entwicklungsgruppen („developmental group“, DG) anhand des histologisch am weitesten entwickelten Keimzellstadiums: DG A – Spermatozyten, DG B – runde Spermatozoen, DG C – elongierende Spermatozoen, DG D – elongierte Spermatozoen. Statt „Gonazon®“ kam bei 3 adulten Beagle-Rüden das GnRH-Implantat „Profact® Depot“ (6,6 mg Buserelinacetat) zur Anwendung. Diese Rüden wurden 5 Monate nach Implantatapplikation chirurgisch kastriert. Von den o. a. Tieren wurden u. a. zum Zeitpunkt der Kastration Blutproben für die Bestimmung von Testosteron, LH und FSH entnommen. Als Kontrollgruppe (CG) dienten 5 unbehandelte, adulte Beagle-Rüden. Ergänzend dazu konnten die Hoden von 3 zur Kastration vorgestellten, 2 Monate alten, juvenilen Mischlingsrüden gewonnen werden.

Zur Charakterisierung des Wiederanlaufs der Steroidbiosynthese wurden 3 wesentliche Faktoren der testikulären Steroidbiosynthese – „Steroidogenic Acute Regulatory-Protein“ (StAR-Protein), „Cytochrom P450 side chain cleavage“ (P450scc) und „Cytochrom P450 17 α -Hydroxylase/17,20-Lyase“ (P450c17) – gewählt, deren Expression auf mRNA-Ebene mittels qualitativer und quantitativer Polymerase-Kettenreaktion sowie auf Proteinebene mittels Immunhistochemie untersucht wurde. Daneben erfolgte eine morphologische Charakterisierung der Leydigzellen und die Bestimmung des Flächenanteils des Interstitiums auf histologischer Ebene.

Mittels Western Blot wurde die Spezifität der in der Immunhistochemie verwendeten Primärantikörper im Vorfeld bestätigt, wobei aufgrund der im Vergleich zu Kontrollgewebe anderer Tierarten beobachteten Unterschiede in der molekularen Masse von einer hundespezifischen Expression von P450scc und P450c17 auszugehen ist. Die zelluläre Lokalisation der untersuchten Proteine war auf die Leydigzellen im Interstitium begrenzt, deren Zellkerngröße unter Downregulation signifikant reduziert war.

Wie anhand der unter bzw. nahe der Nachweisgrenze liegenden Testosteronwerte sowie der im Vergleich zu CG signifikant reduzierten Expression von StAR-Protein, P450scc und P450c17 gezeigt werden konnte, wirkte sich die Downregulation der Hodenfunktion mittels GnRH-Implantat auf das gesamte System der Steroidbiosynthese aus. Die Verfügbarkeit aller 3 untersuchten Parameter war sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene erheblich limitiert.

Nach Aufhebung der Downregulation durch Implantatentfernung fand die Aufregulation der Steroidbiosynthese unmittelbar und in einem engen Zeitfenster zwischen DG A und DG B statt, wobei Hinweise auf einen „Rebound-Effekt“ vorliegen. Eine vollständige Steroidbiosynthese war bereits wenige Wochen nach Aufhebung der Downregulation wiederhergestellt, während die Rekrudescenz der Spermatogenese zu diesem Zeitpunkt lediglich die Stufe der runden Spermatiden erreicht hatte. Eine vollständige Spermatogenese konnte hingegen frühestens 9 Wochen nach Implantatentfernung nachgewiesen werden.

Zwischen den beiden Implantaten „Gonazon®“ und „Profact® Depot“ konnte zum Zeitpunkt der Downregulation kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, der Tendenz nach war die Downregulation nach Implantation von „Profact® Depot“ jedoch stärker ausgeprägt. In den juvenilen Hoden waren große Mengen StAR-Protein-, P450scc- und P450c17-mRNA vorhanden, auf Proteinebene dagegen war nur eine sehr geringe Expression dieser 3 Parameter nachweisbar. Die Expression der genannten Proteine im juvenilen Hoden scheint daher posttranskriptional reguliert zu werden.

7 Summary

Restart of steroid biosynthesis following downregulation of testicular function in the dog: Expression of StAR-protein, P450scc and P450c17

Testicular functions in regard to steroid biosynthesis and spermatogenesis are well described, but the underlying regulations are complex and not yet completely understood. Application of slow-release GnRH-implants in dogs results in downregulation of testicular endocrine and germinative function, which is fully reversible after implant removal or loss of efficacy. Therefore monitoring of the onset of testicular function after downregulation could lead to new insights into regulation of testicular functions.

Aim of the present study was to characterize the restart of steroid biosynthesis in the course of recrudescence of spermatogenesis after abolition of downregulation. In 30 adult male Beagle dogs reestablishment of testicular function was initiated by removal of the GnRH-implant „Gonazon®“ (18.5 mg azagly-nafarelin) 5 months after implantation. Testes were removed from 3–4 dogs in 3-week intervals and were preserved for further investigations. Due to the individually different speed of recrudescence of spermatogenesis, dogs were assigned to 4 groups according to the most developed germ cells observed: Developmental group (DG) A – spermatocytes, DG B – round spermatids, DG C – elongating spermatids, DG D – elongated spermatids. Three adult male Beagle dogs received the GnRH-implant „Profact® Depot“ (6.6 mg buserelinacetat) instead of „Gonazon®“ and testes were removed 5 months after implant application. Blood samples for assay of testosterone, LH and FSH were taken at castration. Five adult male Beagle dogs served as untreated controls (CG). Additionally testes of 3 premature, 2 month old crossbreed dogs (JG) could be obtained.

In order to characterize the restart of steroid biosynthesis, expression of 3 essential components of testicular steroid biosynthesis – steroidogenic acute regulatory (StAR) protein, cytochrome P450 side chain cleavage (P450scc) and cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20-lyase (P450c17) – was determined by qualitative and quantitative polymerase chain reaction on the mRNA level and by immunohistochemistry on the protein level. Furthermore, Leydig cells were characterized morphologically and the area

of the interstitial compartment was assessed histologically.

Western Blot indicated specificity of the antibodies used for immunohistochemistry; however, the apparent slight deviations in molecular masses of canine P450scc and P450c17 from the non-canine controls used, point towards a canine specific expression of these proteins. Positive immunostaining for StAR-protein, P450scc and P450c17 was restricted to Leydig cells, which showed a significantly decreased nuclear size at downregulation.

According to the reduced testosterone concentrations in peripheral plasma ranging at or below the level of detection and, when compared to CG, the significantly decreased expression of StAR-protein, P450scc and P450c17 in DG A, downregulation of testicular function affects the whole cascade of steroid biosynthesis. The availability of these 3 parameters was restricted on mRNA as well as on protein level.

After abolition of downregulation by implant removal restart of steroid biosynthesis occurs immediately and in a short time frame between DG A and DG B, in part showing indications of a rebound-phenomenon. Complete steroid biosynthesis was already recovered few weeks after abolishment of downregulation when recrudescence of spermatogenesis had reached the state of formation of round spermatids. Complete spermatogenesis was present 9 weeks after implant removal at the earliest.

No significant differences were observed between the implants „Gonazon®“ and „Profact® Depot“, but there was a tendency of „Profact® Depot“ having a stronger effect.

In the premature testes a high expression of StAR-protein-, P450scc- and P450c17 could be demonstrated on the mRNA-level, while expression on the protein level was low. Therefore expression of these proteins seems to be regulated post-transcriptionally in the premature testis.

8 Literaturverzeichnis

- ABEL, M.H.; BAKER, P.J.; CHARLTON, H.M.; MONTEIRO, A.; VERHOEVEN, G.; DE GENDT, K.; GUILLOU, F. und O'SHAUGHNESSY, P.J. (2008): Spermatogenesis and Sertoli cell activity in mice lacking Sertoli cell receptors for follicle-stimulating hormone and androgen. *Endocrinology* 149, 3279–3285.
- AMANN, R.P. (1986): Reproductive physiology and endocrinology of the dog. In: D.A. MORROW (Hrsg.), Current therapy in theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals, 532–538. Philadelphia: Saunders, 2. Auflage.
- AMORY, J.K. und BREMNER, W. (2001): Endocrine regulation of testicular function in men: Implications for contraceptive development. *Molecular and cellular endocrinology* 182, 175–179.
- BASGEN, J.M.; NEVINS, T.E. und MICHAEL, A.F. (1989): Quantitation of antigen in tissue by immunofluorescence image analysis. *Journal of immunological methods* 124, 77–83.
- BAUMGÄRTNER, W.; ATZPODIEN, E.; WEINTRAUT, H. und SEIBOLD, G. (1992): Factors influencing computer-assisted video image analysis of immunocytochemically stained lymphocytes and macrophages in the spleen of mice. *Journal of immunological methods* 151, 309–312.
- BELCHETZ, P.E.; PLANT, T.M.; NAKAI, Y.; KEOGH, E.J. und KNOBIL, E. (1978): Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science* 202, 631–633.
- BOSE, H.S.; LINGAPPA, V.R. und MILLER, W.L. (2002): Rapid regulation of steroidogenesis by mitochondrial protein import. *Nature* 417, 87–91.
- BÜSGES, F. (2003): Immunhistologischer Nachweis von Leukozyten, MHC-II Antigen und Gefäßendothelien am Corpus luteum der Hündin im Verlauf des Zyklus. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- BUSTAMANTE, E.; SOPER, J.W. und PEDERSEN, P.L. (1977): A high-yield preparative method for isolation of rat liver mitochondria. *Analytical biochemistry* 80, 401–408.

- BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J. und WITTEWIT, C.T. (2009): The MIQE guidelines: Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments. *Clinical chemistry* 55, 611–622.
- CARREAU, S.; GENISSEL, C.; BILINSKA, B. und LEVALLET, J. (1999): Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male. *International journal of andrology* 22, 211–223.
- CHEN, A.; YAHALOM, D.; BEN-AROYA, N.; KAGANOVSKY, E.; OKON, E. und KOCH, Y. (1998): A second isoform of gonadotropin-releasing hormone is present in the brain of human and rodents. *FEBS Letters* 435, 199–203.
- CHEUNG, L.W.T. und WONG, A.S.T. (2008): Gonadotropin-releasing hormone: GnRH receptor signaling in extrapituitary tissues. *FEBS Journal* 275, 5479–5495.
- CHIBA, K.; KOBAYASHI, H. und WAKABAYASHI, K. (1997): Isolation and partial characterization of LH, FSH and TSH from canine pituitary gland. *Endocrine journal* 44, 205–218.
- CHRISP, P. und GOA, K.L. (1990): Nafarelin – A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and clinical potential on sex hormone-related conditions. *Drugs* 39, 523–551.
- CLARK, B.J.; WELLS, J.; KING, S.R. und STOCCO, D.M. (1994): The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells – Characterization of the Steroidogenic Acute Regulatory protein (StAR). *The journal of biological chemistry* 269, 28314–28322.
- CLAUS, R. und HOFFMANN, B. (1980): Oestrogens, compared to other steroids of testicular origin, in bloodplasma of boars. *Acta endocrinologica* 94, 404–411.
- CLAYTON, R.N. (1982): Gonadotropin-releasing hormone modulation of its own pituitary receptors: Evidence for biphasic regulation. *Endocrinology* 111, 152–161.
- COHEN, S.M.; WERRMANN, J.G.; RASMUSSEN, G.H.; TANAKA, W.K.; MALATESTA, P.F.; PRAHALADA, S.; JACOBS, J.G.; HARRIS, G. und NETT, T.M. (1995): Comparison of the effects of new specific azasteroid inhibitors of steroid 5 α -reductase on canine hyperplastic prostate: Suppression of prostatic DHT correlated with prostate regression. *The prostate* 26, 55–71.
- CONLEY, A.J. und 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 the Δ 5 and Δ 4 pathways of steroidogenesis in mammals. *Biology of reproduction* 56, 789–799.

- CONLEY, A.J.; CORBIN, C.J.; BROWNE, P.; MAPES, S.M.; PLACE, N.J.; HUGHES, A.L. und GLICKMAN, S.E. (2007): Placental expression and molecular characterization of aromatase cytochrome P450 in the spotted hyena (*Crocota crocuta*). *Placenta* 28, 668–675.
- CONLEY, A.J. und HINSELWOOD, M. (2001): Mammalian aromatases. *Reproduction* 121, 685–695.
- CONN, P.M. und CROWLEY, JR., W.F. (1994): Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. *Annual review of medicine* 45, 391–405.
- CONN, P.M.; HSUEH, A.J.W. und CROWLEY, JR., W.F. (1984): Gonadotropin-releasing hormone: Molecular and cell biology, physiology, and clinical applications. *Federation proceedings* 43, 2351–2361.
- CORRADA, Y.; ARIAS, D.; RODRIGUEZ, R.; SPAINI, E.; FAVA, F. und GOBELLO, C. (2004): Effect of tamoxifen citrate on reproductive parameters of male dogs. *Theriogenology* 61, 1327–1341.
- CORRADA, Y.; SPAINI, E.; DE LA SOTA, P.E.; SCODELLARO, C.; FERNANDEZ, L. und GOBELLO, C. (2006): Effect of the GnRH antagonist, acyline, on canine testicular parameters. *Theriogenology* 66, 665–666.
- DE KRETZER, D.M.; BUZZARD, J.J.; OKUMA, Y.; O'CONNOR, A.E.; HAYASHI, T.; LIN, S.; MORRISON, J.R.; LOVELAND, K.L. und HEDGER, M.P. (2004): The role of activin, follistatin and inhibin in testicular physiology. *Molecular and cellular endocrinology* 225, 57–64.
- DE KRETZER, D.M.; HEDGER, M.P.; LOVELAND, K.L. und PHILLIPS, D.J. (2002): Inhibins, activins and follistatin in reproduction. *Human reproduction update* 8, 529–541.
- DE KRETZER, D.M.; LOVELAND, K.L.; MEEHAN, T.; O'BRYAN, M.K.; PHILLIPS, D.J. und WREFORD, N.G. (2001): Inhibins, activins and follistatin: Actions on the testis. *Molecular and cellular endocrinology* 180, 87–92.
- DE KRETZER, D.M. und ROBERTSON, D.M. (1989): The isolation and physiology of inhibin and related proteins. *Biology of reproduction* 40, 33–47.
- DEPALATIS, L.; MOORE, J. und FALVO, R.E. (1978): Plasma concentrations of testosterone and LH in the male dog. *Journal of reproduction and fertility* 52, 201–207.
- DÖCKE, F. (1981): Veterinärmedizinische Endokrinologie. Jena: Fischer, 2. Auflage.

- DUBÉ, D.; ASSAF, A.; PELLETIER, G. und LABRIE, F. (1987): Morphological study of the effects of an GnRH agonist on the canine testis after 4 months of treatment and recovery. *Acta endocrinologica* 116, 413–417.
- EIK-NES, K.B. (1971): Production and secretion of testicular steroids. *Recent progress in hormone research* 27, 517–535.
- EIK-NES, K.B. und KEKRE, M. (1963): Metabolism in vivo of steroids by the canine testis. *Biochimica et biophysica acta* 78, 449–456.
- ENGEL, J.B. und SCHALLY, A.V. (2007): Drug insight: Clinical use of agonists and antagonists of luteinizing-hormone-releasing hormone. *Nature clinical practice (Endocrinology & metabolism)* 3, 157–167.
- ENGLAND, G.C.W. (1997): Effect of progestogens and androgens upon spermatogenesis and steroidogenesis in dogs. *Journal of reproduction and fertility, Supplement* 51, 123–138.
- FALVO, R.E. und VINCENT, D.L. (1980): Testosterone regulation of follicle-stimulating hormone secretion in the male dog. *Journal of andrology* 1, 197–201.
- FERRO, V.A.; KHAN, M.A.H.; MCADAM, D.; COLSTON, A.; AUGHEY, E.; MULLEN, A.B.; WATERSTON, M.M. und HARVEY, M.J.A. (2004): Efficacy of an anti-fertility vaccine based on mammalian gonadotrophin releasing hormone (GnRH-I) – A histological comparison in male animals. *Veterinary immunology and immunopathology* 101, 73–86.
- FONTAINE, E. und FONTBONNE, A. (2011): Clinical use of GnRH agonists in canine and feline species. *Reproduction in domestic animals* 46, 344–353.
- FOOTE, R.H.; SWIERSTRA, E.E. und HUNT, W.L. (1972): Spermatogenesis in the dog. *The anatomical record* 173, 341–352.
- FREEMAN, D.A. und ROMMERTS, F.F.G. (1996): Regulation of Leydig cell cholesterol transport. In: A.H. PAYNE; M. HARDY und L. RUSSELL (Hrsg.), *The Leydig cell*, 231–240. Wien: Cache River Press.
- FRESHMAN, J.L.; OLSON, P.N.; AMANN, R.P.; CARLSON, E.D.; TWEDT, D.C. und BOWEN, R.A. (1990): The effects of methyltestosterone on reproductive function in male greyhounds. *Theriogenology* 33, 1057–1073.
- FREY, A.; BADE, S.; PETERSEN, A.; SALM, T.; MEYER-PUTTLITZ, B. und SCHULTE, A.M. (2007): Detektion von Protein auf Membran und In Situ. In: M. JANSOHN (Hrsg.), *Gentechnische Methoden – Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. München: Spektrum Akademischer Verlag, 4. Auflage.

- GARCÍA ROMERO, G.; VALIENTE, C.; AQUILANO, D.; CORRADA, Y. und GOBELLO, C. (2009): Endocrine effects of the GnRH antagonist, acyline, in domestic dogs. *Theriogenology* 71, 1234–1237.
- GOBELLO, C. (2006): Dopamine agonists, anti-progestins, anti-androgens, long-term-release GnRH agonists and anti-estrogens in canine reproduction: A review. *Theriogenology* 66, 1560–1567.
- GOBELLO, C. (2007): New GnRH analogs in canine reproduction. *Animal reproduction science* 100, 1–13.
- GOERICKE-PESCH, S.; SPANG, A.; SCHULZ, M.; ÖZALP, G.; BERGMANN, M.; LUDWIG, C. und HOFFMANN, B. (2009): Recrudescence of spermatogenesis in the dog following downregulation using a slow release GnRH agonist implant. *Reproduction in domestic animals* 44, Supplement 2, 302–308.
- GOERICKE-PESCH, S.; WILHELM, E. und HOFFMANN, B. (2010a): Hormonelle Downregulation der Hodenfunktion bei Rüde und Kater – eine retrospektive Studie. *Praktischer Tierarzt* 91, 563–570.
- GOERICKE-PESCH, S.; WILHELM, E.; LUDWIG, C.; DESMOULINS, P.O.; DRIANCOURT, M.A. und HOFFMANN, B. (2010b): Evaluation of the clinical efficacy of Gonazon implants in the treatment of reproductive pathologies, behavioral problems, and suppression of reproductive function in the male dog. *Theriogenology* 73, 920–926.
- GONZALEZ, A.; ALLEN, A.F.; POST, K.; MAPLETOFT, R.J. und MURPHY, B.D. (1989): Immunological approaches to contraception in dogs. *Journal of reproduction and fertility, Supplement* 39, 189–198.
- GORDON, K. und HODGEN, G.D. (1992): Evolving role of gonadotropin-releasing hormone antagonists. *Trends in endocrinology and metabolism* 3, 259–263.
- GRAY, C.J. (1988): Glycoprotein gonadotropins. Structure and synthesis. *Acta endocrinologica, Supplement* 288, 20–27.
- GREGORY, S.J. und KAISER, U.B. (2004): Regulation of gonadotropins by inhibin and activin. *Seminars in reproductive medicine* 22, 253–267.
- GÜNZEL-APEL, A.R.; BRINCKMANN, H.G. und HOPPEN, H.O. (1990): Dynamik der LH- und Testosteron-Sekretion bei Beagle-Rüden verschiedener Altersgruppen. *Reproduction in domestic animals* 25, 78–86.
- GÜNZEL-APEL, A.R.; HILLE, P. und HOPPEN, H.O. (1994): Spontaneous and GnRH-induced pulsatile LH and testosterone release in pubertal, adult and aging male beagles. *Theriogenology* 41, 737–745.

- HAIDER, S.G. (2007): Leydig cell steroidogenesis: Unmasking the functional importance of mitochondria. *Endocrinology* 148, 2581–2582.
- HALL, P.F. (1988): Testicular steroid synthesis: Organization and regulation. In: E. KNOBIL (Hrsg.), *The physiology of reproduction*, 975–994. New York: Raven Press.
- HALL, P.F. (1991): Cytochrome P-450 C₂₁scc: One enzyme with two actions: Hydroxylase and lyase. *The journal of steroid biochemistry and molecular biology* 40, 527–532.
- HANSSON, V.; WEDDINGTON, S.C.; MCLEAN, W.S.; SMITH, A.A.; NAYFEH, S.N.; FRENCH, F.S. und RITZEN, E.M. (1975): Regulation of seminiferous tubular function by FSH and androgen. *Journal of reproduction and fertility* 44, 363–375.
- HARDY, C.M. und BRAID, A.L. (2007): Vaccines for immunological control of fertility in animals. *Revue scientifique et technique (International office of epizootics)* 26, 461–470.
- HÄUSLER, A.; ALLEGRI, P.R.; BIOLLAZ, M.; BATZL, C.; SCHEIDEGGER, E. und BHATNAGAR, A.S. (1996): CGP 53153: A new potent inhibitor of 5 α -reductase. *Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 57, 187–195.
- HERBST, K.L. (2003): Gonadotropin-releasing hormone antagonists. *Current opinion in pharmacology* 3, 660–666.
- HESS, R.A. (2003): Estrogen in the adult male reproductive tract: A review. *Reproductive biology and endocrinology* 1, 52–65.
- HOFFMANN, B.; BÜSGES, F. und BAUMGÄRTNER, W. (2004): Immunohistochemical detection of CD4-, CD8- and MHC II-expressing immune cells and endoglin in the canine corpus luteum at different stages of dioestrus. *Reproduction in domestic animals* 39, 391–395.
- HOFFMANN, B. und LANDECK, A. (1999): Testicular endocrine function, seasonality and semen quality of the stallion. *Animal reproduction science* 57, 89–98.
- HOFFMANN, B.; ROSTALSKI, A.; MUTEMBEI, H.M. und GOERCKE-PESCH, S. (2010): Testicular steroid hormone secretion in the boar and expression of testicular and epididymal steroid sulphatase and estrogen sulphotransferase activity. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes* 118, 274–280.
- HOFFMANN, B. und SCHULER, G. (2000): Receptor blockers – general aspects with respect to their use in domestic animal reproduction. *Animal reproduction science* 60-61, 295–312.
- HOLDCRAFT, R.W. und BRAUN, R.E. (2004): Hormonal regulation of spermatogenesis. *International journal of andrology* 27, 335–342.

- HSU, S.; RAINE, L. und FANGER, H. (1981): Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *The journal of histochemistry and cytochemistry* 29, 577–580.
- HSUEH, A.J.W. und JONES, P.B.C. (1983): Gonadotropin releasing hormone: Extrapituitary actions and paracrine control mechanisms. *Annual Review of Physiology* 45, 83–94.
- HULEIHEL, M. und LUNENFELD, E. (2004): Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. *Asian journal of andrology* 6, 259–268.
- IGUER-OUADA, M. und VERSTEGEN, J.P. (1997): Effect of finasteride (Proscar MSD) on seminal composition, prostate function and fertility in male dogs. *Journal of reproduction and fertility, Supplement* 51, 139–149.
- INABA, T.; UMEHARA, T.; MORI, J.; TORII, R.; TAMADA, H. und SAWADA, T. (1996): Reversible suppression of pituitary-testicular function by a sustained-release formulation of a GnRH agonist (leuprolide acetate) in dogs. *Theriogenology* 46, 671–677.
- JÄGER, A. (2006): Downregulation von LH bei der Hündin durch Anwendung eines GnRH-Agonisten in Form eines Implantates. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- JAMES, R.W.; CROOK, D. und HEYWOOD, R. (1979): Canine pituitary-testicular function in relation to toxicity testing. *Toxicology* 13, 237–247.
- JONES, G.E. und BOYNS, A.R. (1974): Effect of gonadal steroids on the pituitary responsiveness to synthetic luteinizing hormone releasing hormone in the male dog. *Journal of endocrinology* 61, 123–131.
- JUNAIDI, A.; WILLIAMSON, P.E.; MARTIN, G.B.; BLACKBERRY, M.A.; CUMMINS, J.M. und TRIGG, T.E. (2009): Dose-response studies for pituitary and testicular function in male dogs treated with the GnRH superagonist, deslorelin. *Reproduction in domestic animals* 44, 725–734.
- JUNG, M.; MOON, Y.; CHO, I.; YEH, J.; KIM, S.; CHANG, W.; PARK, S.; SONG, C.; KIM, H.; PARK, K.; MCORIST, S.; CHOI, I. und LEE, J. (2005): Induction of castration by immunization of male dogs with recombinant gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-canine distemper virus (CDV) T helper cell epitope p35. *Journal of veterinary science* 6, 21–24.

- KARG, H. und KRONTHALER, O. (1957): Karyometrische Untersuchungen an den Leydig-schen Zwischenzellen von androgen- und östrogenbehandelten Bullen. *Zuchthygiene, Fortpflanzungsstörungen und Besamung der Haustiere* 1, 352–357.
- KAWAKAMI, E.; TSUTSUI, T. und OGASA, A. (1991): Histological observations of the reproductive organs of the male dog from birth to sexual maturity. *The journal of veterinary medical science* 53, 241–248.
- KERR, J.B.; LOVELAND, K.L.; O'BRYAN, M.K. und DE KRETZER, D.M. (2006): Cytology of the testis and intrinsic control mechanism. In: J.D. NEILL (Hrsg.), Knobil and Neill's physiology of reproduction, 827–947. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 3. Auflage.
- KEY, M. (2009): Immunohistochemistry staining methods. In: G.L. KUMAR und L. RUDBECK (Hrsg.), Education guide – Immunohistochemical staining methods. Carpinteria: Dako, 5. Auflage.
- KOWALEWSKI, M.P. und HOFFMANN, B. (2008): Molecular cloning and expression of StAR protein in the canine corpus luteum during dioestrus. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes* 116, 158–161.
- KUTZLER, M. und WOOD, A. (2006): Non-surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology* 66, 514–525.
- LADD, A.; TSONG, Y.; WALFIELD, A.M. und THAU, R. (1994): Development of an antifertility vaccine for pets based on active immunization against luteinizing hormone-releasing hormone. *Biology of reproduction* 51, 1076–1083.
- LANG, G. (2006): Histotechnik - Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik. Wien: Springer.
- LAVOIE, H.A. und KING, S.R. (2009): Transcriptional regulation of steroidogenic genes: STARD1, CYP11A1 and HSD3B. *Experimental biology and medicine* 234, 880–907.
- LEYDIG, F. (1850): Zur Anatomie der männlichen Geschlechtsorgane und Analdrüsen der Säugethiere. *Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie* 2, 1–57.
- LISCUM, L. und DAHL, N.K. (1992): Intracellular cholesterol transport. *Journal of lipid research* 33, 1239–1254.
- LUDWIG, C. (2008): Downregulation der hypophysären GnRH-Rezeptoren mit einem neuen GnRH-Implantat beim Rüden. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet. beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

- LUDWIG, C.; DESMOULINS, P.O.; DRIANCOURT, M.A.; GOERICKE-PESCH, S. und HOFFMANN, B. (2009): Reversible downregulation of endocrine and germinative testicular function (hormonal castration) in the dog with the GnRH-agonist Azagly-Nafarelin as a removable implant "Gonazon"; a preclinical trial. *Theriogenology* 71, 1037–1045.
- LUNNEN, J.E.; FAULKNER, L.C.; HOPWOOD, M.L. und PICKETT, B.W. (1974): Immunization of dogs with bovine luteinizing hormone. *Biology of reproduction* 10, 453–460.
- MATSUO, H.; BABA, Y.; NAIR, R.M.G.; ARIMURA, A. und SCHALLY, A.V. (1971): Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochemical and biophysical research communications* 43, 1334–1339.
- MCLACHLAN, R.I.; MATSUMOTO, A.M.; BURGER, H.G.; DE KRETZER, D.M. und BREMNER, W.J. (1988): Relative roles of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in the control of inhibin secretion in normal men. *The journal of clinical investigation* 82, 880–884.
- MCLACHLAN, R.I.; O'DONNELL, L.; MEACHEM, S.J.; STANTON, P.G.; DE KRETZER, D.M.; PRATIS, K. und ROBERTSON, D.M. (2002): Hormonal regulation of spermatogenesis in primates and man: Insights for development of the male hormonal contraceptive. *Journal of andrology* 23, 149–162.
- MCLACHLAN, R.I.; WREFORD, N.G.; O'DONNELL, L.; DE KRETZER, D.M. und ROBERTSON, D.M. (1996): The endocrine regulation of spermatogenesis: Independent roles for testosterone and FSH. *Journal of endocrinology* 148, 1–9.
- MEDURI, G.; BACHELOT, A.; COCCA, M.P.; VASSEUR, C.; RODIEN, P.; KUTTENN, F.; TOURAINE, P. und MISRAHI, M. (2008): Molecular pathology of the FSH receptor: New insights into FSH physiology. *Molecular and cellular endocrinology* 282, 130–142.
- MENDIS-HANDAGAMA, S.M.L.C. und ARIYARATNE, H.B.S. (2001): Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biology of reproduction* 65, 660–671.
- MIDZAK, A.; RONE, M.; AGHAZADEH, Y.; CULTY, M. und PAPADOPOULOS, V. (2011): Mitochondrial protein import and the genesis of steroidogenic mitochondria. *Molecular and cellular endocrinology* 336, 70–79.
- MILLAR, R.P. (2003): GnRH II and type II GnRH receptors. *Trends in endocrinology and metabolism* 14, 35–43.
- MILLAR, R.P. (2005): GnRHs and GnRH receptors. *Animal reproduction science* 88, 5–28.

- MILLER, W.L. (1987): Structure of genes encoding steroidogenic enzymes. *Journal of steroid biochemistry* 27, 759–766.
- MILLER, W.L. (2002): Androgen biosynthesis from cholesterol to DHEA. *Molecular and cellular endocrinology* 198, 7–14.
- MILLER, W.L. (2007a): Mechanism of StAR's regulation of mitochondrial cholesterol import. *Molecular and cellular endocrinology* 265-266, 46–50.
- MILLER, W.L. (2007b): Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. *Biochimica et biophysica acta* 1771, 663–676.
- MIYAMOTO, K.; HASEGAWA, Y.; NOMURA, M.; IGARASHI, M.; KANGAWA, K. und MATSUO, H. (1984): Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus: Evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 81, 3874–3878.
- MUNELL, F.; SUÁREZ-QUIAN, C.A.; SELVA, D.M.; TIRADO, O.M. und REVENTÓS, J. (2002): Androgen-binding protein and reproduction: Where do we stand? *Journal of andrology* 23, 598–609.
- MURASE, M.; UEMURA, T.; GAO, M.; INADA, M.; FUNABASHI, T. und HIRAHARA, F. (2005): GnRH antagonist-induced down-regulation of the mRNA expression of pituitary receptors: Comparisons with GnRH agonist effects. *Endocrine journal* 52, 131–137.
- NABORS, L.B.; SONGU-MIZE, E. und MIZE, R.R. (1988): Quantitative immunocytochemistry using an image analyzer. II. Concentration standards for transmitter immunocytochemistry. *Journal of neuroscience methods* 26, 25–34.
- NAZ, R.K.; GUPTA, S.K.; GUPTA, J.C.; VYAS, H.K. und TALWAR, G.P. (2005): Recent advances in contraceptive vaccine development: A mini-review. *Human reproduction* 20, 3271–3283.
- NERI, R. (1989): Pharmacology and pharmacokinetics of flutamide. *Urology, Supplement* 34, 19–21.
- O'CONNOR, A.E. und DE KRETZER, D.M. (2004): Inhibins in normal male physiology. *Seminars in reproductive medicine* 22, 177–185.
- O'SHAUGHNESSY, P.J.; BAKER, P.J. und JOHNSTON, H. (2005): Neuroendocrine regulation of Leydig cell development. *Annals of the New York academy of sciences* 1061, 109–119.

- PADMANABHAN, V.; KARSCH, F.J. und LEE, J.S. (2002): Hypothalamic, pituitary and gonadal regulation of FSH. *Reproduction, Supplement* 59, 67–82.
- PADULA, A.M. (2005): GnRH analogues – Agonists and antagonists. *Animal reproduction science* 88, 115–126.
- PAPADOPOULOS, V. und BROWN, A.S. (1995): Role of the peripheral-type benzodiazepine receptor and the polypeptide diazepam binding inhibitor in steroidogenesis. *The journal of steroid biochemistry and molecular biology* 53, 103–110.
- PARAMO, R.M.; RENTON, J.P.; FERGUSON, J.M. und CONCANNON, P.W. (1993): Effects of medroxyprogesterone acetate or gonadotrophin-releasing hormone agonist on suppression of spermatogenesis in the dog (*Canis familiaris*). *Journal of reproduction and fertility, Supplement* 47, 387–397.
- PAYNE, A.H. (1990): Hormonal regulation of cytochrome P450 enzymes, cholesterol side-chain cleavage and 17 α -hydroxylase/C17-20 lyase in Leydig cells. *Biology of reproduction* 42, 399–404.
- PAYNE, A.H. und HALES, D.B. (2004): Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocrine reviews* 25, 947–970.
- PAYNE, A.H. und O'SHAUGHNESSY, P.J. (1996): Structure, function and regulation of steroidogenic enzymes in the leydig cell. In: A.H. PAYNE; M. HARDY und L. RUSSELL (Hrsg.), *The Leydig cell*, 259–286. Wien: Cache River Press.
- PAYNE, A.H. und YOUNGBLOOD, G.L. (1995): Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *Biology of Reproduction* 52, 217–225.
- PETERS, M.A.J.; DE JONG, F.H.; TEERDS, K.J.; DE ROOIJ, D.G.; DIELEMAN, S.J. und VAN SLUIJS, F.J. (2000): Ageing, testicular tumours and the pituitary-testis axis in dogs. *Journal of endocrinology* 166, 153–161.
- PETERSON, J.K.; MORAN, F.; CONLEY, A.J. und BIRD, I.M. (2001): Zonal expression of endothelial nitric oxide synthase in sheep and rhesus adrenal cortex. *Endocrinology* 142, 5351–5363.
- PFAFFL, M.W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29, 2002–2007.
- PFAFFL, M.W. (2004): Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum, Sonderausgabe PCR* 1, 92–95.
- PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W. und DEMPFL, L. (2002): Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research* 30, e36.

- PIERIK, F.H.; VREEBURG, J.T.M.; STIJNEN, T.; DE JONG, F.H. und WEBER, R.F.A. (1998): Serum inhibin B as a marker of spermatogenesis. *Journal of clinical endocrinology and metabolism* 83, 3110–3114.
- PINEDA, M.H. (1986): Contraceptive procedures for the male dog. In: D.A. MORROW (Hrsg.), *Current therapy in theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals*, 563–566. Philadelphia: Saunders.
- PINEDA, M.H. (2003): Male reproductive system. In: M.H. PINEDA (Hrsg.), *McDonalds veterinary endocrinology and reproduction*, 239–282. Ames, Iowa: Iowa State Press, 5. Auflage.
- PURVIS, K.; CUSAN, L. und HANSSON, V. (1981): Regulation of steroidogenesis and steroid action in Leydig cells. *Journal of steroid biochemistry* 15, 77–86.
- RAESIDE, J.I. und CHRISTIE, H.L. (1997): Estrogen concentrations in semen of the stallion. *Animal reproduction science* 48, 293–300.
- RAESIDE, J.I. und RENAUD, R.L. (1983): Estrogen and androgen production by purified Leydig cells of mature boars. *Biology of reproduction* 28, 727–733.
- RAMAKRISHNAPPA, N.; RAJAMAHENDRAN, R.; LIN, Y. und LEUNG, P.C.K. (2005): GnRH in non-hypothalamic reproductive tissues. *Animal reproduction science* 88, 95–113.
- REHM, H. und LETZEL, T. (2010): *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 6. Auflage.
- REICHERT, JR., L.E. und DATTATREYAMURTY, B. (1989): The follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in testis: Interaction with FSH, mechanism of signal transduction, and properties of the purified receptor. *Biology of reproduction* 40, 13–26.
- RIESENBECK, A.; KLEIN, R. und HOFFMANN, B. (2002): Downregulation, eine neue, reversible Möglichkeit zur Ausschaltung der Hodenfunktion beim Rüden. *Praktischer Tierarzt* 83, 512–520.
- RITZEN, E.M.; BOITANI, C.; PARVINEN, M.; FRENCH, F.C. und FELDMAN, M. (1982): Stage-dependent secretion of ABP by rat seminiferous tubules. *Molecular and cellular endocrinology* 25, 25–33.
- ROBY, K.F.; LARSEN, D.; DEB, S. und SOARES, M.J. (1991): Generation and characterization of antipeptide antibodies to rat cytochrome P-450 side-chain cleavage enzyme. *Molecular and cellular endocrinology* 79, 13–20.

- RÖCKEN, F.E.; NOTHELFER, H. und HOFFMANN, B. (1995): Testosteronkonzentrationen im peripheren Plasma sowie morphologische Hodenbefunde von Rüden mit einer Perinealhernie. *Kleintierpraxis* 40, 261–267.
- RONE, M.B.; FAN, J. und PAPADOPOULOS, V. (2009): Cholesterol transport in steroid biosynthesis: Role of protein-protein interactions and implications in disease states. *Biochimica et biophysica acta* 1791, 646–658.
- RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.; HIKIM, A.P.S. und CLEGG, E.D. (1990): Staging for the dog. In: L.D. RUSSELL; R. ETTLIN; A.P.S. HIKIM und E.D. CLEGG (Hrsg.), Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater: Cache River Press.
- SAEZ, J.M. (1994): Leydig cells: Endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocrine reviews* 15, 574–626.
- SCHALLY, A.V.; ARIMURA, A. und KASTIN, A.J. (1973): Hypothalamic regulatory hormones – At least nine substances from the hypothalamus control the secretion of pituitary hormones. *Science* 179, 341–350.
- SCHALLY, A.V.; ARIMURA, A.; KASTIN, A.J.; MATSUO, H.; BABA, Y.; REDDING, T.W.; NAIR, R.M.G.; DEBELJUK, L. und WHITE, W.F. (1971): Gonadotropin-releasing hormone: One polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science* 173, 1036–1038.
- SCHALLY, A.V. und COMARU-SCHALLY, A.M. (1980): Hypothalamus and reproduction gonadotropin releasing hormone and its analogues clinical applications. *Materia medica polona* 12, 3–8.
- SCHAMS, D.; HÖFER, F.; SCHALLENBERGER, E.; HARTL, M. und KARG, H. (1974): Pattern of luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) in bovine blood plasma after injection of a synthetic gonadotropin-releasing hormone (Gn-RH). *Theriogenology* 1, 137–151.
- SCHRÖDER, M. (2007): Isolierung von RNA. In: M. JANSOHN (Hrsg.), Gentechnische Methoden – Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. München: Spektrum Akademischer Verlag, 4. Auflage.
- SELMAN, P.J.; MOL, J.A.; RUTTEMAN, G.R.; VAN GARDEREN, E.; VAN DEN INGH, T.S.G.A.M. und RJINBERK, A. (1997): Effects of progestin administration on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and glucose homeostasis in dogs. *Journal of reproduction and fertility, Supplement* 51, 345–354.
- SETCHELL, B.P. und BREED, W.G. (2006): Anatomy, vasculature, and innervation of the male reproductive tract. In: J.D. NEILL (Hrsg.), Knobil and Neill's physiology of reproduction, 771–825. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 3. Auflage.

- SETCHELL, B.P.; PAKARINEN, P. und HUHTANIEMI, I. (2002): How much LH do the Leydig cells see? *Journal of endocrinology* 175, 375–382.
- SIERENS, J.E.; SNEDDON, S.F.; COLLINS, F.; MILLAR, M.R. und SAUNDERS, P.T.K. (2005): Estrogens in testis biology. *Annals of the New York academy of sciences* 1061, 65–76.
- SIRINARUMITR, K.; JOHNSTON, S.D.; ROOT KUSTRITZ, M.V.; JOHNSTON, G.R.; SARKAR, D.K. und MEMON, M.A. (2001): Effects of finasteride on size of the prostate gland and semen quality in dogs with benign prostatic hypertrophy. *Journal of the american veterinary medical association* 218, 1275–1280.
- SONTAS, H.B.; DOKUZEYLU, B.; TURNA, O. und EKICI, H. (2009): Estrogen-induced myelotoxicity in dogs: A review. *The canadian veterinary journal* 50, 1054–1058.
- SPANG, A. (2012, in Vorbereitung): Untersuchungen zur Rekrudescenz der caninen Spermatogenese nach Downregulation mittels GnRH-Analogen. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet. am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- SPANG, A.; GOERICKE-PESCH, S.; BERGMANN, M. und HOFFMANN, B. (2008): Recrudescence of spermatogenesis following downregulation with a GnRH-implant in the dog – First morphological and hormone-analytical results. *Reproduction in domestic animals* 43, Supplement 1, 32.
- STEINBERGER, E. (1971): Hormonal control of mammalian spermatogenesis. *Physiological reviews* 51, 1–22.
- STOCCO, D.M. (1996): Acute regulation of Leydig cell steroidogenesis. In: A.H. PAYNE; M. HARDY und L. RUSSELL (Hrsg.), *The Leydig cell*, 241–257. Wien: Cache River Press.
- STOCCO, D.M. (2001): StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annual review of physiology* 63, 193–213.
- STOCCO, D.M. und MCPHAUL, M.J. (2006): Physiology of testicular steroidogenesis. In: J.D. NEILL (Hrsg.), *Knobil and Neill's physiology of reproduction*, 977–1016. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 3. Auflage.
- STORBECK, K.; SWART, P. und SWART, A.C. (2007): Cytochrome P450 side-chain cleavage: Insights gained from homology modeling. *Molecular and cellular endocrinology* 265/266, 65–70.
- STRAUSS, III, J.F.; KISHIDA, T.; CHRISTENSON, L.K.; FUJIMOTO, T. und HIROI, H. (2003): START domain proteins and the intracellular trafficking of cholesterol in steroidogenic cells. *Molecular and cellular endocrinology* 202, 59–65.

- THOMPSON, JR., D.L. (2000): Immunization against GnRH in male species (comparative aspects). *Animal reproduction science* 60/61, 459–469.
- TILBROOK, A.J. und CLARKE, I.J. (2001): Negative feedback regulation of the secretion and actions of gonadotropin-releasing hormone in males. *Biology of reproduction* 64, 735–742.
- TREMBLAY, Y. und BELANGER, A. (1984): Reversible inhibition of gonadal functions by a potent gonadotropin-releasing hormone agonist in adult dog. *Contraception* 30, 483–497.
- TRIGG, T.E.; DOYLE, A.G.; WALSH, J.D. und SWANGCHAN-UTHAI, T. (2006): A review of advances in the use of the GnRH agonist deslorelin in control of reproduction. *Theriogenology* 66, 1507–1512.
- TSUTSUI, T.; HORI, T.; SHIMIZU, M.; ORIMA, H.; KAWAKAMI, E. und FUKUDA, S. (2000): Regression of prostatic hypertrophy by osaterone acetate in dogs. *The journal of veterinary medical science* 62, 1115–1119.
- TSUTSUI, T.; HORI, T.; SHIMIZU, M.; TATSUZAWA, C. und KAWAKAMI, E. (2001): Effect of osaterone acetate administration on prostatic regression rate, peripheral blood hormone levels and semen quality in dogs with benign prostatic hypertrophy. *Theriogenology* 63, 453–456.
- VALIENTE, C.; CORRADA, Y.; DE LA SOTA, P.E.; GEREZ, P.G. und GOBELLO, C. (2007): Effect of the GnRH antagonist, acyline, on canine testicular characteristics. *Theriogenology* 68, 687–692.
- VAN DER MOLEN, H.J. und EIK-NES, K.B. (1971): Biosynthesis and secretion of steroids by the canine testis. *Biochimica et biophysica acta* 248, 343–362.
- VICKERY, B.; MCRAE, G.; BERGSTROM, K.; BRIONES, W.; SEIDENBERG, R. und WORDEN, A. (1981): Suppression of sexual function in male dogs with a new agonistic analogue of LHRH: Potential for male contraception without need for androgen replacement? *Journal of andrology* 2, 30.
- VICKERY, B.H. (1985): Comparisons of the potential utility of LHRH agonists and antagonists for fertility control. *Journal of steroid biochemistry* 23, 779–791.
- VICKERY, B.H.; MCRAE, G.I.; BRIONES, W.; WORDEN, A.; SEIDENBERG, R.; SCHANBACHER, B.D. und FALVO, R. (1984): Effects of an LHRH agonist analog upon sexual function in male dogs. *Journal of andrology* 5, 28–42.
- WALKER, W.H. und CHENG, J. (2005): FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction* 130, 15–28.

- WINTER, M.; FALVO, R.E.; SCHANBACHER, B.D. und VERHOLTZ, S. (1983): Regulation of gonadotropin secretion in the male dog – Role of estradiol. *Journal of andrology* 4, 319–323.
- WINTER, M.; PIRMAN, J.; FALVO, R.E.; SCHANBACHER, B.D. und MILLER, J. (1982): Steroidal control of gonadotrophin secretion in the orchidectomized dog. *Journal of reproduction and fertility* 64, 449–455.
- WU, X.; WAN, S. und LEE, M.M. (2007): Key factors in the regulation of fetal and postnatal Leydig cell development. *Journal of cellular physiology* 213, 429–433.
- XIA, Y. und SCHNEYER, A.L. (2009): The biology of activin: Recent advances in structure, regulation and function. *Journal of endocrinology* 202, 1–12.
- YAHALOM, D.; CHEN, A.; BEN-AROYA, N.; RAHIMPOUR, S.; KAGANOVSKY, E.; OKON, E.; FRIDKIN, M. und KOCH, Y. (1999): The gonadotropin-releasing hormone family of neuropeptides in the brain of human, bovine and rat: Identification of a third isoform. *FEBS Letters* 463, 289–294.
- YING, S. (1989): Inhibins, activins and follistatins. *Journal of steroid biochemistry* 33, 705–713.

Anhang

A.1 Eingesetzte Chemikalien

Agarose Multi-Purpose, 500 g, BIO-41025, Bioline GmbH, D-14943 Luckenwalde

Albumin-Standard 2,0 mg/ml bovine serum albumine, No. 23209, Pierce, USA-Rockford

AmpliTaq Gold™ 5 U/µl, 250 U, Bestandteil des GeneAmp® Kits,
Applied Biosystems, USA-Foster City

APS/Ammoniumperoxodisulfat APS, ≥98 %, p.a., ACS, (NH₄)₂S₂O₈, 228,2 g/mol,
Art.-Nr. 9592.3, Carl Roth GmbH & Co.KG, D-76185 Karlsruhe

ASSISTENT-Histokitt No. 1025/100, Assistant, D-38835 Osterode

Borsäure Boric acid, ≥99,8 %, p.a., ACS, ISO, H₃BO₃, 61,83 g/mol, Art.-Nr. 6943.1,
Carl Roth GmbH & Co.KG, D-76185 Karlsruhe

Bromphenolblau Sultone Form, C₁₉H₁₀Br₄O₅S, 670,0 g/mol, B-0126,
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim

BSA Albumin from bovine serum, minimum 98 %, electrophoresis, A7906-100g,
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim

C₆H₈O₇ · H₂O Citronensäure-Monohydrat, krist. reinst, 210,14 g/mol, 1.00242.1000,
Merck KGaA, D-64271 Darmstadt

Chloroform Trichlormethan, Roti® Solv HPLC, CHCl₃, 119,38 g/mol, Art.Nr. 7331.1,
Carl Roth GmbH & Co.KG, D-76185 Karlsruhe

Complete Mini protease inhibitor cocktail tablets, 11 836 153 001,
Roche Diagnostics GmbH, D-68305 Mannheim

DEPC Diethylpyrocarbonat, approx. 97 %NMR, C₆H₁₀O₅, 162,14 g/mol, D5758-50ml,
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim

DNA-Größenstandard GeneRuler™ 100bp DNA Ladder, 0,5 µg/µl, #SM0242,
Fermentas GmbH, D-68789 St. Leon-Rot

DNase-Kit DNase I recombinant, RNase free, Cat.No. 04 716 728 001,
enthält DNase I, 10 U/µl und DNase-Puffer, 10× Incubation buffer,
Roche Diagnostics GmbH, D-68305 Mannheim

- dNTP-Mix** 10 mM, 362 275, Bestandteil des GeneAmp® Kits,
Applied Biosystems, USA-Foster City
- EDTA (0,5 M, pH 8,0)** Disodium Salt, for Molecular Biology, $(\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2)_2$,
E-7889, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim
- Eosin gelblich** $\text{C}_{20}\text{H}_6\text{Br}_4\text{Na}_2\text{O}_5$, 691,88 g/mol, 45240-10g, Fluka Chemie AG, CH-Buchs
- Essigsäure** Eisessig 100 %, wasserfrei, zu Analyse, CH_3COOH , 60,05 g/mol, 1.00063.1000,
Merck KGaA, D-64271 Darmstadt
- Ethanol $\geq 99,8 \%$** DAB, reinst, $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, 46,07 g/mol, Art.-Nr. 5054.5,
Carl Roth GmbH & Co.KG, D-76185 Karlsruhe
- Formaldehydlösung min. 37 %** pro analysi, ACS, 1.04003.2500,
Merck KGaA, D-64271 Darmstadt
- GelRed™** Nucleic Acid Gel Stain, 10 000× in H_2O , Cat. 41003, Biotium, USA-Hayward
- GeneAmp® Kit** GeneAmp® Gold RNA PCR Core Kit, 4312 765,
Applied Biosystems, USA-Foster City
- Glycerin** Rotipuran®, $\geq 99,5 \%$, wasserfrei, $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$, 92,10 g/mol, Art.-Nr. 3783.2,
Carl Roth GmbH & Co.KG, D-76185 Karlsruhe
- Glycin** $\geq 99 \%$, p.a., $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$, 75,07 g/mol, Art.-Nr. 3908.2,
Carl Roth GmbH & Co.KG, D-76185 Karlsruhe
- Gonazon®** 18,5 mg Azagly-nafarelin, $14 \times 3 \times 1$ mm großes Implantat,
Intervet Pharma R&D SA, F-Beaucouze Angers Technopole
- Hämatoxylin-Lösung** modifiziert nach Gill III, für die Mikroskopie, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18 \text{H}_2\text{O}$,
1.05174.0500, Merck KGaA, D-64271 Darmstadt
- HCl** 4 N, Salzsäure rauchend 37 %, purum p.a.,
Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim
- Hydrolyse-Sonden** 5'-Modifikation: 6-FAM, 3'-Modifikation: TAMRA, HPLC-gereinigt,
Konzentration 100 pmol/µl in DEPC-Wasser, biomers.net GmbH, D-89077 Ulm
- iQ™ Supermix** 2×, enthält: 100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8,4, dNTPs je 0,4 mM,
50 U/µl iTaq™ DNA Polymerase, 6 mM MgCl_2 , KatalogNr. 170-8860,
Bio-Rad Laboratories GmbH, D-80939 München
- Isopropanol** 2-Propanol, Rotipuran® $\geq 99,7 \%$, p.a., ACS, ISO, $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$, 60,10 g/mol,
Art.-Nr. 6752.4, Carl Roth GmbH & Co.KG, D-76185 Karlsruhe
- Kaninchen IgG** RABBIT IgG, I-1000, Vector Laboratories, Inc., USA-Burlingame
- KCl** Kaliumchlorid zur Analyse, 74,56 g/mol, Art. 4936,
Merck KGaA, D-64271 Darmstadt

- KH₂PO₄** Potassium phosphate monobasic, ACS reagent, ≥99,0 %, 136,09 g/mol, P0662, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim
- Ladepuffer** 6× Loading Dye Solution, Bestandteil des DNA-Größenstandards, Fermentas GmbH, D-68789 St. Leon-Rot
- Magermilchpulver** J.M. Gabler Saliter GmbH & Co.KG, D-87630 Obergünzburg/Allgäu
- 2-Mercaptoethanol** C₂H₆OS, 78,13 g/mol, M-6250, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim
- Methanol** reinst, CH₃OH, 32,04 g/mol, 1.06008.2500, Merck KGaA, D-64271 Darmstadt
- MgCl₂** Solution, 25 mM, 4304898, Bestandteil des GeneAmp® Kits, Applied Biosystems, USA-Foster City
- Na₂HPO₄** di-Natriumphosphat, reinst, 141,96 g/mol, Art. 6585-5kg, Merck KGaA, D-64271 Darmstadt
- Na₂HPO₄ · 2 H₂O** Natriumphosphat dibasisch Dihydrat, purum p.a., ≥98,0 %(T), 177,99 g/mol, 71645, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim
- Na₃C₆H₅O₇ · 2 H₂O** Sodium citrate tribasic dihydrate, ACS reagent, ≥99,0 %, 294,1 g/mol, S-4641, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim
- NaCl** Natriumchlorid zur Analyse, ACS, ISO, Reag.Ph Eur, 58,44 g/mol, 1.06404.5000, Merck KGaA, D-64271 Darmstadt
- NaH₂PO₄ · H₂O** Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, pro analysi, ACS, 137,99 g/mol, 1.06346.1000, Merck KGaA, D-64271 Darmstadt
- Nonidet P-40** (9036-19-5), 1-800-854-0530, Cat No 155942, ICN Biochemicals Inc., USA-Aurora
- Paraffin** Gewebeeinbettmedium proWax, Bestell-Nr. 40-005/B, prolab GmbH, D-35460 Staufenberg
- PCR-Puffer** 10× PCR buffer II, (500 mM KCl, 100 mM TrisHCl, contains no MgCl₂), PartNo. 4376212, Applied Biosystems, USA-Foster City
- Pikrinsäure** Picric Acid-Saturated Solution, 1,3 %, C₆H₃N₃O₇, 229,11 g/mol, P6744-1GA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim
- Ponceau-S** C₂₂H₁₂N₄Na₄O₁₃S₄, 760,56 g/mol, Art.-Nr. 5938.1, Carl Roth GmbH & Co.KG, D-76185 Karlsruhe
- Primer** kartuschengereinigt, Konzentration 100 pmol/µl in DEPC-Wasser, biomers.net GmbH, D-89077 Ulm

- Profact® Depot** 6,3 mg 2-Monatsimplantat, Buserelinacetat,
Aventis Pharma Deutschland GmbH, D-65926 Frankfurt a.M.
- Proteinstandard** Roti®-Mark WESTERN Set, Art.-Nr. 0947.1,
Carl Roth GmbH & Co.KG, D-76185 Karlsruhe bzw. SDS-7B, Prestained Molecular
Weight Standard Mixture, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim
- QIAEX® II Gel Extraction Kit** Cat.No. 20021, Qiagen GmbH, D-40724 Hilden
- Random Hexamers** 50 µM, 100 µl, 4308 212, Bestandteil des GeneAmp® Kits,
Applied Biosystems, USA-Foster City
- Reverse Transkriptase** MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 50 U/µl, Bestandteil des
GeneAmp® Kits, Applied Biosystems, USA-Foster City
- RNAlater®** Soln., Cat# AM7021, Ambion Inc. – The RNA Company, USA-Austin
- RNaseAWAY®** Cat.# 7005, Molecular BioProducts Inc., USA-San Diego
- RNase-Inhibitor (40 U/µl)** RiboLock™, 2500 U, #EO 0381,
Fermentas GmbH, D-68789 St. Leon-Rot
- Rotiphorese® 10×SDS-PAGE** Elektrophoresepuffer, Art.-Nr. 3060.1,
Carl Roth GmbH & Co.KG, D-76185 Karlsruhe
- Rotiphorese® Gel30** (37,5:1), Acrylamidlösung, Art.-Nr. 3020.1,
Carl Roth GmbH & Co.KG, D-76185 Karlsruhe
- SDS** Lauryl Sulfate sodium salt, C₁₂H₂₅NaO₄S, 288,4 g/mol, No. L-5750,
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim
- Sodiumdodecylsulfat** SDS-Pellets, ≥99 %, f.d.Biochemie, C₁₂H₂₅NaO₄S, 288,4 g/mol,
Art.-Nr. CN30.1, Carl Roth GmbH & Co.KG, D-76185 Karlsruhe
- Sucrose** research grade, C₁₂H₂₂O₁₁, 342,3 g/mol, 35580,
SERVA, Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership, D-69115 Heidelberg
- 5-Sulfosalicylsäure-Dihydrat** purum p.a., ≥98 % (T), C₇H₆O₆S · 2 H₂O, 254,22 g/mol,
86195, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim
- TEMED** 99 %, p.a., f.d.Elektrophorese, C₆H₁₆N₂, 116,21 g/mol, Art.-Nr. 2367.3,
Carl Roth GmbH & Co.KG, D-76185 Karlsruhe
- Thimerosal** approx.98 % (HPLC), C₉H₉HgO₂, 404,8 g/mol, T-5125,
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim
- Trichloressigsäure** purum p.a., ≥99 % (T), C₂HCl₃O₂, 163,39 g/mol, 91232, Fluka,
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim
- Tris** Ultra Qualität, Pufferan®, ≥99,9 %, C₄H₁₁NO₃, 121,14 g/mol, Art.-Nr. 5429.3,
Carl Roth GmbH & Co.KG, D-76185 Karlsruhe

- Tris-HCl** $C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$, 157,6 g/mol, 93363, Fluka,
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim
- TRIzol® Reagent** Cat.No. 15596-018 Invitrogen, USA-Carlsbad
- Tween®20** SigmaUltra, $C_{58}H_{114}O_{26}$, P7949-500ml,
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim
- Vectastain® Rabbit IgG Elite ABC Kit** PK-6101,
Vector Laboratories, Inc., USA-Burlingame
- Vector® NovaRED™** Substrate Kit (For Peroxidase), SK-4800,
Vector Laboratories, Inc., USA-Burlingame
- Wasserstoffperoxid 30 %** medizinisch reinst, stabilisiert, H_2O_2 , 1.08597.2500,
Merck KGaA, D-64271 Darmstadt
- Xylol** (Isomerengemisch) zur Synthese, C_8H_{10} , 106,17 g/mol, 8.18754.2500,
Merck KGaA, D-64271 Darmstadt

A.2 Verbrauchsmaterialien

- Aluminiumfolie** Alu-Laborfolie, 45 cm breit, 0,03 mm stark, Art.-Nr. 60130,
MAGV GmbH, D-35466 Rabenau-Londorf
- beschichtete Objektträger** SUPERFROST® PLUS, ca. $25 \times 75 \times 1,0$ mm,
Art.No. J1800AMNZ, Menzel GmbH & Co.KG, D-38116 Braunschweig
- Deckgläser** für Mikroskopie, 22×22 mm, 24×40 mm, 24×50 mm,
Menzel GmbH & Co.KG, D-38116 Braunschweig
- Filterpapier** Munktell Paper Sheets, Grade: 1/F, 80 g/m², 200 x 250 mm,
Art.-No. 2.10130.2000 250, Munktell & Filtrak GmbH, D-09471 Bärenstein
- Filterpapier, dick** Mini Trans-Blot® Filter Paper, KatalogNr. 170 3932,
Bio-Rad Laboratories GmbH, D-80939 München
- fusselfreie Tücher** KimTech Science, Präzisionswischtücher,
Kimberley-Clark® Professional, UK-Surrey
- Klebefolie** PCR Sealers™ Microseal® 'B' Film, Cat.No. MSB1001,
Bio-Rad Laboratories GmbH, D-80939 München
- Kunststoff-Einmalküvette** UVette®, 220–1600 nm, Bestell-Nr. 0300 106.300,
Eppendorf AG, D-22331 Hamburg
- Kunststoffröhrchen** Reagenz- und Zentrifugenröhrchen mit Rundboden und Eindrückstopfen, 3,5 ml, 55,0 x 12,0 mm, PP, SARSTEDT AG & Co., D-51582 Nümbrecht

- Latexhandschuhe** Unigloves® Comfort, UNIGLOVES GmbH, D-53844 Troisdorf
- Lithium-Heparin-Röhrchen** Probenröhre mit rundem Boden und Eindrückstopfen,
4,5 ml, 75,0 × 13,0 mm, PP, Präparierung: Lithium-Heparin,
SARSTEDT AG & Co., D-51582 Nümbrecht
- Mikrotomklingen** Leica 819, Low Profile Microtome Blades,
Leica Microsystems GmbH, D-69226 Nussloch
- Nitril-Handschuhe** Nitrile Gloves N-DEX®, Best Manufacturing Company, USA-Menlo
- PapPen** Dako Pen, Delimiting Pen, S2002, Dako Deutschland GmbH, D-22038 Hamburg
- Papiertücher** wischfix, Haushaltstücher, Fripa Papierfabrik, D-63897 Miltenberg
- Parafilm®** "M" Laboratory Film, PM-996, American National Can™, USA-Menasha
- Pipettenspitzen** ratiolab®, 10 µl, 100 µl, 1000 µl, Ratiolab GmbH, D-63303 Dreieich
- Pipettenfilterspitzen** Filterspitze PP natur, oberflächenoptimiert, RNase-, DNA- und
Pyrogenfrei, steril, 0,5–10 µl, 07.602.5300 bzw. 0–100 µl, 07.642.5300
bzw. 100–1000 µl, 07.692.5300, nerbe plus GmbH, D-21423 Winsen/Luhe
- Pipettenfilterspitzen Gel-Load** filter tip GEL 20, Art.Nr. 775 288,
greiner bio-one GmbH, D-72636 Frickenhausen,
- Probenröhrchen** CELLSTAR® PP-Röhrchen, steril, 50 ml, 30,0/115 mm,
Cat.No. 210 261, greiner bio-one GmbH, D-72636 Frickenhausen,
- PVDF-Membran** Immobilon-P Transfer Membran, PVDF,
Millipore Corporation, USA-Bedford
- 0,5 ml-Reaktionsgefäß** PCR-Softtubes 0,5 ml, einzeln, Flachdeckel, Art.Nr. 711 098,
Biozym Scientific GmbH, D-31833 Hess.Oldendorf
- 1,5 ml-Reaktionsgefäß** DNA-, DNase-, RNase-frei, Polypropylen, Art.Nr. 710 340,
Biozym Scientific GmbH, D-31833 Hess.Oldendorf
- 2 ml-Reaktionsgefäß** DNA-, DNase-, RNase-frei, Polypropylen, Art.Nr. 710 328,
Biozym Scientific GmbH, D-31833 Hess.Oldendorf
- Schwammtücher** optiWisch, ALDI Einkauf GmbH & Co. oHG, D-45476 Mühlheim
- Skalpells** Typ22, steril, BB522, Aesculap AG, D-78532 Tuttlingen
- 15 ml-Tubes** nunc™ Disposable Conical Tubes, Cat.No. 366 060,
Nalge Nunc International, USA-New York
- 96-well-Platte** Thermo-Fast 96 Skirted PCR-Plate, ABgene® PCR Plates,
Cat# AB-0800-L, Thermo Fisher Scientific, D-63505 Langenselbold

A.3 Verwendete Geräte

Digitalkamera Ricoh Caplio GX, Ricoh International B.V., D-40472 Düsseldorf

Durchlichtmikroskop Leitz DM RB, Leica Microsystems, D-35578 Wetzlar

Einbettautomat Leica TP 1050, Leica Microsystems, D-35578 Wetzlar

Elektrophoresekammer EasyPhor Medi, Art.Nr. 615 162,

Biozym Scientific GmbH, D-31833 Hess.Oldendorf

Elektrophoresekammer Mighty Small™ II SE 260, Hoefer Inc., USA-San Francisco

Färbeschale und -gestell für Objektträger, aus Glas, inkl. Drahtbügel,

Assistent, D-38835 Osterode

Feuchte Kammer Frischhaltebox, ca. $25 \times 10 \times 3$ cm, Curver, L-4562 Niedercorn

Gießvorrichtung Mighty Small™ SE 245 Dual Gel Caster,

Hoefer Inc., USA-San Francisco

Glashomogenisator und Teflonpistill Homogenisatorgefäß 10 ml mit Teflonkolben,

zylindrisch, MAGV GmbH, D-35466 Rabenau-Londorf

Kameraaufsatz für Durchlichtmikroskop Leica DC300,

Leica Microsystems, D-35578 Wetzlar

Magnetrührer mit Heizplatte IKA-Combimag, Typ RET, Nr. 68012,

IKA®-Werke GmbH & Co.KG, D-79219 Staufen

Micropistill autoklavierbar, Bestell-Nr. 0300 120.973, Eppendorf AG, D-22331 Hamburg

Mikrowelle COMPACT Y50, Moulinex GmbH, D-42719 Solingen

Paraffinausgießstation Leica EG 1160, Leica Microsystems, D-35578 Wetzlar

pH-Meter inoLab pH Level 1, Ser.-Nr. 9949 0073,

mit pH-Elektrode SenTix 21 und Temperaturfühler TFK 325,

Wissenschaftlich technische Werkstätten WTW, D-82362 Weilheim

Pipetten eppendorf reference, variabel, 0,5–10 µl, 10–100 µl, 100–1000 µl,

Eppendorf AG, D-22331 Hamburg

Porzellanmörser und -pistill aus glasiertem Porzellan, Reibfläche rau, nach DIN 12906,

Carl Roth GmbH & Co.KG, D-76185 Karlsruhe

Power Supply 2301 Macrodrive 1, LKB Bromma, Schweden

Power Supply Electrophoresis Power Supply, EPS301,

Amersham Biosciences Europe GmbH, D-79111 Freiburg

Pumpe für Kühlung der Elektrophorese Thermomix 1419, Type 850 092,

B.Braun Melsungen AG, D-34212 Melsungen

- real-time PCR Cycler** CFX96™ Real-Time System: CFX96™ Optics Module und C1000™ Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories GmbH, D-80939 München
- Rotationsmikrotom** Leica RM 2125 RT, Leica Microsystems, D-35578 Wetzlar
- Rührwerk 1000rpm** IKA-Rührwerk Typ RW18, 25-2500UpM,
Jahnke & Kunkel GmbH & Co.KG, D-79219 Staufen
- Rütteltisch** KL2, Kombischüttler, Art.Nr. 6115 000,
Edmund Bühler GmbH, D-72379 Hechingen
- Schwenktisch** Heidolph Polymax 1040, No. 543.42 205.000,
Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, D-91126 Schwabach
- Tank-Blot-Apparatur** Mini Trans-Blot® Cell,
Bio-Rad Laboratories GmbH, D-80939 München
- Thermocycler** Biometra® T1, Serial No. 411 1392,
Biomedizinische Analytik GmbH, D-37079 Göttingen
- Tiefkühlschrank** HFU 686 Basic, –80 °C, Temp.Klasse N ISO 7371,
Kendro Laboratory Products, D-63450 Hanau
- Ultra Turrax®** IKA® T10 basic, Dispergierantrieb Nr. 3420 000 mit Dispergierwerkzeug
S10N-5G Nr. 3304 000, IKA®-Werke GmbH & Co.KG, D-79219 Staufen
- UV-Licht** Model UVGL-25, Mineralight® Lamp, UVP Inc., USA-San Gabriel
- UV-Photometer** BioPhotometer 6131 02801, Eppendorf AG, D-22331 Hamburg
- UV-Transilluminator** Gel-Dokumentationssystem, 312 nm, mit integrierter Kamera,
biostep GmbH, D-09387 Jahnsdorf
- Vakuumpumpe** VDE 0530, KNF Neuberger GmbH, D-79112 Freiburg
- Vortex** REAX Control, No. 541-110 00-00-0 bzw. REAX top, No. 541-100 00-00-0,
Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, D-91126 Schwabach
- Waage** Mettler PJ300 bzw. AE160, Mettler-Toledo GmbH, D-35353 Gießen
- Wärmeschrank** Typ B26, F-Nr. 840 073,
Memmert GmbH & Co.KG, D-91126 Schwabach
- Wasseraufbereitungsanlage** Milli-Q biocel, Millipore GmbH, D-65760 Eschborn
- Wasserbad** GFL® 1052, Gesellschaft für Labortechnik mbH, D-30938 Burgwedel
- Zentrifuge** Mikro 22R, Typ 1110, bis 18000 rpm,
Andreas Hettich GmbH & Co.KG, D-78532 Tuttlingen

A.4 Software

- Beacon Designer** Version 7.5, Design von Primer-Sonden-Systemen für die real-time PCR, PREMIER Biosoft International, USA-Palo Alto
- BibDesk** Version 1.5.4, Literaturverwaltung unter Mac OS X,
Open Source: <http://bibdesk.sourceforge.net>
- BLAST** Basic Local Alignment Search Tool, Onlineprogramm u. a. zum Abgleich von Nukleotidsequenzen mit Gendatenbanken, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>
- BMDP/Dynamics** Release 8.1, Statistische Auswertung der Ergebnisse,
Statistical Solutions Ltd., IE-Cork
- CFX Manager™** Version 1.0.1035.131, Programmierung des real-time Cyclers,
Bio-Rad Laboratories GmbH, D-80939 München
- ImageTool** Version 3.0, Bildbearbeitung, <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>,
University of Texas, Health Science Center, USA-San Antonio,
- Leica Image Manager IM1000** Version 1.20, Bildarchivierung- und bearbeitung,
Leica Microsystems, D-35578 Wetzlar
- Microsoft® Excel** 2004 für Mac OS X, Version 11.2, Tabellenkalkulationen und Erstellung graphischer Abbildungen, Microsoft Deutschland GmbH, D-85716 Unterschleißheim
- Oligo Explorer** Version 1.1.2, Design von Primern für die RT-PCR,
Freeware <http://www.genelink.com/tools/gl-oe.asp>
- Phoretix Grabber** Version 3.01, Dokumentation von Agarose-Gelen,
biostep GmbH, D-09387 Jahnsdorf
- TeXShop** Version 2.43, Bestandteil von MacT_EX, Textsatzsystem,
<http://www.tug.org/mactex>

A.5 Puffer und Lösungen

A.5.1 Probengewinnung und -konservierung

Bouin'sche Lösung, vor Gebrauch frisch anmischen

Pikrinsäure	15 ml
Formaldehydlösung min. 37 %	5 ml
Essigsäure	1 ml

Phosphatpuffer, 0,1 M

Stammlösung A, 4 °C

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	13,8 g
Aqua bidest	ad 1000 ml

Stammlösung B, 4 °C

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	17,8 g
Aqua bidest	ad 1000 ml

Gebrauchslösung, frisch anmischen

Stammlösung A	28,3 ml
Stammlösung B	71,1 ml

A.5.2 HE-Färbung und Immunhistochemie

Citratpuffer, 10 mM, pH 6,0

Stammlösung A, 0,1 M Citronensäure, 4 °C

$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	21,02 g
Aqua bidest	ad 1000 ml

Stammlösung B, 0,1 M Natriumcitrat, 4 °C

$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	29,41 g
Aqua bidest	ad 1000 ml

Gebrauchslösung, frisch anmischen

Stammlösung A	9 ml
Stammlösung B	41 ml
Aqua bidest	450 ml

1 %-iges Eosin

Eosin gelblich	2 g
Aqua bidest	200 ml
Essigsäure	2 Tropfen

96 %-iges Ethanol

Ethanol $\geq 99,8\%$	96 ml
Aqua bidest	4 ml

80 %-iges Ethanol

Ethanol $\geq 99,8\%$	80 ml
Aqua bidest	20 ml

70 %-iges Ethanol

Ethanol $\geq 99,8\%$	70 ml
Aqua bidest	30 ml

60 %-iges Ethanol

Ethanol $\geq 99,8\%$	60 ml
Aqua bidest	40 ml

50 %-iges Ethanol

Ethanol $\geq 99,8\%$	50 ml
Aqua bidest	50 ml

Hämatoxylin (1:1)

Hämatoxylin-Lösung	25 ml
Aqua bidest	25 ml

Hämatoxylin (1:8)

Hämatoxylin-Lösung	20 ml
Aqua bidest	160 ml

1×PBS-Puffer, vor Gebrauch frisch ansetzen

20×PBS-Puffer	50 ml
Aqua bidest	ad 1000 ml

20×PBS-Puffer

NaCl	160 g
Na ₂ HPO ₄	29,25 g
KH ₂ PO ₄	4,9 g
Aqua bidest	ad 1000 ml

0,1 %-iger PBST-Puffer, vor Gebrauch frisch ansetzen

1×PBS-Puffer	1000 ml
Tween [®] 20	1 ml

3 %-iges Wasserstoffperoxid in Methanol, frisch ansetzen

Wasserstoffperoxid 30 %	15 ml
Methanol	150 ml

A.5.3 Protein-Extraktion und Western Blot**10 % APS, vor Gebrauch frisch ansetzen**

Ammoniumperoxodisulfat	0,1 g
Aqua bidest	1 ml

Complete Mini-stock solution, bei 4 °C max. 2 Wochen haltbar

Complete Mini	1 Tablette
Aqua bidest	1 ml

1×Elektrodenpuffer, vor Gebrauch frisch ansetzen

Rotiphorese [®] 10×SDS-PAGE	40 ml
Aqua bidest	ad 400 ml

NET-2-Gebrauchslösung, vor Gebrauch frisch anmischen

NET-2-Puffer	200 µl
Complete Mini-stock solution	35 µl

NET-2-Puffer, pH 7,4 mit 4 N HCl einstellen, 4 °C

NaCl	4,38 g
Tris-HCl	1,97 g
Nonidet P-40	125 µl
Aqua bidest	ad 250 ml

PBS-Blotto, vor Gebrauch frisch ansetzen

Magermilchpulver	5 g
2 % Thimerosallösung	1 ml
1×PBS-Puffer	ad 100 ml

1×PBS-Puffer, vor Gebrauch frisch ansetzen

10×PBS-Stammlösung	100 ml
Aqua bidest	ad 1000 ml

10×PBS-Stammlösung

NaCl	80 g
Na ₂ HPO ₄	11,5 g
KH ₂ PO ₄	2 g
KCl	2 g
Aqua bidest	ad 1000 ml

0,2 %-iger PBST-Puffer, vor Gebrauch frisch ansetzen

1×PBS-Puffer	1000 ml
Tween®20	2 ml

Ponceau-S-Arbeitslösung, vor Gebrauch frisch ansetzen

Ponceau-S-Stammlösung	1 ml
Aqua bidest	9 ml

Ponceau-S-Stammlösung

Ponceau-S	2 g
Trichloressigsäure	30 g
5-Sulfosalicylsäure-Dihydrat	30 g
Aqua bidest	ad 100 ml

Probenauftragungspuffer, –20 °C

Sammelgelpuffer	1,75 ml
Glycerin	1,5 ml
10 % SDS-Stammlösung	5 ml
2-Mercaptoethanol	0,5 ml
Bromphenolblau	1,25 ml

Protease-Inhibitor-Cocktail, vor Gebrauch frisch anmischen

1×PBS-Puffer	10 ml
Complete Mini	1 Tablette

Sammelgel 5 %-ig

Rotiphorese® Gel30	0,417 ml
Sammelgelpuffer	0,313 ml
Aqua bidest	1,731 ml
10 % SDS-Stammlösung	25 µl
10 % APS	13 µl
TEMED	3 µl

Sammelgelpuffer, 0,5 M Tris, pH 6,8 mit 4 N HCl einstellen

Tris	7,88 g
Aqua bidest	ad 100 ml

10 % SDS-Stammlösung

Sodiumdodecylsulfat	10 g
Aqua bidest	ad 100 ml

2 % Thimerosal-lösung, 4 °C

Thimerosal	2 g
Aqua bidest	100 ml

Transferpuffer, vor Gebrauch frisch ansetzen

Tris	3,03 g
Glycin	14,4 g
Methanol	100 ml
Aqua bidest	ad 1000 ml

Trenngel 7,5 %-ig (P450scc, P450c17)

Rotiphorese® Gel30	1,875 ml
Trenngelpuffer	2,813 ml
Aqua bidest	2,672 ml
10 % SDS-Stammlösung	75 µl
10 % APS	60 µl
TEMED	6 µl

Trenngel 10 %-ig (StAR-Protein)

Rotiphorese® Gel30	2,5 ml
Trenngelpuffer	2,813 ml
Aqua bidest	2,047 ml
10 % SDS-Stammlösung	75 µl
10 % APS	60 µl
TEMED	6 µl

Trenngelpuffer, 1,5 M Tris, pH 8,8 mit 4 N HCl einstellen

Tris	23,64 g
Aqua bidest	ad 100 ml

Tris-Sucrose-Puffer, vor Gebrauch frisch anmischen

Tris-Sucrose-Stammlösung	8 ml
Complete Mini	1 Tablette

Tris-Sucrose-Stammlösung, pH 7,4 mit 4 N HCl einstellen, 4 °C

Tris	0,607 g
Sucrose	42,79 g
Aqua bidest	ad 500 ml

A.5.4 RNA-Isolierung und PCR**1×TBE-Puffer, vor Gebrauch frisch ansetzen**

10×TBE-Puffer	10 ml
Aqua bidest	ad 100 ml

10×TBE-Puffer

Tris	108 g
Borsäure	55 g
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	40 ml
Aqua bidest	ad 1000 ml

2 %-iges Agarose-Gel

Agarose	1,82 g
1×TBE-Puffer	91 ml
GelRed™	8,0 µl

DEPC-Wasser, über Nacht 37 °C, dann autoklavieren

Aqua bidest	1000 ml
DEPC	1 ml

Primer-Arbeitslösung, 20 pmol/µl, –20 °C

Primer-Stammlösung (100 pmol/µl)	10 µl
DEPC-Wasser	40 µl

Primer-Mix, –20 °C

Primer-Arbeitslösung (Forward-Primer)	20 µl
Primer-Arbeitslösung (Reverse-Primer)	20 µl

TE-Puffer, pH 8,0 mit 4 N HCl einstellen

Tris	1,21 g
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	2 ml
Aqua bidest	ad 1000 ml

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Besonders hervorzuheben ist dabei Herr Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann, dem ich für die Überlassung des Themas sowie für seine umfassende Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Anfertigung dieser Arbeit danken möchte. Vielen herzlichen Dank für Ihre stete Diskussionsbereitschaft und Geduld, Professor Hoffmann!

Ein herzliches Dankeschön geht an Frau Dr. S. Goericke-Pesch für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die vielen, erfrischenden Hundespaziergänge.

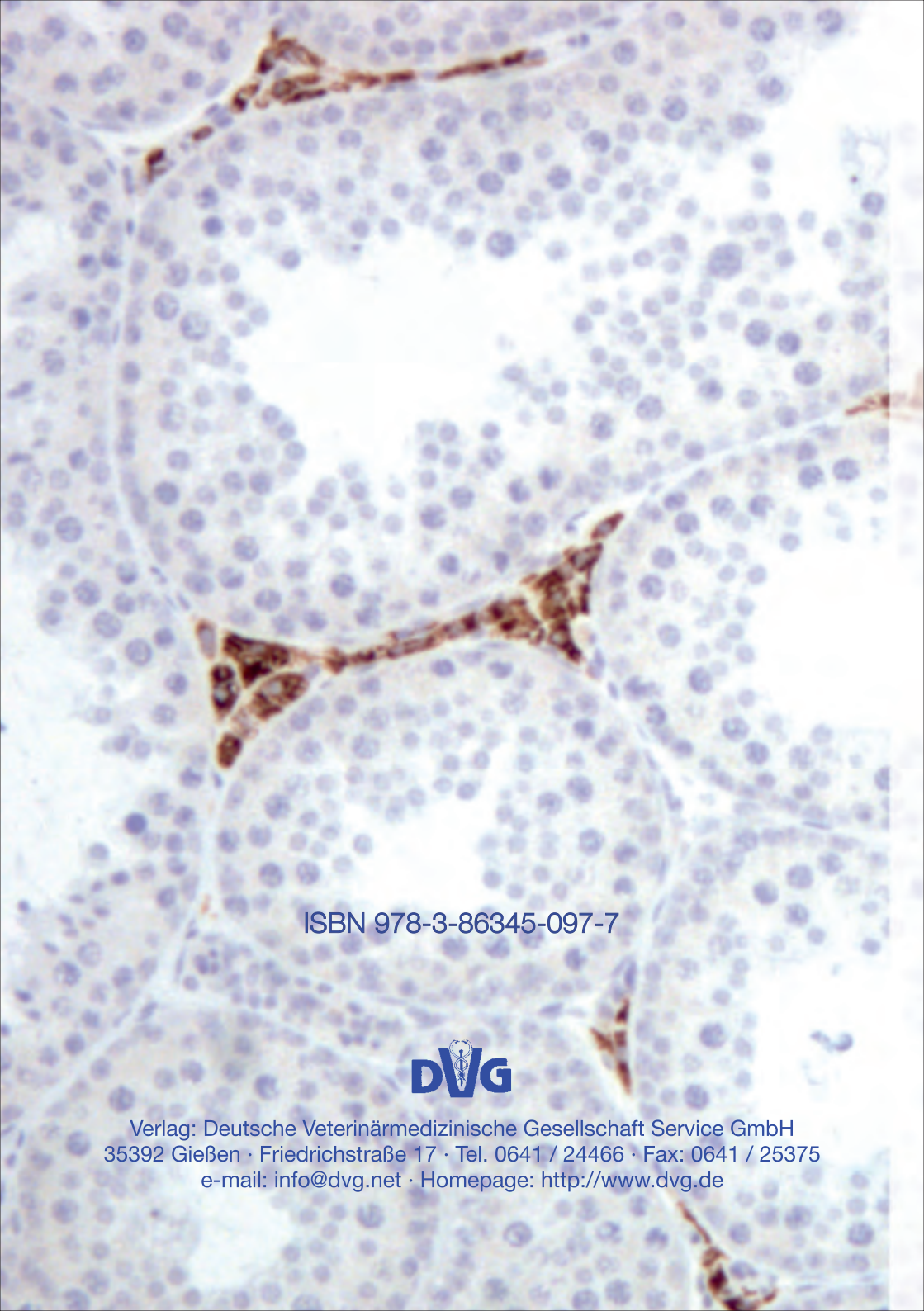
Meinen Kollegen und Mit-Doktoranden an der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere der Justus-Liebig-Universität Gießen, im Speziellen Frau A. Spang, Frau Dr. S. Shenavai und Herrn Dr. M. Keßler, danke ich für methodische Einarbeitung, das angenehme Arbeitsklima und die lustige Zeit im Labor. Vielen Dank für Eure Freundschaft!

Mein Dank gilt außerdem:

- Herrn W. Damm und Frau S. Feller vom Endokrinologischen Labor der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere der Justus-Liebig-Universität Gießen für die Durchführung der Hormonanalytik
- Herrn Prof. Dr. M. Bergmann und Herrn Prof. Dr. R. Brehm aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie, und -Embryologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen für die vielen fachlichen Anregungen
- der Firma Intervet Pharma R&D, Angers Technopole, Frankreich für die Zurverfügungstellung der „Gonazon®“-Implantate
- Frau Dr. G. Itter von Sanofi-Aventis, Frankfurt für die Bereitstellung der Beagle-Rüden
- Herrn Prof. Dr. D. M. Stocco, Texas Tech University Health Science Center, Lubbock, Texas, USA und Herrn Prof. Dr. A. Conley, UC Davis, California, USA für die Überlassung der Antikörper für die immunhistochemischen Untersuchungen

- dem Institut für Veterinär-Pathologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, insbesondere Herrn Dr. K. Köhler und Frau C. Borschensky, die immer mit Rat und Tat zur Seite standen
- Frau Dr. R. G. Özalp von der Klinik für Geburtshilfe und Gynäkologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Uludag Universität in Bursa, Türkei für die freundliche Zusammenarbeit und die Gewinnung der juvenilen Hoden
- Herrn Dr. K. Failing und Frau M. Sparenberg von der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen für ihre Hilfestellung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse
- Frau A. Brückner für's finale Korrekturlesen

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann Dominic, der mich mit viel Geduld und Verständnis während der ganzen Zeit der Anfertigung dieser Arbeit motiviert hat und mir den Rücken gestärkt hat. DANKE !

A microscopic image of tissue, likely a histological section, showing numerous small, round, purple-stained cells (nuclei) arranged in a regular pattern. Several elongated, brown-stained structures are visible, possibly representing blood vessels or connective tissue. The overall appearance is that of a well-organized tissue section.

ISBN 978-3-86345-097-7



Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Friedrichstraße 17 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375
e-mail: info@dvg.net · Homepage: <http://www.dvg.de>