

Aus dem
Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik
der Universität Hohenheim
Lehrstuhl für Anatomie und Physiologie der Haustiere
Univ.-Prof. Dr. med. vet. W. M. Amselgruber

Eingereicht über die
chirurgische und gynäkologische Kleintierklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Univ.-Prof. Dr. med. vet. J. Braun

Saisonale Einflüsse auf die Morphologie des Hodens beim Hengst
- Eine histologische und immunhistochemische Studie -

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Juliane Höffner
aus
Berlin

München 2008

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Braun
Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Wanke

Tag der Promotion: 18. Juli 2008

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN-13: 978-3-86664-450-2

Zugl.: München, Univ., Diss., 2008

Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written
authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© **mensch und buch verlag** 2008 Nordendstr. 75 - 13156 Berlin – 030-45494866
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	2
2.1	Ontogenese.....	2
2.1.1	Pränatale Entwicklung.....	2
2.1.2	Postnatale Entwicklung.....	4
2.2	Makroskopische Anatomie.....	6
2.3	Mikroskopische Anatomie.....	6
2.3.1	Struktur und Funktion.....	6
2.3.2	Keimepithelzyklus.....	11
2.4	Bedeutung des Melatonins in der saisonalen Fortpflanzung beim Pferd.....	15
2.5	Steroidhormone und Rezeptoren.....	18
2.5.1	Übersicht.....	18
2.5.2	Androgene und Androgenrezeptor.....	21
2.5.3	Progesteron und Progesteronrezeptor (PR).....	22
2.5.4	Östrogene und Östrogenrezeptoren α (ER α) und β (ER β).....	23
2.6	Cytochrom-P450-Aromatase (P450-Arom).....	25
2.7	Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA).....	26
2.8	α -smooth muscle actin (α -SMA).....	27
3	Material und Methoden	29
3.1	Untersuchungsmaterial.....	29
3.2	Probenentnahme und Probenaufbereitung.....	29
3.3	Lichtmikroskopie und Immunhistochemie.....	30
3.4	Auswertung und Histometrie.....	32
4	Ergebnisse	34
4.1	Histomorphologie.....	34
4.2	Immunhistochemie.....	41
4.2.1	Androgenrezeptor (AR).....	41
4.2.2	Progesteronrezeptor (PR).....	44
4.2.3	Östrogenrezeptor (ER).....	46
4.2.4	P450-Aromatase (P450-Arom).....	48
4.2.5	Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA).....	49
4.2.6	α -smooth muscle actin (α -SMA).....	52

5	Diskussion	54
6	Zusammenfassung	62
7	Summary	64
8	Verzeichnisse	66
8.1	Literaturverzeichnis	66
8.2	Abkürzungsverzeichnis	86
8.3	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	88
9	Anhang	91
10	Danksagung	94

1 Einleitung

Pferde haben im Gegensatz zu den Nutztierarten Schwein und Rind im Laufe der Domestikation ihr jahreszeitlich geprägtes Fortpflanzungsverhalten noch nicht vollständig verloren. Die Belegung der Stuten wird daher vorwiegend im Frühjahr und Sommer vorgenommen, während demgegenüber viele Hengste ganzjährig im Dienste der Samengewinnung für die züchterische Nutzung stehen.

Die dabei von verschiedenen Untersuchern beobachteten jahreszeitlichen Schwankungen in der Spermaqualität werfen die Frage nach einem möglichen saisonalen Einfluss auf die Hodenmorphologie auf.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, mit Hilfe morphologischer und immunhistochemischer Methoden, saisonale Einflüsse auf die Hodenstruktur und auf das Expressionsmuster fruchtbarkeitsrelevanter Steroidhormonrezeptoren im Hengsthoden zu untersuchen. Hierbei wurde insbesondere auf Veränderungen in den unterschiedlichen Keimepithelstadien geachtet und darüber hinaus morphometrische Untersuchungen und Proliferationsstudien vorgenommen.

Zusammenfassend zeigt die Studie, dass saisonale Unterschiede sowohl in der Hodenmorphologie, als auch im Expressionsmuster verschiedener Steroidhormonrezeptoren beim Hengst bestehen.

2 Literaturübersicht

2.1 Ontogenese

2.1.1 Pränatale Entwicklung

Das genetische Geschlecht wird zum Zeitpunkt der Befruchtung durch die Kombination der elterlichen Geschlechtschromosomen determiniert. Für das männliche Geschlecht steht die Kombination von einem X- mit einem Y-Chromosom und für das weibliche die Kombination von zwei X-Chromosomen. Die Entwicklung der Geschlechtsorgane als geschlechtlich indifferente Anlagen wird eingeleitet durch Proliferation des Zoelomepithels und Verdichtung des darunter liegenden Mesenchyms, wodurch die Keimleisten entstehen. Diese liegen beiderseits der Medianlinie zwischen Urniere und dem dorsalen Mesenterium und erstrecken sich von der Herzregion bis in die Nähe der Kloake. Beim Pferd treten die Keimleisten bereits bei Embryonen mit einer Scheitel-Steißlänge (SSL) von 12 mm auf (Rüsse, 1998). Nur der mittlere Abschnitt der Keimleisten differenziert sich zur Keimdrüse, in die die Primordialkeimzellen (PKZ) über den Dottersack einwandern. Während dieser Wanderung teilen diese sich mehrfach. PKZ unterscheiden sich von übrigen Körperzellen durch ihre Größe, ihre rundliche Form, einen deutlich basophil begrenzten Zellkern mit prominentem Nukleolus, sowie ihren hohen Gehalt an alkalischer Phosphatase (Chiquoine, 1954).

Die in das Oberflächenepithel einwandernden PKZ induzieren die Entwicklung der primitiven Keimstränge. Durch den engen Kontakt der PKZ mit Zellen der Keimstränge (Präsertolizellen) beginnt die erste histologische Differenzierung der Gonadenanlage (Byskov und Høyer, 1988). Später vergrößern sich die Keimstränge und wachsen tief ins Mark der Keimdrüsenanlage ein. Die Keimstränge verlieren den Kontakt zum Oberflächenepithel und es entsteht die primitive *Tunica albuginea*. Mit deren Entstehung lässt sich der Hoden beim Pferd bereits ab dem 45. Tag der Gravidität (Knospe, 1998) lichtmikroskopisch identifizieren.

Beim männlichen Embryo sind an der Gonadenstrangbildung außerdem noch eingewanderte Zellen aus dem Urnierenblastem beteiligt, die sich außen an die Gonadenstränge anlagern und sich später zu peritubulären Myoblasten differenzieren.

Gleichzeitig modelliert sich aus mesonephrogenen Zellen das *Reteblastem* heraus, das sich zum *Rete testis* ausdifferenziert und später mit den Hodenkanälchen verschmilzt. Im Verschmelzungsbereich zwischen Retekanälchen und den gewundenen Samenkanälchen

(*Tubuli seminiferi contorti*) entstehen die geraden Samenkanälchen (*Tubuli seminiferi recti*). Die sich an das *Rete testis* anschließenden *Ductuli efferentes testis*, bei denen es um erhalten gebliebene exkretorische Kanälchen der Urniere handelt, stellen die Verbindung zum Wolffschen Gang dar.

In den frühen Stadien, bestehen die noch soliden Hodenkanälchen aus Primordialkeimzellen und Präsertolizellen. Die begleitenden Präsertolizellen sind aus undifferenzierten Vorläuferzellen des Zoelomepithels entstanden. Sie bilden das Anti-Müller-Hormon, das für die Rückbildung der Müllerschen Gänge bei männlichen Feten verantwortlich ist.

Die PKZ teilen sich mitotisch und differenzieren sich über Gonozyten und Praespermatogonien zu Spermatogonien. Die zyklisch ablaufenden Samenbildungsprozesse laufen erst mit Eintritt in die Meiose ab (Rüsse und Sinowatz, 1998).

Beim Pferd sollen sich die fetalen Leydig-Zellen aus den proximalen Urnientubuli im Mesenchym zwischen den Samenkanälchen (Knospe, 1998) entwickeln. Ihre Hauptaufgabe ist die Synthese des für die Entwicklung und Wachstum vom männlichen Organismus erforderlichen Testosterons. Beim Pferd proliferieren die Leydig-Zellen während der fetalen Entwicklung unter dem Einfluss der mütterlichen Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG)-Sekretion sehr stark und erreichen durch Hypertrophie ihre maximale Größe am 250. Tag der Trächtigkeit (Hay und Allen, 1975). Folglich hält die Proliferation über die Zeit der PMSG-Bildung vom 35. - 40. bis zum 130. -180. Tag hinaus an. Bis zur Geburt degenerieren 80 % der Zwischenzellen (Knospe, 1998) und die Gonaden reduzieren sich auf ein Achtel ihrer ursprünglichen Größe (MacArthur et al., 1967). Die fetalen Leydig-Zellen werden nicht als Vorläuferzellen der adulten Leydig-Zellen angesehen, da sie atrophieren und sich postnatal nicht mehr teilen. Die Zahl der fetalen Leydig-Zellen nimmt zum Ende der Trächtigkeit hin ab. Eine zweite Generation tritt um die Geburt herum auf und wird post natum erneut rückgebildet. Erst zur Pubertät hin entwickelt sich eine dritte Generation (Rüsse, 1998).

Das von den Leydig-Zellen produzierte Testosteron fördert die Entwicklung der Wolffschen Gänge zu Nebenhoden, Samenleiter und Bläschendrüse. Das durch das Enzym 5-a-Reduktase aus Testosteron gebildete 5-a-Dihydrotestosteron (DHT) regt die Entwicklung und Differenzierung der äußeren Geschlechtsorgane (Skrotum, Penis) an. Beide Hormone binden an den gleichen Rezeptor und benötigen demnach einen intakten Androgen-Rezeptor (AR), um die Entwicklung des männlichen Genitale voranzutreiben (Quigley et al., 1995).

Der fetale Hodenabstieg der Lumbalgegend (ventro-medial der Urniere) in das künftige Skrotum ist auf eine Kombination von Wachstumsprozessen und hormonellen Einflüssen zurückzuführen. Dabei spielt das *Gubernaculum testis* eine entscheidende Rolle. Dieses entsteht aus dem distalen Gonadenband, nachdem sich die Urniere zurückgebildet hat. Kranial hat es seinen Ursprung am Testis und inseriert an der Region des Genitalwulstes (künftiges Skrotum). Zeitgleich entsteht beim Inguinalkanal entlang des distalen Gonadenbandes eine Ausstülpung des Peritoneums, der *Processus vaginalis*. Das *Gubernaculum* verkürzt sich und verlagert *Testes*, *Ductus deferentes* und Gefäße in die Leistengegend. Dabei gleiten die Hoden, im *Processus vaginalis*, durch den Inguinalkanal. Der Deszensus des Hodens beginnt beim Pferd am 45. Tag der Gravidität. Die Hoden sind um den 270. Tag (Noden und De Lahunta, 1985) im Inguinalkanal zu finden und kurz vor der Geburt ins Skrotum abgestiegen.

2.1.2 Postnatale Entwicklung

Ähnlich wie beim Bullen beschrieben (Sinowatz und Amselgruber, 1986), verschiebt sich nach der Geburt das Verhältnis von interstitiellem Gewebe zu Samenkanälchen aufgrund der Längen- und Querschnittszunahme der Samenkanälchen zugunsten dieser.

Die Größenzunahme der Samenkanälchen resultiert dabei aus der Proliferation von Sertoli-Zellen und Keimzellen. Mit Beginn der Pubertät verschiebt sich auch das Verhältnis von Sertoli-Zellen zu Keimzellen zugunsten der Keimzellen. Johnson und Thompson (1983) weisen zudem darauf hin, dass die Sertolizellzahl bis zu einem Alter von vier bis fünf Jahren kontinuierlich zunimmt und danach stabil bleibt.

Die postnatale Entwicklung der Samenkanälchen ist dadurch gekennzeichnet, dass sie sich radiär zur Oberfläche schlängeln, von den äußeren Abschnitten ausgehend schrittweise ein Lumen ausbilden und sich über zentrale Enden mit dem *Reteblastem* verbinden. Mit Eintritt in die Pubertät sind die Samenkanälchen vollständig kanalisiert.

Das gering ausgebildete *Mediastinum testis* ist beim einjährigen Pferd vom Hodenzentrum bis in die *Extremitas capitata* nachgewiesen und wird in Folge des Hodenwachstums beim Zweijährigen nur noch im Bereich der *Extremitas capitata* aufgefunden.

Während der postnatalen Entwicklung sind die interstitiellen Zwischenräume zunächst schmal und hauptsächlich mit undifferenzierten, spindelförmigen Zellen (unreife Leydig-Zellen) besetzt. In der weiteren Entwicklung sind um die Samenkanälchen herum vollentwickelte, funktionstüchtige Leydig-Zellen angeordnet (Almahbobi et al., 1988) und auch

das Verhältnis von Leydig-Zellen zu Samenkanälchen verschiebt sich später von 1: 12 bei zwei- bis dreijährigen Hengsten auf 1: 4 bei Hengsten zwischen 13 und 20 Jahren (Johnson und Neaves, 1981).

Die Induktion der Spermatogenese erfolgt nach Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse und unter Einfluss vom Follikelstimulierenden Hormon (FSH) und Testosteron (Naden et al., 1990). Beim Hengst ist die Geschlechtsreife mit großen individuellen Schwankungen je nach Rasse im Alter zwischen zwölf und 24 Monaten (Aurich, 2005) gegeben.

2.2 Makroskopische Anatomie

Die Hoden (*Testes, Orchis*) zusammen mit den Nebenhoden (*Epididymidis*) liegen beim Hengst außerhalb des Körpers in der Leistengegend. Sie sind von gedrungener, eiförmiger Gestalt und ihre Längsachse ist nahezu horizontal ausgerichtet. Der Nebenhoden wird in folgenden Abschnitte strukturiert: *Caput, Corpus* und *Cauda epididymidis*. Sich am Nebenhoden orientierend, wird auch der Hoden in Kopf- und Schwanzende unterteilt. Der *Margo epididymidis* weist kaudodorsal und der *Margo liber* nach kranioventral. Warmblut- und Vollbluthengste haben eine durchschnittliche Hodenlänge von 9,2 bis 9,5 cm und eine Breite von 4,8 bis 5,5 cm (Weitze, 2001). Das Gewicht des Hodens beim Pferd liegt rasse- und altersabhängig zwischen 150 bis 300 Gramm (Sinowatz, 2001).

Die Hoden befinden sich im Hodensack (*Scrotum*). Dieser stellt eine Ausstülpung der Haut dar und besteht aus vier Schichten:

1. der eigentlichen Haut, die viele Schweißdrüsen enthält,
2. der *Tunica dartos*, in der viele glatte Muskelzellen zu finden sind,
3. dem lockeren Bindegewebe und
4. der *Tunica vaginalis parietalis*.

Die Versorgung von Hoden und Nebenhoden erfolgt über Arterie (A.) und Vene (V.) *testicularis* und vegetative Nervenfasern.

2.3 Mikroskopische Anatomie

2.3.1 Struktur und Funktion

Jeden Hoden umgibt eine bindegewebige Hodenkapsel (*Tunica albuginea*). Von dieser ziehen etwa 3 mm dicke Bindegewebssepten (*Septula testis*) in das Hodenparenchym und unterteilen es in Hodenläppchen (Kuhrau, 1993). Zentral treffen die Bindegewebssepten aufeinander und bilden das *Mediastinum testis*. Dieses beschränkt sich mit dem darin enthaltenen Hodennetz (*Rete testis*) beim Hengst nur auf die *Extremitas capitata* (Amann et al., 1977) Das ist die Stelle, an der die *Ductuli efferentes* durch die *Tunica albuginea* hindurch das *Rete testis* verlassen (Schummer und Vollmerhaus, 1995).

Besonders die starke Zwischenzellbildung in der frühembryonalen Phase wird als Ursache für die geringe Ausbildung des *Rete testis* angesehen (Knospe, 1998).

In jedem Hodenläppchen (*Lobulus testis*) finden sich beim Hengst ein bis fünf gewundene Samenkanälchen (*Tubuli seminiferi contorti*). Zwischen den Samenkanälchen befinden sich Leydig-Zellen, peritubuläre Myozyten sowie Blut- und Lymphgefäße. Das Interstitium schließt darüber hinaus Makrophagen, Lymphozyten und mit zunehmendem Alter Mastzellen (Hedger, 1997) mit ein.

Die tubuläre Komponente macht beim Pferd 70 %, der Gefäß-Bindegewebs-Apparat 20 % und die Leydig-Zellen 10 % des Hodengewebes aus (Smollich, 1992). Im interlobulären Gewebe dominieren die Leydig-Zellen. Diese in Gruppen, Strängen oder isoliert liegenden Zellen sind polygonal, haben einen Durchmesser von 10-30 µm und einen runden Kern. Die ein bis zwei Nukleoli sind gut ausgebildet. Form und Größe der Zellen sind abhängig von der hypophysären Stimulation durch das luteinisierende Hormon (Tonutti, 1953). Dominierende Zellorganellen wie ein dichtgepacktes, tubuläres, glattes endoplasmatisches Retikulum (sER), Mitochondrien vom Tubulus-Typ, ein großer Golgi-Apparat, zahlreiche Lysosomen und Lipideinschlüsse weisen auf eine ausgeprägte Steroidsynthese hin. Zudem produzieren equine Leydig-Zellen neben Androgenen, auch verstärkt Östrogene. Johnson und Thompson (1986, 1987) weisen darauf hin, dass beim Hengst sowohl die Anzahl der Leydig-Zellen als auch ihr Gehalt an glattem ER zwischen den Jahreszeiten deutlich variiert.

Die Samenkanälchen machen beim Hengst 61,3 % des Hodenvolumens aus und weisen eine Gesamtlänge pro Hoden von 2419 m auf (Swierstra et al., 1974). Die an den beiden Enden offenen Samenkanälchen haben einen Durchmesser von 130 bis 300 µm. Das Kaliber der am Anfangsabschnitt mehr oder weniger erweiterten *Tubuli seminiferi recti* geht auf Durchmesserwerte um 50-100 µm zurück. Das annähernd isoprismatische Epithel der *Tubuli recti* ist mit einem spärlichen Mikrovillibesatz ausgestattet. Die vom Keimepithel ausgekleideten *Tubuli seminiferi contorti* stellen kleine, vielfach gewundene Kanälchen dar, die von einer Basalmembran umgeben werden. Unmittelbar benachbart liegen peritubuläre Myozyten, denen sich kollagene und elastische Fasern anschließen. Die peritubulären Myozyten enthalten zahlreiche Aktinfilamente, sind kontraktile und unterstützen daher den Transport der Spermien (Maekawa et al., 1996). Sie sorgen zudem für die Integrität der Samenkanälchen und sind Bestandteil der Blut-Hoden-Schranke.

Neben den sich entwickelnden Keimzellen findet man in den Samenkanälchen Sertoli-Zellen, die früher als Ammenzellen beschrieben wurden (Sertoli, 1865). Auffällig ist ihr Zelleib mit ausgeprägten Falten, Einstülpungen und Fortsätzen, der sämtliche Keimzellpopulationen umschließt (Abb. 1). Der sehr stark eingebuchtete Zellkern ist basal

lokalisiert, ebenso wie die zahlreichen Mitochondrien (Aumüller, 1978). Im Zytoplasma verteilt befindet sich rauhes, relativ ribosomenarmes ER sowie unterschiedliche Mengen von glattem ER. Der in der Sertoli-Zelle befindliche Golgi-Apparat ist in mehrere Diktyosomen aufgegliedert, die aus flachen Zisternen und wenigen angelagerten Bläschen bestehen. Des Weiteren findet man Mikro- und Intermediärfilamente, Mikrotubuli, Lysosomen, Peroxisomen, und paraplastische Einlagerungen, wie Lipopigmente und Lipofuscin. Ektoplastische Spezialisierungen dienen der festen Verbindung mit elongierten Spermatisden. Die Verbindungsstellen bestehen aus endoplasmatischem Retikulum, das sich mantelartig über den Spermatisdenkopf legt. Abgelöst werden sie von tubulobulbären Komplexen, die zwischen den Sertoli-Zellen und den Spermatisden bestehen und dynamischen Veränderungen während der Phasen des Keimepithelzyklus unterliegen (Russell, 1979; Sinowatz und Amselgruber, 1988). Mit ihrer Hilfe wird die Aufnahme von überschüssigem Zytoplasma und Zellmembranbestandteilen (sog. Residualkörperchen) durch die Sertoli-Zelle erleichtert (Kojima, 1990). Residualkörperchen, die nach der Spermiation anfallen, werden mit Hilfe lysosomaler Enzyme abgebaut.

Sertoli-Zellen sind multifunktionell und besitzen nutritive, protektive, steuernde und koordinierende Eigenschaften. Sertoli-Zellen sezernieren Glykoproteine, die sich in vier Gruppen unterteilen lassen und unterschiedliche Aufgaben erfüllen (Griswold, 1995). Die erste Gruppe bilden die Transport- und Schutzproteine, wie z.B. Metalltransportproteine. Für die zweite Gruppe sind die Proteasen und Proteaseninhibitoren zu nennen, die Bedeutung bei Umbauprozessen während der Spermiation und dem Transport der präleptotänen Spermatozyten ins adluminales Kompartiment haben. Die dritte Gruppe stellen die Glykoproteine, aus denen die Basalmembran zwischen Sertoli-Zellen und peritubulären Myozyten gebildet wird. Letztendlich sezernieren Sertoli-Zellen regulative Glykoproteine, die als Wachstumsfaktoren oder parakrine Faktoren wirken und zu denen das Anti-Müller-Hormon und Inhibin zählen. Mit Hilfe von Bindungsproteinen werden Lipidvorläufer und essentielle Fettsäuren zwischen den Sertoli-Zellen und den Keimzellen transportiert, die für das rasche Wachstum der Keimzellpopulation während der Spermatogenese erforderlich sind (Guraya, 1995).

Für den Transport von Vitaminen, wie z.B. Folsäure, Biotin und Retinoid, die für die Entwicklung der Keimzellen essentiell sind, stellen Sertoli-Zellen entsprechende vitaminbindende Proteine bereit (Kim und Wang, 1993).

Sertoli-Zellen bilden darüber hinaus den wichtigsten Abschnitt der Blut-Hoden-Schranke. Diese besteht aus mächtig ausgebildeten Tight junctions zwischen benachbarten Sertoli-

Zellen (Nagano und Suzuki, 1978) und unterteilt das Samenkanälchen in ein basales und ein adluminales Kompartiment. Substanzen, die die Zellzwischenräume zwischen den Myozyten passieren, werden von den Tight junctions abgehalten, so dass Substanzen, die zu den späteren Stadien der Keimzellen gelangen sollen, daher erst das Zytoplasma der Sertoli-Zellen passieren müssen. Die Blut-Hoden-Schranke dient dem Schutz der sich entwickelnden Keimzellen vor schädigenden Einflüssen aus dem Blut. Dazu sind nicht nur ankommende Noxen, sondern auch Zellen des Immunsystems hinzuzurechnen. Da die Entwicklung und Reifung des Immunsystems der einsetzenden Keimzellreifung zeitlich vorausgeht, würden die Zellen des Immunsystems neu exprimierten Antigene, die mit Beginn der Meiose auftreten, als fremd erkennen. Dennoch werden diese neuen Autoantigene innerhalb des Tubulus toleriert und geschützt (Tung et al., 1981). Dieses immunologische Privileg ist eine Anpassung, um ein Gewebe mit begrenzter Regenerationsfähigkeit vor Funktionsverlust zu schützen (Fijak und Meinhardt, 2006). Die Permeabilität der Blut-Hoden-Schranke ist unabhängig von dem Stadium des Keimepithelzyklus (Dym und Fawcett, 1970).

Bedeutung haben die Sertoli-Zellen auch im Transport der unbeweglichen Keimzellen. Dazu sezernieren sie eine intratubuläre Flüssigkeit, mit deren Hilfe die Spermien transportiert werden. Sie kontrollieren die Ionenmischung der Kanälchenflüssigkeit und sezernieren eine Vielzahl von kleinen Molekülen, wie Inositol, Laktat, Proteine und Glykoproteine (Guraya, 1995). Die Flüssigkeit im adluminalen Bereich ist kalium- und bicarbonatreich und weicht in ihrer Zusammensetzung von Blut und Lymphe ab. Der Beginn der Sekretion fällt mit dem Auftreten der Tight junctions zwischen benachbarten Sertoli-Zellen zusammen (Steinberger und Steinberger, 1970).

Sertoli-Zellen sind zudem Zielzellen für Hormone aus der Hypophyse sowie des in den Leydig-Zellen gebildeten Testosterons und sie vermitteln selbst hormonelle Stimuli. Weiterhin produzieren sie Trägerstoffe für den Transport hochmolekularer Substanzen, wie androgenbindendes Protein (ABP) und Transferrin (Hagenas et al., 1975). Einzelne Proteine, speziell ABP und Inhibin, sind in der Flüssigkeit des Samenkanälchens gelöst und gelangen in den Nebenhoden (Hinton und Setchell, 1993). Das von den Sertoli-Zellen produzierte Inhibin verhindert selektiv die Freigabe von FSH über einen negativen Feedbackmechanismus (Lumpkin et al., 1981) und spielt somit eine wichtige Rolle bei der Regulation der FSH-Sekretion.

Eine weitere Aufgabe der Sertoli-Zellen ist die Phagozytose apoptotischer Keimzellen. Es ist bekannt, dass bis zu zwei Drittel der Keimzellen während der Spermatogenese zugrunde

gehen (Dym, 1994). Die elektronenmikroskopischen Studien von Russell und Clermont (1977) haben gezeigt, dass Sertoli-Zellen die apoptotischen Keimzellen abbauen, die sie an Phosphatidylserin, einem Apoptose-Marker an der Membranoberfläche (Schlegel und Williamson, 2001) erkennen und mit Hilfe ihres Klasse B-Scavenger-Rezeptortyps I (SR-BI) eliminieren (Nakagawa et al., 2005). Dieser Rezeptortyp wird sowohl an der basalen als auch an der apikalen Oberfläche der Sertoli-Zellen exprimiert. Die Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* haben gezeigt, dass die Phagozytose der apoptotischen Keimzellen unabdingbar ist für den Ablauf einer geordneten Spermatogenese und zu einer effizienten Spermatozytenproduktion notwendig ist (Nakanishi und Shiratsuchi, 2004). Die Sertoli-Zellen von Säugetieren mit saisonal abhängiger Fortpflanzungsperiode zeigen Unterschiede in der Phagozytoseaktivität, die mit der jahreszeitlichen Spermatogenese korrelieren (Bartke et al., 1991). Bekannt ist auch, dass die Zahl der Sertoli-Zellen den limitierenden Faktor für die obere Grenze der Spermienproduktion setzt (Hess und França, 2005).

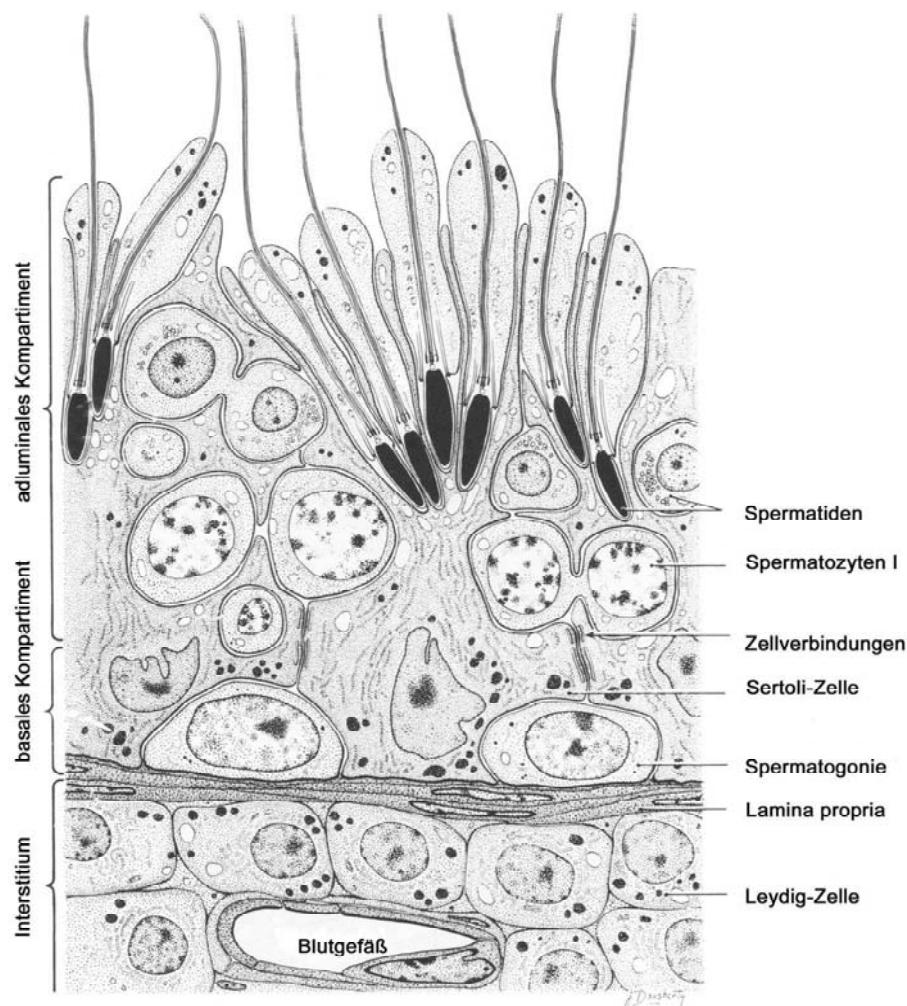
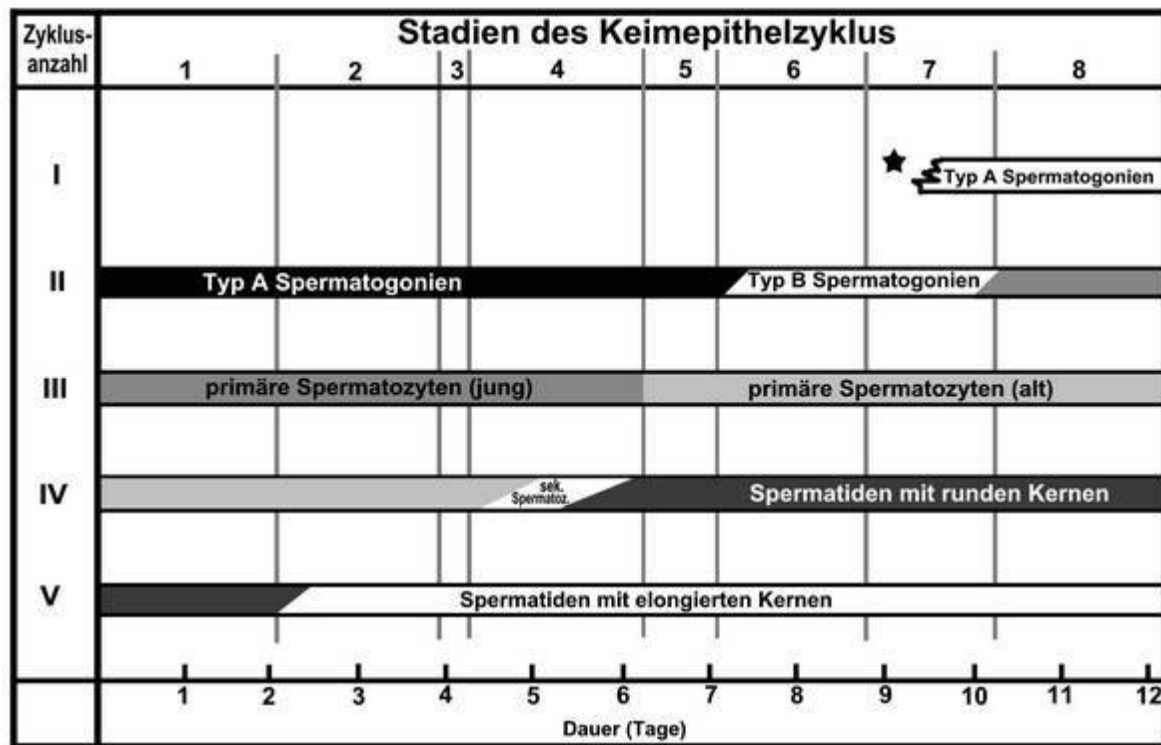


Abb. 1: Schematische Darstellung des Keimepithels beim Hengst mit angrenzendem Interstitium (Nach Pickett et al., 1989)

2.3.2 Keimepithelzyklus

Der vollständige Ablauf einer Serie typischer Zellbilder an einer bestimmten Stelle des Tubulus bis zur nächsten gleichen Zellgemeinschaft ist als Keimepithelzyklus definiert (Rüsse und Sinowatz, 1998). Der Keimepithelzyklus dauert beim Hengst 12,2 Tage (Swierstra et al., 1974) und kann in acht Stadien eingeteilt werden (siehe Tab. 1).



Tab. 1: Phasen des Keimepithelzyklus beim Hengst (Nach Swierstra et al., 1974)

★ Der genaue Beginn der Spermatozoenbildung ist nicht bekannt.

Die Keimzellen durchlaufen eine Reihe von Teilungs- und Entwicklungsschritten, die an der Peripherie der Samenkanälchen beginnt und in Richtung Lumen fortschreitet.

Die Stammzellen der *Spermatozoenbildung* sind die Spermatozoen, die sich mitotisch vermehren. Ein Teil dieser neuen Spermatozoen bleibt als Stammzellpopulation erhalten, während der andere sich weiter differenziert und in die Meiose eintritt. Die Subtypen der Spermatozoen werden in A1-, A2-, A3-, B1-, und B2-Spermatozoen eingeteilt (Johnson, 1991). Sie unterscheiden sich sowohl in ihrer Lage zur Basallamina, der Form des Zellkerns, der Nukleoli und in der Verteilung des Chromatins. Aus den Spermatozoen gehen durch mitotische Teilungen die primären Spermatozoen (Spermatozoen I. Ordnung) hervor. Diese verdoppeln ihre DNA, bevor sie in die prolongierte Prophase der 1.

Reifeteilung (Reduktionsteilung) eintreten, die über mehrere morphologisch unterscheidbare Stadien abläuft. Zu Beginn, im Leptotän, kondensieren sich die homologen Chromosomen und paaren sich im darauf folgenden Zygotän. Nach der deutlichen Verkürzung der Chromosomen im Pachytän kommt es im anschließenden Diplotän zum crossing-over. In der die Prophase abschließenden Diakinese löst sich die Kernmembran auf und der Spindelapparat bildet sich aus. Die Chromosomen ordnen sich in der Metaphase in der Äquatorialebene als Homologenpaare an und trennen sich in der Anaphase, so dass zu jedem Pol ein haploider Chromosomensatz wandert. Nach Beendigung der 1. Reifeteilung werden die Kernmembranen wieder aufgebaut und eine sehr kurze Interphase ohne DNA-Synthese schließt sich an. Die Prophase der 2. Reifeteilung (Äquationsteilung) ist kurz. Die Kernmembran löst sich auf und ein neuer Spindelapparat entsteht. In der Metaphase trennen sich die beiden Chromatiden eines Chromosoms. Rasch schließen sich Ana- und Telophase an. Somit sind nach der 2. Reifeteilung aus einer Spermatogonie vier haploide Spermatiden entstanden. Als Besonderheit kann die Ausbildung von Interzellularbrücken während der gesamten Spermatogenese angesehen werden. So erfolgt bei den Teilungsschritten keine vollständige Trennung. Erst vor Abgabe der Spermien in das Tubuluslumen werden diese zytoplasmatischen Verbindungen unterbrochen (Rüsse und Sinowatz, 1998).

Im sich anschließenden Prozess der *Spermiogenese* entwickeln sich die Klone der runden Spermatiden zu individuellen Spermien. Die Spermiogenese lässt sich in vier Phasen unterteilen: Golgiphase (A), Kappenphase (B), Akrosomenphase (C) und Reifungsphase (D) (Abb. 2).

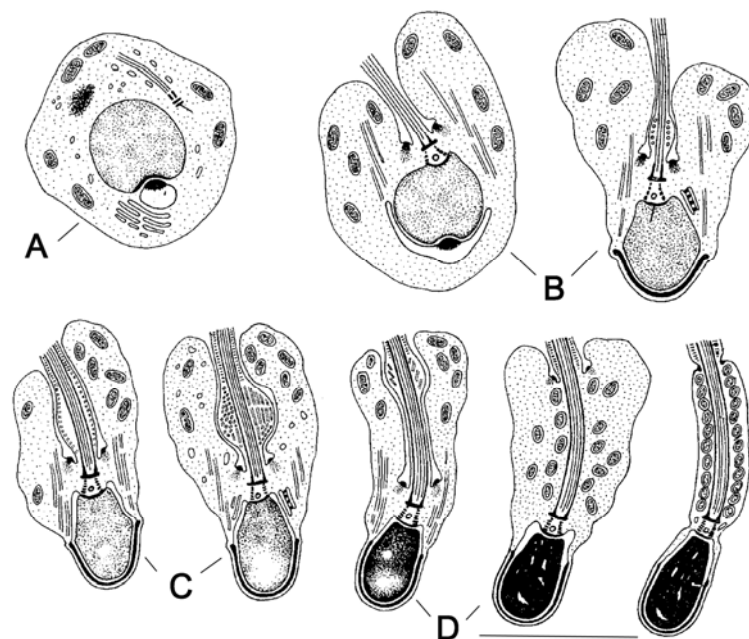


Abb. 2: Schema der Spermiogenese (Nach Smollich, 1992)

Zu Beginn in der Golgiphase (**A**) schnüren sich glykoproteinreiche Vesikel vom Golgi-Apparat ab und verschmelzen zur akrosomalen Vakuole. In der anschließenden Kappenphase (**B**) verdichtet sich der Inhalt der akrosomalen Vakuole zum akrosomalen Granulom und plattet ab. Es entsteht das Akrosom, welches sich als Kopfkappe bis über den Äquator der Kernoberfläche ausbreitet. Der Großteil des Zytoplasmas wird zum gegenüberliegenden Pol der Zelle verlagert. Aus dem distalen Zentriol wächst die Geißel, das Axonema, aus. Danach setzt die Akrosomenphase (**C**) ein. Zellkern und Zelleib strecken sich. Das Chromatin kondensiert von apikal beginnend nach distal. Durch den Austausch lysinreicher gegen argininreicher Histone kommt es zur extremen DNA-Verdichtung. Die Manschette, ein temporäres Organell aus parallelen Mikrotubuli, ist wichtig für die Formgebung des Spermienkopfes. In der Zwischenzeit dreht sich die Spermatide, so dass der akrosomale Pol in Richtung Basalmembran des Samenkanälchens zeigt. In der abschließenden Reifungsphase (**D**) nach Beendigung der Chromatin-Kondensation und der Ausformung des Akrosoms ordnen sich die Mitochondrien in spiraligen Touren um den Achsenfaden an. Die Faserscheide bildet sich aus. Hals, Mittelstück und Schwanz erhalten ihre endgültige Struktur. Die typische tierartige Kopfform wird ausgebildet. Verglichen mit der Kappenphase beträgt das Volumen nur noch 20 bis 30 Prozent. Überschüssiges Zytoplasma mit Golgi-Apparat, Mitochondrien, Lipidtropfen und Ribosomen bleibt als Residualkörper zurück und wird ins Lumen abgegeben bzw. von Sertoli-Zellen phagozytiert. Der vorerst erhaltene zytoplasmatische Tropfen verschwindet bei der Endausreifung der Spermien im Nebenhoden (Herms et al., 1988).

Die Dauer der Spermatogenese, beginnend mit den Mitosen der Spermatogonien bis zur Freisetzung der Spermien (Spermiation) ins Lumen des *Tubulus seminiferus contortus*, beträgt beim Hengst 49 bis 57 Tage (Swierstra et al., 1974; Johnson et al., 1997). Durch den räumlich gesehen helikalen Verlauf des Keimepithelzyklus können im Querschnitt des Samenkanälchens nicht nur ein Stadium, sondern bisweilen auch zwei oder mehr unterschiedliche Stadien beobachtet werden. Jahreszeitliche Unterschiede in der Anzahl der Spermatogonien resultieren aus einer kleinen, aber signifikanten Änderung der Anzahl der A1-Spermatogonien und der Ausbeute der Spermatogonienteilungen zu Beginn der Spermatogenese (Johnson, 1991).

Auf ihrem Weg von den gewundenen Samenkanälchen zum Nebenhodenkanal passieren die Spermien die geraden Samenkanälchen (*Tubuli seminiferi recti*), das Hodennetz (*Rete testis*) und die Ausführungsgänge (*Ductuli efferentes*). Der Anfangsabschnitt der *Tubuli*

recti ist durch modifizierte Sertoli-Zellen gekennzeichnet (Amann et al., 1977). Vom Bullen ist bekannt, dass dieser Struktur eine Ventilfunktion zukommt, durch die ein Rückstrom der Spermien verhindert wird (Wrobel et al., 1982). Zudem sind diese Zellen in der Lage, veränderte Spermien bei der Passage zu phagozytieren (Sinowatz et al., 1979).

Das *Rete testis* des Pferdes besteht aus einem System von anastomosierenden Kanälchen. Das Epithel ist kubisch bis hochprismatisch und wird von einer dicken Basalmembran unterlagert. Unterhalb der Basalmembran finden sich dichte Bündel von Kollagen, Blut- und Lymphgefäßen (Amann et al., 1977). Aus dem *Rete testis* gehen 12 bis 23 Ausführungskanälchen, die *Ductuli efferentes*, hervor, die von glatten Muskelzellen umgeben sind. Bei der Epithelauskleidung wird zwischen Haupt-, Zilien- und Basalzellen unterschieden. Basalzellen sind sehr klein, liegen der Basalmembran auf und erreichen die Epitheloberfläche nicht. Sie werden als Ersatzzellen angesehen, die eine Entwicklungs- und Differenzierungspotenz haben. Am Kopfende des Hodens durchbrechen die *Ductuli efferentes*, auf ihrem Weg Richtung Nebenhoden, die *Tunica albuginea* und fusionieren zum Nebenhodenkanal (*Ductus epididymidis*), der nach Ghetie (1939) beim Pferd bis zu 80 m lang sein soll.

2.4 Bedeutung des Melatonins in der saisonalen Fortpflanzung beim Pferd

Die Graviditätsdauer beträgt bei Stuten ca. 340 Tage. Die Fohlen werden vom Frühjahr bis in den Sommer hinein geboren, zu einem Zeitpunkt, in dem das Futterangebot die Laktationsleistung der Mutter und die Ernährung des Jungtieres optimal gewährleistet. Im Gegensatz zu anderen Nutztieren (z.B. Rind und Schwein) weisen Pferde ein deutlich jahreszeitlich geprägtes Fortpflanzungsverhalten auf. Die Zuchtsaison erstreckt sich in unseren Breiten von April bis September (Klug, 2003; Bader und Busch, 2005).

Pferde werden im Frühjahr, wenn die Tageslichtdauer zunimmt, sexuell aktiv (*long day breeder*). Im Gegensatz dazu werden Tiere, bei denen die Reproduktion an eine kurze Tagesdauer gebunden ist, als *short day breeder* bezeichnet. Dazu zählen bei den Nutztieren Schaf und Ziege.

Verantwortlich für die durch Tageslichtdauer gesteuerte Saisonalität ist das Hormon Melatonin. Die Ausschüttung des Melatonins ist ein komplexer Vorgang, bei dem Lichtenergie mittels Photonen auf die Photorezeptoren der Retina trifft und von dort als Aktionspotential (AP) auf einem Faserzug des *Tractus opticus* zu den Ganglienzellen des *Nucleus suprachiasmaticus* im Hypothalamus weitergeleitet wird (Moore und Lenn, 1972). Diese retinohypothalamische Bahn (RHT) existiert bei allen bisher untersuchten Säugetieren (Sharp et al., 1984). Nach dem Durchlaufen des *Nucleus paraventricularis*, dem Zwischenhorn des Halsmarkes und der präganglionären Nervenfasern erreicht das AP die *Ganglia cervicales craniales* (Kappers, 1976). Zur Epiphyse gelangt das AP über den *Nervus caroticus internus* und die *Nervi conarii*. In der Epiphyse erfolgen Produktion und Freisetzung des Melatonins nach einem relativ stabilen diurnalen Muster, wobei die Hauptmenge in der Dunkelphase gebildet wird. Ein entsprechender Rhythmus wurde auch für die Aktivität der beteiligten Enzyme festgestellt.

Synthetisiert wird das Hormon Melatonin in den Pinealzellen der Epiphyse (*Glandula pinealis*) über mehrere Zwischenstufen aus Tryptophan (Abb. 3). Über den Vorläufer Tryptophan wird mit Hilfe des Enzyms Tryptophanhydroxylase 5-Hydroxytryptophan gebildet. Die Enzyme N-acetyl-transferase (NAT) und Hydroxyindol-o-methyltransferase (HIOMT) katalysieren dabei die Reaktionen, aus denen das Endprodukt Melatonin hervorgeht (Minnemann und Wurtman, 1975). Die NAT-Synthese ist der limitierende Schritt in der Melatoninbildung (Klein und Weller, 1970).

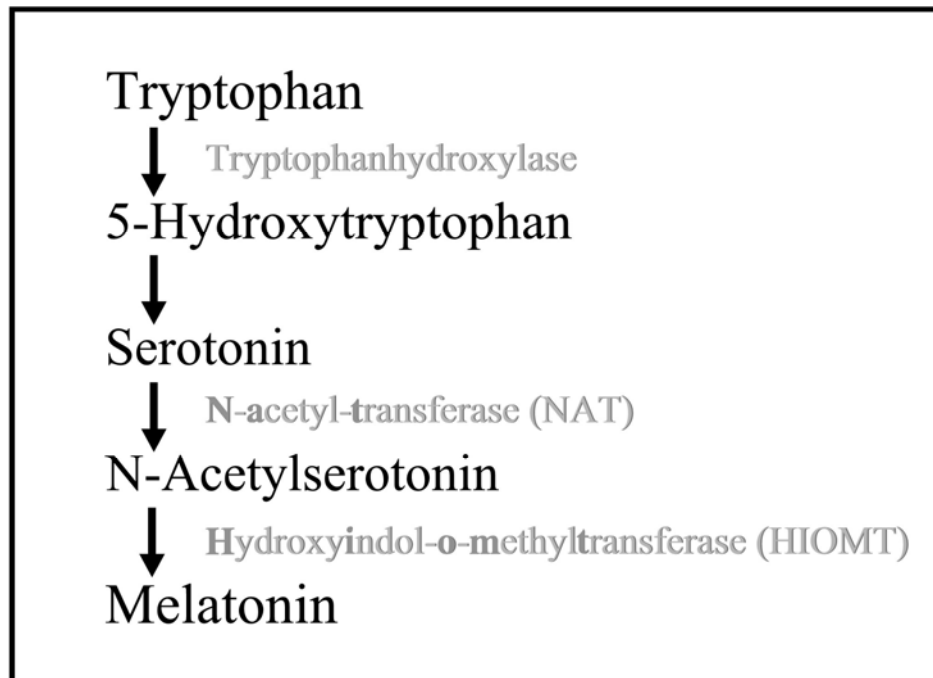


Abb. 3: Darstellung der Melatoninsynthese nach Sharp und Cleaver, 1993

Das in den Pinealzellen produzierte Melatonin gelangt über das vaskuläre System zu melatoninspezifischen Rezeptoren, die in der Hypophyse (Nonno et al., 1995) und in sehr geringer Dichte im Hypothalamus (Stankov et al., 1991) nachgewiesen wurden.

Somit könnte Melatonin auf zwei unterschiedlichen Wegen, Einfluss auf die Freisetzung der hypophysären Gonadotropine nehmen. Zum einen direkt über gonadotropineproduzierende Zellen im Hypophysenvorderlappen und zum zweiten über die Modulation der Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) -Sekretion im Hypothalamus. Bekannt ist, dass die Dauer der nächtlichen Melatonin-Freisetzung die pulsatile Sekretion des GnRH aus Neuronen im Hypothalamus (Malpoux et al., 1999) reguliert, wodurch sich saisonale Unterschiede in Frequenz und Amplitude ergeben (Irvine und Alexander, 1991). In der Paarungssaison kommt es beim Hengst zu zwei Freisetzungsimpulsen pro Stunde. Die Halbwertszeit von GnRH beträgt 30 Minuten. GnRH gelangt über das hypothalamo-hypophysäre Pfortadersystem zum Hypophysenvorderlappen (HVL) und reguliert dort die Synthese der Gonadotropine follikelstimulierendes Hormon (FSH) und luteinisierendes Hormon (LH). Beide Hormone spielen eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Hodenfunktion. Beim männlichen Tier stimuliert LH die Synthese und Sekretion von Androgenen aus den Leydig-Zellen. FSH dagegen steuert die Funktion der Sertoli-Zellen. Der Einfluss der Lichtdauer auf die GnRH-Sekretion spiegelt sich in den zyklischen Änderungen der LH-Ausschüttung wider. Beim Pferd wirkt eine abnehmende Dauer der

Melatoninfreisetzung (d.h. zunehmende Tageslichtdauer) stimulierend auf die Fortpflanzung. Somit korreliert beim Hengst die LH-Ausschüttung positiv mit der Tageslänge (Argo et al., 1991).

Die kurzen Tage im Herbst beenden physiologisch nicht die Zuchtsaison. Stattdessen dienen sie dazu, die Lichtunempfindlichkeit abzubauen, um einen Mechanismus in Gang zu setzen, damit die Hengste gegenüber einer wachsenden Tageslichtdauer wieder sensibel werden (Clay und Clay, 1992). Die Art und Weise, in der die Tubuluszellen reversibel stimuliert oder gehemmt werden, ist noch nicht vollständig geklärt. Die stattfindenden Veränderungen betreffen die Zahl der Sertoli-Zellen pro Hoden (Johnson und Thompson, 1983), die Anzahl der Keimzellen pro Sertoli-Zelle (Johnson und Neaves, 1981) und die auftretenden Keimzelldegenerationen (Johnson, 1985). Infolgedessen ist auch die höhere Spermaausbeute mindestens teilweise auf einen Anstieg der Parenchymmasse und einer verbesserten Effizienz der Spermienproduktion zurückzuführen (Clay und Clay, 1992).

2.5 Steroidhormone und Rezeptoren

2.5.1 Übersicht

Sexualsteroiden sind Geschlechtshormone und bestimmen die Entwicklung und Differenzierung der primären und sekundären Geschlechtsmerkmale. Produziert werden Sexualsteroiden in den Gonaden, in den Nebennieren und in der Plazenta. Die Einteilung der Steroide erfolgt strukturell in C18-, C19- und C21-Steroide oder funktionell in Östrogene, Androgene, Gestagene und Kortikosteroide (Gluko- und Mineralokortikoide).

Die Biosynthese der Sexualhormone geht vom Cholesterol oder einem direkten Verwandten dieses Steroids aus. Es wird von den hormonsynthetisierenden Drüsenzellen mittels Acetyl-CoA selbst gebildet oder aus dem Blut entnommen. Da die Hoden nur in begrenztem Umfang in der Lage sind, Cholesterin aus dem Blut aufzunehmen, wird die Hauptmenge in den Leydig-Zellen selbst synthetisiert (Bamberg, 1994).

Für die Steroidhormon-Biosynthese sind so genannte Cytochrom-P450-Enzymsysteme wichtig. Als erster Syntheseschritt erfolgt die Abspaltung eines Teils der Seitenkette im Cholesterolmolekül. Das daraus resultierende Steroidderivat Pregnenolon enthält 21 Kohlenwasserstoffatome (C21). Pregnenolon ist die Vorstufe für sämtliche Steroidhormone. Einer von mehreren möglichen Stoffwechselwegen der C21-Steroide führt durch Abspaltung einer C2-Gruppe zu C19-Steroid-Derivaten, den Androgenen.

Androgene (Testosteron bzw. Androstendion) sind wiederum obligate Vorstufen für die Östrogensynthese. Dabei kommt es zur Abspaltung des C-Atoms 19, so dass Östrogene als C18-Steroide die Endstufe der Steroidhormonkaskade bilden. Sie unterscheiden sich ferner von allen anderen Steroidhormonklassen durch den aromatisierten Ring A im Steroidgerüst.

Bei der Östrogensynthese werden als vorherrschende Zwischenprodukte hauptsächlich 17α -Hydroypregnenolon (17OH-P5) und Dehydroepiandrosteron (DHEA: 5-androstene-3 β -ol-17-on) oder 17α -Hydroxyprogesteron (17OH-P4) und Androstendion (A4: 4-androsten-3,17-dion) isoliert. Benannt nach ihren Metaboliten spricht man vom Δ^4 - oder Δ^5 -Syntheseweg (Abb. 4). Artspezifisch wird der eine oder der andere Weg genutzt (Conley und Bird, 1997). Nach Bedrak und Samuels (1969) dominiert beim Hengst der Δ^4 -Syntheseweg, hingegen nach Wichmann et al. (1984) mehr Vorläufermoleküle für den Δ^5 -Syntheseweg existieren.

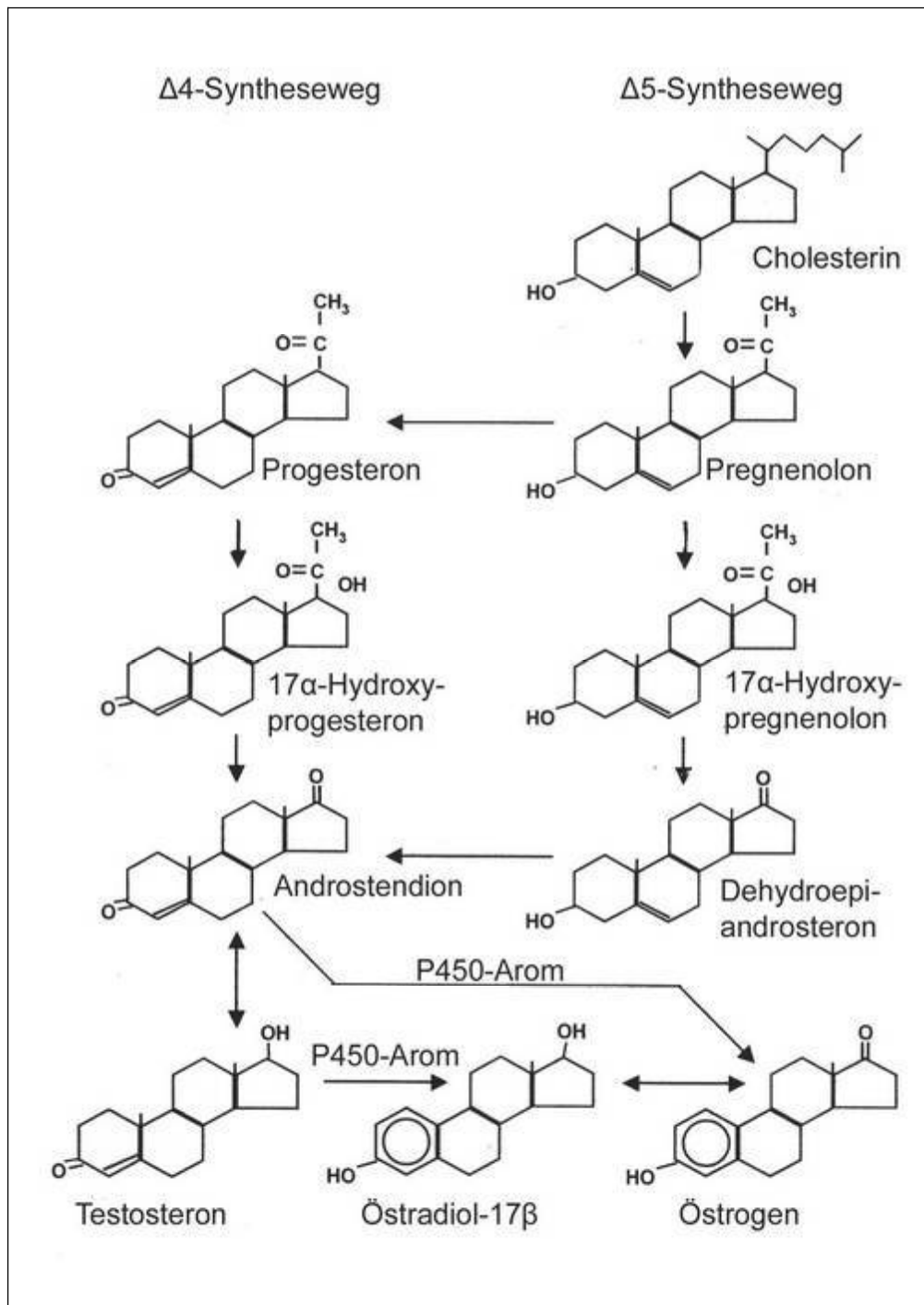


Abb. 4: Synthesewege der Sexualsteroidhormone nach Conley und Bird, 1997

Dargestellt ist sowohl der $\Delta 4$ - als auch der $\Delta 5$ -Syntheseweg. Durch Abspaltung eines Teils der Seitenkette am Cholesterin-Molekül entsteht Pregnenolon. Dies ist der Vorläufer für alle weiteren Steroidhormone. Nach der Oxidation des Pregnenolon zu Progesteron und über die Hydroxylierung dieser beiden Steroide entstehen 17 α -Hydroxyprogesteron und 17 α -Hydroxypregnenolon. Die Aromatisierung der Androgene Androstendion und Testosteron mit Hilfe der P450-Aromatase führt zu Östrogen und Östradiol.

Steroide werden von Transportproteinen zur Zielzelle transportiert. Im Zielgewebe dissoziieren sie vom Transportprotein und binden an den entsprechenden Rezeptor.

Steroidhormonrezeptoren und steroidhormonähnliche Rezeptoren bilden die nukleäre Rezeptor-Subfamilie 3 (NR3). NR3 umfasst die zwei Rezeptoren für Östrogene (ER α und ER β), zwei östrogenbezogene Rezeptoren ERRA/ERR1 und ERRB/ERR2 und einen Rezeptor für jede andere Steroidhormonklasse: Glukokortikoidrezeptor (GR), Mineralokortikoidrezeptor (MR), Progesteronrezeptor (PR) und Androgenrezeptor (AR) (Beato und Klug, 2000).

Alle Steroidrezeptoren weisen eine gemeinsame strukturelle und funktionelle Organisation in fünf Domänen (A bis F) auf, die für die Ligandenbindung, die DNA-Bindung und die Transkriptionsaktivierung verantwortlich sind (Tsai und O'Malley, 1994).

Steroidhormonrezeptoren wandern zwischen Zellkern und Zytoplasma und binden bei Abwesenheit der Hormone an bestimmte Chaperone, insbesondere an einen 90 kDa schweren Hitzeschockproteinkomplex (HSP90). Binden Hormone an den Rezeptor, kommt es zur Ablösung vom HSP90 und gegebenenfalls zur Translokation des Hormon-Rezeptor-Komplexes zum Zellkern (Carson-Jurica et al., 1990). Dort kann der Hormon-Rezeptor-Komplex an DNA-Sequenzen in der Nähe der Zielgene binden. Für die DNA-Bindung besitzen die Steroidhormonrezeptoren jeweils eine DNA-Bindungsdomäne, die aus bis zu 80 Aminosäuren (AS) besteht und durch zwei Zinkfinger motive gekennzeichnet ist. Die Steroidhormonrezeptoren erkennen auf der DNA die charakteristische Hormon-Response-Element- (HRE) Sequenz, mit der die Zinkfingerdomäne interagieren kann. Diese HRE-ergänzten Hormon-Rezeptor-Komplexe sind dann in der Lage, aktivierende oder unterdrückende Signale zur Transkription der Zielgene weiterzuleiten.

Neben den genomischen Wirkungen der Steroidhormonkomplexe über DNA-Transkription mit anschließender mRNA-Translation gibt es nichtgenomische Wirkungen an der Zellmembran. Diese sind durch ihre rasch eintretenden Aktionen gekennzeichnet und werden unterteilt in spezifische, rezeptorvermittelte und unspezifische, nicht rezeptorvermittelte Wirkungen. Die spezifischen, rezeptorvermittelten Aktionen sind abhängig von der Art und Affinität sowie Bindungskapazität des jeweiligen Rezeptors und die unspezifischen, nicht rezeptorvermittelten benötigen eine hohe Ligandenkonzentration (Wehling, 1997). Die Auswirkungen der Steroide auf die Spermatozoen können als nichtgenomische Wirkungen angesprochen werden, da eine genomische aufgrund der dichtgepackten DNA, der spärlichen und begrenzten Proteinbiosynthese in den Mitochondrien der Spermatozoen ausgeschlossen werden kann (Revelli et al., 1998). So

beeinflusst Östradiol-17 β die Spermienmotilität (Beck et al., 1976), die Sauerstoff-Aufnahme und die Laktatproduktion (Revelli et al., 1998). Außer für die gonadalen Steroide sind die nichtgenomischen Effekte auch für Mineralo- und Glukokortikoide, Vitamin D3 und Schilddrüsenhormone bekannt (Falkenstein et al., 2000).

Die Halbwertszeit von Steroidhormonen im Organismus ist kurz. Der enzymatische Abbau erfolgt hauptsächlich in der Leber. Nach Inaktivierung der Steroide durch Einfügen von Hydroxylgruppen und Konjugation mit Glucuron- oder Schwefelsäure werden die Metabolite über Harn bzw. Kot ausgeschieden (Döcke, 1994).

2.5.2 Androgene und Androgenrezeptor

Eine funktionelle Gruppe der Steroide sind die Androgene. Sie spielen eine entscheidende Rolle in der Differenzierung, Entwicklung und Aufrechterhaltung der männlichen Fortpflanzungsfunktionen zusammen mit geschlechtstypischen Eigenschaften außerhalb des Reproduktionstrakts. Testosteron wird in den Leydig-Zellen über mehrere Zwischenschritte aus dem Vorläufersubstrat Cholesterin gebildet und durch 5 α -Reduktase in das wesentlich aktivere Dihydrotestosteron umgewandelt. Darüber hinaus erfolgt auch die Bildung von Androsteron und Androstendiol im Hoden (Döcke, 1994). Androstendion und Adrenosteron, schwächer wirksame Androgene, werden in der Nebennierenrinde produziert (Holzbauer und Newport, 1969). Im Blut werden sie an das sexualhormonbindende Globulin (SHBG) gebunden (Sinnecker et al., 1990), transportiert und nach Ablösung vom SHBG an den Zielorganen über den Androgenrezeptor (AR) wirksam.

Der AR ist ausschließlich nukleär lokalisiert und tritt in den zwei Formen AR-A und AR-B auf (Takeda et al., 1990). AR-A besitzt ein Molekulargewicht von annähernd 87 kDa und AR-B hat ein Molekulargewicht von ca. 110 kDa. Die beiden Formen sind in ihrer Struktur analog zur A- und B-Form des Progesteronrezeptors (Wilson und McPhaul, 1996). Das Gen für den AR ist auf dem langen Arm des X-Chromosoms lokalisiert. Der Androgenrezeptor ist ein Mitglied der nukleären Steroidrezeptorfamilie, er wirkt als Transkriptionsfaktor und enthält Protein-Domänen, die die Aktivität stimulieren oder unterdrücken können. Verschiedene Co-Aktivatoren oder Co-Repressoren können mit diesen Bereichen in Wechselwirkung treten (Ikonen et al., 1997).

Der AR ist beim Hengst sowohl in den Leydig-Zellen, den Sertoli-Zellen sowie den peritubulären Myozyten und perivaskulären glatten Muskelzellen (Bilinska et al., 2005) zu finden.

Die Expressierung des AR in den Leydig-Zellen zeigt, dass Androgene die Leydig-Zellen in autokriner Art und Weise beeinflussen (Vornberger et al., 1994). Dass nicht alle Leydig-Zellen dauerhaft AR exprimieren, lässt auf eine unterschiedliche funktionelle Aktivität innerhalb der Zellpopulation schließen. Die Beobachtung, dass die AR-Expression in den Sertoli-Zellen abhängig von den jeweiligen Stadien des Keimepithelzyklus unterschiedlich stark auftritt, deutet darauf hin, dass spezielle stadienabhängige Funktionen der Sertoli-Zellen durch Androgene moduliert werden können (Bremner et al., 1994).

2.5.3 Progesteron und Progesteronrezeptor (PR)

Progesteron spielt im weiblichen Genitale eine wichtige Rolle bei der Fruchtimplantation im Uterus, der Aufrechterhaltung der Gravidität und der Entwicklung der Milchdrüse (Graham und Clarke, 1997).

Beim Menschen und anderen Spezies existieren zwei isomere Formen des PR, PR-A und PR-B. Die beiden Rezeptorformen werden von einem single-copy Progesteronrezeptor-Gen transkribiert. Das PR-Gen erstreckt sich über 90 kbp und ist beim Pferd auf dem Chromosom 7 lokalisiert (Lear et al., 1998). Die DNA-Bindungsdomäne ist auch beim Progesteronrezeptor hoch konserviert.

PR-B ist ein lineares Molekül, das beim Menschen aus 933 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von ca. 114 kDa hat. Das kleinere Isomer PR-A mit 94 kDa unterscheidet sich von PR-B durch das Fehlen der ersten 164 Aminosäuren am N-terminalen Ende des Moleküls (Giangrande et al., 1997). Dieses fehlende Segment soll zumindest teilweise für die funktionellen Unterschiede beider Isomere verantwortlich sein. So enthält die N-terminale Verlängerung des humanen PR-B eine zusätzliche, transkriptionsaktivierende Funktion (Sartorius et al., 1994). Nach Mohamed et al. (1994) kommen in humanen Zielgeweben beide Isoformen gleichzeitig vor, was die Bildung von Homo- und Heterodimeren ermöglicht: A/A, A/B und B/B. Beide PR-Isoformen können sich in Abhängigkeit von der Spezies und vom Zelltyp in ihren biologischen Aktivitäten deutlich unterscheiden. Außerdem ist ihr Anteil im Reproduktionstrakt abhängig von der Entwicklung (Shyamala et al., 1990) und dem hormonellen Status (Duffy et al., 1997).

In den meisten Zelllinien wirkt der humane PR-A als Transkriptionsrepressor des Progesteron-responsive-Promotors, hingegen PR-B als Aktivator der gleichen Gene (Giangrande und McDonnell, 1999). Des Weiteren fungiert er als transdominanter Repressor der Transkriptionsaktivität des Östrogen-, Glukokortikoid-, Androgen- und Mineralokortikoidrezeptors. Die speziell hemmende Domäne befindet sich zwar bei beiden

PR-Formen am Aminoende, entfaltet ihre Wirkung aber nur beim PR-A (Giangrande und McDonnell, 1999).

Schließlich existiert eine dritte Variante des Progesteronrezeptors mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa (Wei et al., 1996). Diese als PR-C bezeichnete Isoform ist am N-terminalen Ende des Rezeptormoleküls weiter verkürzt, so dass die erste Zinkfinger-Struktur der DNA-Bindungsdomäne fehlt. Die Hormon-Bindungsdomäne sowie die für die Dimerisierung und die nukleäre Lokalisation verantwortlichen Bereiche sind jedoch vollständig vorhanden. Der PR-C ist zur Bildung von Heterodimeren mit dem PR-B befähigt und kann die Transkriptionsaktivität der beiden längeren PR-Isoformen verstärken.

PR-mRNA ist in Hoden, Nebenhoden und Prostata von Primaten (Heikinheimo et al., 1995) präsent. Im Hoden des Mannes zeigen Zytoplasma und Zellkerne der Spermatogonien, der Spermatozyten I. und II. Ordnung und der runden Spermatischen eine positive Immunreaktion auf PR. Darüber hinaus ist der PR in Sertoli-Zellen und in einigen Leydig-Zellen zu beobachten (Shah et al., 2005). Die unterschiedliche Intensität der Färbung lässt auf eine stadienspezifische Expression schließen, wie es auch für den AR bekannt ist.

Progesteron wirkt nicht nur über intrazelluläre Rezeptoren, sondern auch über Interaktionen mit der Zellmembran. Besetzt es Bindungsstellen an der Plasmamembran von Leydig-Zellen, führt dies zu einer Depolarisation der Zellmembran mit Einstrom von Natriumchlorid und anschließender Aktivierung der Steroidproduktion (Rossato et al., 1999). Neben den Leydig-Zellen exprimieren auch Spermien den PR (Cheng et al., 1981). Die Wirkung von Progesteron auf Spermien zeigt sich in einer Aktivierung der Motilität und Einleitung der Akrosomenreaktion (Calogero et al., 2000; Cheng et al., 1998).

2.5.4 Östrogene und Östrogenrezeptoren α (ER α) und β (ER β)

Östrogene werden mit Hilfe des Enzymkomplexes P450-Aromatase irreversibel aus Androgenen gebildet (Carreau et al., 1999). Die wichtigsten biologisch aktiven Östrogene sind 17 β -Östradiol, Östron und Östriol. Neben ihren Wirkungen sowohl auf den weiblichen als auch den männlichen Reproduktionstrakt spielen sie eine bedeutende Rolle im kardiovaskulären System und im Knochenstoffwechsel (Enmark et al., 1997).

Die ersten Berichte über den Östrogengehalt im Urin des Hengstes tauchten schon in den 1930er Jahren auf und es zeigte sich, dass die Hoden der Ort der Östrogensynthese sind (Zondek, 1934 a, b). Beim Hengst wurden im Blut ein Östrogensulfat Spiegel von fast

2.500 pg/ml und ein sehr hoher Östrogenanteil in der Samenflüssigkeit festgestellt (Claus et al., 1992). Des Weiteren wurde in den Lymphgefäßen des Hodens eine besonders hohe Konzentration gemessen (Setchell und Cox, 1982).

Östrogene haben in den männlichen Fortpflanzungsorganen folgende Aufgaben: Sie stellen einen wichtigen Faktor für die Spermatogenese dar (Pentikäinen et al., 2000), regulieren die Entwicklung und Funktion der akzessorischen Geschlechtsdrüsen (Joshi und Raeside, 1973), die Zellproliferation und Mukusproduktion im männlichen Reproduktionstrakt (Davies und Danzo, 1981). Des Weiteren sind sie zur Differenzierung und Aufrechterhaltung der Zellmorphologie in den *Tubuli seminiferi* (Eddy et al., 1996), im *Rete testis* und in den *Ductuli efferentes* (Lee et al., 2000) notwendig.

Der Östrogenrezeptor existiert in zwei Formen: ER α und ER β . ER α besteht aus 595 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 67 kDa, während ER β aus 485 Aminosäuren aufgebaut ist und ein Molekulargewicht von 54,2 kDa besitzt (Kuiper et al., 1996). Die Homologie beträgt 96 % im Bereich der DNA-Bindungsstelle und 58 % in den Sequenzabschnitten der Liganden-Bindungsstelle (Ogawa et al., 1998). Die Sequenz am ersten Zinkfinger, die essentiell ist für die spezifische Bindung an das Östrogen-Response-Element der Zielgene und die Region am zweiten Zinkfinger, die zur Rezeptor-Dimerisierung beiträgt, sind für beide Rezeptoren gleich. Die größten Sequenzunterschiede zwischen ER α und ER β befinden sich in der A/B-Domäne, D-Domäne und der C-terminalen Domäne F (Saunders, 1998).

Je nachdem, ob eine Zelle nur eine oder beide ER-Formen exprimiert, können aktivierte Östrogenrezeptoren Homodimere (ER α -ER α /ER β -ER β) oder Heterodimere (ER α -ER β) bilden (Cowley et al., 1997). Beide Subtypen haben eine gleichstarke Affinität zu 17 β -Östradiol, wobei die 17 β -Östradiolwirkung von der Rezeptorform abhängig ist. 17 β -Östradiol aktiviert mit ER α die Transkription, während derselbe Ligand mit ER β eine Hemmung der Transkription bewirkt (Paech et al., 1997).

Tab. 2: Immunhistochemischer Nachweis von ER α und ER β in Retezellen (Rt), Leydig-Zellen (L), peritubulären Myozyten (M), Sertoli-Zellen (S) und Keimzellen (K) bei verschiedenen Tierarten.

Spezies	ER α					ER β					Literatur
	Rt	L	M	S	K	Rt	L	M	S	K	
Ratte	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	Pelletier et al., 2000
Katze	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	Nie et al., 2002
Hund	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	Nie et al., 2002
Schwein	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	Mutembei et al., 2005
Pferd	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	Hejmej et al., 2005

2.6 Cytochrom-P450-Aromatase (P450-Arom)

Cytochrome sind Hämproteine, die als partikelgebundene Redoxkatalysatoren wirken. Sie dienen als Elektronendonatoren und -akzeptoren. Die P450-Enzyme sind Mitglieder der Überfamilie von Hämproteinen, die in Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Tieren vorkommen. Ihr Name resultiert aus der Eigenschaft, dass *in vitro* ihr reduzierter Komplex sein Absorptionsmaximum bei 450 nm hat. Sie sind membrangebundene Proteine innerhalb des endoplasmatischen Retikulums oder in den Mitochondrien (Payne und Hales, 2004). Die Cytochrom-P450-Aromatase katalysiert die irreversible Transformation von Androgenen in Östrogene. Der Enzymkomplex besteht aus dem spezifischen Cytochrom-P450 und einem ubiquitären unspezifischen Flavoprotein. Bei dem Enzym, das spezifisch für die Umwandlung von C19-Androgenen in C18-Östrogene verantwortlich ist, handelt es sich um ein 58 kDa schweres Protein. Es ist auf dem Gen CYP19 lokalisiert und in vielen Geweben verbreitet; inklusive Gehirn, Fettgewebe und Knochen. Bei der Stute findet es sich sowohl in Lutealzellen als auch in höherer Expression in Granulosazellen (Almadhidi et al., 1995). Im männlichen Reproduktionstrakt können folgende Zellen P450-Arom exprimieren;

- Leydig-Zellen (Levallet et al., 1998),
- unausgereifte Sertoli-Zellen (Rommerts et al., 1982),
- Keimzellen (v.a. in elongierten Spermatischen) (Carreau et al., 2003),
- Epithelzellen der *Ductuli efferentes* und des *Epididymidis* (Carpino et al., 2004),
- Spermien im zytoplasmatischen Tropfen (Janulis et al., 1998)
- ejakulierte Spermien (Carreau et al., 2006).

Beim Hengst ist eine positive Reaktion für P450-Arom in Leydig-Zellen, in Keimzellen (Sipahutar et al., 2003) und im Hypothalamus (Lemazurier et al., 2001) nachgewiesen. In Hoden und Ovar wird die Expression von P450-Arom durch die Gonadotropine FSH und LH reguliert (Conley und Hinshelwood, 2001).

2.7 Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)

Das Proliferation cell nuclear antigen (PCNA) ist ein 36 kDa schweres Helferprotein der DNA-Polymerase δ (Tan et al., 1986; Prelich et al., 1987). PCNA, auch bekannt als Cyclin (Bravo et al., 1981), tritt in normalen und veränderten proliferierenden Zellen auf (Kurki et al., 1986). Kreuzreaktionen auf das PCNA-Antigen bei verschiedenen Arten lassen darauf schließen, dass es sich hierbei um ein hoch konserviertes zelluläres Protein handelt (Kurki et al., 1986). Intrazellulär liegt es in zwei Formen vor: eine Form ist DNA-gebunden, und stellt die aktive Form dar, während die karyoplasmatische Fraktion als eine Art Reservepool anzusehen ist. Während der G1-, S- und G2/M-Phase des Zellzyklus sind die Zellkerne PCNA-positiv und negativ in der G0-Phase (Celis und Celis, 1985). Der monoklonale Antikörper PC 10 gegen PCNA (Waseem und Lane, 1990) wird in der Tumordiagnostik (Goldsworthy et al., 1993) und für wachsende Gewebe (Casasco et al., 1993) eingesetzt.

PCNA wurde als Proliferationsmarker auch im männlichen Genitale eingesetzt. Im Hoden der Ratte ist PCNA in den mitotisch teilenden Spermatogonien, aber nicht in den Spermatozyten, die in die Meiose eingetreten sind, lokalisierbar (Chapman und Wolgemuth, 1994). Der Nachweis von PCNA bei Spermatozyten in Zygotän und Pachytän, späten Stadien der Prophase, lässt auf eine zweite Funktion von PCNA, der DNA-Reparatur schließen (Chapman und Wolgemuth, 1994).

PCNA ist auch in den Zellkernen der Spermatogonien und frühen Spermatozyten von Dschungarischen Hamstern, Affen und Männern nachgewiesen (Schlatt und Weinbauer, 1994). Bei den Nagern sind die A-Spermatogonien stadienspezifisch gefärbt (Schlatt und Weinbauer, 1994).

Beim Bullen zeigen A-, I- und B-Spermatogonien einen PCNA-positiven Zellkern, außer während der Meta-, Ana- und Telophase. Eine positive Expression ist auch bei präleptotänen Spermatozyten I. Ordnung zu beobachten. (Wrobel et al., 1996)

Ebenso konnte PCNA in Sertoli-Zellen noch nicht voll entwickelter Hoden bei Rhesusaffen gefunden werden. Dies weist auf eine Wachstumsaktivität dieser Zellen im präpubertären Stadium hin (Schlatt und Weinbauer, 1994).

2.8 α -smooth muscle actin (α -SMA)

Das Zytoskelett besteht aus einem Proteingerüst, das sich aus Aktinfilamenten (Durchmesser: 6 nm), Mikrotubuli (Durchmesser: 25 nm) und Intermediärfilamenten (Durchmesser: 10 nm) zusammensetzt. Das Zytoskelett unterstützt die aktive Änderung und Aufrechterhaltung der Zellgestalt, die Ausbildung und Stützung spezialisierter Fortsätze, den gerichteten intrazellulären Transport von Organellen und die Stabilisierung der Plasmamembran und anderer Zellmembranen. Die gemeinsame Eigenschaft dieser zum Teil sehr unterschiedlichen Zytoskelettsysteme ist die Fähigkeit zur Polymerisation.

Aktin, bekannt als eines der ältesten konservierten eukaryontischen Proteine, kommt bei Vögeln und Säugern in sechs isomeren Formen vor. Vier von ihnen lassen sich in verschiedenen Muskelgeweben (α -skeletal actin, α -cardiac actin, α -smooth muscle actin und γ -smooth muscle actin) abgrenzen und zwei werden nahezu in allen Zellen gefunden (non muscle actin: β -cytoplasmatic actin und γ -cytoplasmatic actin).

Diese Formen zeigen insgesamt über 90 % Sequenzhomologie, aber nur zu 50 - 60 % Übereinstimmung in ihrem aminoterminalen Ende (Skalli et al., 1986). Die aminoterminalen Region scheint die Hauptantigenregion des Aktins zu sein und ist beteiligt an der Interaktion mit anderen Proteinen, wie dem Myosin.

Aktin besteht aus globulären Molekülen (G-Aktin, globulär), welche zum doppelsträngig gewundenen Filament polymerisieren (F-Aktin, filamentös). Sie lagern sich z.B. in Muskelzellen zu Bündeln zusammen und stellen zusammen mit den Myosinfilamenten die Myofibrillen dar, die die Muskelkontraktion bewirken. Der relative Anteil der Isoformen variiert in den glatten Muskelzellen unterschiedlicher Organe (Gabbiani et al., 1981) und ändert sich innerhalb der gleichen Population von glatten Muskelzellen während der Entwicklung (Kuroda, 1985), unter pathologischen Bedingungen (Kocher und Gabbiani, 1986) sowie unterschiedlichen Kulturbedingungen (Owens et al., 1986).

Ein speziell entwickelter Antikörper gegen α -SMA erlaubt die Darstellung dieses Isomers mit Hilfe immunhistochemischer Verfahren (Skalli et al., 1986). Im Hoden beim Rind wird α -SMA im Alter, in dem sich postnatal die Spermatogonien teilen, erstmals exprimiert

(Devkota et al., 2006) und in der folgenden Entwicklung verändert sich die Ausrichtung der Aktinfilamente (Maekawa et al., 1995).

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial

Es wurden Hoden von klinisch gesunden Hengsten untersucht, die mindestens drei Jahre alt waren. Die Probenentnahmen erfolgten innerhalb (Juni bis September) und außerhalb (Januar bis Februar) der Zuchtsaison (Tab. 3).

Pferd	Rasse	Alter	Datum der Probenentnahme
1.	Haflinger	3	01.07.2005
2.	Haflinger	3	01.07.2005
3.	Englisches Vollblut	3	06.09.2005
4.	Deutsches Warmblut	3,5	27.01.2006
5.	Englisches Vollblut	4	10.06.2005
6.	Achal-Tekkiner	4	11.08.2005
7.	Deutsches Warmblut	4	27.01.2006
8.	Quarterhorse	5	02.02.2006
9.	Deutsches Warmblut	6	10.01.2006
10.	Arabisches Vollblut	8	30.01.2006

Tab. 3: Übersicht über die zur Probenentnahme verwendeten Tiere

3.2 Probenentnahme und Probenaufbereitung

Die Pferde wurden in verschiedenen Pferdekliniken sowohl im Stehen als auch im Liegen kastriert. Zur Fixation wurden die bei der Kastration entnommenen Hoden in mehrere Stücke von maximal 2 x 2 cm zurechtgeschnitten und 24 Stunden in Methanol-Eisessig 2:1 bzw. 48 Stunden in Bouin'scher Lösung (Romeis, 1989) immersionsfixiert. Anschließend erfolgte das Entwässern der Proben mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe über 26 Stunden in einem Gewebeeinfiltrationsautomaten (TP 1020, Fa. Leica), um sie schließlich in einer Paraffinausgießstation (EG 1160, Fa. Leica) in Paraplast^R (Fa. Tyco healthcare, USA) einzubetten. Von jedem Probenblock wurden mit einem Rotationsmikrotom (RM 2135, Fa. Leica) jeweils drei 2 µm dünne Schnitte für eine Übersichtsfärbung geschnitten

und auf Superfrost^R-Objektträger (Fa. Langenbrinck) aufgezogen. Von ausgewählten Blöcken wurden weitere Schnitte angefertigt und für die Immunhistochemie auf Superfrost^Radhäsiv-Objektträger (Fa. Langenbrinck) aufgezogen.

3.3 Lichtmikroskopie und Immunhistochemie

Zur deskriptiven lichtmikroskopischen Auswertung wurden ausgewählte Schnitte einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung sowie einer Azan- und Masson-Goldner-Färbung unterzogen (Romeis, 1989). Zum Nachweis der zu bestimmenden Antigene wurde die Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex (ABC-) Methode unter Verwendung der in Tabelle 4 aufgeführten Antikörper angewendet (Hsu et al., 1981).

Avidin-Biotin-Methode

Die Methode basiert auf der Fähigkeit des Glykoproteins Avidin, vier Moleküle des Vitamins Biotin zu binden. Das erste Reagenz, der Primärantikörper, ist gegen das zu bestimmende, auf dem Gewebeschnitt lokalisierte, Antigen gerichtet. Der biotinylierte Sekundärantikörper bindet im folgenden Arbeitsschritt an den Primärantikörper. Nach Zugabe eines Peroxidase-konjugierten Avidin-Biotin-Komplexes binden die freien Stellen des Avidins an das Biotin des Sekundärantikörpers und markieren diesen. Die Peroxidaseaktivität der gebundenen Komplexe wird mit einem geeigneten Chromogen sichtbar gemacht. Es wurde nach dem im Institut für Anatomie und Physiologie der Haustiere der Universität Hohenheim etablierten Standardprotokoll vorgegangen. Detaillierte Angaben zur Vorgehensweise finden sich in der Doktorarbeit von Dobler (2003).

Tab. 4: Übersicht über die verwendeten Reagenzien

Primär-AK Anti-	Immunogen	Host	Hersteller	Serum	Sekundär-AK biotinyliert
alpha-smooth-muscle actin [a-SMA] (monoklonal) Verd. 1:1000	N-terminales Dekapeptid des humanen a-SMA	Maus	Dako Diagnostika GmbH, Hamburg	Kaninchen (Verd. 1:10)	Anti-Maus IgG, Kaninchen (Verd. 1: 300)
Androgen-Rez. [AR] (polyklonal) Verd. 1:200	Rekomb. Peptid entspr. AS 1-21 des humanen AR	Kaninchen	Upstate, New York, USA	Ziege (Verd. 1:10)	Anti-Rabbit IgG, Ziege (Verd. 1:400)
P450-Arom-Rez. [P450] (monoklonal) Verd. 1:50	Peptid entspr. AS 367-390 der humanen Arom	Maus	Serotec, Düsseldorf	Kaninchen (Verd. 1:10)	Anti-Maus IgG, Kaninchen (Verd. 1: 300)
Östrogenrez. β [ER β] (polyklonal) Verd. 1:100	Rekomb. Peptid entspr. AS 1-150 des humanen ER β	Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg	Ziege (Verd. 1:10)	Anti-Rabbit IgG, Ziege (Verd. 1:400)
Progesteron-Rez. [PR] (polyklonal) Verd. 1:200	Rekomb. Protein entspr. AS 412-526 des humanen PR	Kaninchen	Labvision CA, USA	Ziege (Verd. 1:10)	Anti-Rabbit IgG, Ziege (Verd. 1:400)
Proliferating cell nuclear antigen [PCNA] (clone 19A2) Verd. 1:500	gereinigtes PCNA vom Kaninchen- Thymus	Maus	Linaris, Biologische Produkte GmbH, Wertheim- Bettingen	Kaninchen (Verd. 1:300)	Anti-Maus IgG, Kaninchen (Verd. 1: 300)

Die Schnitte wurden in Xylol entparaffiniert, über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert und in Aqua dest. gewaschen. Bei den immunhistochemischen Tests für AR, PR und PCNA erfolgte dann eine dreimalige Mikrowellenvorbehandlung um die Antigenbindungsstellen darzustellen. Anschließend wurde die endogene Peroxidase in 10-prozentiger Hydrogenperoxidlösung gehemmt. Bei AR und PCNA wurde dies wiederholt. Die unspezifische Bindung der Antikörper wurde durch die 30-minütige Inkubation mit 1:10 normal verdünntem Serum verhindert. Als nächstes wurden die Schnitte mit dem verdünnten Primärantikörper über Nacht in einer Feuchtkammer (Fa. Shandon^R, Frankfurt a.M.) bei 5 °C inkubiert. Die dann folgende Inkubation mit dem entsprechenden, biotinylierten Sekundärantikörper dauerte 30 Minuten. Darauf folgend wurde der Streptavidin-Biotin-Horseradish Peroxidase Komplex (Fa. DAKO, Hamburg) für 30 Minuten zugesetzt. Sichtbar gemacht wurde die eingetretene Immunreaktion durch die 10-minütige Entwicklung in 3,3-Diaminobenzidin-Hydrogenperoxid (DAB)-Lösung unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur. Zwischen den einzelnen Schritten erfolgten Spülungen in einer dem Verdünnungsmedium entsprechenden Pufferlösung (PBS-Puffer; pH 7,4). Es erfolgte abschließend eine Gegenfärbung mit Hämalaun, die Dehydrierung

über eine aufsteigende Alkoholreihe und das Eindecken mit Entellan^R (Fa. Meck, Darmstadt).

Als Positivkontrolle (K0) dienten die in Tabelle 5 aufgeführten Gewebeschnitte, die bekannterweise eine positive Reaktion mit dem Primärantikörper zeigen. Als Negativkontrolle wurde bei jeweils einem Schnitt der Primärantikörper (K1), der Sekundärantikörper (K2) bzw. der Streptavidin-Biotin-Meerrettichperoxidase Komplex (K3) nicht aufgetragen.

<u>IHC</u>	<u>Gewebe</u>	<u>Tierart</u>
a- SMA	Hoden	Schwein
AR	Nebenhoden	Schwein
P450-Aromatase	Hoden	Schwein
ERβ	Ovar	Schwein
PR	Uterus	Pferd
PCNA	<i>Tonsilla caecalis</i>	Huhn

Tab. 5: Übersicht über die Positivkontrollen

3.4 Auswertung und Histometrie

Die deskriptive Auswertung erfolgte an einem Lichtmikroskop Typ Laborlux S (Leitz, Wetzlar). Hier wurde insbesondere auf die Unterschiede im histologischen Bild der zu verschiedenen Jahreszeiten genommenen Proben geachtet.

Die immunhistochemischen Reaktionen wurden an einem Mikroskop Typ DMRBE (Fa. Leica, Bensheim) mit Videokamera (ProgRes 3012, Fa. Kontron Elektronik) bzw. mit der integrierten Digitalkamera (DFC 420C, Fa. Leica, Bensheim) und angeschlossenem „Image Processing and Analysis“ (IPA) Programm ausgewertet und dokumentiert. Dabei wurde auf Zelltypen, die Lokalisation der Zellen, die Häufigkeit markierter Zellen und die Intensität der immunhistochemischen Reaktion geachtet. Die Beurteilung von Häufigkeit und Intensität erfolgte semiquantitativ (-- bis +++), wobei den Symbolen folgende Parameter entsprechen:

Häufigkeit		Intensität
keine	--	negativ
einzelne (bis 10%)	+/-	schwach
wenige (bis 50%)	+	moderat
viele (bis 75%)	++	deutlich
zahlreiche (über 90%)	+++	stark

Für die Bestimmung des mitotischen Index erfolgte die Auszählung von PCNA-positiv markierten Kernen der Keimzellen in den Samenkanälchen. Der Zellteilungsindex ist die Prozent- oder Promillezahl der Zellen einer Zellpopulation, die sich zum Beobachtungszeitpunkt in Teilung befinden (Roche Lexikon Medizin, 2003). Bei 400-facher Vergrößerung wurden pro Stadium I bis VIII des Keimepithelzyklus fünf Samenkanälchen in jedem Schnitt ausgezählt. Nach der Bestimmung aller positiv markierten Kerne im Feld, wurden die markierten Kerne von Spermatogonien und Spermatozyten I. Ordnung einzeln gezählt. Die Größe des mitotischen Index in Prozent ist das Verhältnis von positiv markierten Spermatogonien bzw. positiv markierten Spermatozyten I. Ordnung zur Gesamtzahl aller Keimzellen, die eine Expression von PCNA zeigen.

An mit α -SMA markierten histologischen Schnitten wurden mittels eines Systemmikroskops Typ Leica DM LS (Fa. Leica, Herne) bei 40-facher Vergrößerung der Durchmesser der Samenkanälchen evaluiert. Bei jedem Tier wurden insgesamt 40 Samenkanälchen ausgemessen.

4 Ergebnisse

4.1 Histomorphologie

Das Hodengewebe ist von der derben, bindegewebigen *Tunica albuginea* umgeben, von der zarte Bindegewebssepten in das Hodenparenchym einstrahlen und die *Septula testis* bilden. Die *Septula testis* führen Blut- und Lymphgefäße und unterteilen das Hodenparenchym in zahlreiche, von einander getrennte Hodenläppchen (*Lobuli testis*), von denen jedes bis zu zehn stark gewundene *Tubuli seminiferi contorti* enthält (Abb. 5). Vor der Mündung in das zentral gelegene *Rete testis* strecken sich die gewundenen Samenkanälchen zu kurzen geraden Kanälchen (*Tubuli seminiferi recti*).

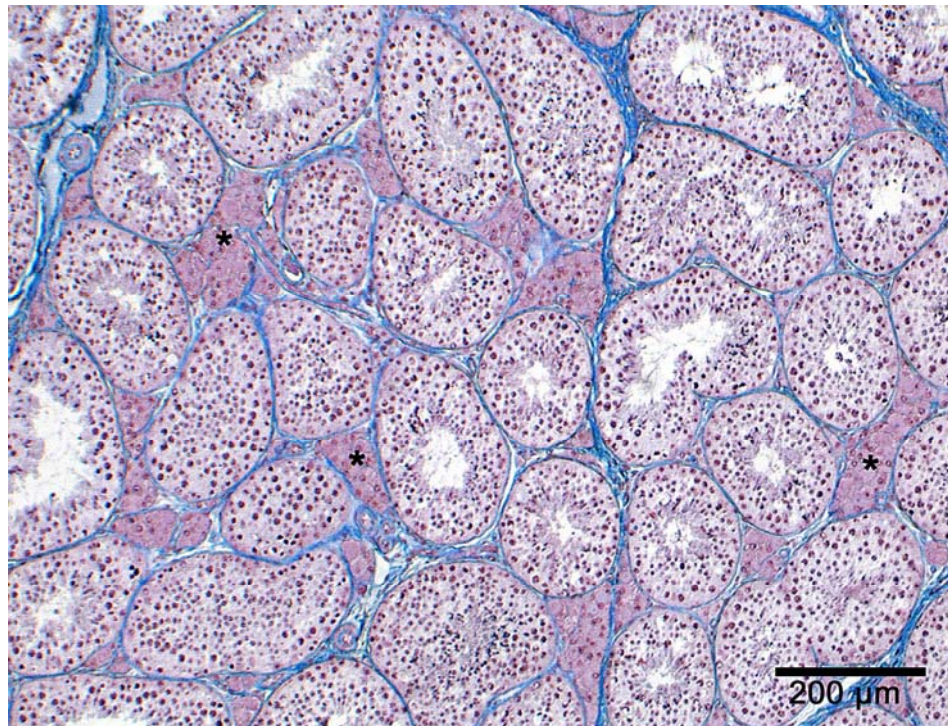


Abb. 5: Übersichtsbild vom Hodengewebe (Hengst, 3 Jahre) innerhalb der Zucht-saison. Zarte *Septula testis* unterteilen das Hodengewebe in Läppchen. Zwischen den Längs- und Querschnitten der Samenkanälchen, sind in Gruppen die Leydig-Zellen (*) lokalisiert. Azanfärbung.

Die stark aufgewundenen Samenkanälchen erscheinen im Querschnitt rund bis oval und weisen einen Querschnitt zwischen 100 µm und 230 µm auf. Die *Tubuli seminiferi* sind von einer kräftigen, mehrlagigen Basalmembran unterlagert, um die sich kontraktile

Myozyten gruppieren. Die Myozyten stellen sich als längliche, schmale Zellen mit einem spindelförmigen Kern dar.

Das Epithel der *Tubuli seminiferi contorti* besteht aus den Sertoli-Zellen und den Keimzellen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Die regelmäßig eingestreuten Sertoli-Zellen sitzen der Basalmembran mit breiter Basis auf, verjüngen sich lumenwärts und stehen über seitliche Ausläufer mit ihren Nachbarzellen in Kontakt. Auffällig im lichtmikroskopischen Bild ist der charakteristische Zellkern, der im basalen Drittel liegt. Er hat beim Pferd eine längsovale bis birnenförmige Gestalt und einen deutlichen Nukleolus. Zudem kommen je nach Schnittebene Invaginationen der Kernmembran zur Beobachtung. Zwischen den ausgedehnten Fortsätzen der Sertoli-Zellen befinden sich von basal nach luminal und je nach Stadium des Keimepithelzyklus Spermatogonien, Spermatozyten I. und II. Ordnung sowie runde und elongierte Spermatisden. Luminal schließen sich Gruppen ausdifferenzierter Spermien an. A-Spermatogonien ruhen unmittelbar auf der Basalmembran. Sie haben eine runde Form und einen querovalen Kern, der von einem relativ dunklen Zytoplasma umgeben ist. B-Spermatogonien sind etwas kleiner als die A-Spermatogonien und besitzen eine kugelige bis ovale Gestalt. Primäre Spermatozyten (Spermatozyten I. Ordnung) sind im basalen Drittel lokalisiert und ihre Kerne zeigen typische Konfigurationen der Chromosomen, wie sie für die verschiedenen Stadien der prolongierten Prophase (Leptotän, Zygotän, Pachytän, Diplotän, Diakinese) charakteristisch sind. Die sekundären Spermatozyten (Spermatozyten II. Ordnung) sind nur in einer kurzen Zeitspanne sichtbar, da sich der ersten Reifeteilung sehr rasch die zweite Reifeteilung anschließt. Sie sind zwischen primären Spermatozyten und runden Spermatisden anzutreffen. Diese liegen gruppiert unterhalb der elongierten Spermatisden, die sich luminal anschließen. Die elongierten Spermatisden sind langgestreckt und schmal. Der stark gefärbte Zellkern dominiert ihr Erscheinungsbild.

In den Samenkanälchen finden sich unterschiedliche Keimzellkombinationen, die einzelne Phasen des Keimepithelzyklus darstellen (Abb. 6 bis 13). Je nach Schnittebene der Samenkanälchen können im Querschnitt nicht nur ein Stadium, sondern bisweilen auch zwei oder mehr unterschiedliche Stadien beobachtet werden.

Im **Stadium I** sitzen die A-Spermatogonien der Basalmembran auf. Ihnen folgen zwei Generationen Spermatozyten I. Ordnung, ältere im Pachytän und jüngere im Leptotän. Lumennah liegen die runden Spermatisden. Typisch für Stadium I ist, dass ausgereifte Spermien im Schnittbild nicht nachzuweisen sind (Abb. 6).

Im **Stadium II** sind die jüngeren Spermatozyten I. Ordnung im Zygotän zu beobachten.

Teile des Karyoplasmas erscheinen ungefärbt, da sich das chromosomale Material lokal an der Kernmembran konzentriert (Paarung der homologen Chromosomen). Außerdem strecken sich in dieser Phase die Spermatiden und ihr Kern erscheint zunehmend dunkler. Sie beginnen in die Akrosomenphase einzutreten (Abb. 7).

In **Stadium III** sind die älteren primären Spermatozyten im Diplotän, ergänzt durch eine zweite jüngere Generation Spermatozyten I. Ordnung, die sich im Zygotän befindet. Die Spermatiden richten sich mit der Akrosomenkappe zur Basalmembran aus. Sie sind in Gruppen angeordnet und stehen in engem Kontakt mit den Ausläufern der Sertoli-Zellen. Der Spermatidenkern nimmt die Form des typischen Spermienkopfes an. Während die Kernkondensation abgeschlossen ist, hat die Ausbildung des Schwanzes noch keinen Abschluss gefunden (Abb. 8).

Stadium IV enthält Spermatozyten I. Ordnung im Zygotän und Diplotän, Spermatozyten II. Ordnung und runde Spermatiden. Die Kerne der Spermatiden, die sich in der späten Akrosomen- und frühen Reifephase befinden, kondensieren weiter und es bildet sich die typische Kopfform aus (Abb. 9).

Im **Stadium V** tritt eine neue Generation von rundkernigen Spermatiden auf. Es existieren nun runde und elongierte Spermatiden, aber nur noch eine Generation Spermatozyten I. Ordnung (Abb. 10).

Im **Stadium VI** treten erstmals B-Spermatogonien auf. Auf eine Generation Spermatozyten I. Ordnung (Pachytän) folgen zwei Generationen Spermatiden. Die runden durchlaufen die Golgiphase und setzen sich gemeinsam in den Ausläufern der Sertoli-Zellen fest. Die elongierten, die sich in der Reifungsphase befinden, beginnen sich lumenwärts zu verlagern (Abb. 11).

Stadium VII ist charakterisiert durch primäre Spermatozyten, die sich in der Prophase der Meiose befinden. Die runden Spermatiden durchlaufen die Kappenphase und die elongierten verlagern sich luminal.

Charakteristisch für die letzte Phase (**Stadium VIII**) des Keimepithelzyklus ist die Abgabe der reifen Spermatiden ins Tubuluslumen. Die Residualkörperchen bleiben als Rest der sich ausdifferenzierenden Spermien zurück und werden ins Lumen abgegeben bzw. von den Sertoli-Zellen phagozytiert. Die nachrückenden runden Spermatiden wechseln von der Golgiphase in die Kappenphase. Basal sind Spermatogonien und primäre Spermatozyten aufzufinden.

Saisonale Unterschiede in der Zellzusammensetzung der Samenkanälchen oder dem Aufbau des interstitiellen Gewebes können lichtmikroskopisch nicht nachgewiesen werden.

Übersicht über die Stadien des Keimepithelzyklus beim Hengst

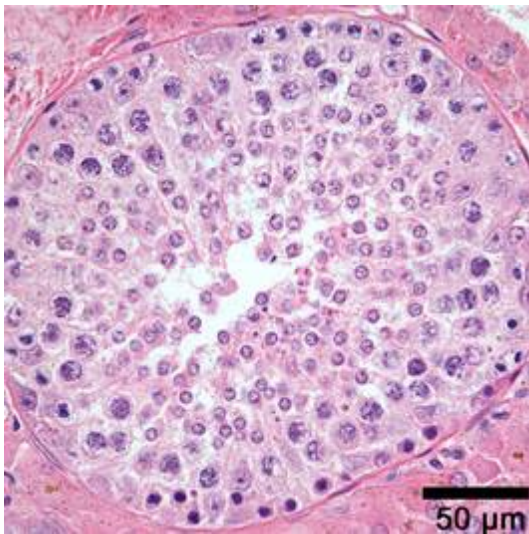


Abb. 6: Stadium I

Spermatozyten I. Ordnung und frühe Spermatisden dominieren das Zellbild. Spermien sind nicht nachzuweisen. Färbung Hämatoxilin-Eosin (HE).

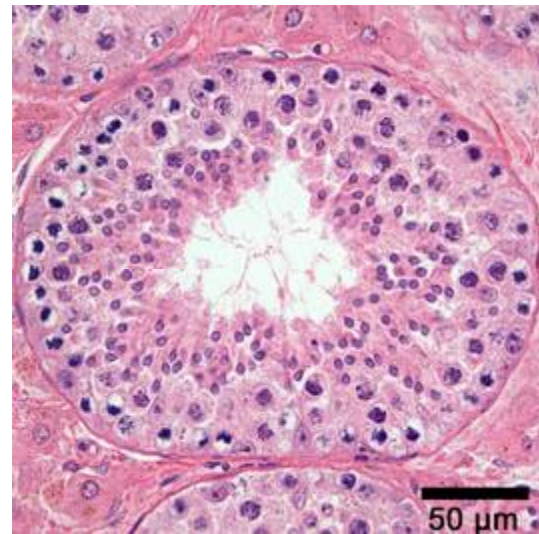


Abb. 7: Stadium II

Es sind Spermatogonien und viele primäre Spermatozyten zu beobachten, die sich im Zygotän befinden. Außerdem treten elongierte Spermatisdenkerne auf. HE.

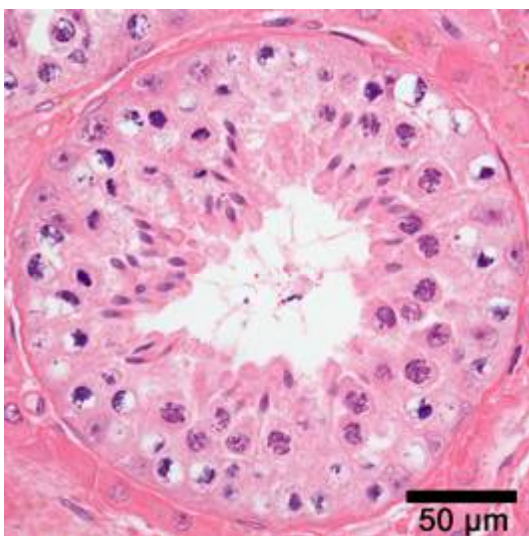


Abb. 8: Stadium III

Es treten zwei Generationen primärer Spermatozyten auf. Die Spermatisden richten sich mit den Akrosomenkappen zur Basalmembran aus. HE.

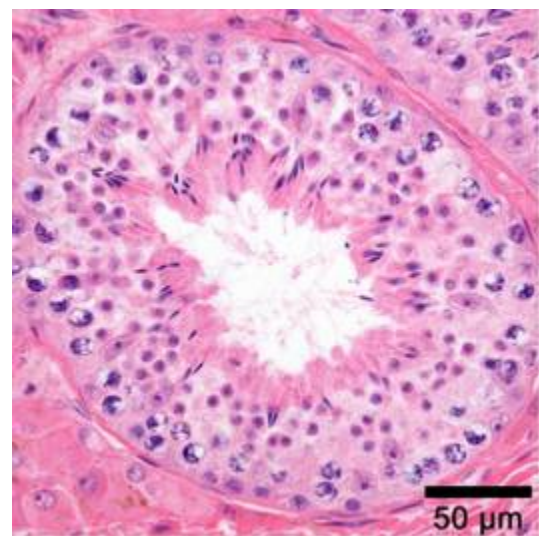


Abb. 9: Stadium IV

Dieses Stadium ist durch das Auftreten zweier Generationen primärer Spermatozyten, sekundärer Spermatozyten und runder Spermatisden gekennzeichnet. HE.

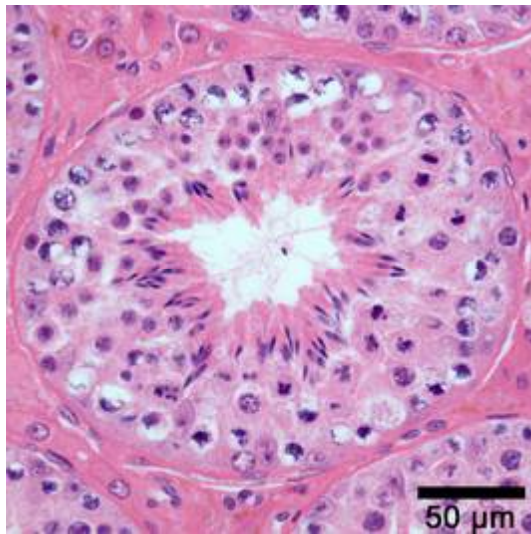


Abb. 10: Stadium V

Hier sind Spermatogonien, ergänzt durch nur noch eine Generation primärer Spermatozyten zu beobachten. Hinzu kommen tief eingebettete Bündel elongierter Spermatisden. HE.



Abb. 11: Stadium VI

Von der Basalmembran aus Richtung Lumen sind runde schmale Spermatogonien, eine Generation primärer Spermatozyten im Pachytän und runde Spermatisden zu beobachten. Elongierte Spermatisden beginnen zu wandern. HE.

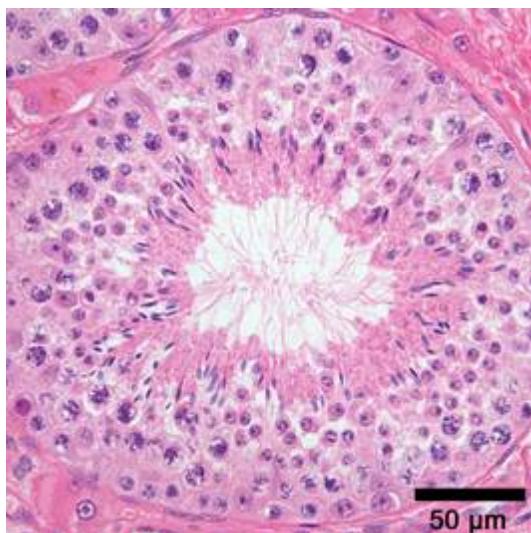


Abb. 12: Stadium VII

Die elongierten Spermatisdenkerne wandern weiter in Richtung Lumen. Akrosomenkappen bedecken den Kern der runden Spermatisden. HE.

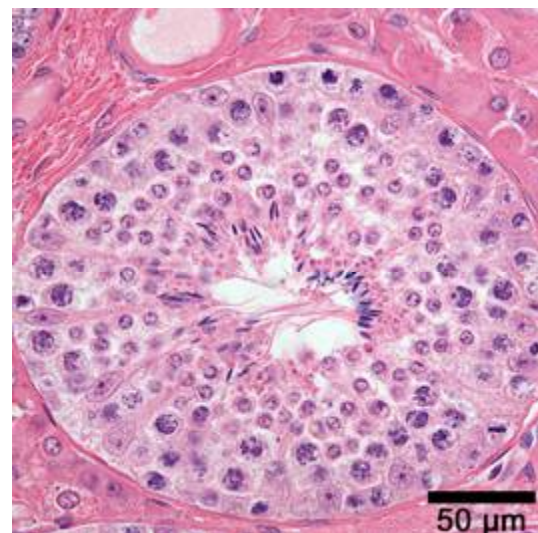


Abb. 13: Stadium VIII

Deutlich erkennbar sind die zurückbleibenden Residualkörper nach Abgabe der ausgereiften Spermien ins Lumen. HE.

Im intertubulären Bereich dominieren die Leydig-Zellen. Sie sind im Interstitium zwischen den Samenkanälchen, in Gruppen oder Strängen, angeordnet und von Kapillaren umgeben. Leydig-Zellen haben ein unterschiedliches färberisches Verhalten. Das Auffinden von stark und weniger stark gefärbten Leydig-Zellen deutet darauf hin, dass sich nicht alle Leydig-Zellen in gleichem Funktionszustand befinden. Leydig-Zellen besitzen eine polygonale Form. Das Zytoplasma der Leydig-Zellen stellt sich in homogener Dichte dar, nur in Randbereichen wirkt es punktuell schaumig. Der runde und euchromatinreiche Kern mit deutlichem Nukleolus nimmt oft eine exzentrische Position ein. Bei jungen Tieren sind die Leydig-Zellen bevorzugt in Gruppen in den Zwickeln zwischen den Hodenkanälchen lokalisiert. Bei älteren Hengsten ändert sich das Bild, hier sind die Leydig-Zellen nicht nur in den Zwickeln angeordnet, sondern umgeben die Hodenkanälchen vollständig.

Auch hier lassen sich keine Unterschiede in Zahl und Verteilung der Leydig-Zellen inner- und außerhalb der Zuchtsaison beobachten.

Das *Rete testis* liegt in einem kräftigen Bindegewebskörper (*Mediastinum testis*) und beschränkt sich beim Hengst auf den Kopfbereich des Hodens. Innerhalb des *Mediastinum testis* verlaufen, bevorzugt in axialer Richtung, stark anastomosierende Retekanälchen, die mit einem isoprismatischen Epithel ausgekleidet sind, das von einer Basalmembran unterlagert wird. Die Epithelzellen besitzen einen sehr großen Kern, der mehrere Nukleoli aufweist. Innerhalb der Lumina der Retekanälchen sind vereinzelt Spermien und Makrophagen zu beobachten. In der Nachbarschaft der Retekanälchen liegen zahlreiche großlumige, ebenfalls längsorientierte Venen und Lymphgefäße, an denen Klappenstrukturen zu beobachten sind. Begleitet werden diese von einigen mittelgroßen Arterien (Abb. 14).

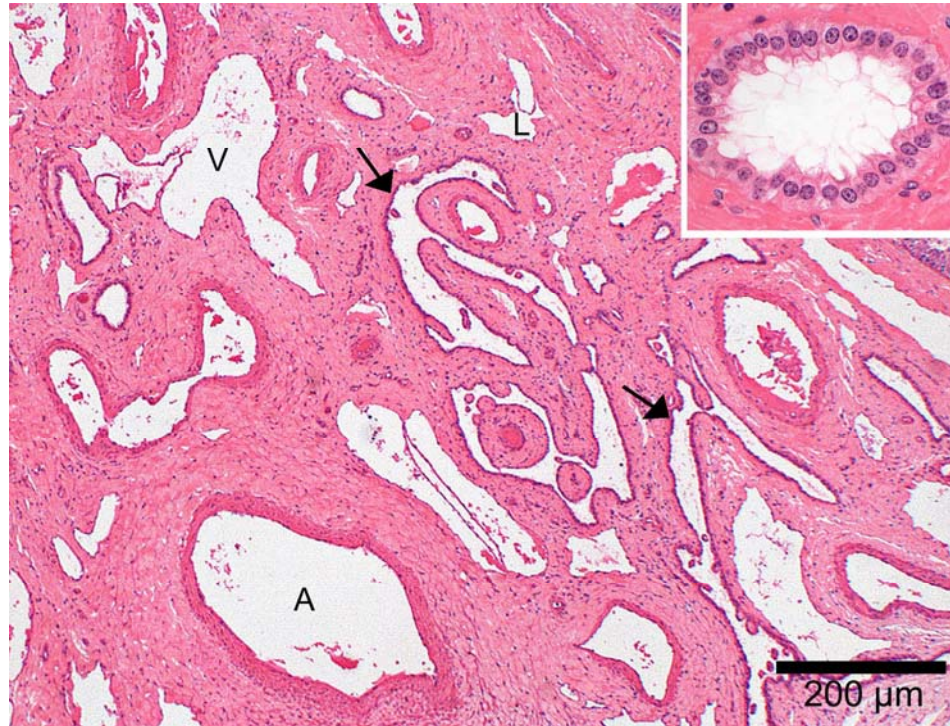


Abb. 14: Übersichtsbild vom Rete testis. Die Retekanalchen (→) sind von einem isoprismatischen Epithel ausgekleidet. In der Nachbarschaft liegen Lymphgefäße (L), Arterien (A) und Venen (V).
Insert: Ausschnittsvergrößerung aus einem Retekanalchen mit dem charakteristischen isoprismatischen Epithel. HE.

4.2 Immunhistochemie

4.2.1 Androgenrezeptor (AR)

Bei allen untersuchten Altersstufen kann sowohl im Untersuchungsmaterial, das im Sommer als auch im Winter gewonnen wurde, eine moderate (+) bis starke (+++) nukleäre Expression des Androgenrezeptors (AR) in nahezu allen Zelltypen des Hodens nachgewiesen werden. Zu beobachten ist die Kernfärbung in den Sertoli-Zellen, peritubulären Myozyten, Leydig-Zellen und Zellen der Retekanälchen (Tab. 6).

Auffällig sind die saisonalen Unterschiede in der AR-Expression in den Sertoli-Zellen. Innerhalb der Zuchtsaison ist eine deutlich stärkere Expression des AR als außerhalb der Zuchtsaison zu beobachten (Abb. 15 und 16). Darüber hinaus nimmt auch die Anzahl der Sertoli-Zellen, die den AR exprimieren, deutlich zu (Tab. 6). Zu beobachten ist zudem, dass sowohl im Untersuchungsmaterial vom Sommer als auch vom Winter die Kernfärbung der Sertoli-Zellen in den Stadien VI-VIII des Keimepithelzyklus am stärksten ist.

Unterschiede in Häufigkeit und Intensität der immunhistochemischen Reaktion treten auch in den Leydig-Zellen auf. So nimmt sowohl die Anzahl der markierten Zellen als auch die Intensität positiv gefärbter Zellen innerhalb der Zuchtsaison deutlich zu (Abb. 15 und Tab. 6). Darüber hinaus ist eine stärkere Markierung der Leydig-Zellen mit zunehmendem Alter der Tiere zu beobachten. Bemerkenswert ist auch, dass zusätzlich zur nukleären auch eine zytoplasmatische AR-Expression, insbesondere außerhalb der Zuchtsaison beobachtet werden kann.

Peritubuläre Myozyten zeigen stets eine starke nukleäre Expression des AR. Ähnliches gilt für die Epithelzellen der Retekanälchen, wobei allerdings eine geringgradige Zunahme der Intensität innerhalb der Zuchtsaison zu vermerken ist.

Eine nukleäre Expression des AR in glatten Muskelzellen von arteriellen Blutgefäßwänden ist gelegentlich zu beobachten.

	innerhalb der Zuchtsaison		außerhalb der Zuchtsaison	
	A	I	A	I
Sertoli-Zellen	+++	+++	+	+
Leydig-Zellen	+++	+++	++	++
peritubuläre Myozyten	+++	+++	+++	+++
Epithel der Retekanalchen	+++	+++	+++	++

Tab. 6: AR-Expression im Hengsthoden inner- und außerhalb der Zuchtsaison. Übersicht über die Anzahl (A) markierter Zellen und die Intensität (I) der Reaktion.

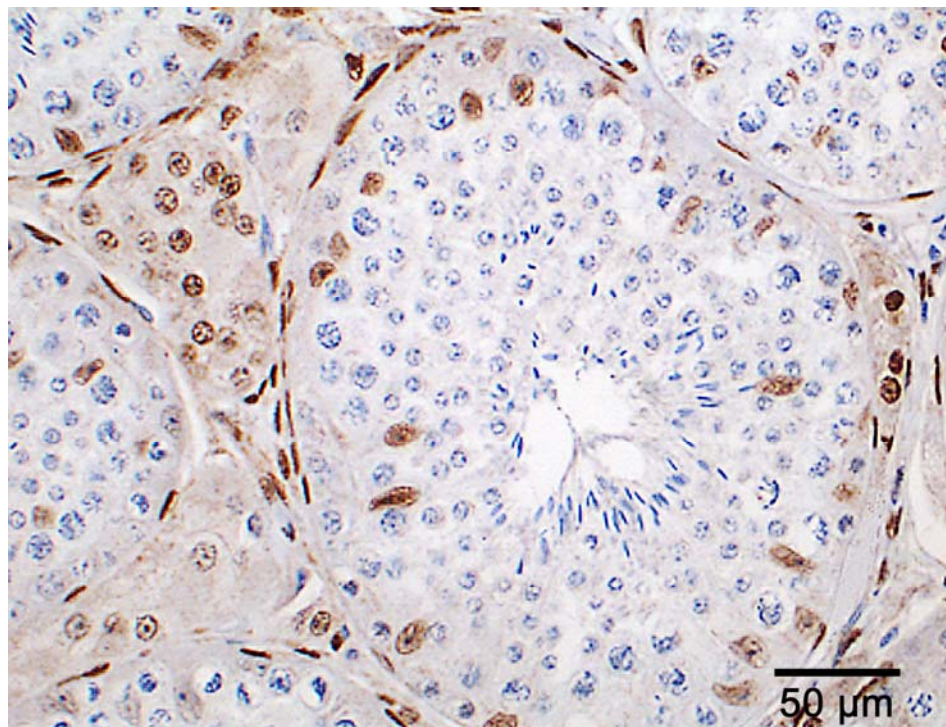


Abb. 15: Starke Expression des AR in zahlreichen Sertoli-Zellen innerhalb der Zuchtsaison (Hengst, 4 Jahre). DAB-Reaktion mit Hämalaun-Gegenfärbung.

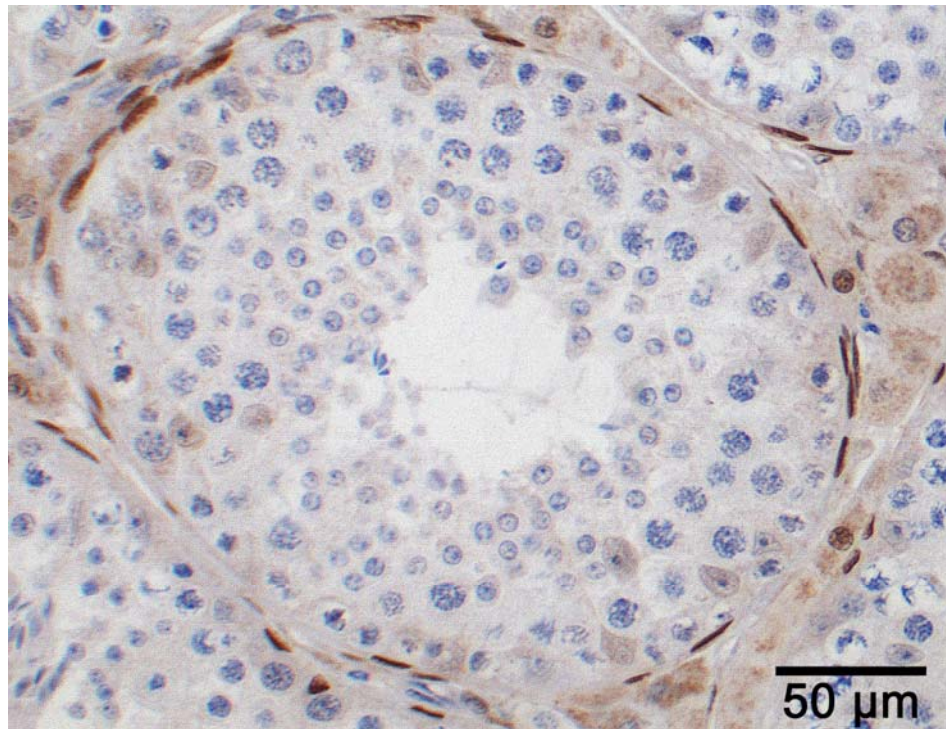


Abb. 16: Im Gegensatz dazu, schwächere Expression des AR in Sertoli-Zellen und Leydig-Zellen außerhalb der Zuchtsaison (Hengst, 5 Jahre). DAB-Reaktion mit Hämalaun-Gegenfärbung.

4.2.2 Progesteronrezeptor (PR)

In den Keimdrüsen des Hengstes zeigen viele Zelltypen ein schwaches (+/-) bis starkes (+++) nukleäres Bindungsmuster für den PR (Tab. 7). Unterschiede in der Intensität der beobachteten Reaktion fallen besonders bei den Sertoli-Zellen und Leydig-Zellen auf. In den Proben innerhalb der Zuchtsaison sind die Kerne der Sertoli-Zellen deutlicher markiert als außerhalb der Zuchtsaison. Des Weiteren steigt auch die Anzahl der positiv markierten Zellen an. Leydig-Zellen zeigen nur innerhalb der Zuchtsaison eine Expression des PR.

Bei den Keimzellen sind insbesondere alle primären Spermatozyten, sekundäre Spermatozyten sowie die runden Spermatozyten unabhängig vom Zeitpunkt der Probenentnahme stark positiv gefärbt. Spermatozyten hingegen weisen in keinem Stadium des Keimepithelzyklus weder inner- noch außerhalb der Zuchtsaison eine positive Markierung für den PR auf. Gleiches gilt für elongierte und ausgereifte Spermien. Peritubuläre Myozyten lassen stets eine moderate positive Reaktion im Zellkern der Proben erkennen (Abb. 17). Geringgradig stärker ausgeprägt ist die Intensität der PR-Expression in den Kernen der Epithelzellen der Retekanälchen und es bestehen keine jahreszeitlichen Unterschiede.

	innerhalb der Zuchtsaison		außerhalb der Zuchtsaison	
	A	I	A	I
Sertoli-Zellen	+++	+++	++	+
Spermato gonien	-	-	-	-
primäre Spermatozyten	+++	+++	+++	+++
sekundäre Spermatozyten	+++	+++	+++	++
runde Spermatozyten	+++	+++	+++	+++
elongierte Spermatozyten	-	-	-	-
Spermien	-	-	-	-
Leydig-Zellen	+	++	-	-
peritubuläre Myozyten	+/-	+	+/-	+/-
Epithel der Retekanälchen	++	+	++	+

Tab. 7: Übersicht zur nukleären PR-Expression im Hoden von Hengsten inner- und außerhalb der Zuchtsaison. Dargestellt sind die Anzahl (A) markierter Zellen und die Intensität (I) der Reaktion.

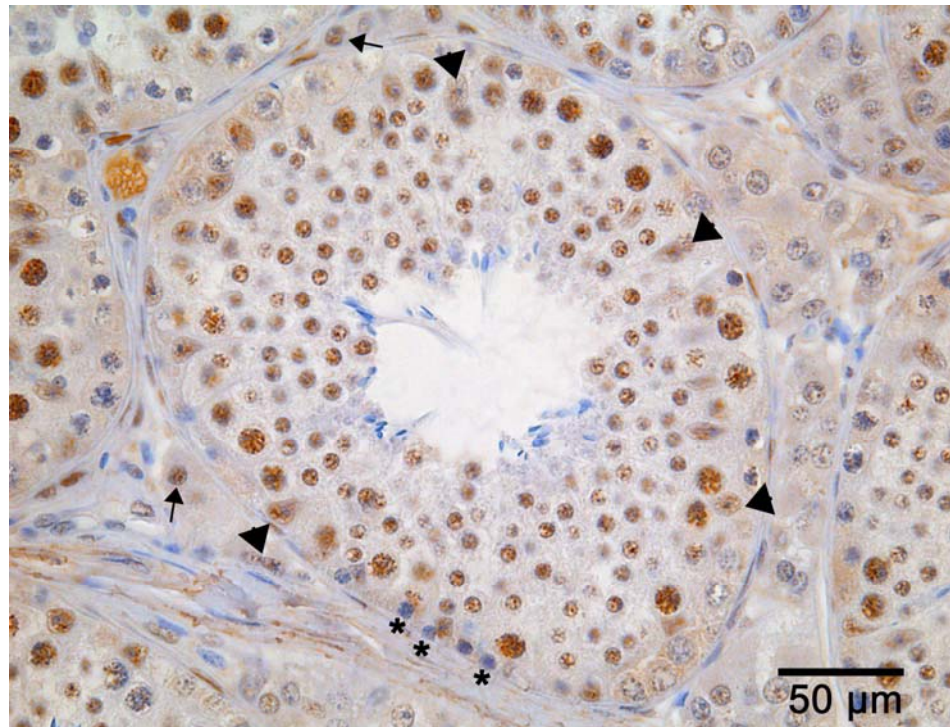


Abb. 17: Innerhalb der Zuchtsaison exprimieren Keimzellen in den unterschiedlichen Stadien und Sertoli-Zellen (Pfeilkopf) den PR. Vereinzelt positive Markierung der Leydig-Zellkerne (\rightarrow). Keine Markierung in den Spermatogonien (*). Hengst, 3 Jahre alt. DAB-Reaktion mit Hämalaun-Gegenfärbung.

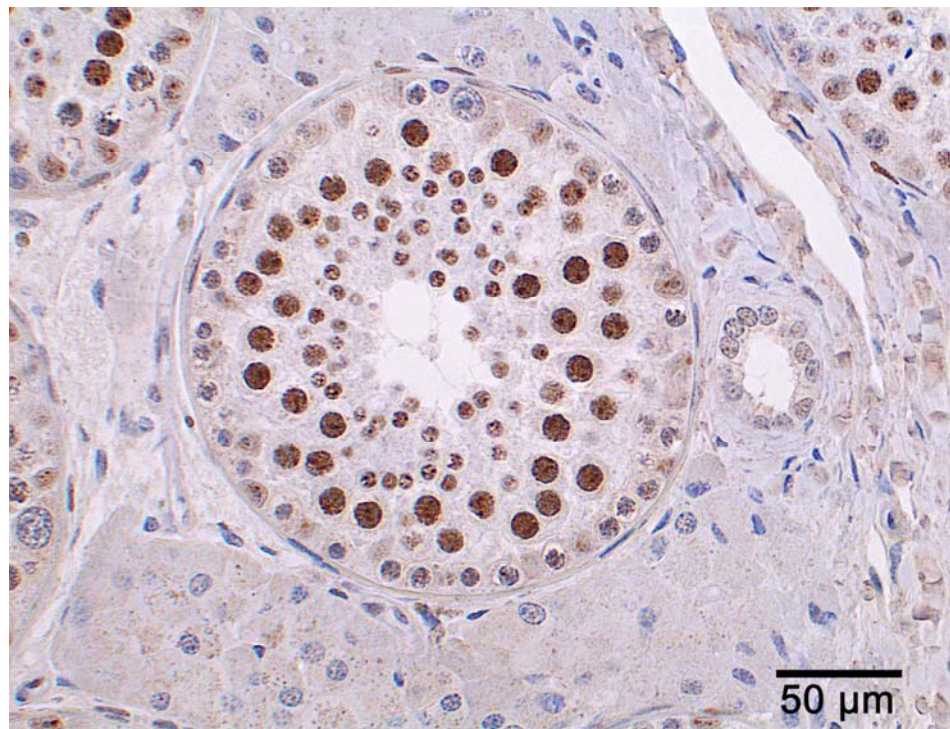


Abb. 18: Außerhalb der Zuchtsaison wird der PR im Hengsthoden stark in Spermatozyten I. und II. Ordnung exprimiert. Leydig-Zellen sind stets unmarkiert. Hengst, 3,5 Jahre alt. DAB-Reaktion mit Hämalaun-Gegenfärbung.

4.2.3 Östrogenrezeptor (ER)

Der Östrogenrezeptor β (ER β) wird innerhalb der Zuchtsaison nukleär in den Spermatogonien, primären und sekundären Spermatozyten, runden Spermatiden sowie gelegentlich in den Leydig-Zellen exprimiert (Tab. 8). Bei Spermatogonien und den Spermatozyten I. und II. Ordnung variiert das Expressionsmuster nicht zwischen den Jahreszeiten. Demgegenüber ist die positive Markierung der runden Spermatiden innerhalb der Zuchtsaison stärker ausgeprägt (Abb. 19). In elongierten Spermatiden und ausgereiften Spermien gelingt zu keinem Zeitpunkt der Probenentnahme der Nachweis von ER β .

Außerhalb der Zuchtsaison wird ER β in Spermatogonien, primären und sekundären Spermatozyten, runden Spermatiden sowie in den Leydig-Zellen und den Sertoli-Zellen exprimiert (Abb. 20).

Unabhängig vom Zeitraum der Probenentnahme zeigen einige wenige peritubuläre Myozyten (Abb. 20) und zahlreiche Epithelzellen der ReteKanälchen eine positive Expression.

	innerhalb der Zuchtsaison		außerhalb der Zuchtsaison	
	A	I	A	I
Sertoli-Zellen	-	-	++	++
Spermatogonien	++	++	++	++
primäre Spermatozyten	++	++	++	++
sekundäre Spermatozyten	++	++	++	++
runde Spermatiden	++	++	+/-	+/-
elongierte Spermatiden	-	-	-	-
ausgereifte Spermien	-	-	-	-
Leydig-Zellen	+/-	+/-	++	++
peritubuläre Myozyten	+	+/- bis +	+	+/- bis +
Epithel der Rete-kanälchen	+++	+	+++	+

Tab. 8: Expression von ER β in Hoden von Hengsten inner- und außerhalb der Zuchtsaison. Dargestellt sind die Anzahl (A) markierter Zellen und die Intensität (I) der Reaktion.

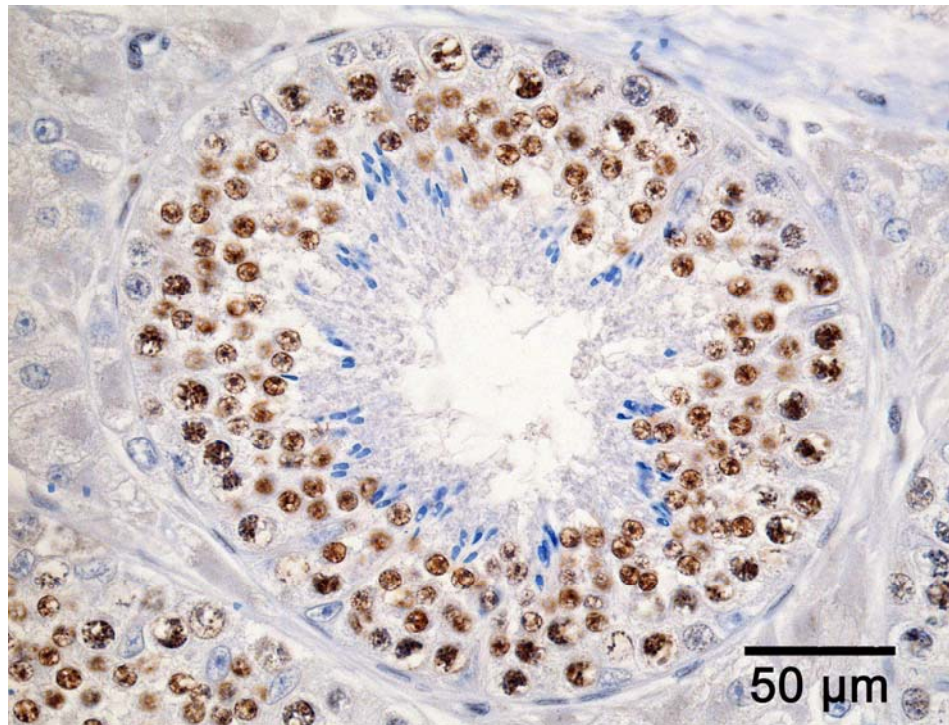


Abb. 19: Innerhalb der Zuchtsaison exprimieren Spermatozyten I. und II. Ordnung den ER β . Sertoli-Zellen sind stets unmarkiert. Hengst, 3 Jahre. DAB-Reaktion mit Hämalaun-Gegenfärbung.

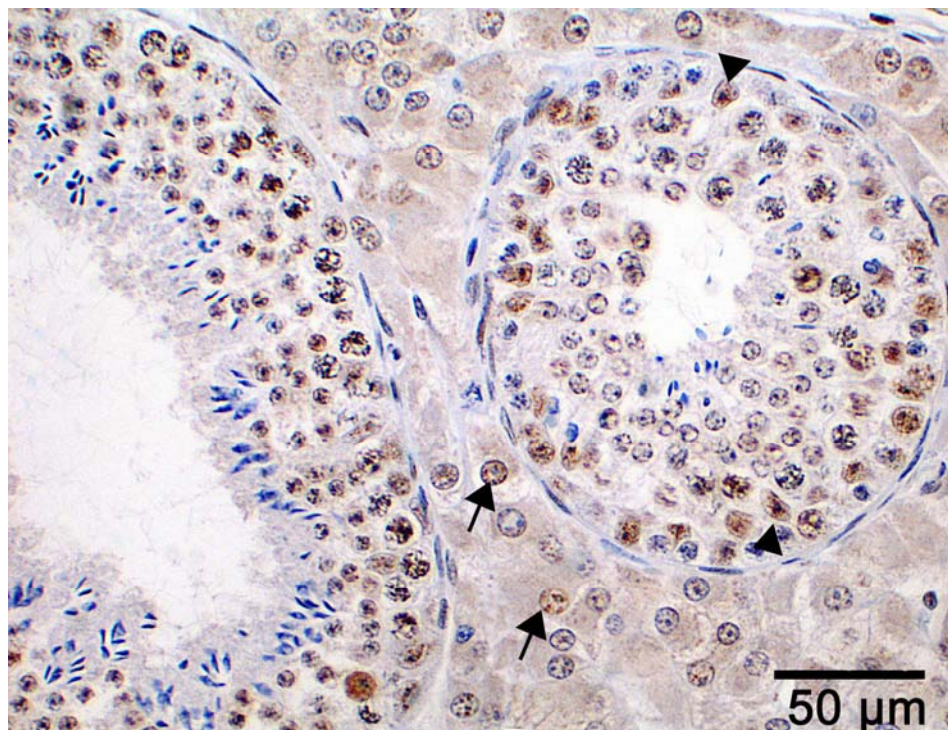


Abb. 20: Expression von ER β außerhalb der Zuchtsaison: deutlich markiert sind Sertoli-Zellen (Pfeilkopf) und Keimzellen in unterschiedlichen Entwicklungsphasen. Moderate Expression von ER β in den Leydig-Zellen (\rightarrow). Hengst, 4 Jahre. DAB-Reaktion mit Hämalaun-Gegenfärbung.

4.2.4 P450-Aromatase (P450-Arom)

Im Hoden des Hengstes lässt sich die Expression der P450-Aromatase (P450-Arom) ausschließlich in den Leydig-Zellen in unterschiedlicher Intensität beobachten. Da die Färbung innerhalb der Zellgruppen unterschiedlich ausgeprägt ist, bekommen diese ein mosaikähnliches Muster (Abb. 21). Die P450-Arom ist nur im Zytoplasma lokalisiert. Die Anzahl der Leydig-Zellen mit einer deutlichen Markierung nimmt mit dem Alter der Tiere zu. Des Weiteren tritt ein jahreszeitlicher Unterschied in dieser Merkmalsausprägung auf. Innerhalb der Zuchtsaison steigt die Zahl und die Intensität positiv markierter Zellen an.

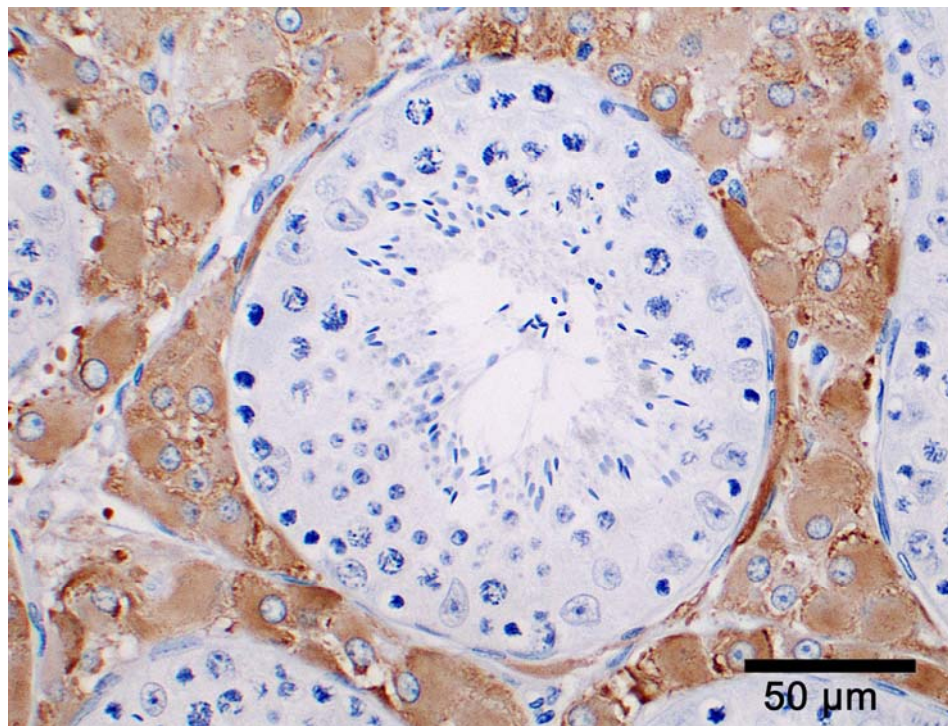


Abb. 21: Starke P450-Aromatase-Expression im Zytoplasma der Leydig-Zellen innerhalb der Zuchtsaison (Hengst, 3 Jahre). DAB-Reaktion mit Hämalaun-Gegenfärbung.

4.2.5 Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)

PCNA wird in Zellkernen während der G1-, S- und G2/M-Phase des Zellzyklus exprimiert und kann somit als Proliferationsmarker eingesetzt werden. PCNA-positive Spermatogonien und PCNA-positive Spermatozyten I. Ordnung sind in allen Samenkanälchen und in den unterschiedlichen Stadien des Keimepithelzyklus nachweisbar. Der mitotische Index, d.h. der prozentuale Anteil der positiven Kerne an der Gesamtzahl der Keimzellen, wurde bei allen Tieren für Spermatogonien und Spermatozyten I. Ordnung ermittelt.

In den Abbildungen 22 und 23 ist der Unterschied mitotisch aktiver Spermatogonien und Spermatozyten I. Ordnung innerhalb (Abb. 22) und außerhalb (Abb. 23) der Zuchtsaison dargestellt. Die Anzahl mitotisch aktiver Spermatogonien ist außerhalb der Zuchtsaison größer als innerhalb der Zuchtsaison.

Weder Sertoli-Zellen noch Leydig-Zellen zeigen eine mitotische Aktivität.

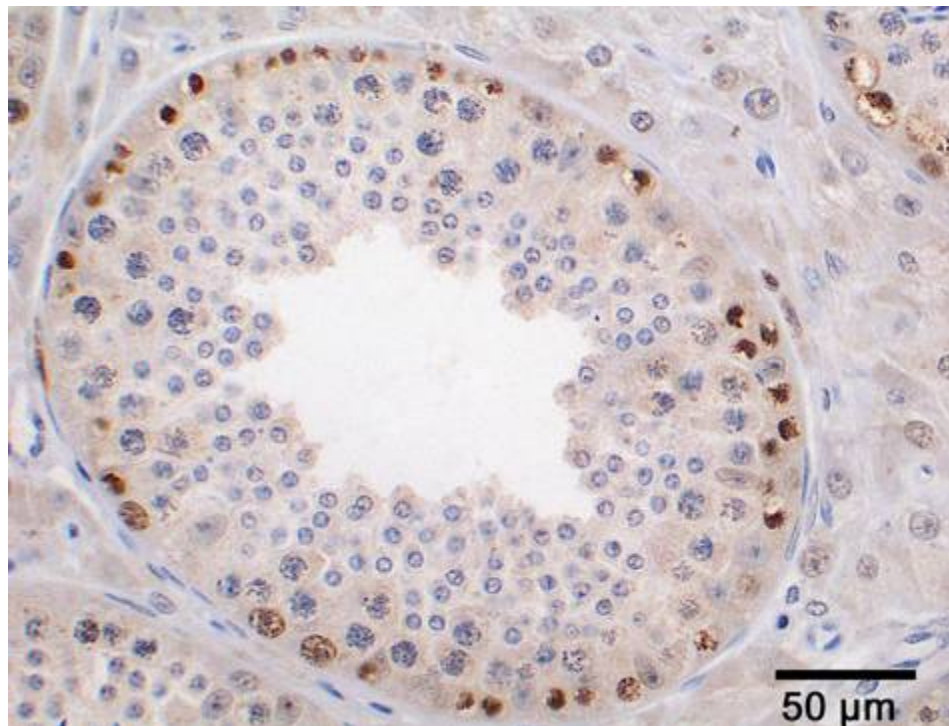


Abb. 22: Expression von PCNA innerhalb der Zuchtsaison sowohl in Spermatogonien als auch Spermatozyten I. Ordnung (Hengst, 4 Jahre). DAB-Reaktion mit Hämalaun-Gegenfärbung.

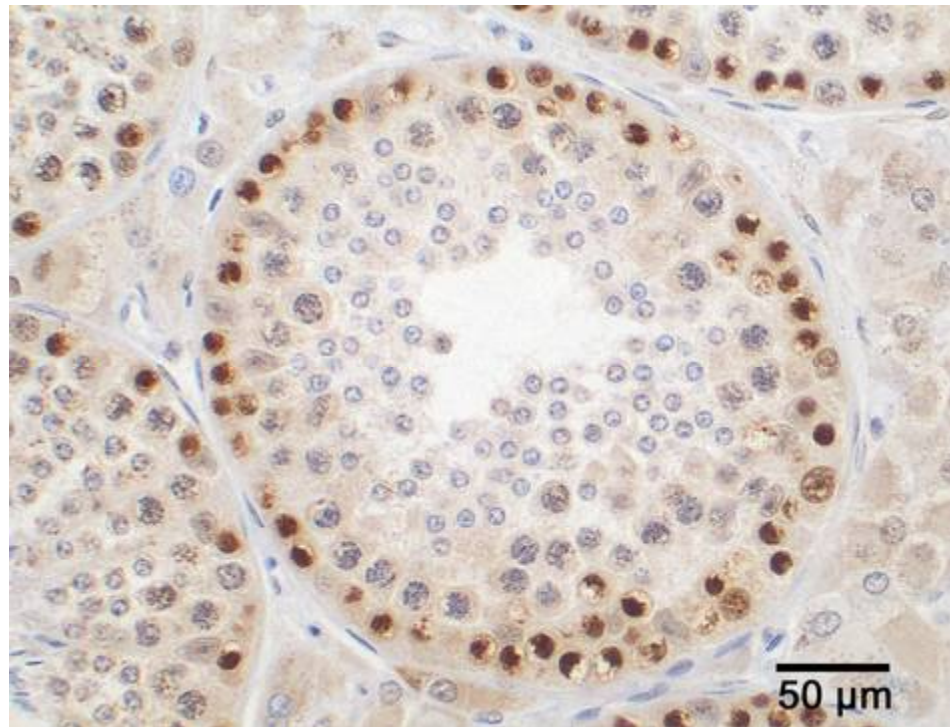


Abb. 23: Starke Zunahme mitotisch aktiver Spermatogonien und Spermatozyten I. Ordnung außerhalb der Zuchtsaison (Hengst, 8 Jahre). DAB-Reaktion mit Hämalaun-Gegenfärbung.

Im Diagramm (Abb. 24) sind die Werte für den mitotischen Index von Spermatogonien in allen acht Stadien des Keimepithelzyklus bei jeweils vierjährigen Hengsten innerhalb und außerhalb der Zuchtseason in Prozent graphisch dargestellt. Ausgewählt wurden zwei nahezu gleichaltrige Tiere, damit die Werte ohne Altersabhängigkeiten zum Vergleich kommen. Der mitotische Index beträgt bei vierjährigen Hengsten im Sommer 7 % und steigt im Winter auf 11% an.

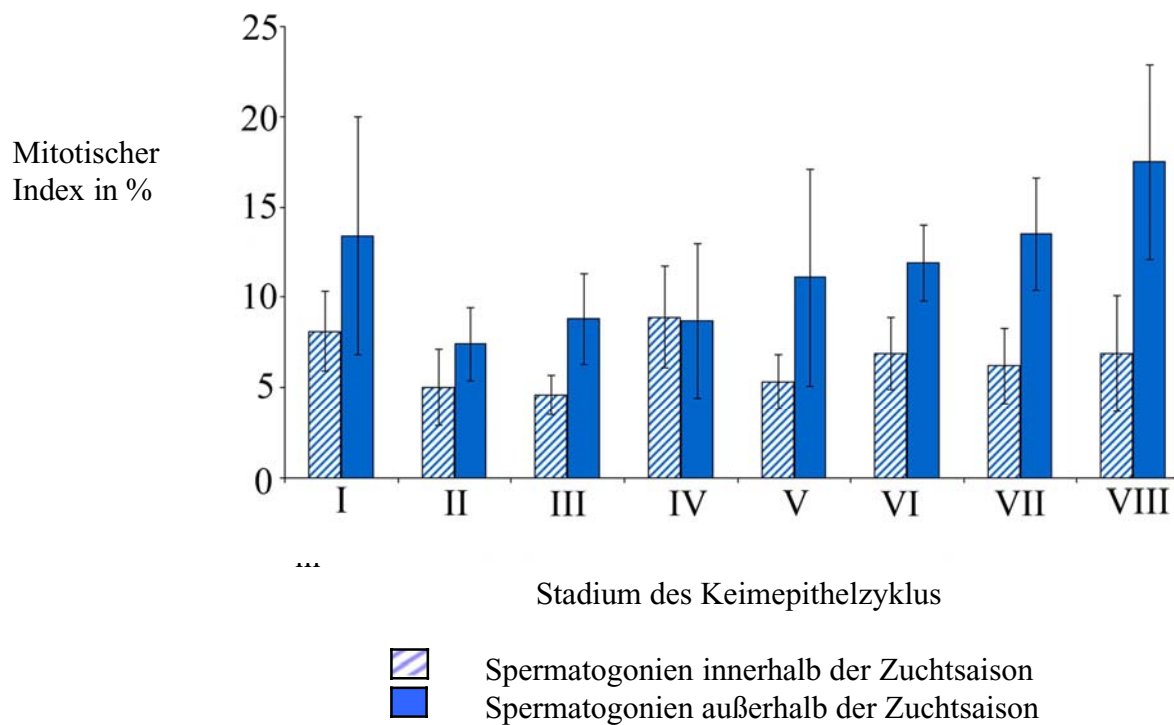


Abb. 24: Mitotischer Index der Spermatogonien in den Phasen des Keimepithelzyklus beim Hengst. Vergleich innerhalb und außerhalb der Zuchtseason bei jeweils vierjährigen Hengsten. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung.

4.2.6 **α -smooth muscle actin (α -SMA)**

Eine starke Expression von α -SMA findet sich altersunabhängig in allen peritubulären Myozyten des Hodengewebes. Unabhängig von der Jahreszeit werden alle gewundenen und geraden Samenkanälchen von einer Lage deutlich bis stark markierter Myozyten eingerahmt (Abb. 25).

Die deutliche Abgrenzung der Samenkanälchen vereinfacht die semiquantitative Auswertung der Tubuliquerschnitte. Dabei fällt auf, dass die Durchmesser der Samenkanälchen mit zunehmendem Alter der Tiere größer werden, signifikante saisonale Unterschiede allerdings nicht bestehen (Abb. 26).

Darüber hinaus ist in der Media zahlreicher Blutgefäße sowie in vereinzelt Zellen des Mesenchyms eine deutliche bis starke Immunreaktion zu beobachten. Die einzelnen Muskelfasern um die Retekanälchen färben sich deutlich bis stark an.

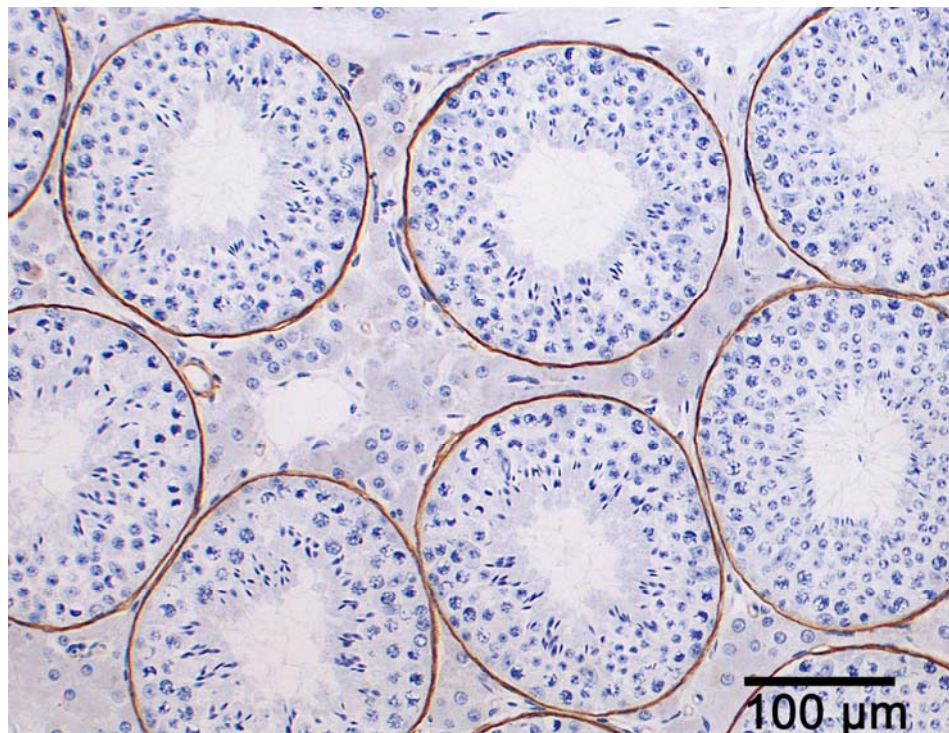


Abb. 25: Mit Hilfe von α -SMA wird die Abgrenzung der Samenkanälchen durch peritubuläre Myozyten deutlich. Markiert sind die Myoepithelzellen. Außerhalb der Zuchtseason (Hengst, 5 Jahre). DAB-Reaktion mit Hämalaun-Gegenfärbung.

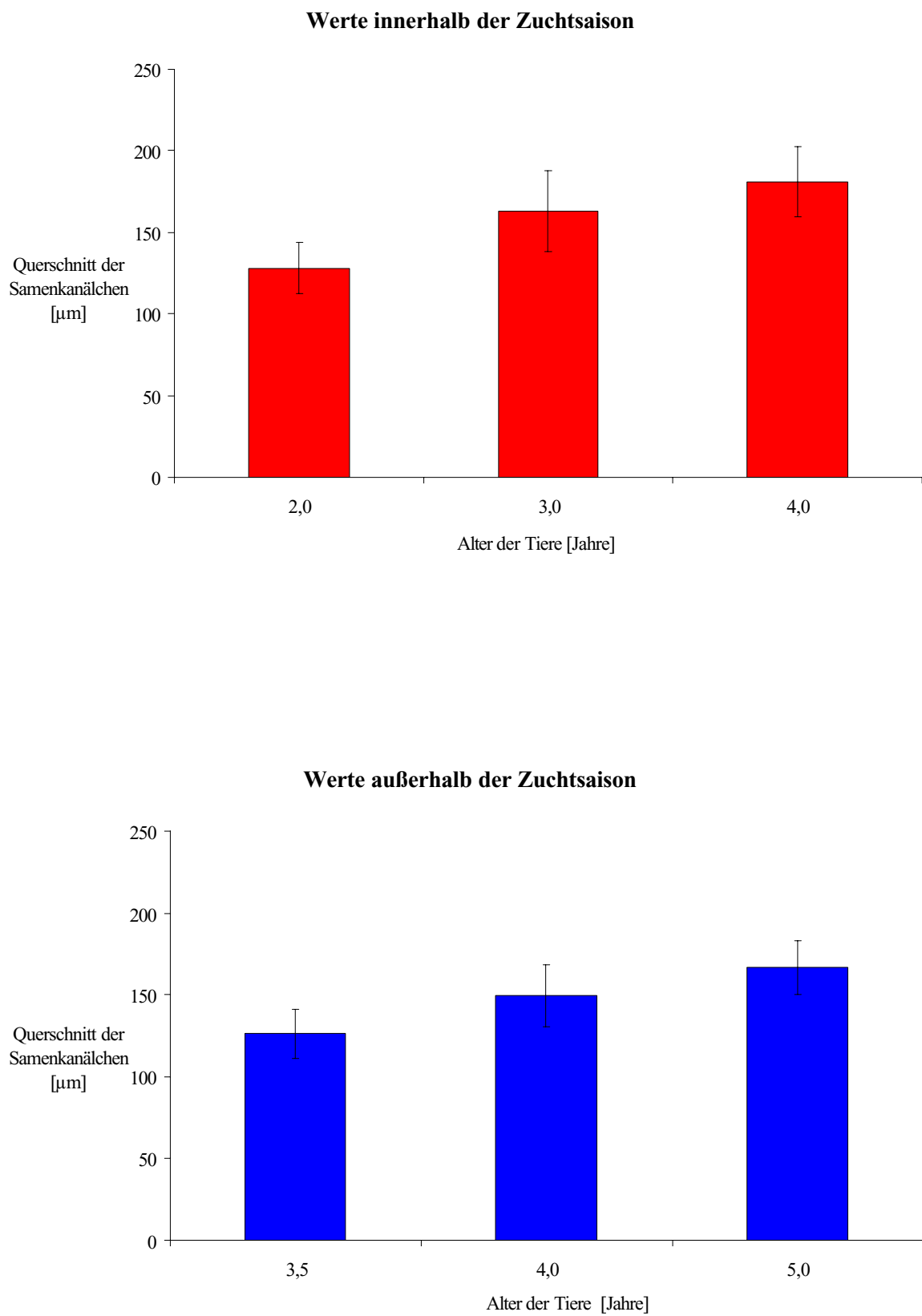


Abb. 26: Vergleich der Querschnitte von Samenkanälchen innerhalb und außerhalb der Zuchtsaison. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung.

5 Diskussion

Die Erfassung jahreszeitlicher Veränderungen von Reproduktionsmerkmalen des Hengstes war bereits Gegenstand mehrerer Untersuchungen. Das Hauptinteresse galt dabei dem Vorkommen testikulärer Sexualhormone im Blut- und Seminalplasma (Berndtson et al., 1974; Hoffmann und Landeck, 1999) und der Analyse von Fortpflanzungsparametern, wie Sexualverhalten (Pickett et al., 1970; Clay und Clay, 1992), Samenqualität (Janett et al., 2003) und Spermienmotilität (Jasko et al., 1991). Arbeiten, die sich mit der Feinstruktur der Keimdrüsen befassen, fokussieren vor allem auf numerische Veränderungen der Keimzellpopulationen (Johnson und Nguyen, 1986; Johnson und Thompson, 1987; Schön et al., 2004). Daten zur saisonalen Expression von Hormonrezeptoren in den verschiedenen Stadien während des Keimepithelzyklus fehlen vollständig.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, mit Hilfe licht- und immunhistochemischer Methoden umfassende Detailkenntnisse über die Expression und topographische Verteilung von Androgen-, Östrogen- und Progesteronrezeptoren, sowie der P450-Aromatase zu erarbeiten. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf stadienspezifische Expressionsunterschiede während des Keimepithelzyklus gelegt. Hierzu wurden die Hoden von zehn geschlechtsreifen Hengsten verschiedener Rassen sowohl inner- als auch außerhalb der Zuchtsaison untersucht.

Androgene sind wichtige Botenstoffe für den männlichen Organismus. Mit ihrer AR-vermittelten Wirkung beeinflussen sie die männliche Embryonaldifferenzierung, die pubertäre Entwicklung und die Regulation der Spermatogenese. Hinsichtlich der Expression des Androgenrezeptors führten die vorliegenden Untersuchungen zu interessanten Ergebnissen. Es wurde deutlich, dass in allen untersuchten Altersstufen sowohl außer- als auch innerhalb der Zuchtsaison eine starke Expression in nahezu allen Zelltypen des Hodens, mit Ausnahme der Keimzellen, nachgewiesen werden konnte. Besonders auffällig war, dass der AR in deutlich stärkerer Expression in den Sertoli-Zellen innerhalb der Zuchtsaison gegenüber außerhalb der Zuchtsaison zu beobachten ist. Darüber hinaus fiel auf, dass die Kernfärbung in den Sertoli-Zellen in den Phasen VI bis VIII des Keimepithelzyklus verstärkt auftritt.

Die starke Expression des AR in den Sertoli-Zellen innerhalb der Zuchtsaison geht mit einer erhöhten Verfügbarkeit an Androgenen für die Sertoli-Zellen einher (Berndtson et al. 1974; Hoffmann und Landeck, 1999). Bekannt ist zudem, dass ein erhöhter

Androgenspiegel in der Zuchtsaison mit einer erhöhten Keimzellproduktion (Johnson, 1991) positiv korreliert ist und die Stimulierung der Sertoli-Zellen zu einem optimalen Mikromilieu beiträgt, so dass mehr Spermien ihre vollständige Reifung erfolgreich abschließen (Clay und Clay, 1992). Neuere Untersuchungen bestätigen, dass die über die Sertoli-Zellen vermittelten Androgeneffekte unabdingbar sind für die Keimzellreifung während der Meiose I, bei der Transformation der runden Spermatiden zu den elongierten und letztendlich während der Spermio-genese (Chang et al., 2004; de Gendt et al., 2004; Holdcraft und Braun, 2004). Andere Studien zeigen auf, dass aktivierte Sertoli-Zellen eine erhöhte Phagozytoseaktivität aufweisen, die ebenfalls mit einer verbesserten Spermio-genese in Zusammenhang gebracht wird (Bartke et al., 1991). Zusätzlich haben Meng et al. (2005) nachgewiesen, dass Testosteron über seinen Rezeptor in den Sertoli-Zellen die Expression von Claudin 3, einem Bestandteil neu gebildeter Tight junctions, reguliert und somit Einfluss auf die Ausbildung der Blut-Hoden-Schranke nimmt.

Die in dieser Arbeit dokumentierte erhöhte Expression des AR in Sertoli-Zellen während der Zuchtsaison stellt offensichtlich die Grundlage für eine verbesserte Ausbildung der Blut-Hoden-Schranke dar, durch die eine effiziente Spermatogenese gewährleistet ist. Auffallend ist auch der Befund, dass die AR-Expression in den Sertoli-Zellen, unabhängig von der Jahreszeit, verstärkt in den Stadien VI bis VIII des Keimepithelzyklus auftritt, was mit einer verstärkten Proteinsekretion in den gleichen Stadien des Keimepithelzyklus zusammenfällt (Sharpe et al., 1992). Nach Bremner et al. (1994) sind spezielle Androgeneffekte auf eine stadienspezifische Expression des AR zurückzuführen. Eine verstärkte Androgenpräsenz in den genannten Phasen des Keimepithelzyklus könnte daher die entscheidenden Umbauprozesse der Spermien während der Kappen- und Akrosomenphase forcieren.

Unterschiede in Häufigkeit und Intensität der Expression des AR treten auch in den Leydig-Zellen auf. So nahm sowohl die Anzahl der markierten Zellen als auch die Intensität positiv gefärbter Zellen innerhalb der Zuchtsaison deutlich zu. Bemerkenswert ist auch, dass zusätzlich zur nukleären auch eine zytoplasmatische AR-Expression, insbesondere außerhalb der Zuchtsaison beobachtet werden kann. Des Weiteren ist mit zunehmendem Alter der Tiere eine stärkere Markierung der Leydig-Zellen festzustellen. Eine nukleäre Expression des AR in den Leydig-Zellen beim Hengst wurde bereits durch Arbeiten von Bilinska et al. (2005) nachgewiesen. Von anderen Spezies, wie Ratte (Pelletier et al., 2000), Schwein (Kotula et al., 2000) und Mensch (Sar et al., 1990) ist ebenfalls bekannt, dass Leydig-Zellen den AR nukleär exprimieren. Kotula et al. (2000)

beschreiben eine zytoplasmatische Expression bei präpubertären Ebern. Eine Gegenüberstellung der eigenen Untersuchungsergebnisse mit vergleichbaren Studien bei der Ratte (Vornberger et al., 1994) zeigt, dass nicht alle Leydig-Zellen den AR exprimieren und somit auf eine unterschiedliche funktionelle Aktivität dieser Zellen innerhalb der Zellpopulation geschlossen werden kann.

Die Interpretation der AR-Expression in den Leydig-Zellen ist schwierig und wird kontrovers diskutiert. Zum einen wird die funktionelle Bedeutung darin gesehen, dass Androgene in autokriner Art und Weise die Zelldifferenzierung und- funktion der Leydig-Zellen regulieren (Vornberger et al., 1994). Zum anderen haben *in vitro*-Studien gezeigt, dass Testosteron über den AR einen hemmenden Effekt auf Enzyme der Leydig-Zellen hat, der durch einen AR-Antagonisten wieder aufgehoben werden kann (Saez, 1994). Sicher ist jedoch, dass eine fehlerhafte Funktion des AR in den Leydig-Zellen Einfluss auf die Steroidbildung hat und zum Stillstand der Spermatogenese, insbesondere auf der Stufe der runden Spermatiden führt (Tsai et al., 2006).

Die vorliegenden Untersuchungen belegen, dass beim Hengst der AR stark in den peritubulären Myozyten exprimiert wird. Takeda et al. (1990) haben nachgewiesen, dass nahezu alle Lagen glatter Muskelzellen der männlichen als auch weiblichen Geschlechtsorgane AR-positive Zellen enthalten. Nach Schlatt et al. (1993) regulieren Androgene die Differenzierung der peritubulären Myozyten während der sexuellen Entwicklung, während sie bei adulten Tieren Einfluss auf die Kontraktilität der peritubulären Myozyten nehmen und so den Transport der Spermien und der testikulären Flüssigkeit in den Samenkanälchen ermöglichen (Maekawa et al., 1996). Nach Bilinska et al. (2004) sollen die Androgene die Funktion der Sertoli-Zellen entweder direkt über deren eigenen AR, aber auch indirekt über den AR der peritubulären Myozyten kontrollieren.

Weiterhin findet sich beim Hengst die AR-Expression im Kern der Epithelzellen des *Rete testis*. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Untersuchungen, die beim Ziegenbock (Goyal et al., 1997) erhoben wurden. Es wird davon ausgegangen, dass die in den Leydig-Zellen synthetisierten Androgene über den Blutweg zum *Rete testis* gelangen, wo sie rasch in die Flüssigkeit des *Rete testis* übergehen (Cooper und Waites, 1974). Die funktionelle Bedeutung dieses Befundes könnte darin gesehen werden, dass der AR in den Epithelzellen des *Rete testis* eine wichtige Rolle spielt, um die Zusammensetzung der Reteflüssigkeit zu modulieren.

Hinsichtlich der Bedeutung von Progesteron und seiner Rezeptoren in der männlichen Gonade weisen immer mehr Untersuchungen darauf hin, dass dieses Hormon nicht mehr allein als strikt „feminines Charakteristikum“ anzusehen ist (Brenner et al., 1990; Schneider et al., 2005). Beim Menschen lässt sich der PR in Zytoplasma und Zellkernen der Spermatogonien, runden Spermatischen, einigen Leydig-Zellen und in der Kopfregion der Spermien mittels *in situ* Hybridisierung nachweisen (Shah et al., 2005). Kohler et al. (2007) finden bei Ebern die Expression des PR in Spermatogonien und peritubulären Myozyten.

Für das Pferd liegen bisher nur spärlich Untersuchungen zur PR-Expression im männlichen Genitale vor. Lediglich aus Studien die an ejakulierten Spermien vorgenommen wurden, ist bekannt, dass der Progesteronrezeptor (PR) in der Spermienmembran lokalisiert ist und die Akrosomenreaktion der Spermien beeinflussen soll (Cheng et al., 1998).

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals, dass eine starke Expression des PR in Leydig-Zellen, peritubulären Myozyten, Spermatozyten I. und II. Ordnung sowie in Sertoli-Zellen nachgewiesen werden kann. Jahreszeitliche Unterschiede in der PR-Expression kommen lediglich bei peritubulären Myozyten, Leydig-Zellen und Epithelzellen der ReteKanälchen zur Beobachtung. Das Expressionsmuster im Hengsthoden lässt die Vermutung zu, dass dem Progesteronrezeptor auch beim Pferd eine lokale, parakrine Rolle zukommen könnte. So ist beispielsweise durch *in vitro*-Studien bei der Ratte bekannt, dass Progesteron in den Sertoli-Zellen zu Testosteron und Dihydrotestosteron umgewandelt wird (Tcholakian und Steinberger, 1978) und Einfluss auf die Spermatogenese (Shah et al., 2005) nimmt. Beim Pferd kommen als potentielle Zielzellen vor allem die Gruppe der Spermatozyten und runden Spermatischen in Betracht, da sich der Rezeptor an elongierten und ausgereiften Spermien nicht mehr nachweisen lässt. Die kurzzeitige Expression des PR legt nahe, dass Progesteron als temporär wirksamer parakriner Regelfaktor beteiligt sein könnte. Eine Aussage, ob die meiotische Aktivität selbst oder andere, den Zellstoffwechsel steuernden Vorgänge durch Progesteron beeinflusst werden, lässt sich daraus nicht ableiten.

Bei Leydig-Zellen wurde eine nukleäre PR-Expression bereits für die Ratte beschrieben (Rossato et al., 1999; Konrad et al., 1998) und beim Hengst lässt sich diese nur innerhalb der Zuchtsaison beobachten. Beim Mensch dagegen ist der PR in der Zellemembran der Leydig-Zellen lokalisiert, weshalb ihm hier nichtgenomische Wirkungen (Oettel und Mukhopadhyay, 2004) zugeschrieben werden. Als Einflussfaktor auf die erhöhte Expression von PR in Leydig-Zellen und Sertoli-Zellen innerhalb der Zuchtsaison wird ein erhöhter Östrogenspiegel gesehen, da Östrogene die PR-Expression induzieren (Aronica

und Katzenellenbogen, 1991; Ing und Tornesi, 1997; Vienonen et al., 2002). Der sowohl beim Eber als auch beim Hengst auftretende hohe Östrogenspiegel lässt auf ein synergistisches Verhalten der Östrogene mit Progesteron schließen, wie es von Kohler et al. (2007) am Beispiel der Reifung und Mitose von Prä spermatogonien diskutiert wird.

Bei den peritubulären Myozyten weist eine deutliche Zunahme der Progesteronrezeptoren innerhalb der Zuchtsaison auf eine funktionsabhängige Expression, ähnlich wie beim AR, hin. Von Janett et al., (2003) wird dies dahingehend interpretiert, dass innerhalb der Zuchtsaison deutlich mehr Spermien auf die Kontraktionskraft der Myozyten angewiesen sind, um aus den Samenkanälchen in Richtung *Rete testis* befördert zu werden.

Die Besonderheit der Hormonprofile beim Pferd besteht darin, dass im Hengsthoden, ähnlich wie im Eberhoden, eine große Menge an Östrogenen produziert wird. Die Expression des klassischen Östrogenrezeptor α (ER α) ließ sich allerdings in den eigenen hier vorliegenden Untersuchungen nicht bearbeiten, da keiner der verfügbaren Antikörper mit dem ER α des Pferdes kreuzreagierte. ER β ließ sich hingegen im Hengsthoden nukleär in allen Zelltypen, außer in elongierten Spermatisden und ausgereiften Spermien, nachweisen.

Auffällig war, dass sich das Expressionsmuster des ER β gegenläufig zu dem des AR verhielt. ER β wird in den Sertoli-Zellen ausschließlich außerhalb der Zuchtsaison exprimiert und in den Leydig-Zellen verstärkt sich die ER β -Expression außerhalb der Zuchtsaison. Im Gegensatz dazu ist die Markierung der runden Spermatisden innerhalb der Zuchtsaison stärker ausgeprägt. Eine nukleäre Expression des ER β in den Sertoli-Zellen findet sich auch beim Eber (Mutembei et al., 2005), wohingegen Rüde und Kater (Nie et al., 2002) keine ER β -Expression in diesem Zelltyp aufweisen. In den Leydig-Zellen wird ER β nicht nur beim Pferd, sondern auch bei Schwein (Mutembei et al., 2005) und Katze (Nie et al., 2002) exprimiert. Ein charakteristisches Expressionsmuster für ER β zeigen die Keimzellen. Es ließen sich Spermatozyten I. Ordnung als auch II. Ordnung mit dem Antikörper gegen ER β stark markieren. Ähnlich, wie es für den Eber beschrieben ist (Mutembei et al., 2005), ist auch beim Pferd keine qualitative oder quantitative Veränderung der Markierung in den verschiedenen Stadien des Keimepithelzyklus zu beobachten.

Die Aufgaben der Östrogene im Hoden sind noch nicht vollständig geklärt. Allgemein anerkannt ist aber, dass sie eine wichtige Rolle in der Differenzierung und Aufrechterhaltung der Zellmorphologie in den *Tubuli seminiferi* (Eddy et al., 1996), im

Rete testis und in den *Ductuli efferentes* (Lee et al., 2000) spielen. Die Beobachtung, dass ER β in so unterschiedlichen Zelltypen des Hengsthodens exprimiert wird, lässt nicht nur auf eine allgemeine Funktion für Regulation der Spermatogenese, sondern auch auf eine spezifische Steuerung der Aufgaben von Sertoli- und Leydig-Zellen schließen. Das gleichzeitige Auftreten des ER β und der P450-Arom in den Leydig-Zellen deutet auf einen autokrinen Wirkungsmechanismus bei diesem Zelltyp hin.

Im Reproduktionstrakt des Hengstes findet eine Expression des östrogenproduzierenden Enzyms Cytochrom P450-Aromatase sowohl in den Hoden (Eisenhauer et al., 1994; Almadhidi et al., 1995) als auch in Nebenhoden und Prostata (Hejmej et al., 2005) statt. Die vorliegenden Untersuchungen führen zu dem Ergebnis, dass ausschließlich Leydig-Zellen das Enzym P450-Arom exprimieren und damit in der Lage sind, aktiv Östrogene aus Androgenen zu synthetisieren. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den Forschungen, die bereits bei Pferd (Hess und Roser, 2004), Schaf (Bilinska et al., 1997), Schwein (Conley und Bird, 1997; Mutembei et al., 2005) und Mensch (Inkster et al., 1995) vorgenommen wurden. Eine von Sipahutar et al. (2003) beschriebene Expression der P450-Arom in den Sertoli-Zellen konnte nicht bestätigt werden. Die bei anderen Spezies, Maus (Nitta et al., 1993), Ratte (Janulis et al., 1998, Carreau et al., 2003) und Mensch (Lambard et al., 2004), beschriebene Lokalisation der P450-Arom in verschiedenen Formen der Keimzellen können die eigenen Ergebnisse nicht belegen.

In den vorliegenden Untersuchungen fiel auf, dass die Zahl und Intensität positiv markierter Zellen innerhalb der Zuchtsaison ansteigt. Die verstärkte Aktivität der P450-Arom wird durch die Beobachtung von Lemazurier et al. (2001) bestätigt, die den Östrogenpeak im Hengstsamen zeitgleich während der Zuchtsaison feststellten. Andere Autoren konnten keine saisonalen Veränderungen der Hormone feststellen (Cox und Williams, 1975; Ganjam und Kenney, 1975; Thompson et al., 1978). Die erhöhte P450-Aromataseaktivität innerhalb der Zuchtsaison wird auf eine erhöhte Anzahl an Leydig-Zellen und einem erhöhten intratestikulären Testosteronspiegel (Johnson und Thompson, 1987) als Ausgangssubstanz für die Aromatisierung erklärt. Zurückgeführt wird die gesteigerte Steroidhormonbildung auf eine quantitative Zunahme des glatten endoplasmatischen Retikulums in den Leydig-Zellen, die entweder eine Folge der Zunahme der Zellanzahl (Johnson und Thompson, 1986) oder der Kapazitätzunahme der individuellen Zelle (Johnson und Thompson, 1987) ist.

In den Studien zur mitotischen Aktivität der Keimzellen wurde der Proliferationsmarker PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit sind Spermatogonien und Spermatozyten I. Ordnung in allen Samenkanälchen und in den unterschiedlichen Stadien des Keimepithelzyklus markiert. Es wurde der mitotische Index, d.h. der prozentuale Anteil der positiven Kerne an der Gesamtzahl der Keimzellen, bei allen Tieren für Spermatogonien und Spermatozyten I. Ordnung ermittelt. Der mitotische Index für die Spermatogonien steigt beim Hengst im Frühjahr an und sinkt im Herbst. Diese Beobachtung wird durch Johnson (1985; 1991) und Janett et al. (2003) gestützt, die die erhöhte Spermienanzahl beim Pferd während der Zuchtsaison auf eine Vermehrung der Spermatogonien zurückführen.

Auffällig ist zudem, dass außer den Spermatogonien auch Spermatozyten eine Markierung zeigen, die bereits früher von verschiedenen Autoren bei unterschiedlichen Spezies (Wrobel et al., 1996; Steger et al., 1998; Strbenc et al., 2003) beschrieben wurde. Als Gründe hierfür werden die lange Halbwertszeit von PCNA (Bravo und MacDonald-Bravo, 1987) und die Beteiligung von PCNA an der Nukleotidreparatur (Hall et al., 1993; Kubbutat et al., 1994) angeführt.

Durch die Markierung der peritubulären Myozyten mit Hilfe eines Antikörpers gegen α -SMA wurde die Abgrenzung der Samenkanälchen deutlich und die semiquantitative Auswertung der Tubulusquerschnitte vereinfacht. Hinsichtlich der Querschnittsgröße der gewundenen Samenkanälchen zeigte sich, dass zwar eine altersabhängige Zunahme, jedoch keine saisonalen Veränderungen im Durchmesser der Samenkanälchen zu verzeichnen sind. Zu einem ähnlichen Ergebnis hinsichtlich der Querschnittszunahme der Samenkanälchen bei älteren Hengsten kommen auch Johnson und Neaves (1981) und Swierstra et al. (1974). Jahreszeitliche Veränderungen der Samenkanälchengröße sind auch bei Hamstern (Hikim et al., 1988), Hasen (Simeunovic et al., 2000) und Ziegen (Delgadillo et al., 1995) beschrieben. Außerhalb der Zuchtsaison beobachteten die Autoren, dass die Werte der Querschnittsdurchmesser signifikant kleiner wurden und dann deutlich innerhalb der Zuchtsaison wieder anstiegen. Ausgeprägte jahreszeitliche Unterschiede in Durchmesser und Länge der Samenkanälchen, die sich bei Tierarten mit einem stark jahreszeitlich geprägten Fortpflanzungsverhalten wie dem Rothirsch (Hochereau-de Reviere und Lincoln, 1978) zeigen, können durch die vorliegenden Untersuchungen für das Pferd nicht bestätigt werden. Ausgeprägte strukturelle Veränderungen der Samenkanälchen sind weiterhin bei anderen Tierarten beschrieben. So ist für Hase (Simeunovic et al., 2000)

und Reh (Schön et al., 2004) nachgewiesen, dass sich das Lumen der Samenkanälchen außerhalb der Fortpflanzungszeit gänzlich zurückbildet und nur noch Sertoli-Zellen und zu beobachten sind, jedoch keine Spermiogenese mehr stattfindet.

6 Zusammenfassung

Saisonale Einflüsse auf die Morphologie des Hodens beim Hengst - Eine histologische und immunhistochemische Studie -

In der vorliegenden Arbeit wurden die Hoden von insgesamt zehn geschlechtsreifen Hengsten verschiedener Rassen und Altersstufen histologisch und immunhistochemisch analysiert. Die Probenentnahme erfolgte dabei im Rahmen von Kastrationen sowohl innerhalb (Juni bis September) als auch außerhalb der Zuchtsaison (Januar bis Februar).

Mit Hilfe der Lichtmikroskopie wurde der histologische Aufbau der Samenkanälchen in den unterschiedlichen Stadien des Keimepithelzyklus, sowie die Struktur des Interstitiums und des Rete testis dargestellt und beschrieben. Ergänzend wurde das Expressionsmuster verschiedener Steroidhormonrezeptoren (Androgenrezeptor, Östrogenrezeptor beta, Progesteronrezeptor) sowie der P450-Aromatase immunhistochemisch untersucht und semiquantitativ ausgewertet. Unterschiede in der Mitoseaktivität von Spermatogonien und Spermatozyten I. Ordnung wurden mit Hilfe des Proliferating Cell Nuclear Antigens (PCNA) ermittelt. Darüber hinaus wurden die Querschnitte α -SMA-markierter Samenkanälchen morphometrisch vermessen und jahreszeitlich verglichen.

Hinsichtlich des Androgenrezeptors ergab die immunhistologische Auswertung eine deutliche bis starke nukleäre Expression des Rezeptors in peritubulären Myozyten, Leydig-Zellen, Sertoli-Zellen und den Zellen der Retekanälchen. Zwischen saisonal und asaisonal kastrierten Hengsten traten deutliche Expressionsunterschiede in Sertoli-Zellen und weniger ausgeprägt auch in Leydig-Zellen auf. Sertoli-Zellen zeigten dabei im Sommer eine starke und im Winter nur eine moderate Expression. Überdies fiel auf, dass die Anzahl und Intensität der angefärbten Sertoli-Zellen zwischen den Stadien des Keimepithelzyklus variierte. Am stärksten war die Kernfärbung der Sertoli-Zellen jeweils in den Stadien VI-VIII des Keimepithelzyklus. Bemerkenswert ist zudem, dass insbesondere außerhalb der Zuchtsaison der Androgenrezeptor in Leydig-Zellen sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch nachgewiesen werden konnte.

Der Nachweis des Progesteronrezeptors gelang in peritubulären Myozyten, Spermatozyten I. und II. Ordnung und Sertoli-Zellen sowie in den Leydig-Zellen. Ein deutlicher Anstieg in Häufigkeit und Intensität der Expression innerhalb der Zuchtsaison findet sich vor allem in Sertoli- und Leydig-Zellen.

Die Expressionsmuster des Östrogenrezeptors beta zeigte ebenfalls deutliche saisonale Unterschiede. Auffällig war hierbei, dass eine nukleäre Expression in Sertoli-Zellen nur außerhalb und nicht innerhalb der Zuchtsaison nachzuweisen war. Leydig-Zellen exprimieren den ER β ebenfalls verstärkt außerhalb der Zuchtsaison.

Die P450-Aromatase wurde ausschließlich in Leydig-Zellen und saisonabhängig in unterschiedlicher Intensität nachgewiesen, wobei die stärkste Expression in Leydig-Zellen innerhalb der Zuchtsaison zu verzeichnen war.

Mit Hilfe des Proliferationsmarkers PCNA ließen sich teilungsaktive Keimzellen in allen Stadien des Keimepithelzyklus darstellen. Für Spermatogonien wurde dabei der höchste mitotische Index außerhalb der Zuchtsaison nachgewiesen.

7 Summary

Seasonal influences on the morphology of the stallion testes - a histological and immunohistochemical study -

Testes from a total of ten sexually mature stallions of different breeds and ages were investigated using histological and immunohistochemical techniques. The samples have been taken within castrations, both during breeding season (June to September) as well as non-breeding season (January to February).

The histological structure of seminiferous tubules in the different stages of the cycle of the seminiferous tubules, the structure of interstitium and rete testis were analysed by light microscopy and described.

In addition the expression of different steroid hormone receptors (androgen receptor, estrogen receptor beta, progesterone receptor) as well as p450-aromatase was immunohistochemical documented and semi quantitative evaluated. Differences of the mitosis activity of the Spermatogonia and primary Spermatocytes could be found by the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Furthermore all the diameters of the a-SMA-marked seminiferous tubules have been measured and compared between the seasons.

An intensive nuclear expression of AR in the peritubular myocytes, the Leydig cells, Sertoli cells and the cells of the rete tubules could be proved. Between the seasonal and non-seasonal castrated stallions there have been differences of the expression in the Sertoli cells and less marked in Leydig cells. Sertoli cells displayed a strong occurrence in the summertime and only a moderate in the winter. Furthermore it was obvious, that the amount and intensity of the colored Sertoli cells varied between the stages of the cycle of the seminiferous epithelium. The nuclear staining of the Sertoli cells was most intensive at the stages VI-VIII of the cycle of the seminiferous epithelium. It was remarkable especially, that androgen receptor during non-breeding season in Leydig cells as well nuclear as cytoplasmatic could be found.

PR is present in peritubular myocytes, primary and secondary Spermatocytes and Sertoli cells. Noticeable is the increasing expression of the receptor in Sertoli cells and Leydig cells within the season.

The expression of ER β also showed strong seasonal differences. Outside the breeding season a large nuclear expression in many Sertoli cells was noticeable, even though this

cell type did not show any immunohistochemical reaction within the breeding season. Leydig cells also express ER β increased outside the breeding season.

P450-Aromatase was only in Leydig cells and seasonal in different intensity found with the highest expression in Leydig cells during the breeding season.

With the use of the proliferation marker PCNA mitotically active germ cells in all stages of the cycle of the seminiferous tubules are labelled. In the Spermatogonia the highest mitotic index was out of the breeding season established.

8 Verzeichnisse

8.1 Literaturverzeichnis

- Almadhidi J., Seralini G.E., Fresnel J., Silberzahn P., Gaillard J.L.** (1995)
Immunohistochemical localization of cytochrome P450 aromatase in equine gonads.
J Histochem Cytochem, **43** (6): 571-570
- Almahbobi G., Papadopoulos V., Carreau S., Silberzahn P.** (1988)
Age-related morphological and functional changes in the Leydig cells of the horse.
Biol Reprod, **38** (3): 653-665
- Amann R.P., Johnson L., Pickett B.W.** (1977)
Connection between the seminiferous tubules and the efferent ducts in Stallion.
Am J Vet Res, **38** (10): 1571-1579
- Argo C.M., Cox J.E., Gray J.L.** (1991)
Effect of oral melatonin treatment on the seasonal physiology of pony stallions.
J Reprod Fertil Suppl, **44**: 115-125
- Aronica S.M., Katzenellenbogen B.S.** (1991)
Progesterone receptor regulation in uterine cells: stimulation by estrogen, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and insulin-like growth factor I and suppression by antiestrogens and protein kinase inhibitors.
Endocrinology, **128** (4): 2045-2052
- Aumüller G.** (1978)
Morphologie des Säugerhodens: Leydig-Zellen, Blut-Hoden-Schranke und Rete testis.
Aus: Senge Th., Neumann F., Schenck B. (Hrsg.): Physiologie und Pathophysiologie der Hodenfunktion.
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1. Auflage: 20-37
- Aurich C.** (2005)
Physiologie der Fortpflanzungsfunktionen beim Hengst.
Aus: Aurich C. (Hrsg.): Reproduktionsmedizin beim Pferd.
Paul Parey Verlag, 1. Auflage: 235-248
- Bader H., Busch, W.** (2005)
Fortpflanzungsstörungen bei der Stute und Krankheiten der weiblichen Geschlechtsorgane.
Aus: Dietz, O., Huskamp, B. (Hrsg.): Handbuch Pferdepraxis.
Enke Verlag Stuttgart, 3. Auflage: 590-619
- Bamberg E.** (1994)
Chemie, Biochemie und Nachweis der Steroidhormone.
Aus: Döcke F. (Hrsg.): Veterinärmedizinische Endokrinologie
Gustav Fischer Verlag Jena Stuttgart, 3. Auflage: 31-40

- Bartke A., Mayerhofer A., Newton S., Mayerhofer D., Majumdar S., Chandrashekar V. (1991)**
Alterations in the control and function of somatic cells in the testis associated with suppression of spermatogenesis in seasonal breeders.
Ann N Y Acad Sci, **637**: 143-151
- Beato M., Klug J. (2000)**
Steroid hormone receptors: an update
Hum Reprod Update, **6** (3): 225-236
- Beck K.J., Herschel S., Hungershofer R., Schwinger E. (1976)**
The effect of steroid hormones on motility and selective migration of X- and Y-bearing human spermatozoa.
Fertil Steril, **27** (4): 407-412
- Bedrak E., Samuels L.T. (1969)**
Steroid biosynthesis by the equine testis.
Endocrinology, **85** (6): 1186-1195
- Berndtson W.E., Pickett B.W., Nett T.M. (1974)**
Reproductive physiology of the stallion. IV. Seasonal changes in the testosterone concentration of peripheral plasma.
J Reprod Fertil, **39** (1): 115-118
- Bilinska B., Lesniak M., Schmalz B. (1997)**
Are ovine Leydig cells able to aromatize androgens?
Reprod Fertil Dev, **9** (2): 193-199
- Bilinska B., Hejmej A., Pawlak M., Sadowska J., Tischner M. (2004)**
Immunoexpression of androgen receptors in testes of immature and mature stallions.
Equine Vet J, **36** (6): 539-543
- Bilinska B., Hejmej A., Gancarczyk M., Sadowska J. (2005)**
Immunoexpression of androgen receptors in the reproductive tract of the stallion.
Ann N Y Acad Sci, **1040**: 227-229
- Bravo R., MacDonald-Bravo H. (1987)**
Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites.
J Cell Biol, **105** (4): 1549-1554
- Bravo R., Fey S.J., Bellatin J., Larsen P.M., Arevalo J., Celis J.E. (1981)**
Identification of a nuclear and of a cytoplasmic polypeptide whose relative proportions are sensitive to changes in the rate of cell proliferation.
Exp Cell Res, **136** (2): 311-319
- Bremner W.J., Millar M.R., Sharpe R.M., Saunders P.T. (1994)**
Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens.
Endocrinology, **135** (3): 1227-1234

- Brenner R.M., West N.B., McClellan MC.** (1990)
Estrogen and progestin receptors in the reproductive tract of male and female primates.
Biol Reprod, **42** (1): 11-19
- Byskov A.G., Høyer P.E.** (1988)
Embryology of mammalian gonads and ducts.
Aus: Knobil E., Neill J.D. (eds.): The physiology of reproduction, Vol.1
Raven Press, New York, 1^{ed}: 265-303
- Calogero A.E., Burrello N., Barone N., Palermo I., Grasso U., D'Agata R.**(2000)
Effects of progesterone on sperm function: mechanisms of action.
Hum Reprod, **15** Suppl 1: 28-45
- Carpino A., Romeo F., Rago V.** (2004)
Aromatase immunolocalization in human ductuli efferentes and proximal ductus epididymis.
J Anat, **204** (3): 217-220
- Carreau S., Genissel C., Bilinska B., Levallet J.** (1999)
Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male.
Int J Androl, **22** (4): 211-223
- Carreau S., Lambard S., Delalande C., Denis-Galeraud I., Bilinska B., Bourguiba S.** (2003)
Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review.
Reprod Biol Endocrinol, **11**: 1-35
- Carreau S., Delalande C., Silandre D., Bourguiba S., Lambard S.** (2006)
Aromatase and estrogen receptors in male reproduction.
Mol Cell Endocrinol, **246** (1-2): 65-68
- Carson-Jurica M.A., Schrader W.T., O'Malley B.W.** (1990)
Steroid receptor family: structure and functions.
Endocr Rev, **11** (2): 201-220
- Casasco A., Giordano M., Danova M., Casasco M., Icaro Cornaglia A., Calligaro A.** (1993)
PC10 monoclonal antibody to proliferating cell nuclear antigen as probe for cycling cell detection in developing tissues. A combined immunocytochemical and flow cytometric study.
Histochemistry, **99** (3): 191-199
- Celis J.E., Celis A.** (1985)
Cell cycle-dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: subdivision of S phase.
Proc Natl Acad Sci U S A, **82** (10): 3262-3266
- Chang C., Chen Y.T., Yeh S.D., Xu Q., Wang R.S., Guillou F., Lardy H., Yeh S.** (2004)

Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells.
Proc Natl Acad Sci U S A, **101** (18): 6876-6881

Chapman D.L., Wolgemuth D.J. (1994)

Expression of proliferating cell nuclear antigen in the mouse germ line and surrounding somatic cells suggests both proliferation-dependent and -independent modes of function.
Int J Dev Biol, **38** (3): 491-497

Cheng C.Y., Boettcher B., Rose R.J., Kay D.J., Tinneberg H.R. (1981)

The binding of sex steroids to human spermatozoa. An autoradiographic study.
Int J Androl, **4** (1): 1-17

Cheng F.P., Gadella B.M., Voorhout W.F., Fazeli A., Bevers M.M., Colenbrander B. (1998)

Progesterone-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa is mediated by a plasma membrane progesterone receptor.
Biol Reprod, **59** (4): 733-742

Chiquoine A.D. (1954)

The identification, origin, and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo.
Anat Rec, **118** (2): 135-146

Claus R., Dimmick M.A., Gimenez T., Hudson L.W. (1992)

Estrogens and prostaglandin F(2)alpha in the semen and blood plasma of stallions.
Theriogenology, **38** (4): 687-693

Clay C.M., Clay J.N. (1992)

Endocrine and testicular changes associated with season, artificial photoperiod, and the peri-pubertal period in stallions.
Vet Clin North Am Equine Pract, **8** (1): 31-56

Conley A.J., Bird I.M. (1997)

The Role of Cytochrome P450 17 α -Hydroxylase and 31-Hydroxysteroid Dehydrogenase in the Integration of Gonadal and Adrenal Steroidogenesis via the Δ 5 and Δ 4 Pathways of Steroidogenesis in Mammals.
Biol Reprod, **56**: 789-799

Conley A., Hinshelwood M. (2001)

Mammalian aromatases.
Reproduction, **121** (5): 685-695

Cooper T.G., Waites G.M. (1974)

Testosterone in rete testis fluid and blood of rams and rats.
J Endocrinol, **62** (3): 619-629

Cowley S.M., Hoare S., Mosselman S., Parker M.G. (1997)

Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA.
J Biol Chem, **272** (32): 19858-19862

Cox J.E., Williams J.H. (1975)

Some aspects of the reproductive endocrinology of the stallion and cryptorchid.
J Reprod Fertil Suppl, **23**: 75-79

Davies J., Danzo B.J. (1981)

Hormonally responsive areas of the reproductive system of the male guinea pig. II.
Effects of estrogens.
Biol Reprod, **25** (5): 1149-1158

**De Gendt K., Swinnen J.V., Saunders P.T., Schoonjans L., Dewerchin M., Devos A.,
Tan K., Atanassova N., Claessens F., Lécureuil C., Heyns W., Carmeliet P., Guillou
F., Sharpe R.M., Verhoeven G. (2004)**

A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic
arrest in meiosis.
Proc Natl Acad Sci U S A, **101** (5): 1327-1332

Delgadillo J.A., Hochereau-de Reviers M.T., Daveau A., Chemineau P. (1995)

Effect of short photoperiodic cycles on male genital tract and testicular parameters
in male goats (*Capra hircus*).
Reprod Nutr Dev, **35** (5): 549-558

**Devkota B., Sasaki M., Takahashi K., Matsuzaki S., Matsui M., Haneda S., Takahashi M,
Osawa T., Miyake Y. (2006)**

Postnatal developmental changes in immunohistochemical localization of alpha-
smooth muscle actin (SMA) and vimentin in bovine testes.
J Reprod Dev, **52** (1): 43-49

Dobler K. (2003)

Histologische und immunhistochemische Untersuchungen zur prä- und postnatalen
Entwicklung des endokrinen Pankreas beim Schwein.
Diss med vet, München

Döcke F. (1994)

Keimdrüsen.
*Aus: Döcke F. (Hrsg.): Veterinärmedizinische Endokrinologie
Gustav Fischer Verlag Jena Stuttgart, 3. Auflage: 399-508*

Duffy D.M., Wells T.R., Haluska G.J., Stouffer R.L. (1997)

The ratio of progesterone receptor isoforms changes in the monkey corpus luteum
during the luteal phase of the menstrual cycle.
Biol Reprod, **57** (4): 693-699

Dym M. (1994)

Spermatogonial stem cells of the testis.
Proc Natl Acad Sci, **91**: 11287-11289

Dym M., Fawcett D.W. (1970)

The Blood-Testis Barrier in the Rat and the Physiological Compartmentation of the
Seminiferous Epithelium.
Biol Reprod, **3**: 308-326

- Eddy E.M., Washburn T.F., Bunch D.O., Goulding E.H., Gladen B.C., Lubahn D.B., Korach K.S.** (1996)
Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility.
Endocrinology, **137** (11): 4796-4805
- Eisenhauer K.M., McCue P.M., Nayden D.K., Osawa Y., Roser J.F.** (1994)
Localization of aromatase in equine Leydig cells.
Domest Anim Endocrinol, **11** (3): 291-298
- Enmark E., Pelto-Huikko M., Grandien K., Lagercrantz S., Lagercrantz J., Fried G., Nordenskjold M., Gustafsson J.A.** (1997)
Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern.
J Clin Endocrinol Metab, **82** (12): 4258-4265
- Falkenstein E., Tillmann H.C., Christ M., Feuring M., Wehling M.** (2000)
Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects.
Pharmacol Rev, **52** (4): 513-556
- Fijak M., Meinhardt A.** (2006)
The testis in immune privilege.
Immunol Rev, **213**: 66-81
- Gabbiani G., Schmid E., Winter S., Chaponnier C., de Ckhasonay C., Vandekerckhove J., Weber K., Franke W.W.** (1981)
Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin.
Proc Natl Acad Sci U S A, **78** (1): 298-302
- Ganjam V.K., Kenney R.M.** (1975)
Androgens and oestrogens in normal and cryptorchid stallions.
J Reprod Fertil Suppl, **23**: 67-73
- Ghetie V.** (1939)
Präparation und Länge des Ductus epididymitis beim Pferd und Schwein
Anat Anz, **87**: 369-374
- Giangrande P.H., McDonnell D.P.** (1999)
The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene.
Recent Prog Horm Res, **54**: 291-313
- Giangrande P.H., Pollio G., McDonnell D.P.** (1997)
Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor.
J Biol Chem, **272** (52): 32889-32900
- Goldsworthy T.L., Butterworth B.E., Maronpot R.R.** (1993)
Concepts, labeling procedures, and design of cell proliferation studies relating to carcinogenesis.

Environ Health Perspect, **101** (Suppl 5): 59-65

Goyal H.O., Bartol F.F., Wiley A.A., Khalil M.K., Chiu J., Vig M.M. (1997)
Immunolocalization of androgen receptor and estrogen receptor in the developing testis and excurrent ducts of goats.
Anat Rec, **249** (1): 54-62

Graham J.D., Clarke C.L. (1997)
Physiological action of progesterone in target tissues.
Endocr Rev, **18** (4): 502-519

Griswold M.D. (1995)
Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis.
Biol Reprod, **52** (2): 211-216

Guraya S.S. (1995)
The comparative cell biology of accessory somatic (or Sertoli) cells in the animal testis.
Int Rev Cytol, **160**: 163-220

Hagenas L., Ritzen E.M., Plooen L., Hansson V., French F.S., Nayfeh S.N. (1975)
Sertoli cell origin of testicular androgen-binding protein (ABP).
Mol Cell Endocrinol, **2** (5): 339-350

Hall P.A., McKee P.H., Menage H.D., Dover R., Lane D.P. (1993)
High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin.
Oncogene, **8** (1): 203-207

Hay M.F., Allen W.R. (1975)
An ultrastructural and histochemical study of the interstitial cells in the gonads of the fetal horse.
J Reprod Fertil Suppl, **23**: 557-561

Hedger M.P. (1997)
Testicular leukocytes: what are they doing?
Rev Reprod, **2** (1): 38-47

Heikinheimo O., Mahony M.C., Gordon K., Hsiu J.G., Hodgen G.D., Gibbons W.E. (1995)
Estrogen and progesterone receptor mRNA are expressed in distinct pattern in male primate reproductive organs.
J Assist Reprod Genet, **12** (3): 198-204

Hejmej A., Gorazd M., Kosiniak-Kamysz K., Wiszniewska B., Sadowska J., Bilinska B. (2005)
Expression of aromatase and oestrogen receptors in reproductive tissues of the stallion and a single cryptorchid visualised by means of immunohistochemistry.
Domest Anim Endocrinol, **29** (3): 534-547

Hermo L., Dworkin J., Oko R. (1988)

Role of epithelial clear cells of the rat epididymis in the disposal of the contents of cytoplasmic droplets detached from spermatozoa.
Am J Anat., **183** (2): 107-124

Hess M.F., Roser J.F. (2004)

Immunocytochemical localization of cytochrome P450 aromatase in the testis of prepubertal, pubertal, and postpubertal horses.
Theriogenology, **61** (2-3): 293-299

Hess R.A. und França L.R. (2005)

Structure of the Sertoli Cell
Aus: Skinner M.K., Griswold M.D. (Hrsg.): Sertoli Cell Biology
Elsevier Academic Press: 19-40

Hikim A.P., Bartke A.J., Russell L.D. (1988)

The seasonal breeding hamster as a model to study structure-function relationships in the testis.
Tissue Cell, **20** (1): 63-78

Hinton B.T., Setchell B.P. (1993)

Fluid Secretion and Movement
Aus: Russell L.D., Griswold M.D. (Hrsg.): The Sertoli cell
Cache River Press, Clearwater, FL: 249-268

Hochereau-de Reviers M.T., Lincoln G.A. (1978)

Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*.
J Reprod Fertil, **54** (2): 209-213

Hoffmann B., Landeck A. (1999)

Testicular endocrine function, seasonality and semen quality of the stallion.
Anim Reprod Sci, **57** (1-2): 89-98

Holdcraft R.W., Braun R.E. (2004)

Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids.
Development, **131** (2): 459-467

Holzbauer M., Newport H.M. (1969)

Adrenal secretion rates and adrenal tissue concentrations of pregnenolone, progesterone, 11 beta OH-androstenedione and some other steroids in young pigs and dogs.
J Physiol, **200** (3): 821-848

Hsu S.M., Raine L., Fanger H. (1981)

Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures.
J. Histochem. Cytochem, **29**: 577-580

Ikonen T., Palvimo J.J., Janne O.A. (1997)

Interaction between the amino- and carboxyl-terminal regions of the rat androgen receptor modulates transcriptional activity and is influenced by nuclear receptor coactivators.

J Biol Chem, **272** (47): 29821-29828

Ing N.H., Tornesi M.B. (1997)

Estradiol up-regulates estrogen receptor and progesterone receptor gene expression in specific ovine uterine cells.

Biol Reprod, **56** (5): 1205-1215

Inkster S., Yue W., Brodie A. (1995)

Human testicular aromatase: immunocytochemical and biochemical studies.

J Clin Endocrinol Metab, **80** (6): 1941-1947

Irvine C.H., Alexander S.L. (1991)

Effect of sexual arousal on gonadotrophin-releasing hormone, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion in the stallion.

J Reprod Fertil Suppl, **44**: 135-143

Janett F., Thun R., Bettschen S., Burger D., Hassig M. (2003)

Seasonal changes of semen quality and freezability in Franches-Montagnes stallions.

Anim Reprod Sci, **77** (3-4): 213-221

Janulis L., Bahr J.M., Hess R.A., Janssen S., Osawa Y., Bunick D. (1998)

Rat testicular germ cells and epididymal sperm contain active P450 aromatase.

J Androl, **19** (1): 65-71

Jasko D.J., Lein D.H., Foote R.H. (1991)

The repeatability and effect of season on seminal characteristics and computer-aided sperm analysis in the stallion.

Theriogenology, **35** (2): 317-327

Johnson L. (1985)

Increased daily sperm production in the breeding season of stallions is explained by an elevated population of spermatogonia.

Biol Reprod, **32** (5): 1181-1190

Johnson L. (1991)

Seasonal differences in equine spermatocytogenesis.

Biol Reprod, **44** (2): 284-291

Johnson L., Neaves W.B. (1981)

Age-Related Changes in the Leydig Cell Population, Seminiferous Tubules, and Sperm Production in Stallions.

Biol Reprod, **24** (3): 703-712

Johnson L., Nguyen H.B. (1986)

Annual cycle of the Sertoli cell population in adult stallions.

J Reprod Fertil, **76** (1): 311-316

- Johnson L., Thompson D.L. Jr. (1983)**
Age-related and seasonal variation in the Sertoli cell population, daily sperm production and serum concentrations of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in stallions.
Biol Reprod, **29** (3): 777-789
- Johnson L., Thompson D.L. Jr. (1986)**
Seasonal variation in the total volume of Leydig cells in stallions is explained by variation in cell number rather than cell size.
Biol Reprod, **35** (4): 971-979
- Johnson L., Thompson D.L. Jr. (1987)**
Effect of seasonal changes in Leydig cell number on the volume of smooth endoplasmic reticulum in Leydig cells and intratesticular testosterone content in stallions.
J Reprod Fertil, **81** (1): 227-232
- Johnson L., Varner D.D., Tatum M.E., Scrutchfield W.L. (1991)**
Season but not age affects Sertoli cell number in adult stallions.
Biol Reprod, **45** (3): 404-410
- Johnson L., Blanchard T.L., Varner D.D., Scrutchfield W.L. (1997)**
Factors affecting spermatogenesis in the stallion.
Theriogenology, **48** (7): 1199-1216
- Joshi H.S., Raeside J.I. (1973)**
Synergistic effects of testosterone and oestrogens on accessory sex glands and sexual behaviour of the boar.
J Reprod Fertil, **33** (3): 411-423
- Kappers J.A. (1976)**
The mammalian pineal gland, a survey.
Acta Neurochir (Wien), **34** (1-4): 109-149
- Kim K. H., Wang Z. (1993)**
Action of Vitamin A on the testis: Role of the Sertoli cell.
*Aus: Russell L.D., Griswold M.D. (Hrsg.): The Sertoli cell
Cache River Press, Clearwater, FL: 517-536*
- Klein D.C., Weller J.L. (1970)**
Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase.
Science, **169** (950): 1093-1095
- Klug E. (2003)**
Optimierung der Fruchtbarkeit beim Pferd.
19. FFP-Tagung in Münster-Handorf
- Knospe C. (1998)**
Zur Entwicklung des Pferdehodens.
[The development of the horse testis]
Anat Histol Embryol, **27** (4): 219-222

Kocher O, Gabbiani G. (1986)

Cytoskeletal features of normal and atheromatous human arterial smooth muscle cells.

Hum Pathol, **17** (9): 875-880

Kohler C., Riesenbeck A., Hoffmann B. (2007)

Age-dependent expression and localization of the progesterone receptor in the boar testis.

Reprod Domest Anim, **42** (1): 1-5

Kojima Y. (1990)

Ultrastructure of goat testes: tubulobulbar complexes between spermatids and Sertoli cells

Nippon Juigaku Zasshi, **52** (4): 781-786

Konrad L., Weber M.A., Groos S., Albrecht M., Aumuller G. (1998)

Paracrine interaction in testicular somatic cells.

Ital J Anat Embryol, **103** (4 Suppl 1): 139-152

Kotula M., Tuz R., Fraczek B., Wojtusiak A., Bilinska B. (2000)

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

Folia Histochem Cytobiol, **38** (4): 157-162

Kubbutat M.H.G., Cattoretti G., Gerdes J. and Key G. (1994)

Comparison of monoclonal antibodies PC10 and MIB 1 on microwave-processed paraffin sections.

Cell Prolif, **27**: 553–559

Kuhrau J. (1993)

Histologische, ultrastrukturelle und histochemische Untersuchungen an Hoden und Nebenhoden des Pferdes. (EQUUS PRZEWALSKII „Caballus“)

Diss med vet, München

Kuiper G.G., Enmark E., Pelto-Huikko M., Nilsson S., Gustafsson J.A. (1996)

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

Proc Natl Acad Sci U S A, **93**: 5925-5930

Kurki P., Vanderlaan M., Dolbeare F., Gray J., Tan E.M. (1986)

Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle.

Exp Cell Res, **166** (1): 209-219

Kuroda M. (1985)

Change of actin isomers during differentiation of smooth muscle.

Biochim Biophys Acta, **843** (3): 208-213

Lambard S., Galeraud-Denis I., Saunders P.T., Carreau S. (2004)

Human immature germ cells and ejaculated spermatozoa contain aromatase and oestrogen receptors.

J Mol Endocrinol, **32** (1): 279-289

- Lear T.L., Adams M.H., Sullivan N.D., McDowell K.J., Bailey E.** (1998)
Assignment of the horse progesterone receptor (PGR) and estrogen receptor (ESR1) genes to horse chromosomes 7 and 31, respectively, by in situ hybridization.
Cytogenet Cell Genet, **82** (1-2): 110-111
- Lee K.H., Hess R.A., Bahr J.M., Lubahn D.B., Taylor J., Bunick D.** (2000)
Estrogen receptor alpha has a functional role in the mouse rete testis and efferent ductules.
Biol Reprod, **63** (6): 1873-1880
- Lemazurier E., Sourdain P., Nativelle C., Plainfosse B., Seralini G.** (2001)
Aromatase gene expression in the stallion.
Mol Cell Endocrinol, **178** (1-2): 133-139
- Levallet J., Bilinska B., Mittre H., Genissel C., Fresnel J., Carreau S.** (1998)
Expression and immunolocalization of functional cytochrome P450 aromatase in mature rat testicular cells.
Biol Reprod, **58** (4): 919-926
- Lumpkin M., Negro-Vilar A., Franchimont P., McCann S.** (1981)
Evidence for a hypothalamic site of action of inhibin to suppress FSH release.
Endocrinology, **108** (3): 1101-1104
- MacArthur E., Short R.V., O'Donnell V.J.** (1967)
Formation of steroids by the equine foetal testis.
J Endocrinol, **38** (3): 331-336
- Maekawa M., Kazama H., Kamimura K., Nagano T.** (1995)
Changes in the arrangement of actin filaments in myoid cells and Sertoli cells of rat testes during postnatal development and after experimental cryptorchidism.
Anat Rec, **241**(1): 59-69
- Maekawa M., Kamimura K., Nagano T.** (1996)
Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function
Arch Histol Cytol, **59** (1): 1-13
- Malpaux B., Thierry J.C., Chemineau P.** (1999)
Melatonin and the seasonal control of reproduction.
Reprod Nutr Dev, **39** (3): 355-366
- Meng J., Holdcraft R.W., Shima J.E., Griswold M.D., Braun R.E.** (2005)
Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier.
Proc Natl Acad Sci U S A, **102** (46): 16696-16700
- Minneman K.P., Wurtman R.J.** (1975)
Effects of pineal compounds on mammals.
Life Sci, **17** (8): 1189-1199
- Mohamed M.K., Tung L., Takimoto G.S., Horwitz K.B.** (1994)
The leucine zippers of c-fos and c-jun for progesterone receptor dimerization: A-

dominance in the A/B heterodimer.
J Steroid Biochem Mol Biol, **51** (5-6): 241-250

Moore R.Y., Lenn N.J. (1972)

A retinohypothalamic projection in the rat.
J Comp Neurol, **146** (1):1-14

Mutembei H.M., Pesch S., Schuler G., Hoffmann B. (2005)

Expression of oestrogen receptors alpha and beta and of aromatase in the testis of immature and mature boars.
Reprod Domest Anim, **40** (3): 228-236

Naden J., Amann R.P., Squires E.L. (1990)

Testicular growth, hormone concentrations, seminal characteristics and sexual behaviour in stallions.
J Reprod Fertil, **88** (1): 167-176

Nagano T., Suzuki F. (1978)

Cell to cell relationships in the seminiferous epithelium in the mouse embryo.
Cell Tissue Res, **189** (3): 389-401

Nakagawa A, Shiratsuchi A, Tsuda K, Nakanishi Y. (2005)

In vivo analysis of phagocytosis of apoptotic cells by testicular Sertoli cells
Mol Reprod Dev, **71** (2): 166-177

Nakanishi Y., Shiratsuchi A. (2004)

Phagocytic Removal of Apoptotic Spermatogenic Cells by Sertoli Cells: Mechanisms and Consequences
Biol Pharm Bull, **27** (1): 13-16

Nie R., Zhou Q., Jassim E., Saunders P.T., Hess R.A. (2002)

Differential expression of estrogen receptors alpha and beta in the reproductive tracts of adult male dogs and cats.
Biol Reprod, **66** (4): 1161-1168

Nitta H., Bunick D., Hess R.A., Janulis L., Newton S.C., Millette C.F., Osawa Y., Shizuta Y., Toda K., Bahr J.M. (1993)

Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase.
Endocrinology, **132** (3): 1396-1401

Noden D.M., Delahunta A. (1985)

Derivatives of the Intermediate Mesoderm: Reproductive Organs
Aus: Noden D.M., Delahunta A.: The embryology of domestic animals: developmental mechanisms and malformations.
Williams & Wilkins, Baltimore, **1.** Auflage: 322-342

Nonno R., Capsoni S., Lucini V., Moller M., Frascini F., Stankov B. (1995)

Distribution and characterization of the melatonin receptors in the hypothalamus and pituitary gland of three domestic ungulates.
J Pineal Res, **18** (4): 207-216

- Oettel, M., Mukhopadhyay A. K.** (2004)
Progesterone: the forgotten hormone in men?
Aging Male, **7** (3): 236-257
- Ogawa S., Inoue S., Watanabe T., Hiroi H., Orimo A., Hosoi T., Ouchi Y., Muramatsu M.** (1998)
The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro.
Biochem Biophys Res Commun, **243** (1): 122-126
- Owens G.K., Loeb A., Gordon D., Thompson M.M.** (1986)
Expression of smooth muscle-specific alpha-isoactin in cultured vascular smooth muscle cells: relationship between growth and cytodifferentiation.
J Cell Bio, **102** (2): 343-352
- Paech K., Webb P., Kuiper G.G., Nilsson S., Gustafsson J., Kushner P.J., Scanlan T.S.** (1997)
Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites.
Science, **277** (5331): 1508-1510
- Payne A.H., Hales D.B.** (2004)
Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones.
Endocr Rev, **25** (6): 947-970
- Pelletier G., Labrie C., Labrie F.** (2000)
Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs.
J Endocrinol, **165** (2): 359-370
- Pentikäinen V., Erkkilä K., Suomalainen L., Parvinen M., Dunkel L.** (2000)
Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro.
J Clin Endocrinol Metab, **85** (5): 2057-2067
- Pickett B.W., Faulkner L.C., Sutherland T.M.** (1970)
Effect of month and stallion on seminal characteristics and sexual behavior.
J Anim Sci, **31** (4): 713-728
- Pickett B.W., Amann R.P., McKinnon A.O., Squires E.L., Voss J.L.** (1989)
Management of the stallion for maximum reproductive efficiency
II. Animal Reproduction Laboratory, Bulletin
Anim Reprod Lab Bull, No 5, Colorado State Univ., Fort Collins
- Prelich G., Tan C.K., Kostura M., Mathews M.B., So A.G., Downey K.M., Stillman B.** (1987)
Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-delta auxiliary protein.
Nature, **326** (6112): 517-520
- Quigley C.A., De Bellis A., Marschke K.B., el-Awady M.K., Wilson E.M.,**

French F.S. (1995)

Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives.
Endocr Rev, **16** (3): 271-321

Revelli A., Massobrio M., Tesarik J. (1998)

Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues.
Endocr Rev, **19** (1): 3-17

Roche Lexikon Medizin (2003)

Hrsg.: Hoffmann-La Roche AG,
Urban und Fischer Verlag München, 5. Auflage

Romeis B. (1989)

Mikroskopische Technik.
Urban & Schwarzenberg Verlag München, 17. Auflage

Rommerts F.F., de Jong F.H., Brinkmann A.O., van der Molen H.J. (1982)

Development and cellular localization of rat testicular aromatase activity.
J Reprod Fertil, **65** (2): 281-288

Rossato M., Nogara A., Merico M., Ferlin A., Foresta C. (1999)

Identification of functional binding sites for progesterone in rat Leydig cell plasma membrane.
Steroids, **64** (1-2): 168-175

Rüsse I., Sinowatz F. (1998)

Gametogenese
Aus: Rüsse I., Sinowatz F.: Lehrbuch der Embryologie der Haustiere
Paul Parey Berlin, 2. Auflage: 42-69

Rüsse I. (1998)

Harn- und Geschlechtsorgane
Aus: Rüsse I., Sinowatz F.: Lehrbuch der Embryologie der Haustiere
Paul Parey Verlag, 2. Auflage: 304-334

Russell L.D. (1979)

Further observations on tubulobulbar complexes formed by late spermatids and Sertoli cells in the rat testis.
Anat Rec, **194** (2): 213-232

Russell L.D., Clermont Y. (1977)

Degeneration of germ cells in normal, hypohysectomized and hormone treated hypohysectomized rats
Anat Rec, **187** (3): 347-366

Saez J.M. (1994)

Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation.
Endocr Rev, **15** (5): 574-626

Sar M., Lubahn D.B., French F.S., Wilson E.M. (1990)

Immunohistochemical localization of the androgen receptor in rat and human tissues.

Endocrinology, **127** (6): 3180-3186

Sartorius C.A., Melville M.Y., Hovland A.R., Tung L., Takimoto G.S., Horwitz K.B. (1994)

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

Mol Endocrinol, **8** (10): 1347-1360

Saunders P.T. (1998)

Oestrogen receptor beta (ER beta).

Rev Reprod, **3** (3): 164-171

Schlatt S., Weinbauer G.F. (1994)

Immunohistochemical localization of proliferating cell nuclear antigen as a tool to study cell proliferation in rodent and primate testes.

Int J Androl, **17** (4): 214-222

Schlatt S., Weinbauer G.F., Arslan M., Nieschlag E. (1993)

Appearance of alpha-smooth muscle actin in peritubular cells of monkey testes is induced by androgens, modulated by follicle-stimulating hormone, and maintained after hormonal withdrawal.

J Androl, **14** (5): 340-350

Schlegel R.A., Williamson P. (2001)

Phosphatidylserine, a death knell.

Cell Death Differ, **8** (6): 551-563

Schneider J.S., Burgess C., Sleiter N.C., DonCarlos L.L., Lydon J.P., O'Malley B., Levine J.E. (2005)

Enhanced sexual behaviors and androgen receptor immunoreactivity in the male progesterone receptor knockout mouse.

Endocrinology, **146** (10): 4340-4348

Schön J., Goritz F., Streich J., Blottner S. (2004)

Histological organization of roe deer testis throughout the seasonal cycle: variable and constant components of tubular and interstitial compartment.

Anat Embryol (Berl), **208** (2): 151-159

Schummer A., Vollmerhaus B. (1995)

Männliche Geschlechtsorgane des Pferdes

Aus: Habermehl K.-H., Vollmerhaus B., Wilkens H. (Hrsg.): Lehrbuch der Anatomie der Haustiere

Band II Eingeweide

Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin Wien Yokohama, 7. Auflage: 327-376

Sertoli E. (1865)

Dell'esistenza di particolari cellule ramificate nei canalicoli seminiferi del testicolo umano

Morgagni, **7**: 31-40

Setchell B.P., Cox J.E. (1982)

Secretion of free and conjugated steroids by the horse testis into lymph and venous blood.

J Reprod Fertil Suppl, **32**: 123-127

Shah C., Modi D., Sachdeva G., Gadkar S., Puri C. (2005)

Coexistence of intracellular and membrane-bound progesterone receptors in human testis.

J Clin Endocrinol Metab, **90** (1): 474-483

Sharp D.C., Cleaver B.D. (1993)

Melatonin

Aus: McKinnon A.O., James L.: Equine Reproduction

Lea & Febiger, Philadelphia: 100-108

Sharp D.C., Grubaugh W.R., Gum G.C., Wirsing C.R. (1984)

Demonstration of a direct retinohypothalamic projection in the mare.

Society for the study of reproduction 17th annual meeting

Sharpe R.M., Maddocks S., Millar M., Kerr J.B., Saunders P.T., McKinnell C. (1992)

Testosterone and spermatogenesis. Identification of stage-specific, androgen-regulated proteins secreted by adult rat seminiferous tubules.

J Androl, **13** (2): 172-184

Shyamala G., Schneider W., Schott D. (1990)

Developmental regulation of murine mammary progesterone receptor gene expression.

Endocrinology, **126** (6): 2882-2889

Simeunovic B., Strbenc M., Bavdek S.V. (2000)

Position and histological structure of the testes in the brown hare (*Lepus europaeus*) during seasonal regression and recrudescence.

Anat Histol Embryol, **29** (2): 73-82

Sinnecker G., Hiort O., Kwan P.W., DeLellis R.A. (1990)

Immunohistochemical localization of sex hormone-binding globulin in normal and neoplastic breast tissue.

Horm Metab Res, **22** (1): 47-50

Sinowatz F. (2001)

Physiologie und Pathologie der Hoden und Nebenhoden

Aus: Busch W., Holzmann A. (Hrsg.): Veterinärmedizinische Andrologie.

Schattauer Verlag, 1. Auflage: 377-378

Sinowatz F., Amselgruber W. (1986)

Postnatal development of bovine Sertoli cells.

Anat Embryol (Berl), **174** (3): 413-423

Sinowatz F., Amselgruber W. (1988)

Ultrastructure of sustentacular (Sertoli) cells in the bovine testis.

Acta Anat (Basel), **133** (4): 274-281

- Sinowatz F., Wrobel K.H., Sinowatz S., Kugler P. (1979)**
Ultrastructural evidence for phagocytosis of spermatozoa in the bovine rete testis and testicular straight tubules.
J Reprod Fertil, **57** (1): 1-4
- Sipahutar H., Sourdain P., Moslemi S., Plainfosse B., Seralini G.E. (2003)**
Immunolocalization of aromatase in stallion Leydig cells and seminiferous tubules.
J Histochem Cytochem, **51** (3): 311-318
- Skalli O., Ropraz P., Trzeciak A., Benzonana G., Gillessen D., Gabbiani G. (1986)**
A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation.
J Cell Biol, **103** (6): 2787-2796
- Smollich A. (1992)**
Geschlechtssystem
Aus: Smollich A., Michel G.: Mikroskopische Anatomie der Haustiere.
Gustav-Fischer Verlag, **2.** Auflage: 233-253
- Stankov B., Cozzi B., Lucini V., Fumagalli P., Scaglione F., Frascini F. (1991)**
Characterization and mapping of melatonin receptors in the brain of three mammalian species: rabbit, horse and sheep. A comparative in vitro binding study.
Neuroendocrinology, **53** (3): 214-221
- Steger K., Aleithe I., Behre H., Bergmann M. (1998)**
The proliferation of spermatogonia in normal and pathological human seminiferous epithelium: an immunohistochemical study using monoclonal antibodies against Ki-67 protein and proliferating cell nuclear antigen.
Mol Hum Reprod, **4** (3): 227-233
- Steinberger A. und Steinberger E. (1970)**
The Sertoli cells
Aus: Johnson A.D., Gomes W. R., Vandemark N.L. (Hrsg.): The testis, Vol. IV
Acad. Press., New York, **1.** Auflage: 317-399
- Strbenc M., Fazarinc G., Bavdek S.V., Pogacnik A. (2003)**
Apoptosis and proliferation during seasonal testis regression in the brown hare (*Lepus europaeus* L.)
Anat Histol Embryol, **32** (1): 48-53
- Swierstra E.E., Gebauer M.R., Pickett B.W. (1974)**
Reproductive physiology of the stallion. I. Spermatogenesis and testis composition.
J Reprod Fertil, **40** (1): 113-123
- Takeda H., Chodak G., Mutchnik S., Nakamoto T., Chang C. (1990)**
Immunohistochemical localization of androgen receptors with mono- and polyclonal antibodies to androgen receptor.
J Endocrinol, **126** (1): 17-25
- Tan C.K., Castillo C., So A.G., Downey K.M. (1986)**
An auxiliary protein for DNA polymerase-delta from fetal calf thymus.

J Biol Chem, **261** (26): 12310-12316

Tcholakian R.K., Steinberger A. (1978)

Progesterone metabolism by cultured Sertoli cells.
Endocrinology, **103** (4): 1335-1343

Thompson D.L., Pickett B.W., Nett T.M. (1978)

Effect of season and artificial photoperiod on levels of estradiol-17beta and estrone in blood serum of stallions.
J Anim Sci, **47** (1): 184-187

Tonutti E. (1953)

Über die Strukturelemente des Hodens und ihr Verhalten unter experimentellen Bedingungen (Hypophysektomie und Substitution mit Choriongonadotropin).
Aus: Nowakowski H. (Hrsg.): Zentrale Steuerung der Sexualfunktionen
Springer-Verlag, Berlin: 146-158

Tsai M.J., O'Malley B.W. (1994)

Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members.
Annu Rev Biochem, **63**: 451-486

Tsai M.Y., Yeh S.D., Wang R.S., Yeh S., Zhang C., Lin H.Y., Tzeng C.R., Chang C. (2006)

Differential effects of spermatogenesis and fertility in mice lacking androgen receptor in individual testis cells.
Proc Natl Acad Sci U S A, **103** (50): 18975-18980

Tung K.S., Teuscher C., Meng A.L. (1981)

Autoimmunity to spermatozoa and the testis.
Immunol Rev, **55**: 217-255

Vienonen A., Syvala H., Miettinen S., Tuohimaa P., Ylikomi T. (2002)

Expression of progesterone receptor isoforms A and B is differentially regulated by estrogen in different breast cancer cell lines.
J Steroid Biochem Mol Biol, **80** (3): 307-313

Vornberger W., Prins G., Musto N.A., Suarez-Quian C.A. (1994)

Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis.
Endocrinology, **134** (5): 2307-2316

Waseem N.H., Lane D.P. (1990)

Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form.
J Cell Sci, **96** (1): 121-129

Wehling M. (1997)

Specific, nongenomic actions of steroid hormones.
Annu Rev Physiol, **59**: 365-393

Wei L.L., Hawkins P., Baker C., Norris B., Sheridan P.L., Quinn P.G. (1996)

An amino-terminal truncated progesterone receptor isoform, PRc, enhances progestin-induced transcriptional activity.
Mol Endocrinol, **10** (11): 1379-1387

Weitze K.-F. (2001)

Andrologie beim Hengst

Aus: Busch W., Holzmann A. (Hrsg.): Veterinärmedizinische Andrologie.
Schattauer Verlag, 1. Auflage: 337-346

Wichmann U., Wichmann G., Krause W. (1984)

Serum levels of testosterone precursors, testosterone and estradiol in 10 animal species.

Exp Clin Endocrinol, **83** (3): 283-290

Wilson C.M., McPhaul M.J. (1996)

A and B forms of the androgen receptor are expressed in a variety of human tissues.

Mol Cell Endocrinol, **120** (1): 51-57

Wrobel K.H., Sinowatz F., Mademann R. (1982)

The fine structure of the terminal segment of the bovine seminiferous tubule.

Cell Tissue Res, **225** (1): 29-44

Wrobel K.H., Bickel D., Kujat R. (1996)

Immunohistochemical study of seminiferous epithelium in adult bovine testis using monoclonal antibodies against Ki-67 protein and proliferating cell nuclear antigen (PCNA).

Cell Tissue Res, **283** (2): 191-201

Zondek B (1934) a

Mass Excretion of Oestrogenic Hormone in the urine of the stallion.

Nature, **133**: 209

Zondek B (1934) b

Oestrogenic Hormone in the urine of the stallion.

Nature, **133**: 494

8.2 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arterie
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ABP	androgen binding protein
AK	Antikörper
AP	Aktionspotential
Aqua dest.	Aqua destillata
AR	Androgenrezeptor
AS	Aminosäure
α -SMA	alpha-Smooth Muscle Actin
C	Kohlenwasserstoffatom
°C	Grad Celsius
cAMP	cyclisches Adenosintriphosphat
cm	Zentimeter
Da	Dalton
DAB	3,3-Diaminobenzidin
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHT	5- α -Dihydrotestosteron
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eds.	Editors
ER α/β	Östrogenrezeptor α/β
ER α KO	Östrogenrezeptor α -Knockout
ERR α /ERR1	östrogenbezogene Rezeptoren
ERR β /ERR2	
et al.	et alii
Fa.	Firma
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
GR	Glukokortikoidrezeptor
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIOMT	Hydroxyindol-o-methyltransferase
HRE	hormone-response-element
Hrsg.	Herausgeber
HSP	Hitzeschockprotein
HVL	Hypophysenvorderlappen
IHC	Immunhistochemie
IgG	Immunglobulin G
IPA	Image Processing and Analysis
K0	Positivkontrolle
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LH	Luteinisierendes Hormon
m	Meter
mg	Milligramm
mm	Millimeter
ml	Milliliter

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
MR	Mineralokortikoidrezeptor
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NAT	N-Acetyl-Transferase
nm	Nanometer
NR3	nukleäre Rezeptor-Subfamilie 3
P450-Arom	Cytochrom P450-Aromatase
PBS	phosphate buffered saline
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
pg	Pikogramm
pH	potentia hydrogenii
PKZ	Primordialkeimzellen
PMSG	Pregnant Mare Serum Gonadotropin
PR	Progesteronrezeptor
Rez.	Rezeptor
RHT	Retinohypothalamische Bahn
sER	glattes endoplasmatisches Retikulum
SHBG	sexualhormonbindendes Globulin
SSL	Scheitel-Steißlänge
Tab.	Tabelle
TR	Schilddrüsenrezeptor
V.	Vene
Verd.	Verdünnung
ZNS	zentrales Nervensystem

8.3 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

Abb. 1:	Schematische Darstellung des Keimepithels beim Hengst mit angrenzendem Interstitium (Nach Pickett et al., 1989).....	10
Abb. 2:	Schema der Spermiogenese (Nach Smollich, 1992)	12
Abb. 3:	Darstellung der Melatoninsynthese nach Sharp und Cleaver, 1993.	16
Abb. 4:	Synthesewege der Sexualsteroiden nach Conley und Bird, 1997	19
Abb. 5:	Übersichtsbild vom Hodengewebe (Hengst, 3 Jahre) innerhalb der Zuchtsaison. Zarte <i>Septula testis</i> unterteilen das Hodengewebe in Läppchen. Zwischen den Längs- und Querschnitten der Samenkanälchen, sind in Gruppen die Leydig-Zellen (*) lokalisiert. Azanfärbung.	34
Abb. 6:	Stadium I.....	37
Abb. 7:	Stadium II.....	37
Abb. 8:	Stadium III	37
Abb. 9:	Stadium IV	37
Abb. 10:	Stadium V.....	38
Abb. 11:	Stadium VI.....	38
Abb. 12:	Stadium VII.....	38
Abb. 13:	Stadium VIII	38
Abb. 14:	Übersichtsbild vom Rete testis. Die Retekanalchen (→) sind von einem isoprismatischen Epithel ausgekleidet. In der Nachbarschaft liegen Lymphgefäße (L), Arterien (A) und Venen (V). Insert: Ausschnittsvergrößerung aus einem Retekanalchen mit dem charakteristischen isoprismatischen Epithel. HE	40
Abb. 15:	Starke Expression des AR in zahlreichen Sertoli-Zellen innerhalb der Zuchtsaison (Hengst, 4 Jahre). DAB-Reaktion mit Hämalaun-Gegenfärbung.	42
Abb. 16:	Im Gegensatz dazu, schwächere Expression des AR in Sertoli-Zellen und Leydig-Zellen außerhalb der Zuchtsaison (Hengst, 5 Jahre). DAB-Reaktion mit Hämalaun-Gegenfärbung.	43

Abb. 17:	Innerhalb der Zuchtsaison exprimieren Keimzellen in den unterschiedlichen Stadien den PR. Vereinzelt positive Markierung der Leydig-Zellkerne (→). Keine Markierung in den Spermato gonien (*). Hengst, 3 Jahre alt. DAB-Reaktion mit Hämalaun-Gegenfärbung.	45
Abb. 18:	Außerhalb der Zuchtsaison wird PR im Hengsthoden stark in Spermatozyten I. und II. Ordnung exprimiert. Leydig-Zellen sind stets unmarkiert. Hengst, 3,5 Jahre alt. DAB-Reaktion mit Hämalaun-Gegenfärbung	45
Abb. 19:	Innerhalb der Zuchtsaison exprimieren Spermatozyten I. und II. Ordnung ERβ. Sertoli-Zellen sind stets unmarkiert. Hengst, 3 Jahre. DAB-Reaktion mit Hämalaun-Gegenfärbung.....	47
Abb. 20:	Expression von ERβ außerhalb der Zuchtsaison: deutlich markiert sind Sertoli-Zellen (Pfeilkopf) und Keimzellen in unterschiedlichen Entwicklungsphasen. Moderate Expression von ERβ in den Leydig-Zellen (→). Hengst, 4 Jahre. DAB-Reaktion mit Hämalaun-Gegenfärbung.....	47
Abb. 21:	Starke P450-Aromatase-Expression im Zytoplasma der Leydig-Zellen innerhalb der Zuchtsaison (Hengst, 3 Jahre). DAB-Reaktion mit Hämalaun-Gegenfärbung.	48
Abb. 22:	Expression von PCNA innerhalb der Zuchtsaison sowohl in Spermato gonien als auch Spermatozyten I. Ordnung (Hengst, 4 Jahre). DAB-Reaktion mit Hämalaun-Gegenfärbung.....	49
Abb. 23:	Starke Zunahme mitotisch aktiver Spermato gonien und Spermatozyten I. Ordnung außerhalb der Zuchtsaison (Hengst, 8 Jahre). DAB-Reaktion mit Hämalaun-Gegenfärbung.....	50
Abb. 24:	Mitotischer Index der Spermato gonien in den Phasen des Keimepithelzyklus beim Hengst. Vergleich innerhalb und außerhalb der Zuchtsaison bei jeweils vierjährigen Hengsten. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung.	51
Abb. 25:	Mit Hilfe von α-SMA wird die Abgrenzung der Samenkanälchen durch peritubuläre Myozyten deutlich. Markiert sind die Myoepithelzellen. Außerhalb der Zuchtsaison (Hengst, 5 Jahre). DAB-Reaktion mit Hämalaun-Gegenfärbung.	52
Abb. 26:	Vergleich der Querschnitte von Samenkanälchen innerhalb und außerhalb der Zuchtsaison. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung.	53

Tabellen

Tab. 1:	Phasen des Keimepithelzyklus beim Hengst (Nach Swierstra et al., 1974).....	11
Tab. 2:	Immunhistochemischer Nachweis von ER α und ER β in Retezellen (Rt), Leydig-Zellen (L), peritubulären Myozyten (M), Sertoli-Zellen (S) und Keimzellen (K) bei verschiedenen Tierarten.	25
Tab. 3:	Übersicht über die zur Probenentnahme verwendeten Tiere	29
Tab. 4:	Übersicht über die verwendeten Reagenzien	31
Tab. 5:	Übersicht über die Positivkontrollen	32
Tab. 6:	AR-Expression im Hengsthoden inner- und außerhalb der Zucht- saison. Übersicht über die Anzahl (A) markierter Zellen und die Intensität (I) der Reaktion.	42
Tab. 7:	Übersicht zur nukleären PR-Expression im Hoden von Hengsten inner- und außerhalb der Zuchtsaison. Dargestellt sind die Anzahl (A) markierter Zellen und die Intensität (I) der Reaktion.	44
Tab. 8:	Expression von ER β in Hoden von Hengsten inner- und außerhalb der Zuchtsaison. Dargestellt sind die Anzahl (A) markierter Zellen und die Intensität (I) der Reaktion.	46

9 Anhang

Tabelle A1: Auswertung Querschnitte der Samenkanälchen mittels a-SMA

innerhalb der Zuchtsaison			
Samenkanälchen	Hengst [2,0 Jahre]	Hengst [3,0 Jahre]	Hengst [4,0 Jahre]
1	120,0	140,0	205,0
2	135,0	190,0	175,0
3	122,5	202,5	177,5
4	112,5	182,5	167,5
5	105,0	175,0	167,5
6	107,5	212,5	175,0
7	145,0	167,5	150,0
8	130,0	150,0	140,0
9	117,5	110,0	202,5
10	140,0	132,5	247,5
11	112,5	175,0	187,5
12	137,5	170,0	202,5
13	155,0	150,0	172,5
14	110,0	155,0	190,0
15	105,0	162,5	180,0
16	120,0	157,5	225,0
17	130,0	135,0	170,0
18	145,0	140,0	150,0
19	110,0	172,5	172,5
20	122,5	145,0	185,0
21	125,0	137,5	175,0
22	120,0	127,5	212,5
23	145,0	142,5	195,0
24	107,5	150,0	175,0
25	110,0	125,0	182,5
26	152,5	190,0	150,0
27	110,0	175,0	170,0
28	137,5	165,0	182,5
29	140,0	157,5	200,0
30	132,5	165,0	210,0
31	122,5	175,0	147,5
32	132,5	177,5	162,5
33	150,0	200,0	182,5
34	120,0	232,5	162,5
35	132,5	147,5	185,0
36	155,0	187,5	165,0
37	162,5	162,5	170,0
38	125,0	155,0	192,5
39	117,5	150,0	180,0
40	150,0	170,0	192,5
Mittelwert	128,3	162,9	180,9
Standardabweichung	16,0	25,0	21,7

Tabelle A2: Auswertung Querschnitte der Samenkanälchen mittels a-SMA

außerhalb der Zuchtsaison			
Samenkanälchen	Hengst [3,5 Jahre]	Hengst [4,0 Jahre]	Hengst [5,0 Jahre]
1	130,0	182,5	185,0
2	132,5	155,0	192,5
3	140,0	195,0	167,5
4	137,5	150,0	180,0
5	132,5	127,5	172,5
6	140,0	115,0	210,0
7	150,0	137,5	187,5
8	157,5	152,5	187,5
9	137,5	147,5	167,5
10	110,0	147,5	162,5
11	120,0	125,0	162,5
12	130,0	132,5	157,5
13	122,5	187,5	180,0
14	115,0	137,5	165,0
15	107,5	157,5	157,5
16	137,5	192,5	170,0
17	140,0	150,0	175,0
18	140,0	142,5	177,5
19	115,0	155,0	167,5
20	120,0	145,0	150,0
21	110,0	182,5	172,5
22	112,5	180,0	142,5
23	97,5	135,0	132,5
24	100,0	157,5	160,0
25	125,0	150,0	137,5
26	117,5	147,5	145,0
27	122,5	145,0	160,0
28	117,5	140,0	150,0
29	155,0	157,5	157,5
30	110,0	150,0	162,5
31	135,0	152,5	157,5
32	127,5	132,5	200,0
33	145,0	150,0	182,5
34	120,0	132,5	150,0
35	140,0	130,0	172,5
36	112,5	137,5	167,5
37	110,0	125,0	170,0
38	105,0	157,5	162,5
39	130,0	130,0	150,0
40	142,5	150,0	152,5
Mittelwert	126,3	149,4	166,5
Standardabweichung	15,0	19,0	16,5

Tabelle A3: Auswertung Mitotischer Index der Spermato gonien mittels PCNA

Stadium	Hengst, 4 Jahre [außerhalb der Zuchtseason]							Hengst, 4 Jahre [innerhalb der Zuchtseason]							
	Feld 1	Feld 2	Feld 3	Feld 4	Feld 5	Mittelwert des mitotischen Index in %	Standardabweichung	Feld 1	Feld 2	Feld 3	Feld 4	Feld 5	Mittelwert des mitotischen Index in %	Standardabweichung	
I	Kerne/Feld	83	67	112	113	82	7	139	135	145	165	184	8	2	
	positive Spermato gonien/Feld	14	14	5	10	13		12	16	10	12	11			6
	Mitotischer Index in %	17	21	4	9	16		9	12	7	7	6			6
II	Kerne/Feld	117	78	90	68	96	2	168	180	180	163	157	5	2	
	positive Spermato gonien/Feld	7	4	9	6	7		14	8	6	5	9			6
	Mitotischer Index in %	6	5	10	9	7		8	4	3	3	6			6
III	Kerne/Feld	84	145	117	71	97	3	176	136	213	123	155	5	1	
	positive Spermato gonien/Feld	8	7	12	8	8		9	8	6	6	7			7
	Mitotischer Index in %	10	5	10	11	8		5	6	3	5	5			5
IV	Kerne/Feld	148	72	145	120	128	4	132	117	123	148	130	9	3	
	positive Spermato gonien/Feld	8	9	7	8	18		10	11	16	8	12			9
	Mitotischer Index in %	5	13	5	7	14		8	9	13	5	9			9
V	Kerne/Feld	86	138	179	101	149	6	163	212	149	180	233	5	2	
	positive Spermato gonien/Feld	11	9	13	21	12		12	9	6	8	15			6
	Mitotischer Index in %	13	7	7	21	8		7	4	4	4	6			6
VI	Kerne/Feld	107	154	100	83	80	2	197	161	209	148	120	7	2	
	positive Spermato gonien/Feld	11	14	13	11	11		13	14	11	7	11			9
	Mitotischer Index in %	10	9	13	13	14		7	9	5	5	9			9
VII	Kerne/Feld	117	99	90	79	118	3	163	136	209	191	138	6	2	
	positive Spermato gonien/Feld	12	15	12	14	13		13	8	15	5	10			7
	Mitotischer Index in %	10	15	13	18	11		8	6	7	3	7			7
VIII	Kerne/Feld	77	106	82	139	106	5	157	149	160	178	313	7	3	
	positive Spermato gonien/Feld	15	17	21	21	12		19	7	10	13	13			4
	Mitotischer Index in %	19	16	26	15	11		12	5	6	7	4			4

10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. W. M. Amselgruber danke ich recht herzlich für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung, seinen jederzeit gewährten, fachlichen Rat und seine persönliche Unterstützung bei der Durchführung meiner Untersuchungen.

Ganz herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. J. Braun für die Übernahme und Vorlage der Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München.

Frau Dr. H. Brehm und Herrn Dr. M. Steffl danke ich für ihre freundliche fachliche Unterstützung.

Herrn Dr. M. Schweiger möchte ich für die Korrektur dieser Arbeit und seine geduldigen Ratschläge danken.

Ein Dankeschön an Frau K. Müller und Frau T. Holzäpfel für ihren fachlichen Rat und die freundliche Unterstützung bei der Laborarbeit.

Für das angenehme Arbeitsklima danke ich den übrigen Mitarbeitern des Instituts und der Tierklinik sowie meinen Promotionskollegen.

Ein großes Dankeschön an alle Tierärzte und ihre Mitarbeiter für die Unterstützung bei der Gewinnung des Untersuchungsmaterials.

Von Herzen danke ich meinen Eltern, die mir stets durch ihr Vertrauen, ihre Ratschläge und ihre großzügige Unterstützung ermöglichen, meine Ziele zu verwirklichen.