

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

Schwerpunkt Endokrinologische Forschung

Leiter: Prof. Dr. med. F. Beuschlein

**Urocortin 2 Überexpressionsmodell der Maus und die Auswirkungen auf die
Morphologie und Funktion der Gonaden**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Katharina Müller-Peltzer

aus

Heidelberg

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. F. Beuschlein
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Armin J. Becker Prof. Dr. Hans Wolff
Mitbetreuung durch die promovierte Mitarbeiterin:	Dr. med. A. Spyroglou
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL
Tag der mündlichen Prüfung:	18.05.2017

Der Beginn aller Wissenschaft ist das Erstaunen, dass die Dinge so sind, wie sie sind.

Aristoteles (384 – 322 v. Chr.)

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	7
1.1	ANATOMIE UND PHYSIOLOGIE DER GONADEN	7
1.1.1	<i>Testes: Anatomie und Funktion</i>	7
1.1.2	<i>Ovarien: Anatomie und Funktion</i>	8
1.1.3	<i>Gonadale Sexualhormonsynthese</i>	12
1.1.4	<i>Gonadotropin-Rezeptoren</i>	15
1.1.5	<i>Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse</i>	16
1.2	UROCORTINE	18
1.2.1	<i>Urocortine - CRF-verwandte Peptide</i>	18
1.2.2	<i>CRF-Rezeptoren</i>	19
1.2.3	<i>CRF-bindendes Protein</i>	19
1.2.4	<i>Expressionsmuster der Urocortine</i>	19
1.2.5	<i>Bekannte Wirkungen der Urocortine</i>	20
1.2.6	<i>Expressionsmuster und Wirkung der Urocortine in den Gonaden</i>	21
1.3	MAUSMODELL	22
1.3.1	<i>Cre/loxP-System</i>	22
1.3.2	<i>ROSA26 Genlocus</i>	24
1.4	ZIEL DER ARBEIT	24
2	MATERIAL UND METHODEN	25
2.1	CHEMIKALIEN, KITS	25
2.2	PUFFERLÖSUNGEN	26
2.3	VERBRAUCHSMATERIALIEN	27
2.4	GERÄTE UND SOFTWARE	28
2.5	VERSUCHSTIERE	29
2.6	GENOTYPISIERUNG DER MÄUSE	31
2.6.1	<i>Probengewinnung zur Genotypisierung</i>	31
2.6.2	<i>SF1-Cre Genotypisierung</i>	31
2.6.3	<i>R26 Genotypisierung</i>	32
2.7	IN SITU-HYBRIDISIERUNG FÜR CRE UND UCN2	34
2.8	ORGAN- UND BLUTENTNAHME	35
2.9	HISTOLOGISCHE AUFARBEITUNG	35
2.9.1	<i>Einbettung in Paraffin</i>	35
2.9.2	<i>Paraffinschnitte</i>	35
2.9.3	<i>Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>	36

2.9.4	Mikroskopie	36
2.9.5	Quantifizierung der Follikelanzahl	36
2.10	QUANTITATIVE EXPRESSIONSANALYSEN	37
2.10.1	RNA-Extraktion	37
2.10.2	cDNA Synthese	38
2.10.3	Standardkurven erstellen	38
2.10.4	Real-Time PCR	39
2.11	HORMONMESSUNGEN IM PLASMA	40
2.11.1	Ucn2	40
2.11.2	Steroidhormone	40
2.11.3	Östradiol	41
2.12	STATISTISCHE AUSWERTUNG	41
3	ERGEBNISSE	42
3.1	ÜBEREXPRESSION VON UCN2 IN UCN2 OE WEIBCHEN	42
3.2	ÜBEREXPRESSION VON UCN2 IN UCN2 OE MÄNNCHEN	46
3.3	VERGLEICH ZWISCHEN UCN2 OE WEIBCHEN UND MÄNNCHEN	50
4	DISKUSSION	52
4.1	BEDEUTUNG VON UROCORTIN 2 FÜR DIE GONADEN	52
4.2	BESONDERHEITEN DES VERWENDETEN MAUSMODELLS	52
4.3	ERGEBNISSE IM VERGLEICH MIT DATEN DER LITERATUR: WEIBCHEN	54
4.4	ERGEBNISSE IM VERGLEICH MIT DATEN DER LITERATUR: MÄNNCHEN	58
4.5	ERGEBNISSE IM VERGLEICH MIT DATEN DER LITERATUR: GESCHLECHTSSPEZIFISCHE UNTERSCHIEDE	60
5	ZUSAMMENFASSUNG	63
6	LITERATURVERZEICHNIS	65
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	74
8	DANKSAGUNG	77
9	VERÖFFENTLICHUNGEN	78
9.1	PUBLIKATIONEN	78
9.2	VORTRÄGE	78
9.3	POSTER	78
10	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	79

1 Einleitung

1.1 Anatomie und Physiologie der Gonaden

1.1.1 Testes: Anatomie und Funktion

Die männlichen Gonaden (Testes, Hoden) haben zwei wichtige Hauptaufgaben: die Produktion von Spermatozoen und die Synthese des Hormons Testosteron (1). Die Testes der Maus sind paarig angelegte, ovale Organe, deren Größe und Gewicht zwischen verschiedenen Mausstämmen und abhängig von der Spermienproduktion variiert (2,3). Eine bindegewebige Kapsel, die Tunica albuginea, umgibt die Testes. Von ihr gehen Septen aus, die im Interstitium zwischen den Tubuli seminiferi (Hodenkanälchen) ziehen. Die Tubuli seminiferi dienen der Spermatozytenproduktion und machen fast 90% des Hodenvolumens aus (4). Das Grundgerüst der Tubuli seminiferi wird durch Sertolizellen gebildet. Diese treten als einzige Zellart mit den reifenden Keimzellen in direkten Kontakt und garantieren ihnen ein stabiles Umfeld, Nährstoffversorgung und Schutz vor Zellen des Immunsystems durch Ausbildung der Blut-Hoden-Schranke (5). Umgeben werden die einzelnen Tubuli seminiferi von einer Basalmembran, sowie Bindegewebe, Myoid- und Endothelzellen. Das Interstitium macht insgesamt nur 10% des testikulären Volumens aus, wovon etwa 4% auf die Leydigzellen entfallen (4). Sie sind für die Synthese von Testosteron verantwortlich und unterliegen der Regulation durch das Luteinisierende Hormon (LH). Die Tubuli seminiferi setzen sich nach innen in das Rete testis fort, welches schließlich in den Epididymis (Nebenhoden) übergeht. Dieser lagert sich dem Testis seitlich an und wird in drei Abschnitte untergliedert: Caput und Corpus dienen der Reifung der Spermatozyten zu Spermatozoen, die anschließend im Bereich der Cauda bis zum Zeitpunkt der Ejakulation (6) gelagert werden. Der muskuläre Ductus deferens verbindet die Cauda epididymidis schließlich mit der Urethra.

Der Weg von der Stammzelle bis zur reifen Keimzelle führt von Spermatogonien zu Spermatozyten 1. und 2. Ordnung. Aus diesen entstehen in den Tubuli seminiferi Spermatozyten. Diese reifen anschließend im Epididymis zu reifen Spermatozoen heran. Die Spermatogonien lassen sich in die Unterklassen A_s und A_1 bis A_4 einteilen. Die Spermatogonien A_s sitzen der Basalmembran direkt auf und stellen die Stammzellen der Spermatogenese dar (7). Aus ihnen gehen durch mitotische Teilungen die Spermatogonien A_{1-4} hervor. Die A_4 Spermatogonien differenzieren sich schließlich zu Typ B Spermatogonien. Diese bewegen sich, unterstützt von Sertolizellen, mit zunehmender Differenzierung lumenwärts. Sie treten als Spermatozyten 1. Ordnung in die Meiose I ein, die zur Haploidisierung des Chromosomensatzes führt. Spermatozyten 2. Ordnung durchlaufen die Meiose II. Der sich anschließende Prozess der Spermiogenese umfasst die Reduktion des Zytoplasmas, Zellkernkondensation, Akrosomenbildung

und die Orientierung des Spermischwanzes in Richtung des Tubuluslumens. Aus den runden Spermatiden entstehen reife Spermatozoen, die schließlich im Epididymis ihre Motilität gewinnen (8,9). Für die Initiierung der Spermatogenese in pubertären Testes werden beide hypophysären Gonadotropine, LH und FSH (Follikelstimulierendes Hormon), benötigt. FSH beeinflusst hierbei die Proliferation, Reifung und Größe der Sertolizellen positiv und erhöht die Spermatogonien- und Spermatozytenanzahl (10,11). Eine weitere Progression zu postmeiotischen Spermatiden ist allerdings nur in Kombination mit Testosteron möglich (10). Dieses wird von den im Interstitium verteilten Leydigzellen synthetisiert. Im Gegensatz zu LH und Testosteron ist FSH für die Spermatogenese der reifen, postpubertären Testes nicht mehr essentiell. Für die kontinuierliche Spermienproduktion beginnen humane Stammzellen etwa alle neun Tage einen neuen mitotischen Zyklus. Bis zur Entstehung reifer Spermatozoen vergehen beim Menschen ungefähr vierunddreißig Tage. Im Alter nehmen dann sowohl die Testosteronsynthese als auch die Spermienproduktion ab. Im Gegensatz zur Follikulogenese setzt sich diese jedoch über die gesamte Lebensspanne fort (12).

1.1.2 Ovarien: Anatomie und Funktion

Die Ovarien sind die weiblichen Gonaden, sie sind paarig angelegt und oval geformt (13). Über Ligamente sind sie mit ihrer Umgebung verankert und werden von der bindegewebigen Tunica albuginea umhüllt (12). Ein Ovar besteht aus einer äußeren Rinde und einem innen liegenden Mark. Die Rinde macht den größten Anteil des Ovars aus. Hier liegen die Follikel in ihren verschiedenen Entwicklungsstadien. Das Mark besteht aus Stromazellen sowie aus Gefäßen und Nerven. Diese treten über den Hilus in das Organ ein bzw. aus. Umgeben werden die Ovarien von einer kubischen Epithelschicht, dem Keimepithel (14). Die zwei Hauptaufgaben der Ovarien sind, analog zu denen der Testes, die Gametogenese und die Steroidsynthese. Die hierfür verantwortlichen Zellen sind im Stroma und in den Follikeln enthalten: Oozyten, Granulosa- und Thekazellen (15). Die Bildung der Primordialfollikel erfolgt bei Primaten *in utero*. Zum Zeitpunkt der Geburt bestehen die Ovarien von Mäusen hauptsächlich aus kleinen, dicht gepackten Oozyten, die von Stroma umgeben werden (15). Die Oozyten reifen dann innerhalb der ersten sieben Tage *post partum* zu Primordialfollikeln heran (16). Zu diesem Zeitpunkt befinden sich die Oozyten im Arrest der Prophase der ersten meiotischen Teilung (Meiose I) und werden primäre Oozyten genannt. Wenn die primären Oozyten von einer flachen Follikel-epithelschicht umgeben werden entstehen Primordialfollikel. Ist die umgebende Epithelschicht kubisch und wird von einer Basalmembran umgeben ist ein Primärfollikel entstanden. Aus der Gesamtheit dieser Primärfollikel tritt mit jedem Zyklus eine Kohorte von Follikeln in den Reifungsprozess zum sprungreifen Follikel ein (14). Primaten und Nager ovulieren spontan. Das heißt, dass kein sexueller Stimulus für die Initiierung der Ovulation benötigt wird (17). Der Zyklus von Primaten gliedert sich in eine Follikelphase, die Ovulation und die anschließende

Lutealphase. Der durchschnittliche Zyklus dauert beim Menschen achtundzwanzig Tage und führt zur Selektion und Ovulation einer Eizelle. Im Gegensatz dazu dauert der Zyklus weiblicher Mäuse vier bis fünf Tage und führt zum Sprung mehrerer Oozyten (16). Der Zyklus der Maus gliedert sich in vier Phasen: Diöstrus, Proöstrus, Östrus und Metöstrus. Analog zur Follikelphase von Primaten reifen die Follikel während des Proöstrus und Östrus zu sprungreifen Follikeln. Die Ovulation erfolgt am Ende des Östrus. Im Metöstrus finden sich frisch gebildete Gelbkörper und atresierende Follikel. Diese bilden sich während des Diöstrus weiter zurück (17). Aufgrund der kurzen Zyklusdauer gibt es bei Nagetieren keine Lutealphase wie bei den Primaten. In der Follikelphase weisen Nager im Vergleich zu Primaten ein hohes FSH-zu-Östradiol-Verhältnis auf. So konnten bei Ratten Spitzenkonzentrationen von FSH mit 500 ng/ml und Östradiol <50 pg/ml gemessen werden. Im Gegensatz dazu liegen die Werte von Makaken bei <160 ng/ml für FSH und 300 pg/ml für Östradiol. Bei Nagetieren liegt ein „Niedrig-Östrogen“-Zyklus vor (18,19). Das von den Follikeln produzierte Östradiol erfüllt dabei mehrere Aufgaben: Es fördert die Proliferation und senkt die Apoptose von Granulosazellen, es erhält die Reaktionsfähigkeit der Granulosazellen gegenüber FSH und führt zur Expression von LH-Rezeptoren (14). Sowohl Primaten als auch Nagetiere benötigen FSH für die Follikelreifung: Während bei Primaten die Follikelreifung erst unter FSH-Einfluss einsetzt, stellt das Follikelwachstum von Nagetieren ein Kontinuum dar (20). Unabhängig vom Zyklus beginnen bei Nagern jeden Tag Follikel zu reifen. Dies geschieht zunächst ohne den Einfluss von FSH, das erst ab einer gewissen Follikelgröße benötigt wird um eine Atresie zu verhindern und sprungreife Follikel zu generieren (21) (siehe Abb. 1).

Wenn eine Kohorte von Primärfollikeln in den Reifungsprozess eintritt kommt es zur Proliferation der Epithelzellen. Die Oozyte wird dann von mehreren Schichten Epithel umgeben. Direkt um die Oozyte differenziert sich das Epithel zu Granulosazellen, die von der Basalmembran umschlossen werden. Um diese herum differenzieren sich die Thekazellen aus. In diesem Stadium wird der Follikel als Sekundärfollikel bezeichnet (14). Die Granulosazellen proliferieren weiter und ihr Zellverbund wird aufgelockert, so dass eine flüssigkeitsgefüllte Aussparung um die Oozyte herum entsteht, die Antrum genannt wird. Die Antrumflüssigkeit enthält in hohen Konzentrationen Steroidhormone und Wachstumsfaktoren (14). In diesem Stadium werden die Follikel als Tertiär- oder antrale Follikel bezeichnet (siehe Tab. 1). Die Oozyte bleibt von einigen Granulosazellen umgeben, die den Cumulus oophorus bilden (14). In die Thekazellschichten sprießen anschließend Kapillare von außen ein. Diese überschreiten die Basalmembran nicht, so dass die Granulosazellschichten gefäßfrei sind. Die antralen Follikel wachsen weiter und werden schließlich Graaf-Follikel genannt. In der zweiten Hälfte der Follikelphase erfolgt bei Primaten die Selektion eines dominanten Follikels, der bis zur Sprungreife weiter wächst. Bei Nagern entstehen gleichzeitig mehrere, sprungreife Follikel. Zu diesem Zeitpunkt der Follikelphase, kurz vor der Ovulation, erreicht die Oozyte ihren größten Durchmesser. Sie vollendet

die Meiose I zum Zeitpunkt der Ovulation und beginnt die zweite meiotische Teilung, die nur im Falle einer Befruchtung abgeschlossen wird (14).

Ovulation, Reifung der Oozyte, Luteinisierung und Vaskularisierung der Follikelzellen werden in der Zyklusmitte durch einen LH-Anstieg initiiert (22). Hierdurch kommt es im Follikel zur verstärkten Produktion von Antrumflüssigkeit und die Zellverbände werden zunehmend gelockert. Schließlich wird die Follikelwand so dünn, dass sie reißt und die Oozyte, umgeben vom Cumulus oophorus, freisetzt. An diesem Prozess sind unter anderem Prostaglandine und Proteasen beteiligt (14). Nach dem Ovulationsstimulus erfolgt der Folielsprung bei Mäusen etwa elf bis vierzehn Stunden und bei Menschen im Durchschnitt achtunddreißig Stunden später (23). Die Oozyte wird dann im Fimbrientrichter der Tube aufgefangen (14).

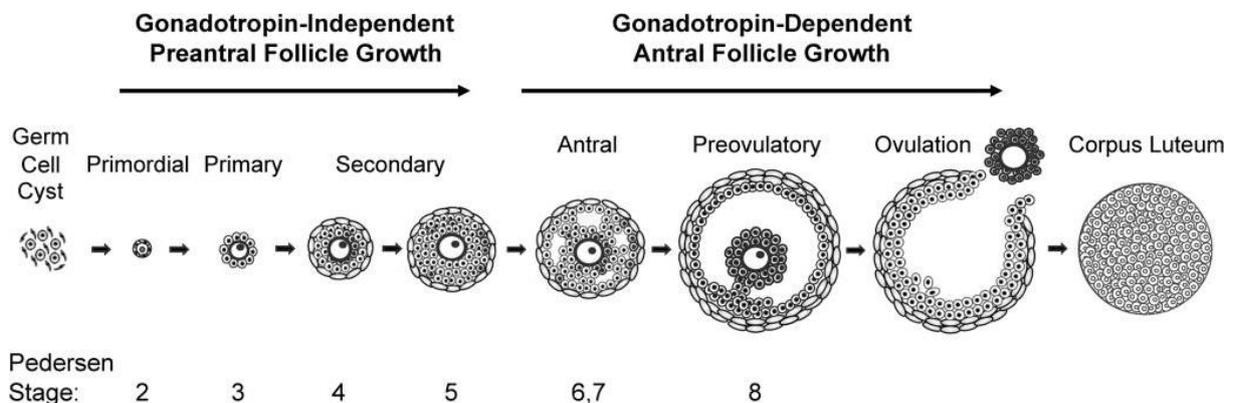


Abbildung 1: Gonadotropin-unabhängige und Gonadotropin-abhängige Stadien der Follikelreifung (13).

Erfolgt keine Befruchtung der gesprungenen Eizelle, werden die Gelbkörper von Mäusen nur für einen Zeitraum von vierundzwanzig Stunden erhalten. So kann im Anschluss an diese verkürzte Lutealphase ein neuer Zyklus beginnen. Bei der Frau bleibt das Corpus luteum bis zu zwölf Tage funktionsfähig und produziert Progesteron. Erst dann bildet sich der Gelbkörper zurück (24). Bei Primaten wird das FSH während der Lutealphase niedrig gehalten, so dass in dieser Zeit keine Follikelreifung stattfindet. Die Granulosazellen des Gelbkörpers produzieren hierzu das Peptid Inhibin, welches FSH, nicht aber LH, hemmt. Bei Nagetieren wird die Produktion von Inhibin durch die LH-Spitze gehemmt wodurch ein erneuter FSH-Anstieg ermöglicht wird (16,25). Activin, der Gegenspieler des Inhibins, wird ebenfalls in Follikeln produziert und fördert die Freisetzung von FSH. Activin kann durch Follistatin gebunden und damit biologisch inaktiviert werden. Diese ovariellen Peptidhormone haben einen wesentlichen Anteil an der Zyklusregulation (14). Am Ende der Lutealphase beginnt der Gelbkörperabbau zum Corpus albicans. Doch nicht nur Gelbkörper werden atretisch. Ein Großteil der Oozyten geht be-

reits vor der Bildung von Primordialfollikeln in Apoptose. Auch im Verlauf des Reifungsprozesses zum Graaf-Follikel kann ein Follikel jeder Zeit atresieren. Dabei treten hauptsächlich Granulosazellen in den Zelltod ein, während Luteinzellen zum Pool der interstitiellen Zellen zurückkehren. Die atretischen Follikel werden bindegewebig umgebaut und werden zu avaskulären Narben. Um dies zu verhindern stellt FSH den wichtigsten anti-apoptotischen Effekt dar. So wird die Fortsetzung des Reifungsprozesses derjenigen Follikel ermöglicht, die die günstigste FSH-Rezeptorausstattung besitzen (14).

Klassifikation der Follikel	Beschreibung
Typ 1	Die Oozyte ist klein (<20 µm) ohne umgebende Zellen.
Typ 2	Die Oozyte (<20µm) wird von wenigen Zellen umgeben wird.
Typ 3a	Die Oozyte hat einen Durchmesser <70 µm und wird von einem Ring Granulosazellen umgeben (weniger als 20 Zellen auf dem größten Querschnitt durch den Follikel).
Typ 3b	Die Oozyte (<70 µm) wird von einem Ring aus 20 bis 60 Granulosazellen umgeben.
Typ 4	Die Oozyte (<70 µm) wird von 2 Schichten Granulosazellen umgeben (60 bis 100 Zellen auf dem größten Querschnitt durch den Follikel).
Typ 5a	Die Oozyte kann nun bis zu 70 µm groß sein und wird von der Zona pellucida und 3 Schichten Granulosazellen umgeben (100 bis 200 Zellen auf dem größten Querschnitt durch den Follikel). Stromazellen umgeben als Thekazellen die Granulosazellen des Follikels, von der sie durch eine Basalmembran getrennt sind.
Typ 5b	Die Oozyte hat eine Größe von 70 µm und wird von mehreren Schichten Granulosazellen umgeben (200 bis 400 Zellen auf dem größten Querschnitt durch den Follikel). Es ist keine Follikelhöhle abgrenzbar.
Typ 6	Die Oozyte hat eine Größe von 70 µm und wird von mehreren Schichten Granulosazellen umgeben (400 bis 600 Zellen auf dem größten Querschnitt durch den Follikel). Zwischen den Zellen sind Areale mit Liquor folliculi abgrenzbar. Die Thekazellen differenzieren sich in Theca interna und externa.
Typ 7	Der Follikel weist eine einzelne Follikelhöhle mit Liquor folliculi auf, das Antrum folliculi. Der Cumulus oopherus ist abgrenzbar.
Typ 8	Der Follikel besitzt ein großes Antrum folliculi, der Cumulus oopherus ist vollständig ausgebildet.

Tabelle 1: Klassifikation der Follikel.
Modifiziert nach Pedersen und Peters (26).

1.1.3 Gonadale Sexualhormonsynthese

In den Gonaden beider Geschlechter werden Androgene und Östrogene produziert. In den Ovarien sind Gestagene ein weiteres Endprodukt der Sexualhormonsynthese. Diese Steroidhormone regulieren die Ausbildung der Geschlechtsmerkmale und die Fortpflanzung (27). Die Sexualhormonsynthese besteht aus einer Abfolge zahlreicher Reaktionsschritte (siehe Abb. 4). Die Regulation erfolgt dabei sowohl durch das Expressionsniveau der beteiligten Enzyme als auch durch die Konzentrationen von Edukten und Produkten. Die Enzyme der Sexualhormonsynthese gehören im Wesentlichen entweder den Cytochromen P450 (Cyp) oder den Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (Hsd) an. Alle Steroidhormone leiten sich von der Substanz Cholesterin ab. Dieses wird zum überwiegenden Anteil aus dem Blutstrom in die hormonsynthetisierenden Zellen aufgenommen und in Form von Lipidtropfen im Zytosol gespeichert oder an Proteine gebunden. Durch Transportproteine gelangt das Cholesterin vom Zytosol zur äußeren und durch das Steroidogenic acute regulatory (StAR) Protein zur inneren Mitochondrienmembran (28). Anschließend katalysiert Cyp11A1, auch „side-chain cleavage“-Enzym (P450scc) genannt, die Synthese von Pregnenolon aus Cholesterin. Dies ist die erste und geschwindigkeitsbestimmende Reaktion bei der Synthese aller Steroidhormone. Aus Cholesterin, einem 27-Kohlenstoff (C27)-Steroid, entsteht so das C21-Steroid Pregnenolon. Dieses gelangt anschließend zurück ins Zytosol und zum endoplasmatischen Retikulum. Hier erfolgen die weiteren Syntheseschritte (14):

Cyp17 (P450c17) katalysiert mit seiner 17 α -Hydroxylase-Funktion die Reaktion zu 17-Hydroxypregnenolon (17OH-P5). Durch die 17,20-Lyase-Funktion von Cyp17 entsteht aus Hydroxypregnenolon dann Dehydroepiandrosteron (DHEA), ein C19-Steroid (29). Nach der Doppelbindung zwischen C5 und C6 werden diese Moleküle auch als Δ 5-Metabolite bezeichnet. Die Reaktion von Pregnenolon zu DHEA wird Δ 5-Syntheseweg genannt (27). Hsd3B, auch 3 β Hsd geschrieben, kann Pregnenolon zu dem Δ 4-Metabolit Progesteron umwandeln. Über den Δ 4-Syntheseweg entsteht dann 17-Hydroxyprogesteron (17OH-P4) durch die 17 α -Hydroxylase-Funktion von Cyp17 und anschließend das C19-Steroid Androstendion (ASD) mittels der 17,20-Lyase-Funktion von Cyp17. Hsd17B, auch 17 β Hsd genannt, katalysiert die Reaktionen von ASD zu Testosteron, von DHEA zu Androstendiol, sowie von Östron zu Östradiol. Hierbei besitzt das humane Enzym Hsd17B eine Substratspezifität für Östrogene und katalysiert somit nur die letztgenannte Reaktion. Hsd17B der Nagetiere verwendet sowohl Androgene als auch Östrogene als Substrat (29). Androstendiol wird durch Hsd3B zu Testosteron umgesetzt. Die Östrogene, Östron und Östradiol, sind C18-Steroide. Ihre Synthese wird durch das Enzym Cyp19 (Aromatase, P450arom) katalysiert. Dabei wird Androstendion zu Östron und Testosteron zu Östradiol aromatisiert. In welcher Menge und auf welchem Syntheseweg

die entsprechenden Hormone produziert werden wird durch mehrere Faktoren beeinflusst, unter anderem geschieht dies über die Enzymausstattung der steroidhormonproduzierenden Zellen. So wird in humanen, nicht aber in murinen, Nebennierenzellen Cyp17 exprimiert (30). In Ovarien besitzen ausschließlich Granulosazellen die Eigenschaft C19-Steroide zu Östrogenen zu aromatisieren, da sie das Enzym Cyp19 exprimieren. In Thekazellen sowie in luteinisierten Granulosazellen des Corpus luteum wird Cyp17 exprimiert (31). In den Granulosaluteinzellen des Corpus luteum ist jedoch die 17 α -Hydroxylase-Funktion die führende Aktivität, so dass die Granulosaluteinzellen keine Androgene synthetisieren. Für die Steroidsynthese in den Ovarien spricht man daher auch von dem „Zwei Zell/Zwei Gonadotropin-Model“ (siehe Abb. 2 und 3): Granulosazellen exprimieren FSH-Rezeptoren (FSH-R). LH-Rezeptoren (LH-R) werden von luteinisierten Granulosazellen des Gelbkörpers sowie von Thekazellen exprimiert. Da die luteinisierten Granulosazellen keine nennenswerte 17,20-Lyase-Funktion von Cyp17 besitzen und daher keine Androgene synthetisieren können, kommt es hier während der Lutealphase zur einer verstärkten Progesteronsynthese (32). Die Thekazellen wandeln das Progesteron dann unter LH-Einfluss in Androgene um. Diese werden schließlich in den Granulosazellen zu Östrogenen aromatisiert. Hierfür aktiviert FSH das notwendige Enzym Cyp19 (Aromatase), welches nur in den Granulosazellen exprimiert wird (14,33).

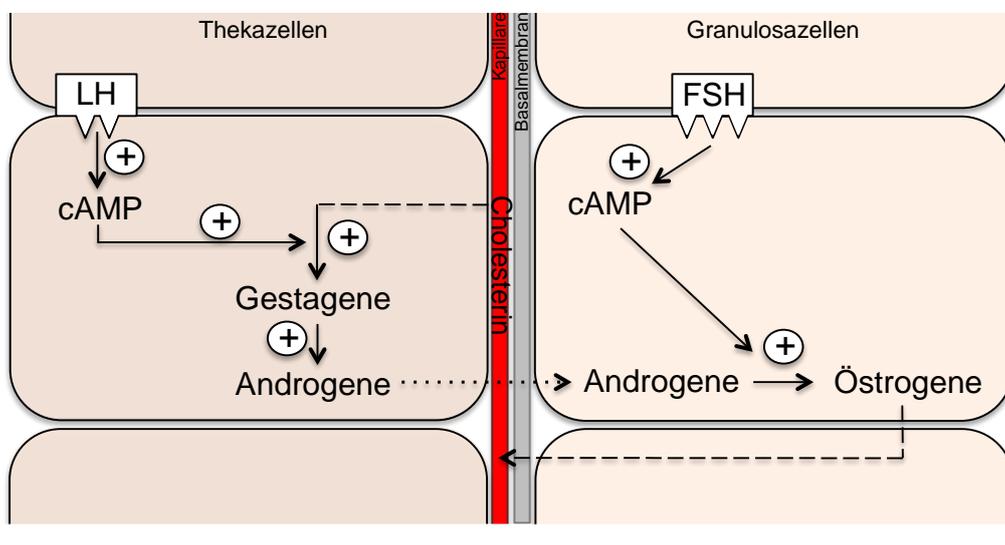


Abbildung 2: Schematische Darstellung der 2-Zell-Theorie (nicht luteinisiert). Theka- und Granulosazellen sind noch nicht luteinisiert. Gestrichelte Linie: Transport zwischen Kapillare und Zelle; gepunktete Linie: Transport zwischen Theka- und Granulosazellen. Modifiziert nach Feher (34).

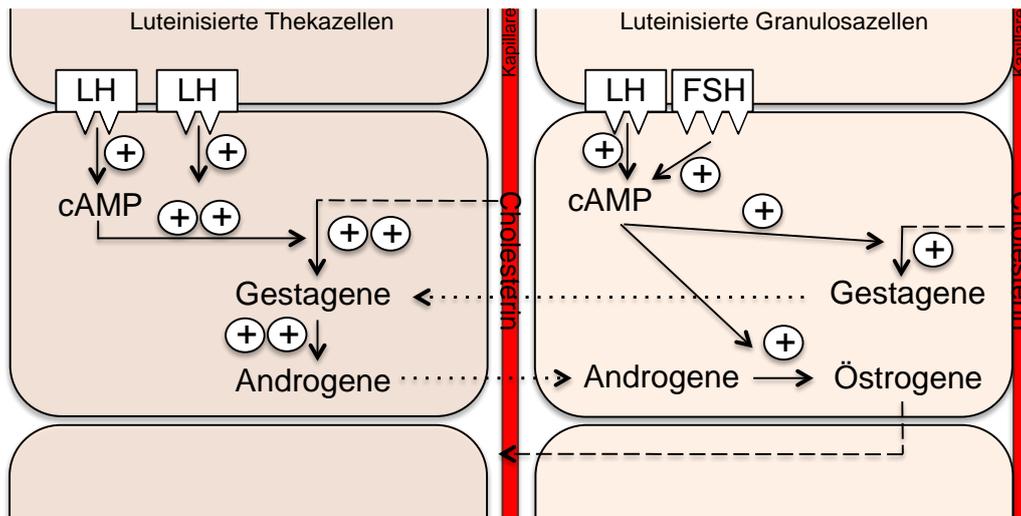


Abbildung 3: Schematische Darstellung der 2-Zell-Theorie (luteinisiert).

Theka- und Granulosazellen sind luteinisiert, eine trennende Basalmembran existiert nicht mehr. Gestrichelte Linie: Transport zwischen Kapillare und Zelle; gepunktete Linie: Transport zwischen Theka- und Granulosazellen. Modifiziert nach Feher (34).

In den Testes erfolgt die Sexualhormonsynthese in den Leydigzellen. Die Leydigzellen besitzen hierfür die volle Enzymausstattung, so dass kein Transport von Zwischenprodukten zwischen verschiedenen Zelltypen notwendig ist. Die einzelnen Syntheseschritte erfolgen entsprechend denen der Ovarien, mit dem Unterschied, dass Testosteron und nicht Östradiol bzw. Östron das Hauptprodukt darstellt. Die Testosteronsynthese erfolgt unter dem Einfluss von LH. In den Testes wird Testosteron jedoch in geringeren Mengen zu Östrogenen aromatisiert (35). Für Ratten konnte gezeigt werden, dass sich der Hauptexpressionsort von Cyp19 mit dem Alter verändert: In präpubertären Ratten besitzen die Sertolizellen die größte Aromatase-Aktivität, während die Leydigzellen die Hauptaktivität in ausgewachsenen Tieren besitzen. Cyp19 wurde mittlerweile auch in verschiedenen Stadien der Spermatogenese nachgewiesen und scheint für eine regelrechte Motilität der Spermien essentiell zu sein (36).

Die produzierte Hormonmenge und der Hormonsyntheseweg werden sowohl in den Testes als auch in den Ovarien durch die Substratspezifität und Effizienz der Enzyme beeinflusst: Während humanes Cyp17 Hydroxypregnenolon als Substrat bevorzugt und somit kaum Hydroxyprogesteron auf dem $\Delta 4$ -Syntheseweg umsetzt, sind Ratten in der Lage C19-Steroide über den $\Delta 4$ - und den $\Delta 5$ -Syntheseweg zu produzieren (37). Hormonelle Stimuli sind ein weiterer, wichtiger Einflussfaktor der Steroidhormonsynthese. FSH erhöht die Expression von Cyp19 in Granulosazellen und bewirkt somit die Aromatisierung von Androgenen zu Östrogenen. LH führt durch eine vermehrte Expression von Cyp11A1 und Cyp17 zu einer gesteigerten Gestagensynthese in den Ovarien (38). In den Hoden stimuliert LH die Testosteronsynthese

der Leydigzellen (39). LH und FSH vermitteln ihre Wirkung in den Testes und Ovarien über membranständige Rezeptoren, die LH- und FSH-Rezeptoren.

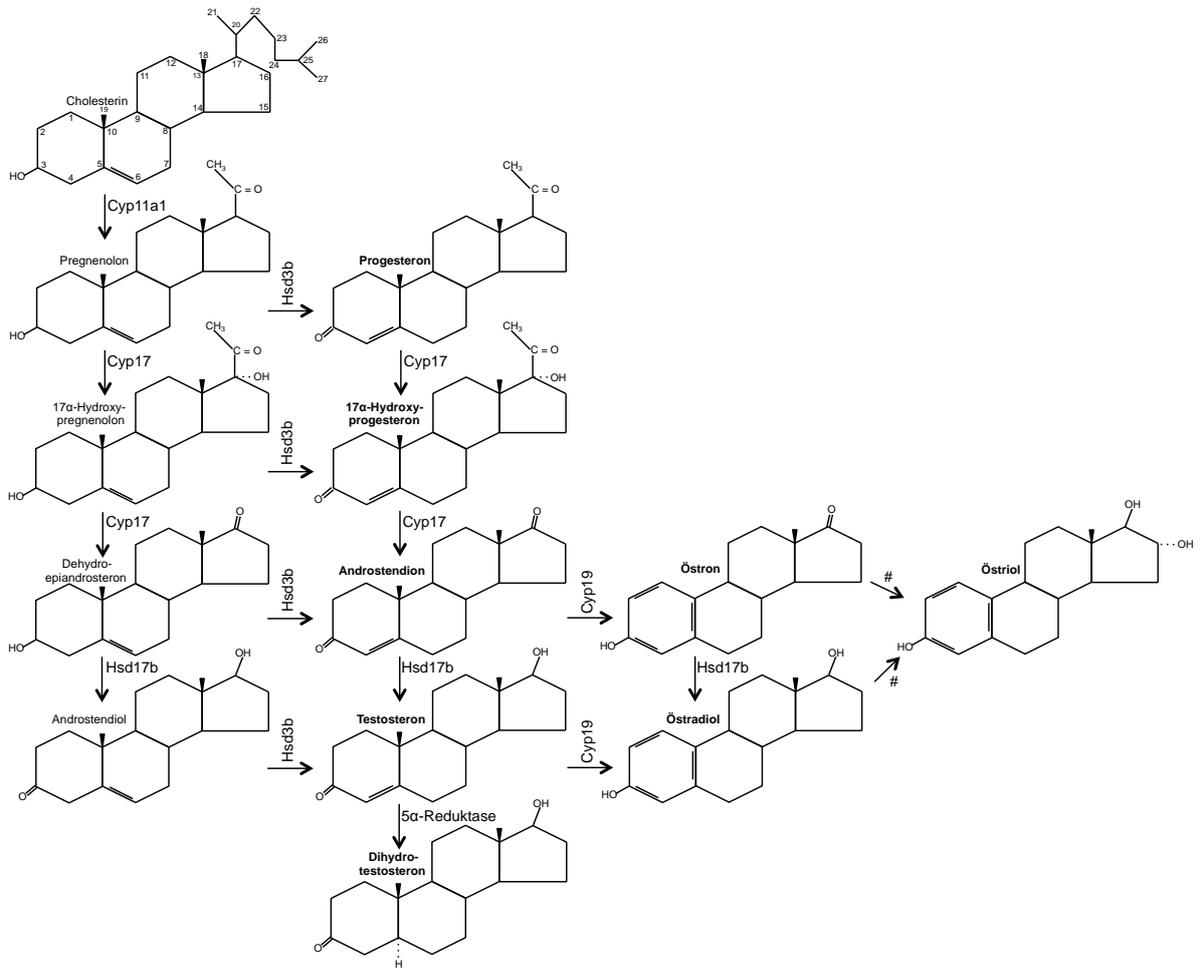


Abbildung 4: Übersicht über die Steroidbiosynthese der Sexualhormone.
#: Synthese erfolgt in Plazenta. Modifiziert nach Shawan et al. (40).

1.1.4 Gonadotropin-Rezeptoren

FSH und LH sind Liganden membranständiger, G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. Nach Bindung des Gonadotropins an seinen Rezeptor wird in der Zelle der Proteinkinase A-Signalweg initiiert. Hierbei aktiviert eine Untereinheit des an den Rezeptor gekoppelten G-Proteins eine membrangebundene Adenylatzyklase. Diese bildet aus Adenosintriphosphat (ATP) den Second-Messenger cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP). cAMP aktiviert anschließend die Proteinkinase A (PKA), die den Transkriptionsfaktor cAMP-response element-binding protein (CREB) phosphoryliert und hierdurch aktiviert. CREB reguliert dann unter anderem die Transkription verschiedener Enzyme der Sexualhormonsynthese oder der Gonadotropin-Rezeptoren (13,41). Über den FSH-Rezeptor werden die Proliferation der Sertolizellen und die Spermatogenese sowie die Follikelreifung gesteuert. Die Hauptexpression der

FSH-Rezeptoren erfolgt daher in den Sertolizellen der Testes sowie in den Granulosazellen der ovariellen Follikel (42,43) (siehe Abb. 5).

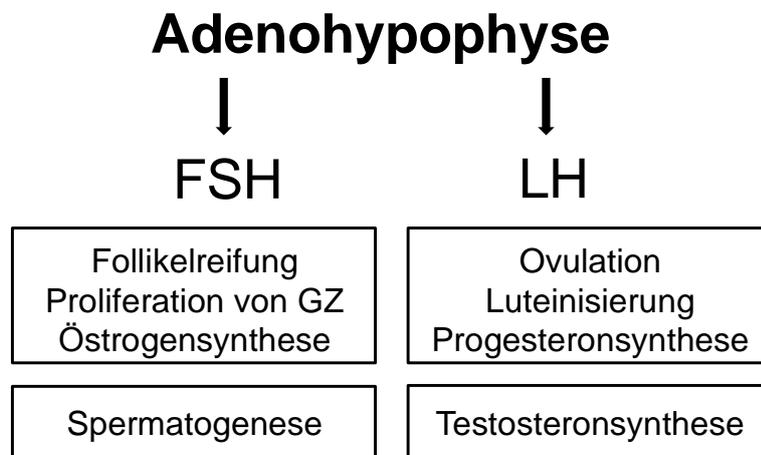


Abbildung 5: Übersicht über die Funktionen von FSH und LH. Modifiziert nach Richards und Pangas (22).

1.1.5 Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse

Die Gonaden unterliegen einer übergeordneten Regulierung. Die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse (HHG-Achse) steuert die Funktion der Gonaden mithilfe von Releasing-Hormonen und Rückkopplungsmechanismen: Dabei hemmen die in den Gonaden produzierten Steroidhormone die Freisetzung der Releasing-Hormone aus dem Hypothalamus und der Hypophyse. Ein wesentlicher Unterschied zu anderen Regelkreisen ist, dass für die Ovarien neben den negativen Feedback-Schleifen ein positiver Rückkopplungsmechanismus existiert (siehe Abb. 7). Hierbei führen steigende Konzentrationen von Östradiol und Progesteron zum LH-Peak der Zyklusmitte (44). Im Hypothalamus, dem übergeordneten Regulationszentrum, wird das Hormon GnRH synthetisiert und pulsatil in das Portalsystem der Hypophyse abgegeben. Dieser Stimulus führt in der Adenohypophyse (Hypophysenvorderlappen, HVL) zur Synthese der gonadotropen Hormone FSH und LH. Diese werden ebenfalls pulsatil freigesetzt und gelangen in den Blutstrom (14). Die Hypophysenhormone erreichen die Gonaden über den systemischen Blutkreislauf. Bei weiblichen Säugetieren führen niedrigfrequente GnRH-Pulse zu einer leichten FSH-Erhöhung zu Beginn der Follikelphase. Die noch niedrige Östradiolkonzentration wirkt hierbei hemmend auf die GnRH-Ausschüttung. In der späten Follikelphase führen Progesteron und der schnelle Konzentrationsanstieg von Östradiol zu einer positiven Rückkopplung. Durch diese Stimulation erfolgen anschließend hochfrequente GnRH-Pulse, die einen starken LH-Anstieg in der Zyklusmitte zur Folge haben (22). Östradiol hat gleichzeitig eine hemmende Wirkung auf die Freisetzung von FSH (44). Für Nagetiere konnte nachgewiesen werden, dass auch die Hypophysenhormone Prolaktin und Wachstumshormon

(Growth hormone) einen direkten Einfluss auf die Ovarien ausüben: Prolaktin kann abhängig von seiner Konzentration die Anzahl der LH-Rezeptoren erhöhen oder senken. Wachstumshormon ist in der Lage die Wirkung von FSH zu unterstützen (14). Bei männlichen Säugetieren stimuliert LH die Leydigzellen der Hoden zur Synthese von Testosteron (39). Dieses gelangt in den Blutstrom und kann peripher zu Dihydrotestosteron oder auch Östradiol umgewandelt werden (45). FSH reguliert die testikuläre Spermatogenese (46). Hierbei wird die Spermienproduktion nicht nur durch das Testosteron der Leydigzellen unterstützt; auch Östrogene greifen hier regulierend in Feedback-Prozesse ein (47). Die HHG-Achse stellt bei beiden Geschlechtern ein komplexes System mit zahlreichen Regulationsmechanismen dar. Ihre Komplexität bedingt daher eine gewisse Störanfälligkeit. Das empfindliche Gleichgewicht kann sowohl durch interne Stimuli (auto-, para- oder endokrin) als auch durch externe Einflussfaktoren gestört werden. Beispiele für solche Störfaktoren sind körperliche Erkrankungen, Umwelteinflüsse sowie akuter und chronischer Stress (44). So kann die Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse bei Stress die Fortpflanzungsfähigkeit negativ beeinflussen (siehe Abb. 6): Im Hypothalamus können aktive CRF-Neuronen einen inhibitorischen Effekt auf das Kontrollzentrum der HHG-Achse ausüben. Zudem können Glukokortikoide der Nebennieren die Funktion der HHG-Achse auf jeder Regulationsebene inhibieren. Während die Aktivität der HHN-Achse durch Östrogene gesteigert wird, kann sie durch Androgene gesenkt werden. So können die Sexualhormone die Ausprägung der Stressantwort mitbeeinflussen (48,49). Für einen Einfluss von Stress auf die Fortpflanzungsfähigkeit spricht auch der Nachweis von CRF und CRF-verwandten Peptiden in den Gonaden (50-53).

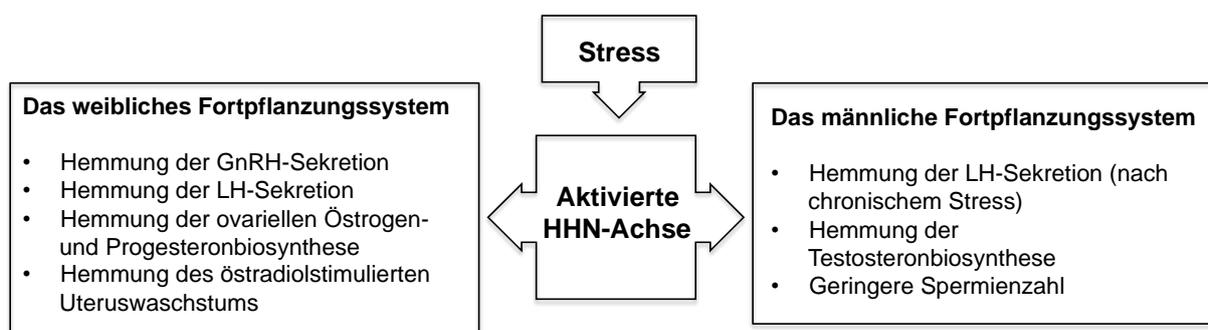


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen der HHN-Achse und der HHG-Achse.

Modifiziert nach Kalantaridou et. al (50).

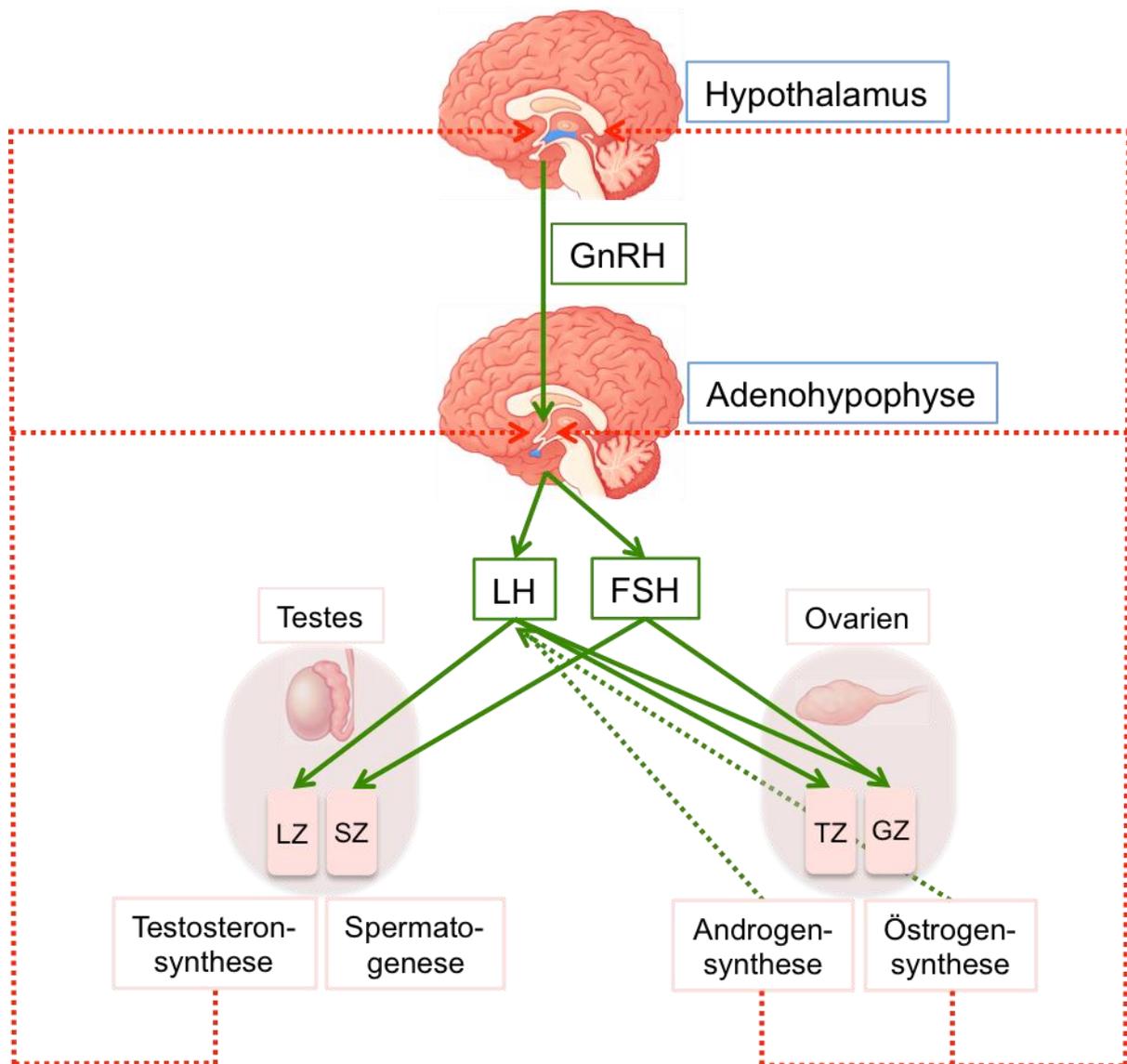


Abbildung 7: Übersicht über die positiven und negativen Rückkopplungsmechanismen der HHG-Achse.
Grüne Pfeile: Stimulation; grüne, gestrichelte Pfeile: positive Rückkopplung; rote, gestrichelte Pfeile: negative Rückkopplung (44,54).

1.2 Urocortine

1.2.1 Urocortine - CRF-verwandte Peptide

Die Urocortine gehören zur Familie der Corticotropin-releasing factor (CRF)-verwandten Neuropeptide. Als ersten Vertreter dieser Gruppe beschrieben 1995 Vaughan et al. Urocortin 1 (Ucn1) im Mittelhirn der Ratte. Es erhielt seinen Namen in Anlehnung an das bei Knochenfischen nachgewiesene Urotensin 1. Mit diesem stimmt es in 63% der Aminosäuresequenz überein. Ucn1 zeigt ferner 45% Sequenzhomologie zu CRF von Ratte/Mensch (55). Als weitere Vertreter der Urocortine folgten 2001 Urocortin 2 (stresscopin-related peptide, Ucn2) und Urocortin 3 (stresscopin, Ucn3) (52,56,57). Sie haben zueinander eine größere Homologie (40%) als zu Ucn1 oder CRF (57).

1.2.2 CRF-Rezeptoren

Die Urocortine und CRF sind natürliche Liganden der CRF-Rezeptoren. Sie gehören zu den G-Protein-gekoppelten, Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren. In Wirbeltieren wurden zwei Rezeptortypen beschrieben: CRF-Rezeptor Typ 1 (CRF₁) und CRF-Rezeptor Typ 2 (CRF₂) (58). CRF₁ und CRF₂ stimmen in über 70% ihrer Aminosäuresequenz überein. Von CRF₂ konnten drei funktionsfähige Splicevarianten nachgewiesen werden (59). Die Rezeptoren unterscheiden sich voneinander sowohl durch die Bindungsaffinität gegenüber ihren Liganden als auch durch ihr Expressionsmuster (siehe Abb. 8). CRF₁ besitzt eine hohe Affinität für CRF und Ucn1. An CRF₂ binden die Urocortine 1-3 mit hoher Affinität, während CRF nur eine geringe Bindungsstärke für diesen Rezeptor besitzt (57,60). Für CRF₁ konnte die höchste Expression in verschiedenen Strukturen des zentralen Nervensystems (ZNS) nachgewiesen werden. In peripheren Geweben, wie den Nebennieren, wird CRF₁ in geringerem Ausmaß exprimiert. Die Expression der CRF₂-Splicevarianten wurde sowohl im Gehirn als auch in Organen wie Herz, Lunge, Skelettmuskel und Plazenta beschrieben (58,61). Ferner konnten beide Rezeptortypen in den Gonaden nachgewiesen werden: CRF₁ konnte in Granulosaluteinzellen und in interstitiellen Stromazellen der Ovarien nachgewiesen werden. Eine CRF₂-Expression findet in ovariellen Granulosaluteinzellen sowie in Leydigzellen der Testes statt (48,62-64).

1.2.3 CRF-bindendes Protein

Das CRF-bindende Protein ist ein 37 kD großes Glykoprotein, das im Blutstrom und in der Hypophyse nachgewiesen werden kann. Es bindet mit hoher Affinität CRF, dessen Bioverfügbarkeit dadurch gesenkt wird und eine CRF-induzierte Freisetzung des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) vermindert (65). Während Ucn1 eine mit CRF vergleichbare Bindungsstärke zum CRF-bindenden Protein aufweist (55) zeigen Ucn2 und Ucn3 keine nennenswerte Affinität (57).

1.2.4 Expressionsmuster der Urocortine

Seit der Erstbeschreibung im Jahr 1995 durch Vaughan et al. konnte die Expression von Ucn1 noch in vielen weiteren Wirbeltieren und Geweben bestätigt werden. Der Nucleus Edinger-Westphal imponiert als der Hauptexpressionsort für Ucn1 im ZNS. Ucn1-mRNA kann unter anderem noch in folgenden ZNS-Strukturen nachgewiesen werden: dem Nucleus supraopticus, der lateralen oberen Olive, der Hypophyse sowie Motoneuronen des Hirnstamms und Rückenmarks (55,66). In der Peripherie wird Ucn1 unter anderem in Herz, Fettgewebe, Milz, Nebennieren, Gonaden und dem enterischen Nervensystem exprimiert (51).

Die Genexpression von Ucn2 erfolgt zentral im Nucleus paraventricularis, im Nucleus arcuatus sowie im Locus caeruleus und in der Neurohypophyse (52,56). Peripher wird Ucn2 in größerer Menge in Skelettmuskel, Haut, Nebennieren, Gonaden, Uterus und Milz exprimiert (51,52).

Ucn3-mRNA wird zentral im Nucleus preopticus medialis, im Nucleus medialis der Amygdala sowie im lateralen Septum exprimiert. Eine periphere Expression ist für Teile des Gastrointestinaltraktes, Haut, Nebenniere und Muskel nachgewiesen (52,53).

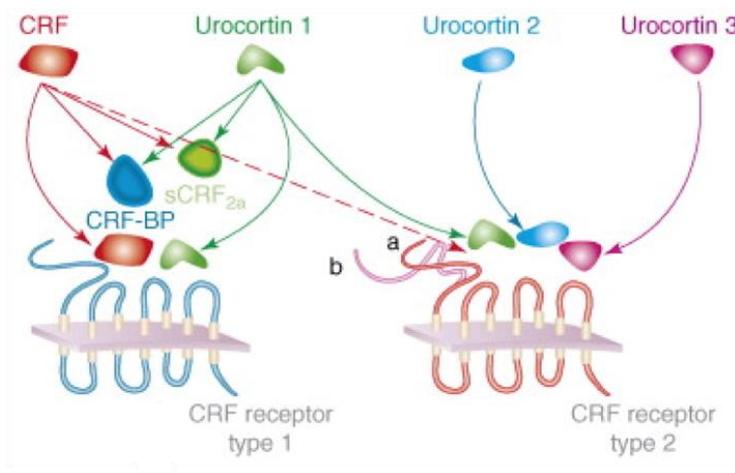


Abbildung 8: Schematische Darstellung der CRF-Familie und ihrer Rezeptoren. Während CRF mit der höchsten Affinität an CRF₁ bindet, zeigt Urocortin 1 eine gleich hohe Affinität zu CRF₁ und CRF₂. Urocortin 2 und Urocortin 3 sind spezifische Liganden von CRF₂. CRF und Urocortin 1 binden mit vergleichbarer Affinität an das CRF-bindende Protein (CRF-BP). Durchgehende Linie: hohe Affinität, gestrichelte Linie: niedrige Affinität. Modifiziert nach Kuperman et al. (67).

1.2.5 Bekannte Wirkungen der Urocortine

Durch ihr individuelles Expressionsmuster und ihre Rezeptorpräferenz modulieren Urocortine die Antwort des Körpers auf Stressstimuli in unterschiedlicher Weise. Bedingt durch seine Affinität für CRF₁ und CRF₂ ergibt sich für Ucn1 ein Wirkungsspektrum, das sowohl CRF- als auch Ucn2/Ucn3-typische Effekte enthält (55). Die zentralnervöse Wirkung von Ucn1 zeigt sich in einer gesteigerten Stressantwort des Körpers. Diese geht mit einer vermehrten Ausschüttung von ACTH, verminderter Nahrungs- und Wasseraufnahme sowie einem verstärktem Angstverhalten einher (56,68). Auch eine Beteiligung an der Osmoregulation ist nachgewiesen (69). Für eine pro-inflammatorische Wirkung sprechen der Nachweis einer gesteigerten Expression von Ucn1 in Lymphozyten, Makrophagen und Synovialzellen bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (70); sowie die Beobachtung, dass intradermales Ucn1 zu Mastzelldegranulation und konsekutiv zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität führen kann (71). Aufgrund des Nachweises von Ucn1 in Plazenta- und Ovarialzellen wird ein regulierender Einfluss auf die Steroidbiosynthese und Plazentafunktion angenommen (72,73). Ucn1 wirkt auch auf das Herz-Kreislaufsystem: Bei Frauen mit hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen konnten erhöhte Ucn1-Werte im maternalem und fetalem Plasma nachgewiesen werden (74). Die Einsatzmöglichkeit als Inotropikum und Biomarker bei Herzinsuffizienz wird untersucht (75). Aufgrund seiner positiven Wirkung auf ischämisches Myokard wird geprüft, ob Ucn1 in der

Therapie des Myokardinfarktes eingesetzt werden könnte (76). Ucn2 und Ucn3 begünstigen durch ihre vielfältigen Funktionen die Wiederherstellung einer post-Stress-Homöostase. Sie werden daher auch als „stress-coping“ Peptide bezeichnet (52). Diese Wirkungsweise liegt in ihrer Selektivität für CRF₂ begründet. Für diesen Rezeptor konnte gezeigt werden, dass er eine wichtige Rolle für die Erholung des Körpers von Stressstimuli spielt (77). Auch Anxiolyse, Vasodilatation, verminderte Nahrungsaufnahme und verzögerte Magenentleerung vermitteln Ucn2 und Ucn3 über diesen Rezeptor (52,56,77-79). Ferner konnte gezeigt werden, dass diese Urocortine den Reperfusionsschaden nach einem ischämischen Ereignis am Herzen reduzieren und die Ischämietoleranz von Kardiomyozyten verbessern können. Hieraus lassen sich vielversprechende Einsatzmöglichkeiten der Urocortine in der Behandlung ischämischer Herzerkrankungen ableiten (80). *In vitro* und in präklinischen *in vivo* Untersuchungen konnten zeigen, dass Ucn2 die Vaskularisation von Tumorgewebe reduzieren und somit das Tumorumfolum verringern kann (81). Wenn sich diese Ergebnisse in weiteren Tumorzelllinien und Tiermodellen in Zukunft bestätigen, könnte Ucn2 als neuer Ansatzpunkt in der Krebstherapie dienen. Da Ucn2 und Ucn3 lokal in verschiedenen Zellen der Plazenta gebildet werden, wird ein Einfluss dieser Urocortine auf den Schwangerschafts- und Geburtsverlauf angenommen. Die maternalen Plasmawerte von Ucn2 und Ucn3 ändern sich im Verlauf einer normalen Schwangerschaft allerdings nicht wesentlich. Da lokal deutlich höhere Konzentrationen erreicht werden können, ist ein auto- oder parakriner Wirkungsmechanismus denkbar (82). Mithilfe von Trophoblasten-Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass Ucn2 dosisabhängig eine Steigerung der Östrogenproduktion in diesen Zellen vermitteln kann (83). Bei intracerebroventrikulärer Applikation induziert Ucn2 eine dosisabhängige Hemmung der pulsatilen LH-Sekretion der Adenohypophyse (53).

1.2.6 Expressionsmuster und Wirkung der Urocortine in den Gonaden

Urocortine und ihre Rezeptoren werden sowohl in weiblichen als auch in männlichen Gonaden exprimiert. Durch ihre Verteilung auf die unterschiedlichen Zelltypen können sie auf diverse Abläufe regulierend einwirken. Ucn1 und seine Rezeptoren werden im Ovar in luteinisierten Theka- und Granulosazellen des aktiven Corpus luteum gebildet. Zu Beginn der Gelbkörperdegeneration ist Ucn1 nur in luteinisierten Thekazellen nachweisbar. Ein Corpus albicans ist nicht mehr zur Steroidbiosynthese fähig und es wird kein Ucn1 mehr gebildet. Dieses zeit- und ortsspezifische Expressionsmuster spricht für einen regulierenden Einfluss von Ucn1 auf den Gelbkörper und seine Steroidbiosynthese (73). In den Testes konnten Ucn1 und seine Rezeptoren sowohl in Leydigzellen als auch in verschiedenen Reifungsstadien männlicher Keimzellen nachgewiesen werden. Tezavel et al. schlussfolgerten daher, dass Ucn1 in männlichen Gonaden sowohl die Steroidbiosynthese als auch die Keimzellreifung beeinflusst (84). Die Studienlage bezüglich der Art dieses Einflusses ist jedoch nicht eindeutig: Für Ucn1 wurde

eine hemmende Wirkung auf die Akrosomenreaktion und die Beweglichkeit von Spermien festgestellt (85). In Mäusen konnte durch CRF₁-Agonisten eine gesteigerte Testosteronproduktion erzielt werden (86). Im Gegensatz dazu führte Ucn1 in Leydigzellen von Ratten zu einer verminderten hCG-vermittelten Testosteronbildung (87). Ucn2-mRNA wird sowohl in den Ovarien als auch in den Testes exprimiert (88,89). Xu et al. untersuchten die ovariellen Expressionsmuster der Urocortine und ihrer Rezeptoren während des Menstruationszyklus bei Primaten. Sie schlussfolgerten, dass die Expression von Ucn2 durch den LH-Einfluss gesteigert werden könnte. Immunohistochemisch konnte Ucn2 während der Follikelphase in Granulosazellen von präantralen, präovulatorischen und atretischen Follikeln sowie im Stroma der Ovarien nachgewiesen werden. Die Färbung der Gelbkörper war zu Beginn der zweiten Zyklushälfte am stärksten und wurde in der späten Lutealphase zunehmend schwächer. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Ucn2 unter LH-Einfluss in steroidhormonsynthetisierenden Zellen produziert wird und auf diese regulierend einwirkt (63). Eine Expression von Ucn2-mRNA in den Leydigzellen der Testes konnte durch Lee et al. (89) nachgewiesen werden, im Vergleich zu der Expression der Ucn1-mRNA war diese jedoch wesentlich geringer. Die Expression von CRF₂, an den Ucn2 hochselektiv bindet, wurde in Spermatogonien, nicht jedoch in reiferen Entwicklungsstadien der Spermatozoen durch Tezval et al. nachgewiesen (84). Während eine Expression von Ucn3 in den Testes von Ratten nachgewiesen werden konnte (89), gelang dieser Nachweis für Ovarien bislang nicht (63).

1.3 Mausmodell

1.3.1 Cre/loxP-System

Die ortsspezifische Rekombinase Cre (cyclization recombination) kommt in den Bakteriophagen P1 vor. Die spezifischen Erkennungssequenzen für die Rekombinase Cre sind die sogenannten loxP-Kassetten. Für P1 erfüllt Cre zwei entscheidende Aufgaben bei der Virusvermehrung: Nachdem die lineare, virale DNA von P1 in ein Bakterium eingebracht wurde bildet Cre zunächst eine ringförmige Virus-DNA. Die virale DNA besitzt hierfür an beiden Enden loxP-Kassetten (locus of crossover P1), die durch Cre erkannt werden. Die DNA wird zu einem Ring geschlossen und liegt im Bakterium dann als Plasmid vor. Während der Plasmidreplikation entstehen Plasmid-Dimere, die anschließend durch Cre aufgrund der vorhandenen loxP-Kassetten getrennt und wieder zu Plasmiden geformt werden (90).

Das Cre/loxP-System ist eine gut etablierte Methode, um Gen-Knock-outs bei Mäusen auf bestimmte Gewebetypen zu begrenzen. Für eine solche, gewebespezifische Knock-out-Maus werden zwei gentechnisch veränderte Mausstämme gekreuzt: Die eine transgene Mauslinie besitzt nach homologer Rekombination ein durch loxP-Kassetten flankiertes Zielgen („ge-

floxt“). Die andere Mauslinie exprimiert nach erfolgreicher Genmodifikation die Cre-Rekombinase. Die Expression von Cre wird hierbei durch einen gewebespezifischen Promotor reguliert. Nach Kreuzung dieser beiden Mauslinien wird ein Teil der Nachkommen das „gefloxt“ Zielgen besitzen und in bestimmten Geweben die Cre-Rekombinase exprimieren. In den Geweben, die kein Cre exprimieren, bleibt das Zielgen erhalten und kann exprimiert werden. In den Zelltypen, die aufgrund der gewebespezifischen Promotoraktivität Cre exprimieren, wird das „gefloxt“ Zielgen entfernt, was einen gewebespezifischen Knock-out zur Folge hat (91).

Das Cre/loxP-System kann jedoch auch für die Generierung von Knock-in-Mäusen genutzt werden (siehe Abb. 9). Hierfür wird eine transgene Mauslinie generiert, die das Zielgen in Kombination mit einer vorangeschalteten, „gefloxt“ Stoppssequenz erhält. Gekreuzt wird wieder mit einer gewebespezifisch oder ubiquitär Cre-exprimierenden, transgenen Mauslinie. Ein Teil der Nachkommen wird sowohl das Zielgen mit der „gefloxt“ Stoppssequenz (flop: *floxed stop*) als auch das Cre-Gen besitzen. In den Geweben mit Cre-Expression wird die „gefloxt“ Stoppssequenz des Zielgens entfernt und somit das Zielgen exprimiert (92).

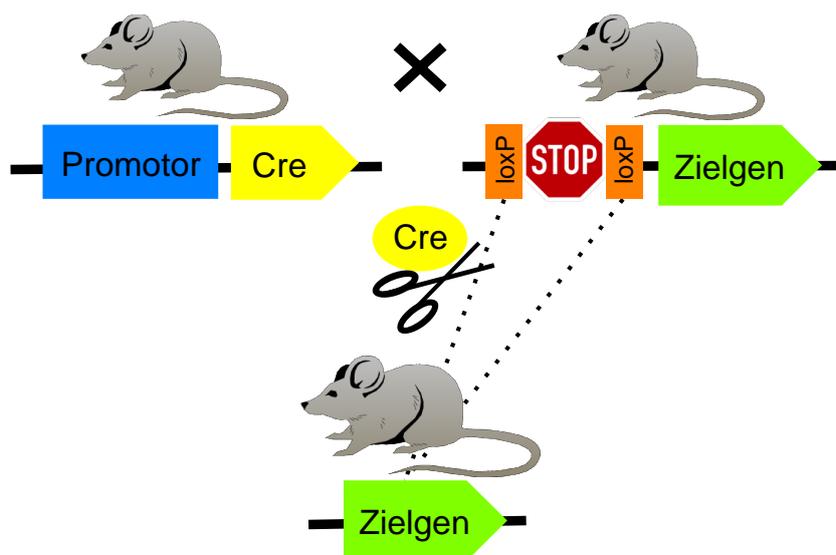


Abbildung 9: Schematische Darstellung eines Gen-Knock-ins mit Hilfe des Cre/loxP-Systems.

Eine transgene Mauslinie exprimiert Cre gewebespezifisch oder ubiquitär. Eine zweite transgene Mauslinie besitzt das „gefloxt“ Zielgen. Nach Kreuzung dieser beiden Mauslinien wird ein Teil der Nachkommen sowohl Cre als auch das „gefloxt“ Zielgen besitzen. Die loxP-Kassetten werden in Geweben mit Cre-Expression entfernt und das Zielgen exprimiert. Modifiziert nach Spyroglou (92).

1.3.2 ROSA26 Genlocus

Der ROSA26 Genlocus steht unter dem Einfluss eines konstitutiven Promotors. Der ROSA26-Promotor unterliegt demnach selbst keinen regulatorischen Einflüssen, sondern bewirkt eine regulationsunabhängige, ubiquitäre Transkription des ROSA26 Genlocus. Soriano (93) generierte eine ROSA26-Reportermaus indem er in diesen Genlocus eine „geflochte“ Stoppssequenz gefolgt von einem LacZ-Gen integrierte. LacZ dient hierbei als sogenanntes Reporter-gen, da in den Geweben die Cre exprimieren die „geflochte“ Stoppssequenz entfernt und LacZ transkribiert wird. Durch eine X Gal-Färbung kann in diesen Geweben Blaufärbung und somit die Aktivität von Cre nachgewiesen werden (93). Seit einigen Jahren ist ROSA26 ein etablierter Genlocus zur Integration und ubiquitären Expression von Transgenen und Reporter-Systemen unter dem Einfluss des endogenen ROSA26 Promotors (94). Mittlerweile wurden auch Transgene generiert, die ROSA26 unter den Einfluss exogener Promotoren stellen (95). Werden in den ROSA26 Genlocus ein Zielgen, ein Reporter-gen, zum Beispiel LacZ, und eine „geflochte“ Stoppssequenz integriert und die Cre-Rekombinase mit einem gewebespezifischen Promotor gekoppelt, erhält man eine Expression des Zielgens und eine positive X Gal-Färbung in den Geweben mit Cre-Expression (93).

1.4 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von Urocortin 2 auf die Funktion und Morphologie der murinen Gonaden weiblicher und männlicher Versuchstiere zu untersuchen. Hierfür wurde ein transgenes Mausmodell generiert, das Urocortin 2 organspezifisch überexprimiert. Anschließend wurden die Gonaden männlicher und weiblicher transgener Mäuse hinsichtlich ihrer Funktion und Morphologie im Vergleich zu nicht überexprimierenden Kontrollmäusen untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Kits

Agarose	peQlab, Erlangen
Aqua destillata (Aqua dest.)	Apotheke Innenstadt, Klinikum der Universität München
DNA Leiter low range/1kb	Fermentas, St. Leon-Rot
DNA Leiter (80-1031 bp)	peQlab, Erlangen
dNTP Mix	Promega, Mannheim
Eosin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Estradiol ELISA kit	DRG Diagnostics, Marburg
Ethanol 100%, 96%, 70%	Apotheke Innenstadt, Klinikum der Universität München
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SsoFAST™ EVAGreen® Supermix	Bio-Rad Laboratories Berkley, Kalifornien, USA
GoTaq Polymerase	Promega, Mannheim
GoTaq 5x Puffer	Promega, Mannheim
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Histoacryl	Braun, Tuttlingen
Isofluran – Forene®	Abbott GmbH, Wiesbaden
Loading dye 6x	Fermentas, St. Leon-Rot
M-MLV Rev Transkriptase 5x Buffer	Promega, Mannheim
M-MLV RT, RNase H minus, PM	Promega, Mannheim
Natriumchlorid 6M	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt

Oligo (dT) ₁₅ Primer	Promega, Mannheim
PCI (Chloroform:Isoamylalkohol 24:1)	Apotheke Innenstadt, Klinikum der Universität München
Permout Mounting Medium	Fisher Scientific, Schwerte
Proteinase K	Fermentas, St. Leon-Rot
Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor	Promega, Mannheim
RQ1 RNase-free DNase	Promega
SV Total RNA Isolation System	Promega, Mannheim
Urocortin 2 Kit Mouse EIA	BioVendor, Modrice, Tschechien
Xylene	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.2 Pufferlösungen

1%iges Agarosegel

1 mg	Agarose
100 ml	TBE-Puffer 1x
5 µl	Ethidiumbromid

TBE-Puffer 10x

108 g	TRIS
55 g	Borsäure
7,4 g	EDTA
1000 ml	Aqua dest.
	Salzsäure bis pH 8,2

TNES-Puffer

10 mM	TRIS, pH 7,5
400 mM	Natriumchlorid
100 mM	EDTA
0,6 %	SDS

TE-Puffer

10 mM	TRIS, pH 8,0
1 mM	EDTA

2.3 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Reagiergefäße safe locks 0.5 ml, 1.5 ml, 2.0 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Futtermittel	ssniff, Soest
Glaskapillaren	Brand, Wertheim
Ohrmarken, Ohrmarkenzange	Hartenstein, Würzburg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Real-time PCR-Platten (96 Loch) und Folie	Sarstedt, Nümbrecht
Skalpelle	PFM, Köln
Trockeneis	TKD, Fraunberg-Tittenkofen

2.4 Geräte und Software

Autoklav	Systec, Wetzlar
Biofuge fresco Zentrifuge	Eraeus, Hanau
Dissektionsmikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Delfia Plateshaker	Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim
Einbettmaschine Microm EC 350-1x	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Färbegestell	Omnilab, Bremen
Feinwaage BD121S/BD2100	Sartorius, Göttingen
Gelelektrophorese-Kammer	Bio-Rad, München
Heizblock Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Kamera SPOT Insight QE	Visitron Systems, Puchheim
Microsoft Excel (Version 14.3.9)	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Mikroplattenreader SPECTRA	Tecan, Crailsheim
Mikroskop DMRB	Leica, Wetzlar
Mikrowelle	LG, Seoul, Südkorea
Mx 3000 P qRT-PCR System Maschine und Software	Stratagene/Agiland, La Jolla, Kalifornien, USA
NanoDrop ND-1000 und Software	peQlab, Erlangen
Primus 25 PCR-Maschine	peQlab, Erlangen
Pipetten 1-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Prism 6.0f Software	GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien, USA
Rotationsmikrotom HM 335 E	Microm, Walldorf
SPOT Advanced Imaging Software for Microscopy (Version 4.0.9)	SPOT Imaging Solutions-Diagnostic Instruments, Sterling Heights, Michigan, USA

T8 Ultra Turrax Homogenizer	IKA-Werke, Staufen
Tierkäfige	TDI, Alcobendas, Spanien
UV Kamera und Software	INTAS UV-System, Göttingen
Wasserbad SB 80	Microm, Walldorf
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg

2.5 Versuchstiere

Die Züchtung und Haltung der Versuchstiere erfolgte im Tierstall der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV. Alle Tierversuche wurden zuvor von der Tierversuchskommission der Regierung von Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen des Tierversuchsantrags: 531-99-09) und gemäß lokaler Bestimmungen und der Richtlinien des National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals durchgeführt.

Die Tiere wurden in einem 12-Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Ihnen standen zu jeder Zeit Futter und Leitungswasser ad libitum zur Verfügung. Die Haltung erfolgte in Standard-Mauskäfigen einer Größe von 15 cm x 27 cm x 42 cm bzw. 15 cm x 17 cm x 37 cm. Die Anzahl der Tiere betrug hierbei maximal 8 bzw. maximal 3 Tiere pro Käfig. Dabei wurden männliche Tiere alleine oder zusammen mit männlichen Tieren des gleichen Wurfes gehalten. Für die Züchtung wurde ein männliches Tier mit maximal drei Weibchen zusammengesetzt. Trächtige Weibchen wurden vor der Geburt von den anderen Tieren getrennt und einzeln gehalten. Im Alter von circa 4 Wochen wurden die Jungtiere nach Geschlechtern getrennt. Ferner wurden in Narkose Ohrmarken angelegt und Schwanzbiopsien zur Genotypisierung entnommen (siehe 2.6 Genotypisierung der Mäuse).

Die Züchtung von Mäusen mit SF1-Promotor-abhängiger Ucn2-Überexpression (Ucn2 OE) war im Rahmen der Dissertation von Dr. med. Anna Riester bereits etabliert worden (96). Für die vorliegende Arbeit konnte die Züchtung dieser Mauslinie fortgeführt werden.

Um Mäuse mit SF1-Promotor-abhängiger Ucn2-Überexpression zu erhalten wurden zwei genetisch veränderte Mausstämme gekreuzt:

SF1-Cre Mausstamm

Die Zucht von SF1-Cre Mäusen wurde bereits vor einigen Jahren etabliert. Entwickelt wurde dieser transgene Mausstamm von Bingham et al. (97). Bedingt durch den SF1- (Steroidogenic Factor 1) Promotor kommt es zu einer Expression der Cre-Rekombinase in den Gonaden, der Nebennierenrinde, der Adenohypophyse, der Milz sowie im Nucleus ventromedialis des Hypothalamus.

Das Cre/loxP-System wurde ursprünglich entwickelt um Gen-Knock-outs auf bestimmte Gewebe oder Zelltypen zu limitieren. Diese Limitation wird durch die Kombination mit einem entsprechenden Promotor erreicht, der die Expression der Cre-Rekombinase steuert. Diese entfernt anschließend den „geflochten“ Genabschnitt (97). Für eine SF1-Promotor-abhängige Ucn2-Überexpression entfernt die Cre-Rekombinase eine „geflochte“ Stoppssequenz, die die Expression von Urocortin 2 verhindert.

R26^{stopUcn2/stopUcn2} Mausstamm

Diesen Mausstamm entwickelte die Arbeitsgruppe von Dr. J. Deussing am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München (98). Jedes in den R26-Locus eingebrachte Gen wird ubiquitär exprimiert (93). In diesem Fall wurden in den R26-Locus die cDNA für Ucn2 sowie ein IRES tau-LacZ-Reporter gen eingebracht. Diesen vorangeschaltet ist eine LoxP-flankierte transkriptionsterminierende Sequenz (Stoppssequenz). Diese Stoppssequenz verhindert die Expression von Ucn2 und des tau-LacZ-Reportergens, so dass es zu einem „stillen“ Knock-in kommt (98).

Es wurden nun homozygote R26^{stopUcn2/stopUcn2} Mäuse mit heterozygoten SF1-Cre^{+/-} Mäusen gekreuzt. Dabei ergaben sich die folgenden Genotypen mit gleicher Wahrscheinlichkeit:

1) R26^{+/stopUcn2}SF1-Cre^{+/-}

Diese Mäuse sind heterozygot für Ucn2 in den Geweben, die physiologisch SF1 exprimieren. Im Folgenden werden sie als Ucn2 overexpressing (**Ucn2 OE**) bezeichnet.

2) R26^{+/stopUcn2}SF1-Cre^{-/-}

Diese Mäuse besitzen keine Cre-Rekombinase und sind daher nicht Ucn2 überexprimierend. Sie entsprechen Wildtyp-Mäusen und werden im Folgenden als Kontrolltiere (**Controls**) bezeichnet.

Im Alter von circa 8 Wochen wurden die Mäuse unter Narkose getötet. Es wurden Blutproben gewonnen und die Gonaden asserviert.

Bezeichnung Genotyp	Anzahl der Mäuse	Anzahl der Gonadenpaare		Anzahl der Plasmaproben
		in PFA	in -80°C	
Controls w	29	5	8	16
Ucn2 OE w	31	9	8	14
Controls m	17	7	9	11
Ucn2 OE m	18	8	9	13

Tabelle 2: Anzahl der Tiere (Controls und Ucn2 OE) und der entnommenen Proben.

2.6 Genotypisierung der Mäuse

2.6.1 Probengewinnung zur Genotypisierung

Nach der Verpaarung der R26^{stopUcn2/stopUcn2} Mäusen mit den SF1-Cre^{+/-} Mäusen musste der Genotyp der Nachkommen bestimmt werden, um sie der Gruppe Ucn2 OE oder Controls zuzuordnen zu können. Hierfür wurde genomische DNA mittels Schwanzbiopsie gewonnen: Im Alter von circa vier Wochen wurden die Nachkommen nach Geschlechtern getrennt. Weiterhin wurden den Mäusen unter Kurznarkose mit Isofluran nummerierte Ohrmarken angelegt, um sie bei Gruppenhaltung weiterhin eindeutig identifizieren zu können. Im Rahmen dieser Narkose wurde mittels eines glühenden Skalpell eine Schwanzbiopsie von circa 3 mm gewonnen. Zur weiteren Blutstillung der Biopsiestelle wurde Histoacryl Gewebekleber verwendet.

Die gewonnenen Biopsien wurden jeweils mit 600 µl TNES und 35 µl Proteinase K (10 mg/ml) bei 55 °C für mindestens 8 Stunden inkubiert. Zu jeder Probe wurden dann 170 µl NaCl (6M) und 100 µl PCI (Chloroform:Isoamylalkohol 24:1) hinzu pipettiert und gut vermischt. Die Proben wurden für 5 min zentrifugiert. Anschließend konnten 700 µl Überstand abpipettiert und durch die Zugabe von 700 µl eiskaltem Ethanol (95 %, -20 °C) die DNA gefällt werden. Entsprechend der Probenanzahl wurden zuvor Glaskapillaren über der Flamme des Bunsenbrenners verschlossen. Mit diesen Glaskapillaren wurde nun die gefällte DNA gewonnen und kurz in 70%iges Ethanol getaucht. Die DNA wurde so für 10 min an der Luft getrocknet und anschließend in 100 µl TE für 10 min bei 65 °C gelöst. Die so gewonnenen DNA-Proben wurden bei +4 °C gelagert bis sie zur Genotypisierung eingesetzt wurden.

2.6.2 SF1-Cre Genotypisierung

Um die Genotypen SF1-Cre^{+/-} und SF1-Cre^{-/-} zu differenzieren wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) mit anschließender Gelelektrophorese durchgeführt. Die verwendeten Primer waren:

SF1 fwd	5'-GAG-TGA-ACG-AAC-CTG-GTC-GAA-ATC-AGT-GCG-3'
SF1 rev	3'-GCA-TTA-CCG-GCG-ATG-CAA-CGA-GTG-ATG-AG-5'

Für die PCR wurden für jede Probe 13 µl Aqua dest., 4 µl GoTaq 5x Puffer, 0,4 µl dNTPs (10mM), 1 µl SF1 fwd-Primer (10 µM), 1 µl SF1 rev-Primer (10 µM) sowie 0,1 µl Taq Polymerase mit der Pipette gemischt. Dann wurden jeweils 0,5 µl der Proben-DNA hinzugefügt. Die PCR wurde mit 40 Zyklen in der Primus 25 PCR-Maschine durchgeführt: 30 sec 94 °C, 30 sec 55 °C und 40 sec 72 °C. Zu jeder Probe wurden anschließend 3 µl Loading dye 6x (Fermentas) hinzugefügt und zusammen mit einer DNA-Leiter, einer Positivkontrolle (SF1-Cre^{+/-})

und einer Negativkontrolle, bestehend aus Aqua dest. (H₂O), auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Die PCR-Produkte wurden für 20 min bei 100 Volt aufgetrennt.

Das beschriebene Vorgehen ermöglicht eine Unterscheidung der SF1-Cre^{-/-} Mäuse von den SF1-Cre^{+/-} Mäusen (siehe Abb. 10). Bei letzteren zeigt die Gelelektrophorese ein PCR-Produkt von 407 bp. Da bei der Züchtung nur heterozygote SF1-Cre Mäuse eingesetzt wurden ergibt sich kein SF1-Cre^{+/+} Genotyp, der in der Gelelektrophorese nicht vom heterozygoten SF1-Cre^{+/-} Genotyp zu unterscheiden wäre.

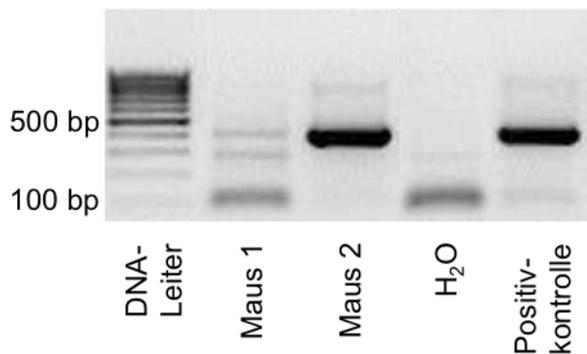


Abbildung 10: Beispiel eines Agarosegels zur SF1-Cre Genotypisierung. In diesem Beispiel ist die Maus 1 negativ für SF1. Die Bande bei Maus 2 entspricht der Positivkontrolle, die Maus 2 ist positiv für SF1.

2.6.3 R26 Genotypisierung

Auch für die Mäuse aus dem R26 wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) mit anschließender Gelelektrophorese zur Genotypisierung durchgeführt. Die verwendeten Primer waren

ROSA-1	5'-AAA-GTC-GCT-CTG-AGT-TGT-TAT-3'
ROSA-5	5'-TAG-AGC-TGG-TTC-GTG-GTG-TG-3'
ROSA-6	5'-GCT-GCA-TAA-AAC-CCC-AGA-TG-3'
ROSA-7	5'-GGG-GAA-CTT-CCT-GAC-TAG-GG-3'

Für die PCR wurden für jede Probe 11,35 µl Aqua dest., 4 µl GoTaq Puffer, 0,4 µl dNTPs (10mM), 1,5 µl ROSA-1, 0,5 µl ROSA-5, 0,5 µl ROSA-6, 0,5 µl ROSA-7 sowie 0,25 µl GoTaq Polymerase mit der Pipette gemischt. Dann wurden jeweils 1 µl der Proben-DNA hinzugefügt. Die PCR wurde in der Primus 25 PCR-Maschine durchgeführt und startete mit 2 min bei 95 °C. Anschließend folgten 35 Zyklen mit 30 sec 95 °C, 30 sec 55 °C und 90 sec 72 °C. Schließlich 5 min bei 72 °C. Die PCR-Produkte wurden anschließend zusammen mit einer DNA-Leiter

und einer Negativkontrolle, die aus Aqua dest. (H₂O) bestand, auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und circa 30 min bei 100 Volt aufgetrennt.

Die Primer ROSA-1 und ROSA-6 bilden zusammen ein 398 bp langes PCR-Produkt. Es entspricht dem Wildtyp-Allel und findet sich bei den Genotypen R26^{+/+} und R26^{+/stopUcn2}. ROSA-1 und ROSA-7 bilden ein PCR-Produkt mit 646 bp bei den Genotypen R26^{stopUcn2/stopUcn2} und R26^{+/stopUcn2}. Diese Mäuse sind homo- oder heterozygot für die Stopp-Ucn2-Sequenz. Bei der PCR mit den Primern ROSA-1 und ROSA-5 ergibt sich für Zellen mit physiologischer SF1-Promotoraktivität, wie beispielsweise den Gonaden, bei denen die „geflochte“ Stoppsequenz durch die Cre-Rekombinase entfernt wurde, eine PCR-Produktlänge von 505 bp. Ein solches Produkt sollte bei der Untersuchung von Schwanzgewebe, das keinen aktiven SF1-Promotor besitzt, nicht vorkommen. Hier würde das Ergebnis für eine ubiquitäre Expression der Cre-Rekombinase sprechen (96,98) (siehe Abb. 11 und 12).

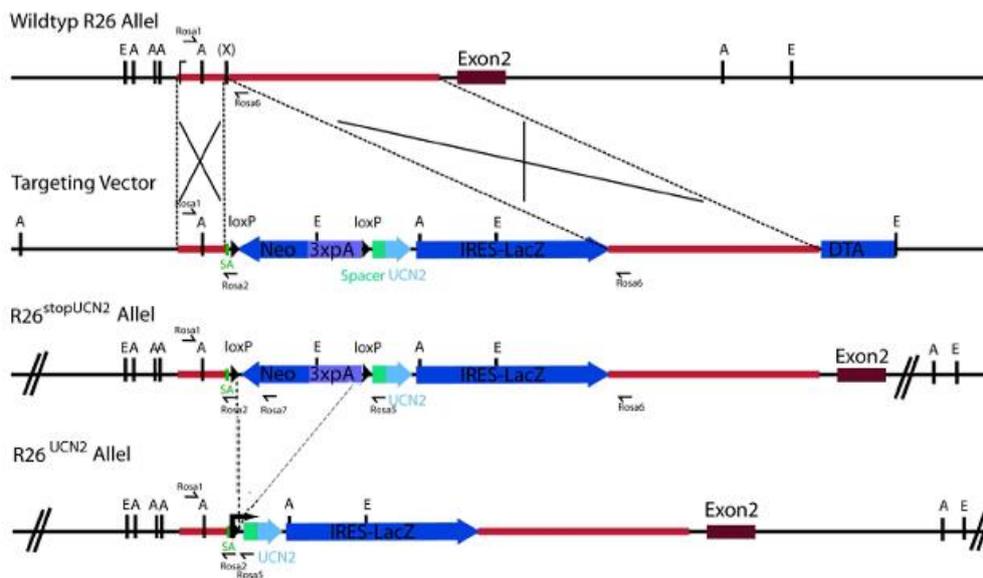


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Targetingstrategie zur Generierung eines Ucn2-überexprimierenden Allels.

Das „Wildtyp R26 Allel“ entspricht dem Genlocus vor dem Gene-Targeting. In dieses Allel wird der „Targeting Vector“ integriert, der das Ucn2-Gen und eine Stoppsequenz enthält und es entsteht das „R26^{stopUcn2} Allel“. Das „R26^{Ucn2} Allel“ entsteht nach Deletion der Stoppsequenz durch eine Cre-Rekombinase. (E: EcoRV, A: Apal, X: Xbal, Schnittstellen für die entsprechenden Restriktionsenzyme). Modifiziert nach Rhode (98).

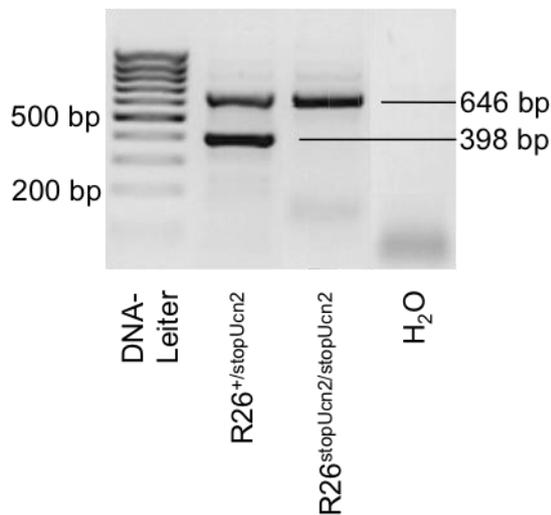


Abbildung 12: Beispiel eines Agarosegels zur R26 Genotypisierung.

Bei der heterozygoten Maus ($R26^{+}/stopUcn2$) ergeben die Primer ROSA-1 und ROSA-6 ein Produkt mit einer Länge von 398 bp und die Primer ROSA-1 und ROSA-7 ein Produkt mit einer Länge von 646 bp. Bei der homozygoten Maus ($R26^{stopUcn2}/stopUcn2$) lässt sich nur eine Bande mit einem Produkt der Länge 646 bp abgrenzen, das die Primer ROSA-1 und ROSA-7 miteinander bilden.

2.7 In situ-Hybridisierung für Cre und Ucn2

Zusätzlich zur Genotypisierung wurden in situ-Hybridisierungen gefrorener Testes mit Cre und Ucn2 „antisense“ Sonden angefertigt. Diese in situ-Hybridisierung sollte sowohl der Bestätigung des Genotyps ($Cre^{+/-}$) als auch zur semiquantitativen Visualisierung des Ucn2-Gens dienen. Die in situ-Hybridisierung konnte in Zusammenarbeit mit der Forschungsgruppe von Dr. J. Deussing des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie in München durchgeführt werden. Hierfür wurden Cryoschnitte gefrorener Testes Ucn2-OE Männchen und männlicher Kontrolltiere angefertigt. Anschließend erfolgte die Bearbeitung gemäß eines etablierten Protokolls. Dieses Protokoll sei hier kurz zusammengefasst (für eine detaillierte Beschreibung vgl. (98)): Die Cryoschnitte der Hoden wurden zunächst in Paraformaldehyd fixiert. Anschließend folgten eine Acetylierung mit Essigsäureanhydrid sowie eine Dehydrierung mit einer ansteigenden Ethanolreihe. Die Objektträger wurden getrocknet und mit einem Hybridisierungsmix bedeckt, der unter anderem die ^{35}S -markierten Sonden enthielt. Anschließend wurden Deckgläschen aufgelegt und die Objektträger über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Deckgläschen wieder entfernt und die Schnitte gewaschen. Dann erfolgte die Dehydrierung mit einer ansteigenden Ethanolreihe. Die getrockneten Schnitte wurden für bis zu drei Tage auf einem hochauflösenden Autoradiographie-Film zur Entwicklung gelagert und der Film anschließend eingescannt.

2.8 Organ- und Blutentnahme

Vor der Entnahme wurden entsprechend der Anzahl der Tiere Reaktionsgefäße für die Testes/Ovarien und die Blutproben beschriftet. In letztere wurden jeweils 10 µl EDTA vorgelegt, um später Plasma gewinnen zu können. Für die Entnahme von Gonaden und Blut wurden die Mäuse einzeln mit Isofluran euthanasiert und anschließend dekapitiert. An der Schnittfläche wurde mit dem vorbereiteten Gefäß das Blut aufgefangen und durch vorsichtiges Rütteln mit dem EDTA vermischt. Die Blutproben wurden im Anschluss bei 10.000 Umdrehungen für 10 min zentrifugiert. Das Plasma wurde in frische, beschriftete Reaktionsgefäße abpipettiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Nach der Desinfektion der Entnahmestelle wurde der Bauchraum eröffnet und die Gonaden einzeln entnommen und unter dem Mikroskop von Fett und Bindegewebe befreit. Ein Teil der Gonaden wurden dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert, der andere Teil wurde in eine 4%ige PFA-Lösung gegeben und anschließend in Paraffin eingebettet (96).

2.9 Histologische Aufarbeitung

2.9.1 Einbettung in Paraffin

Die Gonaden, die nach der Entnahme in 4%ige PFA-Lösung gegeben worden waren, wurden über Nacht bei 4 °C in dieser Lösung belassen. Am folgenden Tag wurden die Gonaden zunächst einer aufsteigenden Ethanolreihe aus 30%igem, 50%igem, 70%igem, 96%igem und 100%igem Ethanol unterzogen. Es schlossen sich eine Xylol-Lösung sowie eine Mischung aus Xylol und flüssigem Paraffin im Verhältnis 1:1 an. Anschließend erfolgte über Nacht die einzelne Einbettung der Gonaden in flüssigem Paraffin bei 60 °C. Die Paraffinblöcke wurden bis zur weiteren, histologischen Aufarbeitung bei Raumtemperatur eingelagert (96).

2.9.2 Paraffinschnitte

Die Paraffinblöcke mit den einzeln eingebetteten Testes bzw. Ovarien wurden vor dem Schneiden zunächst auf der Kühlplatte des Einbettautomaten Microm EC 350-1 (Thermo Scientific) durchgekühlt. Anschließend wurden mit dem Rotationsmikrotom (Microm, Walldorf) Schnitte von 5 µm angefertigt. Diese wurden in ein Wasserbad (Aqua dest., 40 °C) gegeben, um sich auszudehnen und zu glätten. Die Schnitte wurden auf Objektträger gezogen und bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet.

2.9.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) wurden die getrockneten Schnitte zunächst durch Xylol (2 x 90 sec) und eine absteigende Alkoholreihe (2 x 90 sec 100 % Ethanol, 2 x 90 sec 95 % Ethanol) sowie Waschen mit Aqua dest. für 3 min entparaffinisiert. Es folgten zunächst die Färbung mit Hämatoxylin für 5 sec und Spülen mit Aqua dest. Dann die Färbung mit Eosin (angesäuert mit 1 ml konzentrierter Essigsäure auf 100 ml Eosin) für 5 sec. Es schloss sich eine aufsteigende Alkoholreihe (2 x 30 sec 95 % Ethanol, 2 x 30 sec 100 % Ethanol) und Xylol (2 x 30 sec) zur Dehydrierung der Schnitte an. Die Schnitte wurden abschließend mit Permout Mounting Medium und Deckgläschen bedeckt.

2.9.4 Mikroskopie

Die HE-gefärbten Schnitte der Testes und Ovarien wurden unter dem Mikroskop DMRB (Leica) mit verschiedenen Auflösungen (2,5-fach, 5-fach, 10-fach, 20-fach und 40-fach) betrachtet. Dabei wurden die betrachteten Ausschnitte sowie Übersichtsaufnahmen mit der Kamera Spot Insight QE (Visitron Systems) fotografiert und archiviert.

2.9.5 Quantifizierung der Follikelanzahl

Für die Quantifizierung der Follikel wurden jeweils drei eingebettete Ovarien der Ucn2 OE- und der Kontrollgruppe ausgewählt. Von diesen Ovarien wurden Paraffinschnitte und HE-Färbungen angefertigt. Auf diese Art präparierte, sequentielle Schnitte dieser Ovarien wurden unter dem Mikroskop betrachtet und fotografiert. Hierbei wurden zunächst Übersichtsaufnahmen in 2,5-facher und 5-facher Vergrößerung archiviert. Die Übersichtsaufnahmen mit 5-facher Vergrößerung wurden als high power field (hpf) für die Zählung der Follikel in den Ovarien definiert. Des Weiteren wurden Detailaufnahmen mit bis zu 40-facher Vergrößerung der Follikel angefertigt, die zur genauen Klassifikation der Follikel herangezogen wurden. Die Betrachtung und Dokumentation wurde mit der Software SPOT Advanced durchgeführt. Die Klassifikation erfolgte gemäß der oben beschriebenen, vereinfachten Einteilung der Follikulogenese nach T. Pedersen und H. Peters (26) (siehe Abb. 13) in Primär-, Sekundär- und Tertiärfollikel sowie in Corpora lutea und atretischen Follikel. Sehr große Tertiärfollikel mit einem prominenten Antrum, auch Graaf-Follikel genannt, wurden hierbei als Tertiärfollikel gezählt. Mehrfach angeschnittene Follikel wurden anhand charakteristischer Schnitte klassifiziert.

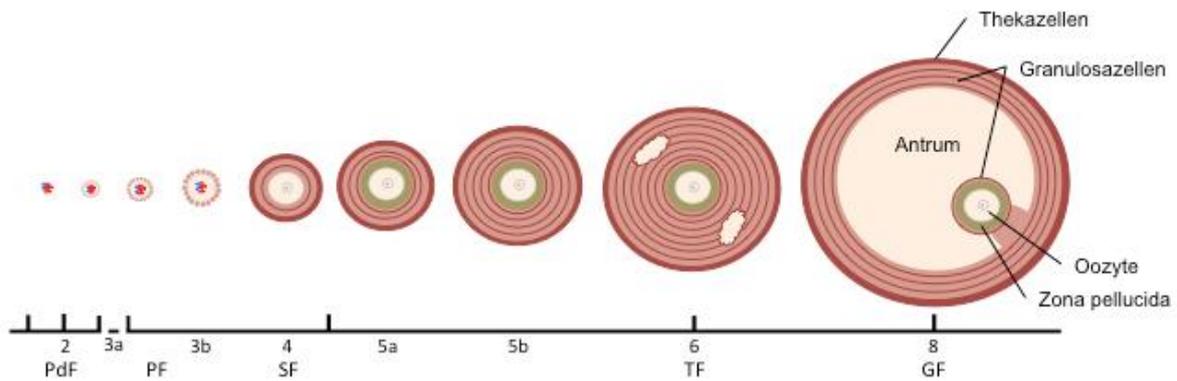


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Follikulogenese.

PdF: Primordialfollikel, PF: Primärfollikel, SF: Sekundärfollikel, TF: Tertiärfollikel, GF: Graaf-Follikel. Modifiziert nach Pedersen und Peters (26).

2.10 Quantitative Expressionsanalysen

2.10.1 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion aus den Testes und Ovarien wurde mit dem SV Total RNA Isolation System von Promega durchgeführt. Verwendet wurden hierfür die bei der Organentnahme in flüssigem Stickstoff paarweise schockgefrorenen und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Gonaden. Die Organe wurden zunächst im gefrorenen Zustand homogenisiert (T8 Ultra Turrax Homogenizer, IKA-Werke). Hierzu wurde bei den Testes ein etwa 3 mm langes Stück von einem der beiden Hoden mit einem Skalpell abgetrennt. Die Ovarien wurden jeweils paarweise homogenisiert um genug Material für die RNA-Extraktion zu erhalten. Zwischen den einzelnen Proben wurde der Homogenisator mit Aqua dest. sowie mit einer Mischung aus Aqua dest. und SDS gereinigt, um eine Kontamination zu vermeiden. RNA-Extraktion wurde dann mit den Materialien des oben genannten Kits und gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Im letzten Schritt des Protokolls wird die RNA in nukleasefreiem Wasser gelöst. Die RNA der Testes wurde, wie vom Protokoll empfohlen, mit $100\text{ }\mu\text{l}$ nukleasefreiem Wasser vermischt. Für die Ovarien wurden aufgrund der geringeren RNA-Konzentration $40\text{ }\mu\text{l}$ verwendet. Im Anschluss an die RNA-Extraktion wurde die RNA-Konzentration mithilfe des Nanodrop ND-1000 von peQlab gemessen. Um die Integrität der RNA zu verifizieren und eventuelle Verunreinigungen zu detektieren, wurde eine Gelelektrophorese mit der extrahierten RNA durchgeführt. Für jede zu testende RNA-Probe wurden $8\text{ }\mu\text{l}$ Aqua dest. mit $3\text{ }\mu\text{l}$ Loading dye und $2\text{ }\mu\text{l}$ RNA vermischt. Jeweils $10\text{ }\mu\text{l}$ dieses Mixes wurden in die Taschen eines vorbereiteten 1%igen Agarosegels pipettiert und zusammen mit $5\text{ }\mu\text{l}$ einer 1 kb DNA-Leiter für circa 35 min bei 110 Volt aufgetrennt.

2.10.2 cDNA Synthese

Zur Synthese von komplementärer DNA (cDNA) aus der gewonnenen Einzelstrang-RNA der Gonaden wurden jeweils 500 ng der Proben-RNA mit einer Reversen Transkriptase umgeschrieben. Hierzu wurde anhand der gemessenen RNA-Konzentration errechnet wie viele μl der verdünnten RNA 500 ng RNA enthalten. Mit Aqua dest. wurde jede Probe anschließend auf 12 μl Gesamtvolumen aufgefüllt. Zu jeder RNA-Probe wurde nun 1 μl Oligo (dt)₁₅ zugegeben und für 5 min bei 70 °C inkubiert. Die Proben wurden danach für 10 min auf Eis gelegt. Im nächsten Schritt wurden zu jeder Probe 1 μl Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega), 5 μl M-MLV RT 5x Buffer (Promega), 1,25 μl dNTPs (Promega), 3,75 μl Aqua dest sowie 1 μl M-MLV Reverse Transkriptase hinzugefügt und mit der Pipette gemischt. Die cDNA Synthese fand dann unter folgenden Bedingungen statt: 10 min bei 40 °C, 50 min bei 48 °C und schließlich 15 min bei 70 °C.

2.10.3 Standardkurven erstellen

Zur Erstellung von Standardkurven für die Real-time PCR-Untersuchung der Enzymexpression in den Gonaden wurde cDNA gepoolt und verdünnt. Anschließend wurden für die zu untersuchenden Enzyme PCR-Untersuchungen mit diesen Verdünnungsreihen durchgeführt. Es wurde jeweils eine Verdünnungsreihe für die Testes und eine für die Ovarien angefertigt. Für eine Verdünnungsreihe wurden 2 μl cDNA jeder Mausprobe aus beiden Gruppen, Ucn2 OE und Controls, in ein Reaktionsgefäß pipettiert und mit der Pipette gemischt. Anschließend wurden mit Aqua dest. folgende Verdünnungen erstellt: 1:5, 1:10, 1:50, 1:100 und 1:500. Für die Testes wurde außerdem noch 1:1000 verdünnt. Für die Standardkurve eines Enzyms wurde eine PCR-Untersuchung mit den oben genannten cDNA-Verdünnungen angefertigt. Hierfür wurden zu jeweils 2 μl verdünnter cDNA, 6 μl SsoFAST™ EVAGreen® Supermix (Bio-Rad Laboratories), 0,5 μl Primer fwd, 0,5 μl Primer rev und 3 μl Aqua dest. hinzugefügt und gemischt. Die PCR-Untersuchungen wurden in der Mx3000P QPCR, entsprechend den Angaben in der Tabelle Nr. 3, durchgeführt.

2.10.4 Real-Time PCR

Mit der Real-Time PCR wurde die Expression der folgenden Gene quantifiziert:

Gen		Primersequenz	Annealing-Temperatur
β-actin	fwd	ACCCGCGAGCACAGCTTCTT	60 °C
	rev	TCTGGGCCTCGTCACCCACATA	
StAR	fwd	GACCTTGAAAGGCTCAGGAAGAAC	63 °C
	rev	TAGCTGAAGATGGACAGACTTGC	
Hsd3b	fwd	AAGGAGGAATTCTCCAAGCTG	60 °C
	rev	GAGCTGCAGAAGATGAAGGC	
Cyp11a1	fwd	AGGACTTTCCCTGCGCT	53 °C
	rev	GCATCTCGGTAATGTTGG	
Hsd17b	fwd	ACTGTGCCAGCAAGTTTGCG	60 °C
	rev	AAGCGGTTTCGTGGAGAAGTAG	
Cyp17	fwd	CCAGGACCCAAGTGTGTTCT	60 °C
	rev	CCTGATACGAAGCACTTCTCG	
Cyp19	fwd	CATGGTCCCGCAAAGTGTGA	60 °C
	rev	GTAGTAGTTGCAGGCACTTC	
Ucn2	fwd	GTGGGCACTGGTGGTGTTCGT	60 °C
	rev	GGCGGCCAACATGGGCTAGT	
LH-R1	fwd	CCTCGAGCTGGCCTCGCCCGA	60 °C
	rev	TTCAGACAGATTGAGGAGGTTG	
FSH-R	fwd	TGTCATCACTGGCTGTGTCAT	60 °C
	rev	GATGTACAGCAGATTGTTAGC	

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Primer mit Angabe der Primersequenzen und Annealing-Temperaturen.

Die PCR wurde mit Hilfe des SsoFAST™ EVAGreen® Supermix (Bio-Rad Laboratories) in der Mx3000P QPCR System Maschine (Stratagene) entsprechend den Angaben des Herstellers

durchgeführt. Hierfür wurden 2 µl cDNA der zu untersuchenden Proben in je ein eigenes Reaktionsgefäß pipettiert. Es wurden jeweils 6 µl SsoFAST™ EVAGreen® Supermix (Bio-Rad Laboratories), 0,5 µl Primer fwd, 0,5 µl Primer rev und 3 µl Aqua dest. hinzugefügt und alles vorsichtig gemischt. Zusätzlich zu den Proben liefen bei jeder PCR-Untersuchung eine Negativkontrolle mit Aqua dest. sowie ein Kalibrator mit (1:10 verdünnte cDNA aus Verdünnungsreihe). Die PCR wurde als two-step PCR unter den folgenden Bedingungen durchgeführt: Initialisierung für 10 min bei 95 °C, anschließend 40 Zyklen mit 10 sec bei 95 °C und 30 sec bei der entsprechenden Annealing-Temperatur (siehe Tab. 3). Die Darstellung der PCR-Untersuchungen erfolgte mit der Mx3000P QPCR System Maschine SOFTWARE (Stratagene).

2.11 Hormonmessungen im Plasma

2.11.1 Ucn2

Zur Bestimmung der Hormonkonzentration von Ucn2 im Plasma wurde ein kommerzielles Kit verwendet. Dieses Kit von BioVendor basiert auf einem kompetitiven Immunassay. Hierbei sind die Mikrotiterplatten mit Anti-Ucn2-Antikörpern beschichtet. Um die Bindung an diese Antikörper konkurrieren dann die Ucn2-Moleküle der Proben bzw. der Standardproben mit dem zugefügten, biotinylierten Ucn2. Mit einem Waschgang wurden alle ungebundenen Moleküle entfernt. Für die Farbreaktion wurden Peroxidase-markiertes Streptavidin und OPD (alpha-Phenylendiamindihydrochlorid) hinzugegeben. Jeder Antikörper, der biotinyliertes Ucn2 anstelle des Proben-Ucn2 gebunden hatte, trug nun zur Farbreaktion bei. Somit ergab sich mit Hilfe der Standardkurven und der so ermittelten Farbintensität indirekt die Konzentration für Ucn2 im Plasma (96). Hierfür wurden die Plasmaproben zunächst im Verhältnis 1:5 verdünnt. Der Versuch wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Diese Ergebnisse wurden auch in der Promotionsarbeit von Dr. med. Anna Riester, in der der adrenale Phänotyp Ucn2-überexprimierender Mäuse beschrieben wurde, berichtet (96).

2.11.2 Steroidhormone

Aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Plasmamengen war die Bestimmung der verschiedenen Sexualhormone mit Hilfe herkömmlicher Kits für Hormonmessungen nicht möglich. Die Messungen der Steroidhormone Progesteron und Hydroxypregnenolon wurden daher unter Leitung von Dr. Alexandra Kulle im Endokrinologischen Labor der Klinik für Allgemeine Pädiatrie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein durchgeführt. Die Messungen erfolgten mittels der etablierten Methode der Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (99-101). Mit diesem Verfahren können verschiedene Steroide simultan in einem geringen Probenvolumen gemessen werden. Es handelt sich hierbei, im Gegensatz zu den Immunas-

says, um ein Verfahren, bei welchem die zu analysierenden Stoffe direkt detektiert und gemessen werden. Somit wird bei diesem Messverfahren eine hohe Sensitivität und Spezifität erreicht (99).

2.11.3 Östradiol

Die Messung von Östradiol in den Plasmaproben erfolgte mit dem kommerziellen Estradiol ELISA Kit [EIA 2693](DRG Diagnostics, Marburg) entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Es handelt sich bei diesem Kit um einen Festphasen-ELISA. An die Mikrotiterplatten sind polyklonale Kaninchen-Antikörper gebunden, die eine Antigenbindungsstelle für Östradiol besitzen. Die Östradiolmoleküle in der Probe konkurrieren hierbei mit einem Östradiol-Meerrettichperoxidase-Konjugat. Nach der Inkubationszeit werden die ungebundenen Stoffe abgespült. Die Menge an gebundenem Östradiol-Meerrettichperoxidase-Konjugat ist hierbei umgekehrt proportional zur Östradiolkonzentration in der Probe. Durch Zugabe der Substratlösung entsteht durch die Meerrettichperoxidase eine Farbreaktion. Diese Farbreaktion wird ausgelesen und mithilfe der Standardlösungen quantifiziert. Die Intensität der Farbreaktion ist hierbei umgekehrt proportional zur Östradiolkonzentration der Plasmaprobe. Laut den Angaben des Herstellers gibt es eine Kreuzreaktivität mit Östron (0,2 %) und Östriol (0,05 %). Der Hersteller gibt keine Kreuzreaktivität mit anderen Steroidhormonen an.

2.12 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Messungen wurden mit der Software Prism (Version 6.0f) in Säulendiagrammen dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel (Version 14.3.9) sowie über das Programm Prism (Version 6.0f) mit dem Mann-Whitney Test. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert von $p < 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Überexpression von Ucn2 in Ucn2 OE Weibchen

Zunächst wurde die Konzentration von Ucn2 im Plasma der Weibchen beider Gruppen (Ucn2 OE und Controls) bestimmt. Hierbei war die Konzentration von UCN 2 im Plasma der Versuchstiere (Ucn2 OE) signifikant höher als die Konzentration bei den Kontrolltieren ($6,7 \pm 0,9$ ng/ml vs. $1,5 \pm 0,1$ ng/ml; $p < 0,01$).

Anschließend wurde die Ucn2 mRNA der Ovarien durch rtPCR quantifiziert. Hierbei zeigte sich eine hochsignifikante Überexpression von Ucn2 in den Ucn2 OE Versuchstieren ($550,8 \pm 64,7\%$ vs. $100,0 \pm 17,9\%$; $p < 0,001$).

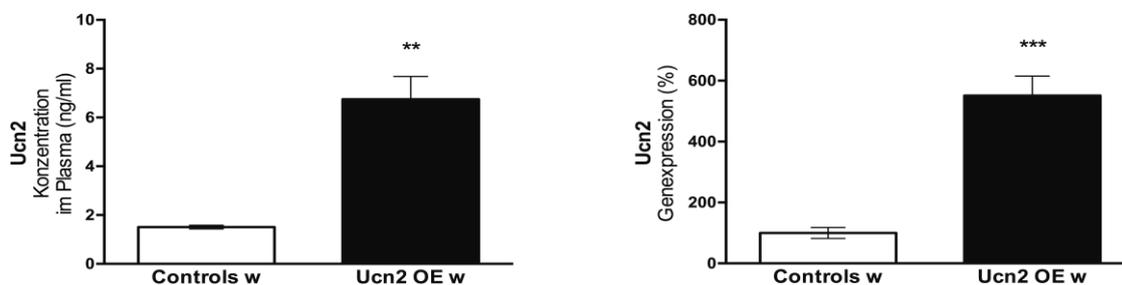


Abbildung 14: Ucn2 im Plasma und in den Ovarien.

Die weiblichen Versuchstiere (Ucn2 OE) zeigten eine signifikant höhere Plasmakonzentration sowie eine hochsignifikante Überexpression von Ucn2 im Vergleich zu den Kontrolltieren (Controls).

Im nächsten Schritt wurde das Expressionsmuster der an der ovariellen Sexualhormonsynthese beteiligten Enzyme untersucht. Hierbei sollte untersucht werden, ob sich die oben genannten, signifikanten Unterschiede in der Plasmakonzentration und in der gonadalen Überexpression von Ucn2 beider Gruppen im Expressionsmuster der ovariellen Enzyme widerspiegeln. Für die Ucn2 OE Weibchen zeigte sich hierbei in der Tat eine signifikant höhere Expression von StAR ($239,2 \pm 45,7$ % vs. $100,0 \pm 20,3$ %; $p < 0,05$) und Cyp11a1 ($160,1 \pm 15,2$ % vs. $100,0 \pm 14,8$ %; $p < 0,05$), die zusammen die ersten Schritte der gonadalen Sexualhormonsynthese bilden. Die darauf folgenden Schritte werden durch Hsd3b, das unter anderem Pregnenolon zu Progesteron und Hydroxypregnenolon zu Hydroxyprogesteron umwandelt, sowie von Hsd17b, welches Dehydroepiandrosteron und Androstendion zu Androstendiol und Testosteron umwandelt, katalysiert.

Hingegen zeigten weder Hsd3b noch Hsd17b ein wesentlich verändertes Expressionsniveau (Hsd3b: $101,0 \pm 13,0$ % vs. $100,0 \pm 19,0$ %; $p = 0,93$; Hsd17b: $127,0 \pm 20,0$ % vs. $100,0 \pm 19,0$ %; $p = 0,18$). Und es fand sich eine signifikant erniedrigte Expression von Cyp17 ($18,6 \pm 10,4$ % vs.

100,0±20,8 %; $p < 0,01$), welches die Gestagene Pregnenolon und Progesteron zu den Androgenen Dehydroepiandrosteron und Androstendion umwandelt. Ebenfalls signifikant erniedrigt zeigte sich die mRNA Expression von Cyp19 (26,8±4,3 % vs. 100,0±29,8 %; $p < 0,05$), dieses Enzym aromatisiert die Androgene Androstendion und Testosteron zu den Östrogenen Östron und Östradiol.

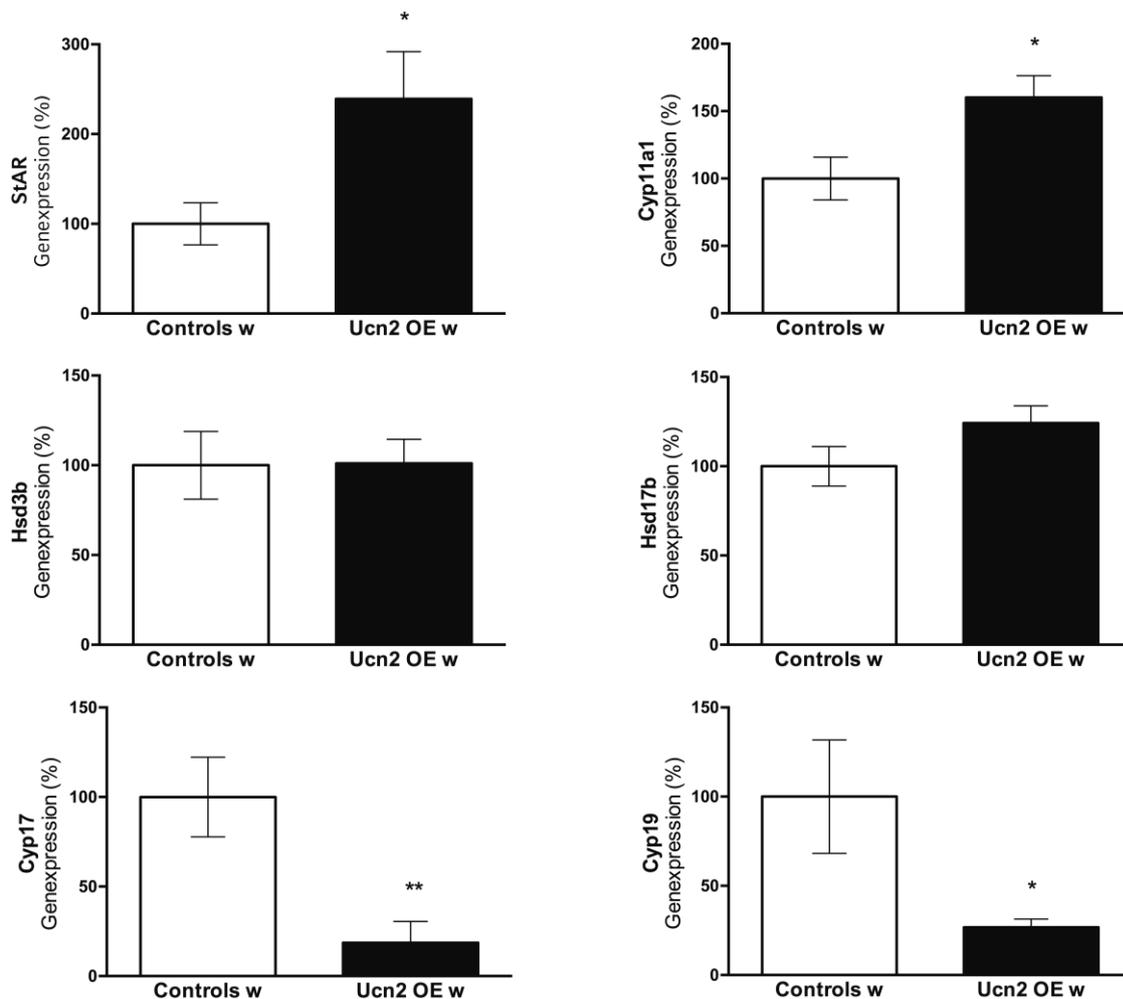


Abbildung 15: Expressionsmuster der Enzyme der ovariellen Sexualhormonsynthese. Während die Expression von StAR und Cyp11a1, welche die ersten Schritte der Sexualhormonsynthese katalysieren, sich signifikant erhöht zeigte, fand sich eine signifikant erniedrigte Expression von Cyp17 und Cyp19. Keine Änderungen fanden sich für Hsd3b und Hsd17b.

Ergänzend zur Untersuchung der mRNA Expression der Enzyme wurden Hormonkonzentrationen von Sexualhormonen im Plasma gemessen. Hierfür wurden Plasmaproben von bis zu 16 Weibchen pro Gruppe mittels Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie beziehungsweise mit einem ELISA KIT gemessen. Passend zur signifikant erniedrigten mRNA Expression von Cyp19 konnte auch eine signifikant erniedrigte Plasmakonzentration von Östradiol in Ucn2 OE Weibchen gemessen werden (81,0±2,5 pg/ml vs. 96,6±1,4 pg/ml; $p < 0,05$).

Für die Hormonkonzentrationen von Progesteron ($5,6 \pm 1,2$ nmol/l vs. $7,7 \pm 1,4$ nmol/l; $p=0,18$) und Hydroxypregnenolon ($1,0 \pm 0,1$ nmol/l vs. $1,4 \pm 0,3$ nmol/l; $p=0,50$) fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Ucn2 OE Weibchen und den weiblichen Kontrolltieren.

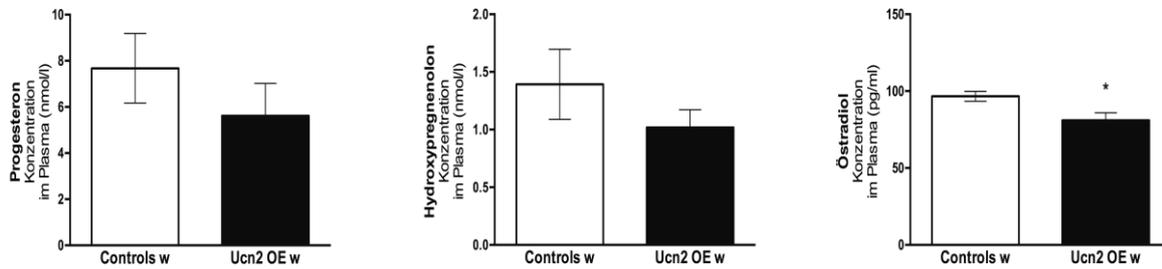


Abbildung 16: Plasmakonzentrationen der Sexualhormone Progesteron, Hydroxypregnenolon und Östradiol.

In Ucn2 OE Weibchen zeigte sich eine signifikant erniedrigte Plasmakonzentration für Östradiol im Vergleich zu den Kontrolltieren. Keine signifikanten Unterschiede fanden sich für die Konzentrationen von Progesteron und Hydroxypregnenolon im Plasma.

Da FSH und LH die Regulatoren der ovariellen Sexualhormonsynthese darstellen, wurde die mRNA Expression des FSH-Rezeptors (FSH-R) und des LH-Rezeptors Typ 1 (LH-R1) untersucht. Hierbei zeigte sich für den FSH-Rezeptor eine signifikant verminderte Expression der mRNA bei den Ucn2 OE Weibchen gegenüber den Kontrolltieren ($41,7 \pm 13,5$ % vs. $100,0 \pm 12,8$ %; $p < 0,05$). Dagegen fand sich eine signifikant gesteigerte Expression des LH-Rezeptors Typ 1 ($276,6 \pm 34,7$ % vs. $100,0 \pm 25,4$ %; $p < 0,05$) bei den weiblichen Ucn2 OE Mäusen.

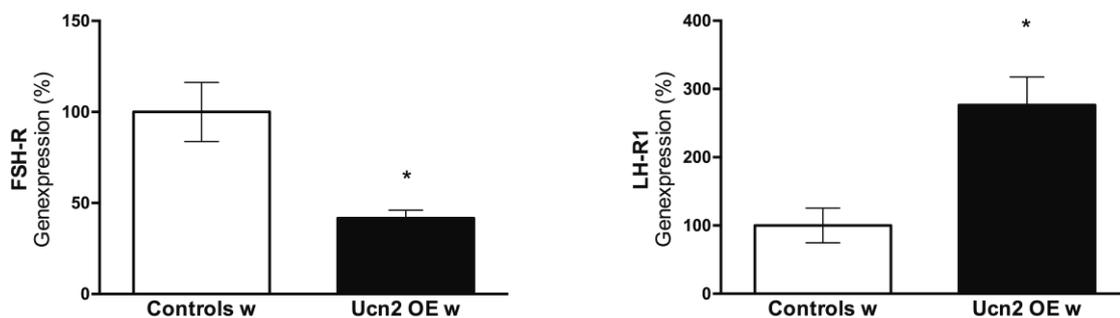


Abbildung 17: Expressionsmuster der Rezeptoren für FSH und LH.

Der Rezeptor für FSH zeigte eine signifikant verminderte Expression, wohingegen sich die Expression für den LH Rezeptor Typ 1 signifikant erhöht zeigte.

Anhand der Quantifizierung der Follikel erfolgte der Vergleich der Morphologie und der Funktionalität der Ovarien der Ucn2 OE Weibchen und der Kontrolltiere. Hierbei wurde die Anzahl der Primär-, Sekundär- und Tertiärfollikel sowie die Zahl der Corpora lutea und der

atretischen Follikel pro high power field (hpf) anhand von H.E.-gefärbten Übersichtsaufnahmen (5x Vergrößerung) verglichen. Für Primärfollikel ($3,6 \pm 0,4$ Follikel/hpf vs. $2,4 \pm 0,4$ Follikel/hpf; $p=0,07$) und Sekundärfollikel ($3,4 \pm 0,4$ Follikel/hpf vs. $4,6 \pm 0,5$ Follikel/hpf; $p=0,12$) ergab sich eine vergleichbare Follikelanzahl der beiden Gruppen. Dagegen war in der Ucn2 OE Gruppe sowohl die Anzahl der Tertiärfollikel ($10 \pm 0,7$ Follikel/hpf vs. $16 \pm 2,2$ Follikel/hpf; $p < 0,05$) als auch der Corpora lutea ($1,8 \pm 0,2$ Follikel/hpf vs. $2,7 \pm 0,3$ Follikel/hpf; $p < 0,05$) und der atretischen Follikel ($2,3 \pm 0,4$ vs. $3,9 \pm 0,5$ Follikel/hpf; $p < 0,05$) signifikant vermindert.

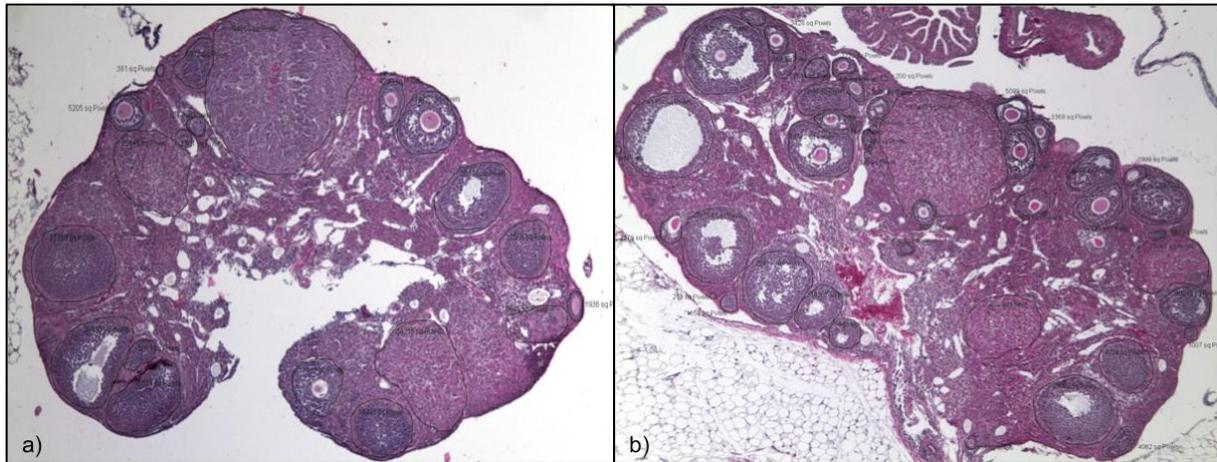


Abbildung 18: Quantifizierung der ovariellen Follikel anhand von H.E.-gefärbten Übersichtsaufnahmen (5x Vergrößerung). a) Beispiel für ein Ovar einer Maus der Kontrollgruppe (Controls). b) Beispiel für ein Ovar einer Ucn2 OE Maus.

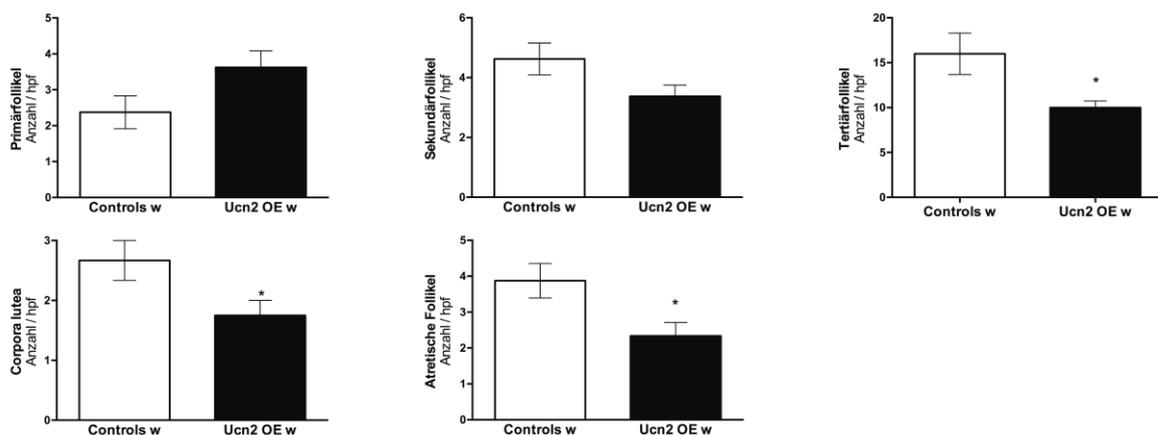


Abbildung 19: Follikelanzahl der Ovarien der Ucn2 OE Weibchen und der Kontrolltiere. Während sich vergleichbare Werte für die Anzahl der Primär- und Sekundärfollikel zeigten, war die Anzahl der Tertiärfollikel sowie der Corpora lutea und der atretischen Follikel in der Gruppe der Ucn2 OE Weibchen signifikant vermindert.

3.2 Überexpression von Ucn2 in Ucn2 OE Männchen

Auch bei den Männchen beider Versuchsgruppen wurde zunächst die Konzentration von Ucn2 im Plasma bestimmt. Hierbei zeigte sich eine signifikant erhöhte Plasmakonzentration von Ucn2 für die Ucn2 OE Mäuse gegenüber der Kontrollgruppe ($4,8 \pm 0,4$ ng/ml vs. $2,0 \pm 0,1$ ng/ml; $p < 0,01$).

Anschließend wurde die mRNA Expression von Ucn2 in den Testes für beide Gruppen untersucht. Es konnte kein Unterschied der testikulären Expression von Ucn2 zwischen den Ucn2 OE Männchen und den Männchen der Kontrollgruppe ($108 \pm 14,4$ % vs. $100,0 \pm 10,8$ %; $p = 0,98$) festgestellt werden.

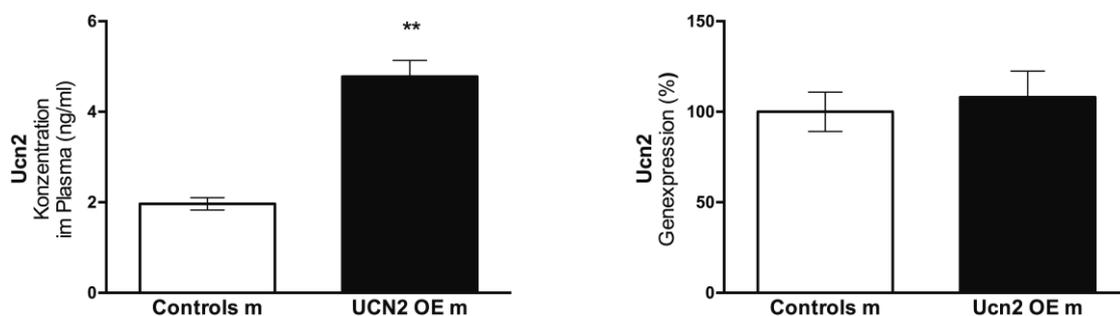


Abbildung 20: Ucn2 im Plasma und in den Testes.

Die männlichen Versuchstiere (Ucn2 OE) zeigten eine signifikant höhere Plasmakonzentration im Vergleich zu den Kontrolltieren. Es fand sich kein signifikanter Unterschied für die testikuläre Expression von Ucn2 zwischen den beiden Gruppen.

Um die Plausibilität der Ergebnisse für die testikuläre Ucn2-Expression zu testen, wurden zunächst die gonadale Ucn2-Expression zwischen den Männchen und Weibchen der Kontrollgruppen verglichen. Hier zeigte sich, dass die Expression von Ucn2 in den Testes der Kontrolltiere hochsignifikant über der Expression in den Ovarien lag (Controls m: $875,4 \pm 94,9$ vs. Controls w: $100,0 \pm 17,9$; $p < 0,0001$), siehe hierzu auch das folgende Kapitel 3.3.

Um den Erfolg der Überexpression der männlichen Versuchstiere zu kontrollieren, wurde zudem eine in Situ-Hybridisierung von testikulären Cryo-Schnitten von Ucn2-OE Männchen und Kontrolltieren angefertigt. Als Kontrollen dienten Hirnschnitte von Mäusen (zur Verfügung gestellt von der Forschungsgruppe von Dr. J. Deussing, Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München), die Cre bzw. Ucn2 entweder nicht exprimierten, heterozygot oder homozygot exprimierten.

Cre-Sonde		
Pos./Neg. Kontrollen	SF1 -	SF1 +
Pos. Kontr. Homozygot		
Pos. Kontr. Heterozygot		
Neg. Kontr.		

Abbildung 21: Autoradiographie einer in situ-Hybridisierung mit Cre „antisense“ Sonden. Diese zeigte, dass die männlichen Kontrolltiere kein und die Ucn2-OE Männchen ein starkes Signal für Cre aufwiesen.

Ucn2-Sonde		
Pos./Neg. Kontrollen	SF1 -	SF1 +
Pos. Kontr. Homozygot		
Pos. Kontr. Heterozygot		
Neg. Kontr.		

Abbildung 22: Autoradiographie einer in situ-Hybridisierung mit Ucn2 „antisense“ Sonden. Diese zeigte, dass es keinen wesentlichen Unterschied im Signal für Ucn2 zwischen den männlichen Kontrolltieren und den Ucn2-OE Männchen gab.

Die in situ-Hybridisierung mit der Cre „antisense“ Sonde konnte den Genotyp der Ucn2-über-exprimierenden Männchen bestätigen. Die in situ-Hybridisierung mit der Ucn2 „antisense“ Sonde bestätigte die Ergebnisse der testikulären Ucn2-Expression, die keinen signifikanten Unterschied zwischen den Ucn2-OE Männchen und den männlichen Kontrolltieren zeigte.

Um einen möglichen Einfluss der erhöhten Plasmakonzentration von Ucn2 in den Ucn2 OE Männchen auf die Sexualhormonsynthese zu untersuchen, erfolgte die Quantifizierung der mRNA der Enzyme StAR, Cyp11A1, Hsd3B und Cyp17 mittels rtPCR. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ucn2 OE Männchen und den Männchen der Kontrollgruppe (StAR: $111,3 \pm 19,6$ % vs. $100,0 \pm 6,6$ %; $p=0,9$; Cyp11a1: $87,0 \pm 11,6$ % vs. $100,0 \pm 7,1$ %; $p=0,47$; Hsd3b: $102,3 \pm 10,6$ % vs. $100,0 \pm 14,9$ %; $p=0,63$; Cyp17: $131,1 \pm 11,9$ % vs. $100,0 \pm 12,7$ %; $p=0,23$).

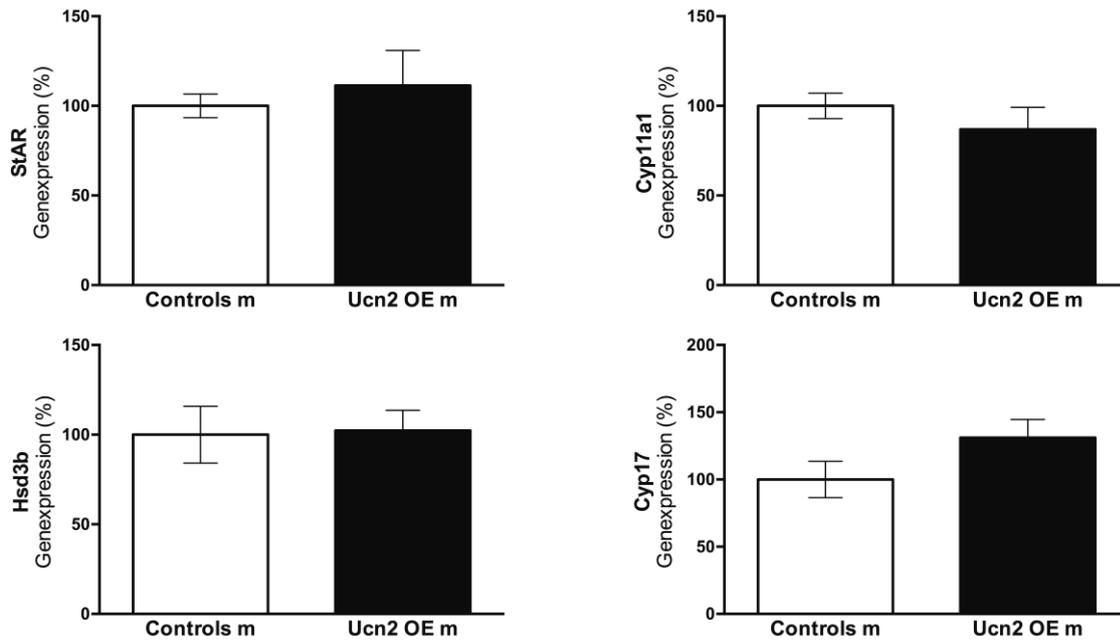


Abbildung 23: Expressionsmuster der Enzyme der testikulären Sexualhormonsynthese. Zwischen den beiden Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Expression von StAR, Cyp11a1, Hsd3b oder Cyp17.

Ferner zeigte sich kein Unterschied in der mRNA Expression des FSH-Rezeptors ($96,5 \pm 14,7$ % vs. $100,0 \pm 9,1$ %; $p=0,65$) und des LH-Rezeptors Typ 1 ($121,9 \pm 8,7$ % vs. $100,0 \pm 8,0$ %; $p=0,14$) zwischen den beiden Gruppen.

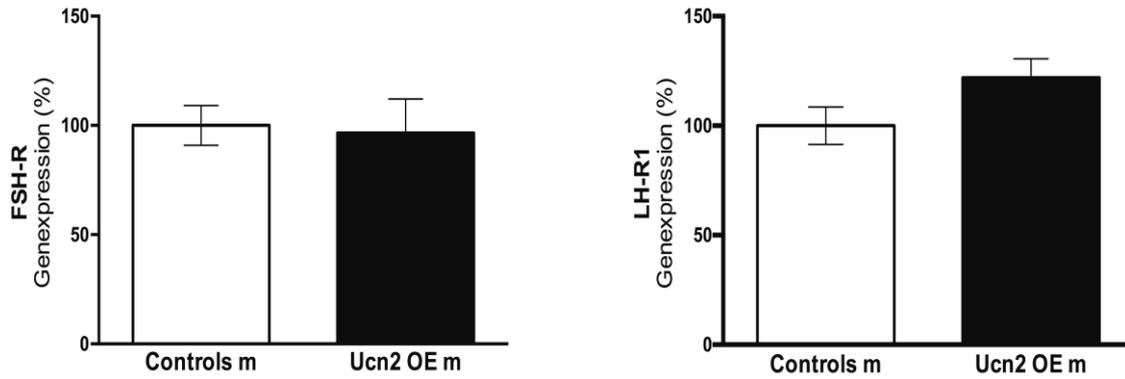


Abbildung 24: Expressionsmuster der Rezeptoren für FSH und LH. Es fanden sich keine Unterschiede in der Expression der Gonadotropinrezeptoren (FSH-R und LH-R1) zwischen den beiden Gruppen.

3.3 Vergleich zwischen Ucn2 OE Weibchen und Männchen

Sowohl die Weibchen als auch die Männchen der Ucn2 OE Gruppe zeigten signifikant erhöhte Plasmakonzentrationen für Ucn2 im Vergleich mit der jeweiligen Kontrollgruppe (w: $6,7 \pm 0,9$ ng/ml vs. $1,5 \pm 0,1$ ng/ml; $p < 0,01$; m: $4,8 \pm 0,4$ ng/ml vs. $2,0 \pm 0,1$ ng/ml; $p < 0,01$).

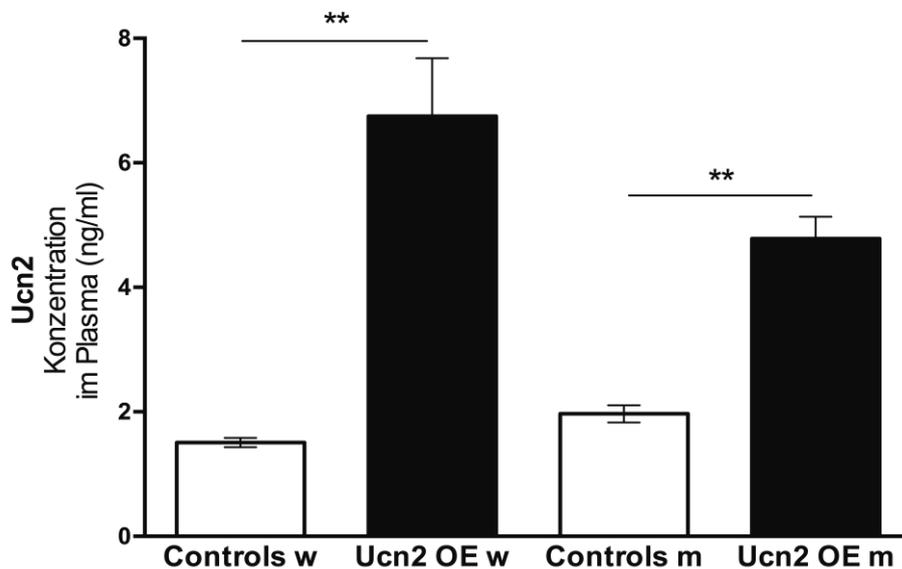


Abbildung 25: Plasmakonzentration von Ucn2 beider Geschlechter im Vergleich. Weibchen und Männchen der Ucn2 OE Gruppen zeigten signifikant erhöhte Plasmakonzentrationen von Ucn2 im Vergleich zu den Kontrollgruppen.

Im Gegensatz zu den Ucn2 OE Weibchen zeigten die Männchen der Ucn2 OE Gruppe keinen Unterschied in der gonadalen Ucn2 Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Wurde die gonadale Ucn2 Expressionen der beiden Kontrollgruppen ins direkte Verhältnis zueinander gesetzt, zeigte sich, dass die Ucn2 Expression in den Testes hochsignifikant über der Expression in den Ovarien lag (Controls m: $875,4 \pm 94,9$ vs. Controls w: $100,0 \pm 17,9$; $p < 0,0001$).

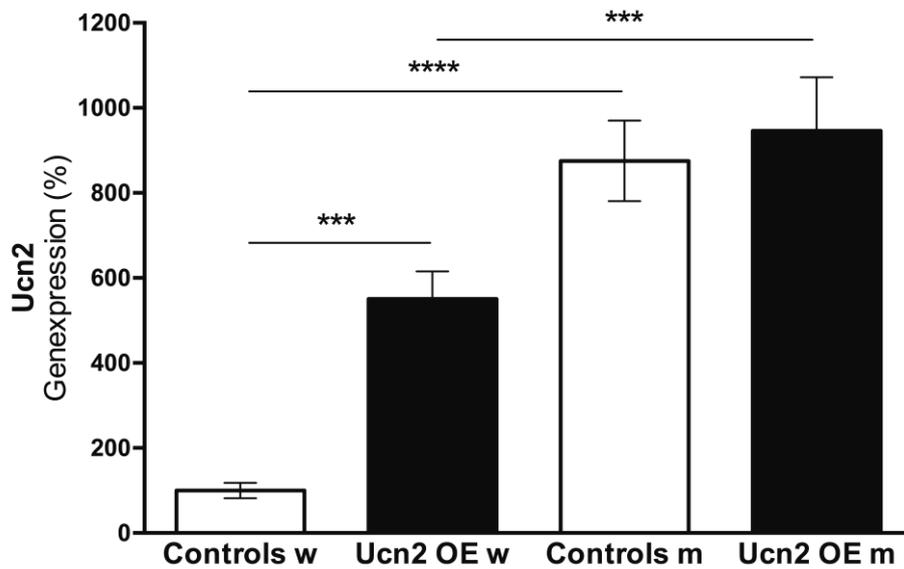


Abbildung 26: Gonadale Ucn2 Expression im direkten Vergleich.

Im direkten Vergleich der gonadalen Ucn2 Expression der Kontrollgruppen zeigte sich eine hochsignifikant gesteigerte Ucn2 mRNA Expression in der männlichen gegenüber der weiblichen Kontrollgruppe.

Bei der Verpaarung Ucn2 OE Weibchen bzw. weiblicher Kontrolltiere mit männlichen Kontrolltieren war die jeweilige Wurfgröße vergleichbar mit 9 vs. 7 Nachkommen. Somit zeigte sich, dass die Ucn2 OE Weibchen trotz der oben beschriebenen Veränderungen fertil waren.

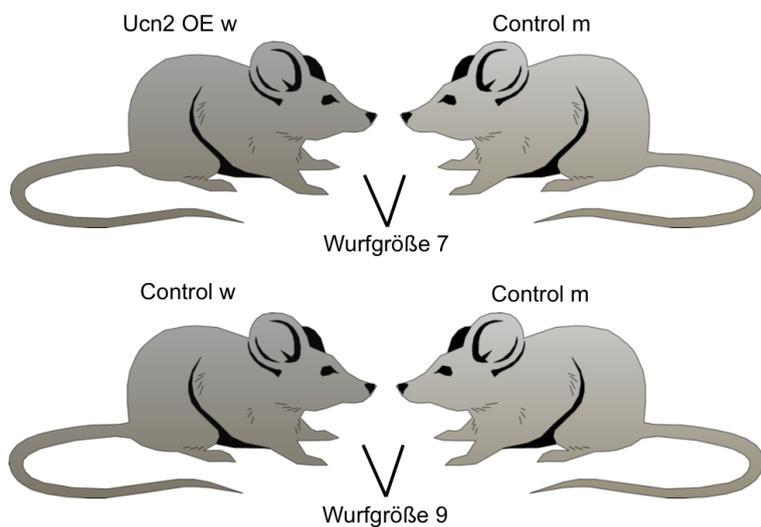


Abbildung 27: Verpaarung Ucn2 OE Weibchen bzw. weiblicher Kontrolltiere mit männlichen Kontrolltieren.

Die Ucn2 OE Weibchen waren fertil. Die Wurfgrößen der Ucn2 OE Weibchen und der weiblichen Kontrolltiere waren vergleichbar.

4 Diskussion

4.1 Bedeutung von Urocortin 2 für die Gonaden

Seit der Erstbeschreibung konnten Urocortin 2 und der zugehörige Rezeptor unter anderem in Strukturen des Hypothalamus, der Hypophyse sowie in den weiblichen und männlichen Gonaden nachgewiesen werden. Als CRF-verwandtes Peptid und natürlicher Ligand für den CRF-Rezeptor Typ 2 scheint Urocortin 2 ein wichtiger Bestandteil der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse zu sein. Die lokale Expression und Funktion von Urocortin 2 in den Gonaden sowie die systemische Auswirkung als Bestandteil der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse ist Gegenstand aktueller Forschung. So konnte gezeigt werden, dass eine lokale, Stress-induzierte Urocortin 2 Sekretion in der Hypophyse die LH-Freisetzung supprimiert (102).

Des Weiteren konnte Urocortin 2 auch in den Nebennieren nachgewiesen werden und scheint eine Rolle in der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse zu spielen. Somit könnte Urocortin 2 eine wichtige Funktion als Bindeglied zwischen der HHG- und der HHN-Achse haben und eine Rolle bei Stress-induzierter, hypothalamischer Amenorrhoe spielen.

Die Wirkungsweise einer gewebespezifischen Überexpression von Urocortin 2 auf die Funktion und Morphologie weiblicher und männlicher Gonaden genau zu untersuchen war das Ziel der vorliegenden *in vivo* Studie. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen im Folgenden im Vergleich mit Daten aus der Literatur diskutiert werden.

4.2 Besonderheiten des verwendeten Mausmodells

Bei dem verwendeten Mausmodell erfolgte die Expression von Urocortin 2 in Abhängigkeit vom SF1-Promotor. Bingham et al. (97) beschreiben für diesen Promotor eine Aktivität im Nucleus ventromedialis des Hypothalamus, in der Adenohypophyse, der Milz, der Nebennierenrinde sowie in den Gonaden.

Während eine natürliche Expression von Ucn2 im Hypothalamus für den Nucleus paraventricularis und den Nucleus arcuatus nachgewiesen werden konnte (56), fand sich kein Hinweis auf eine natürliche mRNA Expression von Ucn2 im Nucleus ventromedialis. In diesem konnte jedoch die Expression von CRF₂ nachgewiesen werden (103). Als Ligand für die hier lokalisierten Rezeptoren wird jedoch Urocortin 3 angenommen, das ebenfalls mit hoher Affinität an CRF₂ bindet. Der Hauptexpressionsort von Ucn3 ist der Nucleus paraventricularis. Dieser ist über afferente Fasern mit dem Nucleus ventromedialis des Hypothalamus verbunden und es wird angenommen, dass auf diesem Weg Ucn3 seinen Einfluss auf die Energiehomöostase ausübt (104). Eine lokale, SF1-Promotor bedingte Ucn2-Überexpression im Nucleus

ventromedialis (97) könnte zu einer Konkurrenz um Bindungsstellen an den CRF₂ führen, an den Ucn2 und 3 mit vergleichbarer Affinität binden. Eine Einflussnahme auf die HHG-Achse wäre dann jedoch weniger zu erwarten, vielmehr könnte es zu einer veränderten Nahrungsaufnahme aufgrund des Einflusses auf die Energiehomöostase kommen.

Eine Aktivität des SF1-Promotors ist ferner für die gonadotropen Zellen der Adenohypophyse beschrieben worden (97), die FSH und LH pulsatil sezernieren. Während Van Pett et al. (105) eine überwiegende Expression von CRF₁ in der Adenohypophyse und eine hohe Expression von CRF₂ in der Neurohypophyse beschrieben, konnten Kageyama et al. 3 Jahre später CRF₂ in gonadotropen Zellen der Adenohypophyse nachweisen (106). Zudem konnten Nemoto et al. zeigen, dass Ucn2 mRNA in Proopiomelanocortin-positiven, kortikotropen Neuronen exprimiert wird (107) und schlussfolgerten aus ihren Experimenten, dass das von diesen Zellen sezernierte Ucn2 die Expression und Sekretion der Gonadotropine FSH und LH auf parakrinem Weg supprimiert (102,108). Die Ucn2 Expression und Sekretion kultivierter Zellen der Adenohypophyse war hierbei durch CRF stimulierbar und wurde durch Glukokortikoide supprimiert (109). Somit ist ein Einfluss der SF1-Promotor abhängigen Ucn2 Überexpression in der Adenohypophyse auf die Expression und Sekretion der Gonadotropine möglich und wird in Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Arbeit im Folgenden weiter diskutiert werden.

Auch in der Milz kommt es zu einer SF1-Promotor-abhängigen Überexpression von Ucn2. Chen et al. konnten für die Milz eine natürliche, wenn auch verglichen mit anderen Organsystemen, geringe Ucn2-mRNA Expression nachweisen (88). Auch eine Expression von CRF₂ konnte nachgewiesen werden (110). Für die CRF-Familie wurde eine mögliche Rolle in der Regulation ruhender Immunzellen und ein inhibitorischer Effekt (110) auf die Aktivität der splenischen Lymphozyten beschrieben (111). Somit waren keine wesentlichen Auswirkungen der Überexpression von Ucn2 in der Milz auf die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse zu erwarten.

Ferner führt die SF1-Promotor-Aktivität auch zu einer Überexpression von Ucn2 in der Nebennierenrinde (97). Bedingt durch die sekretorische Funktion der Nebennieren ist daher auch von einer Sekretion von Ucn2 in den Blutkreislauf auszugehen. Eine natürliche Expression von Ucn2 sowie von seinem Rezeptor CRF₂ konnte für die Nebennierenrinde sowie in geringerem Maße auch für das Nebennierenmark gezeigt werden (107,112). Für CRF und seine Liganden und Rezeptoren wird angenommen, dass die Modulation der Stressantwort nicht nur durch ihre Rolle in der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse, sondern auch durch einen lokalen Regulationsmechanismus in der Nebenniere erfolgt (92,113,114). Zudem ist eine Wechselwirkung zwischen der HHG-Achse und der HHN-Achse bekannt: so führt Stress, CRF-vermittelt, zu einer verminderten Aktivität des GnRH-Pulsgenerators (115). Auf der anderen Seite kann Östrogen die Sensitivität für Stress von CRF-Neuronen im Nucleus paraventricularis erhöhen und somit eine gesteigerte Stressantwort bewirken (49). Dies ist auch ein

Grund für die bekannten, geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Stressantwort (116,117), welche eine starke Verknüpfung der HHG- und der HHN-Achse deutlich machen. Zusammenfassend ist eine systemische und lokale Wirkung von Ucn2 auf die HHN-Achse sowie eine Wechselwirkung von der HHN- und der HHG-Achse bekannt. Auf diese genannten Zusammenhänge wird in der folgenden Diskussion der Ergebnisse weiblicher und männlicher Versuchstiere noch genauer eingegangen.

In den Ovarien wurde die endogene Expression von Urocortin 2 für präantrale, präovulatorische und atretische Follikel sowie für Stromazellen nachgewiesen (63). Dieses Expressionsmuster ist hierbei deckungsgleich mit dem von SF1. Die stärkste Expression konnte in Granulosa- und Thekazellen präovulatorischer Follikel nachgewiesen werden, während Primordial- und Primärfollikel sowie Corpora albicans kein SF1 exprimierten (118). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kam es somit zu einer Überexpression von Ucn2 in Zelltypen, die bereits eine endogene Ucn2-Expression besitzen.

In den Testes wurde eine geringe endogene Ucn2-Expression für die Leydigzellen nachgewiesen (89), während SF1 endogen in Leydig- und geringer ausgeprägt auch in Sertolizellen exprimiert wird (97). Da Ucn2 im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Abhängigkeit vom SF1-Promotor überexprimiert wurde, war eine Ucn2-Überexpression in Leydig- und Sertolizellen zu erwarten, die somit einer Abweichung vom endogenen Expressionsmuster von Ucn2 entsprach.

4.3 Ergebnisse im Vergleich mit Daten der Literatur: Weibchen

Der Nachweis von CRF, seinen verwandten Peptiden und Rezeptoren sowohl in den Ovarien als auch in den übergeordneten Regulationszentren, der Hypophyse und dem Hypothalamus, legen einen regulatorischen Einfluss des CRF-Systems auf die weibliche Sexualhormonsynthese und somit auch auf die Follikelreifung nahe (56,63,88,106,107,119). Hierbei sind insbesondere inhibitorische Einflüsse des CRF-Systems auf die Funktionen der Ovarien vorbeschrieben. So konnten Calogero et al. (120) zeigen, dass CRF die FSH-stimulierte Östrogenproduktion von kultivierten Granulosazellen hemmt. Sie nahmen hierbei an, dass der Effekt über einen hemmenden Einfluss auf die Aromatase, die Androgene zu Östrogenen umwandelt, vermittelt würde. Die Progesteronkonzentration blieb hierbei jedoch unverändert. Eine entsprechende Beobachtung konnte im Rahmen dieser Arbeit bei den Ucn2-überexprimierenden Weibchen gemacht werden: Während die Plasmakonzentration von Progesteron keine signifikanten Unterschiede zeigte, war die Östradiolkonzentration im Plasma signifikant erniedrigt. Außerdem konnte auch eine signifikant erniedrigte Expression der Aromatase (Cyp19) für die Ucn2 OE Weibchen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass die erniedrigte Östradiolkonzentration im Plasma der Ucn2 OE Weibchen durch

die verminderte Aktivität der Aromatase bedingt sein könnte. Wechselwirkungen zwischen Östradiol und Urocortin 2 konnten von Watanabe et al. (121) auch für den Uterus gezeigt werden, der ebenfalls eine natürliche Urocortin 2 Expression aufweist. Beim Vergleich der Ucn2-Expression von 2- bis 4-Wochen alten, weiblichen Ratten mit 9-Wochen alten Rattenweibchen konnten die Autoren zeigen, dass die uterine Ucn2-Expression bei den jüngeren Ratten signifikant höher war. Gleichzeitig war die Östradiolkonzentration im Plasma bei den jüngeren Ratten signifikant niedriger. Ferner konnten sie zeigen, dass es nach subkutaner Injektion von Östradiolbenzoat zu einer signifikanten Abnahme der Ucn2-mRNA Expression im Uterus kam (121).

Das Enzym Cyp17 synthetisiert Androgene aus Gestagenen. Bei Mäusen und Ratten ist die Expression von Cyp17 auf die Gonaden beschränkt und katalysiert sowohl die Reaktionen von Pregnenolon über den Δ^5 -Syntheseweg zu Dehydroepiandrosteron als auch von Progesteron über den Δ^4 -Syntheseweg zu Androstendion (27). Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine signifikante Abnahme der mRNA-Expression für das Enzym Cyp17 sowie eine nicht signifikante Abnahme der Plasmakonzentration von 17α -Hydroxypregnenolon bei Ucn2-überexprimierenden Weibchen nachgewiesen werden. Erden et al. (122) konnten einen inhibitorischen Effekt von CRF auf die LH-stimulierte Androgenproduktion von Cyp17 zeigen. Da weder die 17α -Hydroxylase- noch die $17,20$ -Lyase-Funktion von Cyp17 in kleinen, antralen Follikeln eine nennenswerte Aktivität besitzen, werden in diesen Follikeln kaum Gestagene zu Androgenen umgewandelt (123). Dies, und somit auch die Möglichkeit die Androgene weiter zu Östrogenen zu aromatisieren, ist präovulatorischen Follikeln vorbehalten und abhängig von einem geringen Anstieg von LH und cAMP (124). Die Anzahl solcher präovulatorischer Follikel war bei den Ucn2 OE Weibchen im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant vermindert. Hierin könnte eine Erklärung für die verminderte Expression von Cyp17 bei den Ucn2-überexprimierenden Weibchen liegen.

Die beiden ersten Schritte der Sexualhormonsynthese in den Ovarien, der Transport von Cholesterin zur inneren Mitochondrienmembran sowie die Synthese von Pregnenolon aus Cholesterin, werden von den Enzymen StAR und Cyp11a1 ausgeführt. StAR unterliegt hierbei einem cAMP-vermittelten Stimulus (125,126). Der akute Effekt dieses Stimulus erfolgt innerhalb von Sekunden oder Minuten und besteht in einem verstärkten Transport von Cholesterin aus intrazellulären Lipidtröpfchen zur inneren Mitochondrienmembran. Ein chronischer Stimulus führt zu einer gesteigerten Enzymsynthese (127). Für diese beiden Enzyme, StAR und Cyp11a1, zeigte sich im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit eine signifikant gesteigerte Expression der mRNA bei den Ucn2 OE Weibchen im Vergleich zu den Kontrolltieren. Diese Ergebnisse stehen somit im Kontrast zu den Expressionsmustern, die in dieser Arbeit für die Androgensynthese (Cyp17) und für die Östrogensynthese (Cyp19) gezeigt werden konnten; korrelieren jedoch mit Ergebnissen der Literatur: Ronen-Fuhrmann et al. konnten zeigen, dass die StAR

Expression als Folge des LH-Stimulus in den Thekazellen aller Follikelstadien auf ein hohes Niveau anstieg. In den Granulosazellen konnte ein solcher Anstieg der StAR-Expression nur für präovulatorische Follikel gezeigt werden (128). Auch Hedin et al. konnten zeigen, dass die Expression von StAR nach dem LH-Stimulus steigt und am höchsten in Corpora lutea trächtiger Tiere ist (124). Im Gegensatz hierzu konnte für die Expression von Cyp11a1 eine Abhängigkeit von FSH gezeigt werden. So konnten zum Beispiel deMoura et al. eine gesteigerte Aktivität und Expression von Cyp11a1 in kultivierten Granulosazellen nachweisen, nachdem dem Kulturmedium FSH zugesetzt worden war (129,130). Auch Funkenstein et al. konnten diesen stimulatorischen Effekt von FSH *in vitro* nachweisen (131). Die Expression von Cyp11a1 wurde in Theka- und Granulosazellen, sowie in Zellen des Interstitiums und des Corpus luteum nachgewiesen (132). Insgesamt scheint die Expression von StAR und Cyp11a1 einer weitgreifenden Regulation durch die Gonadotropine LH und FSH zu unterliegen.

Für die Expression von Hsd3b und Hsd17b konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Weibchen beider Gruppen nachgewiesen werden. Entsprechend zeigte auch die Plasmakonzentration von Progesteron, das durch Hsd3b aus Pregnenolon synthetisiert wird, keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der Messwerte der Kontrollgruppe mit den Ucn2 OE Weibchen. Der inhibitorische Effekt, den Yata et al. (133) für Urocortin 3 auf die Progesteronsynthese kultivierter, humaner Granulosazellen zeigten, konnte in diesem *in vivo* Maus-Modell für Urocortin 2 nicht nachvollzogen werden.

Neben der Synthese von Progesteron aus Pregnenolon katalysiert Hsd3b unter anderem auch die Reaktion von Testosteron aus Androstendion. Die Expression von Hsd3b konnte in Theka- und Granulosazellen wachsender und präovulatorischer Follikel sowie in Zellen des Interstitiums und des Corpus luteum nachgewiesen werden. In Zellkultur kann die mRNA Expression von Hsd3b in Theka- und Granulosazellen unter anderem durch LH und hCG gesteigert werden (134). Die Expression und Aktivität von Hsd3b kann in Granulosazellen auch durch FSH verstärkt werden (132). Eimerl und Orly fanden hierbei jedoch einen eher schwachen, stimulatorischen Effekt von FSH auf die Expression von Hsd3b, verglichen mit dem Effekt, den FSH zum Beispiel auf StAR hat. Einer der Hauptgründe hierfür scheint eine hohe, konstitutionelle Expression von Hsd3b in den verschiedenen Zelltypen der Ovarien zu sein (135). Die hohe, konstitutionelle Expression von Hsd3b könnte somit möglicherweise auch einen Teilaspekt darstellen, warum im Rahmen dieser Arbeit die Urocortin 2 Überexpression keinen nennenswerten Effekt auf das Expressionsmuster von Hsd3b zeigte. Das Enzym Hsd17b katalysiert unter anderem die Synthese von Östradiol aus Östron und von Testosteron aus Androstendion. Die Isoform Hsd17b1 wird in Granulosazellen wachsender Follikel exprimiert, die Expression wird hierbei durch den Einfluss von FSH gesteigert. Im Verlauf des Zyklus nimmt die Expression von Hsd17b1 während der Luteinisierung ab und wird als Hauptisoform von Hsd17b7

abgelöst. Im Corpus luteum der Maus wird dann ausschließlich die Isoform Hsd17b7 exprimiert (136).

Die weibliche Sexualhormonsynthese hängt unmittelbar mit der Entwicklung reifer Follikel zusammen und entspricht einem komplexen System mit multiplen, regulatorischen Einflüssen. Um die Auswirkungen einer SF1-Promotor abhängigen Ucn2-Überexpression auf dieses System in möglichst vielen Facetten analysieren zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit neben der Expression der oben besprochenen Enzyme, die an der Sexualhormonsynthese beteiligt sind und den entsprechenden Sexualhormonen, auch die Follikelstadien sowie die Expression der Gonadotropinrezeptoren untersucht. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass sich der murine Zyklus in einigen Punkten entscheidend vom humanen Zyklus unterscheidet: So dauert der Zyklus der Maus im Durchschnitt nur vier bis fünf Tage (16). Das Follikelwachstum läuft hierbei kontinuierlich ab und bringt mehrere sprungreife Follikel gleichzeitig hervor. FSH wird während der Follikelreifung erst ab dem Stadium des Tertiärfollikels benötigt, um sprungreife Follikel zu generieren und eine Atresie zu verhindern (21). Aufgrund der Kürze des Zyklus gibt es keine Lutealphase und das Corpus luteum wird nur über einen Zeitraum von vierundzwanzig Stunden erhalten (24).

Beim Vergleich der Kontrollgruppe mit Ucn2 OE Weibchen konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Unterschiede in der Anzahl der Primär- und Sekundärfollikel nachweisen. Signifikante Unterschiede zeigten sich erst bei den reiferen Follikeln: So war die Anzahl der Tertiärfollikel, der Corpora lutea und der atretischen Follikel bei den Ucn2 OE Weibchen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermindert. Während die Expression von FSH-Rezeptoren bei den Ucn2 OE Weibchen signifikant reduziert war, zeigte sich die Expression von LH-Rezeptoren Typ 1 signifikant gesteigert. Die reduzierte Anzahl an Tertiärfollikeln korreliert mit der verminderten mRNA Expression von Cyp19 und der erniedrigten Plasmakonzentration von Östradiol der Ucn2 OE Weibchen. Diese Ergebnisse könnten durch eine reduzierte, jedoch noch vorhandene Wirkung von FSH in den Ovarien erklärt werden, die durch die verminderte Expression von FSH-Rezeptoren in den Ovarien Ucn2 OE Weibchen bedingt sein könnte. Durch die verminderte Wirkung von FSH können weniger Follikel zu Tertiärfollikeln reifen und sich zu Corpora lutea entwickeln, insgesamt entstehen auf diese Weise weniger atretische Follikel in den Ovarien Ucn2 OE Weibchen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Trotz einer reduzierten Anzahl an Corpora lutea in den Ovarien der Ucn2 OE Weibchen ist in dieser Gruppe die Expression der LH-Rezeptoren erhöht und verhält sich dabei umgekehrt zur Expression der FSH-Rezeptoren. Dass LH, FSH und ihre Rezeptoren unterschiedlichen Einflussfaktoren unterliegen ist bekannt: Unter Stressbedingungen lässt sich keine pulsatile LH-Freisetzung nachweisen und der LH-Plasmaspiegel sinkt, während die Plasmakonzentration von FSH hierdurch nicht beeinflusst wird. Der inhibitorische Effekt von Stress auf LH lässt sich durch die Gabe eines CRF-Antagonisten aufheben (137). Ferner wiesen Li et al. (138) nach,

dass dieser Stress-bedingte, inhibitorische Effekt durch den CRF-Rezeptor Typ 2 vermittelt wird und auch Ucn2, als hochselektiver Ligand des CRF-Rezeptor Typ 2, eine dosisabhängige Inhibition der pulsilen LH-Freisetzung bewirkte. Nemoto et al. (108) berichteten, dass Ucn2 *in vitro* die Sekretion der Gonadotropine hemmt und dass eine passive Immunisierung mit Anti-Ucn2 IgG die mRNA Expression und die Sekretion *in vivo* erhöht. Sie schlussfolgerten aus ihren Experimenten, dass die Expression und Sekretion der Gonadotropine durch endogenes Ucn2 der Hypophyse mittels einer parakrinen Wirkung inhibiert werden könnte und dass LH und FSH hierbei offensichtlich auf unterschiedliche Weise reguliert würden. Da die corticotropen Zellen der Adenohypophyse nicht nur ACTH sondern auch Ucn2 sezernieren, kamen Nemoto et al. (108) zu der Annahme, dass Ucn2 eine Rolle bei Stress-induzierter, gonadaler Dysfunktion spielen könnte. Eine Einflussnahme der SF1-Promotor-abhängigen Ucn2-Überexpression auf die Expression der Gonadotropinrezeptoren ist zum einen durch eine parakrine Hemmung der Expression und Sekretion der Gonadotropine in der Hypophyse und zum anderen durch eine parakrine Wirkung von Ucn2 in den Gonaden selbst denkbar. Zudem könnte die von Nemoto et al. beschriebene, unterschiedliche Einflussnahme von Ucn2 auf LH und FSH eine mögliche Erklärung für die gegensinnige Regulation der Gonadotropinrezeptoren im Rahmen der vorliegenden Arbeit liefern.

Mastorakos et al. (139) konnten zeigen, dass es bei Patientinnen mit Polyzystischem Ovarialsyndrom (PCOS) zu einer Expression von CRF in Oozyten von Primordialfollikeln kommt, die in Follikeln gesunder Probandinnen nicht nachweisbar ist. Zudem konnten Temur et al. (140) erhöhte Plasmakonzentrationen von Urocortin 3 bei Patientinnen mit PCOS nachweisen. Aufgrund der großen Homologie von Ucn2 zu CRF und Ucn3 sowie durch die Ucn3 entsprechende Rezeptoraffinität zu CRF₂, wäre neben der Rolle für Stress-induzierte, gonadale Dysfunktion (108) auch eine Bedeutung beim PCOS für Ucn2 denkbar.

4.4 Ergebnisse im Vergleich mit Daten der Literatur: Männchen

Die Expression von CRF, den Urocortinen und den entsprechenden Rezeptoren, CRF₁ und CRF₂, wurde auch für die Testes und die verschiedenen Entwicklungsstadien der Spermatozoen nachgewiesen (84,85,88,89). In Zusammenschau dieser lokalen Expression mit der bekannten Expression des CRF-Urocortin-Rezeptor-Systems in der Hypophyse und im Hypothalamus (56,106) ist eine Rolle von Ucn2 für die Regulation der Hormon- und Spermatozoenproduktion der Testes zu diskutieren: Der CRF-Rezeptor Typ 2, an den Ucn2 hochselektiv bindet, wird ausschließlich in Spermatogonien exprimiert. Die übrigen Entwicklungsstadien der Spermatozoen weisen keine nennenswerte Expression dieses Rezeptors auf (84,85). Squillacioti et al. konnten zeigen, dass die Expressionsraten von CRF₂ und Ucn1 bei Hunden mit Kryptorchismus niedriger waren im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren. Dies

weist auf eine Beteiligung des Urocortin-Rezeptor-Systems an der Regulation der Spermatogenese und der Testosteronproduktion hin (141). Lee et al. beschrieben, dass Leydigzellen von Ratten Ucn2 exprimieren, die Expression jedoch im Verhältnis zu der von Ucn1 relativ niedrig ist (89).

Aufgrund der Abhängigkeit der Ucn2-Überexpression vom SF1-Promotor war für das in dieser Arbeit verwendete Modell eine Ucn2-Überexpression in Leydig- und Sertolizellen zu erwarten. Signifikante Unterschiede zwischen der Ucn2 OE Gruppe und der Kontrollgruppe ließen sich jedoch für die lokale Expression von Ucn2 nicht nachweisen. Auch in der *in situ*-Hybridisierung zeigte sich kein wesentlicher Unterschied in der Signalstärke für Ucn2 beim Vergleich der beiden Gruppen. Der entsprechende Genotyp konnte hierbei durch eine Hybridisierung mit Cre-Sonden bestätigt werden. Der Vergleich mit der Ucn2-Expressionsrate der Weibchen zeigte, dass bereits die Kontrollgruppe der Männchen eine signifikant höhere Ucn2-Expressionsrate aufwies als die Ucn2 OE Weibchen. Dies könnte eine mögliche Erklärung darstellen, warum eine weitere Steigerung der Ucn2-Expression ohne signifikanten Einfluss auf die Testes blieb.

Bedingt durch die multilokuläre, endogene Expression von SF1 war die Plasmakonzentration von Ucn2, ebenso wie bei den weiblichen Versuchstieren, bei den Ucn2 OE Männchen signifikant höher im Vergleich zur Kontrollgruppe. Durch die systemisch erhöhte Plasmakonzentration von Ucn2 wäre eine Auswirkung auf die Sexualhormonsynthese der Testes denkbar. Im Rahmen dieser Arbeit zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede für die Expression der testikulären Enzyme StAR, Cyp11a1, Hsd3b oder Cyp17 beim Vergleich der Ucn2 OE Männchen und der Männchen der Kontrollgruppe. Für Urocortin 1 beschrieb C. Rivier (87) einen inhibitorischen Effekt auf die hCG-getriggerte Testosteronproduktion. Ein vergleichbarer Effekt für Urocortin 2 konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass sich eine Änderung des Expressionsniveaus der Gonadotropine in einer gegensinnigen Änderung der entsprechenden Rezeptorexpression widerspiegelt (142). Da die Genexpression der Gonadotropinrezeptoren FSH-R und LH-R1 in der vorliegenden Arbeit in beiden Gruppen vergleichbar war, ist nicht von einer relevanten Änderung der Expression von FSH oder LH auszugehen. Somit zeigte sich bei den Ucn2 OE Männchen kein regulierender Effekt einer SF-1-abhängigen, hypophysären Ucn2-Überexpression auf die Gonadotropinexpression, wie es Nemoto et al. (108) im Rahmen ihrer Arbeit zeigen konnten.

Da die Expression von Urocortin 2 in den Testes bereits bei den Kontrolltieren ein sehr hohes Niveau aufwies und eine weitere, signifikante Steigerung dieser Expression im Rahmen des vorliegenden Überexpressionsmodells nicht gelang, wäre ein Knock-out-Modell ein weiterer Ansatz, um die Bedeutung von Urocortin 2 für die Spermatogenese und die Synthese männlicher Sexualhormone in den Testes genauer analysieren zu können. Aufgrund der beschriebenen Rezeptorausstattung und Expressionsmuster wäre hierbei ein Knock-out-Modell der Urocortine oder der Rezeptoren CRF₁ und CRF₂ interessant, wie es bereits für die Analyse

anderer, bekannter Expressionsorte der Urocortine und ihrer Rezeptoren Verwendung fand (143-145).

4.5 Ergebnisse im Vergleich mit Daten der Literatur:

Geschlechtsspezifische Unterschiede

Die Verknüpfung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HHN-Achse) mit der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse (HHG-Achse) und die daraus resultierenden Einflüsse sind bereits seit vielen Jahren Gegenstand der Forschung. Hierbei werden die inhibitorischen Effekte der HPN-Achse auf die HPG-Achse, die zu einer Stress-assoziierten, gonadalen Dysfunktion führen können (146), immer weiter aufgeschlüsselt. Vor einigen Jahren glaubte man in CRF den zentralen Verknüpfungspunkt dieser beiden Achsen gefunden zu haben. Für die inhibitorische Wirkung von CRF auf die Fertilität wurden sowohl zentrale als auch periphere Wirkungsmechanismen nachgewiesen: Petraglia et al. (147) beschrieben, dass CRF die Sekretion von LH hemmt indem es die Freisetzung von GnRH in das hypophysäre Portal-system inhibiert. Calogero et al. (120) konnten zeigen, dass CRF die basale Östrogenproduktion von humanen Granulosazellen *in vitro* hemmt und postulierten daher auch eine periphere Wirkungsweise von CRF an den Gonaden.

Nach der Erstbeschreibung der Urocortine 1 bis 3 als CRF-verwandte Peptide konnten in den folgenden Jahren bekannte Eigenschaften von CRF auch den Urocortinen zugeschrieben werden. Zudem gelang die Differenzierung, über welchen Rezeptortyp (CRF₁ oder CRF₂) die jeweiligen Wirkungen vermittelt wurden: Li et al. konnten zeigen, dass die Stress-induzierte Inhibition von LH durch CRF₂ vermittelt wird und dass nicht nur CRF sondern auch Ucn2 diesen hemmenden Effekt auf die LH-Freisetzung haben (53,138). Nemoto et al. beschrieben, dass Ucn2 die Gonadotropinsekretion *in vitro* hemmt und kamen zu der Annahme, dass Ucn2 eine Rolle bei Stress-induzierter, gonadaler Dysfunktion spielen könnte (102,108). Neben der molekularen Grundlage für die hemmenden Einflüsse der HHN-Achse auf die HHG-Achse ist auch der hierbei zu beobachtende Geschlechtsunterschied, bei dem Östrogen einen verstärkenden und Testosteron einen hemmenden Einfluss auf Stressreaktionen zeigt, bereits seit Jahren Gegenstand der Forschung. Beispielsweise konnten bei weiblichen, ovariectomierten und Östrogen-behandelten Ratten, als Reaktion auf einen Schmerzreiz, signifikant höhere Spitzenkonzentrationen von Corticosteron gemessen werden. Auch die Werte von ACTH und Corticosteron blieben im Vergleich zur Kontrollgruppe (ovariectomiert ohne Östrogen-Gabe) länger erhöht (148). Für kastrierte, männliche Ratten konnte gezeigt werden, dass sie gegenüber den Kontrolltieren signifikant erhöhte Werte für CRF aufwiesen (149). Zusätzlich waren ihre Plasmawerte für ACTH und Corticosteron nach Exposition gegenüber einer neuen Umge-

bung erhöht (150). Diese Effekte waren durch die Gabe von Testosteron oder Dihydrotestosteron reversibel (149,150). Die zugrunde liegenden Mechanismen werden durch zentralnervös exprimierte Östrogen- und Androgenrezeptoren vermittelt (151). Hierbei nehmen insbesondere CRF-Neuronen des Hypothalamus eine zentrale Rolle ein: Lund et al. (49) schlussfolgerten aus ihren Stress-Experimenten beispielsweise, dass Östrogen die Sensitivität von CRH-Neuronen im Nucleus paraventricularis des Hypothalamus erhöht, wohingegen Dihydrotestosteron eine verminderte Aktivierung von CRF-Neuronen bewirkt. Li et al. (152) beschrieben, dass eine Aktivierung von Östrogenrezeptoren im Nucleus paraventricularis zu einer gesteigerten Expression von CRF führte. Und Weiser et al. zeigten, dass Östrogen über Rezeptoren im Bereich des Nucleus paraventricularis negative Feedbackmechanismen stören kann, die über Glukokortikoidrezeptoren vermittelt werden. Durch die Hemmung dieser Feedbackmechanismen resultiert eine verstärkte Antwort der HHN-Achse (153).

CRF unterliegt somit als zentraler Regulator der HHN-Achse und Verknüpfungspunkt mit der HHG-Achse multiplen, geschlechtsspezifischen Einflüssen, die sich in den unterschiedlichen Stressantworten widerspiegeln. Aufgrund der Homologie zu CRF und der vergleichbaren Expression im Hypothalamus, der Hypophyse, den Nebennieren und den Gonaden liegt es nahe, dass auch die Urocortine entsprechenden, geschlechtsabhängigen Einflüssen unterliegen. In der Tat konnten erste, geschlechtsspezifische Effekte auch für die Urocortine nachgewiesen werden: Wan et al. (154,155) beschrieben, dass Urocortin 1 einen geschlechtsabhängigen, proinflammatorischen Effekt bei der Entstehung von Vaskulitiden hatte. Die Geschlechtsdisparität konnte hierbei durch die Gabe eines anti-Ucn1 Serums aufgehoben werden. Zudem berichteten sie, dass Dihydrotestosteron die Expression von Ucn1 bei Anwesenheit von Entzündungsmediatoren erhöht und diese Regulation über Androgenrezeptoren vermittelt wird. Auch Östrogen und seine Rezeptoren scheinen einen regulierenden Einfluss auf die Expression von Ucn1 zu haben. So beschrieben Haeger et al. (156), dass Östrogen die Aktivität des Ucn1-Promotors direkt beeinflussen kann. Zusätzlich wurde verdeutlicht, dass die Anzahl der Ucn1-exprimierenden Zellen im Nucleus paraventricularis bei weiblichen Ratten signifikant höher lag im Vergleich zu den Männchen und nach Ovariectomie signifikant abnahm. Für Urocortin 2 konnten Chen et al. (145) mittels eines Ucn2-Knock-out-Modells demonstrieren, dass weibliche, nicht jedoch männliche, Knock-out-Mäuse einen signifikanten Anstieg der basalen ACTH- und Corticosteronausschüttung aufwiesen. Eine Geschlechtsdisparität für Urocortin 2 konnte auch im Überexpressionsmodell der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden. Während Ucn2-überexprimierende, weibliche Mäuse eine verminderte, basale Glukokortikoidausschüttung zeigten, waren bei den Ucn2-überexprimierenden Männchen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollen nachweisbar. Zusätzlich zeigten die Ucn2-OE Weibchen im Vergleich zu den weiblichen Kontrollen eine signifikant verminderte Expression des

Enzyms Cyp11b1, welches die Synthese von Corticosteron aus Desoxycorticosteron katalysiert. Das Verhältnis von Corticosteron zu Desoxycorticosteron war zudem vermindert. Bei den Ucn2-OE Männchen konnte kein Unterschied in der Expression von Cyp11b1 im Vergleich mit der Kontrollgruppe festgestellt werden (92,96). Die Verhaltensanalyse von Ucn2-Knock-out-Mäusen ergab, dass männliche Knock-out-Mäuse vermehrt passiv sozial interagieren und weniger aggressiv sind. Diese Änderung der Verhaltensweisen konnte für die weiblichen Versuchstiere nicht nachgewiesen werden (157).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine SF1-Promotor-abhängige Überexpression von Urocortin 2 einen überwiegend hemmenden Einfluss sowohl auf die Sexualhormonsynthese als auch auf die Anzahl reifer Follikel und Corpora lutea weiblicher Mäuse zur Folge hatte. Da im Vergleich zu den weiblichen Kontrolltieren sowohl eine signifikant erhöhte, lokale Expression von Ucn2 in den Ovarien vorlag, als auch eine signifikant erhöhte Plasmakonzentration, konnte hier nicht zwischen lokalen und systemisch wirksamen Effekten differenziert werden. Die männlichen, Ucn2-überexprimierenden Versuchstiere zeigten ebenfalls signifikant erhöhte Plasmakonzentrationen für Ucn2, jedoch keine relevanten Unterschiede der gonadalen Ucn2-Expression oder der Sexualhormonsynthese im Vergleich zu den Kontrolltieren. Beim Vergleich des gonadalen Expressionsniveaus von Ucn2 zwischen männlichen und weiblichen Versuchs- und Kontrolltieren fiel auf, dass die männlichen Kontrolltiere eine signifikant höhere, gonadale Ucn2-Expression aufwiesen. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass männliche Kontrolltiere im Vergleich zu den weiblichen Kontrollen natürlicherweise eine wesentlich höhere, gonadale Ucn2-Expression zeigten. Ferner führten weder eine Steigerung der Plasmakonzentration von Ucn2 noch der gonadalen Expression bei den männlichen Mäusen zu weiteren Effekten im Vergleich zu den männlichen Kontrolltieren. Da auch die signifikant erhöhte Ucn2-Plasmakonzentration keinen Einfluss bei den Männchen zu haben schien, könnte dies auf die Bedeutung der natürlichen, gonadalen Ucn2-Expression hinweisend sein.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die in der Literatur bekannte Geschlechtsdisparität der Wirkung von CRF und der verwandten Urocortine im Allgemeinen und von Urocortin 2 im Speziellen auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte. Die hierbei wirksamen Einflüsse sind sehr vielfältig und durch die Verknüpfung der HHN- und HHG-Achse durch die Homologie von Ucn2 zu CRF entsprechend komplex. Um die geschlechtsspezifischen Einflüsse von Urocortin 2 auf die Funktion der Gonaden weiterführend analysieren zu können, wäre zum Beispiel ein Ucn2-Knock-out-Modell mit weiblichen und männlichen Versuchstieren denkbar (157).

5 Zusammenfassung

Die Urocortine (Ucn) 1 bis 3 gehören zur Familie des Corticotropin-Releasing-Faktors (CRF). Als Bestandteil der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse sind sie an Stress- und Stress-coping-Reaktionen beteiligt. Ihre Wirkung wird über die CRF-Rezeptoren Typ 1 und Typ 2 vermittelt, zu denen die Urocortine eine unterschiedlich starke Affinität besitzen. Urocortin 2 ist hierbei spezifischer Ligand für den CRF-Rezeptor Typ 2. Vergleichbar mit CRF konnte die Expression der Urocortine nicht nur für den Hypothalamus und die Hypophyse sondern auch in peripheren Organen wie den Nebennieren und den Gonaden nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass es zahlreiche Wechselwirkungen zwischen der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren- (HHN) und der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden- (HHG) Achse gibt. Durch wechselseitige Effekte kommt es hierbei zu einer Hemmung der Funktion der Gonaden sowie zu einer Modulation der Stressantwort. Zudem weiß man, dass diese Effekte geschlechtsspezifisch und bei weiblichen Individuen insgesamt stärker ausgeprägt sind. Durch seine Homologie zu CRF und seine Bedeutung sowohl für die HHN- als auch für die HHG-Achse hat Ucn2 das Potential ein wesentlicher Regulator der Gonadenfunktion zu sein.

Um die organspezifische Wirkung von Urocortin 2 auf die Gonaden zu untersuchen, wurden Mäuse gezüchtet, die mit Hilfe des Cre-Lox-Systems Urocortin 2 in Abhängigkeit des Steroidogenic Factor 1-Promotors vor allem in den Gonaden und in den Nebennieren überexprimieren. Von den weiblichen und männlichen Versuchstieren sowie von den Kontrolltieren wurden Blutproben entnommen und die Gonaden eingefroren oder für die mikroskopische Betrachtung aufgearbeitet. Die sich anschließenden Tests umfassten RT-PCR Analysen des Expressionsniveaus von Enzymen der Sexualhormonsynthese und der Gonadotropinrezeptoren, Hormonmessungen sowie die Färbung und quantitative Analyse von Gewebeschnitten. Hierbei zeigte sich, dass die Überexpression von Urocortin 2 bei den weiblichen Versuchstieren mit einer verminderten Expression von Schlüsselenzymen der Sexualhormonsynthese und einer erniedrigten Östrogenkonzentration im Plasma assoziiert ist. Ferner war die Zahl reifer Follikel und Corpora lutea bei den Ucn2-überexprimierenden Weibchen signifikant vermindert; die Fertilität war jedoch erhalten. Für die Urocortin 2 überexprimierenden Männchen ließen sich keine signifikanten Unterschiede der Expression von Enzymen oder Gonadotropinrezeptoren im Vergleich zu den männlichen Kontrolltieren nachweisen. Die Analyse der gonadalen Ucn2-Expression zeigte hierbei, dass die Ucn2-Expression der männlichen Versuchstiere mit der natürlichen Expression der Kontrolltiere fast vergleichbar war; und dass das Expressionsniveau der männlichen Kontrollen hochsignifikant über dem der weiblichen Kontrollen lag.

Zusammenfassend kann aus dieser *in vivo* Studie geschlossen werden, dass Urocortin 2 einen regulierenden Einfluss auf die Morphologie und Funktion der Ovarien hat. Zusätzlich

weist Urocortin 2 geschlechtsspezifisch ein unterschiedlich hohes, natürliches Expressionsniveau in den Gonaden auf.

6 Literaturverzeichnis

1. Jiang X, Skibba M, Zhang C, Tan Y, Xin Y, Qu Y. The roles of fibroblast growth factors in the testicular development and tumor. *Journal of diabetes research* 2013; 2013:489095
2. Chubb C. Genes regulating testis size. *Biol Reprod* 1992; 47:29-36
3. Le Roy I, Tordjman S, Migliore-Samour D, Degrelle H, Roubertoux PL. Genetic architecture of testis and seminal vesicle weights in mice. *Genetics* 2001; 158:333-340
4. Mori H, Shimizu D, Fukunishi R, Christensen AK. Morphometric analysis of testicular Leydig cells in normal adult mice. *The Anatomical record* 1982; 204:333-339
5. Griswold MD. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Seminars in cell & developmental biology* 1998; 9:411-416
6. Setchell BP, Breed WG. Chapter 17 - Anatomy, Vasculature, and Innervation of the Male Reproductive Tract A2 - Wassarman, Jimmy D. Neill Tony M. Plant Donald W. Pfaff John R.G. Challis David M. de Kretser JoAnne S. Richards Paul M. Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction (Third Edition)*. St Louis: Academic Press; 2006:771-825.
7. Oakberg EF. Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse. *The Anatomical record* 1971; 169:515-531
8. Roosen-Runge EC. The process of spermatogenesis in mammals. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 1962; 37:343-377
9. Rugh R. *The Mouse: Its reproduction and development*. Minneapolis, Minn.: Burgess Publishing Co.
10. Haywood M, Spaliviero J, Jimenez M, King NJ, Handelsman DJ, Allan CM. Sertoli and germ cell development in hypogonadal (hpg) mice expressing transgenic follicle-stimulating hormone alone or in combination with testosterone. *Endocrinology* 2003; 144:509-517
11. Singh J, Handelsman DJ. The effects of recombinant FSH on testosterone-induced spermatogenesis in gonadotrophin-deficient (hpg) mice. *Journal of andrology* 1996; 17:382-393
12. Foster HL, ed. *The Mouse in Biomedical Research: Normative biology, immunology, and husbandry*. New York: Academic Press; 1983.
13. Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev* 2009; 30:624-712
14. Ojeda SR. Female Reproductive Function. In: Kovacs WJIO, S.R., ed. *Textbook of Endocrine Physiology*. 6. ed. New York: Oxford University Press, Inc.; 1996:194-238.
15. Lunenfeld B, Kraiem Z, Eshkol A. The function of the growing follicle. *Journal of reproduction and fertility* 1975; 45:567-574
16. Chaffin CL, Vandevoort CA. Follicle growth, ovulation, and luteal formation in primates and rodents: a comparative perspective. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ)* 2013; 238:539-548
17. Allen E. The oestrus cycle in the mouse. *American Journal of Anatomy* 1922; 30:297-371
18. Smith MS, Freeman ME, Neill JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 1975; 96:219-226
19. Weick RF, Dierschke DJ, Karsch FJ, Butler WR, Hotchkiss J, Knobil E. Periovarial time courses of circulating gonadotropic and ovarian hormones in the rhesus monkey. *Endocrinology* 1973; 93:1140-1147

20. Peters H, Byskov AG, Himelstein-Braw R, Faber M. Follicular growth: the basic event in the mouse and human ovary. *Journal of reproduction and fertility* 1975; 45:559-566
21. Hirshfield AN, Midgley AR, Jr. Morphometric analysis of follicular development in the rat. *Biol Reprod* 1978; 19:597-605
22. Richards JS, Pangas SA. The ovary: basic biology and clinical implications. *J Clin Invest* 2010; 120:963-972
23. Andersen AG, Als-Nielsen B, Hornnes PJ, Franch Andersen L. Time interval from human chorionic gonadotrophin (HCG) injection to follicular rupture. *Hum Reprod* 1995; 10:3202-3205
24. Stouffer RL. Structure, function and regulation of the corpus luteum. In: Neill JD, ed. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 3. ed. New York: Raven; 2006:478-480.
25. Woodruff TK, D'Agostino J, Schwartz NB, Mayo KE. Dynamic changes in inhibin messenger RNAs in rat ovarian follicles during the reproductive cycle. *Science* 1988; 239:1296-1299
26. Pedersen T, Peters H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *Journal of reproduction and fertility* 1968; 17:555-557
27. Conley AJ, Bird IM. The role of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the delta 5 and delta 4 pathways of steroidogenesis in mammals. *Biol Reprod* 1997; 56:789-799
28. Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev* 2011; 32:81-151
29. Payne AH, Hales DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev* 2004; 25:947-970
30. Perkins LM, Payne AH. Quantification of P450_{scc}, P450(17) alpha, and iron sulfur protein reductase in Leydig cells and adrenals of inbred strains of mice. *Endocrinology* 1988; 123:2675-2682
31. Tamura T, Kitawaki J, Yamamoto T, Osawa Y, Kominami S, Takemori S, Okada H. Immunohistochemical localization of 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase and aromatase cytochrome P-450 in the human ovary during the menstrual cycle. *J Endocrinol* 1992; 135:589-595
32. Conley AJ, Kaminski MA, Dubowsky SA, Jablonka-Shariff A, Redmer DA, Reynolds LP. Immunohistochemical localization of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and P450 17 alpha-hydroxylase during follicular and luteal development in pigs, sheep, and cows. *Biol Reprod* 1995; 52:1081-1094
33. Jamnongjit M, Hammes SR. Ovarian steroids: the good, the bad, and the signals that raise them. *Cell Cycle* 2006; 5:1178-1183
34. Feher JJ. Female reproductive physiology. *Quantitative human physiology: An introduction*. 1 ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press; 2012:850-865.
35. Brodie A, Inkster S. Aromatase in the human testis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993; 44:549-555
36. Carreau S, Silandre D, Bois C, Bouraima H, Galeraud-Denis I, Delalande C. Estrogens: a new player in spermatogenesis. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society* 2007; 45 Suppl 1:S5-10
37. Fevold HR, Lorence MC, McCarthy JL, Trant JM, Kagimoto M, Waterman MR, Mason JI. Rat P450(17 alpha) from testis: characterization of a full-length cDNA encoding a unique steroid hydroxylase capable of catalyzing both delta 4- and delta 5-steroid-17,20-lyase reactions. *Mol Endocrinol* 1989; 3:968-975
38. Wood JR, Strauss JF, 3rd. Multiple signal transduction pathways regulate ovarian steroidogenesis. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 2002; 3:33-46
39. Dufau ML, Catt KJ, Tsuruhara T. Gonadotrophin stimulation of testosterone production by the rat testis in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1971; 252:574-579

40. Shahwan MM, Oakey RE, Stitch SR. Another pathway of oestriol biosynthesis in pregnancy. *The Biochemical journal* 1968; 110:30p
41. Findlay JK, Drummond AE. Regulation of the FSH Receptor in the Ovary. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 1999; 10:183-188
42. Thomas RM, Nechamen CA, Mazurkiewicz JE, Muda M, Palmer S, Dias JA. Follicle-stimulating hormone receptor forms oligomers and shows evidence of carboxyl-terminal proteolytic processing. *Endocrinology* 2007; 148:1987-1995
43. Fan QR, Hendrickson WA. Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. *Nature* 2005; 433:269-277
44. Christensen A, Bentley GE, Cabrera R, Ortega HH, Perfito N, Wu TJ, Micevych P. Hormonal regulation of female reproduction. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 2012; 44:587-591
45. Luu-The V, Belanger A, Labrie F. Androgen biosynthetic pathways in the human prostate. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008; 22:207-221
46. O'Shaughnessy PJ, Monteiro A, Abel M. Testicular development in mice lacking receptors for follicle stimulating hormone and androgen. *PloS one* 2012; 7:e35136
47. Chimento A, Sirianni R, Casaburi I, Pezzi V. Role of Estrogen Receptors and G Protein-Coupled Estrogen Receptor in Regulation of Hypothalamus-Pituitary-Testis Axis and Spermatogenesis. *Frontiers in endocrinology* 2014; 5:1
48. Chrousos GP, Torpy DJ, Gold PW. Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications. *Annals of internal medicine* 1998; 129:229-240
49. Lund TD, Munson DJ, Haldy ME, Handa RJ. Androgen inhibits, while oestrogen enhances, restraint-induced activation of neuropeptide neurones in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 2004; 16:272-278
50. Kalantaridou SN, Zoumakis E, Makrigiannakis A, Lavasidis LG, Vrekoussis T, Chrousos GP. Corticotropin-releasing hormone, stress and human reproduction: an update. *J Reprod Immunol* 2010; 85:33-39
51. Fekete EM, Zorrilla EP. Physiology, pharmacology, and therapeutic relevance of urocortins in mammals: ancient CRF paralogs. *Frontiers in neuroendocrinology* 2007; 28:1-27
52. Hsu SY, Hsueh AJ. Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor. *Nat Med* 2001; 7:605-611
53. Li XF, Bowe JE, Lightman SL, O'Byrne KT. Role of corticotropin-releasing factor receptor-2 in stress-induced suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 2005; 146:318-322
54. Heindel JJ, Treinen KA. Physiology of the male reproductive system: endocrine, paracrine and autocrine regulation. *Toxicologic pathology* 1989; 17:411-445
55. Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, Perrin MH, Lewis K, Sutton S, Chan R, Turnbull AV, Lovejoy D, Rivier C, et al. Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature* 1995; 378:287-292
56. Reyes TM, Lewis K, Perrin MH, Kunitake KS, Vaughan J, Arias CA, Hogenesch JB, Gulyas J, Rivier J, Vale WW, Sawchenko PE. Urocortin II: a member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:2843-2848
57. Lewis K, Li C, Perrin MH, Blount A, Kunitake K, Donaldson C, Vaughan J, Reyes TM, Gulyas J, Fischer W, Bilezikjian L, Rivier J, Sawchenko PE, Vale WW. Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:7570-7575
58. Hauger RL, Grigoriadis DE, Dallman MF, Plotsky PM, Vale WW, Dautzenberg FM. International Union of Pharmacology. XXXVI. Current status of the nomenclature for

- receptors for corticotropin-releasing factor and their ligands. *Pharmacological reviews* 2003; 55:21-26
59. Dautzenberg FM, Kilpatrick GJ, Hauger RL, Moreau J. Molecular biology of the CRH receptors-- in the mood. *Peptides* 2001; 22:753-760
 60. Suda T, Kageyama K, Sakihara S, Nigawara T. Physiological roles of urocortins, human homologues of fish urotensin I, and their receptors. *Peptides* 2004; 25:1689-1701
 61. Florio P, Franchini A, Reis FM, Pezzani I, Ottaviani E, Petraglia F. Human placenta, chorion, amnion and decidua express different variants of corticotropin-releasing factor receptor messenger RNA. *Placenta* 2000; 21:32-37
 62. Stojkov NJ, Janjic MM, Bjelic MM, Mihajlovic AI, Kostic TS, Andric SA. Repeated immobilization stress disturbed steroidogenic machinery and stimulated the expression of cAMP signaling elements and adrenergic receptors in Leydig cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 302:E1239-1251
 63. Xu J, Hennebold JD, Stouffer RL. Dynamic expression and regulation of the corticotropin-releasing hormone/urocortin-receptor-binding protein system in the primate ovary during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:1544-1553
 64. Palchadhuri MR, Hauger RL, Wille S, Fuchs E, Dautzenberg FM. Isolation and pharmacological characterization of two functional splice variants of corticotropin-releasing factor type 2 receptor from *Tupaia belangeri*. *J Neuroendocrinol* 1999; 11:419-428
 65. Behan DP, De Souza EB, Lowry PJ, Potter E, Sawchenko P, Vale WW. Corticotropin releasing factor (CRF) binding protein: a novel regulator of CRF and related peptides. *Frontiers in neuroendocrinology* 1995; 16:362-382
 66. Bittencourt JC, Vaughan J, Arias C, Rissman RA, Vale WW, Sawchenko PE. Urocortin expression in rat brain: evidence against a pervasive relationship of urocortin-containing projections with targets bearing type 2 CRF receptors. *The Journal of comparative neurology* 1999; 415:285-312
 67. Kuperman Y, Chen A. Urocortins: emerging metabolic and energy homeostasis perspectives. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2008; 19:122-129
 68. Vetter DE, Li C, Zhao L, Contarino A, Liberman MC, Smith GW, Marchuk Y, Koob GF, Heinemann SF, Vale W, Lee KF. Urocortin-deficient mice show hearing impairment and increased anxiety-like behavior. *Nat Genet* 2002; 31:363-369
 69. Kakiya S, Yokoi H, Arima H, Iwasaki Y, Oki Y, Oiso Y. Central administration of urocortin inhibits vasopressin release in conscious rats. *Neurosci Lett* 1998; 248:144-146
 70. Uzuki M, Sasano H, Muramatsu Y, Totsune K, Takahashi K, Oki Y, Iino K, Sawai T. Urocortin in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Clinical science (London, England : 1979)* 2001; 100:577-589
 71. Singh LK, Boucher W, Pang X, Letourneau R, Seretakakis D, Green M, Theoharides TC. Potent mast cell degranulation and vascular permeability triggered by urocortin through activation of corticotropin-releasing hormone receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1999; 288:1349-1356
 72. Clifton VL, Gu Q, Murphy VE, Schwartz J, Madsen G, Smith R. Localization and characterization of urocortin during human pregnancy. *Placenta* 2000; 21:782-788
 73. Muramatsu Y, Sugino N, Suzuki T, Totsune K, Takahashi K, Tashiro A, Hongo M, Oki Y, Sasano H. Urocortin and corticotropin-releasing factor receptor expression in normal cycling human ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:1362-1369
 74. Florio P, Torricelli M, De Falco G, Leucci E, Giovannelli A, Gazzolo D, Severi FM, Bagnoli F, Leoncini L, Linton EA, Petraglia F. High maternal and fetal plasma urocortin levels in pregnancies complicated by hypertension. *Journal of hypertension* 2006; 24:1831-1840
 75. Yildirim E, Keles I, Cakmak HA, Cosansu K, Can G, Ikitimur B. The evaluation of the clinical utility of urocortin 1 in systolic heart failure. *Kardiologia polska* 2014;

76. Scarabelli TM, Pasini E, Stephanou A, Comini L, Curello S, Raddino R, Ferrari R, Knight R, Latchman DS. Urocortin promotes hemodynamic and bioenergetic recovery and improves cell survival in the isolated rat heart exposed to ischemia/reperfusion. *Journal of the American College of Cardiology* 2002; 40:155-161
77. Bale TL, Contarino A, Smith GW, Chan R, Gold LH, Sawchenko PE, Koob GF, Vale WW, Lee KF. Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nat Genet* 2000; 24:410-414
78. Venkatasubramanian S, Griffiths ME, McLean SG, Miller MR, Luo R, Lang NN, Newby DE. Vascular effects of urocortins 2 and 3 in healthy volunteers. *Journal of the American Heart Association* 2013; 2:e004267
79. Martinez V, Wang L, Rivier JE, Vale W, Tache Y. Differential actions of peripheral corticotropin-releasing factor (CRF), urocortin II, and urocortin III on gastric emptying and colonic transit in mice: role of CRF receptor subtypes 1 and 2. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2002; 301:611-617
80. Brar BK, Jonassen AK, Egorina EM, Chen A, Negro A, Perrin MH, Mjos OD, Latchman DS, Lee KF, Vale W. Urocortin-II and urocortin-III are cardioprotective against ischemia reperfusion injury: an essential endogenous cardioprotective role for corticotropin releasing factor receptor type 2 in the murine heart. *Endocrinology* 2004; 145:24-35; discussion 21-23
81. Hao Z, Huang Y, Cleman J, Jovin IS, Vale WW, Bale TL, Giordano FJ. Urocortin2 inhibits tumor growth via effects on vascularization and cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:3939-3944
82. Pepels PP, Spaanderman ME, Hermus AR, Lotgering FK, Sweep CG. Placental urocortin-2 and -3: endocrine or paracrine functioning during healthy pregnancy? *Placenta* 2010; 31:475-481
83. Imperatore A, Li W, Petraglia F, Challis JR. Urocortin 2 stimulates estradiol secretion from cultured human placental cells: an effect mediated by the type 2 corticotrophin-releasing hormone (CRH) receptor. *Reprod Sci* 2009; 16:551-558
84. Tezval H, Merseburger AS, Serth J, Herrmann TW, Becker JU, Jahn O, Kuczyk MA. Differential expression of urocortin in human testicular germ cells in course of spermatogenesis: role for urocortin in male fertility? *Urology* 2009; 73:901-905
85. Tao J, Lin M, Sha J, Tan G, Soong TW, Li S. Separate locations of urocortin and its receptors in mouse testis: function in male reproduction and the relevant mechanisms. *Cell Physiol Biochem* 2007; 19:303-312
86. Heinrich N, Meyer MR, Furkert J, Sasse A, Beyermann M, Bonigk W, Berger H. Corticotropin-releasing factor (CRF) agonists stimulate testosterone production in mouse leydig cells through CRF receptor-1. *Endocrinology* 1998; 139:651-658
87. Rivier CL. Urocortin 1 inhibits rat leydig cell function. *Endocrinology* 2008; 149:6425-6432
88. Chen A, Blount A, Vaughan J, Brar B, Vale W. Urocortin II gene is highly expressed in mouse skin and skeletal muscle tissues: localization, basal expression in corticotropin-releasing factor receptor (CRFR) 1- and CRFR2-null mice, and regulation by glucocorticoids. *Endocrinology* 2004; 145:2445-2457
89. Lee S, Braden B, Kang SS, Rivier C. Urocortins are present in the rat testis. *Neuropeptides* 2011; 45:131-137
90. Sternberg N, Sauer B, Hoess R, Abremski K. Bacteriophage P1 cre gene and its regulatory region. Evidence for multiple promoters and for regulation by DNA methylation. *Journal of molecular biology* 1986; 187:197-212
91. Kos CH. Cre/loxP system for generating tissue-specific knockout mouse models. *Nutrition reviews* 2004; 62:243-246
92. Spyroglou A, Riester A, Mueller-Peltzer K, Lu A, Rohde J, Hantel C, Kuehne C, Kulle A, Riepe F, Deussing JM, Beuschlein F. Adrenal and Ovarian Phenotype of a Tissue-

- Specific Urocortin 2-Overexpressing Mouse Model. *Endocrinology* 2015; 156:2646-2656
93. Soriano P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* 1999; 21:70-71
 94. Hasegawa Y, Daitoku Y, Sekiguchi K, Tanimoto Y, Mizuno-Iijima S, Mizuno S, Kajiwara N, Ema M, Miwa Y, Mekada K, Yoshiki A, Takahashi S, Sugiyama F, Yagami K. Novel ROSA26 Cre-reporter knock-in C57BL/6N mice exhibiting green emission before and red emission after Cre-mediated recombination. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science* 2013; 62:295-304
 95. Chen CM, Krohn J, Bhattacharya S, Davies B. A comparison of exogenous promoter activity at the ROSA26 locus using a PhiC31 integrase mediated cassette exchange approach in mouse ES cells. *PLoS one* 2011; 6:e23376
 96. Riester A. Urocortin-abhängige Effekte auf die Struktur und Funktion der Nebenniere in vivo. München, Ludwig-Maximilians-Universität; 2013.
 97. Bingham NC, Verma-Kurvari S, Parada LF, Parker KL. Development of a steroidogenic factor 1/Cre transgenic mouse line. *Genesis (New York, NY : 2000)* 2006; 44:419-424
 98. Rhode J. Generierung und Charakterisierung einer konditionalen Urocortin 2 überexprimierenden Mauslinie. München, Technische Universität; 2007.
 99. Kulle AE, Welzel M, Holterhus PM, Riepe FG. Principles and clinical applications of liquid chromatography - tandem mass spectrometry for the determination of adrenal and gonadal steroid hormones. *Journal of endocrinological investigation* 2011; 34:702-708
 100. Kulle AE, Welzel M, Holterhus PM, Riepe FG. Implementation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for eight adrenal C-21 steroids and pediatric reference data. *Hormone research in paediatrics* 2013; 79:22-31
 101. Kulle AE, Riepe FG, Melchior D, Hiort O, Holterhus PM. A novel ultrahigh pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of androstenedione, testosterone, and dihydrotestosterone in pediatric blood samples: age- and sex-specific reference data. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95:2399-2409
 102. Nemoto T, Iwasaki-Sekino A, Yamauchi N, Shibasaki T. Role of urocortin 2 secreted by the pituitary in the stress-induced suppression of luteinizing hormone secretion in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 299:E567-575
 103. Chalmers DT, Lovenberg TW, De Souza EB. Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1995; 15:6340-6350
 104. Chen P, Hover CV, Lindberg D, Li C. Central urocortin 3 and type 2 corticotropin-releasing factor receptor in the regulation of energy homeostasis: critical involvement of the ventromedial hypothalamus. *Frontiers in endocrinology* 2012; 3:180
 105. Van Pett K, Viau V, Bittencourt JC, Chan RK, Li HY, Arias C, Prins GS, Perrin M, Vale W, Sawchenko PE. Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *The Journal of comparative neurology* 2000; 428:191-212
 106. Kageyama K, Li C, Vale WW. Corticotropin-releasing factor receptor type 2 messenger ribonucleic acid in rat pituitary: localization and regulation by immune challenge, restraint stress, and glucocorticoids. *Endocrinology* 2003; 144:1524-1532
 107. Yamauchi N, Otagiri A, Nemoto T, Sekino A, Oono H, Kato I, Yanaihara C, Shibasaki T. Distribution of urocortin 2 in various tissues of the rat. *J Neuroendocrinol* 2005; 17:656-663
 108. Nemoto T, Yamauchi N, Shibasaki T. Novel action of pituitary urocortin 2 in the regulation of expression and secretion of gonadotropins. *J Endocrinol* 2009; 201:105-114

109. Nemoto T, Iwasaki-Sekino A, Yamauchi N, Shibasaki T. Regulation of the expression and secretion of urocortin 2 in rat pituitary. *J Endocrinol* 2007; 192:443-452
110. Baigent SM, Lowry PJ. mRNA expression profiles for corticotrophin-releasing factor (CRF), urocortin, CRF receptors and CRF-binding protein in peripheral rat tissues. *J Mol Endocrinol* 2000; 25:43-52
111. Okamoto S, Ishikawa I, Kimura K, Saito M. Potent suppressive effects of urocortin on splenic lymphocyte activity in rats. *Neuroreport* 1998; 9:4035-4039
112. Fukuda T, Takahashi K, Suzuki T, Saruta M, Watanabe M, Nakata T, Sasano H. Urocortin 1, urocortin 3/stresscopin, and corticotropin-releasing factor receptors in human adrenal and its disorders. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:4671-4678
113. Tsatsanis C, Dermitzaki E, Venihaki M, Chatzaki E, Minas V, Gravanis A, Margioris AN. The corticotropin-releasing factor (CRF) family of peptides as local modulators of adrenal function. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2007; 64:1638-1655
114. Chen A, Vaughan J, Vale WW. Glucocorticoids regulate the expression of the mouse urocortin II gene: a putative connection between the corticotropin-releasing factor receptor pathways. *Mol Endocrinol* 2003; 17:1622-1639
115. Chen MD, O'Byrne KT, Chiappini SE, Hotchkiss J, Knobil E. Hypoglycemic 'stress' and gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the rhesus monkey: role of the ovary. *Neuroendocrinology* 1992; 56:666-673
116. Handa RJ, Burgess LH, Kerr JE, O'Keefe JA. Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Horm Behav* 1994; 28:464-476
117. Kalantaridou SN, Makrigiannakis A, Zoumakis E, Chrousos GP. Stress and the female reproductive system. *J Reprod Immunol* 2004; 62:61-68
118. Sadovsky Y, Crawford PA. Developmental and physiologic roles of the nuclear receptor steroidogenic factor-1 in the reproductive system. *J Soc Gynecol Investig* 1998; 5:6-12
119. Florio P, Vale W, Petraglia F. Urocortins in human reproduction. *Peptides* 2004; 25:1751-1757
120. Calogero AE, Burrello N, Negri-Cesi P, Papale L, Palumbo MA, Cianci A, Sanfilippo S, D'Agata R. Effects of corticotropin-releasing hormone on ovarian estrogen production in vitro. *Endocrinology* 1996; 137:4161-4166
121. Watanabe K, Nemoto T, Akira S, Takeshita T, Shibasaki T. Estrogens downregulate urocortin 2 expression in rat uterus. *J Endocrinol* 2013; 219:269-278
122. Erden HF, Zwain IH, Asakura H, Yen SS. Corticotropin-releasing factor inhibits luteinizing hormone-stimulated P450c17 gene expression and androgen production by isolated thecal cells of human ovarian follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:448-452
123. Bogovich K, Richards JS. Androgen biosynthesis in developing ovarian follicles: evidence that luteinizing hormone regulates thecal 17 alpha-hydroxylase and C17-20-lyase activities. *Endocrinology* 1982; 111:1201-1208
124. Hedin L, Rodgers RJ, Simpson ER, Richards JS. Changes in content of cytochrome P450(17)alpha, cytochrome P450scc, and 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in developing rat ovarian follicles and corpora lutea: correlation with theca cell steroidogenesis. *Biol Reprod* 1987; 37:211-223
125. Clark BJ, Soo SC, Caron KM, Ikeda Y, Parker KL, Stocco DM. Hormonal and developmental regulation of the steroidogenic acute regulatory protein. *Mol Endocrinol* 1995; 9:1346-1355
126. Clark BJ, Stocco DM. Expression of the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein: a novel LH-induced mitochondrial protein required for the acute regulation of steroidogenesis in mouse Leydig tumor cells. *Endocrine research* 1995; 21:243-257
127. Simpson ER, Waterman MR. Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH. *Annual review of physiology* 1988; 50:427-440

128. Ronen-Fuhrmann T, Timberg R, King SR, Hales KH, Hales DB, Stocco DM, Orly J. Spatio-temporal expression patterns of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology* 1998; 139:303-315
129. Toaff ME, Strauss JF, 3rd, Hammond JM. Regulation of cytochrome P-450_{scc} in immature porcine granulosa cells by FSH and estradiol. *Endocrinology* 1983; 112:1156-1158
130. deMoura MD, Choi D, Adashi EY, Payne DW. Insulin-like growth factor-I-mediated amplification of follicle-stimulating hormone-supported progesterone accumulation by cultured rat granulosa cells: enhancement of steroidogenic enzyme activity and expression. *Biol Reprod* 1997; 56:946-953
131. Funkenstein B, Waterman MR, Masters BS, Simpson ER. Evidence for the presence of cholesterol side chain cleavage cytochrome P-450 and adrenodoxin in fresh granulosa cells. Effects of follicle-stimulating hormone and cyclic AMP on cholesterol side chain cleavage cytochrome P-450 synthesis and activity. *J Biol Chem* 1983; 258:10187-10191
132. Pelletier G, Li S, Luu-The V, Tremblay Y, Belanger A, Labrie F. Immunoelectron microscopic localization of three key steroidogenic enzymes (cytochrome P450_{scc}), 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and cytochrome P450_{c17}) in rat adrenal cortex and gonads. *J Endocrinol* 2001; 171:373-383
133. Yata A, Nakabayashi K, Wakahashi S, Maruo N, Ohara N, Maruo T. Suppression of progesterone production by stresscopin/urocortin 3 in cultured human granulosa-lutein cells. *Hum Reprod* 2009; 24:1748-1753
134. Lavoie HA, King SR. Transcriptional regulation of steroidogenic genes: STARD1, CYP11A1 and HSD3B. *Experimental biology and medicine* (Maywood, NJ) 2009; 234:880-907
135. Eimerl S, Orly J. Regulation of steroidogenic genes by insulin-like growth factor-1 and follicle-stimulating hormone: differential responses of cytochrome P450 side-chain cleavage, steroidogenic acute regulatory protein, and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase in rat granulosa cells. *Biol Reprod* 2002; 67:900-910
136. Peltoketo H, Nokelainen P, Piao YS, Vihko R, Vihko P. Two 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases (17HSDs) of estradiol biosynthesis: 17HSD type 1 and type 7. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999; 69:431-439
137. Rivier C, Rivier J, Vale W. Stress-induced inhibition of reproductive functions: role of endogenous corticotropin-releasing factor. *Science* 1986; 231:607-609
138. Li XF, Bowe JE, Kinsey-Jones JS, Brain SD, Lightman SL, O'Byrne KT. Differential role of corticotrophin-releasing factor receptor types 1 and 2 in stress-induced suppression of pulsatile luteinising hormone secretion in the female rat. *J Neuroendocrinol* 2006; 18:602-610
139. Mastorakos G, Scopa CD, Vryonidou A, Friedman TC, Kattis D, Phenekos C, Merino MJ, Chrousos GP. Presence of immunoreactive corticotropin-releasing hormone in normal and polycystic human ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79:1191-1197
140. Temur M, Yilmaz O, Aksun S, Ozun Ozbay P, Calan M, Kume T, Karakulak M, Korkmaz HA. Increased circulating urocortin-3 levels is associated with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2016; 32:218-222
141. Squillacioti C, De Luca A, Liguori G, Ali S, Germano G, Vassalotti G, Navas L, Mirabella N. Urocortinergic system in the testes of normal and cryptorchid dogs. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* 2016;
142. Menon KM, Menon B. Structure, function and regulation of gonadotropin receptors - a perspective. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 356:88-97
143. Deussing JM, Breu J, Kuhne C, Kallnik M, Bunck M, Glasl L, Yen YC, Schmidt MV, Zurmuhlen R, Vogl AM, Gailus-Durner V, Fuchs H, Holter SM, Wotjak CT, Landgraf R, de Angelis MH, Holsboer F, Wurst W. Urocortin 3 modulates social discrimination

- abilities via corticotropin-releasing hormone receptor type 2. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2010; 30:9103-9116
144. Tabarin A, Diz-Chaves Y, Consoli D, Monsaingeon M, Bale TL, Culler MD, Datta R, Drago F, Vale WW, Koob GF, Zorrilla EP, Contarino A. Role of the corticotropin-releasing factor receptor type 2 in the control of food intake in mice: a meal pattern analysis. *The European journal of neuroscience* 2007; 26:2303-2314
 145. Chen A, Zorrilla E, Smith S, Rousso D, Levy C, Vaughan J, Donaldson C, Roberts A, Lee KF, Vale W. Urocortin 2-deficient mice exhibit gender-specific alterations in circadian hypothalamus-pituitary-adrenal axis and depressive-like behavior. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2006; 26:5500-5510
 146. Rivier C, Rivest S. Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. *Biol Reprod* 1991; 45:523-532
 147. Petraglia F, Sutton S, Vale W, Plotsky P. Corticotropin-releasing factor decreases plasma luteinizing hormone levels in female rats by inhibiting gonadotropin-releasing hormone release into hypophysial-portal circulation. *Endocrinology* 1987; 120:1083-1088
 148. Burgess LH, Handa RJ. Chronic estrogen-induced alterations in adrenocorticotropin and corticosterone secretion, and glucocorticoid receptor-mediated functions in female rats. *Endocrinology* 1992; 131:1261-1269
 149. Bingaman EW, Magnuson DJ, Gray TS, Handa RJ. Androgen inhibits the increases in hypothalamic corticotropin-releasing hormone (CRH) and CRH-immunoreactivity following gonadectomy. *Neuroendocrinology* 1994; 59:228-234
 150. Handa RJ, Nunley KM, Lorens SA, Louie JP, McGivern RF, Bollnow MR. Androgen regulation of adrenocorticotropin and corticosterone secretion in the male rat following novelty and foot shock stressors. *Physiology & behavior* 1994; 55:117-124
 151. Handa RJ, Weiser MJ. Gonadal steroid hormones and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Frontiers in neuroendocrinology* 2014; 35:197-220
 152. Li XF, Mitchell JC, Wood S, Coen CW, Lightman SL, O'Byrne KT. The effect of oestradiol and progesterone on hypoglycaemic stress-induced suppression of pulsatile luteinizing hormone release and on corticotropin-releasing hormone mRNA expression in the rat. *J Neuroendocrinol* 2003; 15:468-476
 153. Weiser MJ, Handa RJ. Estrogen impairs glucocorticoid dependent negative feedback on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis via estrogen receptor alpha within the hypothalamus. *Neuroscience* 2009; 159:883-895
 154. Wan R, Jin L, Zhu C, Liu Y, Li L, Guo R, Li S. Sex difference in urocortin production is contributory to the gender disparity in a rat model of vasculitis induced by sodium laurate. *Endocrinology* 2013; 154:4663-4674
 155. Wan R, Zhu C, Guo R, Jin L, Liu Y, Li L, Zhang H, Li S. Dihydrotestosterone alters urocortin levels in human umbilical vein endothelial cells. *J Endocrinol* 2013; 218:321-330
 156. Haeger P, Andres ME, Forray MI, Daza C, Araneda S, Gysling K. Estrogen receptors alpha and beta differentially regulate the transcriptional activity of the Urocortin gene. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2006; 26:4908-4916
 157. Breu J, Touma C, Holter SM, Knapman A, Wurst W, Deussing JM. Urocortin 2 modulates aspects of social behaviour in mice. *Behavioural brain research* 2012; 233:331-336

7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Komplementäre DNA
Cre	cyclization recombination
CREB	cAMP-response element-binding protein
CRF	Corticotropin-releasing factor
CRF _{1/2}	Corticotropin-releasing factor Rezeptor Typ 1/2
Cyp	Cytochrom P450
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
et al.	und andere (et alii)
FSH	Follikel-stimulierende Hormon
FSH-R	Follikel-stimulierende Hormon Rezeptor
fwd	forward
GnRH	Gonadotropin-releasing Hormon

GZ	Granulosazellen
HE	Hämatotoxylin-Eosin
hCG	humanes Choriongonadotropin
HHG-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse
HHN-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
hpf	High power field, hier definiert als Übersichtsaufnahme in 5-facher Vergrößerung
Hsd	Hydroxysteroid-Dehydrogenasen
kD	Kilodalton
LH	Luteinisierende Hormon
LH-R	Luteinisierende Hormon Rezeptor
M	Molar
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger ribonuclein acid
OE	overexpressing
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKA	Proteinkinase A
rev	reverse
rtPCR	Real-time Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
StAR	Steroidogenic Acute Regulatory Protein

SF1	Steroidogenic Factor 1
Tab.	Tabelle
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	TRIS-EDTA-Puffer
TNES-Puffer	TRIS-Natriumchlorid-EDTA-SDS-Puffer
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Ucn	Urocortin
vs.	versus
ZNS	Zentrales Nervensystem

8 Danksagung

Mein ganz herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Felix Beuschlein für die Möglichkeit diese Doktorarbeit durchzuführen und für die spannende Fragestellung dieser Arbeit. Ganz besonders möchte ich mich auch bei ihm dafür bedanken, dass er mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützte. Ferner möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken am Kongress der DGE und YARE-Meeting (Young Active Research in Endocrinology) teilzunehmen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Martin Reincke für die Möglichkeit meine Doktorarbeit an der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV der Ludwig-Maximilians-Universität München durchzuführen.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Frau Dr. Ariadni Spyroglou bedanken, die mich während der Zeit im Labor und danach mit viel Einsatz betreut hat. Bei Fragen hatte sie immer ein offenes Ohr für mich. Danke für deine positive Energie, für deine Motivation und Unterstützung.

Auch bei Herrn Dr. Jan Deussing des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie in München und bei Herrn Professor Dr. Felix Riepe und Frau Dr. Alexandra Kulle des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein – Klinik für Allgemeine Pädiatrie in Kiel möchte ich mich herzlich für die Unterstützung bedanken.

Bei Brigitte Mauracher und Igor Shapiro möchte ich mich ganz herzlich für die ausführliche Einarbeitung in die Labortechniken und die Mausezucht sowie für all die Unterstützung und Hilfestellung bedanken: vom Troubleshooting bis hin zur Materialbestellung haben sie sich den verschiedensten Problemen angenommen und ihre Unterstützung angeboten. Ein ganz großes Dankeschön dafür. Außerdem möchte ich mich bei Herrn Robert Weinberger und Herrn Klaus Weinberger für die großartige Unterstützung und Arbeit im Tierstall bedanken.

Mein Dank gilt auch meinen Laborkollegen für die gemeinsame Zeit und die gute Zusammenarbeit. In besonderer Form möchte ich mich hierbei auch bei Frau Dr. Constanze Hantel bedanken, die mich bei der Vorbereitung von Vorträgen und Postern mit viel Einsatz unterstützt hat.

Ein großes Dankeschön für die Durchsicht dieses Dokumentes an meine Freundin Teresa Schuster und meine Mutter.

Von ganzem Herzen möchte ich mich natürlich auch bei meiner Familie und meinem Freund bedanken, die mich über die gesamte Zeit unterstützt und motiviert haben und mir so die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglicht haben. Ich danke euch für die aufmunternden Worte, für die Geduld und den Glauben an mich. Danke.

9 Veröffentlichungen

9.1 Publikationen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen in der Fachzeitschrift *Endocrinology* vorgestellt und veröffentlicht:

Spyroglou A, Riester A, Mueller-Peltzer K, Lu A, Rohde J, Hantel C, Kuehne C, Kulle A, Riepe F, Deussing JM, Beuschlein F. Adrenal and ovarian phenotype of a tissue-specific Urocortin 2-overexpressing mouse model. *Endocrinology*. 2015;156(7):2646-56.

9.2 Vorträge

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen auf folgenden Kongressen vorgestellt und als Abstracts veröffentlicht:

Mueller-Peltzer K, Spyroglou A, Hill A, Deussing J, Beuschlein F. *In vivo* effects of SF-1 dependent Urocortin 2 overexpression on the gonads. 13th Young Active Research in Endocrinology. 2011. Stockholm.

Spyroglou A, Hill A, Mueller-Peltzer K, Deussing J, Beuschlein F. Site specific overexpression of Urocortin 2 results in modulation of steroidogenesis *in vivo*. European Congress of Endocrinology. 2011. Rotterdam.

Spyroglou A, Hill A, Mueller-Peltzer K, Deussing J, Beuschlein F. Site specific overexpression of Urocortin 2 results in modulation of steroidogenesis *in vivo*. 54. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie. 2011. Hamburg.

9.3 Poster

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen auf folgenden Kongressen als Poster vorgestellt und als Abstract veröffentlicht:

Mueller-Peltzer K, Spyroglou A, Riester A, Deussing J, Beuschlein F. *In vivo* effects of SF-1 dependent Urocortin 2 overexpression on gonadal morphology and function. 55. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie. 2012. Mannheim.

Spyroglou A, Hill A, Mueller-Peltzer K, Deussing J, Beuschlein F. Site specific overexpression of Urocortin 2 results in modulation of steroidogenesis *in vivo*. ENDO 2011 – The 93rd Annual Meeting of The Endocrine Society. 2011. Boston.

10 Eidesstattliche Versicherung

Müller-Peltzer, Katharina, Cornelia, Julia, Desirée

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Urocortin 2 Überexpressionsmodell der Maus und die Auswirkungen auf die Morphologie und Funktion der Gonaden

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 18.05.2017

Katharina Müller-Peltzer