

Aus dem
Institut für Tieranatomie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Tieranatomie II
Vorstand: Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz

Angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Fred Sinowatz

Genexpression während der Follikulogenese bei den Haussäugetieren
Eine Literaturstudie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Philipa Panchaud
aus
Mülheim/Ruhr

München, 2008

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun
Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. Sinowatz
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Zerbe

Tag der Promotion: 18. Juli 2008

Ich widme diese Dissertation meinem Sohn Constantin

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	I
II.	Liste der Abkürzungen.....	V
1	Einleitung.....	1
2	Follikulogenese.....	3
2.1	Embryologie.....	3
2.1.1	Primordiale Keimzellen: Entstehung und Wanderung zu den Keimdrüsen	3
2.1.2	Frühe Bildung der Gonaden.....	5
2.1.3	Differenzierung des Ovars	6
2.1.4	Bildung der Primordialfollikel.....	6
2.2	Oogenese.....	9
2.3	Postnatale Follikulogenese	14
2.4	Einteilung der Follikulogenese	18
2.4.1	Initiale Rekrutierung	18
2.4.2	Zyklische Rekrutierung.....	21
2.4.3	Selektion	24
2.4.4	Follikeldominanz	30
2.4.5	Zyklischer Verlauf der Follikelentwicklung.....	31
2.4.6	Tierartliche Unterschiede.....	32
2.5	Tabelle Follikelgröße.....	33
3	Endokrine Faktoren der Follikulogenese	34
3.1	Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH)	34
3.1.1	Struktur von GnRH.....	34
3.1.2	Biosynthese und Sekretion von GnRH	36
3.1.3	Gonadotropin-releasing Hormone Rezeptor (GnRH-R).....	40
3.1.4	GnRH-induzierte Genexpression.....	41
3.2	Follikel Stimulierendes Hormon (FSH).....	42
3.2.1	FSH-Struktur.....	43
3.2.2	FSH-Expression	44
3.2.3	Der FSH-Rezeptor (FSH-R) und seine Signaltransduktion.....	49
3.2.4	FSH-induzierte Genexpression	53
3.2.5	Rolle von FSH in der Follikulogenese.....	55

3.3	Luteinisierendes Hormon (LH), Struktur und Expression.....	57
3.3.1	Luteinisierendes Hormon Rezeptor (LH-R) und seine Signaltransduktion.....	59
3.3.2	Rolle von LH in der Follikulogenese und LH-induzierte Genexpression	66
4	Schlüsselenzyme der Steroidgenese	69
4.1	Steroidogenic acute Regulatory Protein (StAR).....	69
4.2	P450 side chain cleavage (P450scc).....	71
4.3	3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (3 β -HSD).....	73
4.4	Cytochrom P450 17-alpha-Hydroxylase (P450c17, 17 α -OH).....	74
4.5	P450 Aromatase (P450arom).....	76
5	Activin, Inhibin und Follistatin.....	79
5.1	Die Activin-Wirkung.....	81
5.1.1	Die autokrinen/ parakrinen Wirkungen am Ovar	81
5.1.2	Die Wirkungen an der Hypophyse.....	84
5.2	Die Activin-Expression.....	85
5.2.1	Die ovarielle Expression von Activin.....	86
5.2.2	Hypophysäre Expression von Activin	87
5.3	Der Activin-Rezeptor.....	89
5.3.1	Die Expression des Activin Rezeptors in der Hypophyse	90
5.3.2	Die Expression des Activin-Rezeptors im Follikel.....	91
5.4	Inhibin.....	94
5.4.1	Die hypophysäre Expression von Inhibin.....	96
5.4.2	Die gonadale Expression von Inhibin.....	97
5.5	Der Inhibin Rezeptor	99
5.6	Follistatin	102
5.6.1	Struktur von Follistatin und gonadale Expression.....	102
5.6.2	Die Wirkung von Follistatin	107
5.7	Die hypophysäre Expression von Follistatin	107
5.8	Der Follistatin-Rezeptor	108
6	Steroidhormone.....	109
6.1	Progesteron (P)	109
6.2	Progesteron-Rezeptor (PR).....	110
6.3	Androgene.....	113
6.4	Androgen Rezeptor (AR).....	113

6.5	Östrogen (E) und der Östrogenrezeptor (ER).....	114
6.6	Wirkung der Östrogene.....	116
7	Lokale Wachstumsregulatoren, Faktoren der Follikulogenese.....	118
7.1	Allgemein.....	118
7.2	Kit Ligand und der c-Kit Rezeptor	119
7.2.1	Allgemein.....	119
7.2.2	Struktur von Kit Ligand.....	119
7.2.3	Der c-Kit Rezeptor.....	120
7.2.4	Die Expression von KL und c-Kit im Ovar	121
7.2.5	Funktionen und Wirkungen von KL und c-Kit.....	124
7.3	Hepatocyte growth factor, HGF.....	129
7.3.1	Hepatocyte growth factor, HGF, Struktur und Funktion.....	129
7.3.2	HGFR.....	130
7.3.3	Aktivatoren und Inhibitoren von HGF.....	131
7.4	Keratinocyte growth factor (KGF)	132
7.5	Fibroblast growth factor Familie	135
7.5.1	Fibroblast growth factor (FGF).....	135
7.5.2	Fibroblast growth factor 1.....	136
7.5.3	Fibroblast growth factor 2.....	136
7.6	TGF- β -Superfamilie	137
7.6.1	Einleitung TGF- β -Familie	137
7.6.2	BMP-2.....	142
7.6.3	BMP-4.....	144
7.6.4	Bone morphogenetic protein 6 (BMP-6)	146
7.6.5	Bone morphogenetic protein 7 (BMP-7)	148
7.6.6	Bone morphogenetic protein 8b (BMP-8b)	150
7.6.7	Growth differentiation factor 9 (GDF-9)	151
7.6.8	GDF-9-Rezeptor	155
7.6.9	Bone morphogenetic protein 15 (BMP-15)	156
7.6.10	TGF β	161
7.6.11	Anti-Muellerian hormone oder Muellerian inhibing substance (AMH/MIS)	165
7.7	Epidermal growth factor (EGF).....	168
7.7.1	Familie (EGF-Familie)	168

7.7.2	EGF im Ovar.....	168
7.7.3	EGF-Rezeptor Expression (EGF-R).....	170
7.7.4	EGF-like Growth factors	171
7.7.5	Transforming Growth Factor α (TGF- α)	172
7.8	Insulin-like growth factor-System, IGF-System.....	174
7.8.1	IGF-System.....	174
7.8.2	IGF-Rezeptor	174
7.8.3	IGF-Bindungsprotein (IGFBP).....	175
7.8.4	Expression von IGF I.....	176
7.8.5	Expression von IGF II.....	177
7.8.6	Wirkung der IGFs	177
7.8.7	IGF-Rezeptor-Expression	179
7.8.8	IGF-Bindungsprotein-1 (IGFBP-1)	180
7.8.9	IGF-Bindungsprotein-2 (IGFBP-2)	180
7.8.10	IGF-Bindungsprotein-4 (IGFBP-4)	181
7.8.11	IGF-Bindungsprotein-5 (IGFBP-5)	182
7.8.12	IGF-Bindungsprotein-6 (IGFBP-6)	182
7.8.13	IGF-Bindungsprotein-3 (IGFBP-3)	182
7.9	Growth Hormon oder Somatotropin (GH, STH) und sein Rezeptor GH-R	183
7.10	Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	185
7.10.1	Vaskulogenese und Angiogenese, ihre Bedeutung für die Follikelentwicklung .	185
7.10.2	VEGF-Familie	186
7.10.3	VEGF Expression	186
7.10.4	Funktion von VEGF.....	188
7.10.5	VEGF-Rezeptoren (VEGFR).....	189
7.10.6	Neuropilin-1 (NRP-1), Neuropilin-2 (NRP-2).....	190
8	Abschließende Betrachtung	191
9	Zusammenfassung.....	194
10	Summary	197
III.	Literaturverzeichnis	200

II. Liste der Abkürzungen

3 β -HSD	3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase
11 β -HSD1	11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 1
11 β -HSD2	11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 2
17 α -OH	P450 17 α -Hydroxylase
A	Androgen
AC	Adenylatzyklase
ACK2	c-Kit Antikörper
ActR	Activin Rezeptor
ActRIA	Activin Rezeptor Typ IA
ActRIB	Activin Rezeptor Typ IB
ActRIIA	Activin Rezeptor Typ IIA
ActRIIB	Activin Rezeptor Typ IIB
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
ALAS	Aminolevulinsäure-Synthase
ALK	Activin-Receptor like kinase
AMH	Anti-mullerisches Hormon
AP-1	Activating Protein 1
AR	Androgen Rezeptor
ARE	Androgen responsives Element
AREG	Amphiregulin
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asp	Aspartat
ATF-1	Activating transcription factor-1
Bax	Bcl-2 assoziiertes X Protein
Bcl-2	Apoptose Regulator Bcl-2
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BMP	Bone morphogenetic protein
BTC	Betacellulin
cAMP	Zyklisches Adenosin Monophosphat

CBP	CREB-bindendes Protein
CDK	Cyclin dependent kinase
Cdc	Cell division cycle
C/EBP α	CCAAT enhancer binding protein α
C/EBP	CCAAT enhancer binding protein β
CL	Corpus luteum
C.M.Pig	Chinese Meishian Pig
COC	Cumulus-Oozyten-Komplex
COX-2	Cyklooxigenase-2
CRE	cAMP responsive element
CREB	CRE-Bindungsprotein
CREM	cAMP responsive element modulator
CTGF	Connective tissue growth factor
CYB	Cyclin B
Cx43	Connexin 43
DAG	Diacylglycerol
DF	Dominanter Follikel
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPC	day post coitum
E	Östrogen
E2	Östradiol
eCG	Equines Choriogonadotropin
EGF	Epidermaler growth factor
EGFR	Epidermal growth factor Rezeptor
EPR	Epiregulin
ER	Östrogen Rezeptor
ER α	Östrogen Rezeptor α
ER β	Östrogen Rezeptor β
ErbB	Epidermal growth factor Rezeptor
ERE	Estrogen responsive element
ERG-1	early growth response site-1
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
FAS	Apoptosis-mediating surface antigen

FF	Folikelflüssigkeit
FF-MAS	Follicle fluid mitogen activating sterol
FGF	Fibroblast growth factor
FGFR	FGF Rezeptor
FIGLA	Fig in the germlie α
Flt	Fms-like Tyrosin Kinase
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
Fst	Follistatin
FS-Zellen	Folikulostelläre Zellen
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GAP	GnRH activating peptide
GC	Granulosazellen
GDF-9	Growth differentiation factor 9
GDP	Guanosindiphosphat
GH	Growth hormone
GHR	Growth hormone Receptor
GHRH	GnRH releasing hormone
GJ	Gap Junction
GnRH	Gonadotropin releasing hormone
GnRHR	GnRH Rezeptor
GPCR	G-Protein assoziierter Rezeptor
GRAS	GnRH-R activating sequence
GTP	Guanosintriphosphat
GZ	Gonadotrope Zellen
HAS-2	Hyaluronsäure Synthetase-2
HB-EGF	Heparin bindender EGF-ähnlicher Wachstumsfaktor
hCG	Humanes Choriongonadotropin
HER	Epidermal growth factor Rezeptor
HGF	Hepatocyte growth factor
HGFA	HGF Aktivator
HGFR	HGF Rezeptor
HIS	Histidin
HLGAG	Heparin-like Glykosaminoglykan

IGF	Insulin-like growth factor
IGFBP	IGF-binding protein
IGF-R	IGF Rezeptor
Il-1 β	Interleukin 1 β
Il-4	Interleukin 4
Il-6	Interleukin 6
InhBP	Inhibin bindendes Protein
IP3	Inositol Triphosphat
JAK	Janus-kinase
Kg	Kilogramm
KGF	Keratinocyte growth factor
KGFR	KGF Rezeptor
KO	Knock-out
KL	Kit ligand
LH	Luteotropes Hormon
LHR	LH Rezeptor
LIF	Leukemia inhibiting factor
Lys	Lysin
M6P	Manose-6-Phosphat
MAPK	Mitogen activating protein kinase
M-CSF	Macrophage colony stimulating Factor
MIS	Muellerian Inhibiting Substance
MO	Monooxygenase
MPF	Maturation promoting factor
NAB	Ngfi-A Bindungsprotein
NGF	Nerve growth factor
NGFI	Nerve growth factor inducible
NOBOX	Newborn homeobox gene
NOS	Stickstoffmonoxyd-Synthase
NRP-1, -2	Neuropilin-1, -2
NRG	Neuregulin
NYP	Neuropeptid Y
Oct-4	Octamer-4

Ooc	Oocyte
P21	P21 Kinase
P27	P27 Kinase
P38	p38 Proteinkinase
P450arom	P450 Aromatase
P450c17	Cytochrom P450 17 α -Hydroxylase
P450scc	P450 side-chain cleavage
P	Progesteron
PACAP	Pituitary adenylat cyclase activating peptide
PAPP-A	Pregnancy associated plasma protein A
PCOS	Polycystic ovarial Syndrom
Pc	Post coitum
PDGF	Platelet-derived growth factor
PGC	Primordial germ cells
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGF ₂	Prostaglandin F ₂
PIP3	Phosphatidylinositol-triphosphat
PI3K	Phosphatidylinositol 3 Kinase
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
p.n.	post natum
PR	Progesteron Rezeptor
PRA	Progesteron Rezeptor A
PRB	Progesteron Rezeptor B
PRIF	Primärfollikel
PRGS2	Prostaglandin Synthase 2
PRL	Prolaktin
PROF	Primordialfollikel
Ptx	Pituitary homeobox 1
RGS-2	Regulator of G-Protein Signaling-2
SCF	Stem cell factor
SDF	Subdominanter Follikel

SER	Serin
SF-1	Steroidogenic factor 1
Sf-1	Splicing factor 1
Sp1	Specificity protein 1
SP	Substanz P
StAR	Steroid acute regulatory protein
T	Tage
TT	Trächtigkeitstage
TC	Thekazellen
TGF α	Transforming growth factor alpha
TGF β	Transforming growth factor beta
TI	Theca interna
TE	Theca externa
tnfaip6	TNF- α induced Protein 6
TNF α	Tumor nekrose faktor α
TRP	Tryptophan
TSG-6	Tumornekrosefaktor α induziertes Protein 6
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
TSRH	TSH Rezeptor
Typ I R	Typ I Rezeptor
Typ II R	Typ II Rezeptor
uPA	Urokinase plasminogen activator
VEGF	Vascular endothelial growth hormone
VEGFR	VEGF Rezeptor
Wdk	Wiederkäuer

1 Einleitung

Die Follikulogenese oder Entwicklung der Follikel ist ein komplexer Prozess, welcher für die Reproduktion von sehr großer Bedeutung ist. Aber sie ist auch sehr anfällig für Störungen. Die Follikulogenese findet in der Rindenschicht (Zona parenchymatosa) des Ovars statt. Diese liegt, außer beim Pferd, um die Zona vasculosa, welche die gefässreiche Schicht darstellt. Beim Pferd umgibt die Zona vasculosa die Zona parenchymatosa. Lediglich an der Fossa ovarii erreicht die Zona parenchymatosa beim Pferd noch die Oberfläche.

Die Follikel bestehen aus mehreren Elementen. Sie bestehen aus einer Eizelle und aus den sie umgebenden Follikelzellen. Diese Elemente durchlaufen jeweils eine spezifische Entwicklung. Dazu gehören Rekrutierung, Proliferation sowie Differenzierung. Der Follikel entwickelt sich währenddessen von einem Primordialfollikel über Primär-, Sekundär-, und Tertiärfollikel zum Graaf Follikel. Der Graaf Follikel ist sprungreif und entlässt dann das befruchtungsfähige Ei.

Die Entwicklung der Follikel wird von vielen Faktoren beeinflusst. Darunter befinden sich Hormone, Steroide, Wachstumsfaktoren sowie viele weitere Faktoren. Diese Faktoren werden zum Teil endokrin dem Follikel zugeführt. Aber ein bedeutender Teil wird auch von den Follikeln selbst produziert. Diese Produktion der Follikel findet in den verschiedenen Kompartimenten des Follikels und zu verschiedenen Zeitpunkten während der Entwicklung der Follikel statt. Die Faktoren, die von einem Kompartiment exprimiert werden, beeinflussen meistens entweder das Kompartiment selbst oder angrenzende Kompartimente.

Dadurch finden während der Entwicklung der Follikel zahlreiche Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Kompartimenten statt.

In den folgenden Kapiteln wird auf die Entwicklung der Follikel eingegangen. Ein besonderes Augenmerk soll hier auf die Expression der verschiedenen Faktoren im Laufe der Follikulogenese gerichtet werden. Es wird hierbei insbesondere auf die folgenden Tierarten eingegangen: Maus, Ratte, Schaf, Rind und Schwein.

Die Selektion der oben erwähnten Tierarten (Siehe Tabelle 1.1) ermöglicht einen Einblick in mono- sowie polyovulatorische Tierarten. Die hier berücksichtigten Tiere sind zum Großteil asaisonal. Eine Ausnahme bildet hier das Schaf. Bei diesem Tier stellt die Veränderung der Tageslichtlänge einen zentralen Stimulus dar.

Alle hier berücksichtigten Tierarten ovulieren spontan.

Ein wesentlicher Unterschied besteht bei Ratte und Maus gegenüber Schaf, Rind und Schwein. Sie weisen einen verkürzten Zyklus auf und es findet keine vollständige Lutealphase statt. Um die Lutealphase einzuleiten ist eine Mindestzahl von Intromissionen (Paarungen) nötig. Ratten ovulieren zwar spontan, brauchen aber die Kopulation um eine Lutealphase zu durchlaufen (Amelang D., 1983). Durch den Paarungsstimulus wird der Hormonstatus verändert und die Konzeptionsbedingung verbessert.

Diese Studie ist eine umfangreiche Darstellung und Zusammenfassung der bis heute gefundenen Ergebnisse. In den letzten Jahren hat sich mehr und mehr herauskristallisiert, dass die Wechselwirkungen zwischen den beteiligten Faktoren ein sehr wenig verstandenes Feld ist, in dem noch viele Fragen ungeklärt sind. Diese Studie weist auf tierartliche Unterschiede hin und zeichnet somit ebenfalls die Grenzen des heutigen Wissens ab, welche sich vielleicht in der Zukunft weiter verschieben.

Tabelle 1.1

Tierart	Brunstzyklus	Geschlechtsreife	Zyklusdauer	Trächtigkeitsdauer	Anzahl der Nachkommen
Maus (Allan E.V., 1922)	Polyöstrisch	~38 T	4-6 T	~24 T	4-8
Ratte (Moore D.M., 1990)	Polyöstrisch	40-70 T	4-6 T	20-24 T	7-14
Schaf	Polyöstrisch saisonal (Herbst), auch ganzjährig möglich *	~5-10 Monate	16-17 T	145-150 T	1-2 (selten mehr)
Rind	Polyöstrisch asaisonal	~4-9 Monate	21 T	~ 280 T (9 Monate)	i.d.R. 1
Schwein	Polyöstrisch asaisonal	~ 5-8 Monate Oder ~120 Kg	21 (+/- 3) T	~115 T (3 Monate, 3 Wochen, 3 Tage)	

Abkürzungen:

T: Tage; Kg: Kilogramm; i.d.R.: in der Regel

* einige Rassen oder im warmen Klima ganzjährig, Z.B.: Merino- und Bergschafe

2 Follikulogenese

2.1 Embryologie

2.1.1 Primordiale Keimzellen: Entstehung und Wanderung zu den Keimdrüsen

Die embryologische Entwicklung der Follikel beginnt mit der Entstehung der Primordialkeimzellen oder Primordial Germ Cells (PGC). Diese stammen bei den Haussäugetieren aus dem Ektoderm (Lawson und Hage, 1994) und wandern anschließend in das Entoderm des Dottersacks. Dort proliferieren sie und migrieren über den Dottersack und das dorsale Gekröse des Enddarms zu den Keimdrüsenanlagen, die dem Mesonephros ventral anliegen. Es wird kontrovers diskutiert, ob diese Migration aktiv durch amöboide Bewegungen oder eher passiv durch das Wachstum des umliegenden Gewebes stattfindet (Freeman, 2003, Molyneaux und Wylie, 2004). Die Proliferation findet während der Wanderung und der Besiedelung der Gonaden durch die primordialen Keimzellen statt (Mahakali Zama et al., 2005).

Bei der Bildung der Primordialkeimzellen sind verschiedene Transkriptionsfaktoren und Wachstumsfaktoren beteiligt. So ist Bone morphogenic protein (BMP) für die Bildung der PGC von großer Bedeutung. BMP-4-knock-out Mäuse besitzen keine PGC. Mäuse die für BMP-4 heterozygot sind, bilden nur die Hälfte der PGC, die normale Mäuse aufweisen. Damit scheint die Wirkung von BMP-4 konzentrationsabhängig zu sein (Lawson et al., 1999). BMP-8b, welches im Ektoderm exprimiert wird, ist ebenfalls für die Bildung von PGC von Bedeutung (Ying et al., 2000). Neuere Untersuchungen haben auch BMP-2 als wichtigen Faktor für die Entstehung von PGC identifiziert. Im Gegensatz zu BMP-4 und BMP-8b wird BMP-2 im Entoderm des frühen Embryos produziert (Coucouvanis und Martin, 1999). Somit sind sowohl entodermale als auch ektodermale BMPs an der Bildung der PGC beteiligt. Im Gegensatz zu BMP-2 und BMP-8b weisen BMP-2 und BMP-4 einen additiven Effekt bei der Bildung der PGC auf (Ying und Zhao, 2001).

An der Proliferation und der Wanderung der PGC in die Keimdrüsenanlagen sind gleichfalls mehrere Transkriptionsfaktoren und ihre Rezeptoren beteiligt. Kit-Ligand (KL) ist

hier von besonderer Bedeutung. Verschiedene Untersuchungen haben klar gezeigt, dass Kit-Ligand 1 (Kitl/KL) in unterschiedlichen Maßen vor und während der Migration benötigt wird, wobei Migration und Proliferation der PGC durch unterschiedliche Konzentration von KL gesteuert werden (Molyneaux und Wylie, 2004, Mahakali Zama et al., 2005). Bei Embryonen der Maus zeigt KL in somatischen Zellen einen deutlichen Konzentrationsgradienten entlang des Wanderweges der primordialen Keimzellen. Die höchsten Werte sind dabei in den Keimleisten selbst zu finden (Keshet et al., 1991, Matsui et al., 1991). KL wurde ebenfalls als ein wichtiger Überlebensfaktor der PGC identifiziert (Hutt et al., 2006). Die PGC exprimieren c-kit, den korrespondierenden Rezeptor für KL (Manova et al., 1990).

Neben dem KL-c-Kit System spielen auch Mitglieder der Fibroblast-Growth-Factor (FGF)-Familie eine wichtige Rolle für die Wanderung und Proliferation der PGC. FGF-2 ist ein mitogener Faktor für PGC und wirkt direkt auf die primordialen Keimzellen (Resnick et al., 1998). Allerdings steht der endgültige Beweis, dass FGF-2 im Verlauf der Keimzellwanderung oder in den frühen embryonalen Gonaden exprimiert wird, noch aus (Kawase et al., 2004). FGF-4 sowie FGF-8 erhöhen die Proliferation von PGC bei Zellkulturexperimenten. Demnach wirken sie ebenfalls als Mitogene (Kawase et al., 2004). Allerdings ist anzumerken, dass diese FGFs in den frühen Phase der PGC-Bildung zu einem großen Teil von den umgebenden Zellen sezerniert werden, während sie in der frühen gonadalen Phase von den PGC selbst sezerniert werden. Ihre Wirkung ist stadienabhängig parakrin oder autokrin (Kawase et al., 2004). Die PGC bilden zwei verschiedene Formen des FGF-Rezeptors, nämlich FGFR-IIIb und FGFR-IIIc. Das FGF/FGF-Rezeptor-System hat großen Einfluss darauf, wie viele PGC während der Wanderung vom Dottersack zu den Gonadenanlagen überleben (Takeuchi et al., 2005).

Weitere Faktoren, welche die Proliferation und das Überleben der PGC beeinflussen, sind Leukemia inhibiting factor (LIF) (Kawase et al., 2004), Pituitary adenylate cyclase activation peptide (PACAP), Tumor necrose Factor α (TNF- α), sowie IL-4. TGF- β 1 hemmt die Proliferation der primordialen Keimzellen, fördert aber ihre Wanderung zur Gonadenanlage (Kawase et al., 2004).

Tabelle 2.1 Wachstumsfaktoren, welche auf die Entstehung, die Proliferation oder/und die Wanderung der primordialen Keimzellen wirken

Faktor	Synthese-Ort	Wirkt vor allem auf:	Autoren
BMP-2	Entoderm und früher Embryo	Bildung der PGC Additiver Effekt mit BMP-4	Coucouvanis und Martin, 1999 Ying und Zhao, 2001
BMP-4	Ektoderm	Bildung der PGC	Lawson und Hage, 1999
BMP-8	Ektoderm	Bildung der PGC	Ying et al., 2000
KL	Somatische Zellen; Gradient entlang des Migrationsweges	Migration der PGC Proliferation der PGC Für beide Elemente besteht ein unterschiedlicher Bedarf an KL	Mahakali Zama et al., 2005 Kawase et al., 2004
LIF	Ektoderm	Proliferation und Überleben der PGC	Kawase et al., 2004
FGF-2	Somatische Zellen	Mitogen für PGC (kontrolliert Anzahl der PGC während der Migration), besonders in vitro Wirkt auf die Motilität der PGC	Takeuchi et al., 2005
FGF-7	Somatische Zellen	Mitogen für PGC	Takeuchi et al., 2005
FGF-4/ FGF-8	Während der Wanderung: Bildung durch somatische Zellen Nach Einwanderung in die Gonaden: Bildung durch die PGC	Migration und Proliferation der PGC	Kawase et al., 2004

BMP: Bone morphogenetic protein, PGC: Primordiale Keimzellen, LIF: leukemia inhibiting factor, FGF: Fibroblast growth factor, KL: Kit Ligand

PGC sind große runde Zellen, die sich beim Nachweis der Alkalischen Phosphatase positiv anfärben oder durch Fluoreszenz-Marker, wie z.B. Oct-4-GFP, identifiziert werden können (Habermann et al., 2007).

Nach dem Eintritt der PGC in die Keimdrüsen, differenzieren sie je nach chromosomaler Ausbildung (XX oder XY) zu Oogonien oder zu Spermatogonien. Die Oogonien bilden Keimzellhaufen. Diese werden von somatischen Zellen umgeben, die dem Mesonephros abstammen. Alle PGC, welche von einer Oogonie abstammen, sind zunächst durch Interzellularbrücken verbunden. Dies wird „Germ Cell Cluster“ genannt. Die Oogonien durchlaufen mehrere DNA-Vermehrungszyklen. Sie treten dann bereits pränatal in die Meiose ein und werden zu Oozyten I. Ordnung.

2.1.2 Frühe Bildung der Gonaden

Die Gonaden entstehen aus den indifferenten Keimdrüsenanlagen. Diese entwickeln sich aus Zölomepithel und darunter gelegenen Mesenchym-Verdichtungen. Die Mesenchymzellen leiten sich von Urnierenglomerula und Urnientubuli ab. Die Einwanderung der PGC in die Gonadenanlagen stellt die notwendige Voraussetzung für die weitere Entwicklung der Gonaden dar. Die Keimdrüsenleiste befindet sich medial an der

Urnierenfalte, und wird durch Größenzunahme zur Keimdrüsenfalte. Dabei hebt sie sich zunehmend vom Mesonephros ab. Die Keimdrüsenanlage reicht während ihrer stärksten Ausbildung vom Thorakal- bis in den Lumbalbereich. An ihr lassen sich drei Anteile unterscheiden, wobei sich der kraniale und der kaudale Teil zu Bändern entwickeln und nur der mittlere Teil zur Keimdrüse differenziert. Die Gonadenanlage wird aussen von proliferierendem Keimdrüsenepithel umgeben. Die Herkunft des Gonadenblastems selbst ist noch nicht vollständig geklärt. Wahrscheinlich stammt ein Teil der Zellen vom Keimdrüsenepithel ab, der Großteil dürfte sich aber aus einwandernden Zellen des Mesonephros ableiten. Die weitere Entwicklung zum Ovar ist, wie schon erwähnt, vom Einwandern der Primordialkeimzellen (PGC) abhängig.

2.1.3 Differenzierung des Ovars

Als erste Anzeichen der Differenzierung der Gonadenanlage zum Ovar kann der Eintritt der Keimzellen in die meiotische Prophase gewertet werden. Die Haussäugetiere zeigen einen etwas verzögerten Eintritt in die Meiose, d.h. der Eintritt der Meiose beginnt nicht unmittelbar wenn das gonadale Geschlecht erkennbar wird, sondern es liegt zunächst eine Periode vor, in der die Keimzellen in Keimzellstränge eingeschlossen werden. Diese erstreckt sich beim Pferd vom 60. bis zum 90. Trächtigkeitstag (TT), beim Rind vom 40.-82. TT, beim Schaf vom 31.-55. TT und beim Schwein vom 52.-70. TT.

Bei der Entwicklung des Ovars findet ein charakteristischer Umbau der Histoarchitektur der Gonadenanlage statt: die peripheren Keimstränge mit den im Inneren enthaltenen Keimzellen werden zur Zona parenchymatosa (Eierstocksrinde). Die zentralen Blastemstränge degenerieren teilweise. Die nicht degenerierenden Keimstränge bilden das spätere Rete ovarii.

Nach der Geburt flacht das Oberflächenepithel (Keimdrüsenepithel) ab und wird einschichtig isoprismatisch. Am Hilus geht es in das Mesovarium über.

2.1.4 Bildung der Primordialfollikel

Die Primordialkeimzellen differenzieren sich durch Mitose zu Oogonien, die, umgeben von somatischen Zellen, die Eiballen bilden. Die mitotischen Teilungen der Oogonien werden mit ihrem Eintritt in die Prophase der ersten Reifeteilung beendet. Die Oogonien werden damit zu Oozyten I. Ordnung (Oozyte I). Die Oozyten werden zunächst von einer flachen Schicht somatischer Zellen (Prägranulosazellen) umgeben und bilden so die primordialen

Follikel (Pepling und Spradling, 1998, McNatty et al., 2000, Juengel et al., 2002a) (Siehe auch Abbildung 2.1 und Abbildung 2.2). Es gibt allerdings auch Tierarten, bei denen teilweise mehrere Oozyten gemeinsam von den umliegenden somatischen Zellen umgeben werden. Diese werden polyovulatorische Follikel genannt. Sie kommen in steigender Häufigkeit bei den folgenden Tierarten vor: Hase, Rhesus Affe, Katze und Hund. Auch beim Menschen treten diese polyovulatorischen Follikel gelegentlich auf (Telfer und Gasden, 1987).

Die Größe der Primordialfollikel beträgt beim Rind 30-50 μm und die der Oozyte 20-35 μm . Die Follikel- und Oozytengrößen liegen auch beim Schwein, beim Menschen und beim Nager in der gleichen Grössenordnung (van den Hurk, 1997). Beim neonatalen Schaf sind die Follikel 23-53 μm gross und die Oozyten 17-22 μm (van den Hurk, 2005). Die Bildung der primordialen Follikel beginnt im inneren Teil des ovariellen Kortex, wo die Oozyten zunächst das Diplotän-Stadium erreichen. Byskov et al. (1994) schlagen einen dualen Ursprung der Granulosazellen vor, die sich sowohl aus Zellen des Keimdrüsenepithels als auch aus einwandernden Zellen des Mesonephros zusammen setzen sollen. Allerdings ist der exakte Ursprung der Prägranulosazellen noch nicht endgültig geklärt. Die Entwicklung dieses Follikelpools findet je nach Tierart kurz vor der Geburt (Pferd, Wiederkäuer, Mensch) oder kurz nach der Geburt (Schwein, Hund, Katze) statt. Alle bei/kurz nach der Geburt noch nicht in Follikel eingeschlossenen Oozyten degenerieren.

Die maximal angelegte Anzahl von Oozyten beträgt beim Menschen 7 Million, beim Rind 2,7 Millionen, beim Schaf 900000 und beim Schwein 1,2 Millionen. Da aber viele Oozyten schon während der ersten Phase der Meiose degenerieren, sinkt die Anzahl der primordialen Follikel bei der Geburt um 90% auf 700.000 beim Menschen, und um mehr als 90% bei Rind und Schaf (135000 und 82000). Beim Schwein nimmt die Zahl um ca. 60% auf 500000 ab (van den Hurk und Zhao, 2005).

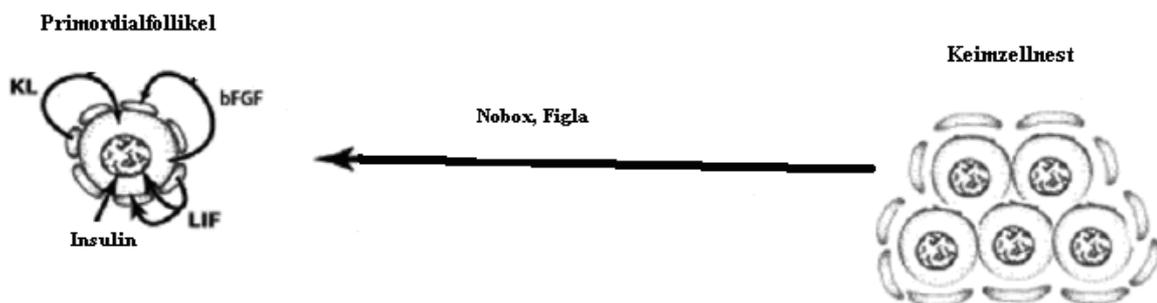
Die seit vielen Jahren bestehende Lehrmeinung ist, dass der bei Geburt angelegte Pool an Follikeln nur noch durch Ovulation und durch Atresie abnehmen kann und dieser Prozess unweigerlich dann endet, wenn der während der Embryonalentwicklung angelegte Vorrat an Follikeln ausgeschöpft ist. Neuere Untersuchungen deuten aber darauf hin, dass es im Oberflächenepithel des Ovars eine Stammzellpopulation an Keimzellen gibt, von der aus der Pool der Primordialfollikel auch postnatal erneuert werden kann (Johnson et al., 2004, Bukovsky et al., 2005).

Bis heute sind zwei Faktoren bekannt, die an dem Zerfall der Germ Cell Cluster und der anschließend erfolgenden Bildung der Primordialfollikel beteiligt sind: Der „Factor in the

Germline α “ (Figl α) und das Protein des „Newborn ovary homeobox gene“ (Nobox). Über beide Faktoren ist bis heute in diesem Zusammenhang noch nicht viel bekannt.

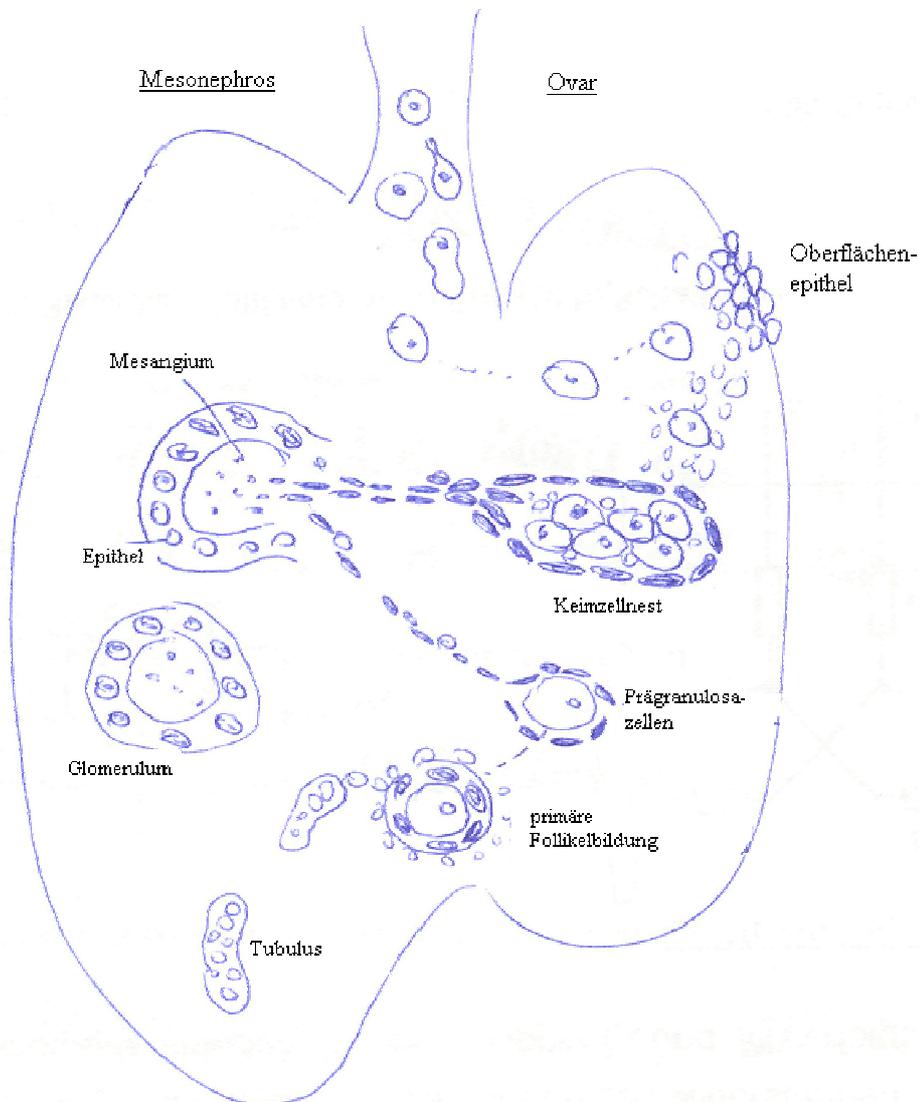
Figl α wurde als erster Faktor bekannt, der die Bildung der primordialen Follikel beeinflusst. Allerdings beeinträchtigt Figl α nicht die Transkription von Genen wie GDF-9, BMP-15, Kit L und FGF-8. Somit muss der genaue Mechanismus, über den Figl α die Bildung der primordialen Follikel beeinflusst, noch aufgeklärt werden (Liang et al., 1997, Soyol et al., 2000, Choi und Rajkovic, 2006). Nobox ist ein anderer spezifischer Transkriptionsfaktor, der bei der Bildung der Follikel eine Rolle spielt. Allerdings wirkt Nobox über eine direkte oder indirekte Regulation der Transkription verschiedener anderer Gene, wie zum Beispiel GDF-9 und BMP-15, wie in Versuchen mit Nobox-defizienten Mäusen herauskristallisiert werden konnte (Choi und Rajkovic, 2006).

Abbildung 2.1. Entwicklung vom Keimzellnest zum Primordialfollikel



Faktoren, welche sich an der Bildung der Primordialfollikel aus Germ Cell Cluster beteiligen. Modifiziert nach Choi und Rajkovic, 2006.

Abbildung 2.2



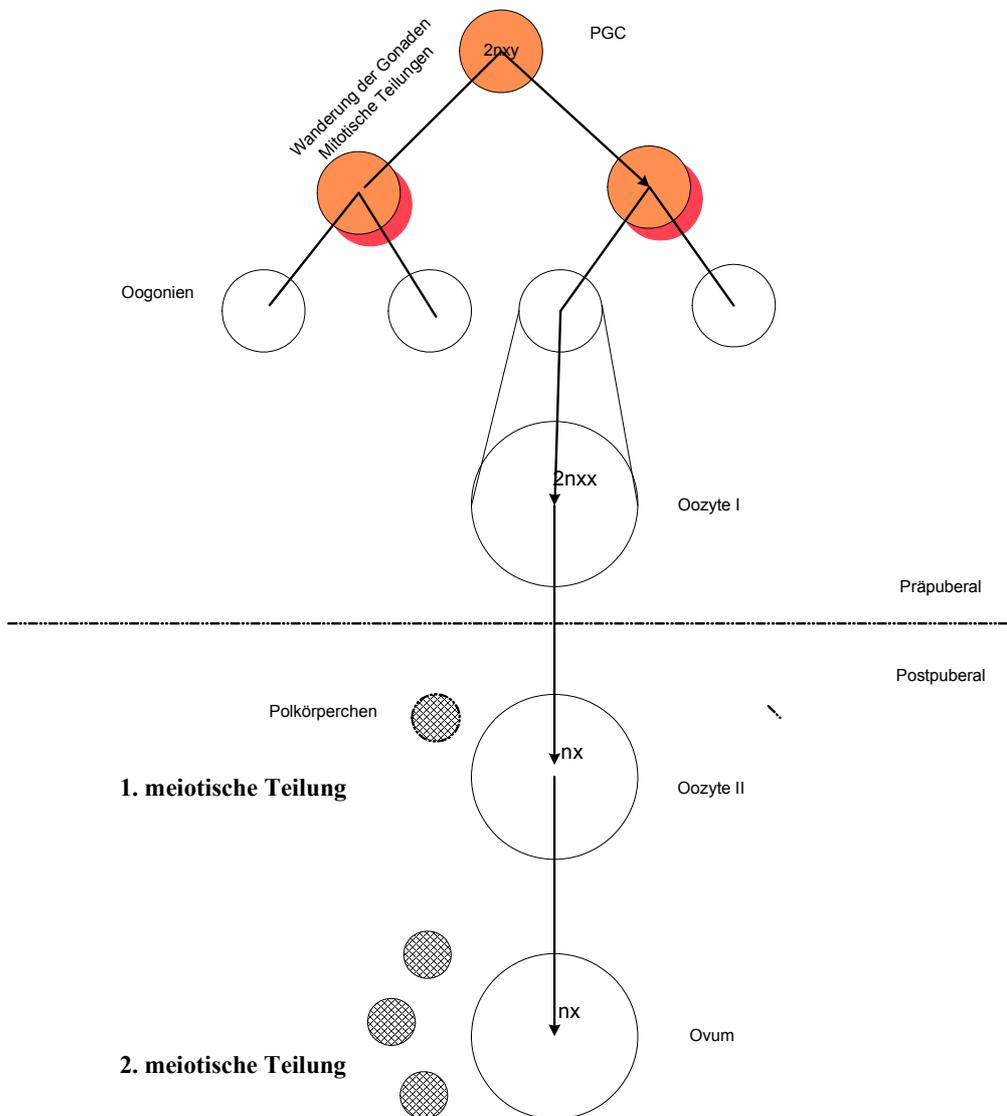
Bildung der Primordialfollikel, modifiziert nach McNatty et al., 2000

2.2 Oogenese

Die Oogenese, früher auch Ovogenese genannt, ist der Prozess, der zu befruchtungsfähigen Eizellen führt. Sie beginnt bereits in der frühen embryonalen Phase mit der Entstehung der Primordialkeimzellen und geht einher mit der Entwicklung der Follikel. Sie lässt sich in verschiedene Phasen unterteilen:

Die Vermehrungsphase ist die Zeit, in der sich die Primordialkeimzellen durch Mitose teilen und zu Oogonien werden. Sie wird mit dem Eintritt in die erste Reifeteilung beendet und bestimmt somit die endgültige maximale Anzahl von Eizellen.

Abbildung 2.3



Oogenese modifiziert nach Schnorr (1996).

Es folgt die erste Wachstumsperiode, in der die erste Reifeteilung bis zum Diplotän-Stadium stattfindet. Die Oogonien werden hier zu Oozyten I. Ordnung oder primären Oozyten. Sie werden von einem einschichtigen Epithel aus Granulosazellen umgeben und bilden so die Primordialfollikel. Oozyten, welche nicht in einen Follikel eingeschlossen werden, gehen zugrunde. Diese erste Wachstumsphase wird bei Mensch, Rind und Schaf

schon pränatal beendet. Bei Karnivoren und Nagern läuft sie auch noch in den ersten Wochen nach der Geburt ab.

Die erste Wachstumsphase wird von einer längeren Ruhephase abgelöst, in der die Follikel sich nicht weiterentwickeln und die Oozyten im Dictyotän-Stadium arretiert werden.

Mit Beginn der Geschlechtsreife erfolgt die 2. Wachstumsphase, in der die Follikel über den Primär-, Sekundär-, Tertiär- zum Graaf- oder präovulatorischen Follikel heranreifen. Die erste Reifeteilung wird kurz vor der Ovulation beendet, wodurch Oozyten II. Ordnung entstehen. Die anschließende zweite Reifeteilung läuft dann bis zur Metaphase ab. Diese zweite Wachstumsphase wird von endokrinen und parakrinen Faktoren gesteuert und kann in eine Gonadotropin-unabhängige und eine Gonadotropin-abhängige Phase unterteilt werden. Die zweite Reifeteilung wird während der Befruchtung beendet.

Im wachsenden und dominanten Follikel befindet sich die Oozyte im Dictyotänstadium, welche mit der G2-Phase von mitotischen Zellen vergleichbar ist. Die Wiederaufnahme der Meiose wird durch den präovulatorischen LH-Anstieg eingeleitet (Tsafriri, 1979) und findet nur in völlig ausgewachsenen, meiotisch kompetenten Oozyten von dominanten Follikeln statt (van den Hurk und Zhao, 2005). Die meiotische Kompetenz wird zum Zeitpunkt der Antrumbildung erworben (Erickson und Sorensen, 1974, Mehlmann, 2005). Das Fortführen der Kernreifung über die Prophase hinaus wird als Germinal Vesicle Breakdown (GVBD) bezeichnet, wobei die Kernmembran abgebaut wird. Vor und während des LH-Anstiegs ist die Oozyte von Cumuluszellen umgeben, deren Fortsätze durch die Zona pellucida bis zum Oolemm reichen und mit diesem Gap Junctions (GJ) bilden (Fair et al., 1997). Diese GJ werden kurz nach dem LH-Anstieg abgebaut. Auch im Kern und im Zytoplasma der Oozyte kommt es zu markanten Veränderungen (Fair et al., 1997). Die ooplasmatische Reifung beinhaltet die Bildung kortikaler Granula, die mit zunehmender Oozytenreifung entlang des Oolems angelagert werden, die vermehrte Einlagerung von Lipiden, die Neuverteilung von Zellorganellen und die Migration der Mitochondrien in eine perinukleäre Position (Hosoe und Shioya, 1997, Fair et al., 1997). Diese Veränderungen sind eine notwendige Voraussetzung, um eine Polyspermie bei der Befruchtung zu verhindern.

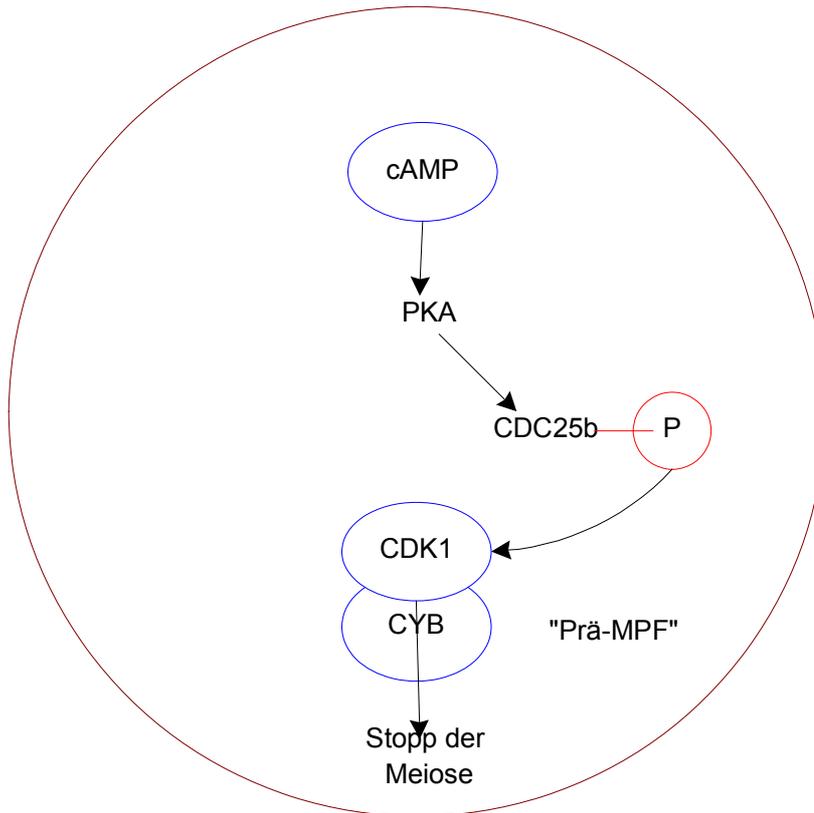
Die Kernreifung dauert beim Rind und beim Schaf 24, beim Schwein 44 Stunden. Sie beinhaltet verschiedene Schritte, unter anderem zwei Mitosephasen, die unmittelbar hintereinander, d.h. ohne DNA-Replikation (S-Phase), erfolgen. Die Oozyten verharren anschließend in der Metaphase der zweiten Reifeteilung bis zur Befruchtung (van den Hurk und Zhao, 2005).

Verschiedene Faktoren sind an der Arretierung der Meiose, bzw. an ihrer Weiterführung beteiligt. Dazu gehören cAMP (Zyklisches Adenosinmonophosphat), MPF (Maturation promoting factor), MAPK (Mitogen activating Protein Kinase), Calciumionen, FF-MAS (Follicle fluid mitogen activating sterol) und Mitglieder der Epidermal growth factor (EGF)-Familie (Park et al., 2004, Ashkenazi et al., 2005).

cAMP in hoher Konzentration ist an der Arretierung der Meiose beteiligt. Sein Abbauprodukt dagegen ist für ihre Fortführung nötig. Des Weiteren beeinflusst cAMP MPF durch Phosphorylierung. Der Mechanismus läuft, vereinfacht dargestellt, wie folgt ab:

MPF besteht aus zwei Einheiten: Aus der regulatorischen Untereinheit Cyclin B (CYB) und der regulatorischen Untereinheit der Cyclin abhängigen Kinase (Cyclin dependent kinase, CDK). cAMP führt über Protein Kinase A (PKA) zu einer Phosphorylierung von CDK1. Diese Phosphorylierung geschieht über den Träger Cdc25 (Cell division cycle 25). Die phosphorylierte Form des MPF (Maturation promoting factor) ist das Prä-MPF. Prä-MPF bewirkt einen Stopp der Meiose. Eine niedrige cAMP-Konzentration führt umgekehrt zu einer Dephosphorylierung von CDK1 und einer Phosphorylierung von Cdc25 (Cell division cycle 25, dual specificity phosphatase 25). Der dephosphorylierte CDK1/ CYB Komplex ist MPF. MPF bewirkt die Fortführung der Meiose (Gordo et al., 2001, Trounson et al., 2001, Mehlmann, 2005). Cdc25 Knock-out Mäuse sind wegen permanenter Arretierung der Meiose infertil (Lincoln et al., 2002).

Abbildung 2.4



cAMP induziert über PKA die Phosphorylierung von Cdc25, welches sein Phosphat daraufhin auf MPF überträgt. Dies führt zur Bildung von Prä-MPF
PKA: Protein Kinase A, Cdc25: Cell division cycle 25, MPF: Maturation promoting factor

Mitglieder der MAPK-Familie sind an der Regulation der Meiose ebenfalls beteiligt: MAPK ist für den Erhalt von MPF-Aktivität, die Spindel-Bildung sowie die Arretierung der Meiose wichtig (Gordo et al., 2001). Des Weiteren sind ebenfalls Ca^{++} und FF-MAS, ein vom Cumulus oophorus gebildeter Faktor, dessen Rezeptoren noch nicht bekannt sind, an der Steuerung des Meioseablaufes beteiligt (van den Hurk und Zhao, 2005).

Die Reifung der Oozyten wird von dem präovulatorischen LH-Anstieg ausgelöst. Die LH-Rezeptoren sind in den muralen GC lokalisiert, nicht aber in den Cumuluszellen oder in der Oozyte (Peng et al., 1991, Eppig et al., 1997). Somit erfolgt die Wirkung von LH indirekt. Sie wird unter anderem von Mitgliedern der EGF Familie, Amphiregulin (AREG), Epiregulin (EPR) und Betacellulin (BTC) vermittelt (Park et al., 2004, Hsieh et al., 2007).

2.3 Postnatale Follikulogenese

Der Follikel ist die grundlegende funktionelle Untereinheit im Ovar. Er besteht aus den sich entwickelnden Oozyten und den sie umgebenden somatischen Zellen. Die zwei somatischen Zelllinien sind die Thekazellen (TC) und die Granulosazellen (GC). Sie sind Wirkungsort und Syntheseort vieler Hormone und Faktoren, welche die Follikelentwicklung beeinflussen. Die Proliferation dieser zwei Zelltypen ist maßgeblich an der Entwicklung des antralen Follikels beteiligt.

Die Differenzierung der Follikelzellen steht unter dem Einfluss vieler unterschiedlicher Hormone und Wachstumsfaktoren. Sowohl spezifische Rezeptoren für die Gonadotropine FSH (Follikelstimulierendes Hormon) und LH (Luteotropes Hormon) als auch für Wachstumsfaktoren, wie EGF (Epidermal growth factor), IGF (Insulin-like growth factor) und AMH (Anti-Müllerian Hormone) wurden in den sich differenzierenden Granulosazellen gefunden. Die Wirkung der Hormone und Wachstumsfaktoren variiert in den verschiedenen Stadien der Follikelentwicklung.

Eine wichtige Funktion der Granulosazellen ist bei Rind, Mensch und Nager die Bildung von Östradiol (E₂) und Progesteron (P). Während des Follikelwachstums und der Differenzierung der Follikelzellen nimmt die Biosynthese von Östrogen zu. Dieser Prozess wird durch FSH stimuliert. Kurz vor der Ovulation entwickeln die Zellen die Fähigkeit unter dem Einfluss von LH Progesteron zu bilden. Während Sekundär-, Tertiär-, und Graaf- Follikel Gonadotropin-abhängig sind, werden die frühen Follikelstadien von Gonadotropin nicht beeinflusst.

Außen werden die Follikel von der Theca folliculi begrenzt. Die Theca wird in eine innere Schicht, die Theca interna (TI) und eine äußere Schicht, die Theca externa (TE) unterteilt. Die Hauptfunktion der Theca interna besteht in der Bildung von Androgen (A) aus Cholesterol unter Einfluss von LH. Androgene diffundieren dann zu den Granulosazellen, wo sie zu Östradiol aromatisiert werden.

Im Stadium des Primordialfollikel sind noch keine Thekazellen vorhanden. Sie werden erst bei dem Übergang zum primärfollikel (Ratte) bzw. im frühen Sekundärfollikel (andere Tierarten) rekrutiert und als bindegewebige Thekazellschicht um die Follikel angelegt (Hirshfield, 1991, Magoffin, 2005). Die Thekazellen leiten sich von mesenchymalen Zellen ab und differenzieren zu Steroid-sezernierenden Zellen mit den dazugehörigen ultrastrukturellen Charakteristika (viele Mitochondrien mit vesikulären Cristae, häufig mit agranulärem Retikulum und Fett-Vesikeln) (Magoffin, 2005). Sie sind, wie die Granulosazellen, in diesem

Stadium ebenfalls von Gonadotropinen unabhängig. Einige weitere Faktoren, welche sich an der Differenzierung der Thekazellen beteiligen, sind der Insulin-like growth Factor I und II (IGF I und IGF II), der Growth differentiation factor 9 (GDF-9), der Stem cell factor (SCF) sowie Follistatin (Fst). Die präzise Entwicklung und Aktivität der TC ist für die normale Reproduktion besonders wichtig, da sowohl eine Hyperaktivität durch Hyperandrogenismus als auch eine zu geringe Aktivität durch Hypoöstrogenismus zur Infertilität führen (Magoffin, 2005).

Zum Zeitpunkt der Geburt befindet sich die weit überwiegende Zahl der Follikel im Stadium der Primordialfollikel (PROF). Diese PROF gehen dann in Primärfollikel (PRIF) über, ein Prozess der Follikeltransition genannt wird. Pro Tag beginnen beim Schaf 2-3 und beim Rind bis zu 6 Follikel zu wachsen (van den Hurk, 1997). Hierbei werden die Granulosazellen isoprismatisch und die Thekazellen aus dem somatischen Zellpool rekrutiert. Dieser Übergang ist Gonadotropin-unabhängig, da er auch in FSH β - und FSHR-Knockout Mäusen stattfindet (Kumar et al., 1997) und Primordialfollikel von Schwein und Mensch keine FSH-Rezeptoren aufweisen (Meduri et al., 2002). Dieses Wachstum, das auch als „Follikeltransition“ bezeichnet wird, dauert von einigen Tagen beim Nager bis hin zu mehreren Jahren beim Menschen (Fortune, 1994). Daher werden häufig Follikel gefunden, die sowohl von flachen als auch von isoprismatischen Zellen umgeben werden und als Transitionsfollikel bezeichnet werden. Laut Hirshfield et al. (1991) erfolgt der Beginn des Follikelwachstums in der Reihenfolge ihrer Bildung. Der Beginn des Follikelwachstums wird von Faktoren, wie KL (Kit Ligand), bFGF (basic fibroblast growth factor), LIF (Leukemia inhibiting factor), TGF α (Tumor growth factor alpha), BMPs (Bone morphogenetic proteins) und vielen anderen Faktoren beeinflusst.

Der Durchmesser der Primärfollikel beträgt beim Rind 40-60 μm , die Oozyte misst 30-40 μm . Sie ist umgeben von ca 27-58 Follikelzellen (Hulshof et al., 1994, van den Hurk, 1997). Beim Schwein beträgt der Durchmesser der Primärfollikel 120 μm , eine vollständig große Oozyte wird von einer bis drei Lagen Follikelzellen umgeben (Knox, 2005).

Im weiteren Verlauf des Oozytenwachstums proliferieren die Follikelzellen und die Follikelwand wird mehrschichtig. Der mehrschichtige Follikel wird auch multilaminarer Follikel genannt. Ab dem Zeitpunkt, an dem zwei oder mehr Follikelzellschichten vorhanden sind, spricht man von einem sekundären Follikel. Hier wächst die Oozyte intensiv, die Follikelzellen proliferieren noch stärker und die Thekazellschicht wird vollständig ausgebildet. Sie wird durch die dem Follikel anliegenden Stromazellen gebildet, welche sich

vergrößern und zirkulär um den Follikel anordnen. Es entsteht eine bindegewebige Schicht, die Theca follicularis. Ein sekundärer Follikel weist sechs (Rind) bis 20 (Schwein) Schichten von Granulosazellen auf. Seine maximale Größe beträgt 150 µm beim Rind, 300 µm beim Schwein und 200 µm bei Mensch und Nager. Die Oozyten messen 60 µm (Rind), 90 µm (Schwein), 70 µm (Maus) und 80 µm (Mensch) (van den Hurk et al., 2005, Knox, 2005). Bei der Bildung der Sekundärfollikel kommt es zu weiteren wichtigen Veränderungen. Von besonderer Bedeutung ist die Bildung einer Glykoproteinschicht, der Zona pellucida, um die Oocyte und das Auftreten von Zwischenzellenverbindungen (Gap Junctions, GJ) zwischen den Follikelzellen und der Oocyte. Diese GJ sind von besonderer Bedeutung sowohl für den Transport von Nährstoffen als auch für die Vermittlung stimulierender und inhibitorischer Signale von den Granulosazellen auf die Oocyte. An der Steuerung der Entwicklung zum Sekundärfollikel sind viele Hormone und Wachstumsfaktoren beteiligt, unter anderem Growth Hormon (GH), die Transforming growth factor β Familie (TGF β), Insulin-like growth factor (IGF), Fibroblast growth factor (FGF), Epidermal growth factor (EGF) und Leukemia inhibiting factor (LIF). Des Weiteren exprimieren die Follikelzellen der Sekundärfollikel FSH-Rezeptoren und die Thekazellen LH-Rezeptoren. Die Sekundärfollikel sind somit Gonadotropin-responsiv, allerdings noch nicht unbedingt Gonadotropin-abhängig, wie Studien an Mäusen mit defekten FSHR zeigen (McGee und Hsueh, 2000).

Die Bildung eines Antrums innerhalb der mehrschichtigen Granulosazellen ist das auffallendste Ereignis bei der Bildung der Tertiärfollikel. Sie geschieht beim Schwein ab einem Follikel von 400 µm Durchmesser (Knox, 2005). Zwischen den Follikelzellen bilden sich Spalträume aus, die dann zu einer einheitlichen Höhle, dem Antrum, zusammenfließen. Die Oocyte liegt dezentral im Antrum und ist über den Cumulus oophorus mit den parietalen Granulosazellen verbunden. Der genaue Vorgang der Antrumbildung ist nicht vollständig verstanden. Bei verschiedenen in vitro Studien konnte die Beteiligung von FSH, LH, Activin, und Kit Ligand (KL) nachgewiesen werden (Driancourt et al., 2000, Mao et al., 2002). Bei Rindern dürfte EGF eine Rolle spielen (Gutierrez et al., 2000).

Auch die Thekazellen des Tertiärfollikels haben sich weiter differenziert und bilden zwei getrennte Schichten, die Theca follicularis interna (TI) und die Theca follicularis externa (TE). Die Theca follicularis interna besteht aus epitheloiden Zellen des Stromas. Sie ist durch eine Basallamina von den Granulosazellen des Follikels getrennt. Die Zellen der Theca follicularis interna produzieren Androgene und sind von einem dichten Kapillarnetz umgeben. Die Zellen der Theca follicularis externa haben eine spindelförmige Gestalt und

sind in ein Netz aus retikulären Fasern eingelagert. Sie weisen weiterhin eine deutlich geringere Kapillarisation als die innere Thekaschicht auf.

Der frühe antrale Follikel beinhaltet beim Rind und Mensch eine Oozyte von 120 µm Durchmesser. Bei Nagern beträgt der Durchmesser der Oozyte ca. 70 µm. Die Oozyte erreicht diese Größe im späten Sekundärfollikel und hat dort auch schon die Kompetenz, unter experimentellen Bedingungen die Meiose zu beenden.

Das Wachstum des antralen Follikels endet im letzten Reifestadium des Follikels, dem Graafs oder auch präovulatorischen Follikel. Bei der Ovulation löst sich der Cumulus oophorus von der Follikelwand. Die Oozyte ist dann nur noch von der Zona pellucida und den Zellen des Cumulus umgeben.

Das Wachstum des antralen Follikels kann in verschiedene Phasen unterteilt werden: Der frühe antrale Follikel ist zunächst noch Gonadotropin-unabhängig (Findlay et al., 2002). Ab einer Größe von 0,2 mm (Maus), 1 mm (Schwein), 2 mm (Schaf, Primaten) sowie 4 mm (Rind) wird er von der Wirkung der Gonadotropine abhängig (Driancourt, 2001). Dieser Prozess wird auch zyklische Rekrutierung genannt und wird im Wesentlichen von FSH induziert (McGhee und Hsueh, 2000). Die Anzahl der in einem Zyklus rekrutierten Follikel beträgt beim Rind 5-10 und beim Schwein ~ 50.

Beim Rind und beim Schaf werden Follikel dann rekrutiert, wenn sich bei ihnen das Enzym P450_{scc} und die P450_{arom} erstmals detektieren lassen. Diese Enzyme sind für die Produktion von Östrogen aus Androgen von großer Bedeutung.

Das Wachstum der tertiären Follikel beruht ebenfalls auf einem fein abgestimmten Zusammenspiel sowohl endokriner als auch parakriner Faktoren. LH ist dabei für die Stimulierung der Androgenproduktion zuständig. Die Wirkung von LH wird von Activin, welches aus den GC stammt, und von EGF, welches von den TC gebildet wird, gehemmt. Inhibin aus den GC verstärkt die Wirkung von LH. FSH stimuliert die Produktion von Östrogen. Die Wirkung von FSH wird von IGF-I (aus GC), von BMP-2, -4, -7 und von Activin gefördert, sowie von EGF gehemmt. FSH selbst wirkt sich negativ auf die Expression von IGFBP-2 und IGFBP-4 aus, wodurch die IGF-I und IGF-II Bioverfügbarkeit steigt. Dies führt wiederum zu einer positiven Rückkopplungsschleife der Sekretion von FSH in der Hypophyse. In der Entwicklung des sprungreifen Follikels spielen also viele Hormone und Wachstumsfaktoren (LH, FSH, IGF-I, IGF-II, IGFBPs, Activin, Inhibin, Follistatin, EGF, VEGF), sowie ihre Rezeptoren und Bindungsproteine eine Rolle, deren Wirkung aber teilweise noch nicht vollständig geklärt ist.

Ab einer Follikelgröße von 4 mm (Schaf), 5-6 mm (Schwein) und 8 mm (Rind) fangen einige selektierte Follikel an, LH-Rezeptoren (LH-R) in den Granulosazellen zu exprimieren (Driancourt, 2001). Die Follikel können sich damit unter LH-Einfluss trotz der sinkenden FSH-Konzentration weiterentwickeln, und werden damit größer als andere Follikel. Dieses Phänomen wird als Follikeldominanz bezeichnet und wird durch mindestens zwei Faktoren, IGF-I und VEGF, verstärkt. IGF stimuliert die LHR-Bildung (Chase et al., 1998), und VEGF erhöht die Durchblutung der Follikelzellwand und somit auch die Zufuhr von FSH und LH zum Follikel (Garrido et al., 1993).

Anschließend folgt die Sekretion des Enzyms Urokinase-Plasminogen Aktivator, welches die Auflösung der Cumuluszellen und die Follikelruptur als Antwort auf den LH-Puls bewirkt (Murdoch et al., 1999).

2.4 Einteilung der Follikulogenese

Unter endokrinologischen Aspekten kann die Follikulogenese in verschiedene Abschnitte unterteilt werden:

- Die Initiale Rekrutierung/ frühes Wachstum/ Gonadotropin-unabhängige Phase
- Die Zyklische Rekrutierung oder FSH-Phase
- Die Selektion oder LH-Phase
- Die Dominanz

Des Weiteren bestehen tierartliche Besonderheiten im zyklischen Verlauf des Follikelwachstums

2.4.1 Initiale Rekrutierung

Die initiale Rekrutierung ist die Phase, in der aus dem ruhenden Pool der Primordialfollikel (PROF) sukzessive und kontinuierlich einige Follikel ihr Wachstum beginnen und sich über den Primärfollikel (PRIF) zum Sekundärfollikel entwickeln. Diese initiale Rekrutierung findet je nach Spezies zu unterschiedlichen Zeiten statt. So beginnt die Follikelentwicklung bei den Primaten und den Wiederkäuern schon pränatal. Bei der Ratte hingegen ist die erste Rekrutierung von Follikeln am dritten Tag post natum zu finden (Fortune et al., 2000, McGhee und Hsueh, 2000).

Die initiale Rekrutierung kann eher mit einem langsamen Reifen als mit einem schnellen Wachsen verglichen werden. Zudem verändert sich bei der initialen Rekrutierung der Durchmesser der Oozyte kaum. Die initiale Rekrutierung ist Gonadotropin-unabhängig. Sie findet auch bei Tieren, die Störungen in der FSH-Sekretion oder einen defekten FSH-Rezeptor (FSHR) aufweisen, statt (Webb et al., 1999, Meduri et al., 2002). Hinzu kommt, dass bei einigen Tierarten wie Mensch und Schwein die primordialen Follikel noch gar keine FSHR exprimieren (Oktay et al., 1997, Webb et al., 1999). Allerdings sind die Follikel schon Gonadotropin-sensitiv, da sowohl eine erhöhte Konzentration an FSH als auch eine erhöhte Konzentration an LH die initiale Rekrutierung beschleunigen (Wang und Greenwald, 1993, Flaws et al., 1997). Über welche Wege die Gonadotropine hier ihre Wirkung ausüben, ist noch unklar.

Die initiale Rekrutierung wird vor allem von lokalen stimulierenden und inhibierenden Faktoren geregelt. Diese Faktoren stammen aus den Follikelzellen, der Oozyte oder aus den somatischen Zellen. Bei diesen Faktoren handelt es sich unter anderem um KL, c-Kit, bFGF, AMH, GDF-9, BMP-4, BMP-7, KGF sowie LIF (Skinner, 2005).

KL wird von den GC sich entwickelnder Follikel produziert und wirkt sich positiv auf das Wachstum der TC, auf undifferenzierte Stromazellen und sich entwickelnde Oozyten aus, in denen der KL Rezeptor c-Kit exprimiert wird (Manova et al., 1993, Nilsson et al., 2001). KL ist damit für die Entwicklung der primären zu primordialen Follikel essentiell. Dies wird auch durch Versuche mit c-Kit Rezeptor Antikörper (ACK2) nachgewiesen. Durch diese Versuche wird nochmals deutlich, dass KL für die spontane Entwicklung von primären hin zu primordialen Follikeln notwendig ist (Parrott and Skinner, 1999). „Basic Fibroblast Growth Factor“ (bFGF) induziert ebenfalls, wie KL, die Entwicklung des PROF und spielt somit eine bedeutende Rolle bei der initialen Follikelrekrutierung. Allerdings weisen diese beiden Faktoren keine additiven Eigenschaften bei der Initiation des Follikelwachstums auf (Nilsson et al., 2001).

GDF-9 wird bei einigen Tierarten schon in den PROF (Primordialfollikel) exprimiert (Schaf und Rind). In anderen wiederum erst in den primordären Follikeln (PRIF) (Maus, Ratte, Mensch). Über welche Signaltransduktionswege GDF-9 wirkt, ist noch unklar.

LIF ist für die Follikulogenese nicht essentiell. Die Follikulogenese findet auch in LIF-defizienten Mäusen statt (Nilsson et al., 2002). Allerdings interagiert LIF wahrscheinlich mit KL und aktiviert dadurch die PROF. Deutlich stimuliert LIF in Follikelkulturen der Ratte die Transition der PROF in die PRIF (Nilsson et al., 2002).

KGF (FGF-7) wird von neu rekrutierten TC, die einen Kontakt zu GC haben, exprimiert. KGF stimuliert ebenfalls die Transition der PROF in die PRIF (Nilsson und Skinner, 2003, Kezele et al., 2005).

Eine positive Rückkopplungsschleife besteht zwischen TC und GC bei der KGF, HGF sowie KL eine Rolle spielen (Parrott and Skinner, 1998a). Die Behandlung von TC mit aus GC stammendem KL stimuliert die Expression von KGF und HGF. Von TC produziertes KGF sowie HGF stimulieren ihrerseits die Expression von KL in den GC. Allerdings ist nicht ganz klar, inwiefern diese Rückkopplungsschleife auch in den frühen Stadien der Follikulogenese ihre Wirkung ausübt (Parrott and Skinner, 1998a) (Siehe Abbildung 2.5)

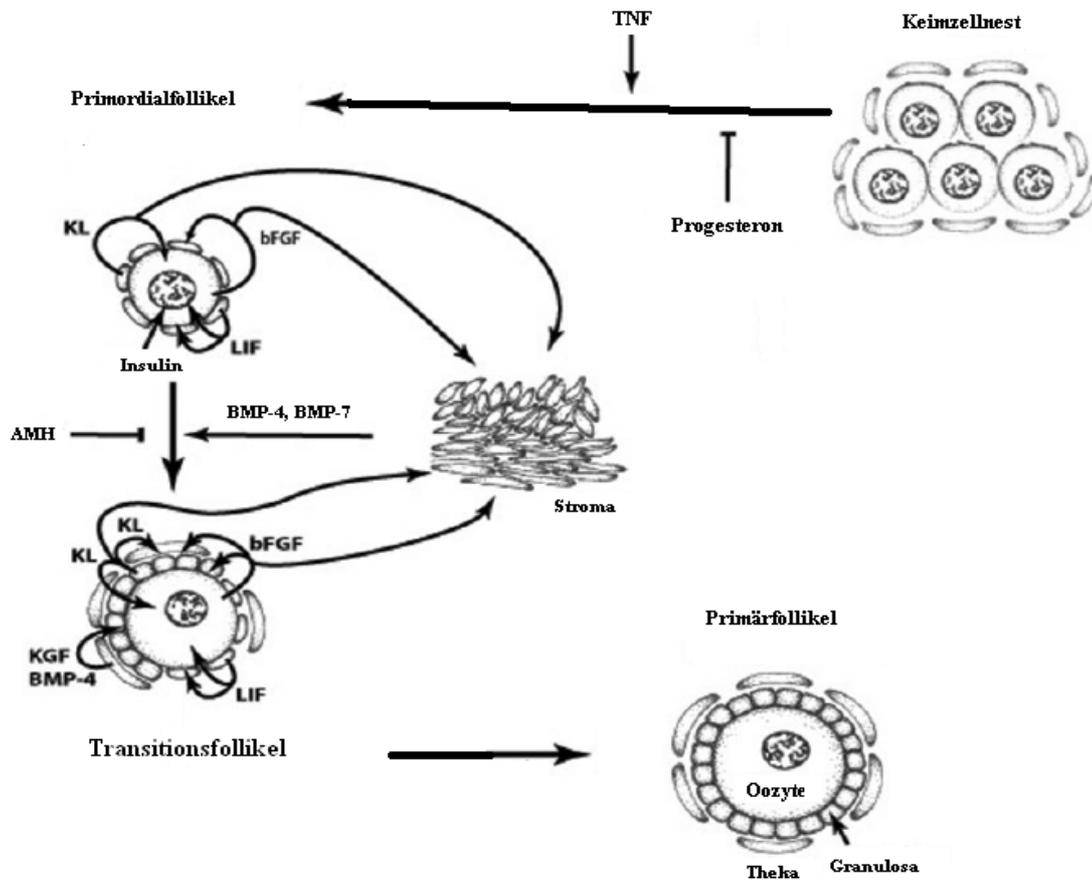
AMH, welches von präantralen und antralen Follikeln produziert wird, inhibiert die Rekrutierung der PROF zum Teil (Durlinger et al., 1999, Durlinger et al., 2002a, Durlinger et al., 2002b).

Die Rezeptoren für BMP-2 und BMP-4, Typ II Rezeptor (Typ II R) und Typ I Rezeptor (Typ I R) werden in der Oozyte der Ratte exprimiert (Erickson und Shimasaki, 2003). Ähnliche Befunde wurden vor kurzem für die PROF des Rindes erbracht. Bei der Ratte aktiviert BMP-7 die PROF. BMP-7 wird dabei in interstitiellen Zellen und TC späterer Follikelstadien gebildet (Lee et al., 2007).

Auch wenn insgesamt über die Faktoren, welche an der Initiation der Follikelentwicklung beteiligt sind, schon viele Details bekannt sind, ist der genaue Mechanismus, welcher der Rekrutierung der PROF zugrunde liegt, noch nicht vollständig aufgeklärt.

Die initial rekrutierten Follikel reifen anschließend, immer noch Gonadotropin-unabhängig, unter dem Einfluss der oben beschriebenen Faktoren, zu frühen antralen Follikeln heran.

Abbildung 2.5



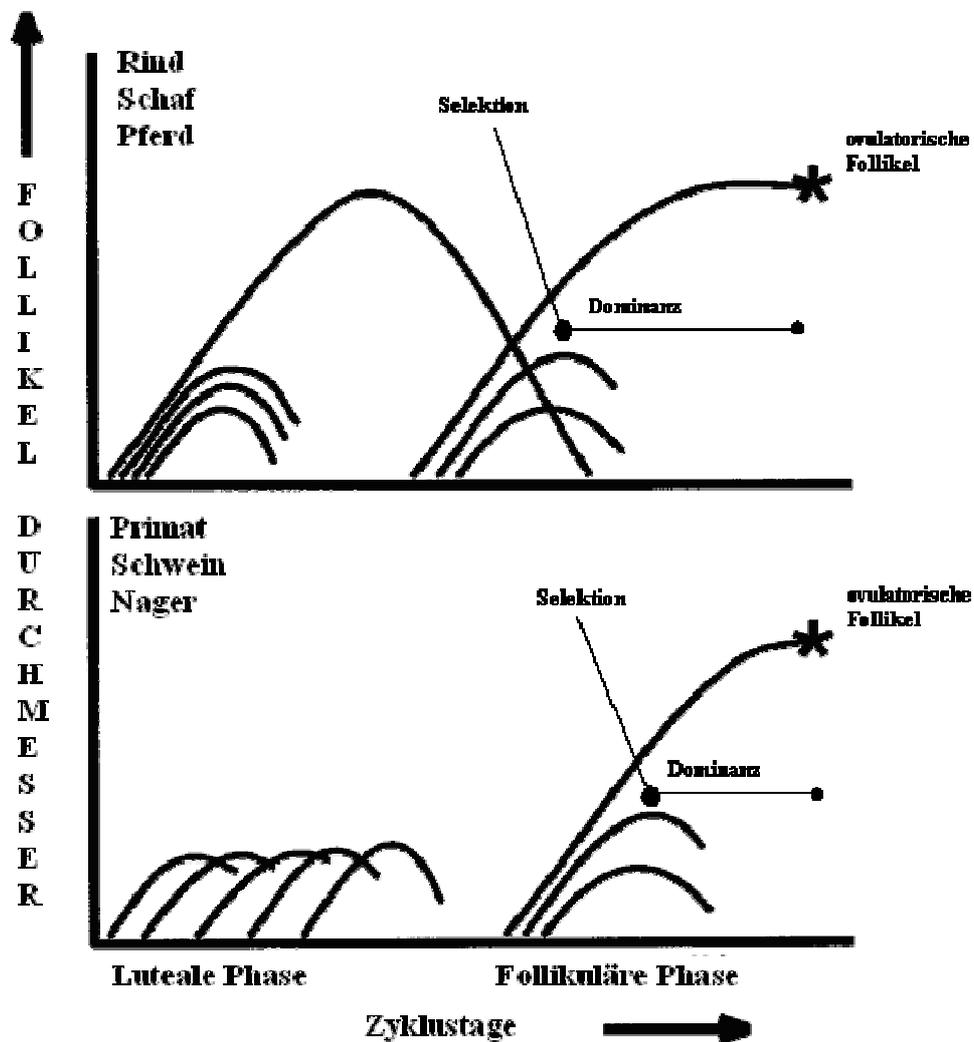
Schema des Ablaufs der zellulären Interaktionen während der Entwicklung der Primordialfollikel zu den Primordialfollikeln. Die zellulären Interaktionen werden von TNF (Tumor-Nekrose-Faktor), von bFGF (basischer fibroblast growth factor), von KL (Kit Ligand), von LIF (Leukemia inhibiting factor), von BMP-4 und BMP-7 (Bone morphogenetic protein), von KGF (Keratinocyte growth factor), sowie von AMH (Anti-muellerian Hormone) vermittelt. Modifiziert nach Skinner (2005).

2.4.2 Zyklische Rekrutierung

Die zyklische Rekrutierung beginnt bei den Primaten mit der Pubertät. Sie wird als Eintritt eines Pools von Follikeln in das Gonadotropin-abhängige Stadium definiert (Driancourt, 1991) und stellt den endokringesteuerten Beginn des gonadotropin-abhängigen Follikelwachstums dar. Die zyklische Rekrutierung wird von einem kleinen Anstieg des FSH begleitet und man vermutet, dass dieser FSH-Anstieg das auslösende Signal darstellt (Ginther et al., 1996). Ziel der zyklischen Rekrutierung ist es Follikel für die endgültige Reifung zum präovulatorischen Stadium bereitzustellen (Zeleznik and Hillier, 1984, Zeleznik and Hillier, 2004).

Hinsichtlich des Verhaltens bei der zyklischen Rekrutierung können zwei Gruppen von Spezies unterschieden werden, nämlich Tierarten, die während der lutealen Phase wie auch während der folliculären Phase eine Kohorte von zyklisch-rekrutierten Follikeln bilden, wie Rind, Schaf und Ziege und Spezies, die ausschließlich in der folliculären Phase präovulatorische Follikel bilden, wie Primaten, Schwein und Nager (Fortune, 1994). Bei letzteren findet der FSH-Anstieg erst nach Rückbildung des Corpus luteum (C.l.) statt. Dies führt wiederum zur Aufhebung der hemmenden Wirkung von Progesteron auf andere Hormone und die Konzentration von FSH steigt an.

Abbildung 2.6



Zyklische Rekrutierung von Follikeln bei ausgewählten Tierarten. Schematische Darstellung der wellenförmigen Follikelentwicklung. Im ersten Diagramm findet die Selektion des dominanten Follikels durchgehend statt, in dem zweiten nur während der folliculären Phase. Follikel deren Durchmesser abnimmt, atresieren. Modifiziert nach Fortune, 1994.

Der FSH-Anstieg bewahrt eine kleine Kohorte antraler Follikel vor der Atresie und ermöglicht ihnen dadurch das weitere Wachstum. Kleine antrale Follikel, die nicht rekrutiert werden, atresieren (McGee und Hsueh, 2000). Die zyklische Rekrutierung findet in einem sogenannten Rekrutierungsfenster statt. Dieser Zeitraum beträgt beim Schaf einen Tag, beim Rind zwei Tage und beim Pferd drei Tage. Für Schwein und Maus fehlen vergleichbare Angaben (Driancourt, 2001).

Die Oozyten der rekrutierten Follikel sind in der Lage, die Meiose zu beenden. Sie sind vollständig ausgewachsen und haben eine Zona pellucida gebildet (McGee und Hsueh, 2000).

Die Zahl der rekrutierten Follikel ist bei den jeweiligen Spezies sehr unterschiedlich: sie liegt bei 5-10 Follikeln beim Rind, über 50 Follikeln beim Schwein, 10-20 Follikeln beim Menschen im Alter von 20 bis 30 Jahren und bei 1-4 Follikeln beim Pferd. Theoretisch haben alle Follikel einer Kohorte die gleichen Chancen, zu ovulieren, wobei dies allerdings nur einem bestimmten Prozentsatz gelingt.

Die Voraussetzungen für die Rekrutierung eines Follikels ist, dass er gesund ist, FSH-Rezeptoren exprimiert und damit Gonadotropin-abhängig, ist. Es besteht offensichtlich ein positiver Zusammenhang zwischen der Größe der rekrutierten Follikel und dem Erlangen der Gonadotropinabhängigkeit. Die jeweilige Größe für eine Rekrutierbarkeit beträgt bei der Maus 0,2 mm, bei Schaf und Mensch 2 mm, beim Rind 4 mm und beim Pferd 10 mm (Driancourt, 2001).

FSH ist das für die Rekrutierung der Follikel entscheidende Hormon, wie durch Versuche mit hypophysesektomierten Nagern und Follikelkulturen deutlich wurde (Chun et al., 1996, Nahum et al., 1996). Eine Hemmung des FSH-Anstieges führt zu einem verzögerten Beginn der Follikelwelle (Turzillo und Fortune, 1990). FSH bindet an seinen in den GC exprimierten Rezeptor. Dadurch aktiviert FSH Gene, die für die Proliferation und Differenzierung der Granulosazellen von Bedeutung sind. Es besteht ein minimaler Schwellenwert für FSH, unter dem die Rekrutierung nicht stattfindet. Dieser Schwellenwert ist tierartlich unterschiedlich und kann auch innerhalb eines Tieres von Follikel zu Follikel variieren (Driancourt, 2001, Vegetti und Alagna, 2006).

Der wichtigste Vorgang bei der Follikelreifung, der mit der Rekrutierung parallel abläuft, ist die Expression von P450arom und P450scc in den Granulosazellen. Sie ermöglicht die nachfolgende hohe Produktion von Östrogen (Bao und Garverick, 1998, Driancourt, 2001). Die Größe der Follikel bei der Rekrutierung korreliert beim Rind und beim Schaf mit

der Größe bei der die Follikel P450arom exprimieren. Sie beträgt beim Schaf 2 mm und beim Rind 3-4 mm (Driancourt, 2001). Dies deutet darauf hin, dass die Expression dieser Enzyme direkt an der Rekrutierung beteiligt ist. Die Expression von P450scc sowie von P450arom wird wahrscheinlich von FSH induziert (Bao und Garverick, 1998). P450arom ist deshalb so wichtig, weil es den Follikeln ermöglicht, Androgen, welches in den TC unter LH-Einfluss produziert wird, in den GC in Östrogen umzuwandeln (Bao und Garverick, 1998, Driancourt, 2001), das ein entscheidender Faktor für das weitere Wachstum und Reifen der Follikel ist (Drummond, 2006). Das Zusammenspiel zwischen den TC und GC wird auch als Zwei-Zell-zwei-Gonadotropin-Modell bezeichnet (Fortune and Quik, 1988). Östrogen wirkt in den GC anti-apoptotisch und ist mit für die Proliferation der GC sowie für die Differenzierung der GC (durch Förderung der Ausbildung von LHR und Prolaktin Rezeptoren), sowie für eine verstärkte Expression von FSHR zuständig (Drummond, 2006). Östrogen stimuliert zusammen mit FSH in kleinen präantralen Follikeln die Proliferation der GC. Dieser Effekt wird durch IGF-I weiter verstärkt (Bley et al., 1997).

Der rekrutierte Follikel kann unter FSH-Einwirkung Activin und Inhibin produzieren, wie die mRNA Expression der α - und β -Untereinheit dieser Hormone gezeigt hat (Ireland und Ireland, 1994). Follistatin wird ebenfalls von Follikeln der Kohorte erzeugt. Durch die Produktion von Follistatin und Inhibin wird das Verhältnis von Activin und Inhibin immer weiter in Richtung Inhibin verschoben. Somit werden die Follikel von Inhibin dominiert. Inhibin übt eine negative Rückkopplung auf FSH aus. Dadurch sinkt dann FSH, was die Rekrutierung weiterer Follikel verhindert (Campbell und Baird, 2001, Welt et al., 2001).

Weitere lokale Faktoren spielen bei der Rekrutierung eine wichtige Rolle: so IGF I und Follistatin. Die durch Somatotropin induzierte Erhöhung von IGF I führt zu einer größeren Follikelanzahl pro Kohorte (Gong et al., 1991). Follistatin hingegen begrenzt die Größe der Kohorte (Singh et al., 1999). AMH ist bei der zyklischen Rekrutierung ebenfalls von Bedeutung: Es reduziert die Sensitivität der Follikel auf FSH (Visser, 2006). LH scheint dagegen keinen wesentlichen Einfluss auf die Rekrutierung zu haben, denn diese findet sowohl in Phasen mit niedrigem als auch hohem LH-Spiegel statt (Driancourt, 2001).

2.4.3 Selektion

Die Selektion der Follikel ist ein komplexer Prozess, bei dem sich unter Einwirkung von LH und bei fallender Konzentration von FSH, in Abhängigkeit von der Spezies ein oder mehrere dominante Follikel entwickeln. Dabei reduziert sich die Anzahl der rekrutierten

Follikel auf die Zahl, die schließlich ovuliert wird (Siehe Abbildung 2.6). Diese Zahl ist tierartlich unterschiedlich. Beim Rind beispielsweise ovuliert im Normalfall ein Follikel pro Zyklus. Beim Schwein hingegen ovulieren bis zu 20 Follikel pro Zyklus.

Während der Dominanzphase durchlaufen die ausgewählten Follikel das präovulatorische Wachstum und die präovulatorische Reifung. Die übrigen Follikel der Kohorte werden subdominante (SDF) Follikel und atresieren. Zwischen den dominanten Follikeln (DF) und den subdominanten Follikeln besteht ein erheblicher Größenunterschied, die „Follikel Deviation“. Sie gibt den Größenunterschied zwischen dem dominanten und dem nächst größeren subdominanten Follikel an.

Die Selektion ist ein häufig untersuchter biologischer Prozess, der aber bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnte. Jeder rekrutierte Follikel einer Follikelwelle sollte theoretisch die gleiche Chance haben, zum dominanten Follikel zu werden. Diese Aussage wird verdeutlicht durch:

- Eine FSH Anreicherung während der Rekrutierung produziert eine größere Kohorte und eine höherer Anzahl an Follikeln die die Größe eines DF erreicht haben (Fortune, 1994)
- Die Eliminierung des DF führt zum Heranwachsen des nächst größeren Follikels zum DF (Ko et al., 1991)

Viele unterschiedliche Mechanismen sind bei der Selektion der Follikel beteiligt.

Sie lassen sich in extrazelluläre und intrazelluläre Aspekte der Selektion unterteilen. Als extrazelluläre Aspekte werden alle von außen an den Follikel herangetragene Hormone oder Wachstumsfaktoren verstanden. Bei den intrazellulären Aspekten handelt es sich um Vorgänge im späteren dominanten Follikel, die es ihm ermöglichen, intensiver auf die zirkulierenden Konzentrationen von FSH und LH zu reagieren und verstärkt LH-Rezeptoren zu exprimieren. Dabei muss weiter zwischen monoovulatorischen Tieren, die nur einen dominanten Follikel besitzen, und polyovulatorischen Tieren, die mehrere ovulatorische Follikel entwickeln, unterschieden werden. Zu den monoovulatorischen Tieren gehören das Rind und das Pferd. Zu den polyovulatorischen Tieren zählen das Schwein, das Schaf, die Ratte und die Maus.

Die nachfolgenden Mechanismen treffen vor allem auf die monoovulatorischen Tiere Rind und Pferd zu, und laufen bei den anderen Tierarten modifiziert ab.

Die intrazellulären Veränderungen der Follikel vor der Selektion müssen teilweise schon vor einer erkennbaren Selektion stattgefunden haben (Ginther et al., 1996). Zu dem Zeitpunkt der Selektion haben kleinere Follikel noch kein Stadium erreicht, das ihnen eine ausreichende Reaktion auf zirkulierende Gonadotropine ermöglicht. Damit werden diese kleineren Follikel später zu subdominanten Follikeln.

Nachfolgend werden die verschiedenen wichtigen Mechanismen aufgelistet und erläutert, welche an der Selektion der Follikel beteiligt sind:

- Der Abfall von FSH
- Die Bildung von LHR in den GC
- Expression der von Steroid bildenden Enzymen im selektierten Follikel
- Die Größe der Follikel in der Kohorte
- Steroide, die vom Follikel produziert werden: Androgen und Östrogen, vor allem steigendes Östrogen und dadurch bedingt, abfallendes FSH
- Mitglieder der IGF-Familie
- Follistatin, Activin und Inhibin
- Die Vaskularisation der Follikels und die einhergehende Erhöhung der Gonadotropinzufuhr
- Das BMP-7/ActRII/ALK-2 System ist an der Selektion der Follikel beim Rind beteiligt (Shimizu et al., 2006a) (ActRII: Activin Rezeptor Typ II, ALK-2: Anaplastic lymphoma kinase-2)

Von zentraler Bedeutung bei der Follikelselektion ist der Abfall der FSH-Konzentration. FSH ist der Überlebensfaktor der Follikel. Sein Abfall bedeutet für die meisten Follikel Atresie. Die rekrutierten Follikel produzieren im Laufe ihres Wachstums immer mehr Östrogen und Inhibin. Über eine negative Rückkopplung auf die Hypophyse sinkt die FSH Produktion. Der Abfall von FSH ist ein wichtiges Kriterium für die Follikelselektion. Durch exogene FSH-Zufuhr kann der Abfall von FSH und die Selektion von Follikeln verzögert werden (Driancourt et al., 1991). Des Weiteren führt ein Abfall von FSH zu einer raschen Größendifferenz zwischen dem dominanten Follikel (DF) und dem nächstgrößeren subdominanten Follikel (SDF) (Ginther et al., 1996). Trotz dieser Erkenntnisse über die Bedeutung von FSH bei der Selektion, ist der genaue Mechanismus der Follikelselektion noch nicht vollständig geklärt. Möglicherweise weist der DF durch eine bevorzugte Lage im Ovar

eine bessere Blutversorgung auf und erhält dadurch mehr FSH. Der Grund, warum der DF in der Kohorte der Follikel eine Sonderstellung einnimmt, ist nicht ganz klar. Möglicherweise hat er einen speziellen zellulären Mechanismus entwickelt, der ihm die weitere Reifung trotz fallender FSH-Werte erlaubt. Dies könnte durch die verstärkte Expression von LHR in den GC sowie die verstärkte Expression von FSHR bedingt sein.

Zu den intrafollikulären Mechanismen der Follikelselektion gehören unter anderem folgende:

Expression von LHR in den GC. Ab einer Größe von 4 mm beim Schaf, 5-6 mm beim Schwein und 8 mm beim Rind bilden die GC LH-Rezeptoren (LHR) aus (Driancourt, 2001). Beim Rind wird diese Expression von LHR in den GC von einer Expression der 3 β -HSD (3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase) in den GC begleitet (Bao und Garverick, 1998). Für viele Autoren ist die Expression von LHR in den GC eine wesentliche Bedingung, die die Selektion ermöglicht. Sie erlaubt den Follikeln, sich trotz fallender Konzentration an FSH weiter zu entwickeln. Dadurch bekommen die selektierten Follikel einen Vorteil und werden zu den DF. Allerdings gibt es Autoren, die hierzu abweichende Ansichten vertreten. So stellt sich die Frage, ob zuerst die Selektion des DF oder die Expression von LHR auftritt (Fortune et al., 2004). Fortune et al. (2001) fanden in ihrem Versuch an Follikeln des Rindes heraus, dass die Expression von LHR erst nach der Selektion stattfindet. Ähnliche Resultate von Evans et al. (1997) beim Rind ergaben, dass die Expression der Gonadotropin-Rezeptoren während der Selektion sich nicht verändert, und somit nicht als Schlüsselmechanismus in Frage kommt. Im Gegensatz dazu stehen die oben erwähnten Beobachtungen von Bao et al. (1998) und Webb et al. (1999; 2003), die einen zeitlichen Zusammenhang zwischen der Follikelselektion und der Expression von LHR feststellen konnten. Wenn die LH-Rezeptoren in den GC mit LH besetzt werden, induzieren sie wie auch FSH in den GC, die Expression von Adenylatzyklase und damit eine vermehrte Bildung von cAMP. Somit hat LH in den selektierten Follikel die gleiche Wirkung wie FSH. Dies ermöglicht die weitere Reifung des DF (Zeleznik, 2004).

Es ist also unklar, ob die Selektion der Follikel oder die Expression von LHR zuerst auftritt, oder beide Phänomene zeitgleich stattfinden. Diese Frage bedarf weiterer Klärung.

Der selektierte Follikel weist außerdem eine erhöhte Expression der mRNA für LHR und für die an der Steroidogenese beteiligten Enzyme P450scc, P450c17, 3 β -HSD and StAR in den TC sowie eine erhöhte Expression der Enzyme P450scc and P450arom in GC auf. Die erhöhte Enzymexpression ist von großer Bedeutung, da sie zu einem hohen

Östradiolspiegel führt. Trotz dieses Anstieges der Enzyme kann der selektierte Follikel in seinen frühen Stadien häufig nicht eindeutig an Hand dieser erhöhten Enzymexpressionen von den anderen Follikeln unterschieden werden (Bao und Garverick, 1998). Trotz allem ist diese erhöhte Expression von großer Bedeutung, da sie zu einem hohen Level von Östradiol führt, welcher das Überleben und die Entwicklung des selbigen fördert.

Generell wird angenommen, dass der selektierte Follikel der größte Follikel der Kohorte ist (Ginther et al., 1996). Da aber alle Follikel funktionell unterschiedlich sind, ist auch diese Annahme nicht bewiesen (Driancourt, 2001). Der Größenunterschied zwischen dem späteren DF (d.h. dem größten Follikel der Kohorte) und dem späterem größten SDF (d.h. dem zweitgrößten Follikel der Kohorte) ist sehr klein, und nicht immer ein genauer Indikator für die spätere Follikeldominanz (Fortune et al., 2001).

Der selektierte Follikel sezerniert eine große Menge an Östrogen. Nach der Auflösung des Corpus luteum besteht ein reziprokes Verhältnis zwischen der Konzentration an FSH und der Konzentration an Östrogen. FSH wird über negative Rückkopplung von Östrogen reguliert. Die Follikel der Kohorte aktivieren bei ihrer Rekrutierung die P450arom und bekommen damit die Fähigkeit, Östrogene aus Androgen zu bilden (Bao und Garverick, 1998). Die selektierten Follikel besitzen zudem das Enzym 3β -HSD und sind somit in der Lage, Androgen vermehrt herzustellen (Bao und Garverick, 1998). Mit dem Wachstum der Follikel nimmt ihre Fähigkeit Östrogen zu synthetisieren zu und die Konzentration von Östrogen steigt an. Dies wirkt sich negativ auf die FSH-Konzentration aus. Die Konzentration von FSH sinkt dadurch unter einen kritischen Schwellenwert, der das weitere Wachstum der Follikel verhindert und die rekrutierten Follikel atresieren. Alle bis auf den selektierten Follikel, der wahrscheinlich LHR in den GC exprimiert und so die durch den FSH-Abfall bedingte Atresie umgehen kann (Rind, Primaten) (Zeleznik, 2004), gehen zugrunde. Beim Schaf verläuft der Mechanismus des Überlebens von dominanten Follikel etwas anders, da pro Follikelwelle zwei bis vier dominante Follikel auftreten (Duggavathi et al., 2004). Dies trifft auch für das Schwein zu, bei dem ebenfalls mehrere Follikel pro Welle zu dominanten Follikeln werden.

Das IGF-System ist für die Follikelentwicklung sehr wichtig und beim Rind sogar maßgeblich an der Selektion der Follikel beteiligt. Nach Fortune et al. (2004) wird im späteren DF, schon bevor der dominante Follikel durch seine Größe erkennbar wird, als Antwort auf die FSH-Stimulierung, das Pregnancy associated plasma protein-A (PAPP-A) vermehrt exprimiert. PAPP-A führt dann, über eine Reduktion von IGFBP-4 zu einer erhöhten

Konzentration von intrafollikulärem IGF, welches sodann in Synergie mit FSH einen schnellen Anstieg von Östradiol bewirkt. Dieses Östradiol führt über eine negative Rückkopplung zu einem FSH-Abfall (Fortune et al., 2004) und ist so in die Follikelselektion involviert.

Die genaue Rolle des Activin/Inhibin/Follistatin Systems bei der Selektion des DF ist nicht geklärt. Sicher erscheint, dass Inhibin die LH-induzierte Androgenproduktion in bovinen TC sowie die FSH-induzierte Östradiol-Produktion in GC des Schafes verstärkt (Campbell und Baird, 2001). Das Activin-bindende Protein Follistatin wird ebenfalls vermehrt in selektierten Follikeln produziert, wodurch das Activin/ Inhibin-Verhältnis sich in Richtung Inhibin verschiebt (Driancourt, 2001). Resultate anderer Studien ergaben jedoch, dass bei unterschiedlich großen Follikeln keine Unterschiede in der Inhibin A oder Inhibin B Expression zu finden waren. Somit ist die Rolle von Activin/Inhibin/Follistatin für die Follikelselektion noch relativ unklar. Eventuell ist der intrafollikuläre Quotient von Activin zu Follistatin und von Activin zu Inhibin für die Follikelselektion von Bedeutung (Beg und Ginther, 2006).

Die follikuläre Produktion von VEGF könnte ebenfalls eine Rolle für die unterschiedliche Größenzunahme der heranwachsenden Follikel spielen (Garrido et al., 1993). Allerdings ist dies bislang für Haussäugetiere noch nicht exakt nachgewiesen worden. Eine erhöhte Vaskularisation könnte dem Follikel einen Wachstumsvorteil verschaffen und ihn vermehrt mit Wachstumsfaktoren, Substraten für die Steroidsynthese und Nährstoffen versorgen, die der Follikel für ein weiteres Wachstum benötigt (Beg und Ginther, 2006).

Die Rolle von BMP-7 in der Follikelentwicklung, insbesondere zum Zeitpunkt der Selektion, wurde von Shimizu et al. (2006) untersucht. Nachdem sich die Expression von BMP-7 in TC von präovulatorischen Follikeln und postovulatorischen Follikeln unterscheidet, haben diese Autoren untersucht, ob die Rezeptoren für BMP-7, ActRII und ALK-2 im Laufe der Follikelentwicklung, insbesondere während der Follikelselektion, variieren. Dabei fanden sie heraus, dass Östrogen eindeutig die Expression der Rezeptoren für BMP-7 im Laufe der Follikelentwicklung reguliert. Daher ist anzunehmen, dass BMP-7 wesentlich an der Entwicklung der Follikel beteiligt ist. Die mögliche Bedeutung von LH in der Expression der Rezeptoren für BMP-7 ist noch nicht untersucht worden.

Tabelle 2.2

Größe der Follikel Angaben in mm	Maus	Schaf	Rind	Schwein
Rekrutierbarer Follikel	0,2	2	4	1
Follikelgröße bei Expression von P450arom		2	3-4	
Selektierbarer Follikel		4	8	5-6
Ovulationsfähiger Follikel		8-10	15 >-20	6-7
Magnitude of Dominance		2-3	3-4	8

Angaben in mm, LH-R: LH Rezeptor, P450arom: P 450 Aromatase

2.4.4 Follikeldominanz

Beim Rind wird immer ein DF auf die Ovulation vorbereitet. Er zeichnet sich durch verstärktes Wachstum und eine zunehmende Sekretion von Östrogen und Inhibin aus. Beides hemmt FSH durch negative Rückkopplung, wodurch die subdominanten Follikel atresieren. Zusätzlich sezernieren die GC des DF vermehrt VEGF, wodurch die Angiogenese in den TC und dadurch die Blutzufuhr zum DF erhöht wird (Garrido et al., 1993). Dies bewirkt eine verstärkte Versorgung des DF mit FSH und LH. IGF ist ebenfalls vermehrt verfügbar, wodurch die Bildung von LHR verstärkt wird (Driancourt, 2001). Hinzu kommt eine gesteigerte Sensivität des DF für FSH durch vermehrte Expression von FSHR, wodurch ein weiterer Selektionsvorteil entsteht.

Weiter besteht die Annahme, dass der DF Faktoren sezerniert, die andere antralen Follikel atresieren lassen. Zu diesen Atresie-Faktoren zählen $TGF\alpha$, Inhibin, Superoxiddismutase und HSP 90 (Heat shock protein 090), die sämtlich die FSH-induzierte Aromatase-Aktivität herabsetzen können (Driancourt, 2001).

In den GC üben LH und FSH ihre Wirkung über denselben Signaltransduktionsweg aus. Somit führt die Entwicklung der LH-Rezeptoren in den GC dazu, dass der DF weit weniger FSH abhängig ist, als subdominante Follikel. Bei Primaten ist der DF bei seinem weiteren Wachstum weitestgehend FSH-unabhängig. Bei den Wiederkäuern allerdings braucht der DF eine Schwellenkonztration von FSH um weiter wachsen zu können (Picton und McNeilly, 1991).

Im dominanten Follikel wird die Oozyte (Ooc) von Oozyten-assoziierten GC umgeben, die auch Cumuluszellen genannt werden. Sie bildet mit ihnen den Cumulus-Oozyten-komplex (COC). Dieser COC ist durch einen Sockel von GC mit den muralen GC

verbunden. Die Ooc ist für die Entwicklung des DF essentiell, da der Verlust oder die Entfernung der Ooc zu einer verfrühten Luteinisierung und hohen Progesteron-Konzentrationen in den GC führt, während weiter Östrogen produziert wird (van den Hurk und Zhao, 2005). Dies bedeutet, dass ein oder mehrere Oozyten sezernierte Faktoren die Steroidproduktion in den GC regulieren. Ihre Identität ist noch unklar, aber sie haben ein niedriges Molekulargewicht und sind hitzestabil (Vanderhyden, 1996). Daher kommt BMP-15 für diese Funktion nicht in Frage, obwohl BMP-15 die FSH-induzierte Progesteronproduktion hemmt.

2.4.5 Zyklischer Verlauf der Follikelentwicklung

Die Follikelentwicklung verläuft bei den meisten geschlechtsreifen Haussäugetieren wellenförmig, wobei 2-4 Wellen beim Rind, 3-4 Wellen beim Schaf, 4-5 Wellen bei der Ziege und 1-2 Wellen beim Pferd beobachtet werden (Driancourt, 2001). Beim Schwein dagegen findet die Follikelentwicklung kontinuierlich statt (Knox, 2005).

Beim Rind läuft die Follikelentwicklung in mehreren Wellen (2-4) innerhalb von 7-9 Tagen ab. Bei jeder Welle treten 7-11 Follikel in eine gemeinsame Wachstumsphase ein (4 mm Durchmesser), die ca. drei Tage dauert. Danach wächst ein Follikel schneller als die übrigen und wird dominant (Ginther et al., 2003). Jede Follikelwelle wird von einem FSH-Peak ausgelöst (Adams, 1999), der wiederum auf der Regression des DF beruht. Der DF hemmt direkt durch Abgabe verschiedener Faktoren (Driancourt, 2001) sowie indirekt über die (durch negative Rückkopplung von Inhibin und Östrogen an der Hypophyse bedingten) Hemmung der FSH-Sekretion das Wachstum weiterer Follikel und das Entstehen einer neuen Welle. Die direkte hemmende Wirkung des DF auf die Entwicklung weiterer Follikel ist beim Rind unter anderem durch Versuche mit physiologischer FSH-Gabe, die das Auftreten einer neuen Follikelwelle verhindert, gezeigt worden (Adams, 1999).

Beim Schaf treten typischerweise 3-4 Wellen pro Zyklus auf. Sie sind alle 3-5 Tage zu beobachten und ihnen geht, wie beim Rind, ein FSH-Peak voraus. Allerdings gibt es beim Schaf keinen DF Follikel, der wie beim Rind das Wachstum der anderen unterdrückt. Dadurch wachsen teilweise zwei oder mehr Follikel gleichzeitig pro Welle heran und es können der antrale Follikel der letzten und der vorletzten Welle gleichzeitig ovulieren (Duggavathi et al., 2004). Somit scheint der größte antrale Follikel beim Schaf nicht den gleichen hemmenden Einfluss wie der DF beim Rind auszuüben. Dies wurde vor allem durch Versuche klar, bei

denen die FSH-Gabe zu einer neuen Welle führte, obwohl ein gut ausgebildeter DF vorhanden war (Duggavathi et al., 2004).

Beim Schwein besteht die Besonderheit, dass die Follikelentwicklung auch bei Anwesenheit eines C.I. stattfindet. Zusätzlich sind hier keine Follikelwellen erkennbar, sondern die Follikel entwickeln sich kontinuierlich aus einem Pool selektierbarer Follikel bis zum mittleren Follikeldurchmesser (>6,5 mm) in der lutealen Phase. Die Entwicklung zum großen antralen Follikel (6.5 mm-10 mm) findet nach der Luteolyse statt (Knox, 2005). FSH ist hier an dem Erhalt eines Pools mittelgroßer Follikel, die von LH selektiert werden und ovulieren können, beteiligt. Die Selektion findet hier durch einen Shift von FSH zu LH statt. Weiter besteht die Vorstellung, dass die Follikel um bestimmte Selektionsfaktoren wie EGF (Epidermal growth factor), NGF (Nerve growth factor), IGF (Insulin-like growth factor), Activin und Östradiol sowie um die Atresie-Faktoren Testosteron, GnRH, Inhibin und Interleukin konkurrieren (Knox, 2005).

Bei allen drei Tierarten (Rind, Schaf und Schwein) haben Faktoren aus der unmittelbaren Umgebung der Follikel und Ernährung der Tiere wesentlichen Einfluss auf die Ovulationsrate, aber auch genetische Faktoren (z.B durch spezifische Züchtungen) spielen eine Rolle (Hunter et al., 2004).

Bei Schweinen (Flowers et al., 1989) und Schafen (Downing und Scaramuzzi, 1991) wurden nahrungsbedingte erhöhte pulsatile LH-Ausschüttungen gefunden.

Es gibt bestimmte Zuchtlinien, die höhere Ovulationsraten als andere aufweisen. Beim Schaf handelt es sich unter anderem um die die Rassen Booroola, Inverdale, Romanov und Finnish Landrace, beim Schwein um das Chinese Meishan Pig (C.M.Pig). Hier sind die höheren Ovulationsraten unter anderem durch Unterschiede in der Genexpression von Oozyten-sezernierter Faktoren wie BMP-15 und GDF-9 (Booroola, Inverdale) sowie durch Ovulation kleinerer Follikel bedingt (C.M.Pig, chinese meishian Pig).

2.4.6 Tierartliche Unterschiede

Zwischen verschiedenen Tierarten bestehen deutliche Unterschied im Zyklus sowie in der Anzahl der ovulierenden Follikel. So wird beim Menschen und beim Rind pro Zyklus im Regelfall nur ein ovulierender Follikel gebildet. Beim Schaf und beim Schwein hingegen tritt eine größere Zahl an ovulierenden Follikeln pro Zyklus auf. Weiterhin bestehen in der Anzahl der Rekrutierungswellen Unterschiede zwischen den Tierarten. So haben Rind, Schaf und Ziege mehrere Wellen pro Zyklus und diese Wellen finden auch schon in der lutealen Phase

des Zyklus statt (Xu et al., 1995). Die zum Zeitpunkt der lutealen Phase gebildeten DF ovulieren nicht sondern atresieren und geben damit den Weg frei für eine neue Follikelwelle. Beim Rind ovuliert der DF der letzten Welle. Dies entspricht dem Zeitpunkt der Luteolyse und somit dem Abfall von Progesteron. Dadurch sinkt die hemmende Wirkung von Progesteron auf die Expression der Gonadotropine, wodurch diese wieder ansteigen kann. Der DF einer jeden Follikelwelle kann ovulieren, wenn dies hormonell unterstützt wird (Fortune et al., 2001).

Bei der Ratte, dem Schwein und den Primaten besteht eine Entwicklung über das Stadium des kleinen antralen Follikels hinaus und somit die Entwicklung eines DF nur während der folliculären Phase eines jeden Zyklus.

Tabelle 2.3 Zyklus und tierartliche Besonderheiten

	Maus	Ratte	Schaf	Rind	Schwein
	Po	Po	Po	Mo	Po
Rekrutierungs-fenster		1 Tag	1 Tag	2 Tage	
Anzahl der Follikel-Wellen	1	1	3-4	2-3, teilweise 4	1
Anzahl der Follikel pro Kohorte				3-10	10-15 Jungsauen 15-25 Altsauen
Anzahl ovulierender Follikel			1-??	1	10-11

Po: Polyovulatorisch; Mo: Monoovulatorisch

2.5 Tabelle Follikelgröße

Es gibt verschiedene Einteilungen und Klassifizierungen der Follikel. So gibt es die Unterscheidung in Gonadotropin-unabhängige und Gonadotropin-abhängige Follikel. Weiter werden präantrale und antrale Follikel unterschieden, wobei einige Autoren zwischen frühen, späten und mittleren antralen Follikeln differenzieren.

Die in den folgenden Kapiteln gewählte Klassifikation lehnt sich an jene von Lundy et al. (1999) an.

Tabelle 2.4 Klassifikation der Follikel

Typ 1	Primordialfollikel
Typ 1a	Übergang zwischen Primordial- und Primärfollikel, Transitionsfollikel
Typ 2	Primärfollikel
Typ 3	Sekundärfollikel, kleiner präantraler Follikel
Typ 4	großer präantraler Follikel
Typ 5	antraler Follikel

3 Endokrine Faktoren der Follikulogenese

3.1 Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH)

3.1.1 Struktur von GnRH

GnRH (Gonadotropin releasing hormone, Gonadoliberin) ist ein von den GnRH-Neuronen des Hypothalamus produzierter Botenstoff. Er ist besonders für die Regulation der Sekretion von FSH und LH zuständig. Die GnRH-Neurone stammen aus der olfaktorischen Plakode (Schwanzel-Fukuda und Pfaff, 1989) und wandern im Laufe der frühen fetalen Entwicklung in das rostrale Vorderhirn ein. Sie erreichen ihr endgültiges Zielgebiet kurz vor der Geburt (Jennes und Conn, 1994). Bei der Geburt sind die Axone der GnRH-Neurone noch sehr kurz und entwickeln sich während ersten zwei bis drei postpartalen Wochen weiter (Jennes und Conn, 1994). Es gibt beim Menschen circa 1500-2000 GnRH Neurone.

GnRH wurde erstmals von den Arbeitsgruppen von Schally (Schally et al., 1971) und Guillemin (Guillemin, 1977) isoliert und seine Struktur völlig aufgeklärt. Dafür bekamen die Autoren im Jahre 1977 den Nobelpreis verliehen. GnRH ist ein Dekapeptid und existiert bei den Haussäugetieren in verschiedenen Isoformen. Beim Menschen wurden hingegen nur zwei Isoformen gefunden (King und Millar, 1980, Neill, 2002). Das Gen für GnRH-I ist beim Menschen auf Chromosom 8p21-p11.2 lokalisiert, das für GnRH-II auf Chromosom 20p13 (Wierman ME, 1996, Limonta et al., 2003, Harrison et al., 2004).

Tabelle 3.1 AS-Sequenz, welche an dem Aufbau der GnRH beteiligt sind

Faktor	Aminosäuresequenzen	Quelle
GnRH-I	pGlu-His-Trp- Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂	Millar et al., 2001
GnRH-II "chicken-GnRH"	pGlu-His-Trp-Ser-His-Gly- Trp-Tyr-Pro-Gly-NH ₂	Counis et al., 2005

Abkürzungen:

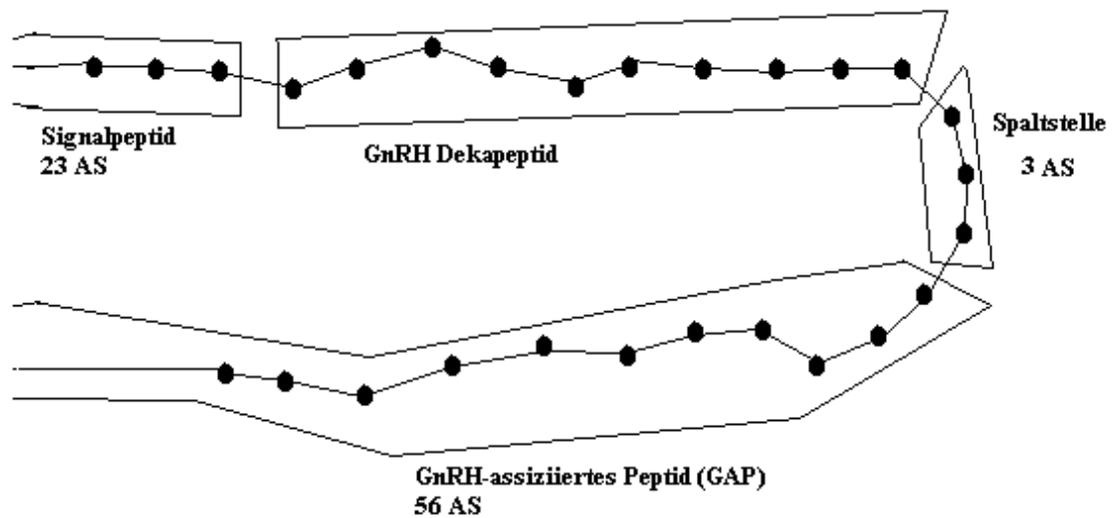
Glu:	Glutamin	Ser	Serin
His	Histidin	Tyr	Tyrosin
Trp	Triptophan	Gly	Glycin
Leu	Leucin	Arg	Arginin
Pro	Prolin		

GnRH-II wurde erstmals im Gehirn des Huhns gefunden (chicken-GnRH). GnRH-II ist hoch-konserviert und wird vom Fisch bis zum Homo Sapiens exprimiert. Im Menschen wurde die Expression von GnRH-II von White et al. gezeigt (White et al., 1998). Seine genaue Funktion bei den Säugetieren ist nicht geklärt (Hapgood et al., 2005). GnRH-III (Millar et al., 2001) wurde bisher nur beim Neunauge nachgewiesen.

GnRH wird als pre-pro-GnRH sezerniert, welches beim Menschen aus 92 AS (Aminosäuren) besteht. Es enthält ein 23 AS langes Signal Peptid, gefolgt von dem GnRH Dekapeptid, einer drei AS langen Spaltstelle und einer 56 AS langen Region, die als GAP (GnRH associated peptid) bezeichnet wird (Harrison et al., 2004).

Die posttranslationelle Prozessierung verläuft in mehreren Schritten: Spaltung durch eine Prohormon-Konvertase, Entfernen von AS durch eine Karboxypeptidase, Modifikation des Aminoende durch eine Glutamylzyklase sowie Modifikation des Karboxyl-Ende durch eine Monooxygenase (MO) (Wierman ME, 1996, Limonta et al., 2003). Dieser enzymatische Prozess erzeugt GnRH und GAP. Für GAP wurde noch keine physiologische Funktion ermittelt.

Abbildung 3.1 Prepro-GnRH und seine Untereinheiten



GnRH wird von Neuronen des Hypothalamus sezerniert und in die Portalgefäße abgegeben. Es gelangt über das hypothalamo-hypophysäre Pfortadersystem in den Hypophysenvorderlappen. Dort reguliert es die Synthese und die Expression der Gonadotropine LH und FSH. Die Expression von GnRH-I und GnRH-II auch in Organen wie der Niere, dem Knochenmark und der Prostata deutet auf weitere autokrine, parakrine und endokrine extrahypophysäre Funktionen für das GnRH und GnRH-R (Hapgood et al., 2005).

GnRH wird pulsatil ausgeschüttet und wirkt an den GnRH-Rezeptoren (Knobil, 1988, Knobil, 1990). Man spricht von einem GnRH-Pulsgenerator. Dieser ist neonatal aktiv wird aber nach der Geburt bis zur Geschlechtsreife unterdrückt. Bei diesen Prozessen spielt GABA eine zentrale Rolle (Terasawa und Fernandez, 2001). Die pulsatile Ausschüttung ist von zentraler Bedeutung für die Gonadotropin-Sekretion. Versuche mit GnRH-Analoga und Antagonisten haben gezeigt, dass sich eine kontinuierliche Stimulation durch GnRH negativ auf die Produktion von LH und FSH auswirkt (Neill, 2002).

3.1.2 Biosynthese und Sekretion von GnRH

Die GnRH-Neuronen des Hypothalamus sind an der Regulation des Fortpflanzungsgeschehens entscheidend beteiligt. Sie sind in ein komplexes Netzwerk von anderen Nervenzellen integriert, die Neurotransmitter, Neuropeptide, Zytokine und Wachstumsfaktoren freisetzen, welche die Biosynthese und Sekretion von GnRH modulieren

(z.B. GABAerge-Neurone, Astrozyten, etc. Dieses Netzwerk wurde von Knobil, einem der Pioniere der neuroendokrinen Forschung, als GnRH-Pulsgenerator bezeichnet) (Knobil, 1990).

Eine präzise eingestellte, von Spezies zu Spezies geringfügig variierende GnRH-Pulsfrequenz ermöglicht eine ausreichende Gonadotropin-Sekretion. Auf den Pulsgenerator wirken vielfältige interne und externe Signale. Zu den internen Signalen gehören die intrinsischen Rhythmen, der metabolische Zustand sowie das hormonelle Milieu. Externe, von der Umwelt stammende Signale sind zum Beispiel Stress, Licht und Temperatur.

Die Expression von GnRH wird von vielen autokrinen und parakrinen Faktoren beeinflusst. Die ovariellen Östrogene können kontextabhängig eine positive oder negative Wirkung auf die Sekretion von GnRH ausüben. Normalerweise übt Östrogen eine negative Wirkung auf die GnRH-Expression aus. Allerdings verändert sich diese Rückkopplung zu einer positiven gegen Ende der folliculären Phase und bedingt damit einen GnRH-Peak (Christian und Moenter, 2007). GnRH übt seinerseits eine positive Wirkung auf die Sekretion von FSH und LH aus, was die Expression von Östrogen positiv beeinflusst. Somit ist hier eine negative/positive Rückkopplungsschleife gegeben (Clarke, 1988). Hingegen ist noch ungeklärt, ob die GnRH-Neurone Östrogenrezeptoren (ER) exprimieren (Wintermantel et al., 2006). Allerdings zeigen ER-Knock-out Mäuse keine normale homeostatische Regulation der GnRH/LH-Achse und sind infertil (Couse und Korach, 1999). Damit scheint sicher, dass Östrogen bei der Regulation der GnRH-Sekretion eine Rolle spielt.

Progesteron und Testosteron stellen zwei weitere Steroide dar, welche die Expression von GnRH beeinflussen. Auch sie wirken indirekt über afferente Neurone, die über Neurotransmitter die GnRH-Neurone stimulieren. Progesteron übt, wie auch Östrogen, einen negativen Feedback auf GnRH aus, allerdings wirkt dieser eher auf die GnRH-Sekretion als auf die GnRH-Expression (Robinson et al., 2000). Weiterhin ist ein "Progesteron-Priming" für den positiven Feedbackmechanismus von Östrogen essentiell (Caraty und Skinner, 1999).

Da die GnRH-Neurone wahrscheinlich keine Steroidrezeptoren aufweisen, wird die Wirkung der Steroide indirekt über andere Neurone, die Steroidrezeptoren exprimieren, vermittelt. Dazu gehören aminerge, peptiderge sowie GABAerge Neurone. Des Weiteren kommen auch Gliazellen als Transmitter der steroiden Wirkung in Frage.

Dies soll am Beispiel GABAerger Neurone kurz dargestellt werden: hypothalamische GABAerge Zellen exprimieren ER, und GnRH-Neurone exprimieren den GABA_A-Rezeptor. Über den GABA_AR können, je nach intrazellulärer Chlorid-Konzentration, die Zellen

entweder stimuliert oder inhibiert werden. Östradiol inhibiert die Weiterleitung von GABA während seiner negativen Rückkopplung und wirkt somit negativ auf GnRH, aber erhöht sie während des LH/GnRH Peaks und übt zu dem Zeitpunkt eine positive Rückkopplung auf GnRH aus (Christian und Moenter, 2007). Allerdings ist es sehr unwahrscheinlich, dass GABA allein die Feedbackwirkung von Östrogen vermittelt. GABA wirkt eher im Zusammenspiel mit anderen Faktoren. Die genaue Kenntnis der Wirkung von GABA bei der Transmission der Signaltransduktion von Östradiol sowie die Bestimmung der anderen beteiligten Faktoren stehen noch aus. Dies wäre für das Verständnis der neuronalen Reproduktionskontrolle von Bedeutung. Es würde, durch Einblick in die Regelkreise, helfen, krankhafte Veränderungen, wie das polyzystische ovarielle Syndrom (PCOS), besser zu verstehen.

Ein weiterer Faktor, der die Expression von GnRH positiv beeinflusst, ist GnRH selbst. Diese Regulation wird als "Ultrashort-Feedback" bezeichnet. Sie setzt allerdings die Expression von GnRH-Rezeptoren in den GnRH Neuronen voraus. Diese ist bisher nur bei Nagern und bei Primaten nachgewiesen (Thind und Goldsmith, 1988, Jennes et al., 1997, Witkin, 1999).

Ein lokaler, im Gehirn produzierter Faktor, der sich an der Sekretion von GnRH beteiligt, ist TGF β . Dies wurde in Versuchen, bei denen Gliazellen mit einem Antikörper gegen TGF β 1 inkubiert wurden, gezeigt. Diese Inkubation führte zu einer signifikanten Reduktion der GnRH-Sekretion. Hingegen führt die Inkubation von GnRH Neuronen mit TGF β 1 zu einer erhöhten GnRH-Sekretion (Melcangi et al., 1995).

Weiterhin sind die von den Astrozyten sezernierten Faktoren TGF α und bFGF von Bedeutung. Beide beeinflussen die Sekretion von GnRH. Es ist sehr wahrscheinlich, dass Östrogen indirekt über diese beiden Faktoren auf die GnRH-Neurone wirkt (Melcangi et al., 2001).

Activin und Follistatin sind ebenfalls Faktoren, die für die autokrine Regulation des GnRH-Pulsgenerators in Frage kommen. Activin, wie auch Follistatin, wird von den GnRH-Neuronen sezerniert und übt sogleich eine autokrine Wirkung über eine ultra-kurze Rückkopplungsschleife auf die GnRH-Neurone aus. Activin scheint zwar nicht an der Erzeugung der GnRH-Pulse beteiligt zu sein, aber dieser autokrine Faktor moduliert wahrscheinlich die GnRH-Pulsfrequenz und/oder deren Amplitude (MacConell et al., 1998).

Bedingt durch die wechselnde Konzentration an ovariellen Steroiden während des Sexualzyklus verändert sich in weiblichen Tieren die Aktivität der GnRH-Neurone. Die

maximale Expression und Sekretion von GnRH ist perioovulatorisch zu finden. Wie schon beschrieben, sind die primären Modulatoren der GnRH-Expression und Sekretion Östradiol sowie die Wachstumsfaktoren TGF β 1, TGF α und bFGF. An den GnRH-Pulsen selbst sind die Östrogene nicht beteiligt, sie beeinflussen allerdings indirekt über GABA die Amplitude sowie die Frequenz dieser Pulse (Melcangi et al., 2001).

Neurotransmitter, welche an der Entstehung sowie an der Modulierung der GnRH-Pulse beteiligt sind, sind Noradrenalin, Dopamin, Glutamat, Endorphin sowie Stickstoffmonoxid. Weitere Faktoren, die die GnRH-Sekretion beeinflussen sind Leptin, olfaktorische Stimuli sowie die Photoperiode.

Der Leptin-Pegel ist eng an die Nahrungsmittelzufuhr gekoppelt. Menschen, die ihre Nahrungsmittelzufuhr stark reduzieren, haben einen gestörten Leptin-Haushalt und veränderte Leptinwerte, welche wiederum den Zyklus beeinflussen (Caprio et al., 2001, Tena-Sempere, 2007).

Bei einigen Tieren spielen olfaktorische Stimuli für die LH-Sekretion eine große Rolle. So führt beim Schaf zum Beispiel die Anwesenheit eines männlichen Tieres zu einer erhöhten GnRH-Ausschüttung und zur Induktion eines LH-Peaks.

Die Photoperiode übt ebenfalls eine starke Wirkung auf die GnRH-Sekretion aus. So sind viele Tiere saisonal polyöstrisch (Schaf, Ziege, Pferd, Katze, Fledermaus, Eichhörnchen, Igel, Frettchen, Nerz und Wildschwein) und reagieren mit einer gesteigerten GnRH-Ausschüttung auf eine verlängerte oder eine verminderte Tageslichtlänge. So wird der GnRH-induzierte LH-Peak beim Pferd durch eine verlängerte Photoperiode ausgelöst. Beim Schaf hingegen führt eine verminderte Photoperiode zur Induktion der Zyklen.

Table 3.2 Faktoren, die die GnRH-Sekretion beeinflussen

Faktor	Wirkung	Autoren
GnRH	GnRH übt einen positiven Feedback-Mechanismus auf die GnRH-Expression aus	Jennes et al., 1997 Witkin, 1999
Östrogen Progesteron Testosteron	Indirekte Wirkung über afferente Neurone Östrogen übt im Allgemeinen ein negatives Feedback auf GnRH aus, außer gegen Ende der folliculären Phase. Progesteron übt ebenfalls ein negatives Feedback auf GnRH aus	Bakker und Baum, 2000 Chrstitian und Moenter, 2007 Robinson et al., 2000
Activin Inhibin	Activin und Follistatin werden lokal in dem Hypothalamus produziert und wirken sich auf die Pulsamplitude und -frequenz aus	MacConnel et al., 1998
TGF α TGF β bFGF	erhöht als lokal sezernierter Faktor die GnRH Sekretion TGF β und bFGF beeinflussen ebenfalls positiv die Expression von GnRH	Melcangi et al., 1995 Melcangi et al., 2001
Photoperiode Leptin	Die Photoperiode übt je nach Tierart eine positive oder auch negative Wirkung auf den Zyklus aus. Durch unterschiedliche Nahrungsmittelzufuhr veränderte Leptinwerte beeinflussen den Zyklus	Bakker und Baum, 2000 Caprio et al., 2001 Tena-sempere, 2007

GnRH: Gonadotropin releasing hormone, TGF α : Transforming growth factor α , bFGF: basic fibroblast growth factor, TGF β : Transforming growth factor β

3.1.3 Gonadotropin-releasing Hormone Rezeptor (GnRH-R)

Es gibt mindestens zwei GnRH-Rezeptoren (GnRH-R): GnRH-RI und GnRH-RII. Beide GnRH-Isoformen können an beide Rezeptoren binden, jedoch weist GnRH-RI eine 48-fach höhere Affinität für GnRH-I und GnRH-RII eine 421-fach höhere Affinität für GnRH-RII auf (Millar et al., 2001, Gault et al., 2003).

Die Genstruktur von GnRH-R-I wurde bei der Maus, beim Schwein, beim Menschen und beim Schaf charakterisiert (Zhou und Sealfon, 1994, Fan et al., 1995, Campion et al., 1996, Jiang et al., 2001). Die GnRH-R-Gene dieser Spezies besitzen einen hohen Grad an Homologie der kodierenden Region. Sie bestehen aus drei Exons, welche durch zwei Introns getrennt werden (Hapgood et al., 2005).

Beim Menschen befindet sich das Gen für GnRH-RI auf Chromosom 4, und es gibt zwei Genkandidaten für GnRH-RII. Der erste liegt auf Chromosom 1, der zweite auf Chromosom 14 (Neill, 2002, Millar, 2003). Sowohl die Transkripte von GnRH-RI als auch von GnRH-RII sind in den hypophysären als auch in einigen extrahypophysären Geweben, z.B. in der Milchdrüse, nachweisbar (Hapgood et al., 2005).

Seit Mitte der achtziger Jahre wird der GnRH-Rezeptor (GnRH-R) zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren gerechnet (Andrews et al., 1986). Er besteht aus sieben transmembranösen alpha-Helix-Anteilen (Heptahelikale Struktur), die eine Ligandenbindende-Tasche bilden und aus drei extrazellulären Schleifen, die für die Ligandenbindung

und die Signaltransduktion wichtig sind (Millar et al., 2004). Das auffälligste Merkmal des Säugetier-GnRH-RI ist das Fehlen des zytoplasmatischen C-Endes. Das C-Ende ist bei den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR, G-Protein-coupled Receptor) die Zielstruktur für die GPCR-Kinasen. Sie inaktivieren dort den Rezeptor (Ferguson et al., 1996). Da dieser Anteil dem GnRH-RI fehlt, können die GPCR-Kinasen den GnRH-Rezeptor nicht inaktivieren.

Wie bereits erwähnt, gehört der GnRH-Rezeptor zur Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Das durch die Bindung des Liganden an den Rezeptor aktivierte G-Protein aktiviert die Phospholipase C (PLC, β -Isoform). PLC spaltet Phosphatidylinositol-triphosphat (PIP₃) in Diacylglycerol (DAG) und 1,4,5 Inosit Triphosphat (IP₃). IP₃ entleert die intrazellulären Ca⁺⁺-Speicher. DAG stimuliert zusammen mit PKC (Protein Kinase C) den Ca⁺⁺-Einstrom über die spannungsabhängigen Ca⁺⁺-Kanäle (Stojilkovic et al., 1994). GnRH kann über PKC ebenfalls MAPK (mitogen activating protein kinase) aktivieren. Somit stimuliert GnRH die Expression der Gonadotropine FSH und LH (Naor et al., 2000). GnRH induziert ebenfalls die Phospholipasen D und A2 und die Produktion von cAMP (Horton und Halvorson, 2004, Burger et al., 2004a).

Weiter sind hier Verstärker oder Enhancer des GnRH-R Promotors beteiligt. Sie bestehen aus einer dreiteiligen Bindungsstelle für SF-1, AP-1 und einem Element, das ursprünglich GnRH-R-activating Sequence (GRAS) genannt wurde (Duval et al., 1997, Jeong et al., 2004). Experimente an transgenen Mäusen haben zur Hypothese eines Gewebespezifischen Promotors geführt. (McCue et al., 1997). Die GnRH-R Promotoren von Mensch (mit 18 Transkriptions-Startstellen) und Schaf sind viel komplexer als die von Maus und Ratte (mit jeweils 5 Transkriptions-Startstellen) (Jeong et al., 2004).

3.1.4 GnRH-induzierte Genexpression

GnRH ist der wichtigste Faktor bei der Synthese und der Freisetzung der Gonadotropine. Versuche, bei denen die Wirkung von GnRH limitiert oder sogar unterdrückt wurde, haben das verdeutlicht. Ebenfalls von großer Bedeutung für die Synthese und die Sekretion der Gonadotropine ist die Pulsatilität der GnRH-Ausschüttung. Experimente mit vermehrter Gabe von GnRH-Agonisten, durch die die Pulsatilität aufgehoben wurde, haben dies verdeutlicht (Neill, 2002). Hinzu kommt, dass Tiere oder Menschen mit natürlichen genetischen Defekten in den Genen für GnRH keine GnRH-Produktion aufweisen. Bei allen Tieren lässt sich durch pulsatile GnRH-Gabe die Synthese und die Sekretion der gonadotropen Zellen leicht wiederherstellen (Neill, 2002, Harrison et al., 2004).

Wenn über die Wirkung von GnRH gesprochen wird, so ist meistens die Wirkung von GnRH-I gemeint. Die physiologische Wirkung von GnRH-II ist bis jetzt noch nicht bekannt (Gault et al., 2003).

GnRH besitzt eine differentielle Wirkung auf die α - und β -Untereinheiten von LH und FSH. GnRH ist zwar für die Expression von beiden Hormonen essentiell, aber eine kurze Behandlung mit Gonadotropin-Antagonisten führt bei Mensch, Ratte und Schaf nur zu einem leichten Abfall von FSH während LH stark vermindert wird. Dadurch wird klar, dass GnRH unterschiedlich auf LH und FSH wirkt. Wie genau diese differentielle Wirkung von GnRH auf die Hormone und ihre Untereinheiten stattfindet ist nicht sicher. Klar ist jedoch, dass eine hohe Pulsfrequenz zu einer hohen LH-Produktion führt. Ebenso führen niedrige Frequenzen zu einer vermehrten FSH-Sekretion (Dalkin et al., 1989, Kaiser et al., 1997, Molter-Gerard et al., 1999). Weiter weiß man, dass im Vergleich zu den β -Untereinheiten die α -Untereinheiten immer vermehrt exprimiert werden und somit die β -Untereinheiten die limitierenden Faktoren der Gonadotropinproduktion darstellen.

GnRH induziert die Expression von über 200 Genen (Kakar et al., 2003). Darunter sind Gene, die an der Signaltransduktion der Gonadotropine beteiligt sind (der GnRH Rezeptor selbst, NOS, PKA, PKC) sowie ein Teil seiner Transkriptionsfaktoren (c-Fos, c-Jun oder Erg-1). GnRH reguliert weiter die Expression seines eigenen Rezeptors.

Die genauen Vorgänge der differentiellen Aktivierung von FSH β und LH β durch GnRH sind noch weitestgehend ungeklärt. Aller Wahrscheinlichkeit nach sind einige AP-1 (Activating protein 1) Domänen und PKC involviert (Huang et al., 2001). An dieser differentiellen Aktivierung sind aber sicher noch viele weitere Faktoren beteiligt. So spielen hier die GnRH-Rezeptoren eine zentrale Rolle. Weiter sind autokrine und parakrine Faktoren und ovarielle Steroide (Androgene und Östrogene) involviert. Die genaueren Zusammenhänge und Wirkungen dieser Faktoren auf die differentielle Expression der Untereinheiten werden bei LH und FSH beschrieben.

3.2 Follikel Stimulierendes Hormon (FSH)

Die Synthese und die Sekretion von FSH (wie auch von LH) in der Hypophyse wird von einem komplexen Zusammenspiel hypothalamischer, gonadaler und hypophysärer Faktoren reguliert. Die hypothalamische Produktion von GnRH spielt für die Fertilität eine zentrale Rolle, da GnRH die Synthese von FSH (und auch von LH induziert). Die Synthese dieser beiden Hormone wird aber nicht nur von GnRH, sondern auch noch von vielen anderen

Faktoren beeinflusst. Dabei spielen verschiedene Rückkopplungsmechanismen eine wichtige Rolle. Activine und Inhibine sind hier ebenfalls involviert. Weiter wird die Expression der Gonadotropine von verschiedenen parakrinen Faktoren wie z.B. IGF, EGF, TGF α beeinflusst.

Im Folgenden wird auf die Expression und Sekretion dieser beiden hypophysären Hormone eingegangen, wobei auch die dabei ablaufenden auto- und parakrinen Mechanismen berücksichtigt werden.

3.2.1 FSH-Struktur

FSH gehört wie auch LH zur Familie der Glykoprotein hormone, die bei den Säugetieren aus 3 Mitgliedern besteht, und auch noch TSH (Thyreotropes Hormon) beinhaltet. Bei den Primaten und den Equiden kommt noch ein viertes Hormon, das plazentare Gonadotropin (CG) hinzu, das während der Gravidität produziert wird (Leigh und Stewart, 1990). Diese Hormone werden, mit Ausnahme von CG, welches in der Plazenta entsteht, in der Hypophyse produziert.

Die Hormone haben alle eine strukturelle Ähnlichkeit und bestehen jeweils aus einer α - und einer β -Untereinheit. Diese beiden Untereinheiten bilden über eine nicht-kovalente Verbindung ein Heterodimer.

Die α -Untereinheit ist für alle Glykoprotein hormone einer Spezies identisch, ob sie nun hypophysärer oder plazentärer Herkunft sind. Sie besteht aus 96 AS, außer bei Mensch und Primaten (92 AS). Sie beinhaltet 10 Cysteinreste, in invariabler Position die alle an der Bildung von Disulfidbrücken beteiligt sind. 1981 wurde von Fiddes et al. die Nukleotidsequenz der α -Untereinheit (UE) ermittelt. Sie besteht aus 4 Exons und 3 Introns, was ebenfalls beim Rind (Burnside et al., 1988) und bei der Ratte nachgewiesen wurde (Goodwin et al., 1983). Die Gene für die FSH α -UE sind beim Menschen auf Chromosom 6 (locus 6q12-6q21) (Vegetti und Alagna, 2006) und bei der Maus auf Chromosom 4 lokalisiert.

Die β -Untereinheit ist für jedes Hormon spezifisch. Sie besteht je nach Tierart aus 111 (hFSH, humanes FSH) bis 145 AS, enthält 12 Cysteine und bildet somit 6 Disulfidbrücken. Das Gen für die β -UE ist beim Menschen auf Chromosom 11 (Vegetti und Alagna, 2006), bei der Maus auf Chromosom 2, beim Schwein ebenfalls auf Chromosom 2 und beim Rind auf Chromosom 15 gelegen.

Es gibt verschiedene FSH-Isoformen mit unterschiedlicher Wirkung auf die Gonaden (Vegetti und Alagna, 2006). Die Isoformen haben eine gleiche Primärstruktur, jedoch unterschiedliche elektrische Ladungen, wodurch sie verschiedene Halbwertszeiten,

unterschiedliche Rezeptoraffinitäten und somit auch verschiedene biologische Aktivitäten aufweisen (Ulloa-Aguirre et al., 1995, Zambrano et al., 1996). Weniger saure Isoformen stimulieren eher die Aromatase, saure Isoformen eher die α -Inhibin mRNA-Produktion (Timossi et al., 2000).

3.2.2 FSH-Expression

Die Expression von FSH wird über unterschiedliche Mechanismen induziert. Besonders wichtig für die Expression von FSH und LH ist GnRH. GnRH führt über seinen GnRH-Rezeptor zur Aktivierung des FSH-Promotors. GnRH führt aber ebenfalls zu der Expression von LH. Da nun GnRH an der Expression beider Gonadotropine beteiligt ist, stellt sich die Frage, ob GnRH die Expression der beiden Gonadotropine unterschiedlich regulieren kann. Die Pulsfrequenz von GnRH spielt hier eine zentrale Bedeutung. Es ist seit längerem bekannt, dass eine sehr hohe GnRH-Pulsfrequenz die Expression der α -Untereinheit, eine hohe Pulsfrequenz die Expression von LH- β , eine niedrigere Pulsfrequenz die Expression von FSH- β stimuliert (Dalkin et al., 1989, Molter-Gerard et al., 1999). Fraglich ist, welche Mechanismen an der differenzierten Regulation von LH und FSH durch GnRH mitwirken. Bedecarrat et al. (2003) haben gezeigt, dass die Expression von GnRH-R je nach unterschiedlicher GnRH-Pulsatilität variiert und somit GnRH-R maßgeblich an der differentiellen Regulation von LH- β und FSH- β beteiligt ist. Ferris et al. (2006) haben diese differenzierte Regulation genauer untersucht und gelangten zu der Überzeugung, diese fände auf drei Ebenen statt:

- Auf der Ebene der Signaltransduktion
- Auf der Ebene der Proteine und
- Auf der Ebene der Transkriptionsfaktoren.

Sie kommen zu dem Schluss, dass das Pulsintervall von GnRH sich auf die Expression einiger Aktivator-Proteine und inhibitorischer Proteine auswirkt. Die Proteine benötigen für ihre Transkription unterschiedliche Pulsfrequenzen und regulieren somit differentiell die Promotoren der drei Gonadotropin-Gene.

Die Zellen des vorderen Hypophysenlappens werden durch GnRH stimuliert beziehungsweise von Feedbacksignalen aus den Zielzellen negativ reguliert. Nach früherer Ansicht sollten die Zellen der Hypophyse unabhängig voneinander funktionieren. Neuere Ergebnisse zeigen aber, dass die Zellen der Hypophyse sehr wohl kommunizieren und

ebenfalls Hormone sowie lokale Wachstumsfaktoren produzieren. Die Expression von FSH wird außer von GnRH auch noch von weiteren Mechanismen reguliert, wobei sowohl autokrin als auch parakrin wirkende Faktoren von Bedeutung sind. Daneben spielen aber auch Rückkopplungsschleifen von Steroiden und Wachstumsfaktoren eine Rolle (Pernasetti et al., 2001).

In der Hypophyse sind die Gonadotropin-produzierenden Zellen von den follikulostellären Zellen umgeben. Follikulostelläre Zellen (FS-Zellen) repräsentieren ca. 5-10% aller Zellen der Hypophyse und haben eine charakteristische, sternförmige Morphologie. Sie formen ein zelluläres Netzwerk und umgeben mit ihren langen Zellausläufern endokrine Zellen des Vorderlappens. FS-Zellen sind mit hormonproduzierenden Zellen und untereinander über Gap Junctions verbunden (Morand et al, 1996) und transduzieren elektrophysiologische Signale. Die follikulostellären Zellen produzieren verschiedene Faktoren. Darunter befinden sich das Pituitary adenylatcyclase activating protein (PACAP), der „Vascular endothelial growth factor“ (VEGF), Follistatin, der „Epidermal growth factor“ (EGF), der „basische Fibroblast growth factor“ (bFGF), der „Insulinlike growth factor“ (IGF-I), der „Nerve growth factor“ (NGF), der „transforming growth factor alpha“ (TGF- α), der „transforming growth factor beta-2 (TGF- β 2), Interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, Leukemia inhibiting Factor (LIF) und noch einige weitere (Winters und Moore, 2007).

Diese Faktoren sind, insbesondere PACAP und Follistatin, an der Synthese und der Sekretion von FSH beteiligt. PACAP erhöht die Transkription der α -UE, verlängert die Halbwertszeit von LH- β und reduziert die mRNA-Konzentration von FSH- β . Follistatin blockiert Activin und verhindert somit dessen positive Wirkung auf die Expression von FSH. Die Expression von Follistatin scheint unter anderem von PACAP reguliert zu werden (Attardi und Winters, 1998). Somit sind Follistatin und PACAP an einem intrahypophysärem Kontrollmechanismus beteiligt, über den sie die Expression von LH verstärken und die Expression von FSH vermindern. Es bleibt zu klären, welche genaue Bedeutungen die anderen von den follikulostellären Zellen sezernierten Faktoren haben und ob sie an der Expression von FSH sowie LH beteiligt sind.

Activin, Inhibin und Follistatin wirken alle drei regulatorisch auf die Sekretion der Gonadotropine und somit auf die Sekretion von FSH. Activin fördert die Expression von FSH in der Hypophyse (Gregory und Kaiser, 2004, Gregory et al., 2005). Weiter wirken GnRH und Activin teils unabhängig von einander teils aber auch synergistisch auf die Expression von FSH- β (Coss et al., 2007). Inhibin hemmt die Wirkung von Activin und somit auch die

Expression von FSH (Gregory und Kaiser, 2004). Follistatin bindet mit starker Affinität an Activin und verhindert so dessen Rezeptorbindung. Dadurch hemmt Follistatin ebenfalls die positive Wirkung von Activin auf die Expression von FSH (Gregory und Kaiser, 2004).

BMP-2 ist ebenfalls ein wichtiger parakriner Coregulator der FSH-Synthese in den gonadotropen Zellen (Lee et al., 2007). Über die Bedeutung von BMP-6 und BMP-7 gibt es Kontroversen. Huang et al. (2001) haben für diese beiden Mitglieder der „Bone morphogenetic protein“- (BMP) Familie eine positive Wirkung auf die Expression der FSH- β sowie der LH- β -Untereinheit nachgewiesen. Allerdings werfen sie die Frage auf, ob diese Faktoren als Homodimere oder als Heterodimere wirken. Alle drei Transkriptionsfaktoren (BMP-2, BMP-6 und BMP-7) sind in der Hypophyse der Maus zu finden. In vielen Geweben haben Heterodimere von BMP-2/BMP-7 sowie von BMP-4/BMP-7 eine weitaus stärkere Wirkung als die Homodimere (Aono et al., 1995, Israel et al., 1996). Man vermutet, dass auch in der Hypophyse Heterodimere gebildet werden und dass auch diese eine stärkere Wirkung als die Homodimere entfalten. Diese Hypothese muss allerdings erst verifiziert werden. Otsuka und Shimasaki (2002b) haben ebenfalls die Wirkung von BMP-6 und BMP-7 auf die Expression von FSH und LH untersucht. In ihrem Zellkultursystem aus hypophysären Zellen haben sie keine Wirkung von BMP-6 oder BMP-7 auf die Expression und Sekretion von LH oder von FSH nachweisen können (Otsuka und Shimasaki, 2002b). Ob es sich hierbei um tierartige Unterschiede handelt oder diese auf den Versuchsaufbau zurückzuführen sind, ist fraglich. BMP-15 hingegen wurde von Otsuka und Shimasaki (2002) durchaus als potenter Faktor bei der Induktion der FSH-Synthese betrachtet. Allerdings, im Gegensatz zu den anderen Faktoren, wirkt BMP-15 nur auf FSH und reguliert die Gonadotropine somit selektiv.

EGF stimuliert ebenfalls die Gonadotropin-Sekretion. Die Wirkung von EGF scheint durch die Expression von EGFR beeinflusst zu werden, welche im Laufe des Zyklus in den gonadotropen Zellen stark variiert. EGF dürfte über zwei Mechanismen auf die Freisetzung der Gonadotropine wirken: erstens über einen indirekten Weg, der auf den Hypothalamus wirkt und zweitens über einen direkten Weg, der auf die Hypophyse wirkt. EGF vermittelt im Laufe des Zyklus die differentielle Abgabe von FSH und LH (Armstrong und Childs, 1997). Allerdings gibt es auch negative Ergebnisse über die Beteiligung von EGF an der Sekretion der Gonadotropine. So haben Charidaun et al. (1994) keine direkte Beteiligung von EGF an der Expression der Gonadotropin-Untereinheiten gefunden.

bFGF ist ebenfalls ein Produkt der folliculostellären Zellen. Bislang konnte aber keine Wirkung von bFGF auf die Synthese der Gonadotropine nachgewiesen werden.

TGF- α wird zwar gleichfalls im Hypophysenvorderlappen exprimiert und sezerniert, jedoch ist seine Wirkung eher auf eine Replikation der DNA der mammotropen Zellen gerichtet. TGF- α scheint keinen besonderen Einfluss auf die gonadotropen Zellen zu haben (Sharma et al., 2003).

Die Wirkung von IGF-I auf die Sekretion der Gonadotropine beschränkt sich im Wesentlichen auf die Sekretion von LH. Es gibt aber eine Untersuchung über die Wirkung von IGF-I auf die Expression der Gonadotropine, an der FSH ebenfalls beteiligt ist: Kanematsu et al. (1991) haben diese Wirkung untersucht und festgestellt, dass die Konzentration beider Gonadotropine in den gonadotropen Zellen nach IGF I-Gabe abnimmt. Weiter stellten sie fest, dass die Sekretion beider Gonadotropine nach IGF I-Verabreichung ansteigt.

Als weitere Regulatoren der FSH- β Expression kommen die gonadalen und adrenalen Steroide in Frage (Thackray et al., 2006). Diese Hormone beteiligen sich ebenfalls an der differentiellen Regulation der Gonadotropinsekretion. Androgene sind nach Bindung an Androgen-Rezeptoren maßgeblich an der FSH-Produktion beteiligt (Rice et al., 2007). Androgen stimuliert direkt die mRNA von FSH- β sowohl in Zellkulturen als auch in GnRH-defizienten Ratten (Wierman et al., 1990, Winters et al., 1992). In mehreren Studien wurde die Wirkung von Androgenen auf FSH-Synthese und Sekretion untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Androgene sowohl über ihren Rezeptor und anschließender Bindung des Androgen-Rezeptor-Komplexes an eine Bindungsstelle des FSH-Promotors als auch über eine Modulation der Wirkung von Activin die FSH-Synthese stimulieren (Spady et al., 2004, Thackray et al., 2006, Burger et al., 2007). Je nach Tierart findet sich eine unterschiedliche Anzahl von Androgen-response-elements (ARE). So existieren drei beim Schaf und sechs bei der Maus (Burger et al., 2007).

Die Wirkung von Östrogen auf die Transkription von FSH- β ist nicht eindeutig geklärt. Burger et al. (2007) haben keine Wirkung von Östrogen auf die Transkription von FSH-mRNA β bei der Ratte nachweisen können. In anderen Versuche hingegen wurde, allerdings nur bei männlichen Ratten, ein Einfluss von Östrogen auf die Transkription der Gonadotropin-Untereinheit nachgewiesen (Burger et al., 2004). Diese Diskrepanz kann auf geschlechtliche Unterschiede oder auf den Umstand zurückzuführen sein, dass beim ersten Versuchsansatz eine physiologische Östrogendosis und im zweiten Versuch eine supraphysiologische Dosis angewandt wurde. Die Wirkung von Östrogen auf FSH in vivo ist indirekt, da der Promotor kein Östrogen-responsives Element und keine Bindungsstelle für

den Östrogen-Rezeptor aufweist (Miller und Miller, 1996). Der große Unterschied in der Wirkung von Östrogen und Androgen besteht darin, dass Östrogene die Expression von FSH hemmen und nicht stimulieren (Miller und Miller, 1996, Baratta et al., 2001). Somit ist Östrogen Teil einer negativen Rückkopplungsschleife zwischen den Gonaden und den gonadotropen Zellen der Hypophyse. Es gibt auch Hinweise dafür, dass Östrogen die Expression von FSH über eine Activin-Komponente moduliert: Östrogen erhöht die Expression von hypophysärem Follistatin und wirkt somit indirekt negativ auf FSH (Prendergast et al., 2004).

Progesteron ist ebenfalls positiv an der Expression von FSH- β beteiligt. Innerhalb des FSH- β -Promotors befinden sich beim Schaf sechs "Progesterone-response-elements" (PRE), bei der Maus drei (Thackray et al., 2006).

Eine ähnliche Wirkung weisen die Glukokortikoide auf. Sie wirken auf der Ebene der Hypophyse auf FSH, allerdings haben sie keine Wirkung auf LH (Thackray et al., 2006).

Die Kenntnisse über die Wirkungen der Steroide auf die Expression von FSH sind noch unvollständig. Insbesondere bleibt noch zu klären, wie die Steroide sich auf die tierartigen Unterschiede der FSH Sekretion während des Zyklus auswirken. Die Aufklärung der Rolle der Steroide bei Expression und Sekretion von FSH ist für das Verständnis von Regulationsstörungen der Hypophyse, wie z.B. dem polyzystischen ovariellen Syndrom (PCOS) sehr wichtig und kann eventuell zu neuen Therapieansätzen führen.

Tabelle 3.3 Einfluss von endokrinen und parakrinen Faktoren auf die FSH-Sekretion

Faktor	Funktion	Autoren
PACAP	Wirkt selektiv auf die Transkription der UE, positiv auf die α -UE, und negativ auf die FSH- β -UE	Winters und Moore, 2007
Follistatin	Blockiert Activin und hemmt somit dessen positive Wirkung auf FSH in der Hypophyse	Winters und Moore, 2007 Gregory und Kaiser, 2004
Activin	Fördert die Expression von FSH in der Hypophyse	Gregory und Kaiser, 2004 Gregory et al., 2005
Inhibin	Hemmt die Wirkung von Activin und wirkt somit ebenfalls negativ auf FSH	Gregory und Kaiser, 2004
BMP-2	Co-regulator der FSH Synthese	Lee et al., 2007
BMP-6	Wirkung auf FSH in der Hypophyse fraglich	Huang et al., 2001 Otsuka et al., 2002
BMP-7	Wirkung auf FSH in der Hypophyse fraglich	Huang et al., 2001 Otsuka et al., 2002
BMP-15	Potentieller Faktor bei der Induktion der FSH-Synthese	Otsuka et al., 2002
EGF	Vermittelt im Laufe des Zyklus die differentielle Abgabe von FSH und LH	Armstrong et al., 1997
bFGF	Noch keine Wirkung an der Expression/Sekretion der Gonadotropine nachgewiesen	
TGF α	Wird im HVL exprimiert, jedoch ohne besondere Wirkung auf die gonadotropen Zellen	Sharma et al., 2003
IGF-I	Steigert die Sekretion beider Gonadotropine	Kanematsu et al., 1991
Androgen	Ist maßgeblich an der Produktion von FSH beteiligt	Rice et al., 2007
Östrogen	Wirkung von Östrogen auf die FSH-Sekretion ungewiss	
Progesteron	Positive Wirkung auf die FSH-Expression	Thackray et al., 2006

PACAP: Pituitary adenylat cyclase activating peptide, BMP: Bone morphogenetic protein, EGF: epidermal growth factor, bFGF: basic fibroblast growth factor, TGF α : Transforming growth factor α , IGF-I: Insulin growth factor I

3.2.3 Der FSH-Rezeptor (FSH-R) und seine Signaltransduktion

Der FSH-Rezeptor (FSH-R) ist ein Mitglied der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Dieser Gruppe gehören auch der LHR, TSHR und GHR an. Die Struktur des FSH-R-Gens wurde schon bei verschiedenen Tierarten aufgeklärt, so bei Maus, Ratte, Schaf, Rind, Hund, Zebrafisch, beim Menschen sowie beim Schimpansen (Hermann und Heckert, 2007). Das FSHR-Gen besteht aus zehn Exons und neun Introns. Die ersten neun Exons kodieren für die Ligandenbindende Domäne, das letzte kodiert alleine für die Transmembranäre- und Intrazelluläre-Domäne (Hermann und Heckert, 2007). Bei der Maus werden vier verschiedene Spleißvarianten gefunden (Tena-Sempere et al., 1999).

In Follikelzellen kann die Expression des FSH-R ab dem Sekundärfollikel nachgewiesen werden (Oktay et al., 1997, Rice et al., 2007). Die FSH-R-Expression wurde erstmals im Jahre 1974 in den Granulosazellen gefunden (Zeleznik et al., 1974, Camp et al.,

1991). Allerdings gibt es auch andere Ergebnisse, nach denen FSH-R auch auf der Oozyte von primären bis zu präovulatorischen Follikeln nachweisbar ist (Meduri et al., 2002). Dieses Ergebnis führt zu dem Schluss, dass die Reifung der Oozyte nicht ausschließlich durch von GC sezernierten Faktoren induziert wird, sondern auch von den Oozyten selbst.

Die Expression von FSH-R findet anschließend bis zum großen antralen Follikel statt. Die Anzahl der Rezeptoren pro Zelle verändert sich kaum. Allerdings nimmt im Laufe der Follikelentwicklung die Anzahl der GC stark zu, so dass die Anzahl der FSH-Rezeptoren ebenfalls stark ansteigt (Findlay und Drummond, 1999). In dem großen antralen Follikel nimmt die Expression der FSH-R wieder ab und ist zum Zeitpunkt der Selektion beim Schwein gar nicht mehr vorhanden (Yuan et al., 1996, Abdennebi et al., 1999). Atretische Follikel exprimieren ebenfalls viel geringere Mengen FSH-R (Yuan et al., 1996). Konträre Angaben machen hingegen Bao et al. (1998) zum Rind. Sie finden zum Zeitpunkt der Selektion keine nennenswerten Unterschiede in der Expression von FSH-R und sprechen sich somit gegen eine Beteiligung der FSH-Rezeptoren bei der Follikelselektion aus. Ob es sich tatsächlich um tierartige Unterschiede handelt, oder ob diese Unterschiede auf die verschiedenen Versuchsgestaltungen zurückzuführen sind, wird noch kontrovers diskutiert

Tabelle 3.4 Tierartige Unterschiede in der Expression von FSHR in den Granulosazellen (GC)

Tier		Autoren
Ratte	Abnahme der Expression in atretischen Follikeln	Rice et al., 2007
Schaf	FSH-R Spiegel sind in großen antralen Follikeln etwas niedriger als in mittelgroßen antralen Follikeln. Abnahme der Expression in atretischen Follikeln	Abdennebi et al., 1999
Rind	Keine signifikante Veränderung der FSH-R Expression in den GC zum Zeitpunkt der Selektion	Bao et al., 1995
Schwein	Große antrale Follikel weisen gar keine Expression von FSH-R mehr in den GC auf	Yuan et al., 1996

FSH-R: FSH-Rezeptor, GC: Granulosazellen

Wie schon bei der Expression von FSH beeinflussen auch verschiedene Faktoren die Expression des FSH-Rezeptors: FSH, cAMP, und Mitglieder der TGF- β Familie regulieren die FSH-Rezeptoren herauf, während EGF und TGF α die FSH-Rezeptoren senken (Tilly et al., 1992, Findlay und Drummond, 1999).

So wird die Expression von FSH-R bei der Ratte und beim Schwein von FSH stimuliert (Sites et al., 1994, Minegishi et al., 1995). Bei der Maus wiesen Findlay et al. (1999) eine Induktion des FSH-R durch FSH nach. In GC-Kulturen der Ratte konnten Tilly et

al. (1992) eine Erhöhung der FSH-Rezeptoren durch FSH zeigen. Luo et al. (2006) konnten beim Rind keine Beteiligung von FSH bei der Expression von FSH-R nachweisen. Eine einzelne hohe Dosis von FSH kann allerdings die Expression seines Rezeptors herunterregulieren (Themmen et al., 1991). Somit führt der FSH-Peak zu einer verminderten FSH-R Expression und einer Desensibilisierung für FSH (Minegishi et al., 1997).

Activin stimuliert sowohl die Expression FSH-R mRNA als auch die Anzahl der Rezeptoren (Nakamura et al., 1993). Allerdings ist der Mechanismus, über welchen Activin die Expression des FSH-Rezeptors erhöht, nicht ganz klar.

Die Expression von FSH-R wird ebenfalls von Androgenen über den Androgen-Rezeptor stimuliert. Androgen erhöht die FSH-R mRNA in allen FSH-exprimierenden Follikelstadien (Rice et al., 2007). Diese Ergebnisse beruhen auf Untersuchungen beim Menschen. Luo et Wiltbank (2006) kamen beim Rind zum gleichen Ergebnis. Androgen agiert wahrscheinlich als interzellulärer Regulator der Granulosazellen durch direkte Stimulierung der FSH-R Expression (Luo und Wiltbank, 2006). Da die Expression der AR auch von FSH beeinflusst wird, scheinen der AR und FSH sich wechselseitig zu beeinflussen (Rice et al., 2007). Diese Ergebnisse stellen eine bedeutende Erweiterung des zwei-Zell-zwei-Gonadotropin Modells dar.

FSH stimuliert cAMP in GC. cAMP seinerseits fördert die Expression von FSH-Rezeptoren (Knecht et al., 1983). Damit wirkt auch cAMP positiv auf die Follikelentwicklung.

Luo und Wiltbank (2006) sind der Ansicht, dass die Expression von FSH-R unabhängig von FSH und Östrogen ist und somit kein Einfluss von Östrogen, FSH und cAMP/PKA auf die Konzentration der FSH-R anzunehmen ist. Ihre Ansicht steht im Gegensatz zu der von anderen Autoren wie Sites et al. (1994), Minegishi et al. (1995) und Findlay et al. (1999). Sie alle nehmen eine Induktion der FSH-R Expression durch FSH an.

Östrogen scheint bei der Expression von FSH-R weniger wichtig zu sein. Allerdings scheinen basale Östrogenwerte eventuell doch notwendig zu sein, wie Versuche von Luo et al (2006) gezeigt haben. Trotzdem ist Östrogen bei der FSH-R Expression bei weitem nicht so bedeutend wie die Androgene (Luo und Wiltbank, 2006).

Die Expression von FSH-R wird von BMP-15 gehemmt (Otsuka et al., 2001a). Diese Wirkung wird von Follistatin, das an BMP-15 bindet, aufgehoben (Otsuka et al., 2001b). Auch GDF-9, in adäquaten Mengen, ist für die Expression von FSH-R notwendig (Orisaka et al., 2006a).

TGF β 1 und der TGF β 2 führen in Östrogen-behandelten Ratten zu einer erhöhten Konzentration von FSH-R mRNA, und somit zu einer erhöhten Liganden-Bindung (Dunkel et al., 1994). Hingegen senkt die Behandlung mit TGF α die Expression von FSH-R und vermindert die stimulatorische Wirkung von TGF β 1 oder TGF β 2.

Ebenfalls inhibitorisch auf die FSH-R Expression wirkt EGF, welches die Induktion der Rezeptoren vermindert (Tilly et al., 1992). TGF β , TGF α und EGF sind lokale, im wachsenden Follikel produzierte Faktoren und modulieren die Wirkung von FSH über die Expression seines Rezeptors (Findlay und Drummond, 1999). Allerdings muss beachtet werden, dass es auch hier tierartliche Unterschiede bei der Wirkung der verschiedenen Faktoren gibt. So wirkt TGF β stimulatorisch auf den FSH-R beim Schwein, während es bei der Ratte eine inhibitorische Wirkung hat. Zu beachten ist, dass diese stimulatorischen und inhibitorischen Wirkungen nicht ausschließlich auf der Expression der Rezeptoren beruhen, sondern sicherlich teilweise auf der unterschiedlichen Rezeptor-Liganden-Bindung.

FSH wirkt über den FSH-R durch eine cAMP-Erhöhung und den PKA-Signaltransduktionsweg. Zusätzlich zu cAMP/PKA stimuliert FSH die MAPK, die PKB und führt zu der Freisetzung von intrazellulärem Ca⁺⁺. Allerdings ist die genaue Rolle dieser Transduktionswege bei der Proliferation und Differenzierung der GC noch nicht geklärt (Zeleznik et al., 2003).

Die jeweilige Wirkung der hier beschriebenen Faktoren auf die Expression der FSH-Rezeptoren ist sehr unterschiedlich. So bestehen neben den tierartlichen Unterschieden auch Unterschiede bei der Wirkung auf den FSH-Rezeptor. So stimulieren Activin, cAMP sowie FSH besonders die Expression der FSH-Rezeptoren (Findlay, 1993) während EGF und TGF α inhibitorisch wirken (Findlay und Drummond, 1999). Aber nicht nur die Expression der Rezeptoren wird beeinflusst, sondern auch deren Liganden-Bindung und die nachfolgende Signaltransduktion.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um ein präziseres Bild über die vielfältigen Interaktionen zwischen lokalen Wachstumsfaktoren, Gonadotropinen und ihren Rezeptoren bei der Follikulogenese zu erhalten.

Tabelle 3.5 Faktoren, welche die FSH-R Genexpression beeinflussen:

	Wirkung / Anmerkung	Literatur	Tierart
FSH	Erhöht die Expression von FSH-R Erhöht die Expression von FSH-R Expression wird erhöht Hat keine Wirkung auf FSH-R Expression	Findley et al., 1999 Sites et al., 1994 Minegishi., 1995 Luo et al., 2006	Schwein Ratte Rind
cAMP /Analoge cAMP/ PKA	Erhöht die Expression von FSH-R Keine Wirkung auf FSH-R Expression	Findley et al., 1999 Luo et al., 2006	
TGFβ Mitglieder	Erhöht die Expression von FSH-R , Wirkung eventuell über E-Box	Findley et al., 1999	
Activin	Erhöht die Expression von FSH-R , Wirkung eventuell über E-Box	Findley et al., 1999	
EGF	Setzt die Expression herab	Findley et al., 1999	
TGFα	Setzt die Expression herab	Findley et al., 1999	
Androgen über AR	A erhöht die Expression von FSH-R	Luo et al., 2006 Rice et al., 2007	
Östrogen	Basale Östrogenwerte für die FSH-R Expression notwendig	Luo et al., 2006	
BMP-15	Hemmung der Expression von FSH-R	Otsuka et al., 2001b	
Follistatin	Hebt die Hemmende Wirkung von BMP- 15 auf FSH-R auf	Otsuka et al., 2001c	
GDF-9	Notwendig für Entwicklung vom prä- antralen zum frühen antralen Follikel	Orisaka, 2006	

FSH: Follikelstimulierendes Hormon, cAMP: cyclic adenosin monophosphat, PKA: Proteinkinase A, TGFβ: Transforming growth factor β, EGF: Epidermal growth factor, TGFα: Transforming growth factor α, AR: Androgen Rezeptor, BMP-15: Bone morphogenetic protein-15, GDF-9: Growth differenziation factor-9, FSH-R: FSH Rezeptor,

3.2.4 FSH-induzierte Genexpression

FSH spielt für die Follikelentwicklung eine entscheidende Rolle. Es induziert über seinen Rezeptor die Expression einer Reihe von Genen, die an der Proliferation und Differenzierung der Granulosazellen sowie an der Steroidogenese beteiligt sind. FSH wirkt allerdings meistens im Zusammenspiel mit weiteren Faktoren, die seine Wirkung auf die Expression verschiedener Gene unterstützen.

Die Proliferation der Granulosazellen ist eines der Hauptmerkmale beim Wachstum der Follikel. Die Mitosen der Granulosazellen werden eingeleitet durch einen Konzentrationsanstieg von Cyclin D2 und einen gleichzeitigen Abfall der p27 und p21-Konzentration. Letztere sind wichtige Zellzyklusregulatoren, welche die Zellen aus dem G₀ in das G₁ Stadium bringen.

FSH führt, sowie cAMP und Östrogen, zu einem rapiden Anstieg der Cyclin D2-Konzentration. Dieser Anstieg von Cyclin D2 gilt als einer der Hauptfaktoren für die Proliferation der GC. Sicherlich sind aber weitere Faktoren für Proliferation der GC

verantwortlich, da auch Cyclin D2 Knockout Mäuse eine, wenn auch limitierte, Proliferation der GC aufweisen (Robker und Richards, 1998).

FSH induziert die Expression seines Rezeptors FSH-R (Findlay und Drummond, 1999) und ist ebenfalls an der Expression der LH-Rezeptors beteiligt (Ascoli et al., 2002, Garverick et al., 2002).

FSH induziert die Expression verschiedener Enzyme, die an der Steroidogenese beteiligt sind. So wirkt FSH positiv auf die Expression von P450arom, P450scc, StAR, 3 β -HSD. Weiters wirkt FSH ebenfalls positiv auf die Expression von ER β , sowie auf die α - und β -Untereinheiten (UE) des Activin/Inhibin-Systems (Hedin et al., 1987, Meunier et al., 1988, Segaloff et al., 1990, Camp et al., 1991, Richards, 1994, Bao et al., 1998, Findlay und Drummond, 1999, Sharma et al., 1999, Otsuka et al., 2000, LaVoie et al., 2004). Durch die Induktion von P450scc und P450arom hat FSH eine Schlüsselrolle bei der Follikulogenese und stellt die treibende Kraft bei der Follikelrekrutierung dar (Garverick et al., 2002). Weiterhin wirkt FSH noch auf die Expression von CTGF (connective tissue growth factor) sowie von Cx43 (Connexin 43) (Harlow et al., 2002, Jammongjit et al., 2005). Diese beiden Faktoren sind maßgeblich am Aufbau von Zwischenzellverbindungen beteiligt und wirken sich somit auf die Reifung und Proliferation der GC aus. FSH wirkt sich auch positiv auf die Expression von BMP-15 aus, während es keinen Einfluss auf die Expression von GDF-9 hat (Gueripel et al., 2006).

Die Wirkung von FSH kommt in vielen Fällen durch Synergie mit anderen Faktoren, wie Wachstumsfaktoren, Enzymen und Transkriptionsfaktoren zustande. So ist für die Expression von P450scc bei der Ratte ein Zusammenspiel von FSH und IGF-I für die Expression zwingend notwendig. FSH alleine kann keine Expression von P450scc bewirken. Im Gegensatz hierzu ist bei der Expression von StAR und 3 β -HSD kein Mitwirken von IGF-I notwendig (Eimerl und Orly, 2002). Diese Synergie von FSH und IGF-I tritt auch bei anderen Tierarten, zum Beispiel beim Schwein, auf (Eimerl und Orly, 2002). Allerdings bestehen zwischen den Tierarten Unterschiede bezüglich der Wirkung der einzelnen Faktoren auf die Expression von P450scc. So führt bei der Ratte die alleinige Gabe von IGF-I zu keiner Expression von P450scc (Eimerl und Orly, 2002). In den GC des Schweines hingegen kann die alleinige Gabe von IGF-I sehr wohl P450scc induzieren (Urban et al., 1990). Über die Regulatoren der Transkription, welche die zellulären Antworten dieser Signale weiterleiten, ist noch wenig bekannt. Ein wichtiges Protein in diesem Zusammenhang scheint CREBP (cAMP Responsive Element Binding Protein) zu sein (Sterneck et al., 1997, Pall et al., 1997).

Tabelle 3.6 Enzyme, Rezeptoren und Wachstumsfaktoren, deren Expression von FSH induziert wird

Faktor	Autoren (unter anderem)
P450arom	Bao et al., 1998, LaVoie et al., 2004
P450scc	Bao et al., 1998, LaVoie et al., 2004
StAR	Bao et al., 1998, LaVoie et al., 2004
3 β -HSD	Bao et al., 1998, LaVoie et al., 2004
ER β	Sharma et al., 1999
α - und β -UE Activin/Inhibin	Findlay et al., 1999
CTGF	Harlow et al., 2002
BMP-15	Otsuka et al., 2000

P450arom: P 450 Aromatase, P450scc: Cytochrom P450 side chain cleavage, StAR: Steroidogenic acute regulatory protein, 3 β -HSD: 3 beta Hydroxysteroid-dehydrogenase, ER β : Östrogen Rezeptor β , UE: Untereinheiten, CTGF: Connective tissue growth factor, BMP-15: Bone morphogenetic Protein 15

3.2.5 Rolle von FSH in der Follikulogenese

FSH ist ein zentrales Element bei der Follikelentwicklung. Die ersten Schritte der Follikelentwicklung, die initiale Rekrutierung, bei der die Follikel aus dem ruhenden Pool rekrutiert werden, erfolgen allerdings Gonadotropin-unabhängig. Die wachsenden Follikel entwickeln sich auch ohne Anwesenheit von Gonadotropinen zu sekundären Follikeln. Dies wurde durch Versuche an hypophysektomierten Mäusen deutlich (Campbell et al., 2003, Webb et al., 2003). Allerdings sind auch diese Follikel Gonadotropin-sensitiv, da erhöhte Konzentrationen von FSH sowie von LH die initiale Rekrutierung beschleunigen (Wang und Greenwald, 1993, Flaws et al., 1997). Über welche Faktoren die Gonadotropine hier ihre Wirkung ausüben ist noch unklar. Die initiale Rekrutierung wird vor allem von lokalen stimulierenden und inhibierenden Faktoren reguliert. Darunter befinden sich unter anderem KL, c-Kit, bFGF, AMH, GDF-9 sowie BMP-15.

Die Abhängigkeit von FSH ist stark an die Anwesenheit der FSH-Rezeptoren gekoppelt. Die Follikel produzieren unter anderem Androgene und Progesteron, welche die Expression der FSH-Rezeptoren beeinflussen.

Ab dem sekundären Follikel ist das weitere Wachstum gonadotropinabhängig. Dies wurde an Versuchen mit hypophysesektomierten Nagern deutlich, bei denen die Follikel ohne Gonadotropine bald atresieren (Nahum et al., 1996). Hingegen haben Versuche an Follikel-Kulturen gezeigt, dass die Apoptose in den Follikeln durch FSH-Gabe, aber nicht durch LH-Gabe, verhindert werden kann. Daraus wird deutlich, dass FSH hier die wesentliche Funktion besitzt (Chun et al., 1996).

In der Gonadotropin-abhängigen Phase kommt es zu vielen wichtigen Veränderungen am Follikel. Er zeigt starkes Wachstum, seine Zellen (ganz besonders die GC) proliferieren und differenzieren sich. Der erste Schritt bei der Gonadotropin-abhängigen Follikelentwicklung ist die zyklische Rekrutierung der Follikel. Dabei werden Follikel, die schon initial rekrutiert wurden, durch einen Anstieg an FSH vor der Atresie bewahrt (McGee und Hsueh, 2000).

Bei der Rekrutierung von Follikeln bestehen tierartige Unterschiede hinsichtlich der Bedeutung von FSH. So ist FSH bei Schaf und Rind essentiell und unabdingbar für das Überleben der Follikel. Beim Schwein läuft die Rekrutierung im Detail etwas anders ab. Die Rekrutierung wird hier wahrscheinlich durch eine Änderung des Verhältnisses der FSH zu LH-Ratio reguliert, und nicht allein durch FSH (Lucy et al., 2001). Zusätzlich ist beim Schwein die folliculäre Phase relativ länger, so dass mehr Follikel rekrutiert werden können. Weiter führt der FSH-Anstieg zu einer erhöhten Expression der FSH-Rezeptoren und LH-Rezeptoren (McGee und Hsueh, 2000).

VEGF und IGF sind bei der Rekrutierung ebenfalls erhöht und führen zu höheren FSH-Konzentrationen und verstärkter FSH-Wirkung (McGee und Hsueh, 2000). Die FSH-Zufuhr und Wirkung wird am Follikel durch eine VEGF-induzierte vermehrte Blutzufuhr sowie durch vermehrte Rezeptorexpression in den GC gewährleistet.

Zudem stimuliert FSH die Produktion von Inhibin und Follistatin und verschiebt damit das Verhältnis von Activin/Inhibin in Richtung Inhibin. Inhibin steigert die LH-Wirkung in den TC, wodurch u.a. mehr Androgene gebildet werden, und zur Aromatisierung zu Östrogen in den GC vermehrt zur Verfügung stehen. Außerdem führt FSH zu einer Repression des Gens für IGFBP-2, wodurch die Bioverfügbarkeit von IGF steigt. IGF verstärkt wiederum die Wirkung von FSH auf die Aromatase in den GC und von LH auf die Androgenproduktion in den TC (Driancourt, 2001). Unter FSH Wirkung findet somit Wachstum, Proliferation und Differenzierung der GC, sowie erhöhte Steroidsynthese statt.

Die Atresie der nicht-dominanten Follikel kommt durch eine unter den Rekrutierungsschwellenwert fallende FSH-Konzentration und steigende LH-Konzentration zustande (Hunter et al., 2004). Die FSH-Konzentration sinkt durch die negative Rückkopplung über Inhibin und Activin, die vom dominanten Follikel sezerniert werden. Damit wird den anderen rekrutierten Follikeln der entscheidende Wachstumsstimulus genommen und sie atresieren.

Für das Wachstum der zu ovulierenden Follikel ist FSH von großer Bedeutung. Während bei Schaf und Rind der LH-Peak der Auslöser der Ovulation ist, antworten die selektierten Follikel beim Schwein zwar auf diesen LH-Peak, aber der Ovulationszeitpunkt und die Meiose endet bei den einzelnen Follikeln nicht zur gleichen Zeit (Hunter et al., 2004).

3.3 Luteinisierendes Hormon (LH), Struktur und Expression

LH ist wie FSH ein G-Protein gekoppeltes Glykoproteinohormon, das in der Hypophyse gebildet und in ihr Kapillarsystem abgegeben wird. Wie FSH besteht es aus einer α -UE und einer β -UE. Die α -UE ist mit der von FSH identisch. Die β -UE von LH hingegen variiert. Sie besteht aus drei Exons und zwei Introns. Das Gen für LH β befindet sich beim Schwein auf Chromosom 6 und bei der Maus auf Chromosom 7.

Die Transkription der β -UE ist der limitierende Schritt der LH-Produktion. Sie findet, wie auch schon bei FSH, in den gonadotropen Zellen der Hypophyse statt. In diesen gonadotropen Zellen wird LH β gespeichert und später in das Blut abgegeben. LH ist schon bei vielen Tieren, unter anderem bei Ratte, Maus, Schaf, Schwein und beim Menschen charakterisiert worden (Chin et al., 1983, Fiddes und Talmadge, 1984, Jameson et al., 1984, Virgin et al., 1985, Maurer, 1985, Saade et al., 1989).

Die Expression und Sekretion von LH sind wie auch bei FSH sehr komplexe Mechanismen und werden sowohl parakrin, autokrin als auch endokrin gesteuert.

Am wichtigsten für die LH-Expression ist GnRH. Seine pulsatile Abgabe aus dem Hypothalamus, wo es über das Portalgefäßsystem die Adenohypophyse erreicht, steuert die Expression und Abgabe von LH β (Bedecarrats und Kaiser, 2003). Die Bedeutung der pulsatilen GnRH-Ausschüttung ist schon seit den neunziger Jahren des letzten Jahrhunderts bekannt (Knobil, 1990). Sie ist ebenfalls für die FSH-Sekretion wichtig. GnRH steuert, wie schon bei FSH beschrieben, die differentielle Gonadotropin-Ausschüttung durch die Frequenz seiner Freisetzung. So führen eine hohe GnRH-Frequenz und hohe GnRH-Pulsamplitude zu einer Synthese von LH β und zu einer Abgabe von LH (Dalkin et al., 1989, Shupnik, 1990, Haisenleder et al., 1991).

GnRH ist, wie bereits erwähnt, das zentrale Element bei der Freisetzung von LH.

LH wird nach seiner Synthese zunächst in membranbegrenzten Vesikel gespeichert. Zum Zeitpunkt des LH-Peaks findet eine Verlagerung der LH-haltigen Vesikel in den beta-Zellen der Hypophyse in Richtung zur Zellmembran statt. Anschließend wird LH durch Verschmelzung der Vesikelwand mit der Zellmembran freigesetzt. Die Synthese von LH und

Speicherung in den Granula unterscheidet sich somit stark von der Synthese und Sekretion von FSH, wo kein so langer Zeitraum zwischen Synthese und Freisetzung vorliegt (McNeilly et al., 2003).

Die Mechanismen, über welche GnRH die differentielle Expression von FSH und LH steuert, waren lange unklar. Lawson et al. (2007) haben sie genauer untersucht und festgestellt, dass hohe GnRH-Frequenzen die mRNA für die „early growth response elements“ (ERG1 und ERG2) induzieren. Diese aktivieren dann den Promotor für LH β . Im Gegensatz dazu führen niedrige GnRH-Frequenzen zur Expression der Co-Repressor-Gene für ERG, nämlich von „Nerve growth factor inducible (Ngfi)-gfi-A Binding protein“ (NAb1 und NAb2). NAb inhibiert die ERG-induzierte, Frequenz-abhängige Induktion des Promotors der LH β -UE und stimuliert somit FSH (Kanasaki et al., 2005, Lawson et al., 2007). GnRH verstärkt die Expression des Transkriptionsfaktors Erg-1, der mit SF-1 und Ptx synergistische Wirkung hat. Sie docken an ihre Bindungsstellen des Promotors an und regulieren dort die Expression von LH β hoch (Tremblay und Drouin, 1999).

Wie auch bei FSH sind außer GnRH noch weitere Faktoren an der Expression und Synthese von LH beteiligt. Mehrere Peptide wurden als lokale Regulatoren der LH-Sekretion vorgeschlagen. So kommen als Faktoren bei der LH-Sekretion IL-6, Neuropeptid Y (NPY), Oxytocin, „pituitary adenylat cyclase activating peptide“ (PACAP) sowie Substanz P (SP) in Frage (Spangelo et al., 1989, Culler und Paschall, 1991, Shamgochian und Leeman, 1992, O'Conner et al., 1993, Evans et al., 1995, Evans, 1999).

Allerdings konnte im Gegensatz zur autokrinen und parakrinen FSH-Sekretion bis heute keiner dieser Faktoren als essentiell für die LH-Sekretion bestätigt werden. Ein System, wie das Inhibin/Activin/Follistatin-Peptidsystem, welches für FSH-Bildung und Sekretion unabdingbar ist, konnte für LH bisher nicht nachgewiesen werden.

Östrogene, Androgene und Progesteron spielen hingegen bei der Regulation der Sekretion von LH eine wichtige Rolle.

Östrogen wirkt auf die hypothalamische-hypophysäre Achse und die Modulation der Gonadotropin-Synthese und Sekretion durch Östrogene ist für die Reproduktion wichtig (Shupnik, 1996). In den meisten Säugetierspezies wird der Zyklus durch die bi-modale Wirkung des aus den Ovarien stammenden Östrogens auf die hypothalamo-hypophysäre Achse beeinflusst. So wirken die niedrigen Östrogen-Konzentrationen inhibitorisch auf die LH-Sekretion während der Anstieg von Östrogen im Proöstrus den präovulatorischen LH-Peak hervorruft (Freeman ME, 1994). Die genauen Mechanismen über die Östrogen die

positive als auch die negative Wirkungen hervorruft, wurden und werden intensiv untersucht. Östrogen übt ein negatives Feedback auf GnRH aus, wie durch Versuche mit Ovariectomie herausgefunden werden konnte. Die GnRH-Sekretion ist bei diesen Tieren stark erhöht, kann aber durch Zufuhr von Östrogen wieder auf ein normales Maß gebracht werden (Wise et al., 1981, Zoeller et al., 1988). Zudem zeigen in vitro Studien, dass einige der Wirkungen von Östrogen unabhängig vom Hypothalamus sind, z.B. die Hemmung von FSH β (Miller und Miller, 1996) sowie die Expression und der Anstieg von LH β (Shupnik et al., 1989). Hier wirkt Östrogen direkt auf die Hypophyse. Die Wirkungen von Östrogen scheinen dabei über den ER vermittelt zu werden, und zwar entweder über ein ERE (Estrogen-response element) innerhalb der Promotors der Gonadotropin-Untereinheit (Shupnik et al., 1989) oder aber über andere Transkriptionsfaktoren (Miller und Miller, 1996). Östrogen moduliert gleichfalls die hypophysäre Antwort auf GnRH über eine Modulation der GnRH-Rezeptor-Expression (Turgeon et al., 1996) und reguliert somit ebenfalls die Expression von LH β . Neue Untersuchungen von Lindzey et al. (2006) haben gezeigt, dass der ER α für beide Wirkungen von Östrogen essentiell ist.

Östrogen stimuliert die Transkription von LH β , sowohl der basalen als auch der GnRH-induzierten Synthese bei der Ratte (Shupnik et al., 1989, Shupnik, 1996) sowie beim Affen (Kawakami und Winters, 1999), beim Schaf (Ben Said et al., 2007), beim Rind (Kesner et al., 1981) und beim Schwein (Britt et al., 1991).

Androgen übt eine inhibitorische Wirkung auf LH β und eine stimulierende auf FSH β aus. Die Mechanismen, über die Androgen die beiden Gonadotropine differenziert reguliert, sind noch nicht klar (Burger et al., 2004).

Progesteron inhibiert das positive Feedback von Östrogen auf die Hypophyse. Somit inhibiert Progesteron die Expression und Sekretion von LH, vor allem während der lutealen Phase des Zyklus (Van Vugt et al., 1992).

3.3.1 Luteinisierendes Hormon Rezeptor (LH-R) und seine Signaltransduktion

Der LH-Rezeptor hat eine typische G-Protein Struktur. Er besteht aus einer extrazellulären, hormonbindenden, N-terminalen Domäne, sieben transmembranösen Domänen und einer kleinen intrazellulären C-terminalen Domäne (Mamluk et al., 1998). Zwischen der LH-R cDNA der Maus, des Schweines und des Rindes bestehen grosse Homologien (Loosfelt et al., 1989, Gudermann et al., 1992, Mamluk et al., 1998). Der LH-Rezeptor wird von elf Exons kodiert. Die ersten zehn Exons kodieren für die extrazelluläre

Domäne des Rezeptors, während das elfte Exon ausschließlich für die transmembranäre Region und den cytoplasmatischen Teil des Rezeptors kodiert (Richards, 1994). Spleißvarianten von LH sind in den Gonaden des Schweins (Loosfelt et al., 1989), der Ratte (McFarland et al., 1989), des Menschen (Minegishi et al., 1990) und des Hasens (Laborde et al., 1996) nachgewiesen worden. Bei der Ratte existieren mindestens elf, beim Schwein und beim Schaf vier und beim Menschen mindestens zwei Spleißvarianten. Allerdings ist die Bedeutung dieser Spleißvarianten noch nicht ganz klar. Die Untersuchungen am Schaf von Abdennebi et al. (2002) haben die Verteilung von Spleißvarianten von östrischen und anöstrischen Tieren verglichen. Sie haben gezeigt, dass in anöstrischen Schafen, in den TC, die kurze Spleißvariante LH-R3 zwei Mal häufiger vorkommt als die Spleißvariante LH-R1. Somit dürfte beim Übergang vom Östrus zum Anöstrus die Antwort auf LH unter anderem von einem veränderten Muster der Expression der Spleißvarianten bedingt sein. Im Östrus wird vor allem die lange Variante, im Anöstrus hingegen vermehrt die kürzeren Spleißvariante exprimiert. Die Ergebnisse von Abdennebi et al. (2002) veranschaulichen zudem, dass die Regulation der Empfindlichkeit auf LH besonders bei den TC stattfindet. Das reifungsspezifische Auftreten solcher Spleißvarianten könnte eventuell als Basis für diagnostische Tests dienen, um die Qualität und das Reifestadium der Oozyten zu ermitteln (Abdennebi et al., 2002).

Trotz dieser umfangreichen Untersuchungen beim Schaf ist im Allgemeinen die physiologische Bedeutung der Spleißvarianten bei der Follikulogenese unklar. Insbesondere sind die Bindungseigenschaften und die funktionellen Eigenschaften der Varianten bei den meisten Spezies noch nicht geklärt (Robert et al., 2003). So wird die Variante, der ein Teil von dem Exon 11 fehlt zwar in ein Protein translatiert, aber nicht in die Zellmembran eingebaut (Kawate, 2004).

Untersuchungen beim Rind ergaben ebenfalls eine zeitliche und entwicklungspezifische Expression von Spleißvarianten im Laufe der Follikelexpression und es werden auch beim Rind die lange Variante und die am Exon 11 deletierte Variante gleichermaßen exprimiert. Weiter besteht kein wesentlicher Unterschied zwischen der Expression in den bovinen TC und der Expression in den bovinen GC (Nogueira et al., 2007). Dieses Ergebnis steht im klaren Gegensatz zu den Untersuchungen von Abdennebi et al. (2002) nach denen ein deutlicher Unterschied in der Expression von LH-R in den GC und in den TC besteht. Weiterhin haben Nogueira et al. (2007) untersucht, inwiefern LH-R-Varianten in Follikeln des Rindes unter einer Größe von 6 mm (also in noch nicht selektierten Follikeln)

vorkommen. LH-R mRNA war nachweisbar, aber die Follikel zeigten keine Reaktion auf LH-Stimulation. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass vor der Selektion der Follikel noch keine funktionsfähigen Rezeptoren vorhanden sind.

Die Promotoren der LH-R-Gene weisen nur wenige TATA und CAAT Motive auf. Hingegen sind sie GC-reich und initiieren die Transkription an multiplen Stellen (Richards, 1994).

LH-Rezeptoren werden zuerst in den Thekazellen exprimiert. Später, während der Follikelselektion werden sie dann auch in den Granulosazellen exprimiert. Die Expression von LH-Rezeptoren in den Granulosazellen ist ein wesentliches Merkmal der Selektion. Sie ist für die weitere Entwicklung zum ovulierenden Follikel essentiell, da die Sekretion von FSH zu diesem Zeitpunkt nachlässt und durch die Sekretion von LH ersetzt wird. Da für die spätere Follikelentwicklung das wichtigste Hormon LH und nicht mehr FSH ist, ist die Expression des LH-R von großer Bedeutung. Unklar ist immer noch, ob die Expression von LH-R auch an der Selektion der Follikel beteiligt ist. Die Expression von LH-R findet in den GC sowie in den TC präovulatorischer Follikel statt und nimmt während der Follikelentwicklung zu. Nach dem LH-Peak allerdings geht die Expression des LH-Rezeptors stark zurück. Im C.I. ist sie aber wieder zu finden (Menon et al., 2004). Bei einigen Tierarten, wie bei der Ratte, ist LH-R ebenfalls in den interstitiellen Zellen zu finden (McFarland et al., 1989). Obwohl die gängige Meinung lange war, dass die Expression von LH-R ausschließlich in den Gonaden beider Geschlechter stattfindet, haben neuere Untersuchungen diese Ansicht modifiziert. So wurde der LH-R ebenfalls im Uterus verschiedener Tierarten gefunden, so zum Beispiel bei der Maus (Zhang et al., 2001) und bei dem Menschen (Reshef et al., 1990).

Die Expression von LH-Rezeptoren kann in zwei Kategorien unterteilt werden:

- die Expression von LH-R in den Thekazellen (TC).
- die Expression von LH-R in den Granulosazellen (GC).

Die Expression von LH-Rezeptoren in den Thekazellen findet schon in sehr frühen Stadien in der Follikelentwicklung statt (Peng et al., 1991). Sie ist erstmalig kurz nach der Bildung der Thekazellschicht zu finden (Xu et al., 1995, Bao et al., 1997a). Allerdings wird der genaue Zeitpunkt des ersten Auftretens nicht von allen Autoren gleich angegeben. So soll die LH-R Expression schon kurz nach der Bildung des Antrums stattfinden (Bao et al., 1997a, Braw-Tal und Roth, 2005) oder erst später einsetzen (Xu et al., 1995). Die Expression von

LH-R nimmt mit der Follikelentwicklung zu, obwohl nicht alle TC im gleichen Maße LH-R exprimieren. Letzteres deutet darauf hin, dass die TC keine homogene Zellpopulation darstellen und dass manche TC aktiver sind als andere (Braw-Tal und Roth, 2005).

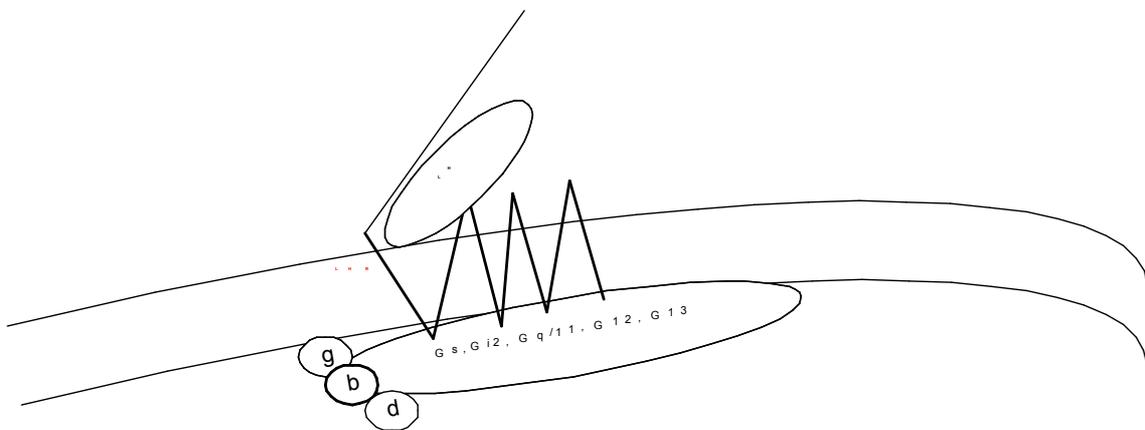
Die Expression von LH-R steht im engen zeitlichen Zusammenhang mit der Selektion und mit dem präovulatorischen LH-Peak (Peng et al., 1991). Diese Beobachtungen werden durch den Befund unterstützt, dass LH-R in den GC des Rindes nur in Follikeln, welche größer als 8 mm sind, gefunden wird (Bao et al., 1997b, Manikkam et al., 2001, Nogueira et al., 2007). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die folliculäre Dominanz und die LH-R Expression in engem zeitlichen Zusammenhang stehen. Davon abweichende Ergebnisse werden von Evans and Fortune (1997) berichtet: In ihren Beobachtungen findet die Selektion des DF ohne besondere Veränderungen der LH-R Expression statt, welche sich erst nach der Selektion verändert. Somit ist die Beteiligung von LH-R an der Selektion noch nicht zweifelsfrei geklärt. Es wird aber allgemein angenommen, dass die Expression von LH-R zwar zeitlich mit der Selektion korreliert, aber nicht als auslösender Mechanismus der Selektion in Frage kommt. Weiterhin bestehen auch hier wieder tierartige Unterschiede: so wird bei der Ratte LH-R in den GC aller reifen präovulatorischen Follikel exprimiert. Beim Schaf exprimiert dagegen normalerweise nur ein Follikel LH-R, sowohl in den TC als auch in den GC (England et al., 1981). Beim multiovulatorischen Schwein hingegen wachsen mehrere Follikel synchron heran und exprimieren im gleichen Maße LH-R in den GC (Liu et al., 1998a). LH-R wird nur in den muralen Granulosazellen und nicht in den Cumuluszellen der Follikel exprimiert. Die in den Cumuluszellen stattfindende Hemmung der LH-R-Expression entsteht wahrscheinlich durch Faktoren, die von der Oozyte sezerniert werden. Die Konzentrationen dieser Faktoren nimmt mit zunehmender Entfernung von der Oozyte ab, wodurch die LH-R-Expression in den muralen GC nicht mehr gehemmt wird und somit dort stattfindet. In Versuchen, bei denen die Oozyte aus dem Follikel entfernt wurde, findet die Expression auch in den Cumuluszellen statt (Eppig et al., 1997). Diese FSH-induzierte Expression von LH-R sinkt allerdings sofort wieder, wenn den Follikeln die von den Oozyten sezernierten Faktoren hinzugegeben werden (Eppig et al., 1997).

Die Expression der LH-R in den GC wird so wohl von FSH als auch von cAMP induziert (Richards, 1994, Ascoli et al., 2002, Garverick et al., 2002). Östrogen ist ebenfalls an der Induktion der LH-R in den GC beteiligt (Knecht et al., 1985). Die Expression von LH-R wird in mittleren Follikeln durch eine hohe Expression von ER β in den GC initiiert. Zwischen der Expression von ER β von LH-R besteht in den wachsenden Follikeln eine starke

Korrelation. Somit erscheint es als wahrscheinlich, dass E, welches in den GC synthetisiert wird, über autokrine/parakrine Wege auf die GC und auf die TC wirkt. (Bao et al., 2000).

Der LH-Rezeptor gehört zu der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR: G protein coupled receptors). Die G-Proteine sind heterodimere Einheiten und bestehen aus einer α -, β -, gamma und einer delta- UE. Die α - UE ist für den Austausch von GTP nach GDP maßgeblich und existiert in unterschiedlichen Formen (s, i2, q/11, 12, 13), welche für die Namensgebung des G-Proteins verantwortlich sind.

Abbildung 3.2



G-Protein-gekoppelter Rezeptor LH-R, mit seinem transmembranösen Anteil, und dem gekoppelten G-Proteinen, welches aus seinen α -, β -, gamma und delta-Untereinheiten besteht.
g: gamma, b. beta, d: delta

Der G-Protein gekoppelte LH-R kommt, wie geschildert, in TC, interstitiellen Zellen und reifen GC vor. Weiters ist der LH-R in den testikulären Leydig Zellen zu finden. Der LH-R war einer der ersten GPCR (G-Protein coupled receptor), bei welchem nachgewiesen wurde, dass er unabhängig von einander zwei Signaltransduktionswege aktiviert (Ascoli et al., 2002): Autoren haben neben der Aktivierung von cAMP und IP3 die Aktivierung von PLC in den GC der Ratte sowie im C.I. des Rindes nachgewiesen (Davis et al., 1986, Davis et al., 1987, Davis et al., 1994). FSH-R und der TSH-R sind zwei weitere Rezeptoren mit diesen Eigenschaften, welche als duale Kopplung bezeichnet wird. Der LH-R ist somit sowohl an die Adenylatzyklase und damit an den cAMP- und den PKA-Signaltransduktionsweg als auch an die Phospholipase C und somit an dem Protein-kinase C Signaltransduktionsweg beteiligt

(Herrlich et al., 1996, Ascoli et al., 2002). Die duale Kopplung von LH-R basiert auf der unabhängigen Aktivierungen unterschiedlicher G-Protein-Subfamilien (Gs, Gi und Gq) (Kuhn und Gudermann, 1999). Der murine LH-R aktiviert zum Beispiel die Adenylatzyklase (AC) über eine selektive Kopplung an Gs. Hingegen wird die Aktivierung der G-Proteine bei dem PLC-Signaltransduktionsweg kontrovers diskutiert. Manche Autoren bestätigen eine Aktivierung von Gs und Gi2 (Herrlich et al., 1996), bei der Aktivierung der Phospholipase C, ohne Beteiligung von G13 und Gq/11 (Kuhn und Gudermann, 1999). Andere Autoren sprechen sich hingegen bei der Aktivierung der PLC für eine Beteiligung von G13 und Gq/11 aus (Rajagopalan-Gupta et al., 1997). Auch hier muss noch geklärt werden, ob tierartige Unterschiede hinsichtlich der Struktur der Heterodimere bestehen und ob sich diese Unterschiede auf die Aktivierungen der einzelnen Signaltransduktionswege auswirken.

Weiter konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der Adenylatzyklase durch LH-R in allen Zellen stattfindet, während die Aktivierung des PLC-Signaltransduktionsweges nicht immer nachweisbar ist. Die Ursache für eine mangelnde Aktivierung des PLC-Signaltransduktionsweges ist noch nicht vollständig geklärt. Sie könnten auf einer insuffizienten Konzentration des Rezeptors auf der Oberfläche der jeweiligen Zellen beruhen (Zhu et al., 1994, Ascoli et al., 2002).

Die duale Kopplung des Rezeptors ist auch von der Dichte der Rezeptorexpression abhängig. So wird zum Beispiel der PLC-Signaltransduktionsweg bevorzugt bei hoher Rezeptor-Dichte induziert (Zhu et al., 1994).

Allerdings sind noch nicht alle Mechanismen der dualen Kopplung vollständig aufgeklärt, insbesondere ist die Bedeutung des β -Komplexes im Vergleich zu dem $G\alpha$ -Komplex bei der Signaltransduktion noch unklar (Puett et al., 2007). Die meisten Autoren sind sich darüber einig, dass Gs wesentlich an der Aktivierung der Adenylat-zyklase beteiligt ist (Ascoli et al., 2002). Die Aktivierung der Phospholipase C durch LH-R ist hingegen noch nicht endgültig geklärt (Herrlich et al., 1996).

Der LH-R wurde ebenfalls als Initiator anderer Signaltransduktionswege identifiziert. So vermittelt der Rezeptor die Aktivierung des Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Signaltransduktionsweges (Salvador et al., 2002, Srisuparp et al., 2003) so wie des Janus-Kinase (JAK) Signaltransduktionsweges (Carvalho et al., 2003). Über die Transkriptionsfaktoren, welche die zellulären Antworten dieser Signale weiterleiten, ist noch nicht viel bekannt. Ein wichtiger und schon seit einigen Jahren bekannter Faktor in diesem

Zusammenhang ist CREBP (cAMP Responsive Element Binding Protein) (Sterneck et al., 1997, Pall et al., 1997).

Die Herabregulation des LHR ist ein komplexer, Liganden induzierter Prozess (Menon et al., 2004). Dieser Prozess wird von LH induziert und verhindert dass im Ovar nach dem LH-Peak noch weitere Ovulationen stattfinden. Die Konzentration an LH-Rezeptoren nimmt somit nach dem LH-Peak rasch ab. Im Corpus Luteum treten LH-R dann wieder vermehrt auf. Für das Verständnis der „Down-regulation“ des LH-R ist das Prinzip der Rezeptorfunktionalität von großer Bedeutung. Glaubte man lange bei dem GPCR (G-Proteingekoppelten Rezeptor) an ein durch zwei Stadien charakterisiertes System, so weisen neuere Untersuchungen darauf hin, dass es sich hierbei um ein „Multiple-State-System“ handelt. Im System gibt es mehrere aktive (R) sowie mehrere inaktive (R*) Rezeptorkonformationen (und nicht nur zwei), die in einem Gleichgewicht stehen. Die Energieschwelle zwischen diesen beiden Stadien ist sehr niedrig. Damit kommt es zum Teil auch zu spontanen Konformationsänderungen von dem inaktiven in den aktiven Zustand (Schwartz TW, 1995).

Folgende Mechanismen sind an einem Verlust der LH-Rezeptor-Responsivität beteiligt:

- Desensibilisierung des Rezeptors
- Veränderung der Rezeptortranskription
- Posttranskriptionale Regulation der Dichte der Oberflächenrezeptoren

Die Desensibilisierung des Rezeptors findet durch die Entkopplung des Rezeptors und des G-Proteins statt. Daran ist auch β -Arrestin beteiligt. Allerdings ist unklar, ob die Phosphorylierung des GPCR für die Bindung von β -Arrestin notwendig ist. Die Entkopplung des Rezeptors führt zu einer verminderten Produktion des Signaltransduktionsmoleküls cAMP und somit zu einer reduzierten Responsivität auf LH. Die Desensibilisierung des Rezeptors durch Entkopplung ist im Vergleich zu den beiden anderen Wegen eine schnelle aber temporäre Möglichkeit, die Rezeptoraktivität herabzusetzen.

Die posttranskriptionelle Veränderung der Rezeptordichte an der Zelloberfläche erfolgt unter anderem durch Endozytose des Rezeptors. An diesem Prozess ist β -Arrestin beteiligt. β -Arrestin (es gibt β -Arrestin-1 und β -Arrestin-2) bildet mit dem phosphorylierten G-Protein einen Komplex. Durch ihn wird der GPCR zum Ziel verschiedener Moleküle, zum Beispiel von Clathrin-ummantelten Stachel, welche für die darauf folgende Internalisation der

Rezeptoren verantwortlich sind. Verschiedene Autoren haben die Bedeutung dieses GPCR- β -Arrestin-Komplexes für die Inaktivierung des Rezeptors untersucht. Dabei wird vor allem diskutiert, ob die Phosphorylierung des LH-Rezeptors eine notwendige Voraussetzung für die β -Arrestin-Bindung darstellt (Gether, 2000, Ascoli et al., 2002, Hunzicker-Dunn et al., 2003, Menon et al., 2004).

3.3.2 Rolle von LH in der Follikulogenese und LH-induzierte Genexpression

Die Bedeutung von LH in der Follikelentwicklung kann in zwei Phasen eingeteilt werden:

3.3.2.1 Die Bedeutung von LH in den TC

Ab dem Zeitpunkt, an dem die Follikel Gonadotropin-abhängig werden, wirkt LH über die LH Rezeptoren auf die TC und führt somit zu der Produktion von Androgen, welches anschließend in die GC transportiert wird und zu Östrogen umgewandelt wird (zwei-Zell-zwei-Gonadotropin-System). Zudem führt das Androgen über den AR zu einer erhöhten Expression von FSH-R und beteiligt sich somit an einer Erhöhung der Sensibilität von FSH.

3.3.2.2 Die Bedeutung von LH in den GC, welche erst zu/ab dem Zeitpunkt der Selektion stattfindet.

Die Bedeutung von LH in den GC kann ebenfalls in zwei Phasen geteilt werden. Es findet zuerst eine LH-Induzierte Reifung der Follikel statt, ab dem Zeitpunkt, wenn die FSH-induzierten Gene unter LH-Kontrolle fallen (McGee und Hsueh, 2000). Diese LH-responsive Reifung wird durch hohe Konzentrationen an Östrogen und Inhibin, welche einen Abfall an FSH initiieren, hervorgerufen. Darauf folgt der, von den hohen Östrogen-Konzentrationen induzierte, LH-Peak. Dieser tritt in ca. der Mitte des Zyklus auf und induziert eine ganze Reihe von Genen als Antwort auf die hohen cAMP-Konzentrationen. Die Expression dieser Gene führt zu der terminalen GC-Differenzierung (Luteinisierung) sowie zu der Follikelruptur und der Fortführung beziehungsweise Beendigung der Meiose I der Oozyte (McGee und Hsueh, 2000; Hillier, 2001). Der LH Peak führt zu einem dramatischen Anstieg von cAMP und auch der PKC-Signaltransduktionsweg wird aktiviert. Besonders die hohe Konzentration an cAMP induziert eine Veränderung in dem Expressionsmuster von den Zellzyklusregulatoren Cyclin D2, p27 sowie p21. Die Konzentrationen der beiden letzten werden massiv erhöht, die Konzentration von D2 sinkt. Diese neue Verteilung der

Konzentrationsverhältnisse (relevant sind hier die relativen und nicht die absoluten Konzentrationen) führt zu einem Stopp der GC Proliferation und fördert die Luteinisierung (Robker und Richards, 1998).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der LH-Peak zu der Fortführung der meiotischen Reifung der Oozyte, zur Differenzierung der GC (Luteinisierung) sowie zur Veränderung ihrer steroidogenen Aktivität führt. Außerdem führt der LH-Peak zur Ruptur der Follikelwand und somit zur Freisetzung der Eizelle. Dies wird durch die Synthese und Expression verschiedener Enzyme, welche die die Follikelwand anbauen und abbauen, erreicht (Tsafriri und Reich, 1999).

Bei diesen LH-induzierten Genen handelt es sich insbesondere um die folgenden:

- Gene, die besonders an der Progesteron Produktion bzw. an einem Steroid-shift beteiligt sind. Der LH-Peak fördert die Expression von P450scc und von StAR (McRae et al., 2005), hingegen hemmt er die Expression der P450arom, welche von FSH induziert wurde (Fitzpatrick et al., 1997, McRae et al., 2005). Damit steigt die Produktion von Progesteron an während die von Östrogen sinkt. Allerdings ist zu beobachten, dass die meisten dieser Ergebnisse auf Experimenten mit muralen GC beruhen. Diese unterscheiden sich deutlich in ihrer Steroidproduktion von den Cumuluszellen. Die Heterogenität der GC ist auch schon bei der Expression des LH-R aufgefallen. Die Besonderheit der Cumuluszellen basiert auf ihrer unmittelbaren Nähe zu der Oozyte. Die Cumuluszellen stehen unter dem Einfluss von Faktoren, die von der Oozyte sezerniert werden (Eppig et al., 1997). Die unmittelbare Nähe zur Oozyte beeinflusst auch hier wieder die Cumuluszellen in ihrer Steroidproduktion. Die Cumuluszellen weisen deutlich weniger P450arom und P450scc auf als die muralen GC. Dadurch ist die Steroidproduktion der Cumuluszellen deutlich geringer als die von muralen Granulosazellen (GC) (Zlotkin et al., 1986, Whitelaw et al., 1992).
- Gene, die an der Wirkung von Progesteron beteiligt sind. So induziert der LH-Peak besonders stark die Expression des Progesteronrezeptors (PR) (Natraj und Richards, 1993, Hillier, 2001)
- Zu den pro-inflammatorischen Genen gehören Faktoren wie Interleukin-1 β und Interleukin-1 β R (Adashi, 1998). Die Prostaglandin Endoperoxidase Synthase-2

und COX-2 (Cyklooxygenase-2) (Morris und Richards, 1995) werden ebenfalls induziert. LH induziert die Expression von COX-2 in den Cumuluszellen wahrscheinlich über die der EGF-Familie zugehörigen Faktoren Epiregulin, Ampiregulin sowie Betacellulin. Diese Faktoren binden in den Cumuluszellen an den EGF-Rezeptor und induzieren dadurch die Expression von COX-2 (Park et al., 2004).

- Weiterhin induziert der LH-Peak die Expression von 11 β -HSD1, und führt gleichzeitig zu einem Abfall der 11 β -HSD2 in den GC präovulatorischer Follikel. Dies führt zu einem Anstieg von Cortisol, welches anti-inflammatorisch wirkt (Tetsuka et al., 1997, Tetsuka et al., 1999).
- Es werden ebenfalls Proteasen exprimiert, die für den Umbau der Zellen von Bedeutung sind (Liu et al., 1998b). Die Expression dieser Gene führt schon vor der Ovulation zu einer Umstrukturierung des Gewebes, welche die spätere Freilassung der Oozyte sowie für die Umwandlung des Follikels in ein C.I. wichtig sind.
- LH induziert in den DF die Expression von VEGF, welches zu einer erhöhten Blutzufuhr und somit auch zu einer erhöhten Zufuhr von Gonadotropinen führt (Ravindranath et al., 1992).
- LH ist an der Expression einer ganzen Reihe weiterer Faktoren beteiligt. Diese werden hier nur genannt und nicht weiter behandelt: ALAS (Aminolevulinsäure Synthase), ERG-1, GCS, Epiregulin, PACAP, TSG-6 (Tumornekrosefaktor α induziertes Protein 6, RGS2 (Regulator of G-Protein Signaling-2), Adrenoxin, 3 β -HSD, CD63 und noch einige mehr.

Die räumliche Expression der Gene in den Stratum Granulosum deutet darauf hin, dass der Großteil der Antworten auf die Gonadotropine eher uniform in den GC stattfindet und somit nicht auf die apicale Region des Follikels, in dem die Ruptur stattfindet, beschränkt ist.

4 Schlüsselenzyme der Steroidgenese

4.1 Steroidogenic acute Regulatory Protein (StAR)

StAR ist für den Transport von Cholesterol in das Mitochondrium essentiell und kontrolliert diesen limitierenden Schritt der Progesteron-Biosynthese (Stocco, 1997, Stocco und Clark, 1997, Stocco, 2001). Die Expression von StAR steigt mit zunehmender Follikelgröße. Dies korreliert mit der erhöhten Androgenproduktion während des Follikelwachstums und dem damit verbundenen erhöhten Bedarf an Vorläufermolekülen. Während der Rekrutierung der Follikel ist keine Veränderung des Expressionsmusters von StAR zu finden. Im Unterschied dazu steigt die Expression von StAR bei der Selektion der Follikel (Bao et al., 1998). Dieser Anstieg wird durch den LH-Peak induziert und ist für die dann ansteigende Östradiolproduktion von großer Bedeutung (Rusovici et al., 2005, Su et al., 2006). Die Expression von StAR ist FSH-induziert (Orisaka et al., 2006) und wird durch den LH-Peak verstärkt (Rusovici et al., 2005).

Die Expression von StAR findet ab dem Stadium des kleinen antralen Follikels in den TC statt. Die Expression von StAR ist in den TC, die unmittelbar unter der Basalmembran der Granulosazellschicht liegen, am höchsten und nimmt mit zunehmender Entfernung von dieser ab (Braw-Tal und Roth, 2005). Eine Expression in den GC findet nach Bao et al. (1998) nicht statt, wohingegen andere Autoren sie beim Schwein (Garmey et al., 2000), beim Rind (Pescador et al., 1996), beim Schaf (Logan et al., 2002) und der Maus (Su et al., 2006) nachweisen konnten. Logan et al. (2002) haben ebenfalls eine Expression von StAR in der Oocyte des Schafes nachgewiesen. Hier scheint StAR aber eine andere, noch nicht bekannte, Funktion zu besitzen.

StAR wurde unter anderem auch in humanen renalen distalen Tubulus-Epithelien, in Sertolizellen und humanen fetalen Oozyten gefunden. Diese Zellen bzw. Gewebe exprimieren keine P450_{scc} (Pollack et al., 1997). Die Bedeutung von StAR in diesen Zellen ist noch unbekannt. Eventuell beteiligt sich StAR hier am Cholesterol-Transport, der einen anderen metabolischen Prozess als der Steroidsynthese dient.

Tabelle 4.1 Tierartliche Besonderheiten der StAR Expression

Tierart		Quelle
Allgemein	Kein Expression von StAR in den GC, nur in den TC	Bao et al., 1998
Maus	Expression von StAR in den GC so wie in den TC	Su et al., 2006
Rind	FSH verstärkt die Expression von StAR in den GC Keine Expression von StAR in den GC	Orisaka et al., 2006 Logan et al., 2002 Bao et al., 1998
Schaf	Expression von StAR in den GC und den TC, sowie in der Oozyte	Logan et al., 2002
Schwein	Expression von StAR in den GC	Rusovici et al., 2005

StAR: Steroid acute regulatory protein, GC: Granuloosazellen, TC: Thekazellen

Die ersten 250 bp des proximalen Promotors von StAR sind für die FSH und cAMP-stimulierte Gen-Transkription sehr wichtig. Als beteiligte Transkriptionsfaktoren sind unter anderem zu erwähnen: CCAAT/enhancer binding protein (CEBP), GATA-4 und splicing factor 1 (Sf-1) (LaVoie et al., 2004, Rusovici et al., 2005).

GDF-9 spielt in humanen GC eine wichtige Rolle und inhibiert die cAMP-stimulierte StAR-Expression (sowie die Expression von P450scc und P450arom) beim Menschen in den GC und in den TC. GDF-9 reduziert die Progesteron-Synthese um 40% (Yamamoto et al., 2002). Welche Faktoren an dieser Inhibition beteiligt sind und inwiefern „splicing factor 1“ (Sf-1) involviert ist, bleibt noch zu klären. Abweichende Ergebnisse wurden allerdings bei Nagern gefunden. Die Untersuchungen von präovulatorischen GC der Ratte durch Vitt et al. (2002) ergaben, dass GDF-9 die Forskolin-induzierte Stimulation der Progesteron-Synthese nicht inhibiert. Elvin et al. (1999a) fanden, dass GDF-9 bei der Maus keinen inhibitorischen Einfluss auf die FSH-stimulierte Progesteron Produktion hat, hingegen aber die basale Progesteron Produktion erhöht. Möglicherweise ist das unterschiedliche Verhalten von GDF-9 auf Unterschiede zwischen mono- und polyovulatorischen Tieren zurückzuführen.

Die Mitglieder der TGF- β -Familie BMP-4, -6, -7 und -15 inhibieren die FSH induzierte Progesteronproduktion (Pierre et al., 2005, Lee et al., 2001) und beim Schaf (Pierre et al., 2004, Shimasaki et al., 2004). FGF-9 dagegen erhöht die Progesteron Synthese durch verstärkte Expression von StAR (Drummond et al., 2007). EGF supprimiert die FSH-stimulierte GC-Differenzierung durch Hemmung der StAR-Gentranskription (Rusovici et al., 2005).

Tabelle 4.2 Faktoren, welche an der Expression von StAR beteiligt sind

Faktor	Funktion	Quelle
GDF-9	Inhibiert die cAMP stimulierte StAR Expression beim Menschen Keine Inhibition der StAR Expression bei den Nagern Bei der Maus: Stimulation der basalen Progesteron Synthese	Yamamoto et al., 2002 Vitt et al., 2000 Elvin et al., 1999
BMP-4, -6, -7, -15	Inhibieren StAR und somit die Progesteron Produktion	Pierre et al., 2005 Pierre et al., 2004 Shimasaki et al., 2004
FGF-9	Verstärkt die Expression von StAR und somit die Produktion von Progesteron	Drummond et al., 2007
EGF	Hemmt die Gentranskription von StAR	Rusovici et al., 2005

GDF-9: Growth differentiation factor 9, cAMP: cyclic adenosin monophosphat, StAR: steroid acute regulatory protein, BMP: Bone morphogenetic protein, FGF-9: Fibroblast growth factor 9, EGF: epidermal growth factor

4.2 P450 side chain cleavage (P450scc)

Das P450scc ist ein Enzym, das an der Umwandlung von Cholesterol zu Pregnenolon beteiligt ist. Es ist in den Mitochondrien lokalisiert. P450scc tritt erstmals in den TC der kleinen antralen Follikel auf. Die Expression von P450scc in den GC, zusammen mit der Expression von P450arom, ist ein wesentliches Merkmal der Follikelrekrutierung (Bao und Garverick, 1998), und findet erstmals in GC von antralen Follikeln statt.

Die Expression steigt mit der Größenzunahme des Follikels an. Beim Schaf ist keine Expression von P450scc in den Follikeln vom Typ 1 bis 3 zu finden. P450scc kann erst in den Thekazellen ab Follikel-Typ 4 nachgewiesen werden, allerdings nicht in allen Follikeln. Ab einem Follikeldurchmesser von mehr als 2,2 mm kann in mehr als 80% der Follikel P450scc in den GC nachgewiesen werden. In den Oozyten dagegen wurde keine Expression gefunden (Logan et al., 2002). Die Expression von P450scc findet beim Rind kurz vor dem Auftreten von StAR statt und kommt erstmals in Thekazellen nicht rekrutierter Follikel vor.

Tabelle 4.3 Expression von P450scc in den verschiedenen Kompartimenten bei verschiedenen Follikelgrößen

	Typ 1-2			Typ 3			Typ 4: kleiner präantraler Follikel			Typ 5			Typ 5>2,2mm			Typ 5>3mm		
	TC	GC	Ooc	TC	GC	Ooc	TC	GC	Ooc	TC	GC	Ooc	TC	GC	Ooc	TC	GC	Ooc
Maus	-	-		-	-		-	-		+	-		+	?		+	+	
Schaf	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-
Rind	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-
Schwein																		

TC: Thekazellen, GC: Granulosazellen, Ooc: Oozyte,
 +: Expression konnte nachgewiesen werden, ?: unklar
 -: Expression konnte nicht nachgewiesen werden

Die Expression von P450scc in den GC wird vor allem durch FSH im Zusammenwirken mit IGF I stimuliert (Eimerl und Orly, 2002). Allerdings bestehen hier tierartige Unterschiede, z.B. hat IGF I allein keine stimulierende Wirkung auf die P450scc Expression in den GC der Ratte, während IGF I beim Schwein allein die P450 Expression induzieren kann (Eimerl und Orly, 2002, Urban et al., 1990).

Tabelle 4.4 Tierartige Besonderheiten bei der Expression von P450scc

Tierart	Faktoren, welche die P450scc Expression beeinflussen	Quelle
Maus Ratte	Synergie von IGF-I und FSH in Verstärkung der P450scc Expression. Allerdings ist der Mechanismus unklar.	Eimerl et al., 2002
Rind	Eine Abnahme von FSH, IGF-I und Inhibin führt zu einer verminderten Expression von P450scc (Kultur)	Silva et al., 2002
Schwein	IGF I verstärkt die Wirkung von FSH auf die Expression von P450scc in den GC; IGF-I alleine induziert Expression von P450scc	Winters et al., 1998 Eimerl et al., 2002

P450scc: Cytochrom P450 side chain cleavage, IGF-I: Insulin-like growth factor I, FSH: Follikel stimulierendes Hormon, GC: Granulosazellen

BMP-4, -6, -7, und -15 haben bei der Ratte laut Pierre et al. (2005) eine inhibierende Wirkung auf die FSH-induzierte Progesteron Produktion und senken unter anderem die Expression von P450scc. Dies wurde auch schon von Otsuka et al. (2001) festgestellt. Allerdings ist beim Rind nach Glister et al. (2004) die Expression von P450scc nur wenig betroffen und wird nur geringfügig gesenkt. TGF β hingegen scheint die Expression von P450scc zu steigern (Magoffin et al., 1989). Auch FGF-9 stimuliert durch verstärkte Expression von P450scc die Progesteron-Synthese (Drummond et al., 2007).

Tabelle 4.5 Faktoren, welche die Expression von P450scc beeinflussen

Faktor	Wirkung	Quelle
BMPs	Inhibieren die Expression von P450scc bei der Ratte und beim Rind	Pierre et al., 2005 Otsuka et al., 2001 Glister et al., 2004
TGF β	Steigert die Expression von P450scc	Magoffin et al., 1989
FGF-9	Steigert die Expression von P450scc	Drummond et al., 2007
FSH	Stimuliert die Expression von P450scc	Eimerl et al., 2002
IGF-I	Stimuliert, meist zusammen mit FSH, die Expression von P450scc	Eimerl et al., 2002 Urban et al., 1990

BMP: Bone morphogenetic protein, TGF β : Transforming growth factor β , FGF-9: Fibroblast growth factor 9, FSH: Follikel stimulierendes Hormon, IGF-I: Insulin-like growth factor-I, P450scc: Cytochrom P450 side chain cleavage

Transkriptionsfaktoren, die an der Expression von P450scc beteiligt sind, sind unter anderem der an den proximalen Promotor bindende Steroidogene Faktor 1 (SF-1) die an den

distalen Promotor bindende Faktoren SF-1, Activating Protein-2 (AP-2), (CRE-binding Protein-1 (CREB-1) und GATA-4 (Sher et al., 2007). Nach dem LH-Peak steigt die Expression der P450_{scc} weiter an, zusammen mit der Expression von StAR. Da zeitgleich die P450_{arom} Expression abnimmt, kommt es zu einem LH-induzierten Shift von Östrogen zu Progesteron. Diese Verschiebung der Steroidogenese ist ein wesentliches Kennzeichen der terminalen Differenzierung der Follikel und essentiell für die Ovulation (Su et al., 2006).

4.3 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (3 β -HSD)

3 β -HSD ist ein Enzym, das im Endoplasmatischen Reticulum lokalisiert ist und die Umwandlung von Pregnenolon zu Progesteron in den TC sowie in den GC bewirkt. Dieser Umwandlungsweg wird auch als *D4*-Pfad bezeichnet. Bei dem *D5* Pfad wird Pregnenolon durch die P450_{c17} in Dihydroepiandrosteron (DHEA) und anschließend zu Androstenedion in den TC und dann durch die P450 Aromatase in den GC zu Östradiol umgewandelt. Beim Rind und beim Schaf wird bevorzugt der *D5*-Umwandlungspfad beschritten (Bao et al., 1997a).

Die Expression der 3 β -HSD weist große tierartliche Unterschiede auf. Conley et al. (1995) fanden, dass sich die Expression von 3 β -HSD beim Schaf und beim Schwein auf die TC des antralen Follikels beschränkt und in den GC gar nicht nachweisbar ist, während beim Rind ausschließlich die GC des präovulatorischen Follikels 3 β -HSD exprimieren. Die Ergebnisse von Duggavatti et al. (2006) besagen, dass die Aktivität von 3 β -HSD beim Schaf nicht, wie bislang beschrieben, nach dem präovulatorischen LH-Peak abfällt, sondern gleich hoch bleibt, wenn nicht sogar ansteigt und maßgeblich an der hohen Progesteronbildung nach dem LH-Peak beteiligt ist. Logan et al. (2002), fanden beim Schaf, dass die Expression von 3 β -HSD in fast allen GC von Typ 1, 1a und Typ 2 Follikel vorhanden ist. In den Follikeln von Typ 3 und Typ 4 ist sie in einigen GC nahe der Oozyte lokalisiert. Ab Typ 4 fängt die Expression auch in den TC an, um im Typ 5 Follikel eine maximale Expression zu erreichen (Für die Einteilung der Follikel in Typen siehe Kapitel 2, Punkt 2.5.).

Die Untersuchungen von Bao et al. (1997b) beim Rind ergaben, dass die Expression von 3 β -HSD in den TC ab dem präantralen Follikel (Typ4) stattfindet und in den GC ab dem präovulatorischen Follikel (\geq 8mm) vor dem LH-Peak ansteigt. Nach dem LH-Peak nimmt die Expression wieder ab. Diese Autoren haben ebenfalls beobachtet, dass die Expression von LH-R und 3 β -HSD immer in den GC der selektierten Follikel anzutreffen ist. Die Konzentration von 3 β -HSD steigt mit dem Wachstum der Follikel an. In den TC ist keine Veränderung in der Expression um den Zeitpunkt der Follikelselektion zu erkennen.

Zum Schwein sind ebenfalls kontroverse Angaben über die 3 β -HSD Expression zu finden. Laut Conley et al. (1995) ist die 3 β -HSD Expression im Vergleich zum Schaf und Rind hoch und findet ausschließlich in den TC und in einigen endothelialen Zellen von kleinen Gefäßen statt. Dagegen fanden Yuan et al. (1996) ein Expressionsmuster, das dem der anderen Tierarten gleicht. Dabei weisen die TC eine Expression von 3 β -HSD schon im präantralen Follikel auf. Die Konzentration von 3 β -HSD mRNA steigt in kleinen antralen Follikeln an und ist schließlich in präovulatorischen Follikel am höchsten.

Die Expression von 3 β -HSD wird vor allem von LH, aber auch von FSH sowie Östradiol hoch, und von Progesteron herunter reguliert (Bao et al., 1997a).

Auch hier spielt die TGF β -Familie wieder eine große Rolle: beim Rind wird die Expression durch BMP-4, -6, und -7 leicht gesenkt (Glister et al., 2004). BMP-2 und -4 senken die 3 β -HSD Expression beim Schwein (Brankin et al., 2005), und die Expression bei der Ratte wird von BMP -4, -6, -7, und -15 inhibiert (Pierre et al., 2005).

Tabelle 4.6 Faktoren, welche die Expression der 3 β -HSD beeinflussen

Faktor	Wirkung	Quelle
BMP -2, -4, -6, -7	Inhibieren die Expression von 3 β -HSD	Glister et al., 2004 Brankin et al., 2005 Pierre et al., 2005
FSH/LH	Regulieren die Expression von 3 β -HSD hoch	Bao et al., 1997b
Östrogen	Reguliert die Expression von 3 β -HSD hoch	Bao et al., 1997b
Progesteron	Reguliert die Expression von 3 β -HSD herab	Bao et al., 1997b
EGF	Erhöht die Aktivität und die Expression von 3 β -HSD	Bendell et al., 1990
TGF β 1	Erhöht die Aktivität und die Expression von 3 β -HSD	Bendell et al., 1990
aFGF, bFGF	Inhibieren die 3 β -HSD in Leydig Zellen	Herrmann et al., 2002

BMP: Bone morphogenetic protein, FSH: Follikelstimulierendes Hormon, LH: Luteinisierendes Hormon, EGF: Epidermal growth factor, TGF β 1: Transforming growth factor β 1, FGF: Fibroblast growth factor, 3 β -HSD: 3 beta Hydroxysteroiddehydrogenase

4.4 Cytochrom P450 17-alpha-Hydroxylase (P450c17, 17 α -OH)

P450c17 ist ein steroidbildendes Enzym, das je nach Substrat zwei Funktionen aufweist. Es wirkt an der Umwandlung von Pregnenolon zu Progesteron als 17- α -Hydroxylase während es bei den Substraten 17-Hydroxypregnenolon und 17-Hydroxyprogesteron eine

17,20-lyase Aktivität aufweist (Herrmann et al., 2002). Das Enzym befindet sich im Endoplasmatischen Retikulum der Zellen und wird erst katalytisch aktiv, wenn es als Komplex an die NADPH-Cytochrom P450 Reduktase gebunden ist.

Die Untersuchungen zur Expression von P450 wurden unter anderem deshalb durchgeführt, um herauszufinden, welche Schritte für die Östradiol-Synthese limitierend sind (die Umwandlung von P450c17 in Androgen oder die anschließende Aromatisierung durch P450arom (Corbin et al., 2003)). Da die Aktivität der P450c17 fast 100-mal höher ist als die der P450arom ist es unwahrscheinlich, dass P450c17 bei der Östrogensynthese der limitierende Faktor ist.

Allen vier Tierarten (Maus, Schaf, Rind und Schwein) ist gemeinsam, dass die Expression von P450c17 ausschließlich in der TI stattfindet und zwar erst mit der Differenzierung der TC kurz vor der Antrum-Bildung, bzw. im späten präantralen Follikel (je nach Autor) auftritt (Xu et al., 1995, Bao et al., 1997b, Braw-Tal et al., 2002). Sie findet nie in GC statt. Die Intensität der Expression nimmt mit dem Heranreifen zum präovulatorischen Follikel zu und sinkt post-ovulatorisch wieder ab.

Tierartige Unterschiede treten lediglich hinsichtlich der Lokalisation der P450c17 synthetisierenden TI Zellen auf. Beim Schwein ist eine Zellschicht der TI, die unmittelbar unter der Basalmembran der Granulosazellschicht liegt, bei immunhistochemischen Untersuchungen für P450c17 negativ, während bei Rind und Schaf immunonegative Zellen diffus in der TI verteilt sind (Conley et al., 1995). Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass nicht alle Thekazellen funktionell identisch sind (die Theca interna besteht somit aus Zellen, die aktiv Steroide bilden und solchen, die inaktiv sind). Ein weiterer Unterschied besteht in der postovulatorischen Expression, die bei allen Tierarten fast bis auf null herabsinkt aber beim Schwein in der frühen lutealen Phase, in niedriger Konzentrationen, noch nachweisbar ist (Conley et al., 1995).

Die Expression von P450c17 findet kurz vor der Expression der P450arom statt (Xu et al., 1995, Bao et al., 1997). Das Expressionsmuster ist dem von LH-R sehr ähnlich (Braw-Tal, 2002). Sie wird von FSH und von LH stimuliert. Allerdings scheint die Wirkung von FSH über parakrine Faktoren vermittelt zu werden (Smyth et al., 1993, Gray et al., 1996).

Die Expression von P450c17 wird beim Rind durch Faktoren wie BMP-4, -5 und -7 deutlich herab gesenkt, was zu einer verminderten Androgen-Produktion führt (Glistler et al., 2004). Die inhibitorische Wirkung von TGF β 1 auf P450c17 wurde bis dato nur in

adrenokortikalen Zellen nachgewiesen (Biernacka-Lukanty et al., 2004). GDF-9 erhöht die Expression von P450c17 in Thekazellen (Vitt et al., 2000).

Tabelle 4.7 Faktoren, welche an der Synthese und Sekretion von P450c17 beteiligt sind

Faktor	Wirkung	Quelle
FSH	Stimuliert die Expression von P450c17	Smith et al., 1993 Gray et al., 1996
LH	Stimuliert die Expression von P450c17	Smith et al., 1993 Gray et al., 1996
BMP-4, -5, -7	Senken die Expression von P450c17	Glister et al., 2004
TGFβ1	In adrenokortikalen Zellen inhibiert TGFβ1 die Expression der P450c17	Bernacka-Lukanty et al., 2004
GDF-9	Erhöht die Expression von P450c17 in den Thekazellen	Vitt et al., 2000

FSH: Follikelstimulierendes Hormon, LH: Luteinisierendes Hormon, BMP: Bone morphogenetic protein, TGFβ1: Transforming growth factor β1, GDF-9: Growth differentiation factor 9, P450c17: Cytochrom P450 17α-Hydroxylase

4.5 P450 Aromatase (P450arom)

Diese Aromatase (P450arom oder CYP19A1) ist für die Aromatisierung der C19 Steroide zuständig und wandelt Androgene in Östrogene um (Androstenedion in Östradiol und Testosteron in Östradiol-17β). Sie ist ein Mitglied der Cytochrom P450 Familie. Die P450arom ist erst im Komplex mit NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase aktiv und im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (Corbin et al., 2003).

Die Expression der P450arom in den GC findet gleichzeitig mit der Expression von P450scc statt und wird mit der Rekrutierung der Follikel assoziiert (Bao und Garverick, 1998). Die Induktion der P450scc und der P450arom erfolgt in den GC durch den FSH-Anstieg vor der Follikelrekrutierung, zu Beginn einer neuen Follikelwelle. Die Expression ist bei Rind, Schaf und Maus auf die GC beschränkt. Beim Schwein ist hier eine Besonderheit anzutreffen: die Aromatase wird hier auch in den TI exprimiert (Garrett und Guthrie, 1997). Die Expression der Aromatase steigt mit dem Follikelwachstum an und führt damit zu steigenden Östrogen-Konzentrationen (Tetsuka und Hillier, 1997). Nach dem LH-Peak fallen sowohl die Expression der P450arom als auch die Östrogenwerte stark ab. Im frühen lutealen Stadium sind noch minimale Werte vorhanden während im mitt-lutealen Stadium das Enzym nur noch in Spuren nachweisbar ist (Slomczynska und Tabarowski, 2001, Su et al., 2006). Dies liegt vor allem an einer Veränderung der Expressionsmusters nach dem LH-Peak, wobei P450arom vermindert und P450scc sowie StAR verstärkt induziert werden. Dies führt zu einer

Verschiebung des Östrogen-Progesteron-Verhältnisses (Su et al., 2006). Atretische Follikel weisen keine P450arom Expression auf. Ein Verlust der P450 Expression ist einer der frühesten Anzeichen für eine Atresie. Wie schon bei P450c17 erwähnt, ist die Aromatase der limitierende Faktor der Östrogen-Synthese (Corbin et al., 2003). Der Verlauf der P450 Expression im Follikel korreliert daher mit den Östrogen-Werten.

In verschiedenen Studien wurden die Wechselwirkungen der Aromatase mit lokalen Faktoren untersucht. So haben Knight et al (2001) gezeigt, dass Activin die Aktivität der P450arom verstärkt. Otsuka et al. (2005) haben herausgefunden, dass die Oozyte an der Östrogenamplifikation der FSH-Signale in den GC beteiligt ist und diese verstärkt. Silva et al. (2002) konnten zeigen, dass eine Reduktion der Insulin- und IGF-Konzentration zu einer reduzierten Aktivität der P450arom führt. Spicer et al. (2007) konnten zeigen, dass beim Rind sowohl IGF-I als auch IGF-II die Aromatase in den GC stimulieren. Allerdings geschieht dies durch eine IGF induzierte „Auf“-Regulierung der FSH-R und nicht durch eine „down“-Regulierung der IGF-IIR. Desweiteren beeinflussen die BMPs über die Expression der Aromatase die Östrogenkonzentration. So stimulieren BMP-4 und BMP-7 die FSH-induzierte Östrogenproduktion über einen Anstieg der P450arom Expression (Lee et al., 2001, Shimasaki et al., 2004).

In nicht-luteinisierten GC der Ratte steigert Prostaglandin E₂ (PGE₂) die GATA-4 induzierte CYP19 Expression in den GC, während PGE₂ (Prostaglandin F₂) in luteinisierten GC keine Wirkung hervorruft, dafür aber PGF₂, welches im C.I. die Expression von CYP19 sinken lässt (Cai et al., 2007). PGE₂ stimuliert die Bindung von GATA-4 an den Promotor von CYP19. Dies konnte durch Mutationen der GATA-4 Bindungsstelle nachgewiesen werden, durch die PGE₂ seine stimulierende Wirkung verliert. Daher ist GATA-4, zumindest teilweise, für die Vermittlung des stimulierenden Effekts von PGE₂ verantwortlich (Cai et al., 2007). Der Transkriptionsfaktor GATA-4 wird ebenfalls von FSH stimuliert (Kwintkiewicz et al., 2007).

Tabelle 4.7 Faktoren, welche die Expression der P450arom beeinflussen

Faktor	Wirkung auf die P450arom	Quelle
FSH	Steigert die Expression der P450arom	Bao et al., 1998 Kwintkiewicz et al., 2007
LH	LH-Peak reduziert die Expression der P450arom	Su et al., 2006
Activin	Steigert die Aktivität von P450arom	Knight et al., 2001
Insulin	Steigert die Aktivität der P450arom	Ostuka et al., 2005
IGFI/II	Stimulieren die Expression und Aktivität von P450arom	Otsuka et al., 2005 Silva et al., 2002 Spicer et al., 2007
BMP-4/-7	Steigern die Expression der P450arom	Lee et al., 2001 Shimasaki et al., 2004
PGE ₂	Steigert über den Transkriptionsfaktor GATA-4 die P450arom Expression	Cai et al., 2007
Il-1	Inhibiert die Expression der P450arom in bovinen GC	Yasuda et al., 1990
Il-6	Stimuliert die Expression von P450arom	Machelon et al., 1994
TNF	Inhibiert die Aktivität/Expression der P450arom	Adashi et al., 1989
EGF	Inhibiert die Aktivität/Expression der P450arom	Steinkampf et al., 1988
TGFβ1	Stimuliert die Aktivität/Expression der P450arom	Bendell et al., 1988
TGFα	Inhibiert die Aktivität/Expression der P450arom	Ying et al., 1986
FGF	Inhibiert die Aktivität/Expression der P450arom	Adashi et al., 1988

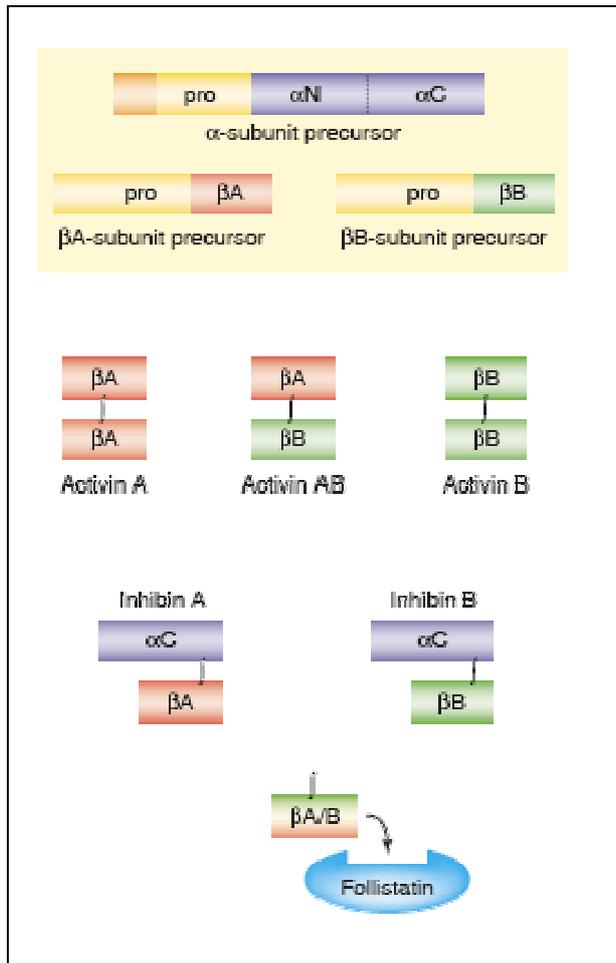
FSH: Follikelstimulierendes Hormon, LH: Luteinisierendes Hormon, BMP: Bone morphogenetic protein, PGE₂: Prostaglandin E₂, Il: Interleukin, TNF: Tumor necrose factor, EGF: Epidermal growth factor, TGF: Transforming growth factor, FGF: Fibroblast growth factor

5 Activin, Inhibin und Follistatin

Activin und Inhibin sind Mitglieder der TGF β -Familie. Sie gehören, zusammen mit Inhibin, zu einer Gruppe von lokalen und hypophysären Regulatoren der Follikulogenese. Activin wurde kurz nach der Isolierung von Inhibin aus folliculärer Flüssigkeit gewonnen und wirkt positiv auf die FSH-Sekretion und die FSH-Expression.

Activin besteht aus β -Ketten, welche Homodimere bilden. Es sind mittlerweile 5 β -Untereinheiten (UE) identifiziert worden (β a- β e). Davon sind β a und β b an der Bildung von Activin und Inhibin beteiligt, β c und β d wurden in Säugetieren gefunden und die Untereinheit β e beim Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) (Bernard et al., 2001, Bilezikjian et al., 2004). Es sind drei Dimerformen bekannt: β a β a β a β b, β b β b (Gregory und Kaiser, 2004). Die meisten Untersuchungen wurden mit Activin A durchgeführt. Die Wirkung von Activin B und Activin AB ist hingegen wenig erforscht (Drummond, 2005).

Abbildung 5.1 Struktur von Activin und Inhibin



Struktur von Activin und Inhibin: Entstehung der Untereinheiten aus einer Vorläufer-Form (Precursor) und mögliche Zusammensetzung der Untereinheiten, modifiziert nach Knight et al. (2001).

Activin wird, wie auch Inhibin, in einer Vorläuferform synthetisiert. Nach Abspaltung der prä- und pro-Region entstehen die reifen β A-, β B- und α -Untereinheiten. Diese sind dann zur Dimerisation fähig und können Activin A, Activin AB und Activin B, sowie Inhibin A und Inhibin B bilden (Knight, 1996). Die Activine binden an einen Zell-Membran-Rezeptor mit Serin/Threonin-Protein-Kinase-Aktivität vom Typ I oder Typ II. Der Mechanismus ist dabei folgendermaßen: Activin bindet an seinen Rezeptor Typ II, welcher dann den Rezeptor Typ I rekrutiert und mit diesem einen Rezeptorkomplex bildet. Der Komplex vermittelt seinerseits die Activinwirkung über die intrazellulären Mediatoren Smad 2 oder Smad 3, die mit dem Co-Smad 4 assoziieren. Der Smad-Komplex ist in der Lage, in den Zellkern einzutreten und die Transkription der Activin-responsiven Gene zu regulieren (Siehe Abbildung 5.3).

Activin und Inhibin wirken im Wechselspiel mit Follistatin. Follistatin ist nicht Mitglied der TGF β -Familie, aber ist funktionell Activin und Inhibin zugehörig. Follistatin bindet an Activin und reduziert damit dessen Bioverfügbarkeit und Wirkung.

5.1 Die Activin-Wirkung

Die Wirkungen von Activin auf die gonadale Achse sind vielfältig und lassen sich grob in zwei Kategorien einteilen: Die auto- und parakrinen Wirkungen am Ovar sowie die auto- und parakrinen Wirkungen an der Hypophyse.

5.1.1 Die autokrinen/ parakrinen Wirkungen am Ovar

Activin hat lokale Wirkung am Ovar, wo es autokrin auf die GC sowie parakrin auf die TC und die Oozyte wirkt.

Des Weiteren reguliert Activin auch über einen negativen Feedback LH, ACTH sowie GH.

Activin wird erstmals in Sekundärfollikeln produziert und lässt andere kleinere Follikel im Ruhestadium verharren. Daraus kann abgeleitet werden, dass eine Abnahme des lokalen Activin-Einflusses, zum Beispiel infolge einer Atresie von frühen Sekundärfollikeln, zu einer Initiation der frühen Follikulogenese führen kann und dass Activin damit einen entscheidenden Regulator für die frühe Follikelentwicklung darstellt (Mizunuma et al., 1999).

Activin ist ein Mitogen der Granulosa Zellen und stimuliert deren Proliferation. Dies ist durch Versuche an KO-Mäusen für den Typ II Rezeptor verdeutlicht worden, deren Follikelwachstum im frühen antralen Stadium endet. Allerdings sinkt in diesen Versuchen das Plasma-FSH ebenfalls ab, was die Frage aufwirft, ob der Entwicklungs-Stopp nur an Activin oder auch an FSH liegt (Knight und Glistler, 2001).

Activin hat am Ovar vielfältige Effekte und wirkt vor allem in der präantralen und in der frühen antralen Follikulogenese als ein autokriner Regulator der Follikel. Wesentliches Kriterium für die Wirkung von Activin ist das Stadium der Follikel (Miro et al., 1995): In den präantralen Follikeln fördert Activin die Expression der FSH-R (Nakamura et al., 1993) und bewirkt somit eine Responsivität auf FSH. Activin wirkt im Gegensatz zu IGF auch in Abwesenheit von cAMP auf die FSR-H (Findlay, 1993). Somit nimmt Activin eine Schlüsselrolle in der Gonadotropinsensitivität der Follikel durch die Expression von FSH-R,

einer der ausschlaggebenden Dreh- und Angelpunkte in der Lebensgeschichte eines Follikels, ein. Im antralen Follikel behält Activin zwar seine positive Wirkung auf die Proliferation der GC, aber diese Wirkung rückt in den Hintergrund. Vordergründig wird FSH (und später dann LH) zur treibenden Kraft (Knight und Glister, 2001).

Bei der Steroidogenese fördert Activin in kleinen antralen Follikeln die Expression der P450arom und wirkt somit positiv auf die Umwandlung von Androgen zu Östrogen. Zeitgleich inhibiert Activin aber die Expression der P450scc so wie die Progesteron-Synthese (Hillier und Miro, 1993, Knight und Glister, 2001).

Die Progesteron-Produktion wird von Activin ebenfalls abhängig vom Follikelstadium reguliert: sie wird in nicht differenzierten GC gefördert und in differenzierten GC gehemmt. Activin erhöht in nicht-differenzierten GC die Expression und Aktivität von P450scc. Hingegen wird selbige in differenzierten GC gehemmt. So fungiert Activin als ein Förderer kleiner Follikel und hemmt die Luteinisierung sowie die Atresie großer antraler Follikel. Activin steigert zudem die FSH-induzierte Expression von P450scc (auch hier wieder in kleinen antralen Follikeln) das gleiche Element wird in großen antralen Follikeln gehemmt (Miro et al., 1995).

Im Gegensatz zu der stimulatorischen Wirkung von Activin auf die FSH-induzierte P450scc Expression weist es keine Wirkung auf die Expression von 3β -HSD auf. Allerdings weist Activin einen positiven Effekt auf die FSH-induzierte Expression von 3β -HSD auf, weshalb eine posttranscriptionelle Beeinflussung der Enzym-Aktivität vermutet wird (Miro et al., 1995). Diese bedarf allerdings noch des Nachweises.

Zusätzlich zu seinen autokrinen Wirkungen auf die GC besitzt Activin ebenfalls parakrine Wirkungen. In den TC reduziert Activin die LH-induzierte Androgen-Produktion und antagonisiert somit den Inhibin-Einfluss auf die TC. Activin reguliert die Östradiol-induzierte Androgen Produktion ebenfalls negativ. Die Bedeutung von Activin für die erwähnten Mechanismen ist durch ihre Antagonisierbarkeit durch Follistatin (Fst) nachgewiesen (Wrathall und Knight, 1995).

Die Oozyten exprimieren ebenfalls Activin Rezeptoren, deswegen hat Activin auch eine parakrine Wirkung auf die zytoplasmatische und nukleare Reifung und ist am Erhalt des meiotischen Stopps bis zum LH-Peak beteiligt (Eppig, 1996).

Tabelle 5.1 Übersicht über die Wirkungen von Activin im Follikel

Activin (In GC großer präantraler Follikel) Wirkt auf:	bewirkt
Primordialfollikel	Wissenschaftlich nicht geklärt
Primärfollikel bis präantrale Follikel	Anstieg der GC-Proliferation Anstieg von FSH-R so wie der FSH-induzierten P450arom Expression Minderung der LH-induzierten Androgen-Produktion der TC
Antrale Follikel	Anstieg der GC-Proliferation Anstieg der FSHR sowie der FSH-induzierten P450arom Expression Minderung der LH-induzierten Androgen-Produktion in den TC Förderung der Oozyten-Reifung
Corpus luteum	Abfall der GC-Luteinisierung sowie der GC-Atresie Abfall der lutealen P4-Produktion

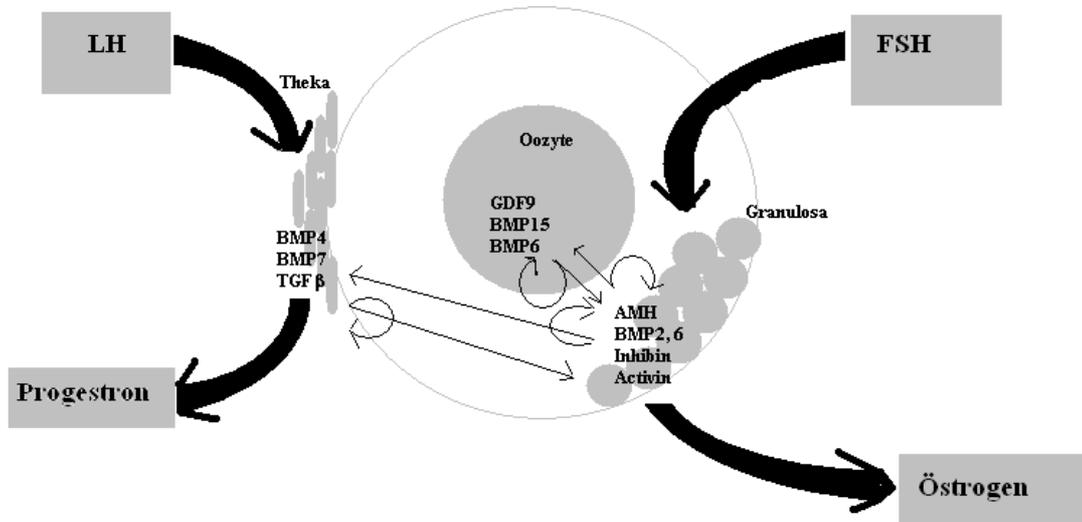
GC: Granulosazellen, FSH: Follikelstimulierendes Hormon, FSH-R: FSH Rezeptor, P450arom: P 450 Aromatase, LH: luteinisierendes Hormon, P4: Progesteron

Tabelle 5.2 Faktoren und Zellen, welche von Activin beeinflusst werden

Faktor/Element	Activin-Wirkung auf diese Faktoren/Zellen
GC	Erhöht die Mitose und Proliferation
FSH-R	Erhöht die Expression in frühen antralen Follikeln erhöht ebenfalls die Expression in undifferenzierten GC
GnRH-R	Activin erhöht die GnRH-induzierte Aktivierung der GnRH-R-Expression.
P450arom	Erhöht ihre Expression und somit die Östradiol-Produktion bei gleichzeitiger Verminderung der Progesteron-Produktion.
P450scc	Erhöht ihre Expression in nicht-differenzierten GC, vermindert die Expression in differenzierten GC.
3 β -HSD	Activin erhöht die FSH induzierte Expression von 3 β -HSD.
ER β	Wird von Activin stark hoch reguliert (Kipp et al., 2007a) (Feedbackmechanismus, da Östrogen die Aktivität von Activin herabreguliert, Kipp et al., 2007a).
Regulation der Keimzellen	Die pränatale Gabe von Activin erhöht die postnatale Größe des Follikelpools (Bristol-gould et al., 2006).

GC:Granulosazellen, GnRHR: GnRH Rezeptor, P450arom: P450 Aromatase, P450scc: Cytochrom P450 side chain cleavage, 3 β -HSD: 3 β -Hydroxysteroid-dehydrogenase, ER β : Östrogen Rezeptor β , FSH-R: FSH Rezeptor

Abbildung 5.2



Die verschiedenen Faktoren mit Ihrem Synthese-Ort sowie dem Ort, den sie beeinflussen.

BMP: Bone morphogenetic protein, AMH: Anti mullerian hormone, GDF: Growth differentiation factor, TGFβ Transforming growth factor β, FSH: Follikelstimulierendes Hormon, LH: Luteinisierendes Hormon

5.1.2 Die Wirkungen an der Hypophyse

Activin, Inhibin und Follistatin wirken gemeinsam und beeinflussen sich gegenseitig. Die Wirkung von Activin ist sehr vielfältig und sowohl auto- als auch parakrin (Bilezikjian et al., 2004).

Activin wirkt über zwei grundlegende Mechanismen positiv auf die FSH-Sekretion:

1) über eine direkte Wirkung auf die gonadotropen Zellen. Diese Wirkung kann durch Inhibin und Follistatin moduliert werden. Die Stimulation der gonadotropen Zellen führt vor allem zu einer gesteigerten Expression von FSHβ (Ling et al., 1986).

2) über eine indirekte Modulation der Promotor-Aktivität des GnRH-Rezeptor-Gens, der Zahl der GnRH-R in der Zellmembran der gonadotropen Zellen und deren Sensitivität (Norwitz et al., 2002).

Neuere Befunde besagen, dass Activin A und GnRH synergistisch bei der transkriptionellen Aktivierung von FSHβ bei der Ratte wirken (Gregory et al., 2005). Die Wechselwirkung zwischen den beiden Transkriptionswegen ist von den Smad-Bindungen

abhängig (Gregory et al., 2005). Activin, in Synergie mit BMP-2, steigert die FSH β -Transkription und somit auch die FSH-Synthese (Lee et al., 2007).

Der Einfluss von Activin und Inhibin auf FSH β bewirkt vor allem eine gesteigerte Transkription, eine verlängerte Halbwertszeit des Transkripts und eine erhöhte Expression des Activin-Rezeptors (Knight, 1996).

Neuere Untersuchungen widerlegen frühere Ergebnisse, nach denen Activin ausschließlich die FSH-Expression und -Sekretion stimulieren soll (Weiss et al., 1993). Activin beeinflusst nämlich nicht nur die FSH β -Expression sondern auch die LH β -Expression und damit die LH-Produktion positiv (Coss et al., 2005). Erste Ergebnisse fanden eine Wirkung von Activin auf LH nur über die GnRH-induzierte LH-Sekretion (Weiss et al., 1993). Spätere Untersuchungen hingegen konnten auch einen Einfluss von Activin auf die basale LH-Produktion aufweisen (Coss et al., 2005).

Beim dem Schaf ist allerdings eine Besonderheit zu beobachten: die Activin-induzierte FSH-Sekretion wird von einem Abfall der GnRH-induzierten LH-Sekretion begleitet.

Activin moduliert ebenfalls die Sensitivität der gonadotropen Zellen der Hypophyse für GnRH (durch Erleichterung der GnRH-Wirkung bei der Transkription von FSH β und GnRH-R) (Gregory et al., 2005).

Desweiteren wird Activin auch eine wichtige Funktion in der GnRH-unabhängigen Ausbildung des sekundären FSH-Anstieges beigemessen. Tebar et al. (2000) schlagen ein Modell vor, in dem der sekundäre FSH-Anstieg als Ergebnis der präovulatorischen LH-Sekretion- und somit eines Abfalls des ovariellen und hypophysären Inhibins resultiert. Weiterhin resultiert der sekundäre FSH-Anstieg ebenfalls aus einem Anstieg des hypophysären Activins B- und der im Proöstrous stattfindenden Corticosteron-Produktion mit folgendem hypophysärem Inhibin- und Follistatinabfall. Zur Wirkung von Activin wurde beobachtet, dass es einen Effekt auf weitere hypophysäre Hormone außer FSH besitzt, so zum Beispiel auf LH, ACTH und GH (Knight, 1996). Bei der Ratte stimuliert Activin die FSH-Sekretion und -Synthese, inhibiert aber GH, ACTH und PRL (Bilezikjian et al., 1996). Konträre Angaben über die Wirkung von Activin auf GH wurden von Tamura et al. (2000) angeben. Danach stimuliert Activin die Expression von GH bei der Ratte.

5.2 Die Activin-Expression

Die Expression von Activin lässt sich ebenfalls in zwei Kategorien einteilen, und zwar in die ovarielle und in die hypophysäre Expression von Activin

5.2.1 Die ovarielle Expression von Activin

Lange Zeit war vorherrschende Meinung, dass die Expression der drei Activin/Inhibin Untereinheiten fast ausschließlich in den GC stattfindet. Die Expression von β -UE mRNA wurde schon vor einiger Zeit in den GC antraler Follikel der Ratte nachgewiesen (Meunier et al., 1988), später auch bei Primaten (Schwall et al., 1990) sowie Schafen (Tisdall et al., 1994) gefunden. Beim Rind (Ireland und Ireland, 1994) wurde die Expression der β -UE ebenfalls in den GC der antralen Follikel nachgewiesen. Neuere Experimente zeigen beim Schwein eine deutliche Expression der α - und β -UE in den GC von unilaminaren (Typ 1 bis Typ 2), multilaminaren (Typ 3-4) und antralen (Typ5) Follikeln (inklusive Cumuluszellen im Typ 5 Follikel). Weiter wurde die Expression dieser UE ebenfalls in den TC von multilaminaren und kleinen antralen Follikeln sowie in der TI mittlerer antraler Follikel gezeigt werden. Eine Expression von Activin wurde in atretischen Follikeln nicht gefunden (van den Hurk und Van de Pavert, 2001).

Eine Expression der Activin-Untereinheiten in den TC wurde bei mehreren Tierarten nachgewiesen, wie beim Schwein (van den Hurk und Van de Pavert, 2001) und bei der Ratte (Findlay et al., 2001). Juengel et al. (2000) hingegen konnte beim Schaf keine Expression der UE in den TC finden.

Tabelle 5.3 Expression- der $\beta\alpha$ - und $\beta\beta$ - Untereinheiten beim Schwein, modifiziert nach Van den Hurk et al.(2001).

Stadium und Kompartimente	$\beta\alpha$ mRNA	$\beta\beta$ mRNA	Act A
Unilaminarer Follikel			
Oozyte	-	-	-
GC	+	+	+
multilaminarer Follikel			
Oozyte	-	-	+
GC	+	+	+
TC	+	+	-
kleiner antraler Follikel			
Oozyte	-	-	+
GC	+	+	+
TC	+	+	+
mittlerer antraler Follikel			
Oozyte	-	-	+
GC	+	+	+
TC	+	+	-

+: konnte nachgewiesen werden, -: konnte nicht nachgewiesen werden

GC: Granulosazellen, TC: Thekazellen, Act A: Activin Rezeptor A, $\beta\alpha$ mRNA: mRNA der $\beta\alpha$ Untereinheit, $\beta\beta$ mRNA: mRNA der $\beta\beta$ Untereinheit

Van den Hurk et al. (2001) fanden keine Expression der Activin-UE in Oozyten. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu Untersuchungen bei der Ratte (Zhao J., 2000) und beim Rind (Izadyar et al., 1998), bei denen eindeutig eine Expression der UE in der Oozyte nachgewiesen wurde. Dieser Unterschied könnte an der von van den Hurk et al. (2001) verwendeten Methode der In-Situ-Hybridisierung liegen. Möglicherweise würden RT-PCR Studien weitere Aufklärung über die Expression der β -UE in der Oozyte geben.

Die beiden β -UE werden während der Follikelselektion und der Follikelreifung unterschiedlich reguliert (Muttukrishna et al., 1994) und unterliegen teilweise zyklusbedingten Veränderungen. Die $\beta\alpha$ -UE wird beim Rind am stärksten in den größten Follikeln mit dem höchsten Aromatase-Gehalt exprimiert und dürfte somit in die Ausbildung eines dominanten Follikels involviert sein (Ireland und Ireland, 1994). Zudem wird die Expression der $\beta\alpha$ -UE nach Ireland et al. (1994) im nicht-ovulatorischen Follikel wesentlich von FSH, und LH sowie von Veränderungen der Konzentrationen von Östrogen und Progesteron beeinflusst. Nach Ireland et al. (1994) bleibt beim Rind die Expression der $\beta\beta$ -Untereinheit hingegen unbeeinflusst von Follikelgröße, Differenzierungsstadium der Theca oder Atresie des Follikels. Weiterhin sinkt die $\beta\beta$ -Expression bei der Ratte im tertiären Follikel während des Proöstrous ab. Daraus resultiert die Vorstellung, dass $\beta\beta$ teilweise hormonell reguliert wird und eine differenzierte Expression der UE stattfindet.

Tabelle 5.4 Expression von Activin in den verschiedenen Kompartimenten

	TC	GC	Ooc
Maus		+	
Ratte	+	+	+
Schaf		+	
Rind	+	+	+
Schwein	+	+	+

+: Konnte nachgewiesen werden,

TC: Thekazellen, GC: Granulosazellen, Ooc: Oozyte

5.2.2 Hypophysäre Expression von Activin

Das hypophysäre Expressionsmuster von Activin, Inhibin und Follistatin ist außerordentlich komplex.

Die Activin- und Inhibin-Untereinheiten wurden schon sehr früh in der Hypophyse der Ratte nachgewiesen. Die Zellen des HVL sezernieren Activin A und Activin B (Bilezikjian et al., 1993). Anderen Angaben zufolge wird in der Hypophyse der Ratte die $\beta\alpha$ -UE nicht

exprimiert und somit Inhibin A und Activin A auch nicht synthetisiert (Knight, 1996). Nach Bilezikjian et al. (1996) wird Activin A allerdings in der Hypophyse der Ratte in geringem Maße exprimiert, aber die Expression von Activin B überwiegt. Die Expression beider Untereinheiten von Activin wurden in den gonadotropen Zellen des Menschen nachgewiesen, was eine physiologische Funktion von Activin als autokriner Regulator der Gonadotropin-Sekretion unterstreicht (Uccella et al., 2000). In der Hypophyse der Ratte und des Rhesus-Affen wird mehr β b als β a exprimiert (Attardi et al., 1992). Die Produktion von Inhibin α sowie der Inhibin/Activin- β -UE ist erstmals sowohl auf transkriptionaler Ebene als auch auf translationaler Ebene in den GC der Rattenhypophyse nachgewiesen worden (Attardi et al., 1992, Bilezikjian et al., 1996). Diese UE werden zusammen mit FSH und LH in den sekretorischen Granula der GC gespeichert. Eine Expression der β -UE ist auch in den Hypophysen anderer Spezies, inklusive Primaten und Mensch, nachgewiesen worden (Attardi et al., 1992, Uccella et al., 2000). Allerdings war auch hier die Expression von β b deutlich höher als die Expression von β . Beim Schwein haben Li et al (1997) β a und β b nachgewiesen, wobei bei β b rassenspezifische Unterschiede in der Expression bestehen, während β a keine Unterschiede aufweist. Li et al (1997) haben keine Expression der α -UE in der Hypophyse des Schweines nachweisen können.

Wie auch die gonadale Expression variiert die hypophysäre Expression bei der Ratte stark während des Zyklus. Das präovulatorische LH hemmt zusammen mit Progesteron die hypophysäre Inhibin-Expression und fördert die Expression von Activin B, was wiederum zu einer gesteigerten FSH Expression führt. Diese Steigerung der Activin-Expression geschieht vor allem über ein erhöhtes β/α -Verhältnis (Tebar et al., 2000). Eine Ovariectomie führt in Ratten zu einem Anstieg der mRNA-Spiegel der α - und β -UE (Bilezikjian et al., 1996).

In diesen Regelkreis sind noch weitere Komponenten involviert. So moduliert beim Schaf Östradiol GnRH-unabhängig die Activin-Expression in der Hypophyse (Baratta et al., 2001). Hinzu kommt bei der Ratte die Beobachtung, dass Activin A die lokale Produktion von der β b-Untereinheit negativ und Follistatin sowie Inhibin A diese positiv reguliert (Bilezikjian et al., 1996).

Tabelle 5.5 Tierartlich spezifische Expression der Activin-Untereinheiten

Tierart	Literatur	Quelle
Maus	Keine Angaben gefunden	
Ratte	Hypophysäre Expression von β Follistatin, α und β Kein Expression von β Auto und parakrine Regulation, Expression von Activin A und Activin B	Bilezikjian et al., 1993 Bilezikjian et al., 1996 Bilezikjian et al., 2004 Knight et al., 1996 Bilezikjian et al., 2006
Schaf	Activin Expression wird GnRH unabhängig von Östradiol reduziert	Baratta, 2001
Rind	Keine Angaben gefunden	
Schwein	β α und β β in der Hypophyse, Züchtungs-spezifische Unterschiede	Li et al., 1997

GnRH: Gonadotropin releasing hormone

5.3 Der Activin-Rezeptor

Wie auch bei anderen Mitgliedern der TGF β -Familie wird die Signaltransduktion von Activin über eine membranständige Serin-Threonin-Proteinkinase vermittelt. Zuerst bindet Activin an den Activin-Typ-II Rezeptor, der in zwei Subformen existiert: ActRII und ActRIIb. Das c-Terminale Ende von Activin bindet an den Rezeptor Typ II. Dieser Komplex bildet ein Heterodimer mit ActRI (ALK2=ActRI und ALK4=ActRIb), welches nach Phosphorylierung die nachgeschaltete Signaltransduktionskette auslöst. Die Komplexbildung ist der ausschlaggebende Moment, der die Transphosphorylierung des Typ II Rezeptors ermöglicht und den Rezeptor Typ I aktiviert. An der Signaltransduktion sind Smad 2, 3 und 4 beteiligt (Findlay et al., 2002). Der Smad-Komplex wird in den Zellkern transloziert und löst die Transkription der Activin-responsiven Gene aus. Es gibt drei Gruppen von Smads: die regulatorischen Smads (1, 2, 3, 5 und 8), co-Smad 4 und zwei inhibitorische Smads (smad 6 und 7).

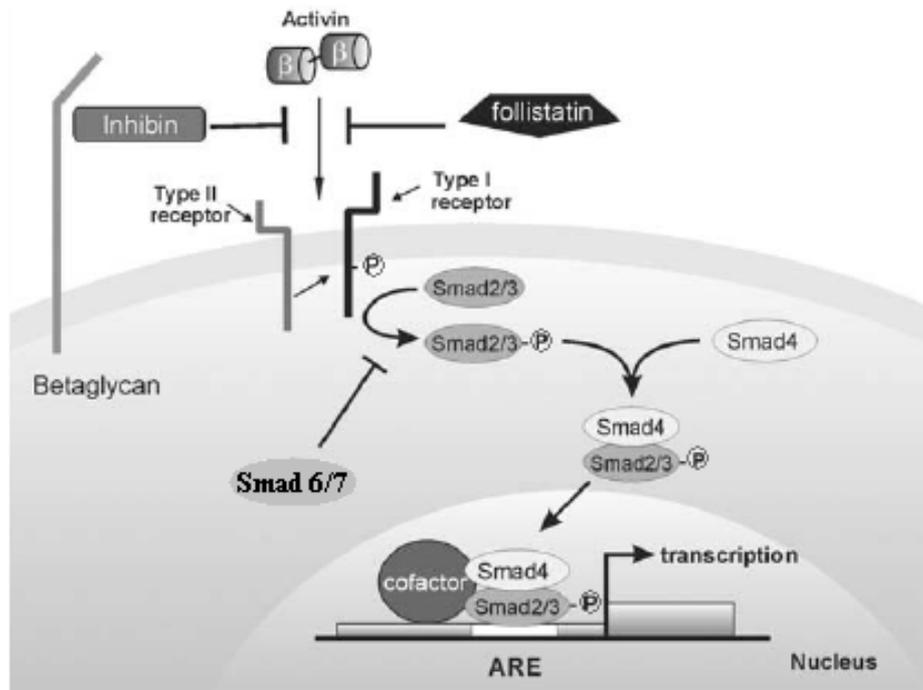
Bei der Ratte und der Maus kann der Smad-Komplex an ein Konsensus-Smad-Bindungselement, das im proximalen Promotor von FSH β lokalisiert ist, binden. Diese Konsensussequenz fehlt dem Schaf, dem Schwein und dem Menschen. Daher dürfte der Mechanismus der Smad-Wirkung bei diesen Spezies anders sein (Lamba et al., 2006, Lee et al., 2007).

Tabelle 5.6 Liganden, Rezeptoren der TGF β -Mitglieder, u.a. Activin und Inhibin, und Ihre Smads

Ligand	Typ II Rezeptor	Typ I Rezeptor	R-Smad	I-Smad	Co-Smad
TGF β	T β RII	ALK5 (T β RI) ALK1	2 oder 3	7	4
Activin	ActRIIA ActRIIB	ALK4 (ActRIA)	2 oder 3	7	4
BMP	BMPRII ActRIIA ActRIIB	ALK2 (ActRIA) ALK3 (BMPRIA) ALK6 (BMPRIB)	1,5 oder 8	6	4
AMH	AMHRII	ALK2 (ActRIA) ALK6 (BMPRIB)	1,5 oder 8	6	4

TGF β : Transforming growth factor β , T β RII (I): TGF β Rezeptor Typ II (I), ALK: Activin receptor like kinase, ActRI (II): Activin receptor typ I (II), AMH: Anti muellerian hormone, AMHR: AMH Rezeptor, BMPRIB: BMP receptor Typ I B

Abbildung 5.3 Activin-Rezeptor und Smads, modifiziert nach Findley et al. (2002)



Der Activin-Rezeptor, bestehend aus seinen zwei Anteilen, induziert den Smad2/3, welcher mit dem co-Smad 4 die Transkription aktiviert Smad 6 und 7 sind antagonisierende Smads

Wie auch schon bei Activin findet die Expression des Activin-Rezeptors ebenfalls in verschiedenen Organen statt, nämlich in den Gonaden und in der Hypophyse

5.3.1 Die Expression der Activin Rezeptors in der Hypophyse

Nach den Ergebnissen von Aono und Schneyer (1997) werden in der Hypophyse der Ratte alle vier Rezeptoren exprimiert. Die Konzentration von ActRIIB, ALK4 und ALK2 beim Schaf variiert während des Zyklus und ist vor dem präovulatorischen Peak und während

des sekundären FSH-Antieges höher als während des präovulatorischen Peaks und in der lutealen Phase. Der Anstieg der ActRIIB mRNA Expression geht einher mit einem Anstieg von ActRII-Protein. Die Expression von ActRIIA hingegen erfolgt während des gesamten Zyklus hindurch gleichmäßig (Fafioffe et al., 2004).

Da Activin maßgeblich an der erhöhten Synthese und Sekretion von hypophysärem FSH beteiligt ist, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die erhöhte ActRIIB-Expression kurz vor und kurz nach dem Gonadotropin Peak wesentlich an dem Erhalt einer basalen FSH-Synthese und am sekundären FSH-Anstieg beteiligt ist.

Halvorson et al. (1994) fanden ähnliche Ergebnisse bei der Ratte. Sie zeigten, dass die hypophysäre Expression von ActRIIA mRNA während des Zyklus unverändert bleibt. Allerdings haben sie ActRI und ActRIIB nicht untersucht.

Somit wird deutlich, dass ActRIIA im Vergleich zu den anderen Rezeptor-Subtypen differentiell exprimiert wird. Auch Dalkin et al. (1996) konnten zeigen, dass Activin die mRNA von ActRI und ActRIIB steigert, aber nicht die von ActRIIA. Erkenntnisse über die Expression der Activin-Rezeptoren stehen beim Schwein und beim Rind noch aus.

Tabelle 5.7 Verlauf der Expression der Rezeptor-Subtypen in der Hypophyse im Verlauf des Zyklus

	Ratte	Schaf	Rind	Schwein
ALK2	Ø	Variiert	Ø	Ø
ALK4	Ø	Variiert	Ø	Ø
ActRIIA	Unverändert	Unverändert	Ø	Ø
ActRIIB	Ø	Variiert	Ø	Ø

Ø: Keine Ergebnisse, ALK: Activin receptor like kinase, ActRII: Activin receptor Typ II

Die Expression der Activin-Rezeptoren in den gonadotropen Zellen ist wesentlich an der Expression und Sekretion von FSH beteiligt (Gregory et al., 2004).

5.3.2 Die Expression des Activin-Rezeptors im Follikel

Der Activin-Rezeptor wird in den Follikeln speziesspezifisch in den GC, in den Oozyten und in den TC exprimiert. Beim Schwein wird der ActRII in der Oozyten der unilaminaren der multilaminaren und der kleinen antralen bis zum mittleren antralen Follikel exprimiert. In den GC findet die ActRII Expression ab dem multilaminaren Follikel statt. Ab dem kleinen antralen Follikel ist der Activin-Rezeptor auch in den TC nachweisbar. Im atretische Follikel findet keine Expression statt. Eine Expression des Activin-Rezeptors fehlt auch in den TC multilaminarer und mittlerer Antraler Follikel (van den Hurk und Van de Havert, 2001).

Tabelle 5.8 Expression von β_a , β_b , Activin sowie ActRII in dem Follikel des Schweines.

Schwein		β_a mRNA	β_b mRNR	Act A	ActR II
Unilaminarer Follikel	Ooc	-	-	-	+
	GC	+	+	+	-
Multilaminarer Follikel	Ooc	-	-	+	+
	GC	+	+	+	+
	TC	+	+	-	-
Kleiner antraler Follikel	Ooc	-	-	+	+
	GC	+	+	+	+
	TC	+	+	+	+
Mittlere Antraler Follikel	Ooc	-	-	+	+
	GC	+	+	+	+
	TC	+	+	-	-
Atretischer Follikel		-	-	-	-

+: Nachgewiesen, -: nicht nachweisbar

GC: Granulosazellen, TC: Thekazellen, Ooc: Oozyten, Act: Activin, ActRII: Activin Rezeptor Typ II

Der Typ II Rezeptor wird beim Menschen in den Oozyten und den GC exprimiert (Sidis et al., 1998), ebenso bei der Maus (Wu et al., 1994). Bei der Ratte lässt sich der Typ II Rezeptor in den Oozyten und den umgebenden Follikelzellen (GC und TC) nachweisen (Zhao J., 2000). Beim Rind haben Izadayar et al. (1998) die Expression von ActRII in vitro in COC nachgewiesen (Izadayar et al., 1998).

Die Ergebnisse über die Expression der Activin-Rezeptoren beschränken sich beim Schaf auf die Hypophyse. Es liegen keine Ergebnisse über die Rezeptor-Expression im Ovar des Schafes vor, wohl aber für das der Ziege (Silva et al., 2004). Diese Studie hatte folgenden Ergebnisse: das Protein für ActRIIA/B wurde in den Oozyten aller Follikel gefunden, weiterhin in den GC ab dem primordialen Follikelstadium sowie in den TC antraler Follikel, im C.l. und im Oberflächenepithel des Ovars. Bei antralen Follikel findet die Expression in Cumuluszellen und in muralen GC statt. Die Expression von ActRIA ist ähnlich, bis auf den Unterschied, dass keine Expression des Proteins in den TC großer antraler Follikel stattfindet.

Tabelle 5.9 Expression von Activin und seiner Rezeptoren im Follikel der Ziege, modifiziert nach Silva et al. (2004)

Stadium und Kompartiment	Activin A	ActRIIA/B Protein	ActRIIA mRNA	ActRIIB mRNA	ActRIA Protein	ActRIA mRNA	ActRIB mRNA
Unilaminarer Follikel			(+)	(-)		(+)	(+)
Oozyte	++	++			++		
Granulosazellen	+/-	++			+		
multilaminarer Follikel			(+)	(-)		(+)	(+)
Oozyte	++	++			+		
Granulosazellen	++	++			+		
Thekazellen	-	-			-		
antraler Follikel (kl)							
Oozyte	+	++	+	+	++	+	+
Cumuluszellen	+	++	+	+	+	+	+
murale GC	+	++	+	+	+	+	+
Thekazellen	+	+/-	+	+	+	+	+
Antraler Follikel (mittlerer)							
Oozyte	++	+++	+	+	++	+	+
Cumuluszellen	++	+++	+	+	++	+	+
murale GC	+++	+++	+	+	++	+	+
Thekazellen	++	+	+	+	-	+	+

(+), (-): ganzer Follikel untersucht
 +, ++, +++: Intensität der Expression
 +/-: Spuren gefunden
 -: keine Expression gefunden

GC: Granulosazellen
 ActRI (II): Activin Rezeptor Typ I (II)

Tabelle 5.10 Expression der Activin-Rezeptor mRNA bei der Maus

Stadium und Kompartiment	Activin A	ActRIIA mRNA	ActRIIB mRNA	ActRIA mRNA	ActRIB mRNA
Unilaminarer Follikel					
Oozyte					
Granulosazellen					
multilaminarer Follikel					
Oozyte					
Granulosazellen					
Thekazellen					
kleiner antraler Follikel					
Oozyte	-	++	++	++	++
Cumuluszellen	+	++	++	++	++
murale Granulosazellen					
ThekazellenC					
Mittlerer antraler Follikel					
Oozyte	-	++	++	++	++
Cumuluszellen	+	++	++	++	++
murale GranulosazellenC					
Thekazellen					

(+), (-): ganzer Follikel untersucht
 +, ++, +++: Intensität der Expression
 +/-: Spuren gefunden
 -: keine Expression gefunden

GC: Granulosazellen
 ActRI (II): Activin rezeptor Typ I (II)

Tabelle 5.11 Expression des Typ II Rezeptors in den verschiedenen Kompartimenten des Ovars

Type II Rez mRNA	TC	GC	Oozyte
Maus		+	+
Ratte	+	+	+
Mensch		+	+
Schaf			
Ziege	+	+	+
Rind		+	+
Schwein	+	+	+

+: Expression nachgewiesen,
GC: Granulosazellen, TC: Thekazellen

Diese Expressionsmuster weisen darauf hin, wie wichtig Activin für die Entwicklung der Follikel ist. Ein wichtiger Befund ist die Expression des Rezeptors in der Oozyte. Diese deutet darauf hin, dass Activin an der Entwicklung und Reifung der Oozyte wesentlich beteiligt ist. Weiterhin belegen diese Ergebnisse, dass Activin wesentlich an den parakrinen Mechanismen zwischen Oozyte, Granulosazellen und Thekazellen beteiligt ist (Gilchrist et al., 2006).

Der Activin-Rezeptor konkurriert mit Follistatin um Activin (Siehe Follistatin). Somit beeinflusst die Konzentration von Follistatin wesentlich die Wirkungsmöglichkeit von Activin.

Inhibin hat durch seine β -Kette ebenfalls eine Bindungsaffinität zu den ActR, allerdings ist die Affinität viel niedriger. Ein Überschuß an Activin reguliert die Expression seines Rezeptors sowie die Activin-Biosynthese herunter (van den Hurk und Van de Pavert, 2001).

5.4 Inhibin

Inhibin ist ein Peptidhormon und gehört wie Activin in die TGF β -Familie. Es besteht aus einer α -UE, das Dimere mit einer $\beta\alpha$ - oder $\beta\beta$ -UE bildet und so zum Inhibin A ($\alpha\beta\alpha$) oder Inhibin B ($\alpha\beta\beta$) führt. Die UE sind über Disulfid-Brücken miteinander verbunden.

Unterschiedliche posttranslationale Prozessierung, besonders des α -Precursors, führt zu verschieden großen Inhibin A- und Inhibin B-Molekülen. Die α -UE besteht, wie auch schon bei den β -UE erwähnt, aus einem pre-pro-aN-aC Precursor. Nach Abspaltung der Pre-Region wird daraus Pro-aN-aC. Nach weiterer Abspaltung entstehen Pro-aC und aN, und danach aC. aN sowie pro-aN-aC sind beide ebenfalls in der Follikelflüssigkeit zu finden und haben intrinsische biologische Aktivität, die sich aber wesentlich von der klassischen Inhibin-Bioaktivität unterscheidet (Knight, 1996) (siehe Abbildung 5.1).

Inhibin wirkt als Gegenspieler von Activin, indem es die Bindung von Activin an seine Rezeptoren und/oder dessen intrazelluläre Signaltransduktion blockiert (Matzuk et al., 2000). Inhibin wird vornehmlich im Ovar gebildet und wirkt endokrin im Sinne einer negativen Rückkopplung supprimierend auf die Sekretion von FSH β und somit auf die FSH-Synthese. Inhibin hat, wie auch Activin, sowohl eine hypophysäre als auch eine gonadale Wirkung.

Zur hypophysären Wirkung gehört die negative Rückkopplung des gonadal produzierten Inhibins auf die hypophysäre FSH-Synthese und -Sekretion. Die Hypothese einer negativen Rückkopplung wurde durch Immunoneutralisationsstudien von Inhibin bestätigt. Diese Studien wurden an den verschiedensten Tierarten durchgeführt, so zum Beispiel bei der Ratte (Rivier et al., 1986), dem Schaf (Findlay et al., 1989), dem Rind (Glencross et al., 1994) und dem Schwein (Brown et al., 1990). Die Inhibin α -UE wird zwar ebenfalls in der Hypophyse exprimiert. Die Produktion von hypophysärem Inhibin und seine Wirkung sind aber nicht eindeutig geklärt. Ob eine lokale Produktion von Inhibin Einfluss auf die Wirkung des zirkulierenden Inhibins in der Regulation der Gonadotropinsekretion hat, bleibt noch zu klären (De Kretzer et al., 2002, Bilezikjian et al., 2004). Das gonadale Inhibin erreicht die Hypophyse auf dem Blutweg und reguliert dort die FSH-Produktion, vor allem durch eine Hemmung der Activin-Wirkung (Bilezikjian et al., 2004, Phillips und Woodruff, 2004).

Zu den parakrinen Wirkungen von Inhibin gehört, dass Inhibin in den Thekazellen die Androgen-Synthese fördert, und somit die Östrogen-Synthese in einer Phase fallender FSH-Werte anhebt. An der Oozyte verhindert Inhibin dessen Maturation.

Ob und inwiefern Inhibin eine Wirkung auf die Aromatase besitzt, bleibt noch zu klären (Knight et al, 1996).

Keine der drei α -UE-Precursor-Formen besitzt eine Inhibin-ähnliche Wirkung. Die freie α N-pre-Form von Inhibin konkurriert aber mit FSH um die Bindung an den FSH-R und setzt somit die biologische Aktivität von FSH in den GC herab (Knight, 1996). Zu den weiteren parakrinen Wirkungen von Inhibin gehört der von Inhibin A hervorgerufene Anstieg der LH-stimulierten thekalen Androgen-Synthese (Campbell und Baird, 2001). Ähnliche Ergebnisse wie hier beim Schaf wurden bei der Ratte von Hsueh et al. (1987) und beim Mensch von Hillier et al. (1991) gefunden. Wrathall et al. (1995) konnten hingegen beim Rind keine parakrine Wirkung von Inhibin A bei der Androgen-Synthese feststellen.

Die Expression von Inhibin kann, wie auch die von Activin, in zwei Kompartimente unterteilt werden: Die hypophysäre Expression und die gonadale Expression.

Tabelle 5.12 Autokrine, parakrine und endokrine Wirkungen von Inhibin

Granulosazellen	Autokrin	Eventuell findet eine Wirkung von Inhibin auf die Aromatase statt.
Thekazellen	Parakrin	Inhibin steigert die LH-induzierte Androgen-Produktion in den TC
Oozyte	Parakrin	Inhibin verhindert, verzögert die Reifung der Oozyte
Gonadotrope Zellen	Endokrin	Inhibin vermindert die FSH-Produktion Inhibin moduliert die Sensitivität der GnRH-Rezeptoren in den Gonadotropen Zellen

FSH: Follikelstimulierendes Hormon, LH: Luteinisierendes Hormon, GnRH: Gonadotropin-releasing hormone

5.4.1 Die hypophysäre Expression von Inhibin

Die Expression der I/α Untereinheiten sowie die Expression von Inhibin A und Inhibin B in der Hypophyse wird kontrovers diskutiert. Die hypophysäre Expression der β -UE ist nachgewiesen. Die UE werden zusammen mit FSH und LH in den Speichergranula der Hypophyse angetroffen.

Die Expression der α -UE ist noch nicht bei allen Spezies geklärt. Es bestehen kontroverse Ansichten über ihre Expression. So wurde zum Beispiel die α -UE in der Hypophyse der Ratte lokalisiert (Meunier et al., 1988). Allerdings scheint bei dieser Tierart die Hypophyse nur α und β_b zu exprimieren, während β_a fehlt (Meunier et al., 1988).

Weiterhin scheint das in der Hypophyse produzierte Inhibin nicht gleich sezerniert zu werden, sondern wird zusammen mit den Gonadotropinen, Activin und Follistatin in den Speichergranula der gonadotropen Zellen gelagert (Roberts et al., 1992). Weiter gibt es unterschiedliche Angaben über die Expression der β_a - und β_b -Untereinheiten bei der Ratte. Einige Studien sprechen von der Expression beider UE (Roberts et al., 1989). Andere wiederum weisen ausschließlich die Expression der β_b -UE nach (Bilezikjian et al., 1993, Bilezikjian et al., 1996). Diese Diskrepanzen sind auch bei anderen Spezies zu finden. So behaupten Alexander et al. (1995) dass die α -UE beim Menschen exprimiert wird (allerdings ohne Expression von β_a) während von Schlatt et al. (1991) nur eine sehr schwache Expression von α -Inhibin nachgewiesen werden konnte.

Weiter bestehen unterschiedliche Angaben über die Veränderungen der Expression der UE während des Zyklus. So findet nach Bilezikjian et al. (1996) vorwiegend die Expression von Inhibin B statt. Und während die Expression der α -UE durch den Zyklus ziemlich konstant ist, ist die Expression der β_b -UE zwar mäßig aber an die Veränderung in der Expression von Follistatin angelehnt.

Nach Marshal et al. (1997) wird die α -UE stärker als die β_b -UE exprimiert. Die β_a -UE wird nur sehr schwach exprimiert. Dies deutet darauf hin, dass Activin B und Inhibin B lokal

produziert werden können. Activin B wird auch lokal sezerniert. Nach Li et al. (1997) wurde die $\beta\alpha$ UE in der Hypophyse der Ratte gar nicht gefunden. Beim Schwein lässt sich die α -UE kaum, die $\beta\alpha$ - und $\beta\beta$ -UE sehr deutlich nachweisen, wobei die Expression der β -UE stark rassespezifisch erfolgt.

Die meisten Befunde deuten somit auf eine Expression von Inhibin in der Hypophyse hin (obwohl dies bei Mensch und Affe noch im Detail zu klären ist). Es muss aber noch untersucht werden, ob Inhibin gespeichert wird und wie seine Sekretion abläuft. Weiterhin nimmt man an, dass gonadales Inhibin auf die Hypophyse und die dort sezernierten Faktoren wirkt (De Kretzer et al., 2002, Bilezikjian et al., 2004).

5.4.2 Die gonadale Expression von Inhibin

Die gonadale Expression von Inhibin findet vor allem in den GC des Follikels statt. Die Expression der α -UE wurde auch in den TC nachgewiesen. Es gilt mittlerweile als gesichert, dass GC einen Überschuss an der α -UE im Vergleich zu der β -UE synthetisieren. Damit dürfte zusätzlich zu den Activin/Inhibin-Dimeren auch noch freie α -UE sezerniert werden (Knight, 1996). Bei Menschen haben Welt et al. (2001) gefunden, dass $\beta\beta$ v.a. in kleinen antralen Follikeln und $\beta\alpha$ v.a. in präovulatorischen Follikeln exprimiert wird. Die α -UE wird von allen Follikelstadien gleichermaßen exprimiert. Bei der Ratte werden nach Findlay et al. (2001) auch alle drei UE in den GC exprimiert, wobei die Expression der α -Untereinheit wesentlich stärker erfolgt als die der β -UE. Zu diesem Ergebnis kamen auch schon Knight et al. (1996). Weiter fanden Findlay et al. (2001), dass in FSH behandelten GC-Kulturen die Konzentration an Inhibin A mit dem Follikelwachstum zunimmt während die von Inhibin B mit dem Follikelwachstum abnimmt. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Welt et al. (2001) über die zeitliche Expression der β -UE überein. Während Ireland et al. (1994) behaupten, dass $\beta\beta$ beim Rind durchgehen exprimiert wird und nur α und $\beta\alpha$ in ihrer Expression von den Gonadotropinen reguliert werden, beschreiben andere Gruppen, dass bei den Primaten kein $\beta\beta$ in den DF zu finden ist (Schwall et al., 1990) und dass bei der Ratte die Expression von $\beta\beta$ im Proöstrous deutlich sinkt (Meunier et al., 1988). Kaneko et al. (2002) konnten zeigen, dass die Schwankungen der Inhibin A Konzentration mit der Follikelgröße und dem Plasma-FSH-Spiegel korrelieren. Sie sind gleichfalls der Ansicht, dass die GC vor allem Inhibin A und kaum Inhibin B produzieren. Li et al. (1997), wie schon früher Guthrie et al. (1992), haben gezeigt, dass α und $\beta\alpha$ beim Schwein im Verlauf der Follikelentwicklung zum mittleren Follikelstadium stark zunehmen. Der Konzentrationsunterschied beträgt für α/β

bei 20 zu 1, wodurch klar wird, dass die β -UE den limitierenden Faktor in der Inhibin Synthese darstellt. Die Synthese von Inhibinen nimmt nach dem LH-Peak stark ab und ermöglicht damit das Auftreten einer neuen Follikelwelle. Beim Schaf ist die Expression von Inhibin A und Östrogen in den GC zeitlich sehr eng verbunden, obwohl die Inhibin A Expression kurz vor der Östrogen-Expression stattfindet (Campbell und Baird, 2001).

Die Expression der Activin/Inhibin-UE in Oozyten wurde ebenfalls untersucht. Silva et al. (2003) konnten in der Oozyte des kleinen bis zum mittleren antralen Follikel alle drei UE beim Rind nachweisen. Diese Befunde stimmen mit Ergebnissen von Albano et al. (1993) bei der Maus und mit Izadyar et al. (1998) beim Rind überein. Sie sind allerdings der Meinung, dass die α -UE vor allem von den umliegenden Cumuluszellen produziert und dann von der Oozyte aufgenommen werden. β a verhält sich ebenso, wird aber zudem noch in bovinen Oozyte exprimiert. Nach Reifung der Oozyte lässt die Immunfärbung für die α - und β -UE sowie für Follistatin deutlich nach, was an der Abkopplung der Oozyte von den umliegenden Cumuluszellen und einer damit verminderten Aufnahme liegen dürfte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Inhibin A eher ein Produkt ovulatorischer Follikel ist, während Inhibin B hingegen von der Kohorte der rekrutierten Follikel auf ihrem Weg zur Selektion gebildet wird (Phillips und Woodruff, 2004).

Es gibt verschiedene Untersuchungen über die Korrelation der Inhibin-Expression mit den FSH/LH Kurven und dem Zyklus. Durch Studien an der Ratte, dem Menschen und dem Primaten wurde deutlich, dass FSH die Inhibin-Sekretion in kleinen antralen Follikeln sowie FSH und LH die Inhibin-Sekretion in präovulatorischen Follikeln stimuliert (Welt et al., 2001). Inhibin B kann damit als ein Produkt der FSH-Stimulation von kleinen antralen Follikeln aufgefasst werden, während Inhibin A in den späteren Stadien des Follikelwachstums als Antwort auf FSH und LH im präovulatorischen Follikel gebildet wird. Insofern sind sowohl die FSH/LH-Sekretion als auch das Follikelstadium für das Inhibin-Expressionsmuster von großer Bedeutung. Weiteren Untersuchungen von Campbell et al. (2001) ist zu entnehmen, dass die Synthese von Inhibin A beim Schaf ebenfalls FSH-ansprechbar ist und dass die Inhibin A Sekretion kurz vor der Östrogen-Sekretion stattfindet.

Die Expression von Inhibin wird wiederum von verschiedenen endokrinen, parakrinen und autokrinen Faktoren beeinflusst. FSH und LH (in niedrigen Konzentrationen), IGF-I, TGF β und Activin können die Produktion von Inhibin in den GC stimulieren. EGF, TGF α , Interferon- α sowie hohe Dosen von LH regulieren die Inhibin Produktion in Anwesenheit von FSH oder anderen cAMP stimulierenden Elementen herunter (Findlay, 1993).

Abbildung 5.4 Wirkungen sowie Wechselwirkungen von Activin, Inhibin und Follistatin, modifiziert nach Knight and Glister (2001).

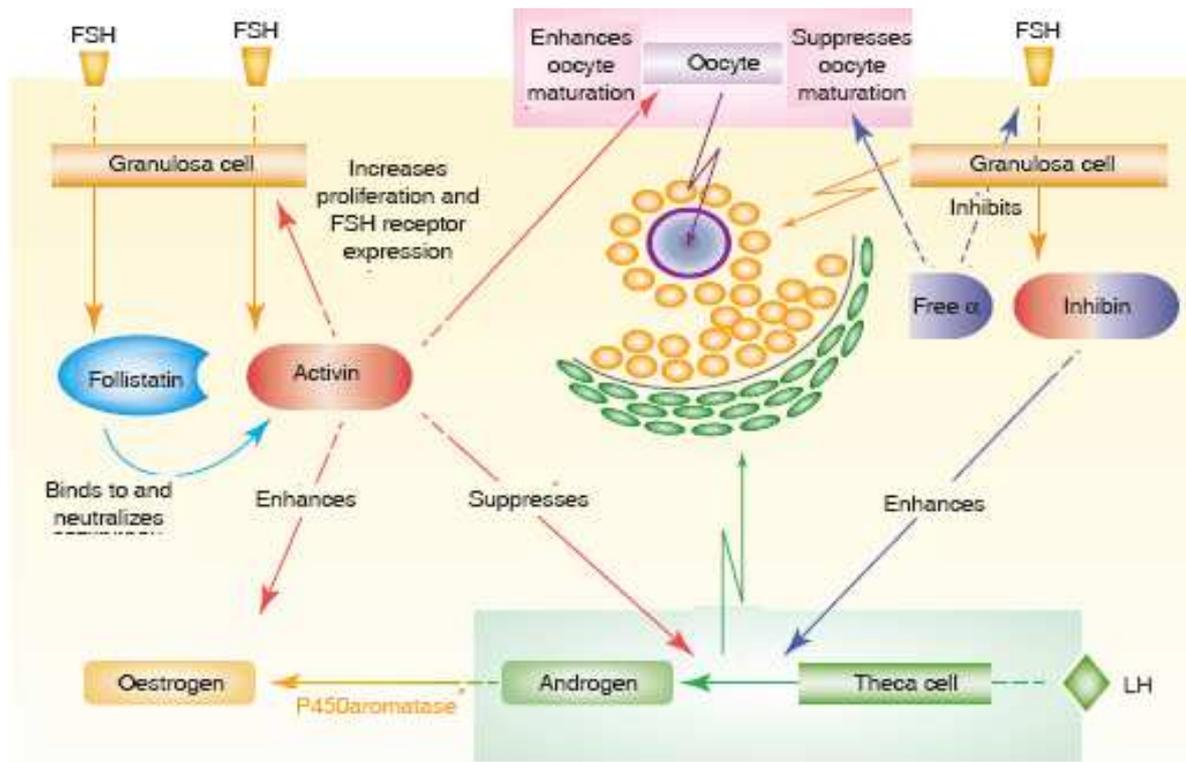


Tabelle 5.13 Faktoren, welche sich auf die Expression von Inhibin auswirken

FSH	Kann Produktion von Inhibin in den GC stimulieren
LH	Kann Produktion von Inhibin in den GC stimulieren
IGF-I	Kann Produktion von Inhibin in den GC stimulieren
TGF β	Kann Produktion von Inhibin in den GC stimulieren
Activin	Kann Produktion von Inhibin in den GC stimulieren
EGF	Kann die Produktion von Inhibin, in Anwesenheit von FSH oder andere cAMP erzeugender Faktoren negativ regulieren
TGF α	Kann die Produktion von Inhibin, in Anwesenheit von FSH oder andere cAMP erzeugender Faktoren negativ regulieren
Interferon	Kann die Produktion von Inhibin, in Anwesenheit von FSH oder andere cAMP erzeugender Faktoren negativ regulieren
Hohe LH-Dosen	Kann die Produktion von Inhibin, in Anwesenheit von FSH oder andere cAMP erzeugender Faktoren negativ regulieren

FSH: Follikelstimulierendes Hormon, LH: Luteinisierendes Hormon, IGF-I: Insulin-like growth factor I, TGF β : Transforming growth factor β , EGF: Epidermal growth factor, TGF α : Transforming growth factor α , cAMP: cyclic adenosine monophosphat

5.5 Der Inhibin Rezeptor

Bei der Regulation der FSH-Sekretion in der Hypophyse ist sowohl lokal produziertes als auch gonadales Inhibin involviert. Der Mechanismus der Inhibin-Wirkung ist noch nicht

vollständig geklärt. Vor allem die Expression des Inhibin-Rezeptors ist umstritten und daher auch die Wirkung von Inhibin unklar.

Wie schon zuvor erwähnt geschieht die Bildung von Inhibin über Dimerisation einer α - und einer β -UE, die Bildung von Activin über die Dimerisation zweier β -UE. Es wird daher angenommen, dass die Verfügbarkeit der β -UE über die Dimerisation zu Inhibin reguliert werden kann. (Gregory und Kaiser, 2004). Der zweite Aspekt der Inhibin-Wirkung ist die direkte Bindung von Inhibin über seine β -UE an den ActRII. Inhibin löst aber im Gegensatz zu Activin keine Komplexbildung mit dem ActRI und daher auch keine Signaltransduktion aus. Dies könnte ein weiterer antagonistischer Regulationsmechanismus auf die Activin-induzierte FSH-Stimulation sein. Die Bedeutung dieses Mechanismus muss jedoch noch geklärt werden, da Inhibin wesentlich geringere Affinität zu dem Rezeptor aufweist als Activin (Bilezikjian et al., 1996).

Auf der Suche nach einem geeigneten Inhibin-Rezeptor sind zwei Moleküle identifiziert worden, die als Rezeptor-Kandidaten in Frage kommen. Zum einen ist das der TGF β -Typ-III-Rezeptor (auch Betaglykan), welcher von Lewis et al. (2000) erstmals identifiziert wurde und zum anderen das Inhibin-Bindungsprotein InhBP. Bernard et al. (2001) haben diese beiden Moleküle genauer untersucht, um zu klären ob sie als spezifische Inhibin Rezeptoren in Frage kommen.

Betaglykan bindet Inhibin nur schwach. Es bildet aber in Anwesenheit von ActRII einen Komplex mit Inhibin und ActRII (Ethier et al., 2002), der die Affinität von Inhibin A für den ActRII erhöht (Lewis et al., 2000) und durch Activin nicht beeinflusst werden kann. Betaglykan könnte daher als ein Inhibinkorezeptor fungieren, der die Bindung von Inhibin an ActRII erhöht und die Bindung von Activin an seinen Rezeptor verhindert. Dadurch wird die Activin-induzierte Stimulation der FSH-Synthese verhindert (Cook et al, 2004). Dass selbst hohe Mengen an Activin nur einen Teil der Komplexbildung von Inhibin und Betaglykan verhindern können, zeigt wie wirksam dieser Mechanismus ist.

Betaglykan fungiert auch als TGF-Typ-III Rezeptor und bindet TGF β 2 mit höherer Affinität als TGF β 1 oder TGF β 3. Es wird vermutet, dass Betaglykan die TGF β -Bindung an seinen eigenen Rezeptor Typ II verstärkt. Betaglykan besitzt zwei extrazelluläre Domänen, die an diesem Prozess beteiligt sind: die Endoglin-Domäne und die Uromodulin-Domäne. Betaglykan bindet Inhibin über die Uromodulin-Domäne (Ethier et al., 2002). Die Wirkung von TGF β 1 und TGF β 2 auf die Inhibin-Aktivität entsteht folgendermaßen: sie konkurrieren mit Activin um Betaglykan und antagonisieren somit dessen Wirkung (Ethier et al., 2002).

Die Untersuchungen der Betaglykan-Expression in der Hypophyse der Ratte liefern unterschiedliche Ergebnisse für Betaglykan-mRNA und das von ihm kodierte Protein:

Bernard und Woodruff (2001) fanden heraus, dass der Betaglykan mRNA Spiegel während des gesamten Östruszyklus konstant bleibt und nicht mit dem FSH-Spiegel korreliert. Daraus schlossen sie, dass bei der Regulation der FSH-Sekretion die Verfügbarkeit der β -UE als Dimerisationspartner für Activin oder Inhibin entscheidend ist und nicht etwa Betaglykan.

Chapman and Woodruff (2003) haben die Lokalisation von Betaglykan Protein in der Hypophyse von Ratten untersucht, insbesondere den Zusammenhang mit der Konzentration von zirkulierendem Inhibin, mit der Expression von FSH β und den Serum-FSH Werten während des Östrus. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass in den Hypophysen dieser Ratten kein Inhibin A, kein Inhibin B und kein Activin A gefunden wurde, sind die folgenden Ergebnisse erzielt worden: Die Betaglykan-Produktion und seine Expression in der Zellmembran fluktuiert während des Zyklus. Die größte Anzahl von gonadotropen Zellen mit membrangebundenem Betaglykan findet sich während des Östrus, zu einem Zeitpunkt also, an dem Inhibin nur langsam ansteigt und daher die Unterstützung eines Korezeptors benötigt um einen schnellen Abfall von Serum- und hypophysären-FSH zu bewirken. Betaglykan erleichtert die Bindung von Inhibin A an ActRIIA und ActRIIB und verhilft Inhibin B zur erhöhten Bindung an ActRIIA (Dyson und Gurdon, 1998). Die Immunoreaktivität von Betaglykan auf der GC-Membran ist bei hohen Serum- und hypophysären-Inhibin-Werten intensiv. Damit tritt Betaglykan vermehrt zu jenem Zeitpunkt des Zyklus auf, in dem die Activin-stimulierte FSH-Synthese-Inhibierung durch Inhibin große Bedeutung hat (Chapman und Woodruff, 2003).

Fafioffe et al. (2004) haben die Inhibin-Rezeptor Genexpression in der Hypophyse des weiblichen Schafes untersucht. Sie fanden heraus, dass Betaglykan auch hier exprimiert wird und dass sich die Konzentration von Betaglykan mRNA während des Zyklus nicht verändert. Auch hier muss wieder die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die Konzentration von Betaglykan während des Zyklus Unterschiede aufweist.

In der Rattenhypophyse können zwei Transkripte des Inhibin-bindenden Proteins (InhBP) nachgewiesen werden. Das größere Transkript (InhBP-Long, InhBP-L) kodiert das ganze Protein während das kleinere Transkript (InhBP-short, InhBP-S) eine Spleißvariante darstellt (Bernard und Woodruff, 2001). Wie Betaglykan bildet InhBP mit dem Activin-Rezeptor einen Komplex, bindet allerdings im Gegensatz zu Betaglykan ActRI. Bernard et al (2001) haben die Interaktion des InhBP und der Activin-Rezeptoren untersucht. InhBP

interagiert sehr stark mit den Typ IB Rezeptor, dafür aber kaum bis gar nicht mit dem Typ II oder dem Typ IIB Rezeptor. InhBP kann ebenfalls Komplexe mit dem BMP-Typ-IB Rezeptor (Alk 6) bilden. Auf dieser Basis entstand die Hypothese, dass InhBP die Activin-induzierte Komplexbildung von ActRI und ActRII verhindert und somit die Activin-induzierte Signaltransduktionskaskade unterbricht (Cook et al, 2004).

Inhibin B, aber nicht Inhibin A antagonisiert zusammen mit InhBP die von Activin A stimulierte Gentranskription durch Blockieren der Activin-induzierten Signaltransduktion. Bernard et al. (2001) formulierten die Hypothese, dass die Anwesenheit von InhBP den Activinrezeptor Komplex für Inhibin B sensitiv werden lässt, so dass auch niedrige Konzentrationen von Inhibin B die Activinwirkung antagonisieren können.

Es bleibt noch zu klären, ob Betaglykan und InhBP spezifische Rezeptoren für Inhibin A bzw. Inhibin B sind. InhBP scheint beide Inhibine binden zu können, aber mit einer höheren Affinität das Inhibin B. Insofern könnte InhBP ein Rezeptor für Inhibin B sein. Die Frage ob Betaglykan bei der Activinantagonisierung vorwiegend das Inhibin-A- oder das Inhibin-B-Signal vermittelt, bleibt noch zu klären (Bernard et al., 2001).

Neue Studien an Knock-out-Mäusen belegen, dass Tiere, die kein InhBP exprimieren, und eine normal Betaglykan Expression haben, dennoch fertil sind und keine bedeutende Veränderungen in der FSH-Synthese und -Sekretion aufweisen (Bernard et al., 2003). Hingegen sterben Betaglykan Knock-out-Mäuse schon in utero (Stenvers et al, 2003). Dies unterstreicht die wichtige Rolle des Betaglykan-Rezeptors.

5.6 Follistatin

5.6.1 Struktur von Follistatin und gonadale Expression

Follistatin (Fst) ist strukturell völlig anders aufgebaut als Activin und Inhibin und somit nicht Mitglied der TGF β -Familie, aber funktionell diesen beiden Substanzen nahestehend, da es als FSH-regulatorisches Element fungiert. Follistatin wurde wie Inhibin und Activin erstmals aus ovarieller Flüssigkeit isoliert (Esch et al., 1987). Es ist ein zysteinreiches monomeres „single-chain“ Protein. Es ist außer in der Follikelflüssigkeit auch in hypophysären gonadotropen Zellen und in vielen weiteren Geweben, wie Niere, Uterus, Gehirn zu finden. Follistatin ist ein hoch-affines Activin-Bindungsprotein.

Follistatin wird von einem einzigen Gen kodiert. Es wird in den Ovarien von den GC gebildet und existiert in verschiedenen Isoformen, die auf alternatives Spleißen und

unterschiedliche Glykosylierung zurückzuführen sind (Shimasaki et al., 1988a, Shimasaki et al., 1988b, Sugino et al., 1993). Beim Schwein sind zum Beispiel sechs Isoformen vorhanden: Die drei alternativen Spleißingformen FS-315, FS-303 und FS-288 werden teilweise anschließend noch glykosiliert. Beim Schwein ist die am meisten vertretene Form FS-303 (Sugino et al., 1993, Li et al., 1997)

Die Primärstruktur von Follistatin ist zwischen den verschiedenen Spezies hoch konserviert (>97%). Follistatin wurde erstmals in boviner und porciner Follikelflüssigkeit (FF) identifiziert. Hauptsyntheseort ist, wie schon erwähnt, die GC-Schicht im Follikel (DePaolo et al., 1991, Findlay, 1993). Vor kurzem konnte Follistatin auch in Oozyten nachgewiesen werden (Silva et al., 2004).

Follistatin hat eine Bindungsstelle für die β -UE und bindet demnach sowohl an Activin als auch an Inhibin. Dadurch bindet ein Follistatin an Inhibin während Activin zwei Follistatinmoleküle binden kann. Die Bindung zwischen Follistatin und Activin ist sehr stark, so dass der gebildete Komplex nicht dissoziiert und lysosomal abgebaut werden muss (Shimonaka et al., 1991). Follistatin ist ein Modulator der Activin-Funktion und führt durch die Blockierung der Activin-Wirkung zu einer Unterdrückung der hypophysären FSH-Sekretion.

Das Expressionsmuster von Follistatin ist von dem der I (Inhibin)/A (Activin)-UE sehr verschieden (Li et al., 1997b).

Die Expression von Follistatin mRNA wurde bei diversen Tierarten studiert. So haben Sidis et al. (1998) bei der Maus die Expression von Follistatin mRNA in der Oozyte und den GC untersucht. Sie fanden eine deutliche und starke Expression in den Cumuluszellen, aber keine in den Oozyten. Bei der Ratte haben Nakatani et al. (1991) eine Expression von Follistatin in den muralen GC und in Cumuluszellen ab dem sekundären Follikel nachgewiesen. Auch hier findet weder eine Expression in den Oozyten noch in den TC statt. Beim Rind ist das Expressionsmuster dem der Ratte und der Maus ähnlich. Allerdings kann eine Expression von Follistatin mRNA schon in den GC primordialer Follikel sowie in Oozyten ab den kleinen antralen Follikeln nachgewiesen werden. Die beobachteten Unterschiede könnten eventuelle darauf zurückzuführen zu sein, dass die Ergebnisse beim Rind auf deutlich späteren Versuchen resultieren, bei denen schon wesentlich sensitivere Methoden zur Verfügung standen, oder aber auch auf tierartliche Unterschiede. (Sing et al., 1998, Izadayar et al., 1998). Die Follistatin-Expression beim Schaf wurde von Tisdall et al. (1994), McNatty et al. (1994), sowie Braw-Tal et al. (1994) untersucht. Die Expression von

Follistatin mRNA findet beim Schaf ebenfalls ausschließlich in den GC ab dem sekundären Follikel statt. Li et al., (1997b), kamen beim Schwein zum gleichen Ergebnis. Ein signifikanter Unterschied ist hingegen von Silva et al. (2004a) bei der Ziege gefunden worden. Hier findet zusätzlich zur Expression in den GC auch eine Expression in der Oozyte ab dem primordialen Follikelstadium statt, sowie eine Expression von Follistatin in den TC ab dem kleinen antralen Follikel.

Follistatin Protein wurde mittels Immunocytochemie in GC und teilweise auch in lutealen Zellen nachgewiesen (DePaolo et al., 1991).

Follistatin wird von GC der Ratte (Nakamura et al., 1990, Saito et al., 1991) und des Rindes (Klein et al., 1991) sezerniert, aber nicht von der TI (Klein et al., 1991). Die Expression von Follistatin wurde bei Rind und Ziege in den GC und in der Oozyte nachgewiesen (ab den antralen Follikeln) (Izadayar et al., 1998, Silva et al., 2003, Silva et al., 2004a). Weiterhin wurde das Follistatin-Protein in den Oozyten primordialer Follikel sowie in den Oozyten und Granulosazellen primärer und sekundärer Follikel lokalisiert, obwohl die mRNA erst in den GC sekundärer Follikel gefunden wurde (McNatty et al., 1999).

Bei der Ziege und beim Rind scheint Follistatin in den Kompartimenten, in denen das Protein aufgefunden wurde, auch gebildet zu werden, da die mRNA auch in diesen Kompartimenten exprimiert wird. Die Anwesenheit von Follistatin in diesen Kompartimenten, deutet zusammen mit einer Anwesenheit von Activin darauf hin, dass das Activin-Follistatin System eine wichtige Komponente bei der antralen Follikelentwicklung darstellt (Silva et al., 2006a).

Tabelle 5.14 Expression von Follistatin bei den verschiedenen Tierarten

	Maus		Ratte		Schaf		Ziege		Rind		Schwein	
	mRNA	Protein	mRNA	Protein	mRNA	Protein	mRNA	Protein	mRNA	Protein	mRNA	Protein
Primordialfollikel							+					
Oozyte			-		-	+		+				
Granulosa			-		-	-		-	+		+	
Primärfollikel							+					
Oozyte			-		-	+		+				
Granulosa			-			+		+/-	+		+	
Sekundärfollikel							+					
Oozyte			-		-	+		+				
Granulosa			+		+	+		+	+		+	
Theka			-		-	-		-	-			
Antraler Follikel (kl)												
Oozyte	-		-		-		+	+++	+	+		
Cumuluszellen	++		+		+		+	+++	+	+	+	
Murale GC			+		+		+	+++	+		+	
Theka			-		-		+	+	-			
Antraler Follikel (gr)												
Oozyte	-		-		-		+	++	+	+		
Cumuluszellen	++		+		+		+	+	+	+	+	
Murale GC			+		+		+	+++	+		+	
Theka			-		-		+	++	-			
Corpus Luteum			+		+		+	++				
Atretischer Follikel												

(+), (-): ganzer Follikel untersucht

GC: Granulosazellen, kl: klein, gr: gross

+, ++, +++: Intensität der Expression

+/-: Spuren gefunden

-: keine Expression gefunden

Die Produktion von Follistatin mRNA durch die GC wird von FSH aber nicht von LH reguliert. Dies haben in vivo und in vitro Untersuchungen ergeben (DePaolo et al., 1991). FSH hat einen konzentrations- und zeitabhängigen Stimulationseffekt auf die Expression der Follistatin mRNA, während LH, Prolaktin, GH und IGF-1 keine oder kaum eine Wirkung besitzen (Findlay, 1993). Activin wirkt auf Follistatin konzentrationsabhängig: in niedrigen Konzentrationen wirkt Activin auf Follistatin inhibitorisch, in hohen Konzentrationen stimulatorisch auf die basale wie auch auf die FSH-induzierte Follistatin-Konzentration (Findlay, 1993). LH hat keinen Einfluss auf die Follistatin Expression und somit ist die Produktion von Follistatin FSH- aber nicht LH-abhängig (Findlay, 1993) Allerdings hat cAMP eine positive Wirkung auf die Fst-Expression. Es gibt noch keine Erklärung für die fehlende Wirkung von LH (Findlay, 1993).

Follistatin zeigt an den Östruszyklus angelehnte Schwankungen seiner mRNA als auch Proteinexpression. Diese zyklusbedingten Konzentrationsveränderungen sind für die Ratte von Nakatani et al. (1991) beschrieben worden. Follistatin mRNA und Protein-Konzentration nehmen mit Antrumbildung zu und werden in der gesamten GC-Schicht exprimiert. Bei den Ratten ist nachgewiesen worden, dass die Expression von Follistatin-Protein und auch der mRNA nach dem primären Gonadotropin-Anstieg absinkt. Dies bedeutet, dass der Gonadotropinanstieg die Expression von Follistatin hemmt (Shimasaki et al., 1989).

Das stärkste Signal für Follistatin wird in präovulatorischen Follikeln und in neu gebildeten C. I. gefunden (Findlay, 1993). Neuere Untersuchungen bei der Ratte ergaben, dass Follistatin zwei Anstiege im Verlauf des Zyklus durchmacht, einen im Proöstrus und einen nach dem primären Gonadotropin-Anstieg (Arai et al., 2002). Der Anstieg von Follistatin geht einem von Progesteron voraus und Follistatin scheint die Progesteronsekretion zu unterstützen (Arai et al., 2002). Beim Rind wird Follistatin ebenfalls zunehmend in der mittleren folliculären und präovulatorischen Phase exprimiert. Zudem gibt es beim Rind einen deutlichen Unterschied in der Expression zwischen dem dominanten Follikel (DF) und den subdominanten Follikel (SDF), der allerdings erst einige Tage später messbar wird. Hinzu kommt der Befund, dass ein Verlust der funktionellen Dominanz eines Follikels mit einem starken Abfall der Follistatin-Expression in den GC einhergeht (Singh und Adams, 1998). Somit findet sich beim Rind eine zeitliche Korrelation zwischen der Expression von Follistatin, der Östradiol-Produktion sowie dem Auftreten der DF und der SDF (Sing und Adams, 1998).

Beim Schwein fanden Li et al. (1997b) dass die Genexpression von Follistatin in antralen Follikeln im Laufe der pubertären Entwicklung und während der lutealen Phase des Zyklus zunimmt.

Der Gehalt an Follistatin in der Follikelflüssigkeit folgt der Expression von Follistatin in den GC und nimmt daher ebenfalls während der letzten Stadien der Follikelentwicklung ab (Li et al., 1997b). Beim Schwein wurden zudem die Isoformen FS-315 und FS-288 untersucht und festgestellt, dass das Verhältnis dieser Isoformen im Laufe der Follikelentwicklung nicht variiert (Li et al., 1997b).

5.6.2 Die Wirkung von Follistatin

Follistatin und der Activin-Rezeptor konkurrieren beide um Activin (siehe Abbildung 5.4). Daher besteht eine wesentliche Wirkung von Follistatin in der Regulation der Bioverfügbarkeit von Activin und dadurch in der Regulierung der FSH-Biosynthese.

Es besteht beim Rind eine zeitliche Korrelation zwischen der erhöhten Expression von Follistatin, der Produktion von Östradiol und dem Auftreten von DF (Singh und Adams, 1998). Eventuell ist dieser zeitliche Zusammenhang zufällig oder aber Follistatin ist in den Prozess der Selektion involviert und verstärkt die Differenzierung der GC und der TC (Singh und Adams, 1998). Follistatin verstärkt ebenfalls die Produktion von Progesteron der nicht präovulatorischen GC (Singh und Adams, 1998)

Im Gegensatz zu der FS-315 Form wird bei den kleineren FS-288 und FS-303 Formen über die potentielle Wirkung noch diskutiert. Beide können reversibel Zell-Membran-Proteoglykane binden. Ob sie einen Einfluss auf Activin haben, wird noch debattiert, da durch Zugabe von Heparin oder Heparin-Sulfat ihre Bindung an die Zell-Oberflächen Proteoglykane verhindert werden kann, dies aber die Wirkung von Activin nicht beeinträchtigt (Schneyer A.L., 1997).

Neben Activin und Inhibin kann Follistatin die Wirkung von BMP, insbesondere von BMP-2, BMP-4, BMP-7 und BMP-15, sowie von Myostatin, antagonisieren (Yamashita et al., 1995, Findlay et al., 2002, Otsuka et al., 2002).

5.7 Die hypophysäre Expression von Follistatin

Follistatin wird in der Hypophyse nicht wie die A/I UE nur in gonadotropen Zellen sondern auch in follikulostellären Zellen gebildet (Bilezikjian et al., 2004). Die Hypophyse der Ratte sezerniert Follistatin-mRNA und Zellkulturen aus hypophysären Zellen der Ratte und des Rindes sezernieren Follistatin ins Medium (Gospodarowicz und Lau, 1989, Kogawa et al., 1991). Eine Follistatin-Expression in der Hypophyse des Schafes wurde von Farnworth et al. (1995) nachgewiesen.

Die Expression und somit die Funktion von Follistatin mRNA in der Hypophyse ist noch nicht gänzlich geklärt. Bekannt ist, dass der Spiegel der Follistatin-mRNA im Laufe des Zyklus bei der Ratte stark variiert (Halvorson et al., 1994). So steigt Follistatin im Proöstrous stark an. Dieser Anstieg stimmt mit dem Anstieg von FSH β überein, geht ihm allerdings etwa sechs Stunden voraus. Dieser zeitliche Zusammenhang könnte bedeuten, dass Follistatin die

FSH β -Expression stimulatorisch beeinflusst, oder dass beide Gene durch ein und dasselbe Element, z.B. Activin, reguliert werden.

Die hypophysäre Expression von Follistatin wird von vielen Faktoren beeinflusst. Wie bereits gezeigt spielt der Zyklus eine wichtige Rolle. Desweiteren wirkt sich GnRH positiv auf Follistatin aus (und neuerdings sind auch die Signaltransduktionsmechanismen geklärt, welche an der GnRH-induzierten Follistatin-Expression beteiligt sind (Winters et al., 2007b)) und Follistatin steigt nach einer Gonadektomie stark an (Liu et al., 1996, Dalkin et al., 1998). Die GnRH-induzierte Follistatin-Expression könnte einen Mechanismus darstellen, welcher die differentielle Expression von FSH β und LH β durch GnRH ermöglicht (Winters et al., 2007b).

Allerdings bleiben noch einige Aspekte, wie z.B. die Follistatin-Expression bei verschiedenen Tierarten zu verschiedenen Zyklusstadien, offen.

5.8 Der Follistatin-Rezeptor

Follistatin, insbesondere die am Carboxy-Ende gekürzte Form (FS-288), bindet an den Heparin-Seiten-Strang von Proteoglykanen, die sich auf vielen Zelloberflächen und somit auch auf GC befinden. Dennoch scheint diese Bindung keine funktionelle Liganden-Rezeptor-Interaktion zu besitzen. Es wird eher angenommen, dass Membran-fixiertes Follistatin die Wirkung von Activin und eventuell auch von Inhibin über ihre Fähigkeit, diese Moleküle zu binden und somit ihre Wirkung auf Zielzellen zu reduzieren, reguliert (Knight und Glister, 2001).

6 Steroidhormone

6.1 Progesteron (P)

Progesteron ist ein Steroidhormon, das zyklusabhängig von den Granulosazellen (GC) bzw. dem Corpus luteum produziert wird. Progesteron wird aus Cholesterol synthetisiert. Die an dieser Umwandlung beteiligten Steroidenzyme sind StAR (Steroid acute regulatory Protein), P450scc (P450 side chain cleavage) und 3 β -HSD (3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase) (R.E. Gore-Langton und D.T. Armstrong, 1994). Progesteron ist ebenfalls die Vorstufe von Androgen.

Die Synthese von Progesteron in den GC erfolgt erstmals zum Zeitpunkt der Follikelrekrutierung. Progesteron wird in erhöhten Mengen von differenzierten GC durch die FSH-Induktion der P450scc, welche den limitierenden Schritt der Konversion von Cholesterol zu Pregnenolon katalysiert, produziert (Richards et al., 1998). Eine erhöhte Aktivität der P450scc findet ebenfalls nach Stimulation der LH-R statt. Nach dem LH-Peak, bedingt durch Vaskularisation der GC-Schicht, und dem dadurch erhöhten Angebot an Cholesterol steigt die Progesteron-Synthese massiv an.

Die FSH-Stimulation der Progesteron-Synthese kann durch verschiedene autokrine und parakrine Faktoren beeinflusst werden. So modulieren BMP-4, -6, -7, -15 sowie GDF-9 stark die FSH-induzierte Progesteron-Sekretion in den GC der Ratte und beim Schaf. Sie führen zu einer verminderten Expression von P450scc, von StAR und 3 β -HSD (Pierre et al., 2004). BMP-5 führt bei der Ratte ebenfalls zu einem Abfall von StAR und hemmt somit die Progesteron-Sekretion der GC. Diese Wirkung kann allerdings von Follistatin aufgehoben werden (Pierre et al., 2005).

An der Progesteronsynthese sind neben den Enzymen StAR und P450scc noch weitere Faktoren beteiligt, wie Smad, SF-1 (Steroidogener Faktor 1) und Sp-1 (spezifisches Protein 1) (Pierre et al., 2004). Diese werden teilweise durch Mitglieder der TGF-beta Familie in ihrer modulierenden Wirkung auf die Progesteron-Synthese beeinflusst. So moduliert z.B. BMP-4 Progesteron durch Inhibition der Transkriptions-fördernden Aktivität von SF1 auf die

Promotoren der steroidogenen Gene (Pierre et al., 2004). BMP-7 hemmt ebenfalls die FSH-induzierte Progesteron Synthese.

Am Follikel hat Progesteron hat mehrere Wirkungen:

- Progesteron hemmt zusammen mit Östradiol die FSH- und LH-Sekretion, und wirkt hemmend auf die GnRH-Pulsfrequenz
- Progesteron wirkt beim Rind in der Lutealphase auf die untergeordneten Follikel: Der DF (dominante Follikel) kann auf Grund der niedrigen LH-Freisetzung nicht ovulieren, atresiert und verliert seine blockierende Wirkung auf die Hypophyse. Dies bewirkt das Reifen einer neuen Follikelwelle.
- Beim Schwein ist der nach der Luteolyse auftretende Abfall von Progesteron eines der Hauptsignale, welches für die Auslösung der präovulatorischen Reifung zuständig ist. Eventuell ist der Progesteron-Abfall allein ausreichend, um die präovulatorische Reifung, die Inhibin-Produktion und die Steroidogenese einzuleiten (Guthrie et al., 1992).
- Progesteron hat wichtige Funktionen, unter anderem am Ovar, an der Milchdrüse und an den für sexuelles Verhalten zuständigen Gehirnarealen. Progesteron spielt zudem eine Rolle in der Modulation des Follikelwachstums und der Ovulation. Allerdings muss die genaue Rolle in diesen Fällen noch ermittelt werden.

6.2 Progesteron-Rezeptor (PR)

Das Progesteron-Signal wird durch den Progesteron-Rezeptor (PR) umgesetzt. PR wird allerdings nicht nur von Progesteron sondern kann über den proximalen Promotor auch von Östrogen aktiviert werden (Richards et al., 1998). Daher können viele beobachtete Antworten von dem PR an einer Kombination von Progesteron und Östrogen liegen.

Der Progesteron-Rezeptor kommt in zwei Isoformen vor: PRA und PRB (Conneely et al., 1989). Diese beiden Isoformen werden von dem gleichen Gen kodiert und sind Mitglieder der „Nuclear-Receptor“ Superfamilie von Transkriptionsfaktoren. PR besitzt zwei Promotor-Regionen. Der distale Promotor beinhaltet eine Sp1- und eine CCAAT-Bindungstelle während der proximale Promotor eine ERE ähnliche Region aufweist (Richards et al., 1998).

Progesteron und sein Rezeptor sind für die Vermittlung der LH-Induktion der Ovulation, sowie für die Entwicklung des Uterus und der Milchdrüse essentiell. Studien an PRA oder PRB Knock-out Mäusen haben ergeben, dass die beiden Rezeptoren unterschiedliche Transkriptionseigenschaften besitzen, wenn sie Progesteron gebunden haben. Versuche beim Schwein haben weiter gezeigt, dass PRA und PRB zu unterschiedlichen Zeiten exprimiert werden. So ist die PR Expression in Cumuluszellen von Schwein, die mit FSH und LH kultiviert werden, bis zur 20. Stunde sehr hoch. (Shimada et al., 2004).

Die Konzentration von PRB sinkt stark im Zusammenhang mit einer erhöhten Konzentration von Progesteron. Behandlungen mit dem Antiprogesteron führen zu einer Inhibition der Meiose. Daraus wurde geschlossen, dass ein Abfall von PRB für die Reifeteilung essentiell ist (Shimada et al., 2004). Weiters gibt es erste Befunde, dass ein Abfall von PRB in den Cumuluszellen nötig ist, um die Connexin-43 Expression (welche eine der Hauptkomponenten der Gap Junctions darstellt) zu hemmen (Shimada et al., 2004).

Studien an PRKO (PR-Knock-out) Mäusen haben zu folgenden Ergebnissen bezüglich der Rolle von PR geführt: PRKO Mäuse können nicht ovulieren, trotz Gabe von superovulatorischen Gonadotropin-Konzentrationen. PRKO Mäuse exprimieren aber P450_{scc}. Dadurch wird deutlich, dass PR für die zur Ovulation führenden Ruptur des Follikels nötig ist, nicht jedoch für die Differenzierung der GC (Conneely et al., 2002). PRKO Mäuse haben zudem eine normale Follikelentwicklung bis zum tertiären Follikel (Lydon et al., 1996). Diese Follikel enthalten voll entwickelte Oozyten, die auch funktionell vollwertig sind (Lydon et al., 1996).

Die Expression von PR im präovulatorischen Follikel findet als Reaktion auf die LH-Stimulation statt (Natraj und Richards, 1993), während die Expression von PR in den kleinen Follikeln durch FSH ausgelöst wird. Es gibt auch hier wieder eine Reihe von Untersuchungen an verschiedenen Tierarten mit teilweise widersprüchlichen Ergebnissen:

- So ist z.B. nach Robert et al. (2000) die PR Expression ausschließlich in den muralen GC und nicht in Cumuluszellen zu finden, während Shimada et al. (2004) die Expression der PR in den Cumuluszellen des Schweines nachweisen konnten.
- Bei der Maus ist PR laut Shimada et al. (2004) in den GC der Primärfollikel zu finden. Seine Expression verschwindet dann im wachsenden Follikel und tritt erst wieder in den GC der präovulatorischen Follikel auf. Thekazellen

exprimieren nach seinen Befunden PR ab ihrer Ausdifferenzierung. Hingegen haben Gava et al. (2004) bei der Maus die Expression von PRA durchgehend in allen Follikeln nachgewiesen. Das Expressionsmuster für PR bei der Maus ist dem der Ratte sehr ähnlich. PR wird bei der Maus vor allem in gesunden GC präovulatorische Follikel exprimiert und wird mit der Luteinisierung herunter reguliert. Im C.l. kommt es zu keiner PR-Expression. Bei der Ratte soll die PR Expression in GC aber nicht in TC von präovulatorischen Follikeln vorkommen (Park und Mayo, 1991).

- Die PR Expression beim Schaf ist nach Juengel et al. (2006) durchgehend in den TC, und ab dem großen präantralen Follikel auch in den GC zu finden.
- Beim Rind gibt es in den präovulatorischen Follikeln ein triphasisches Expressionsmuster für PR mRNA, mit einem ersten Anstieg einige Stunden nach dem LH-Peak und einem zweiten Anstieg nach der Ovulation (Jo et al., 2002). Beim Rind konnte eine LH-induzierte Hochregulierung der PR mRNA in den TC nachgewiesen werden (Jo et al., 2002). Der stimulatorische Effekt von Gonadotropinen auf die PR Expression ist schnell aber kurzlebig.
- Beim Schwein weisen kleine und mittlere antrale Follikel keine PR-Expression auf. Diese kann aber durch Stimulation mit LH und FSH induziert werden (Shimada et al., 2004). Die Expression von PR in den GC kann dagegen nicht durch Östrogen induziert werden (Shimada et al., 2004).

Table 6.1 Literaturquellen zu der Expression von Progesteron Rezeptor A (PRA) und Progesteron Rezeptor B (PRB).

Tierart	Literatur Quellen	
Maus	Gava et al., 2004 Shimada et al., 2004 Shao et al., 2003	Expression von PRA und PRB
Schaf	Juengel et al., 2006	Steroide und ihre Rezeptoren
Rind	v. den Boerk et al., 2002 Jo et al., 2002	PR Expression beim Rind PR Expression
Schwein	Shimada et al., 2004 Slomczynska et al., 2000	PRA und PRB Expression in GC Cumulus Zellen PR und seine Expression in den GC, TC und C.l.

PR: Progesteron Rezeptor, PRA (B): Progesteron Rezeptor A (B), GC: Granulosazellen, TC: Thekazellen, C.l.: Corpus luteum

6.3 Androgene

Androgene werden in den TC aus Pregnenolon unter dem Einfluss von LH synthetisiert. Androgene sind vor allem im frühen Follikelwachstum wesentlich an der Stimulierung des Follikelwachstums beteiligt.

Androgene wirken in der frühen Phase der Follikel-Entwicklung in den noch wenig differenzierten GC über den Androgen-Rezeptor (AR). Später werden Androgene in den differenzierten GC, nach Expression der P450arom, in Östrogene umgewandelt (Slomczynska und Tabarowski, 2001). Während des Follikelwachstums kommt es damit zu einem Shift im Ovar von Androgen zur Östrogenproduktion.

Die genaue Rolle von Androgenen für die Follikulogenese ist noch nicht geklärt. Mann weiß, dass Androgen ein wichtiger Regulator des frühen Follikelwachstums ist und die Proliferation von GC sowie die Wirkung von FSH fördert (Hampton et al., 2004). Sobald sich ein Antrum im Follikelgebildet hat, sinkt die AR Expression in GC und A dient dann vermehrt als Substrat für die Aromatase zur Östrogenbildung.

6.4 Androgen Rezeptor (AR)

Das Gen für den AR ist auf dem X-Chromosom lokalisiert. AR wird bei der Maus vor allem in den GC ab dem Transitionsfollikel exprimiert. Seine Konzentration ist im frühen antralen Follikel am höchsten und nimmt mit zunehmender Reifung des Follikels wieder ab (Walters et al., 2007). Bei der Ratte wurde keine Expression von AR in den TC gefunden (Tetsuka et al., 1995). Beim Schaf wird die mRNA von AR erst ab dem Typ 3-Follikel (Siehe 2.5 Tabelle Follikelgröße) in den GC und in den TC exprimiert. Die Ergebnisse über die Expression von AR in den Oozyten sind nicht eindeutig (Juengel et al., 2006). Beim Rind findet die Expression wie bei der Maus erstmals im Transitionsfollikel statt und die Expression steigt mit zunehmender Follikelgröße. D.h. die Expression des AR nimmt mit dem Follikeldurchmesser, unabhängig von der Zeit, zu. Auch hier ist die Expression am stärksten im präantralen und frühen antralen Follikel und sinkt dann im späten antralen Follikel. Der Hauptexpressionsort sind die GC (Hampton et al., 2004). Beim Schwein wird AR ebenfalls vor allem in den GC exprimiert, bevorzugt in der an das Antrum grenzende Zellschicht. AR

wird beim Schwein erstmals im Transitionsfollikel exprimiert. Die maximale Expression ist im frühen antralen Follikel zu finden (Slomczynska und Tabarowski, 2001). Laut einer Untersuchung von Garrett et al (1996) wird AR in den GC nicht atretischer Follikel exprimiert und seine Expression sinkt in atretischen Follikeln.

Weil et al. (1999) fanden heraus, dass die Konzentration von ARmRNA in GC positiv mit der von FSH-R korreliert und zudem dass FSH die Expression von AR in primären Follikeln erhöht.

Der genaue Wirkungsmechanismus von A über seinen Rezeptor ist noch nicht völlig geklärt, aber bis jetzt ist bekannt, dass A über den AR zu einer Erhöhung von FSH induziertem cAMP führt (Hillier, 2004). AR beeinflusst die Rückkopplungs-mechanismen, welche die hypothalamische GnRH- und die hypophysäre FSH- und LH-Sekretion steuern. Dieser Vorgang ist teilweise Activin-abhängig und weist Spezies-spezifische Unterschiede auf. z.B. ist in der Hypophyse die Stimulation der FSH-Synthese durch Androgen bei der Ratte GnRH-unabhängig, während bei den Primaten eine GnRH-unabhängige Inhibition der FSH-Synthese stattfindet (Spady et al., 2004). A inhibiert die FSH-stimulierte LH-R Expression durch GC und verstärkt die Wirkung von Komponenten des IGF-Systems (Hickey et al., 2004).

Die sinkende Expression von AR im antralen Follikel wird durch ER β reguliert. Eine erhöhte Konzentration von AR in antralen Follikeln bindet verstärkt A und führt zu einem Substratmangel für die Östrogenbildung und in Folge zur Follikelatresie (Cheng et al., 2002).

6.5 Östrogen (E) und der Östrogenrezeptor (ER)

Östrogene sind aus Androgenen synthetisierte Steroide und werden, außer beim Schwein, vor allem in den GC produziert. Das für die Östrogen-Synthese nötige Enzym ist die Aromatase (P450arom). Beim Schwein tritt eine Besonderheit auf: hier kommt die Aromatase (P450arom) auch in den TC vor, wodurch Östrogen in den TC synthetisiert werden kann. Es findet keine Produktion von Östrogen in präantralen und kleinen antralen Follikeln statt, da die P450arom erst bei mittleren antralen Follikeln exprimiert wird. E ist einer der wesentlichen Faktoren, die an der Follikelselektion beteiligt sind.

Die FSH-induzierte Östradiolproduktion wird von dem Mitgliedern der TGF β -Familie, wie BMP-4 und BMP-7, in Abhängigkeit von Follikelstadium verstärkt (Pierre et al., 2004).

E wirkt über die beiden ER-Rezeptorsubtypen, ER α und ER β (und dessen Spleißvarianten). Es übt einen proliferativen bzw. differenzierenden Einfluss auf die Follikelentwicklung aus (Drummond und Findlay, 1999). Die zelluläre Verteilung von ER α und ER β ist für die Wirkung von E2 (Östradiol) im Ovar essentiell.

ER α wird vor allem in lutealen Zellen, ER β dagegen stärker in GC exprimiert (Sharma et al., 1999). Die ER liegen sowohl als Homodimere als auch als Heterodimere vor.

Die genaue Wirkung von Östrogen über seine beiden Rezeptoren im Follikel ist noch nicht in allen Einzelheiten geklärt. Experimente an KO-Mäusen, bei denen gezielt ER α oder ER β oder ER $\alpha\beta$ ausgeschaltet wurden, haben die Bedeutung der einzelnen Subtypen erkennen lassen. Es wurden ebenfalls ArKO-Mäuse untersucht (Aromatase Knock-out Mäuse), die nicht in der Lage sind, Östrogen herzustellen. Aus den Untersuchungen ist zu entnehmen, dass E für die Entwicklung der Follikel besonders wichtig ist. Aromatase Knock-out-Mäuse (ArKO) sind infertil. Ihre Follikel entwickeln sich nur bis zum antralen Follikel und es sind keine C.I. zu finden (Britt und Findlay, 2002).

In Abwesenheit eines Y Chromosoms entwickeln Östrogen-defiziente ArKO Mäuse virilisierte Gonaden, in denen zwischen einzelnen somatischen Ovarzellen ebenfalls Sertoli-Zell-ähnliche Zellen zu erkennen sind (Britt und Findlay, 2002). Dies zeigt, dass die Abwesenheit eines Y Chromosom nicht zwangsläufig zur Ausbildung weiblicher Genitalorgane führt und demonstriert die Bedeutung von Östrogen bei der phänotypischen Entwicklung der Geschlechtsdrüsen.

ER übt seine genregulierenden Eigenschaften über zwei Wege aus: erstens über direkte Bindung an Östrogen responsives Element (ERE) oder zweitens über Signaltransduktionswege an der Zellmembran. ER α und ER β haben trotz gleicher Wirkung auf der ERE-Ebene unterschiedliche Wirkungen an den AP-1 Bindungsstellen. ER α aktiviert die Transkription durch die AP-1 Bindungsstelle während ER β diese inhibiert (Liu et al., 2002).

Im Follikel führt Östrogen über Bindung an ER β zu einer Herabregulierung von AR und reduziert damit die Atresie (Cheng et al., 2002). ER α KO Mäuse zeigen, wie wichtig ER α für die Modulierung der Androgene in den TC ist: in ER α KO Mäusen findet eine Repression des Enzyms P450c17 statt. Die Umwandlung von Androgenen zu Östrogenen findet nicht statt und die Follikel atresieren (Taniguchi et al., 2007). Die präzise Regulierung der Steroide ist für die Follikelentwicklung von großer Bedeutung. Sehr lange wurde angenommen, dass Östrogen eine negative Wirkung auf die Androgensynthese hat. Taniguchi et al. (2007) haben

gezeigt, dass an dieser negativen Rückkopplung der ER α in den TC maßgeblich beteiligt ist. Bei seiner Abwesenheit wird Androgen in den TC vermehrt produziert.

Britt et al. 2002 vertreten die Hypothese, dass die proliferative Wirkung von E über ER α und die zelldifferenzierende Wirkung von E über den ER β vermittelt wird. Zusätzlich moduliert ER β die Wirkung von ER α indem es dessen Wirkung auf das Cyclin D1 Gen oder anderer Schlüsselgene, die CRE oder AP-1 Bindungstellen beinhalten, blockiert. ER α und ER β haben also entgegengesetzte Wirkungen auf die Cyclin D2 Genexpression (Liu et al., 2002).

In mehreren Studien wurden genaue Untersuchungen über die ER-Expression im Follikel gemacht und deutliche tierartliche Unterschiede festgestellt: So fanden Juengel et al. (2006) dass beim Schaf ER α in den GC von Follikeln des Typs 4-5 exprimiert wird während ER β in Follikeln des Typs 1-3 in GC und in der Oozyte, in Follikeln des Typs 3-5 in den GC, in der Ooc und in den TC exprimiert wird. D'Haesseler et al. (2006) fanden in Primordial-, Primär- und Sekundärfollikeln keine Expression von ER α und eine sehr niedrige Expression von ER β . Das deutet darauf hin, dass Östrogen in den frühen Follikelstadien über den ER β wirkt. Dieses Expressionsmuster wurde von Couse et al. (1997) auch bei der Maus gefunden. Im tertiären Follikel wurden von D'Haesseler et al. (2006) nur niedrige Konzentrationen von ER α in GC und TC ermittelt, während deutlich höhere Mengen an ER β vorhanden waren. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Slomczynska et al. (2001) beim Schwein überein. Die ER β -Konzentrationen in den tertiären Follikeln variieren allerdings stark mit den Zyklusphasen: so ist ER β im Östrus relativ hoch, steigt im Metöstrus an, sinkt im Diöstrus wieder ab um in späten Diöstrus und im Proöstrus dann wieder anzusteigen.

Beide ER sind im C.l. zu finden, was eine Beteiligung von ER α und ER β am Erhalt und an der Luteinisierung des C.l. vermuten lässt. Auch hier finden wieder starke Variationen in der Genexpression in Abhängigkeit von dem Zyklusstadium statt.

Die spezifische zelluläre Lokalisation und die zyklische Abhängigkeit der Expression weist darauf hin, dass jeder Rezeptorsubtyp spezifische Funktionen besitzt. Allerdings sind hierfür noch weitere Studien nötig.

6.6 Wirkung der Östrogene

Es gibt drei Östrogene: Östradiol, Östron und Östriol. Das wichtigste und hier behandelte ist Östradiol.

Die endokrine Rolle von Östrogenen auf die hypothalamische-hypophysäre Achse und die Modulation der Gonadotropin-Synthese und -Sekretion ist für die Reproduktion essentiell (Shupnik, 1996). In den meisten Säugetierspezies wird der Zyklus durch die bi-modale Wirkung des von den Ovarien stammenden Östrogen auf die hypothalamo-hypophysäre-Achse beeinflusst. So wirken die niedrigen Östrogen-Konzentrationen inhibitorisch auf die LH-Sekretion während der akute Anstieg von Östrogen im Proöstrus den präovulatorischen LH-Peak hervorruft (Freeman, 1994). Die genauen Mechanismen, über die Östrogen die positive als auch die negative Wirkung hervorruft, wurden und werden immer noch intensiv untersucht. Östrogen übt einen negativen Feedback auf GnRH aus, welches durch Versuche an ovariectomierten Tieren gezeigt werden konnte. Die GnRH-Sekretion ist in diesen Tieren stark erhöht, kann aber durch Zufuhr von Östrogen wieder auf ein normales Maß gebracht werden (Wise et al., 1981, Zoeller et al., 1988). Allerdings zeigen in vitro Studien, dass einige der Wirkungen von Östrogen unabhängig vom Hypothalamus sind. So zum Beispiel die Hemmung von FSH β (Miller und Miller, 1996) sowie die Expression und der Anstieg von LH β (Shupnik et al., 1989). Hier wirkt Östrogen direkt auf die Hypophyse. Die Wirkungen von Östrogen scheinen hier über den ER vermittelt zu werden, entweder über ein ERE (Estrogen-response element) innerhalb der Promotors der Gonadotropin-Untereinheit (Shupnik et al., 1989) oder aber über andere Transkriptionsfaktoren (Miller und Miller, 1996). Östrogen moduliert ebenfalls die hypophysäre Antwort auf GnRH über eine Modulation der GnRH-Rezeptor Expression (Turgeon et al., 1996). Neue Untersuchungen von Lindzey et al. (2006) haben gezeigt, dass der ER α für beide Wirkungen von Östrogen essentiell ist.

Östrogen stimuliert weiter die Transkription von LH β , sowohl die basale als auch der GnRH-induzierte Synthese, bei der Ratte (Shupnik et al., 1989, Shupnik, 1996) beim Affen (Kawakami und Winters, 1999), beim Schaf (Ben Said et al., 2007), beim Rind (Kesner et al., 1981) und beim Schwein (Britt et al., 1991).

7 Lokale Wachstumsregulatoren, Faktoren der Follikulogenese

7.1 Allgemein

Im letzten Jahrzehnt wurde immer deutlicher, dass parakrine Faktoren, von der Oozyte oder den somatischen Zellen sezerniert, eine überaus wichtige Funktion in der Follikulogenese einnehmen indem sie wichtige Prozesse beim Oozytenwachstum sowie beim frühen Follikelwachstum regulieren. Die Follikulogenese kann unterteilt werden in eine Gonadotropin-unabhängige Phase und in eine Gonadotropin-abhängige Phase. Dadurch wird noch mal unterstrichen, dass die frühe Follikulogenese nicht vorwiegend von Hormonen geregelt wird, sondern von parakrinen Faktoren, die mit den Hormonen vielfältige Wechselwirkungen eingehen und sich gegenseitig verstärken oder hemmen können.

Die parakrinen Faktoren sind zahlreich und werden meist ihrer Wirkung und/oder Struktur nach in Gruppen oder Familien zusammengefasst.

Die wichtigsten Gruppen/Familien sind:

- Kit Ligand und c-Kit-Rezeptor
- Wachstumsfaktor β -Familie (TGF β)
- Insulin Wachstumsfaktor und Wachstumshormon (GH)
- Keratinozyten Wachstumsfaktor (KGF)
- Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF)
- Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)
- Hepatozyten Wachstumsfaktor (HGF)
- Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF)

7.2 Kit Ligand und der c-Kit Rezeptor

7.2.1 Allgemein

Kit Ligand (KL), auch Stem Cell Factor (SCF) genannt, wurde 1985 ursprünglich als muriner Leukämie-Antikörper und später, 1990, als von humanen Fibroblasten und Leberzellen gebildeter Faktor beschrieben (Copeland et al., 1990, Huang et al., 1999). Gebräuchliche Synonyme sind Mast Cell Growth Faktor (MGF), Stem Cell Factor (SCF), Steel Factor (SLF) oder auch c-Kit Ligand oder Kit Ligand (KL).

7.2.2 Struktur von Kit Ligand

Kit Ligand gehört, wie auch andere Wachstumsfaktoren (z.B. Macrophage colony stimulating Factor (M-CSF) oder auch Platelet-derived growth Factor (PDGF)) zu der Familie der Zytokine und befindet sich auf dem steel (Sl) Locus, der bei Menschen auf Chromosom 12, bei Ratte und Maus auf Chromosomen 10, und beim Schaf auf Chromosom 3 liegt (Tisdall et al., 1996).

Kit Ligand liegt in zwei Splice-Varianten vor, deren Proteine eine lösliche KL-1 Form (auch sSCF, soluble SCF genannt, mit einem Molekulargewicht von 20-35 kDa) und eine membrangebundene KL-2 Form (mSCF, membrane-bound SCF mit einem MG von 37- 42 kDa) bilden (Huang et al., 1992, Lu et al., 1992).

In der Maus besteht KL-1 aus 248 AS und ist ursprünglich membrangebunden. Durch eine Proteolyse an der durch Exon 6 kodierten Schnittstelle, wird eine 164-165 AS lange Kette, die den extrazellulären Teil des Proteins enthält, gebildet (Lu et al., 1992). Weiterhin enthält das Protein eine hydrophobische transmembranöse Domäne und eine zytoplasmatische Domäne. In der 220 AS transmembranösen KL-2 Form fehlt das Exon 6, wodurch dieses Protein membrangebunden bleibt. Trotz der Tatsache, dass dem KL-2 eine durch Exon 6 kodierte Proteolyse-Stelle fehlt wurde eine lösliche KL-2 Form gefunden (Huang et al., 1992). Dies deutet darauf hin, dass noch andere Proteolysemechanismen existieren. Das Verhältnis von KL-1 zu KL-2 variiert je nach Alter erheblich (Manova et al., 1993). Zusätzlich haben Versuche gezeigt, dass das Gleichgewicht der KL-1/KL-2 Produktion für das optimale Oozytenwachstum in vitro nötig ist (Thomas et al., 2005).

Unter physiologischen Bedingungen liegt Kit Ligand als Monomer vor (Hsu et al., 1997), dass sich allerdings durch polare und nicht polare Verbindungen zu Dimeren zusammenlegen kann (Zhang et al., 2000). Es wird angenommen, dass die biologische

Aktivität sowohl des sSCF als auch des mSCF von der Bildung dieser Homodimere abhängt (Hsu et al., 1997). Weiter konnte gezeigt werden, dass die Dimerisation die Aktivierung des Rezeptors sowie dessen Bindungsaffinität beeinflusst (Lemmon et al., 1997, Zhang et al., 2000).

Um die für die biologische Aktivität kritischen Regionen herauszufinden, wurden zahlreiche Untersuchungen mit Mutationen, Deletionen und Bildung chimärer KL-Proteine unternommen (Langley et al., 1994, Matous et al., 1996). Diese Versuche haben gezeigt, dass die Deletion der ersten drei Aminosäurereste die Bindungsaffinität auf bis zu 50% herabsetzt (Langley et al., 1994), und dass die Deletion des Cysteins auf Position vier das Zytokin vollkommen inaktiviert, während die Deletion des Cysteins auf Position 138 nur dessen Aktivität herabsetzt (Langley et al., 1994). Es sind also das Aminosäure-Ende und die Cysteine auf Position 4 bis 138 für die biologische Aktivität von SCF essentiell, während die zweite intramolekulare Disulfidbrücke nicht so wichtig ist (Langley et al., 1994). Studien an chimären KL/m-SCF Mäusen haben Folgendes ergeben (Matous et al., 1996):

Arg 121, Asp 124, Lys 127 so wie Asp 128 so wie die Aminosäuren (AS) 61 bis 65 und 91 bis 94 sind für die biologische Aktivität von SCF wesentlich. Die Rolle des zytoplasmatischen Endes von KL wird durch eine Mutationsstudie veranschaulicht. Bei diesen Mäusen wurden 36 AS, die den zytoplasmatischen Teil von KL bilden, durch 28 neue AS ersetzt (Tajima et al., 1998, Kapur et al., 1999). Männliche, nicht aber weibliche Tiere mit dieser Mutation sind infertil, und in beiden Geschlechtern sind Pigmentierungsdefizite und Anämie zu beobachten. Die Defekte sind auf einen Dimerisationsdefekt, und eine geringere Oberflächenexpression des Zytokins zurückzuführen. Dies deutet darauf hin, dass der zytoplasmatische Teil von KL keine direkte Funktion für die Signaltransduktion besitzt.

7.2.3 Der c-Kit Rezeptor

Der c-Kit Rezeptor ist auf dem W-Locus lokalisiert. Dieser befindet sich beim Menschen auf Chromosom 4, bei der Maus auf Chromosom 5 und beim Schwein auf Chromosom 8. c-Kit ist eine transmembranöse Glykoprotein-Rezeptor-Tyrosin Kinase Typ III (Lemmon et al., 1997) aus der Familie der PDGF-Rezeptoren (Platelet derived growth factor) und der CSF-1 Rezeptoren (colony stimulating factor). Er besteht aus einer extrazellulären Domäne, die wiederum aus fünf Immunglobulin-ähnlichen Regionen besteht. Die ersten drei binden SCF. Die vierte ist für die Dimerisation zuständig, die Rolle der fünften ist noch nicht geklärt. Des Weiteren besteht c-Kit-Rezeptor aus einer hydrophilen transmembranösen

Domäne und aus einer zytoplasmatischen Domäne, in dessen Mitte eine aus 80 AS bestehende Kinase-Domäne inseriert ist (Roskoski, 2005).

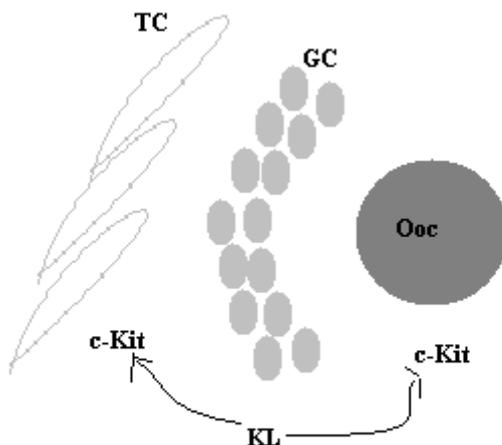
c-Kit ist in verschiedenen Zelltypen, wie in Erythrozyten, Lymphozyten, Mastzellen, Zellen der Ovarien und des Hodens und noch einigen anderen Organen zu finden.

SCF (Stem cell factor) bindet an die ersten drei Immunglobulin-ähnlichen Regionen vom c-Kit-Rezeptor und dies führt zur Autophosphorylierung des Rezeptors am Tyrosin-Ende. Dies wiederum aktiviert verschiedene Signaltransduktionswege wie den PI3K/AKT Weg und den Ras/MEK/MAPK Weg (Blume-Jensen et al., 1998, Ueda et al., 2002), in den Thekazellen (TC) auch zwei Komponenten der MEK-Transduktionsweges (ERK 1/2) (Jin et al., 2005a).

7.2.4 Die Expression von KL und c-Kit im Ovar

Grobschematisch dargestellt findet die Expression von KL in den GC statt, die Expression von c-Kit hingegen in den TC und den Oozyten.

Abbildung 7.1 Expression von KL und c-Kit in dem Follikel



Wirkung von KL, welches in den Granulosazellen exprimiert, auf die umliegenden Kompartimente, welche den dazugehörigen Rezeptor c-Kit exprimieren
KL: Kit Ligand, Ooc: Oozyte, GC: Granulosazellen, TC: Thekazellen

Die Expression von KL findet in den Granulosazellen (GC) und in den Zellen des Oberflächenepithels statt (Maus (Huang et al., 1992, Manova et al., 1993, Huang et al., 1993), Rind (Parrott und Skinner, 1999), Schaf (Tisdall et al., 1997), Schwein (Brankin et al., 2004)).

Entgegen der früheren Annahme, dass c-Kit-Transkripte zwischen dem 13,5 und dem 17,5 Tag post coitum (day post coitum, dpc) bei der Maus nicht vorkommen (Manova et al., 1990), konnte man später durch Anwendung sensitiverer Methoden die Expression von KL und c-Kit mRNA in den primordialen Keimzellen (PGC, primordial germ cells) zwischen Tag 16,5 und 17,5 nachweisen (Doneda et al., 2002). Am Tag 18,5 pc ist die KL-Expression auf die somatischen Zellen im Mark des Ovars beschränkt (Doneda et al., 2002). Bei der Geburt ist die Expression von KL mRNA und dessen Protein in den medullären Bereichen des Ovars besonders hoch. Nach der Geburt ist die KL-Expression auf die GC beschränkt (Manova et al., 1993, Doneda et al., 2002).

c-Kit wird in primordialen Keimzellen, in den Thekazellen (TC) und in der Oozyte exprimiert (Maus (Huang et al., 1992, Manova et al., 1993, Huang et al., 1993), Rind (Parrott und Skinner, 1999), Schaf (Tisdall et al., 1997), Schwein (Brankin et al., 2004)). c-Kit mRNA liegt in hoher Konzentration in wandernden und mitotischen PGC vor. c-Kit mRNA ist aber in den PGC, die die ersten Stadien der Mitose I durchlaufen haben, nicht mehr vorhanden. Dies wurde sowohl bei der Maus (Manova et al., 1993) als auch beim Schaf gefunden (Clark et al., 1996). Die c-Kit Expression ist ab dem Diplotän-Stadium wieder zu beobachten (Maus (Manova et al., 1990, Doneda et al., 2002), Schaf (Clark et al., 1996)). Der Grund für diese Unterbrechung der Expression ist noch nicht aufgeklärt. Oozyten primordialer und späterer Follikel exprimieren alle c-Kit mRNA und das zugehörige Protein, aber auch hier sinkt die Expression wieder in antralen Follikeln (Clark et al., 1996, Tisdall et al., 1999). c-Kit mRNA und sein Protein werden ebenfalls in TC exprimiert (Rind (Parrott und Skinner, 1997), Maus (Kang et al., 2003)).

Wie schon bei der Struktur von KL erwähnt, kommt KL in zwei verschiedenen Isoformen vor, KL-1 und KL-2 (Huang et al., 1992). Das Verhältnis dieser beiden Isoformen variiert zwischen verschiedenen Geweben, verschiedenen Ovarien von Mäusen unterschiedlicher Alterskategorien so wie zwischen GC präovulatorischer und ovulatorischer Follikel (Huang et al., 1992, Manova et al., 1993, Ismail et al., 1997). Somit wird deutlich, dass die Expression der beiden Isoformen differenziert reguliert wird. Obwohl KL-1-defiziente Mäuse infertil sind, sind Mäuse, welche ausschließlich KL-2 produzieren fertil (Tajima et al., 1998). Daraus wird ersichtlich, dass KL-2 wahrscheinlich das wichtigere Element ist. Die Versuche von Thomas et al. (2005) haben gezeigt, dass eine niedrige Konzentration von FSH das Verhältnis von KL-1 zu KL-2 durch Erhöhung von KL-2

verändert. Dieser Effekt verbessert wiederum das Wachstum der Oozyten in Kultur (Thomas et al., 2005).

Die Expression von KL wird von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst. GDF-9 reguliert sehr wahrscheinlich die Expression von KL herunter, da die KLmRNA in Abwesenheit von GDF-9 erhöht ist (Elvin et al., 1999). Dieses Ergebnis stimmt mit der Aussage von Joyce et al. (1999) überein, dass in den GC der Maus die Expression von KL durch die Oozyte kontrolliert wird.

BMP-15 wirkt sich positiv auf die Expression von KL in GC-Kulturen der Ratte aus (Otsuka et al., 2002). Thomas et al., (2005), fanden weiterhin, dass die Expression der beiden Isoformen durch BMP-15 hochreguliert wird. Allerdings wirkte sich BMP-15 in diesem Versuch nicht auf das Verhältnis von KL-1 zu KL-2 aus.

FSH in niedriger Konzentration erhöht die Expression von KL-2 und somit das Wachstum der Oozyten. Eine hohe Konzentration von FSH hingegen erhöht das KL-1/KL-2 Verhältnis (Thomas et al., 2005).

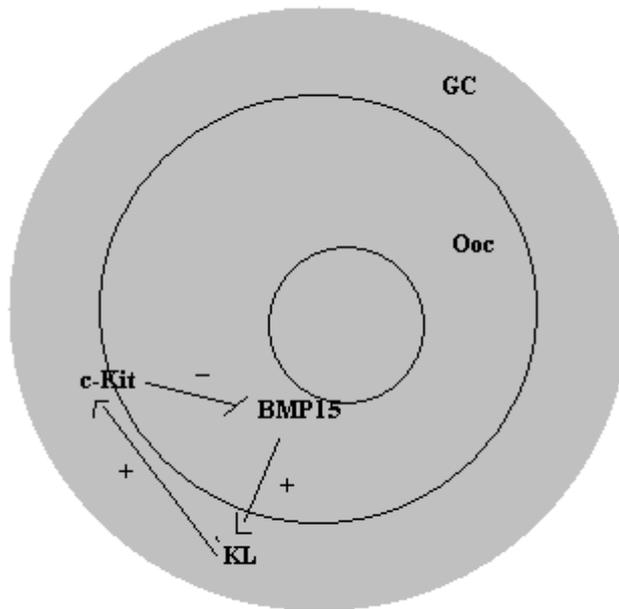
Diese Ergebnisse lassen eine Rückkopplungsschleife vermuten, bei der die FSH-stimulierte KL-Expression in einer Suppression von BMP-15 resultiert, welche wiederum eine Erhöhung der Expression des FSH-Rezeptors so wie eine Erhöhung der FSH-Sensitivität verursacht. Diese induziert dann die Expression von KL.

Tabelle 7.1 Faktoren, welche die Expression von KL beeinflussen

Faktor	Wirkung	Quelle
FSH	FSH in hoher Konzentration positiv auf das KL-1/KL-2 Verhältnis FSH in niedriger Konzentration negativ auf die KL-1/KL-2 Verhältnis	Thomas et al., 2003
GDF-9	Inhibiert die Expression von KL	Elvin et al., 1999
BMP-15	Stimuliert die Expression von KL Verändert allerdings nicht das Verhältnis von KL-1 zu KL-2	Otsuka et al., 2002 Thomas et al., 2005

FSH: Follikelstimulierendes hormon, GDF-9: Growth differentiation factor 9, BMP-15: Bone morphogenetic protein 15, KL-1 (-2): Kit ligand -1 (-2).

Abbildung 7.2



Negative Rückkopplungsschleife von KL und BMP-15.
KL: Kit ligand, BMP-15: Bone morphogenetic protein 15, GC: Granulosazellen, Ooc: Oozyte

7.2.5 Funktionen und Wirkungen von KL und c-Kit

7.2.5.1 KL und die primordialen Keimzellen (Primordial germ cells, PGC)

Die Bedeutung von KL und c-Kit bei der Migration der primordialen Keimzellen (primordial germ cells, PGC) und der Bildung der primordialen Follikel ist noch nicht völlig geklärt. KL und c-Kit werden dabei unterschiedliche Funktionen zugesprochen.

Im Embryo der Maus wird KL in den somatischen Zellen, die auf dem Migrationsweg der PGC lokalisiert sind, gefunden. Die Konzentration von KL nimmt zu, je näher man an zu den Keimleisten kommt (Keshet et al., 1991). Da die PCG Zellen c-Kit exprimieren, liegt die Vermutung nahe, dass die Interaktion von KL und c-Kit die Migration vermittelt. Diese Hypothese wird durch mehrere Studien an Mäusen mit Mutationen am Steel-Locus (Sl), welcher KL kodiert, gestützt: Bei diesen Mäusen migrieren die PGC an ektopische Stellen (McCoshen und McCallion, 1975). Migrationsdefekte sind ebenfalls bei einigen Mutationen des White Spotting-Locus (W, kodiert für c-Kit) zu finden. Zum Beispiel findet man in

W^c/W^c-Tieren Gruppen von Keimzellen im Dickdarm und die PGC migrieren langsamer (Buehr et al., 1993).

Die Abhängigkeit der PGC von KL ist je nach Migrationsphase unterschiedlich. So ist KL absolut notwendig für die Proliferation der PGC nach Verlassen des Mesenteriums, während es für die Proliferation auf dem Weg zum Darm nicht so wichtig ist (Matsui et al., 1991).

KL ist also für das Überleben und die Proliferation von PGC von großer Bedeutung und spielt in der Migration zu und der Kolonisation der Keimleisten eine zentrale Rolle (Fleischman, 1993). Relativ neu sind die Befunde, dass KL zusammen mit IGF-I und LIF (leukemia inhibiting factor) den Eintritt der PGC in die Meiose fördert (Lyraou et al., 2002), und die Aktivierung von c-Kit Rezeptor die Fas (Apoptosis-mediating surface antigen)-vermittelte Apoptose der PGC negativ reguliert (Sakata et al., 2003). Weiterhin scheint KL auch für die fetalen Oozyten von Bedeutung zu sein: die Co-Expression von KL und c-Kit in den Oozyten fetaler Mäuse lässt auf einen autokrinen Mechanismus des KL-c-Kit Systems in der Meiose und dem Überleben der fetalen Oozyten schließen (Doneda et al., 2002).

7.2.5.2 KL und der Primordialfollikel: Aktivierung und frühes Follikelwachstum

Die Aktivierung des Wachstums des primordialen Follikels zum Primärfollikel ist noch nicht völlig geklärt. KL und c-Kit sind zwei der wenigen bekannten Faktoren, die diesen Schritt fördern beziehungsweise beeinflussen. Der Nachweis, dass KL und c-Kit in der frühen Follikelentwicklung eine Rolle spielen, kommt aus Untersuchung nach Behandlung neonataler Mäuse mit dem c-Kit Antikörper ACK-2 (Yoshida et al., 1997). Daraus wurde deutlich, dass die KL/c-Kit Interaktion für die Aktivierung der primordialen Follikel, besonders in den ersten fünf Tagen post natum (p.n.) sehr wichtig ist. Die mit ACK-2-AK behandelten Mäuse zeigten eine Störung der initialen Follikelrekrutierung, eine Störung des Wachstums der primären Follikel, eine Störung der Antrumbildung, sowie mangelnde Granulosazellproliferation. Schon Parrott und Skinner (1999) haben durch Oozyten-Kulturen mit und ohne ACK-2 gezeigt, dass die Aktivierung der Primordialfollikel durch KL gefördert wird und dass KL zur Rekrutierung von Thekazellen aus den umliegenden Stroma-Zellen führt. Sie formulierten die Hypothese, dass KL nicht nur für das Follikelwachstum wichtig ist, sondern auch ausreicht, dieses zu induzieren, obwohl in vivo eine multifaktorielle Regulation wahrscheinlicher ist.

Nilsson et al., (2004) kamen zu dem Ergebnis, dass KL zusammen mit bFGF (basischer Fibroblast growth factor) am Übergang des primordialen zum primären Follikel beteiligt ist. Reynaud et al. (2000) haben gezeigt, dass KL direkt auf die Thekazellen wirkt. Sie fanden auch, dass KL eine wichtige Funktion für die Zellvermehrung, bei der thekalen Steroidogenese und der zytoplasmatischen Reifung der Oozyten besitzt.

Der Einfluss von KL auf die Reifung der Oozyten wurde schon mehrfach beschrieben (Packer et al., 1994, Klinger und De Felici, 2002). Die Oozyten wachsen in Gegenwart von KL deutlich. Die KL/c-Kit-Interaktion ist nicht nur für das Wachstum sondern auch für das Überleben der Oozyte von Bedeutung. Die Störung dieser Interaktion durch ACK-2 führt zum Absterben der Oozyte (Reynaud et al., 2000). Dieser Zusammenhang wurde in PGC, in Primordialfollikeln so wie in präantralen Follikeln nachgewiesen (Yoshida et al., 1997, Reynaud et al., 2000, Jin et al., 2005).

KL wirkt sich ebenfalls auf die Proliferation der Granulosazellen (GC) aus (Reynaud et al., 2000, Otsuka und Shimasaki, 2002). Da aber die GC selber nur KL produzieren und kein c-Kit exprimieren, muss ein anderes Signal an der Übermittlung beteiligt sein. Hierfür wurden schon einige Kandidaten vorgeschlagen, wie zum Beispiel GDF-9 oder BMP-15 (Otsuka und Shimasaki, 2002, Gilchrist et al., 2004).

KL hat ebenfalls eine wichtige Funktion bei der Antrumbildung, was durch Versuche mit ACK-2 belegt wird, in denen die Antrumbildung blockiert wurde (Yoshida et al., 1997, Reynaud et al., 2000).

Ebenfalls wichtig zu erwähnen ist, dass KL über die Proteine der Bcl-2 (Apoptose Regulator Bcl-2) Familie die Oozyten beeinflusst: KL reguliert die Expression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-cl hoch, während es die den pro-apoptotischen Faktor Bax (Bcl-2 assoziiertes X Protein) herunter reguliert (Yan et al., 2000, Jin et al., 2005b). Dies bewirkt ein verbessertes Überleben der Follikel.

7.2.5.3 KL und die späteren Stadien der Follikulogenese

In kleinen antralen Follikeln besteht ein Expressionsgradient der KL mRNA: Cumuluszellen zeigen eine deutlich höhere Konzentration von KL-1 und KL-2 als murale Granulosazellen (Ismail et al., 1996, Ismail et al., 1997). Ismail et al. (1997) haben weiter gezeigt, dass die Meiose der Oozyten blockiert ist, wenn diese mit KL kultiviert werden.

Andererseits kommt es zur Fortsetzung der Meiose, wenn man die Oozyten mit c-Kit AK kultiviert. Somit wird KL eine wichtige Rolle in der Meiose der Oozyten zugeschrieben.

Ausgereifte Oozyten inhibieren die KL-Expression in GC. Diese Wirkung soll durch GDF-9 vermittelt werden (Joyce et al., 2000). Eine weitere Regulationsschleife besteht zwischen der Oozyte und den somatischen Zellen: BMP-15 stimuliert die Expression von KL in den Granulosazellen, welches im Gegenzug die Expression von BMP-15 in der Oozyte herabreguliert (Otsuka und Shimasaki, 2002).

Beim Rind koordiniert KL zusammen mit dem Keratinocyte growth factor (KGF) und dem Hepatocyte growth factor (HGF) einige Granulosazell-Thekazell- Interaktionen, die in den späteren Phasen der Follikelentwicklung wichtig sind und vermitteln den wachstumsfördernden Effekt der Gonadotropine (Parrott und Skinner, 1998, Parrott und Skinner, 2000, Ito et al., 2001).

KL trägt zur Regulation der Androgenproduktion in den Thekazellen von antralen Follikeln bei (Maus (Reynaud et al., 2000), Rind (Parrott und Skinner, 1997), Schwein (Brankin et al., 2004)) und reguliert die mRNA- und Proteinexpression von SF-1, StAR und P450arom hoch (Jin et al., 2005c).

7.2.5.4 KL1 und KL2: Unterschiedliche Rollen bei der Follikulogenese

KL1 und KL2 werden in den verschiedenen Geweben und den verschiedenen Granulosazell-Populationen unterschiedlich exprimiert (Ismail et al., 1996, Ismail et al., 1997). Kawase et al. (2004) konnten zeigen, dass in Abwesenheit der löslichen Form von KL die membrangebundene Form zusammen mit dem Fibroblast growth factor (FGF) die PGC-Proliferation fördert, während (bei Anwesenheit der membrangebundenen Form) die lösliche Form die FGF induzierte PGC Proliferation hemmt. Somit können, in Abhängigkeit von dem KL1/ KL2-Quotienten die beiden Formen unterschiedliche Funktionen haben. Während die lösliche Isoform die Oberflächenexpression von c-Kit herabreguliert sowie die Proteolyse des Rezeptors fördert, erhöht die membrangebundene Form eher die Expression von c-Kit (Hutt et al., 2006).

7.2.5.5 KL und andere lokale Faktoren

Es gibt verschiedene andere lokale Faktoren, die die Expression beziehungsweise die Wirkung von KL beeinflussen. Zu diesen Faktoren gehören GDF-9, BMP-15, FGF, LIF, KGF und HGF. Die Beobachtung, dass GDF-9 die KL-Expression herunter reguliert stammt von Versuchen an GDF-9-defizienten Mäusen, die erheblich höhere KL-Expression aufwiesen als die Kontrollmäuse (Elvin et al., 1999). Durch Joyce et al. (2000) wurde bestätigt, dass GDF-9 die KL mRNA Expression in murinen GC inhibiert. BMP-15 stimuliert die KL-Expression, und KL reguliert BMP-15 über c-Kit herunter. Somit besteht durch BMP-15 und KL zwischen der Oozyte und den Granulosazellen eine negative parakrine Rückkopplungsschleife (Moore und Shimasaki, 2005, Thomas et al., 2005, Thomas und Vanderhyden, 2006). Joyce et al. (2000) fanden heraus, dass GC in Kultur zusammen mit noch reifenden Oozyten die KL-Expression erhöht, während GC in Kultur mit schon ausgereiften Oozyten die KL-Expression erniedrigt. Sie schlugen daher vor, dass reife Oozyten BMP-15 und ausdifferenzierte Oozyten GDF-9 sezernieren.

FGF (fibroblast growth factor) reguliert die Expression von KL hoch und unterstützt dessen Wirkung bei der Rekrutierung der TC. KL hat aber keinen Einfluss auf die bFGF-Expression. bFGF hat also eine direkte Wirkung durch die Aktivierung der GC-Mitose und eine indirekte Wirkung durch die Erhöhung der KL-Expression (Nilsson und Skinner, 2004).

Allerdings wirken KL und bFGF beim Übergang vom primordialen zum primären Follikel zusammen (Nilsson und Skinner, 2004).

LIF (leukemia inhibition factor) reguliert die Expression von KL in kultivierten GC hoch (Nilsson et al., 2002). KL, KGF und HGF haben synergistische Funktionen bei der Rekrutierung der Primordialfollikel. Sie bilden eine positive Rückkopplungsschleife zwischen den GC und den TC, was für die späteren Entwicklungsstadien des Follikel von Bedeutung ist (Nilsson und Skinner, 2001).

7.3 Hepatocyte growth factor, HGF

7.3.1 Hepatocyte growth factor, HGF, Struktur und Funktion

HGF wurde erstmals in Kulturen von Hepatozyten als ein mitogener Faktor nachgewiesen. HGF ist ein 87-kDa Protein, das aus einer α - und einer β -Untereinheit besteht. HGF spielt bei der Morphogenese verschiedener Gewebe und Organe eine Rolle. HGF ist ein lokaler Faktor, der vor allem von mesenchymal abgeleiteten Zellen produziert wird und als ein Mitogen für epitheliale Zellen wirkt. Der Rezeptor von HGF ist ein Produkt des c-met Protoonkogens und ist vorwiegend in den epithelialen Zellen lokalisiert (Parrott und Skinner, 1998a). Es existieren zwei Speißvarianten von HGF: NK1 (Baculovirus expressed HGF) und NK2 (naturally occurring HGF). Sie haben möglicherweise antagonistische Wirkung (Schwall et al., 1996).

Die ersten Ergebnisse zur zellulären Lokalisation von HGF zeigten, dass HGF in bovinen TC vorhanden ist, in bovinen GC aber nicht exprimiert wird (Parrott et al., 1994). Hinzu kam das Ergebnis, dass HGF in bovinen GC die Proliferation, nicht aber das TC-Wachstum fördert. Dies führte zum Modell der mesenchymal-epithelialen Wechselwirkung von HGF (Parrott et al., 1994, Ito et al., 2001). Neuere Ergebnisse machten allerdings deutlich, dass die Expression von HGF ebenfalls in den GC stattfindet und dass HGF sowohl die TC- als auch die GC-Funktion beeinflussen kann. So zeigten GC des Menschen, der Ratte und des Schweins eine HGF Expression in den GC (Zachow et al., 1997, Shimizu et al., 2003a, Uzumcu et al., 2006). Diese Ergebnisse bei der Ratte und beim Schwein stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen beim Rind (Parrott et al., 1994). Eine Behandlung von GC der Ratte mit eCG (equines Choriogonadotropin) induziert eine Reduktion der HGF Expression in den GC und eine Erhöhung der Expression in den TC (Uzumcu et al., 2006).

Die Vorstellung der Bildung von HGF und HGFR in den Granulosazellen wurde dahingehen erweitert, dass vor kurzem gezeigt werden konnte, dass die Expression von HGF einer hormonellen Einflüssen unterliegt und somit in beiden Kompartimenten (GC und TC) exprimiert werden kann (Uzumcu et al., 2006, Zachow und Uzumcu, 2007).

In TC fungiert HGF als ein Modulator der Steroidogenese. Nach Zachow et al. (1997) supprimiert HGF die LH-abhängige Sekretion von Androsteron und blockiert die Expression des für die Umwandlung von Pregnenolon in Androsteron zuständigen Enzyms P450c17.

Weiterhin fanden die gleichen Autoren, dass die basale so wie die LH-induzierte Produktion von Progesteron ansteigt, ohne dass jedoch die Expression der Enzyme 3 β -HSD und P450scc betroffen sind. Allerdings sind die Effekte von HGF in den TC nicht allein auf die Steroidogenese beschränkt. So ist HGF Teil einer positiven Rückkopplungsschleife. HGF stimuliert in den GC die Expression von KL, welches sich wiederum auf die TC auswirkt und deren Proliferation so wie deren Expression von HGF positiv beeinflusst (Parrott und Skinner, 1998b, Parrott und Skinner, 2000). Ein ähnliches System wurde in TC und GC des Menschen gefunden (Ito et al., 2001).

Die Wirkung von HGF besteht vor allem in einer Erhöhung der Proliferation der GC, einhergehend mit einer verminderten Differenzierung. Beim Menschen wirkt sich HGF negativ auf die Produktion von Progesteron aus (Ito et al., 2001). Dieser negative Einfluss findet bei der Ratte nicht statt (Zachow und Woolery, 2002). Beim Rind senkt HGF die hCG induzierte Progesteron-Produktion (Parrott und Skinner, 1998a). Weiterhin hemmt HGF die Aromatisierung von Androgen zu Östrogen in den GC, welche durch FSH und IGFI induziert wird (Zachow und Woolery, 2002). HGF übt hier seine Wirkung durch Blockierung eines oder mehrerer Schritte der Östrogen-Synthese aus (Parrott und Skinner, 1998a, Zachow et al., 2000). Der suppressive Effekt von HGF scheint von dem Reifestadium der GC abhängig zu sein. (Zachow und Woolery, 2002, Zachow und Uzun, 2007).

Zu dem Einfluss verschiedener Hormone auf HGF ist bekannt, dass LH und LH-Agonisten wie cAMP die Expression von HGF mRNA in TC erhöhen, wie durch Versuche von TC-Kulturen bekannt wurde (Parrott und Skinner, 1998a). Östrogen hingegen scheint keinen Einfluss auf die Expression von HGF mRNA zu haben. Es bleibt allerdings zu klären, ob nicht in anderen Zyklusstadien Östrogen doch einen Einfluss auf die HGF mRNA Expression aufweist. Die HGF mRNA Expression in den GC wird in kleinen aber nicht in mittleren und großen antralen Follikeln als Antwort eCG (equines Choriogonadotropin) erhöht (Shimizu et al., 2003b).

7.3.2 HGFR

HGFR, auch c-met, wird vor allem in den GC von kleinen präantralen Follikeln exprimiert und spielt dort eine wichtige Rolle bei der HGF-HGFR-Interaktion (Zachow et al., 1997). Allerdings ergaben spätere Untersuchungen, dass HGFR ebenfalls in den TC exprimiert wird (Uzun et al., 2006). Diese Expression des Rezeptors in den TC erfolgte auch hier nach Zugabe von eCG und bewirkte einen Shift der Expression von HGFR von den

GC zu den TC. Somit werden in kleinen preantralen Follikeln die HGFR vermehrt in den GC exprimiert und in großen antralen Follikeln hingegen eher in den TC (Uzumcu et al., 2006, Zachow und Uzumcu, 2007). Damit scheint nachgewiesen, dass die Expression von c-met im Laufe der Follikulogenese hormonell reguliert wird.

Wie auch schon bei HGF nimmt die Konzentration der HGFR Expression in großen antralen Follikeln im Vergleich zu kleineren Follikeln zu (Parrott und Skinner, 1998a).

HGFR wird vor allem in den GC exprimiert und bildet somit zusammen mit HGF ein lokales parakrines System, das an der Proliferation der GC und somit am Follikelwachstum beteiligt ist (Uzumcu et al., 2006). Wie auch schon bei HGF wird HGFR bei isolierten bovinen Follikeln vermehrt in den großen antralen Follikeln exprimiert, und ist somit zusammen mit HGF an der erhöhten Proliferationsrate der GC beteiligt. Hinzu kommt, dass die Expression von c-met die Ansprechbarkeit der Zellen auf HGF erhöht.

Die Suppression der Östradiol-Produktion durch HGF sollte reversibel sein, um die präovulatorische Erhöhung von Östradiol zu ermöglichen. Dies könnte durch drei verschiedene Mechanismen erreicht werden:

- Herabregulierung von HGF
- Herabregulierung der HGFR
- Unterbrechung der post-c-met-Signaltransduktion

Die Untersuchungen von Zachow et al. (2000) haben ergeben, dass c-met noch von FSH, HGF und cAMP reguliert wird. Es wird daher postuliert, dass mehrere Mechanismen an der Veränderung der c-met Expression beteiligt sind. Wahrscheinlich ist, dass diese zum Teil von HGF selber induzierte Herabregulation von c-met eine Blockierung der E2-Synthese in GC verhindert. HGF ist, zusammen mit seinem Rezeptor Teil eines komplexen Mechanismus, der die frühe Synthese und Sekretion von E2, an der FSH, TGF β und IGF-I beteiligt sind, verhindert und dennoch die präovulatorische Sekretion ermöglicht.

7.3.3 Aktivatoren und Inhibitoren von HGF

Eine andere Komponente des HGF Systems ist der HGF-Aktivator (HGFA). HGFA ist eine Serin-Protease, welche die Vorstufe von HGF spaltet und zu dem reifen HGF führt. HGFA ist in vielen Geweben, in denen HGF exprimiert wird, vorhanden. Es wird vermutet, dass HGFA Kontrolle auf die HGF-Expression ausüben könnte.

Über die Expression von HGFA im Follikel ist noch recht wenig bekannt. Bei der Ratte kommt HGFA bei präantralen Follikeln in den TC und GC vor, nicht aber in der Oozyte. Das gleiche Expressionsmuster wurde auch in kleinen antralen Follikeln gefunden. Große antrale Follikel wiesen hingegen keine Expression von HGFA in GC mehr auf (Uzumcu et al., 2006, Zachow und Uzumcu, 2007).

Kürzliche wurde eine weitere Komponente des HGF-Systems identifiziert, HAI oder HGFA Inhibitor Protein (Shimomura et al., 1997). Die Wirkung von HAI besteht, wie sein Name schon verrät, in der Blockierung von HGFA. Bis jetzt sind aber weder der genaue Wirkungsmechanismus noch der Ort seiner Expression im Ovar bekannt.

7.4 Keratinocyte growth factor (KGF)

KGF oder Keratinocyte Growth Factor (FGF-7) ist ein Mitglied der FGF-Familie. Er ist zusammen mit HGF und KL an einer Feedbackschleife beteiligt (Parrott and Skinner, 1998c) und wird daher zusammen mit HGF in einem Kapitel behandelt. KGF hat ein Molekulargewicht von 28 kDa. Er wurde als wichtiger Faktor bei der Bildung von antralen Follikel identifiziert (Bottaro et al., 1990, Berisha et al., 2004). KGF wird von den TC produziert (Parrott et al., 1994), wirkt auf die Granulosazellen und fördert dort die Expression von KL, welches wiederum in einer positiven Rückkopplungsschleife auf die TC wirkt (Parrott und Skinner, 1998b). KGF vermittelt daher mesenchymal-epitheliale-Zell-Interaktionen in vielen Geweben. Außer dem Ovar sind hier unter anderem das Endometrium, die Blase und die Haarfollikel zu nennen (Parrott et al., 1998b). Die Expression von KGF wird durch Hormone wie Androgene, Progesteron und Glukokortikoide reguliert (Koji et al., 1994, Chedid et al., 1996, Fasciana et al., 1996).

Der KGF-Rezeptor (KGFR) ist eine Spleißvariante des FGFR-2, und ist primär auf epithelialen Zellen lokalisiert. Zusammen mit früheren Befunden, dass KGF das Wachstum der GC stimuliert (Parrott et al., 1994), deutet dies darauf hin, dass KGF wie auch HGF an der Proliferation der GC beteiligt ist. Allerdings sind noch weitere Untersuchungen nötig um zu klären, ob die Expression von KGF-Protein ebenfalls einer entwicklungsbedingten Regulation unterliegt.

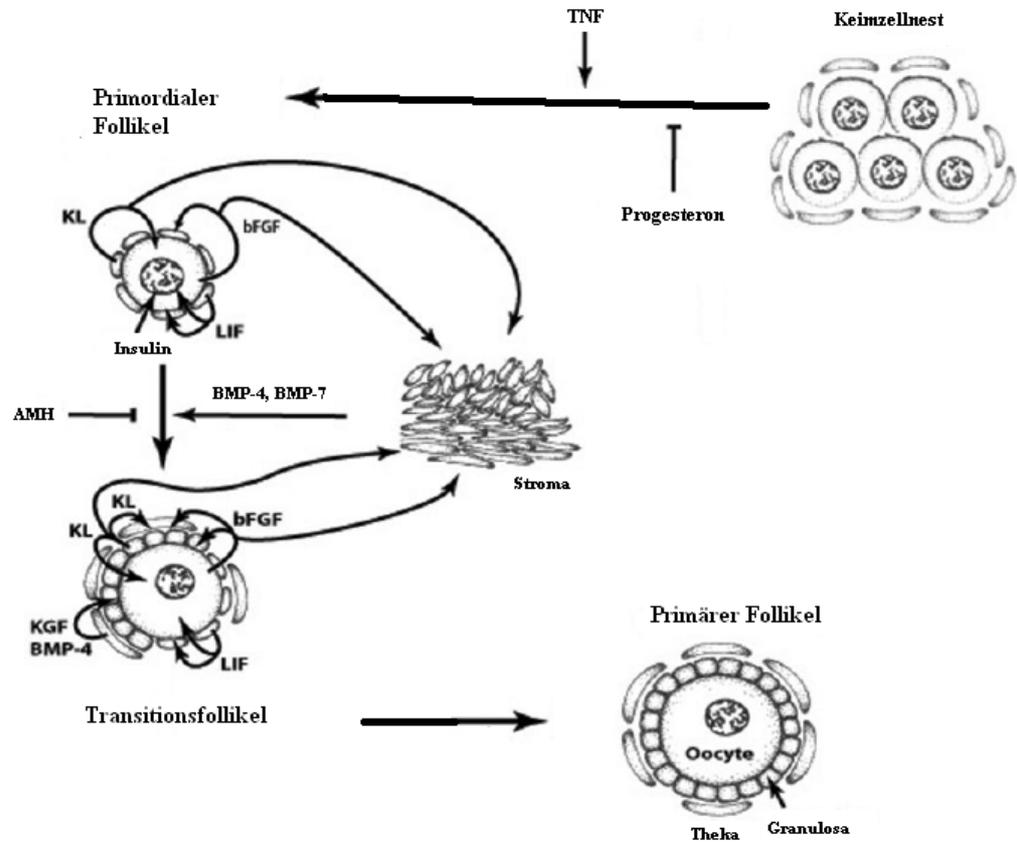
KGF wird schon in mesenchymalen TC-Vorläuferzellen exprimiert und beteiligt sich somit an der Primordial- zu Primärfollikeltransition. Hier ist KGF in einer positiven Rückkopplungsschleife mit KL involviert: GC primordialer Follikel produzieren KL, welches auf die mesenchymalen Zellen wirkt, und die Rekrutierung der TC fördert. Diese wiederum

produzieren KGF, welches auf die GC wirkt und die Wirkung von KL verstärkt, die GC-Proliferation fördert und damit die Entwicklung der Primordialfollikel induziert (Kezele et al., 2005). BMP-4 wird ebenfalls in mesenchymalen Vörläufern der TC exprimiert. Ob diese beiden Faktoren eine Kolokalisation aufweisen, ist noch nicht bekannt.

Die Wirkung von KGF beruht vor allem in einer Stimulation der GC und in der Induktion der Primordial- zu Primärfollikel-Transition (Kezele et al., 2005). KGF ist zusammen mit KL an einer positiven Rückkopplungsschleife beteiligt, welche sich positiv auf die Follikeltransition auswirkt. Interessanterweise ist festgestellt worden, dass KL-Antikörper die KGF-Wirkung auf die Follikeltransition nicht beeinflussen. Das weist darauf hin, dass KGF über einen KL-unabhängigen Mechanismus den Follikelübergang bewirkt. KGF hat damit zwei Wege über den es die Follikeltransition beeinflusst, einmal über eine Erhöhung der KL-Expression, und zweitens über einen KL-unabhängigen Mechanismus (Kezele et al., 2005). Weiterhin stimuliert KGF die Proliferation bei gleichzeitiger Hemmung der GC-Differenzierung. Östrogen und LH stimulieren das Follikelwachstum über KGF indirekt, was zur Vorstellung führte, dass KGF ein Östromedin (ein lokaler Mediator der Östrogen Aktion) im Follikel sein könnte. Damit dürften Hormone das Follikelwachstum über Erhöhung der lokalen Produktion von Wachstumsfaktoren regulieren. Als weitere Indizien für eine KGF mediierte Hemmung der GC-Differenzierung sind folgende Befunde zu nennen: KGF reduziert sowohl den basalen als auch den Hormon-spiegel der Aromatase- und der Progesteron-Produktion.

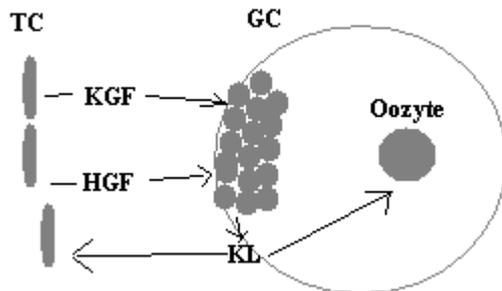
Neben dem Einfluss und der Wirkung auf die GC scheint KGF, zusammen mit HGF, noch erhebliche Wirkung auf die Follikelreifung, speziell auf die Oozyten-Reifung zu besitzen. So unterstützen die Untersuchungen von Parrott und Skinner (1998) die Annahme, dass HGF und KGF, über eine Regulierung der KL-Expression in den GC, indirekt die Funktion der Oozyte regulierten.

Abbildung 7.3



Wirkung von KGF und HGF während des Primordial-Primärfollikel-Überganges.
 TNF: Tumor nekrose Faktor, KL: Kit Ligand, bFGF: basic fibroblast growth factor, LIF: Leukemia inhibiting factof, BMP: Bone morphogenetic protein, KGF: Keratinocyte growth factor

Abbildung 7.4



Schematische Darstellung der Theka-Granulosa-Zell Interaktionen während der Follikelentwicklung
 GC: Granulosazellen, TC: Thekazellen, KGF: Keratinocyte growth factor, HGF: Hepatocyte growth factor, KL: Kit Ligand

7.5 Fibroblast growth factor Familie

7.5.1 Fibroblast growth factor (FGF)

Die „Fibroblast-Growth-Factor“- Familie oder FGF Familie besteht mindestens aus 22 Mitgliedern, die alle ein Molekulargewicht zwischen 17 und 34 kDa aufweisen. Die Gemeinsamkeiten dieser Mitglieder basiert auf einer hohen Affinität für Heparin und für Heparin-like Glykosaminoglykane (HLGAGs), sowie auf einer ähnlichen Struktur im zentralen Bereich der Moleküle, der aus 140 AS besteht.

Die Rezeptoren für die FGFs bestehen aus 4 der Familie der Tyrosin-Kinasen Familie zugehörigen Rezeptoren. Sie binden alle die verschiedenen FGFs mit unterschiedlicher Affinität (Partanen et al., 1993, Ornitz et al., 2001). Alle FGFR bestehen aus einer extrazellulären Liganden bindenden Domäne, einer transmembranären Domäne und einer intrazellulären Tyrosin-Kinase-Domäne.

Die Bindung eines Liganden führt zur Dimerisation der Rezeptoren und anschließend zu einer Aktivierung des Ras/Mapk-Signaltransduktionsweges.

Die FGFs sind an unterschiedlichen biologischen Prozessen beteiligt und vermitteln mitogene, chemotaktische so wie angiogene Aktivitäten. Sie wurden von Gospodarowicz und Thakral (1978) zusammen mit den VEGF als Hauptfaktoren der ovariellen Angiogenese ermittelt. Außer am Ovar sind die FGFs lokal wirkende Faktoren im Knochen, im Endometrium, im Epithel und vielen weiteren Geweben. Als bedeutende Faktoren treten die FGFs besonders bei der Wanderung der PGC auf. Sie werden während der Migration der PGC von den umliegenden Zellen sezerniert und wirken daher parakrin auf die PGC. Sobald aber diese in die Gonaden eingetreten sind, sezernieren die PGC diese beiden Faktoren (FGF-1 und FGF-2) selbst und somit wirken diese dann autokrin (Kawase et al., 2004). FGF-17 scheint ebenfalls an der Entwicklung der PGC beteiligt zu sein. Dieser Faktor wird ebenfalls nicht von den PGC selbst exprimiert sondern von den umgebenden Zellen.

Sobald die PGC in den Gonaden angelangt sind, sezernieren sie auch FGF-4 und FGF-8. Somit ist die FGF-Familie sowohl an der parakrinen Signalinduktion während der Migration sowie an der Proliferation der PGC nach Eintritt in die Gonaden beteiligt (Kawase et al., 2004).

Die für die postembryonale ovarielle Entwicklung bedeutendsten Faktoren sind: FGF-1 (acid FGF, aFGF), der FGF-2 (basic FGF, bFGF) sowie der FGF-7 (KGF). Sie haben unter anderem Bedeutung als potentielle angiogene Faktoren, sowohl des reifenden Follikels als auch nach der Ovulation bei der Entstehung des C.I.

7.5.2 Fibroblast growth factor 1

Wie auch schon bei FGF-7 beschrieben, wird FGF-1 (acid FGF, aFGF) ebenfalls in unterschiedlichsten Geweben exprimiert, unter anderem in der Niere, im Muskel, im Larynx und im Endometrium. Im Ovar wird FGF-1 vor allem in glatten Muskelzellen der Gefäße exprimiert und ist anti-apoptotisch wirksam (Carmeliet, 2000).

FGF-1 mRNA wurde in dem Ovar der Ratte (Koos und Olson, 1989), des Schafes (Jablonka-Shariff et al., 1997) und des Rindes (Zheng et al., 1993) nachgewiesen.

FGF mRNA ist vor allem in dem Zytoplasma glatter Muskelzellen der Gefäße und der GC lokalisiert (Berisha et al., 2004). Die FGF mRNA Expression ist in TC relativ hoch und in GC viel niedriger. Es wurden keine Konzentrationsveränderungen in beiden Kompartimenten im Verlauf des abschließenden Follikelwachstums beobachtet. Da die Expression von FGF-1 im Verlauf der Follikelentwicklung konstant ist, übt der Faktor wahrscheinlich keine direkte Wirkung auf die Rekrutierung und die Selektion der Follikel aus (Berisha et al., 2004). Die Expression von FGF mRNA nimmt erst in der frühen C.I. Phase zu, in einer Zyklusphase in der die Angiogenese von großer Bedeutung ist (Berisha et al., 2006). Daher ist FGF-1 wahrscheinlich ein wesentlicher Faktor bei der Angiogenese zu Beginn der C.I. Bildung. Er dürfte aber keine große Rolle bei der Angiogenese in den TC bei der Follikelreifung spielen. FGF-1 ist im Vergleich zu FGF-2 und FGF-7 nicht besonders Rezeptor-spezifisch und kann alle FGFR-Varianten binden (Berisha et al., 2004).

7.5.3 Fibroblast growth factor 2

FGF-2 (basic FGF, bFGF) ist ebenfalls ein Mitglied der FGF-Familie. Von ihm gibt es mehrere Isoformen. Die 18 kDa Isoform ist vor allem im Zytoplasma vorhanden während die vier größeren Isoformen (22, 22,5, 24 und 34 kDa) vor allem in Kern lokalisiert sind.

FGF-2 besitzt viele verschieden wichtige Funktionen. Bei der Entwicklung der Primordialfollikel und somit beim Beginn der Follikulogenese fördert bFGF, wie auch schon KL, die Follikelentwicklung. Allerdings sind die Effekte von KL und bFGF nicht additiv (Nilsson et al., 2001). Somit resultiert die Behandlung von Ovarien mit bFGF in einer

Abnahme der Primordialfollikel verbunden mit einer Zunahme der Primärfollikel. Der bFGF, sowie auch KL, gehören zu den ersten Faktoren, bei denen gezeigt wurde, dass sie die Entwicklung der Primordialfollikel fördern (Nilsson et al., 2001). Diese Ergebnisse stammen aus Untersuchungen bei der Ratte und beim Rind. Die Beteiligung von bFGF an der Initiation der Follikelentwicklung wurde ebenfalls bei der Ziege nachgewiesen (Matos et al., 2007).

bFGF beeinflusst bei Primärfollikeln verschiedene Zelltypen. So wirkt bFGF auf das Wachstum der GC, der TC, der Stromazellen positiv. Desweiteren sind hohe Konzentrationen an bFGF in den Oozyten der frühen Follikelstadien zu finden. Diese hohen Konzentrationen lassen vermuten, dass das aus den Oozyten stammendes bFGF das Wachstum der Stroma-, Granulosa-, und Thekazellen positiv beeinflusst. Diese Ergebnisse wurden vor allem in Zellkulturen des Rindes gewonnen (Nilsson et al., 2001).

Untersuchungen von Berisha et al. (2004) an bovinen Follikeln, haben nur sehr schwache mRNA Expression und keine Protein-Expression von bFGF in GC gezeigt. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit früheren Ergebnissen bei der Ratte (Koos und Olson, 1989), in denen FGF mRNA keine signifikante Konzentration in GC präovulatorischer Follikel aufweist, aber stark in TC und interstitiellen Zellen exprimiert wird. In bovinen GC in vivo wurde keine Expression von FGF mRNA gefunden aber in Zellkulturen von bovinen GC präantraler und antraler Follikel wird FGF-2 produziert (Neufeld et al., 1987, Stirling et al., 1991). Dies beruht entweder auf dem Effekt von Luteinisierung der GC oder GC produzieren FGF-2 nur in Zellkultur. Berisha et al. (2004) haben gezeigt, dass die Expression von FGF mRNA in der TI während der abschließenden Wachstumsphase stark steigt, vor allem in den Kapillaren der TI. Diese Ergebnis deutet auf eine autokrine Funktion von FGF-2 und eine starke angiogene Aktivität hin, die vor allem das weitere Wachstum des DF beim Rind fördern könnte (Berisha et al., 2000). Zusätzlich reguliert FGF-2 die Expression für VEGFR-2 mRNA herauf und verstärkt somit die angiogene Aktivität von VEGF (Pepper et al., 1998).

7.6 TGF- β -Superfamilie

7.6.1 Einleitung TGF- β -Familie

Die TGF- β -Familie besteht aus mehreren Wachstumsfaktoren und ist maßgeblich an der Regulierung der ovariellen Entwicklung und Funktion beteiligt. Sie besteht aus mehr als 35 strukturell verwandten Mitgliedern. Auf der Basis zusätzlicher Kriterien wurden die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie in mehrere Subfamilien eingeteilt:

- die TGF- β -Subfamilie (besteht aus TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3)
- die große BMP-Subfamilie (Bone Morphogenetic Protein), mit mehr als 20 Mitgliedern.
- die Gruppe der GDF (Growth and Differentiation Factors), mit mindestens neun Mitgliedern.
- die Activin/Inhibin Subfamilie (beinhaltet Activin A, AB, B, Inhibin A, B)
- die GDNF (Glial cell-derived neurotrophic factor)-Subfamilie (beinhaltet GDNF, Artemin und Neurturin).
- so wie einige zusätzliche Mitglieder, wie AMH (Anti-Muellerian Hormone, auch MIS, Muellerian-inhibiting Substance) und Nodal.

Die Gruppe der BMP Proteine wurde ursprünglich als am Knochengewebe wirksame Proteine angesehen. Es handelt sich hierbei um Proteine, die eine Homologie zeigen.

Tabelle 7.2 Auflistung der Mitglieder der TGF- β -Familie

TGF β 1, 2, 3
GDF-1, -3, -5 (CDMP1), -6 (BMP13), -7(BMP12), -8, -9, -9B (BMP15), -10 (BMP3B), -14 und -15 (MIC1)
BMP-2, -4, -5, -6, -7 (OP1), -8 (OP2-Mensch), -8a (Maus), -8b (Maus), -9, -10, -11 und -16 (Nodal)
AMH/MIS
Inhibin α
Activin $\beta\alpha$, $\beta\beta$, $\beta\gamma$ und $\beta\epsilon$
Lefty 1 und 2
GDNF
Neurturin, Persephin und Artemin

TGF: transforming growth factor, GDF: growth and differentiation Factor, CDMP: cartilage-derived morphogenetic proteins, MIC: MHC class I chain-related, OP: ovine prolactin, AMH/MIS: anti-muellerian hormone/ Muellerian inhibiting substance, GDNF: glial-cell-derived neurotrophic factor

Tabelle 7.3 Alternative Namen für die BMP-Familie

Ligand	Alternativer Name
BMP-2	BMP-2A
BMP-3	Osteogenin
BMP-3b	GDF-10
BMP-4	BMP-2b
BMP-6	Vgr-1
BMP-7	OP-1
BMP-8a	OP-2
BMP-8b	OP-3
BMP-9	GDF-2
BMP-12	GDF-7, CDMP-3
BMP-13	GDF-6, CDMP-2
BMP-14	GDF-12
BMP15	GDF-9B
BMP-16	Nodal
GDF-3	Vgr-2
GDF-5	CDMP-1
GDF-15	PLAB, MIC-1, PDF, PTGF- β
MIS	AMH

Vgr: Vg-related Protein, MIC: Macrophage inhibiting Cytokine, PTGF- β : placental TGF- β , BMP: Bone morphogenetic protein, GDF: Growth differentiation factor, CDMP: cartilage-derived morphogenetic proteins, MIC: Macrophage inhibitory cytokine, PLAB: Placental bone morphogenic protein, PDF: Prostate differentiation factor, OP: Ovine prolactin

Die strukturelle Gemeinsamkeit der Mitglieder dieser Familie ist das Vorkommen von sieben Cysteinresten, die an der drei-dimensionalen Struktur der Moleküle wesentlich beteiligt sind. Das vierte Cystein, welches nicht wesentlich zur drei-dimensionalen Struktur beiträgt, ist an der Bildung von Disulfid-Brücken beteiligt, was zur Bildung von Dimeren führt. Die Bildung der Dimere ist für die biologische Aktivität der Moleküle von großer Bedeutung. Interessanterweise führt die Co-Expression von BMP-2, -4, -5, -6, und 7 zu der Bildung von Heterodimeren. Diese Heterodimere besitzen teilweise eine größere biologische Aktivität als die Homodimere (Aono et al., 1995, Israel et al., 1996). Interessanterweise besitzen BMP-15 und GDF-9 nur sechs der ansonsten sieben vorhandenen Cysteinen. Beiden fehlt das vierte, normalerweise für die Disulfid-Brückenbildung verantwortliche Cystein (Dube et al., 1998). Diese ungewöhnliche Struktur wirft die Frage auf, ob BMP-15 und GDF-9 als Monomere oder als nicht-kovalent verbundene Dimere existieren. Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass BMP-15 und GDF-9 in der Tat in der Lage sind, Dimere zu bilden (Liao et al., 2003). Allerdings ist die Bedeutung der Dimerbildung für die biologische Aktivität noch unklar.

Alle Mitglieder der TGF β -Familie werden als Prä-Protein synthetisiert und werden nach anschließender enzymatischer Spaltung zum reifen Protein. Allerdings erfolgt die

enzymatische Spaltung der Mitglieder der TGF β -Familie erst nach ihrer Dimerisation. Die Sekretion erfolgt erst nach Dimerisation und Abspaltung der Pro-Region (Hogan, 1996).

Mitglieder der TGF β -Familie vermitteln ihre biologische Wirkung über Serin-Threonin-Kinasen und intrazellulären Smad Proteinen (Findlay et al., 2002). Untersuchungen des Signaltransduktionsmechanismus der Mitglieder der TGF β -Familie ergab, daß die meisten Mitglieder ähnliche Wege der Signaltransduktion verwenden, die verwandte Rezeptoren sowie Smads involvieren. Die Rezeptoren der TGF β -Familie beinhalten fünf Typ II Rezeptoren (RII) und sieben Typ I Rezeptoren (RI), auch bekannt als ALK oder Activin-like receptor Kinase 1-7. Die Smad-Familie besteht aus mehr als acht Mitgliedern (Findlay et al., 2002). Die Vorstellung, wie die biologische Aktion abläuft, soll am Beispiel des Activins dargestellt werden:

Der Ligand bindet an seinen Typ II R, welcher dann den RI rekrutiert. Diese Komplexbildung führt zu Phosphorylierung des RI durch den RII. Dieses Signal wird dann durch Phosphorylation auf Smad 2 oder Smad 3 übertragen. Die Phosphorylierung dieser Smads induziert ihre Bindung zu Smad 4. Der Smad-Komplex kann dann in den Zellkern eintreten und die Transkription der Activin-responsiven Gene aktivieren (Findlay et al., 2002). Dieses Schema trifft auch auf TGF β zu. Dieses Modell wurde durch die Tatsache unterstützt, dass weder TGF β noch Activin eine Affinität für den Typ-I-Rezeptor allein aufweisen (Attisano et al., 1993). Das Modell der Oligomerisation der BMP-Rezeptoren ist noch nicht vollständig geklärt und es scheint von dem Activin- und TGF β -Modell abzuweichen. Diese Überlegung basiert auf der Tatsache, dass die BMP-Liganden kaum eine Affinität für BMPRII und eher eine Affinität für den Typ I Rezeptor aufweisen. Dabei scheinen zwei Alternativen in Betracht zu kommen: Zum einen könnten BMPRII und der Typ I Rezeptor zusammenwirken und einen hoch-affinen Komplex für die BMP-Liganden bilden. Eine zweite Möglichkeit wäre, dass die BMP-Liganden zuerst an den Typ-I Rezeptor binden und erst danach erfolgt die Rekrutierung des BMPRII. Wenn die zweite Hypothese zuträfe, wäre die BMP-Rezeptor-Liganden-Bindung der von Activin und TGF β unterschiedlich (Liu et al., 1995, Moore et al., 2003).

Durch die Rezeptor-Liganden Bindung wird eine Reihe intrazellulärer Signalproteine, sogenannter Smads, transphosphoryliert (Findlay et al., 2002). Die spezifischen Smadproteine, die durch die Rezeptor-Liganden-Bindung aktiviert werden sind R-Smads (Rezeptor-Smads). Zu dieser Gruppe gehören Smad 1, 2, 3, 5 und 8. Die aktivierten R-Smad bilden mit einem anderen Molekül, dem Smad 4, welcher ein gemeinsamer Partner für alle Smads

darstellt und auch als co-Smad (common-Smad) genannt wird, einen Komplex bildet. Dieser Komplex tritt in den Zellkern ein, wo er anschließend die Transkription verschiedener Zielgene auslöst. Der Smad-Transduktionsweg kann durch inhibitorische Smads (Smad 6 und 7) gehemmt werden (Findlay et al., 2002). Wie in der Tabelle 7.4 zu sehen, führen unterschiedliche Liganden zu der Aktivierung verschiedener Smad-Proteine. So wird das intrazelluläre Signal von Activin und TGF β über Smad 2 und 3 vermittelt, während die meisten BMP Liganden Smad 1, 5 und 8 aktivieren (Findlay et al., 2002).

Obwohl klar erscheint, dass je nach BMP-Ligand andere Smads aktiviert werden, ist bis jetzt wenig über die genaue Rolle der verschiedenen Smad-Proteine bekannt (Miyazono et al., 2001). Trotz der Tatsache, dass die meisten Untersuchungen der BMP-Signaltransduktion sich vor allem mit Smad-transduktionswegen beschäftigt haben, gibt es mittlerweile einige Anhaltspunkte die belegen, dass auch andere Signaltransduktionswege bei der BMP-Wirkung involviert sein können (Iwasaki et al., 1999, von Bubnoff und Cho, 2001). So scheinen Mitglieder der MAPK Familie (ERK1/2, p38, Jun-N) hier ebenfalls eine Rolle zu spielen und mit dem Smad-Transduktionsweg zu interagieren (Yamaguchi et al., 1995, Nakamura et al., 1999).

Tabelle 7.4 Liganden, Rezeptoren der TGF β -Mitglieder und ihre Smads

Ligand	Typ II Rezeptor	Typ I Rezeptor	R-Smad	I-Smad	Co-Smad
TGF β	T β RII	ALK5 (T β RI) ALK1	2 oder 3	7	4
Activin	ActRIIA ActRIIB	ALK4 (ActRIA)	2 oder 3	7	4
BMP	BMPRII ActRIIA ActRIIB	ALK2 (ActRIA) ALK3 (BMPRIA) ALK6 (BMPRII)	1,5 oder 8	6	4
AMH	AMHRII	ALK2 (ActRIA) ALK6 (BMPRII)	1,5 oder 8	6	4

Modifiziert nach Findlay et al.,(2002),

ALK 1-6: Activin-receptor like Kinase 1-4
 ActRIA: Activin Rezeptor Typ IA
 BMPRI, BMPRII: BMP Rezeptor Typ I, II
 T β RI, II: TGF β Rezeptor Typ I, II

Die Rolle der TGF β -Mitglieder im Ovar ist vielfältig und umfasst die Stimulierung verschiedener Zellfunktionen wie Proliferation, Differenzierung, Adhäsion, Motilität und Apoptose (Findlay et al., 2002).

Die wichtigsten Mitglieder dieser Familie sind: BMP-2, BMP-4, BMP-8b, BMP-7, GDF-9, BMP-15, BMP-6, Activin, Inhibin, TGF β so wie MIS/AMH.

Activin und Inhibin wurden bereits in Kapitel 5 beschrieben.

7.6.2 BMP-2

BMP-2 ist einer von ungefähr zwanzig BMP-Mitgliedern und ist von besonderer Bedeutung bei der Bildung des Neuralrohres und besitzt ebenfalls osteoinduktive Fähigkeiten (Ying und Zhao, 2001).

BMP-2 besitzt über 90% Sequenz-Homologie zu BMP-4, aber BMP-2 wird später als BMP-4 exprimiert (Ying und Zhao, 2001). Studien an heterozygoten Mäusen haben gezeigt, dass die Wirkungen von BMP-2 und BMP-4 additiv sind (Ying und Zhao, 2001).

Die Rezeptoren für BMP-2 sind als Typ II Rezeptor der BMPRII und als Typ I Rezeptor die ALK3/ALK6 (Vitt et al., 2002, Juengel et al., 2006a). Wie auch bei den anderen TGF β -Familienmitgliedern bilden diese beiden Rezeptor-Typen Dimere und aktivieren anschließend Smads (hier Smad 1,5 oder 8), die zusammen mit dem Co-Smad 4 einen Komplex bilden und dann die Fähigkeit besitzen, in den Zellkern einzutreten und dort die Transkription spezifischer Gene zu aktivieren (Juengel et al., 2006b).

In der embryonalen Follikelbildung beteiligt sich BMP-2, zusammen mit BMP-8b an der Bildung der PGC. BMP-2 Knock-out Mäuse sterben schon früh während der embryonalen Entwicklung. Die Wirkungen von BMP-2 in der Follikulogenese sind mehrmals untersucht worden. Nach Souza et al. (2002) erhöht die Gabe von BMP-2 in einer Kultur in den GC die FSH-induzierte Östrogen- und Inhibin-A-Produktion (Souza et al., 2002). Brankin et al. (2005) hingegen fanden heraus, dass die Synthese von Östradiol von BMP-2 gehemmt wird.

In welchem Umfang BMP-2 an der Progesteron-Produktion beteiligt ist, konnten Shimasaki noch nicht eindeutig klären (Shimasaki et al., 2004). Brankin et al. (2005) hingegen untersuchten Kulturen von porcinen TC und kamen zu den Ergebnissen, dass BMP-2 (wie auch BMP-6) die Steroidogenese der TC und der GC beeinflusst. Es wirkt suppressiv auf die Progesteron- sowie auf die Androgen-Synthese. Ähnliche Ergebnisse fanden Glister et al. (2005) in TC sowie GC des Rindes. Allerdings ist die Wirkung von BMP-2 schwächer als die von BMP-6. BMP-2 wirkt sich auf die Sekretion der Steroide zum Teil über die Expression von Enzymen aus. So wirkt sich BMP-2 (wie auch BMP-6, welches eine stärkere Wirkung aufweist) in porcinen GC negativ auf die Expression von 3 β -HSD aus. Die Expression von StAR scheint in den GC nur von BMP-6 und nicht von BMP-2 beeinflusst zu werden

(Brankin et al., 2005). Ob ein Mangel an 17α -OH (P450 17α -Hydroxylase) an der erniedrigten Synthese von Androsteron beim Schwein beteiligt ist, oder ob dieser eventuell nur auf eine zu geringe Progesteronkonzentration zurückzuführen ist, bleibt noch zu klären (Brankin et al., 2005). In den TC des Rindes jedenfalls ist das Enzym 17α -OH deutlich erniedrigt (Glister et al., 2005).

Diese Erkenntnis über die Wirkungen von BMP-2 führte zur Vermutung, dass BMP-2 die Expression von FSH beeinflusst. Diese Hypothese wurde von Lee et al. (2007) aufgegriffen und führte zu dem Ergebnis, dass BMP-2 in Synergie mit Activin A die Transkription der FSH β -UE stimuliert. Diese Synergie ist umso interessanter, da in vielen anderen Bereichen diese beiden Faktoren antagonistisch wirken (diese beiden Elemente können kompetitiv wirken, unter anderem da sie um Smad 4 konkurrieren. So erhält Activin zum Beispiel die pluripotenten Eigenschaften der Zellen und inhibiert die differenzierende Wirkung von BMP auf humane Stammzellen (Xiao et al., 2006)). BMP-2 wirkt auch alleine auf die FSH β -Expression der Maus. Der genaue Mechanismus der BMP-2-Wirkung ist noch nicht geklärt, aber BMP-2 wirkt bei der Stimulation von FSH β über den BMPRII und ALK2 und aktiviert somit eine Smad 8/4-abhängige Signaltransduktionskaskade (Lee et al., 2007).

BMP-2 hat keinen Einfluss auf die Reifung der Oozyte (Fatehi et al., 2005). Zusammen mit BMP-6 übt BMP-2 einen negativen Einfluss auf die cAMP-Produktion in den TC und somit auch auf die TC-Steroidogenese aus (Brankin et al., 2005). Die Wirkung von BMP-2 kann durch Follistatin inhibiert werden (Glister et al., 2004).

Einige Autoren haben sich mit der Expression von BMP-2 und seiner Rezeptoren befasst. So wird BMP-2 tierartlich sehr unterschiedlich exprimiert. Während die Ratte BMP-2 sowohl in GC als auch in TC bildet (Erickson und Shimasaki, 2003), exprimiert das Rind BMP-2 vor allem in den TC und gelegentlich in den Oozyten und den Cumuluszellen, aber nie in den muralen GC. Zu dem ist beim Rind das vollständige Fehlen von BMP-2 in den Primordial-, Primär- und Sekundärfollikeln zu beobachten. Dies ist ein deutlicher Unterschied zu den Ergebnissen bei der Ratte und beim Schaf (Fatehi et al., 2005). Beim Schaf wird wieder ein ganz anderes Expressionsmuster gefunden. BMP-2 ist hier ausschließlich in GC atretischer Follikel zu finden (Juengel et al., 2006a).

Tabelle 7.5 BMP-2-Expression in dem Follikel, tierartspezifisch

BMP-2		Maus	Ratte	Schaf	Rind	Schwein	Mensch
Primordialfollikel	Typ 1						
Oozyte			-	-	-		
Granulosa			-	-	-		
Primärfollikel	Typ 2						
Oozyte			-	-	-		
Granulosa			+	-	-		
Sekundärfollikel	Typ 3/ 4						
Oozyte			-	-	-		
Granulosazellen			++	-	-		
Thekazellen			+	-	-		
Antraler Follikel klein	Typ 5						
Oozyte			-	-	+/-		
Cumuluszellen			++	-	+/-		
Murale GC			++	-	-		
Theca			+	-	+		
Antraler Follikel (großer)	Typ 5a						
Oozyte			-	-	+/-		
Cumuluszellen			++	-	+/-		
Murale GC			++	-	-		
Theca			+	-	+		
Corpus luteum			-	-			
Atretischer Follikel			++	+			

+: Expression vorhanden, ++: Stärkere Expression

+/-: in Spuren vorhanden

Follikeltypen: Nach Tabelle 2.4 Klassifikation der Follikel

GC: Granulosazellen

Tabelle 7.6 Bedeutung und Wirkung von BMP-2 im antralen Follikel

Induziert die Expression von FSH β	
Inhibiert die Östrogen-Produktion	Es wird vermutet, dass die Aromatase betroffen ist
Inhibiert die Progesteron-Produktion	3 β -HSD in den GC reduziert
Inhibiert die Androgen-Produktion	17 α -OH in den TC reduziert

FSH β : β -Untereinheit von FSH, 3 β -HSD: 3 β Hydroxysteroiddehydrogenase, GC: Granulosazellen, TC:

Thekazellen, 17 α -OH: P450 17 α -Hydroxylase

7.6.3 BMP-4

BMP-4 wird, wie auch BMP-8b, vom extraembryonalen Ektoderm produziert und ist für die Generierung der primordialen Keimzellen bei der Maus essentiell (Ying et al., 2000, Ying und Zhao, 2001). Die Gene für BMP-4 und BMP-8b werden schon vor der Gastrulation, d.h. vor Auftreten der PGC exprimiert. Die meisten BMP-4 Knock-out-Mäuse sterben schon im Laufe der frühen Gastrulation, allerdings überleben einige lange genug, um zu zeigen, dass keine PGC gebildet werden. Dieser Mangel kann auch nicht durch externe BMP-4-Zugabe

behalten werden (Lawson et al., 1999). Lange war unklar, ob BMP-4 an der Entwicklung der Primordialfollikel beteiligt ist. Neuere Untersuchungen von Nilsson und Skinner (2003) ergaben, dass BMP-4 in den Stromazellen, welche den Follikel umgeben, exprimiert wird, und somit eine Wirkung auf die Entwicklung der Primordialfollikel sowie auf den Übergang der Primordial- in die Primärfollikel haben.

BMP-4 wird zusammen mit BMP-7 in adulten Ovarien exprimiert, vor allem in TC der Graaf-Follikel (Shimasaki et al., 1999). Zusammen verstärken BMP-4 und BMP-7 die FSH-induzierte Östradiol-Produktion während sie die FSH-induzierte Progesteron Produktion reduzieren. Dieser bifunktionale Effekt von BMP-4 und BMP-7 auf FSH lässt vermuten, dass diese beiden Faktoren als Inhibitoren der Luteolyse fungieren (Shimasaki et al., 1999). Interessanterweise beeinflusst BMP-4 bei der Ratte nur die FSH-induzierte Steroidsynthese, während bei dem Schaf auch die basale Progesteron-Synthese in den GC beeinflusst wird (Shimasaki et al., 1999, Mulsant et al., 2001).

In der Follikulogenese wird BMP-4 vor allem in den TC der Graaf-Follikel produziert (Shimasaki et al., 1999). Das in den TC produzierte BMP-4 interagiert mit den in den GC exprimierten Rezeptoren und reguliert somit unter anderem die FSH-induzierte Steroidogenese, BMP-4 hat daher parakrine Wirkung in der Follikulogenese.

BMP-4 wird zwar vor allem in TC produziert, allerdings bestehen auch hier wieder tierartlichen Unterschiede. So findet man bei der Ratte die BMP-4 Genexpression in den TC aller Follikel (Shimasaki et al., 1999) während beim Schaf die Expression nur in atretischen Follikeln nachzuweisen ist (Juengel et al., 2006b). Beim Rind wiederum ist die Expression des Faktors zwar im Prinzip auf die TC beschränkt, dennoch sind hin und wieder Oozyten antraler Follikel (~25%) positiv für BMP-4 (Fatehi et al., 2005).

Als Rezeptoren für BMP-4 fungieren auch hier wieder BMPRII und ALK3/6 (Siehe Tabelle 7.4). Sie befinden sich auch hier wieder in den GC und somit ist BMP-4 ein in den TC produzierter Faktor, der in den GC seine Wirkung entfaltet. BMP-4 hat sowohl stimulatorische als auch inhibitorische Effekte auf verschiedene Schritte der Steroidsynthese.

Die Wirkung von BMP-4 kann durch seine Bindung an Follistatin inhibiert werden (Shimasaki et al., 1999, Glister et al., 2004, Fatehi et al., 2005).

BMP-4 wird ebenfalls in den Endothelzellen einiger Blutgefäße des Ovars exprimiert (Erickson und Shimasaki, 2003) und spielt somit eine Rolle in der Blutzirkulation des Ovars.

Tabelle 7.7 Expression von BMP-4

BMP-4		Maus	Ratte	Schaf	Rind	Schwein	Mensch
Primordialfollikel	Typ 1		+1				
Oozyte			-	-	-		
Granulosa			-	-	-		
Primärfollikel	Typ 2						
Oozyte			-	-	-		
Granulosa			-	-	-		
Sekundärfollikel	Typ 3/ 4						
Oozyte			-	-	-		
Granulosa			-	-	-		
Theca			+	-	-		
Antraler Follikel (klein)	Typ 5						
Oozyte			-	-	+/-		
Cumuluszellen			-	-	-		
Murale GC			-	-	-		
Theca			++	-	+		
Antraler Follikel (groß)	Typ 5a						
Oozyte			-	-	+/-		
Cumuluszellen			-	-	-		
Murale GC			-	-	-		
Theca			++	-	+		
Corpus luteum			+	-			
Atretischer Follikel			-	+			

+1= in umliegenden Stromazellen vorhanden

+: Expression nachgewiesen, ++: stärkere Expression nachgewiesen

+/-: in Spuren nachgewiesen

-: nicht nachweisbar

GC: Granulosazellen

Einteilung der Follikeltypen nach Tabelle 2.4.

7.6.4 Bone morphogenetic protein 6 (BMP-6)

BMP-6, ein weiteres Mitglied der TGF β -Familie, wird je nach Tierart spezifisch exprimiert. BMP-6 wird bei der Ratte und beim Rind in den GC sowie in der Oozyte ab dem Zeitpunkt exprimiert, an dem der Follikel zwei Schichten von GC aufweist. Die BMP-6-Expression nimmt mit dem weiteren Follikelwachstum zu. Bei der Ratte sind in den Oozyten der Graaf Follikel die höchsten Konzentrationen an BMP-6 zu finden. Ebenfalls bei der Ratte konnte in den GC dominanter Follikel keine BMP-6 Expression nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass die Inhibition der BMP-6-Expression in den GC für die Bildung dominanter Follikel von großer Bedeutung ist. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse unterstützt, die zeigen, dass BMP-6 während der Atresie in GC stark exprimiert wird. Im C.1. der Ratte wird BMP-6 ab dem Zeitpunkt der Ovulation bis zur Luteolyse exprimiert (Erickson und Shimasaki, 2003, Glister et al., 2004). Das Schaf nimmt hinsichtlich BMP-6, wie auch

schon bei den anderen BMP-Faktoren, eine besondere Stellung ein, da BMP-6 bei dieser Spezies ausschließlich in der Oozyte exprimiert wird (Juengel et al., 2006b).

Die Wirkungen von BMP-6 sind sehr vielfältig, allerdings beinhalten diese nicht Stimulierung der Zellteilungen in den GC (Shimasaki et al., 2004). Konträre Angaben, von Knight et al. (2006) besagen allerdings, dass BMP-6 sehr wohl an der Proliferation der GC beteiligt ist. Zu den Funktionen von BMP-6 gehört die Hemmung der Luteinisierung. BMP-6 inhibiert, wie auch einige andere BMPs, in GC der Ratte die FSH-induzierte Progesteron Produktion, die Stimulation von StAR sowie von P450_{scc}. BMP-6 hat aber keine Wirkung auf die P450_{arom} Expression und auf die Östradiol Produktion. In den GC des Rindes und des Schweines stimuliert BMP-6 hingegen die Produktion von Östradiol, Inhibin A, Activin A und Follistatin, und supprimiert die Produktion von Progesteron, StAR und von P450_{scc} (Shimizu et al., 2004, Glister et al., 2004). Allerdings konnten Glister et al. (2004) keine Wirkung von BMP-6 auf die FSH-induzierte Zellproliferation oder auf die Hormonexpression nachweisen. Da BMP-6 die Wirkung von FSH reduziert, könnte ein starker Abfall der BMP-6 Expression in den GC notwendig sein, damit FSH seine Wirkung auf den Selektionsprozess der Follikel entfalten kann (Erickson et al., 2003).

Tabelle 7.8 Expression von BMP-6

BMP6		Maus	Ratte	Schaf	Rind	Schwein	Mensch
Primordialfollikel	Typ 1					+	
Oozyte			-	+	-		
Granulosa			-	-	-		
Primärfollikel	Typ 2					+	
Oozyte			+/-	+	-		
Granulosazellen			+/-	-	-		
Sekundärfollikel	Typ 3/ 4					+	
Oozyte			+	+	+		
Granulosazellen			+	-	+		
Thekazellen			-	-	-		
Antraler Follikel (klein)	Typ 5						
Oozyte			+	+	+		
Cumuluszellen			+	-	+		
Murale GC			+	-	+		
Theca			-	-	-		
Antraler Follikel (groß)	Typ 5a						
Oozyte			+	+	+		
Cumuluszellen			+	-	+		
Murale GC			+	-	+		
Thecazellen			-	-	-		
Corpus luteum			+	-			
Atretischer Follikel				+			

+: Expression nachgewiesen

-: Keine Expression nachgewiesen

+/-: Spuren nachgewiesen

GC: Granulosazellen

Einteilung der Follikeltypen nach Tabelle 2.4.

7.6.5 Bone morphogenetic protein 7 (BMP-7)

BMP-7 ist sowohl in seiner Funktion als auch in der Lokalisation seiner Expression dem BMP-4-Faktor sehr ähnlich. Die Expression von BMP-7 wurde bei verschiedenen Tierarten untersucht und beim Rind und bei der Ratte ausschließlich in den TC gefunden (Shimasaki et al., 1999, Erickson und Shimasaki, 2003, Glister et al., 2004, Shimizu et al., 2006). Beim Schaf ist die BMP-7-Expression im Follikel viel weniger ausgeprägt. Juengel et al. (2006) haben in nicht-atretischen Follikeln des Schafes gar keine BMP-7 Expression nachweisen können.

Lee et al. (2001) haben die Wirkung von BMP-7 auf die Follikulogenese und die Ovulation bei der Ratte untersucht. Dabei konnten sie zeigen, dass BMP-7 die FSH-induktion der Östradiol-Produktion verstärkt und die FSH-induzierte Progesteron-Produktion hemmt. Die vermehrte Bildung von Östradiol kommt durch eine verstärkte Expression der P450arom

zustande und die Abnahme an Progesteron durch eine reduzierte Expression von StAR mRNA und von P450scc (Lee et al., 2001). Weiters führt BMP-7 zu einer vermehrten GC - Proliferation. Somit ist BMP-7 ein Follikel-fördender Faktor und zugleich ein Antiluteinisierungsfaktor (Lee et al., 2001, Shimizu et al., 2006, Lee et al., 2007). Weiterhin verstärkt BMP-7 in den GC die Wirkung von IGF.

Bei Nagern ist, wie auch schon bei BMP-4 beschrieben, wird BMP-7 auch in Stromazellen exprimiert und fördert den Übergang vom Primordial- zum Primärfollikel (Nilsson und Skinner, 2003). BMP-7 wirkt über den ActRII, einen Typ II Rezeptor (siehe Tabelle 3 Kapitel 6.5), und bindet anschließend sehr stark an den ALK-2 (Typ I Rezeptor). Beide Rezeptoren werden in den TC und der Oozyte, nicht aber in den TC exprimiert. Shimizu et al. (2006) haben den Einfluss von FSH und Östradiol auf die Expression dieser Rezeptoren beim Rind untersucht. Sie konnten zeigen, dass FSH und Östradiol die Expression der beiden Rezeptoren hochregulieren. Dabei war Östradiol für sich allein wirksam, nicht aber FSH. Die Autoren vermuten, dass das BMP-7/ActRII/ALK-2 System entscheidend an der Selektion der Follikel mitwirkt.

Die Wirkung von BMP-7 kann durch Follistatin und seine Bindung an den Faktor inhibiert werden (Findlay et al., 2002).

Tabelle 7.9 Expression von BMP-7

BMP-7		Maus	Ratte	Schaf	Rind	Schwein	Mensch
Primordialfollikel	Typ 1						
Oozyte			-	-	-		
Granulosazellen			-	-	-		
Primärfollikel	Typ 2						
Oozyte			-	-	-		
Granulosazellen			-	-	-		
Sekundärfollikel	Typ 3/ 4						
Oozyte			-	-	-		
Granulosazellen			-	-	-		
Thekazellen			+	-			
Antraler Follikel (klein)	Typ 5						
Oozyte			-	-	-		
Cumuluszellen			-	-	-		
Murale GC			-	-	-		
Thekazellen			+	-	+		
Antraler Follikel (groß)	Typ 5a						
Oozyte			-	-	-		
Cumuluszellen			-	-	-		
Murale GC			-	-	-		
Thekazellen			+	-	+		
Corpus luteum			+	-			
Atretischer Follikel				-			

+: Expression nachgewiesen

-: Keine Expression nachgewiesen

+/-: Spuren nachgewiesen

Einteilung der Follikeltypen nach Tabelle 2.4.

GC: Granulosazellen

7.6.6 Bone morphogenetic protein 8b (BMP-8b)

BMP-8b spielt zusammen mit BMP-4 bei der Bildung der PGC eine zentrale Rolle. Die Gene für BMP-4 und für BMP-8b werden schon vor der Gastrulation exprimiert, also bevor überhaupt PGC zu finden sind. Aus Versuchen mit Knock-out Mäusen wurde deutlich, dass BMP-8b für die PGC Bildung nötig ist. Allerdings können BMP-8-Knock-out Mäuse, im Unterschied zu BMP-4-Knockout-Mäusen, durch der Defekt BMP-8b-Gabe überleben (Ying et al., 2000). BMP-8b scheint im Rahmen der weiblichen Reproduktion ausschließlich für die PGC-Bildung von Bedeutung zu sein (Shimasaki et al., 2004).

7.6.7 Growth differentiation factor 9 (GDF-9)

GDF-9 ist ein Mitglied der TGF β -Familie und ein Schlüsselmolekül, welches die Proliferation und Differenzierung der GC moduliert. Es ist ein von den Oozyten sezernierter intraovarieller Wachstumsfaktor (Erickson und Shimasaki, 2000). GDF-9 wird mit der frühen Follikulogenese assoziiert und eine gezielte Deletion des GDF-9-Gens resultiert in einer Unfähigkeit der TC zur einer geordneten Ausbildung der Theca, in einem abnormalen Wachstum der Oozyten und zu einer verminderten GC-Proliferation. Dadurch endet die Follikulogenese schon im Stadium des Primordialfollikels (Dong et al., 1996, Shimizu, 2006). GDF-9 wirkt autokrin bei der Regulation der Entwicklung und Reifung der Oozyte und parakrin bei der Differenzierung und Proliferation der GC (Bodensteiner et al., 1999).

Die Genkartierung für GDF-9 wurde bei mehreren Tierarten durchgeführt. GDF-9 konnte beim Schwein auf Chromosom 2 (Cepica et al., 2004) und beim Schaf auf Chromosom 5 lokalisiert werden (Sadighi et al., 2002).

GDF-9 zeigt eine starke Verwandtschaft zu BMP-15. Es wird ausschließlich in den Gonaden und der hypothalamisch-hypophysären-Achse exprimiert (Gilchrist et al., 2004). Dabei wird es als Vorläufer-Protein sezerniert. Beim Schaf weist das Vorläufer-Protein 453 AS auf. Es besteht aus einer kurzen sekretorischen Region, gefolgt von einer Pro-Region, welche die biologisch aktive Region des Proteins (135 As) beinhaltet (Bodensteiner et al., 1999). Das humane GDF-9-Gen besteht aus zwei Exons, welche von einem Intron getrennt werden. Auch das GDF-9 bei Maus und Rind sind in gleicher Weise organisiert.

GDF-9 ist, zusammen mit BMP-15, eines der wenigen TGF β -Familienmitglieder, dem das Cystein, das für die Ausbildung von Dimeren notwendig ist, fehlt. Daher ist noch unklar, ob einer Dimerisation eine notwendige Voraussetzung für die biologische Aktivität von GDF-9 darstellt. In Zellkulturen können sowohl Homo- als auch Heterodimere produziert werden (Liao et al., 2003, Moore und Shimasaki, 2005). Da in vivo beide Faktoren zur gleichen Zeit exprimiert werden, scheint es sehr wahrscheinlich, dass Heterodimere in vivo gebildet werden (Moore und Shimasaki, 2005). In welcher Form dieser von den Oozyten-produzierter Faktor nun in vivo vorkommt, ist noch in keiner Spezies eindeutig geklärt.

Während BMP-15 ausschließlich von wachsenden Oozyten exprimiert und sezerniert wird, und dies ebenfalls zunächst für GDF-9 angenommen wurde, (McGrath et al., 1995), haben neuere Untersuchungen gezeigt, dass GDF-9 außer in der Oozyte auch in weiteren

Gewebe, wie den Hoden (Maus, Ratte und Mensch), und in geringen Konzentrationen auch in einigen extragonadalen Geweben, wie dem Hypothalamus, der Hypophyse, dem Uterus so wie des Knochenmarks gefunden wird (Fitzpatrick et al., 1998).

Die Expression von GDF-9 weist speziesspezifische Unterschiede hinsichtlich des Zeitpunktes der ersten Expression sowie der Lokalisation der Expression auf.

Bei der Maus und bei der Ratte findet die Expression von GDF-9 nur in Oozyten statt und wird dabei erstmals bei Primärfollikeln beobachtet (McGrath et al., 1995, Fitzpatrick et al., 1998, Elvin et al., 1999a, Elvin et al., 1999b).

Bei Schaf und Rind ist die Expression von GDF-9 gleichfalls Oozyten-spezifisch, allerdings findet sie hier schon ab dem Primordialfollikeln statt (Bodensteiner et al., 1999, McNatty et al., 1999, Bodensteiner et al., 2000, McNatty et al., 2000, McNatty et al., 2001, Juengel et al., 2002, Sadighi et al., 2002, Juengel et al., 2004a, McNatty et al., 2005). Somit ist bei diesen Tieren GDF-9 wahrscheinlich nicht nur für das Follikelwachstums beteiligt sondern auch bei der Rekrutierung der Primordialfollikel (Prochazka et al., 2004).

Beim Schwein findet die Expression von GDF-9 ebenfalls schon ab dem primordialen Follikel statt. Zusätzlich zu den Oozyten exprimieren hier auch die GC (Cumuluszellen und murale GC) GDF-9, allerdings in einer deutlich niedrigeren Konzentration (4-mal weniger) als die Oozyten (Bodensteiner et al., 1999, Bodensteiner et al., 2000, Prochazka et al., 2004).

Somit ist GDF-9 kein ausschließlich von Oozyten-sezernierter Faktor sondern wird auch in GC exprimiert.

Tabelle 7.10 Expression von GDF-9

GDF-9		Maus	Ratte	Schaf	Rind	Schwein	Mensch
Primordialfollikel	Typ 1						
Oozyte		-	-	+	+	+	-
Granulosazellen							
Primärfollikel	Typ 2						
Oozyte		+	+	+	+	+	+
Granulosazellen							
Sekundärfollikel	Typ 3/4						
Oozyte		+	+	+	+	+	+
Granulosazellen							
Thekazellen							
Antraler Follikel (klein)	Typ 5						
Oozyte		+	+	+	+	+	+
Cumuluszellen						~+	~+
Murale GC						~+	~+
Thekazellen							
Antraler Follikel (groß)	Typ 5a						
Oozyte		+	+	+	+	+	+
Cumuluszellen						~+	~+
Murale GC						~+	~+
Thekazellen							
Corpus Luteum							
Atretischer Follikel							

+: Expression nachgewiesen

-: Keine Expression nachgewiesen

+/-: Spuren nachgewiesen

Einteilung der Follikeltypen nach Tabelle 2.4.

GC: Granulosazellen

Die GC müssen über „Gap Junctions“ gekoppelt sein, um optimal auf eine Stimulierung durch GDF-9 antworten zu können. Die Abnahme an „Gap Junctions“ in Cumuluszellen, wie sie kurz vor der Ovulation beobachtet wird, reduziert die Menge der von den GC als Antwort auf GDF-9 sezernierten autokrinen und parakrinen Wachstumsfaktoren (Gittens et al., 2005).

Gilchrist et al. zeigten 2004 erstmals, dass GDF-9 ein wichtiger, von Oozyten sezernierter Faktor ist, aber nur einen Teil der Oozytenfunktionen beeinflusst. GDF-9 mRNA und das korrespondierende Protein werden während der gesamten Follikulogenese exprimiert und auch noch nach der Ovulation (bis zu anderthalb Tage nach der Befruchtung) exprimiert (McGrath et al., 1995). Dies lässt eine zusätzliche Rolle für GDF-9 bei der Fertilisation und bei der frühen embryonalen Entwicklung vermuten.

Viele Daten über Funktion und Bedeutung von GDF-9 wurden aus Versuchen mit Knock-out Mäusen erhalten. GDF-9 Knock-out Mäuse sind steril und ihre Follikel bleiben im

Stadium der Primärfollikel blockiert. Weiterhin existieren Schafe (Belclare Schafe (FecG^H), die eine Mutation am GDF-9-Locus aufweisen. In ihren Ovarien läuft die Follikelentwicklung bis zum antralen Follikel ab, aber diese Follikel weisen eine anormale Morphologie. Bei ihnen liegt eine non-konservative Aminosäure-Substitution auf Position 77 der reifen Proteinregion vor (McNatty et al., 2005) (Siehe Tabelle 7.15).

GDF-9 stimuliert in niedriger Konzentration während der frühen Follikulogenese die Proliferation der GC durch Suppression von Kit-ligand und LH-R. In höheren Konzentrationen fördert GDF-9 die Expression von HAS-2 und von COX-2 und unterdrückt die Synthese des Urokinase-Plasminogen-Aktivators (uPA). Weiter kann rekombinantes GDF-9 die StAR Synthese induzieren (Elvin et al., 1999a, Elvin et al., 2000). Dies sind Schlüsselemente, welche die Produktion der Hyaluronsäure-reichen extrazellulären Matrix und damit die Cumulusexpansion regulieren (Elvin et al., 1999a, Prochazka et al., 2004). Daraus kann geschlossen werden, dass GDF-9 wesentlich an der Cumulusexpansion beteiligt ist, aber weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Bedeutung der Konzentrationsunterschiede von GDF-9 in den präovulatorischen Follikeln zu klären. In präovulatorischen Follikeln scheint die Oozyte GDF-9 in größeren Mengen zu sezernieren (Eppig et al., 2001). Diese könnte zu einer verstärkten Expression von HAS-2 und COX-2 führen damit eine Expansion des Cumulus oophorus auslösen. Eine niedrigere Konzentration an GDF-9 führt über KL und LH-R (negative Rückkopplungsschleife) zur Proliferation der GC und inhibiert ihre Differenzierung (Prochazka et al., 2004). Allerdings ist die Bedeutung der unterschiedlichen GDF-9 Konzentrationen in den Follikeln noch ungeklärt. Prochazka et al. (2004) haben die relative Konzentration von GDF-9 in den Follikeln untersucht und gefunden, dass die Unterschiede nicht auf eine vermehrte Expression zurückzuführen sind, da die Konzentration der GDF-9 mRNA in der periovulatorischen Periode nicht ansteigt. Sie fanden aber eine Abnahme der GDF-9-Konzentration in den Cumuluszellen. Diese Abnahme führen sie auf eine verminderte Expression zurück.

Weiterhin wird GDF-9 für die Rekrutierung der TC benötigt (Dong et al., Elvin et al., 2000). GDF-9 Knock-out Mäuse sind nicht in der Lage, TC zu rekrutieren. GDF-9 reguliert auch, über eine vermehrte Expression von StAR, die Progesteron-Synthese.

Es erscheint zudem als gesichert, dass GDF-9 das Verhältnis Primordialfollikel/Primärfollikel zugunsten der Primärfollikel verschiebt. Der dabei zugrunde liegende Mechanismus ist unklar, zumal diese Verschiebung auf keine direkte Stimulation des

Übergangs vom Primordial- zum Primärfollikel zurückzuführen ist (Nilsson und Skinner, 2002).

Tabelle 7.11 Faktoren, welche durch die Anwesenheit von GDF-9 beeinflusst werden

Anwesenheit von GDF-9 bewirkt:	Und darauf hin:
uPA wird vermindert produziert	
LH-R wird weniger exprimiert	verhindert Luteinisierung
KitL wird vermindert exprimiert	
HAS-2 wird vermehrt produziert	HA vermehrt vorhanden, fördert Cumulus Expansion
StAR Expression erhöht	Progesteron steigt an
COX-2 Expression ist erhöht	Prostaglandin steigt an

KitL: Kit Ligand, HAS-2: Hyaluronsäure Synthase 2, StAR: steroid acute regulatory protein, COX-2: Cyclooxygenase 2, HA: Hyaluronsäure, GDF-9: Growth differentiation factor 9, uPA: Urokinase plasminogen activator, LH-R: LH Rezeptor

Tabelle 7.12 Faktoren, welche durch die Abwesenheit von GDF-9 beeinflusst werden

Fehlen von GDF-9	
uPA wird vermehrt produziert	Follikelruptur
LH-R werden vermehrt exprimiert	Luteinisierung

GDF-9: Growth differentiation factor 9, uPA: Urokinase plasminogen activator, LH-R: LH Rezeptor

7.6.8 GDF-9-Rezeptor

GDF-9 übt seine Wirkung über ein Serin-Threonin-Rezeptorsystem, das aus dem Typ II BMP Rezeptor (BMPRII) und dem TGF β -Typ I Rezeptor (ALK-5) besteht. Die Bindung des Liganden an den Typ II Rezeptor führt zur Heterodimerisation mit dem Typ I Rezeptor, was wiederum die intrazellulären Signaltransduktionsmoleküle Smad 2 und 3 aktiviert. Diese bilden einen Komplex mit den Co-Smad 4. Dieser Komplex ist fähig, in den Zellkern zu gelangen und dort Transkriptionsprozesse einzuleiten (Findlay et al., 2002, Drummond, 2005). Die Identifizierung von BMPRII als Typ II Rezeptor für GDF-9 gelang Vitt et al. (2002) und die von ALK5 als Typ I Rezeptor für GDF-9 Mazerbourg et al. (2004).

Die Expression von BMPRII wurde vormals schon in bovinen GC und TC (Glister et al., 2004) und in GC der Ziege (Silva et al., 2005) untersucht. Die Expression von ALK5 wurde im Ovar des Hamsters so wie in porcinen GC nachgewiesen (Goddard et al., 1995, Roy, 2000). Die Expression der GDF-9-Rezeptoren findet beim Schaf schon in den Oozyten primordialer Follikel statt. Daraus kann geschlossen werden, dass GDF-9 auch das Wachstum der Oozyte in diesen Spezies beeinflusst (Juengel et al., 2004b).

Jayawardana et al. (2006) untersuchten den Einfluss von Östradiol und FSH auf die GDF-9-Rezeptor-Expression. Sie konnten zeigen, dass Östradiol und FSH die Expression der Rezeptoren in den GC verstärken, nicht aber in den TC. Weiter ist die Expression in den GC

abhängig vom Follikelstadium. Sie nimmt in den präovulatorischen Follikel bis zur Ovulation zu. Diese Zunahme findet in den TC nicht statt (Jayawardana et al., 2006). Diese Ergebnisse führen zur Hypothese, dass die Typ I und Typ II Rezeptoren zusammen mit GDF-9 bei der Follikelselektion eine Rolle spielen könnten (Jayawardana et al., 2006).

Tabelle 7.13 GDF-9-Rezeptor Expression

Expression des GDF-9 Rezeptors in den GC	Expression des GDF-9 Rezeptors in den TC
Zunahme der Expression durch FSH und Östradiol	Keine Zunahme der Expression durch FSH oder Östradiol
Zunahme der Expression während des Follikelwachstums	Keine Zunahme der Expression während des Follikelwachstums

GDF-9: Growth differentiation factor 9, GC: Granulosazellen, TC: Thekazellen, FSH: Follikelstimulierendes Hormon

7.6.9 Bone morphogenetic protein 15 (BMP-15)

BMP-15, auch GDF-9B genannt, ist ein von den Oozyten sezernierter Faktor, der ebenfalls der TGF β -Familie angehört. Das Gen für BMP-15 ist ein „single copy gene“ das bei Säugetieren auf dem X Chromosom liegt (Dube et al., 1998). Wie auch schon bei den anderen Mitgliedern der TGF β -Familie wird BMP-15 zunächst als prä-pro-Protein gebildet. Für die Abspaltung der Pro-Region muss das Protein ein Dimer bilden (Hogan, 1996). Da bei BMP-15 wie auch schon bei GDF-9 das vierte Cystein, das für die Disulfid-Brücke bei der Dimerbildung verantwortlich ist, fehlt, kommen die BMP-15-Dimere durch nicht-kovalente Bindungen zustande (Liao et al., 2003). BMP-15 bildet sowohl Homodimere als auch Heterodimere mit GDF-9 (Liao et al., 2003). Die biologische Wirksamkeit dieser Dimere ist noch nicht ganz klar, aber da GDF-9 und BMP-15 Co-exprimiert werden, ist eine Heterodimerbildung in vivo wahrscheinlich.

Die Expression von BMP-15 findet ausschließlich in Oozyten wachsender Follikel statt (Dube et al., 1998). Bei Schaf, Rind, Ratte, Maus und auch beim Menschen wird die Expression ab den Primärfollikeln beobachtet.

Die beiden Schafrassen Inverdale und Hanna weisen höhere Ovulationsraten und höhere Wurfzahlen auf als das Wild-typ Pendant. Inverdale und Hanna sind beide heterozygote Träger einer BMP-15 Punktmutation. Inverdale (FecX^I) und Hanna (FecX^H) weisen beide eine Punktmutation auf, die in der Synthese eines sehr kurzen Peptids münden, welches mit großer Wahrscheinlichkeit nicht biologisch aktiv ist. Die Bedeutung von BMP-15 für die Fertilität des Schafes wurde anschließend durch zwei weitere Mutationsträger bestätigt: FecX^G (Galway) und FecX^B (Belclare). Sie münden in dem gleichen Phänotyp wie Inverdale

und Hanna (Hanrahan et al., 2004, Moore et al., 2005). Zusammen mit weiteren Versuchen von Mc Natty et al. (2005) so wie Juengel et al. (2004, 2006) wird klar, dass BMP-15 eine große Bedeutung in der frühen Follikulogenese besitzt, in der Promotion der Transition des primordialen zu dem primären Follikel, und zeitgleich aber die Entwicklung zum dominanten Follikel fördert. Somit spielt BMP-15 eine wichtige Rolle in der Bestimmung der Ovulationsquote so wie der Wurfgrösse (Shimasaki et al., 2003, Shimasaki et al., 2004, Moore und Shimasaki, 2005).

Bei Schaf und Mensch ist BMP-15 für die normale Fertilität essentiell. Heterozygote Tiere haben eine erhöhte Ovulationsrate und erhöhte Würfe wahren homozygote Tiere infertil sind und veränderte Ovarien aufweisen. Bei der Maus scheint die Bedeutung von BMP-15 in der Follikulogenese von der bei Schaf und Mensch sehr unterschiedlich zu sein. Homozygote Tiere sind nur subfertil und in Heterozygoten ist keine klare Veränderung des Phänotyps zu erkennen. Somit wird deutlich, dass die essentielle Bedeutung von BMP-15 in der Follikelentwicklung des Nagers im Vergleich zu der des Schafes nicht gegeben ist (Yan et al., 2001, Rajkovic et al., 2002).

Beim Menschen werden Mutationen an BMP-15 mit für die „premature ovarian failure“ verantwortlich gemacht (Laissue et al., 2006, Suzumori et al., 2007). Somit ist auch hier BMP-15 ein wichtiges Element bei der Follikelentwicklung.

Ergebnisse über Untersuchungen beim Schwein und beim Rind scheinen noch zu fehlen. Lediglich die Lokalisation von BMP-15 auf dem X-Chromosom des Schweines ist geklärt (Grapes und Rothschild, 2002).

Die biologische Aktivität von BMP-15 ist in der Follikulogenese bedeutend, da BMP-15 wie auch schon GDF-9, ein Oozyten-sezernierter Faktor ist, der auf die umliegenden somatischen Zellen wirkt und ihr Wachstum anregt. Ganz besonders in der Regulation der GC-Funktion ist BMP-15 bedeutend (Shimasaki et al., 2004). BMP-15 ist ein potenter Stimulator der GC-Mitose und der GC-Proliferation (Otsuka et al., 2001). Zu dem ist BMP-15 in GC ein starker Stimulator der mRNA Expression von Kit Ligand, welcher besonders in dem frühen Follikelwachstum von Bedeutung ist (Otsuka und Shimasaki, 2002). In Bezug auf KL ist BMP-15 in einer negativen Feedback-schleife zwischen der Oocyte und den somatischen Zellen involviert: BMP-15 stimuliert die Expression von KL in GC, welches im Gegenzug die Expression von BMP-15 in der Oocyte herabreguliert (Siehe Abbildung 7.2).

Weiterhin ist BMP-15 ein potenter Suppressor der FSH-induzierten Progesteronproduktion (Otsuka et al., 2000). BMP-15 hat allerdings keinen Einfluss auf die Synthese von

Östrogen. Diese Tatsache unterstützt die Hypothese, dass BMP-15 das frühe Follikelwachstum so wie die frühe Follikelentwicklung fördert, und zeitgleich die Luteinisierung verhindert.

Weitere Untersuchungen über den genauen Vorgang der Progesteron-inhibition durch BMP-15 brachten die Erkenntnis, dass BMP-15 dieses über eine Suppression der FSH-R mRNA bewirkt (Otsuka et al., 2001). Somit sind die FSH-induzierten mRNA Expressionen von StAR, P450scc, 3 β -HSD, LH-R so wie die α - und β -UE von Activin und Inhibin ebenfalls inhibiert und reduziert (Moore et al., 2003, Moore und Shimasaki, 2005). Auf die FSH-induzierte Expression von Östradiol hat BMP-15 hingegen keine Wirkung (Moore und Shimasaki, 2005).

Diese Mechanismen könnten eine Erklärung für die erhöhte Ovulationsrate in heterozygoten Tieren darstellen: die Reduktion von bioaktivem BMP-15 in diesen Tieren könnte zu einer erhöhten FSH-sensitivität führen und dies würde zu einer schnelleren Follikelentwicklung und somit zu einer verfrühten Ovulation führen.

Otsuka et al. (2001) fanden heraus, dass der inhibitorische Effekt von BMP-15 auf die FSH-induzierte StAR- und P450scc-Expression über cAMP gesteuert wird.

In Zellen der Hypophyse stimuliert BMP-15 die Expression des FSH-Promotors und -Synthese, nicht aber die Expression von LH (Juengel et al., 2004a).

BMP-15 übt, wie die anderen Mitglieder der TGF β -Familie, seine Wirkung über zwei Serin-Threonin-Kinasen aus, der BMPRII und AKL-6. Diese phosphorylieren anschließend Smad 2 und 3, die zusammen mit Smad 4 einen Komplex bilden. Dieser Komplex ist zellkernfähig und aktiviert dort die Transkription diverser Elemente.

In Bezug auf AKL-6, so gibt es, beim Schaf, heterozygote Träger einer inaktivierenden AKL-6-Mutation. Diese Tiere zeigen deutlich vermehrte Wurfgrößen, durch eine erhöhte Ovulation hervorgerufen, und der Phänotyp dieser Tiere ist demjenigen der BMP-15 heterozygoten Mutanten sehr ähnlich. Interessanterweise haben homozygote Tiere eine noch gesteigerte Ovulationsquote als die heterozygoten Tiere, Phänomen das in starkem Kontrast zu homozygoten BMP-15 Mutanten steht. Die ALK-6 Mutation wurde erstmals in Booroola Schafen (FecB) identifiziert, und nach ihnen auch benannt, als eine Punktmutation in den Nucleotid 830, die zu einem Arginin anstelle eines Glutamins führt (McNatty et al., 2005). Der dominante Phänotyp wird durch eine verfrühte Follikelentwicklung sowie durch eine außergewöhnliche Fruchtbarkeit gekennzeichnet. Einige Sekundär Effekte sind ebenfalls beobachtet worden und beruhen darauf, dass ALK-6 ebenfalls in vielen weiteren Geweben

wie Gehirn, Hypophyse, Nieren, Muskel, Uterus, Prostata und Hoden exprimiert wird. Im Gegensatz zu dem Booroola Schaf zeigt die ALK-6-Knock-out Maus eine normale Entwicklung der Ovarien und eine normale Ovulationsrate. Eine leicht verminderte Fertilität kann beobachtet werden, wahrscheinlich auf einer fehlerhaften Cumuluszellen Expansion beruhend. Im Gegensatz zu den Booroola Schafen haben ALK-6 Knock-out Schafe einen deutlichen Defekt in der Chondrogenese (McNatty et al., 2005).

Tabelle 7.14 Wirkung von BMP-15 auf die Expression und Sekretion verschiedener Elemente

Faktor/ Element	Wirkung von BMP-15 auf diesen Faktor/dieses Element
Progesteron	Inhibiert die Synthese und Sekretion
StAR	Wirkt inhibitorisch auf die Expression von StAR
P450 _{scc}	Wirkt inhibitorisch auf die Expression von P450 _{scc}
3 β -HSD	Inhibitorische Wirkung
FSH-R	Inhibitorische Wirkung
LH-R	Inhibitorische Wirkung
α - und β - UE	Inhibitorische Wirkung

BMP-15: Bone morphogenetic protein 15, StAR: Steroid acute regulatory protein, P450_{scc}: Cytochrom P450 side chain cleavage, 3 β -HSD: 3 β -Hydroxysteroid-dehydrogenase, FSH-R: FSH Rezeptor, LH-R: LH Rezeptor

Tabelle 7.15 Mutationen beim Schaf

Name	Allel	Chr.	Phänotyp	Ovulationsrate	Gen	Quelle
Inverdale	FecX ^I	X	++ I+ II	1-2 2-3 0	BMP15	Galloway et al., 2000
Hanna	FecX ^H	X	++ H+ HH	1-2 2-3 0	BMP15	Galloway et al., 2000
Booroola	FecB ^B	6	++ B+ BB	1-2 3-4 >5	BMPR-IB	Wilson et al., 2001 Mulsant et al., 2001 Souza et al., 2001
Woodlands	FecX2 ^W	X	++ W+ WW	1-2 ~20% mehr als ++ unbekannt	Un- be- kannt	Davis et al., 2001
Romney Wishart	Fec ^W	?, nicht X- linked		Keine Infertilität bei homozygoten Trägern der Mutation	Nicht klar	Davis et al., 2006
Belclare	FecG ^H	Nicht X- linked	GG	Follikelentwicklung bis zum antralen Follikel, aber anormale Follikel		

Chr.: Chromosom

GC: Granulosazellen

++: Homozygote Tiere, welche keine Mutation exprimieren

I+: Heterozygote Tiere, H+: Heterozygote Tiere, B+: Heterozygote Tiere, W+: Heterozygote Tiere

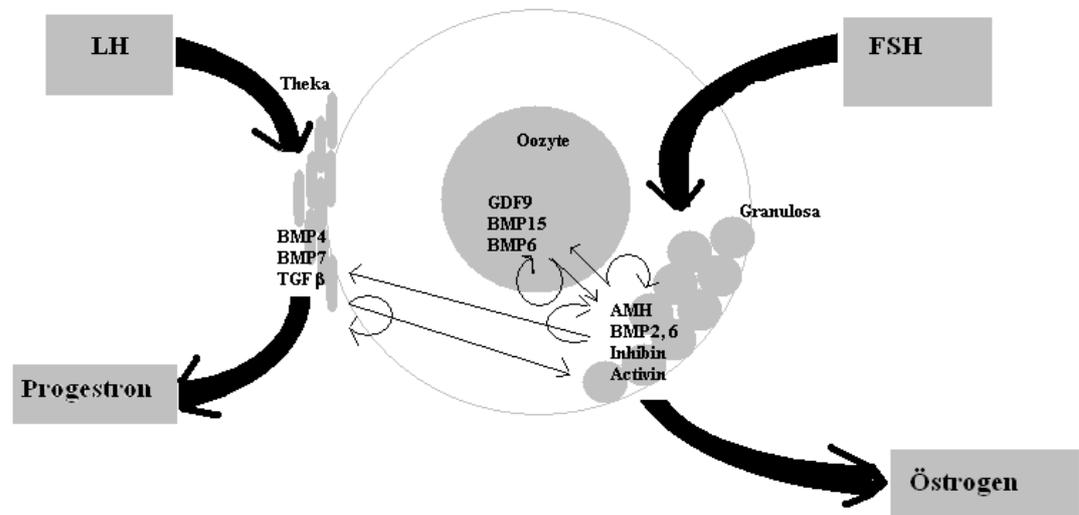
II: Homozygote Träger der Mutation Inverdale, HH: Homozygote Träger der Mutation Hanna, BB: Homozygote Träger der Mutation Booroola, WW: Homozygote Träger der Mutation Woodlands

Tabelle 7.16 Vergleichende Tabelle über die Wirkung der BMPs und GDF-9

Ligand	Primordial	Primärfollikel bis zum präantralen Follikel	antraler Follikel	Corpus luteum
BMP-2	?	?	inhibiert die Östrogenproduktion inhibiert die Progesteron- so wie die Androgen-Produktion Senkt die Expression von 3 β -HSD in GC Senkt 17 α -OH in TC	?
BMP-4 BMP-7	Aus Stroma/TC Steigert primordiale Follikel Aktivierung	Steigert GC Proliferation, Follikel Wachstum und das Überleben der Follikel	Steigert basale FSH-induziertes E, Inhibin, Activin Produktion und steigert GC-Proliferation Senkt Progesteron-Produktion in GC Senkt basale und LH-induzierte Androgenproduktion in TC	Inhibiert die Luteinisierung der GC, inhibiert eventuell die Ovulation.
BMP-6	?	?	Senkt die Progesteron-Produktion in GC und die Androgenproduktion in TC Proliferation der GC ??	Verhindert die Luteinisierung der GC und die Atresie der Follikel
BMP-15	?	Essentiell für die Follikelentwicklung, essentiell bei Schafen, nicht bei Nagetieren	Steigert die GC-Proliferation, und senkt die Progesteron-Produktion. Reguliert eventuell die FSH Responsivität der GC	?
GDF-9	Eventuelle Bedeutung bei der Bildung der primordialen Follikel	Follikelwachstum nach dem Primordialfollikel	Steigert die GC-Proliferation, senkt die Progesteron-Produktion, steigert die Cumulus-Expansion, beeinflusst die Ovulationsrate beim Schaf, reguliert die FSH-Ansprechbarkeit bei Schafen	?

?: noch nicht klar, FSH: Follikelstimulierendes Hormon, LH: Luteinisierendes Hormon, 3 β -HSD: 3 β -Hydroxysteroid-dehydrogenase, 17 α -OH: P450 17 α Hydroxylase, BMP: Bone morphogenetic protein, GDF: Growth differentiation factor, GC:Granulosazellen, TC: Thekazellen

Abbildung 7.5 Schematische Darstellung der BMP- und GDF-Faktoren und ihrer Expressionsorte so wie Wirkungsorte



In den Kompartimenten des Follikels werden die verschiedenen Faktoren produziert, welche teilweise autokrin aber auch Parakrin auf andere Kompartimente ihre Wirkung ausüben

LH: Luteinisierendes Hormon, FSH: Follikelstimulierendes Hormon, BMP: Bone morphogenetic protein, TGFβ: Transforming growth factor β, AMH: Anti-muellerian hormone, GDF: Growth differentiation factor

7.6.10 TGFβ

Die Transforming growth Factor β Superfamilie (TGFβ-Superfamilie) umfasst mehrere Subfamilien. Es gibt drei Hauptisoformen von TGFβ, nämlich TGFβ1, TGFβ2 und TGFβ3 (Massague, 1990). Knock-out Experimente haben gezeigt, dass die unterschiedlichen Isoformen für unterschiedliche physiologische Funktionen zuständig sind. Die aktiven TGFβ Isoformen binden alle an den TGFβRII, der anschließend mit dem TGFβRI dimerisiert und diesen phosphoryliert. Der phosphorylierte Rezeptor-Komplex aktiviert seinerseits wieder Smads (Smad 2 und 3).

Die Expression der TGFβ-Isoformen wurde in den Ovarien verschiedener Tierarten nachgewiesen. Die Expression von TGFβ1 zeigt in den Zellen des Follikels ein charakteristisches Verteilungsmuster:

TGFβ1 wird bei der Maus in den kleinen und mittleren Follikeln nicht exprimiert sondern erst in den TC und GC großer Follikel (Christopher, 2000). Bei der Ratte ist die TGFβ1 Expression vor allem in den TC und interstitiellen Zellen zu finden, mit besonders hohen Konzentrationen zum Zeitpunkt der Antrumbildung (Levacher et al., 1996). Beim Schaf ist die Expression von TGFβ1 ausschließlich in den TC zu finden (Juengel et al., 2004).

Beim Rind fanden Nilsson et al. (2003) die Expression des Proteins in den GC früher antraler und präantraler Follikel. In späteren Follikeln konnte der TGF β 1 nicht mehr nachgewiesen werden. Die mRNA ist allerdings auch in größeren Follikeln vorhanden. Beim Schwein wurde TGF β 1mRNA sowohl in TC als auch in GC antraler Follikel nachgewiesen. Allerdings wurde das Protein nur in TC gefunden (May et al., 1996). Beim Menschen wurde TGF β 1 sowohl in GC als auch in TC nachgewiesen, wobei seine Konzentration während des Follikelwachstums zunimmt (Chegini und Flanders, 1992).

Die Expression von TGF β 2 bei der Maus wurde in GC und TC antraler Follikel nachgewiesen (Ghiglieri et al., 1995). Bei der Ratte haben Levacher et al. (1996) TGF β 2 in GC ab dem primordialen Follikel bis zum frühen antralen Follikel sowie in den Interstiellen Zellen früher antraler Follikel gefunden. Bei dem Schaf kommt eine Expression von TGF β 2 ausschließlich in den TC vor Juengel et al. (2004). Beim Schwein wurden antrale Follikel untersucht, in denen allerdings keine Expression von TGF β 2 vorkam (Mulheron et al., 1992).

Die Expression von TGF β 3 wurde noch wenig untersucht. Bei der Maus ist die Expression von TGF β 3 in allen Zelltypen präantraler und antraler Follikel vorhanden (Schmid et al., 1994). Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen von Nilsson et al. (2003) beim Rind überein. Beim Schaf haben Juengel et al. (2004) die Expression von TGF β 3 ausschließlich in dem vaskulären System der Follikel finden können.

Die Expression der beiden Rezeptoren für TGF β , TGF β RI und TGF β RII wurden mehrfach untersucht. Der Typ I Rezeptor wird in den Oozyten primordialer, präantraler und antraler Follikel exprimiert. Weiters wird der Rezeptor auch in den GC und TC präantraler und früher antraler Follikel exprimiert (Mensch, Rind, Maus) (Schmid et al., 1994, Roelen et al., 1998, Roy und Kole, 1998). Ähnliche Ergebnisse fanden beim Schaf die Gruppe von Juengel et al. (2004). Der TGF β RII-Rezeptor wird nach Angaben von Roy et al. (1998) ebenfalls in den Oozyten, den GC und den TC der Follikel exprimiert. Diese Ergebnisse stimmen nicht mit den Befunden von Juengel et al. (2004) überein. Nach Juengel et al. (2004) wird der TGF β RII-Rezeptor ausschließlich in den Oozyten der primordialen und primären Follikeln und nicht in anderen Zelltypen exprimiert.

Das von Juengel et al. (2004) identifizierte Fehlen von TGF β RII in den GC widerspricht in vitro Studien, die das Vorkommen von TGF β 1 und TGF β 2 in GC nachgewiesen haben. Für diese unterschiedlichen Befunde gibt es mehrere Erklärungen. Zum einen kann es durchaus sein, dass TGF β RII doch in den GC exprimiert wird, aber dass die Nachweismethode zu wenig sensitiv war. Zum anderen ist möglich, dass ein anderer Typ II-

Rezeptor existiert, der sich an der Wirkung der TGF β beteiligt. Diese zweite Hypothese wird durch TGF β RII- exprimierenden Zelllinien unterstrichen, welche nicht fähig sind, TGF β 3 zu binden, aber doch TGF β 1. So wie durch TGF β -responsive Zelllinien die keinen detektierbaren TypII-Rezeptor aufweisen (Massague, 1990, Lawler et al., 1994).

Die Wirkungen von TGF β 1, -2, -3 sind vielfältig. So inhibiert zum Beispiel TGF β 1 die ovarielle Produktion von Androgen, wahrscheinlich über die direkte Inhibition der 17 α -Hydroxylase. Beim Menschen stimuliert TGF β 1 die FSH-induzierte P450arom-Aktivität in GC-Kulturen. Desweiteren inhibiert TGF β das Wachstum der GC beim Rind und Schwein (Mondschein und Hammond, 1988), und beim Rind zudem das Wachstum der TC (Roberts und Skinner, 1991). Ebenfalls beeinflusst wird die Produktion von Östrogen, die durch TGF β in den GC von Maus und Ratte erhöht wird. Die Progesteronproduktion in den TC des Rindes wird ebenfalls durch TGF β stimuliert (Roberts und Skinner, 1991). In den GC der Ratte erhöht TGF β zudem die Expression der FSH-Rezeptoren (Dunkel et al., 1994).

Tabelle 7.17 Expression von TGF β 1

TGF β 1		Maus		Ratte		Schaf		Rind		Schwein		Mensch	
		R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P
Primordialfollikel	Typ 1												
Oozyte													
Granulosazellen		-	-			-						+	+
Primärfollikel	Typ 2												
Oozyte													
Granulosazellen		-	-			-						+	+
Sekundärfollikel	Typ 3/4												
Oozyte													
Granulosazellen		-	-	+	+	-		+	+			++	++
Thekazellen		-	-	+	+	+						++	++
Antraler Follikel (kl.)	Typ 5												
Oozyte													
Cumuluszellen		-	-	+	+	-		+	+	+++	-	+++	+++
Murale GC		-	-	+	+	-		+	+	+++	-	+++	+++
Thekazellen		-	-	+++	+++	++				+++	+++	+++	+++
Antraler Follikel (gr.)	Typ 5a												
Oozyte													
Cumuluszellen		++	++	+	+	-				+++	-	+++	+++
Murale GC		++	++	+	+	-				+++	-	+++	+++
Thekazellen		++	++	+++	+++	++				+++	+++	+++	+++

R: mRNA, kl: klein, gr: gross

P: Protein

G: Granulosazellen

+: Expression vorhanden, ++: mittelstarke Expression vorhanden, +++: starke Expression vorhanden,

-: Keine Expression nachweisbar

Tabelle 7.18 Expression von TGFβ2

TGFβ2		Maus		Ratte		Schaf		Rind		Schwein		Mensch	
		RNA	P	RNA	P	RNA	P	RNA	P	RNA	P	RNA	P
Primordialfollikel	Typ 1												
Oozyte													
Granulosazellen					+			+	+				
Primärfollikel	Typ 2												
Oozyte													
Granulosazellen					+			+	+				
Sekundärfollikel	Typ 3/ 4												
Oozyte													
Granulosazellen					+			+	+				
Thekazellen						+	+	+	+			+	+
Antraler Follikel (klein)	Typ 5												
Oozyte													
Cumuluszellen		+	+		+			+	+		-		
Murale GC		+	+		+			+	+		-		
Thekazellen		+	+		+	+	+	+	+		-	+	+
Antraler Follikel (groß)	Typ 5a												
Oozyte													
Cumuluszellen		+	+					+	+		-	-/+	- /+
Murale GC		+	+					+	+		-	-/+	- /+
Thekazellen		+	+		+	+	+	+	+		-	+	+

R: mRNA

P: Protein

GC: Granulosazellen

+: Expression vorhanden, ++: mittelstarke Expression vorhanden, +++: starke Expression vorhanden,

-: Keine Expression nachweisbar, -/+: in Spuren

Tabelle 7.19 Expression von TGFβ3

TGFβ3		Maus		Ratte		Schaf		Rind		Schwein		Mensch	
		RNA	P	RNA	P	RNA	P	RNA	P	RNA	P	RNA	P
Primordialfollikel	Typ 1												
Oozyte													
Granulosazellen													
Primärfollikel	Typ 2												
Oozyte													
Granulosazellen													
Sekundärfollikel	Typ 3/ 4												
Oozyte													
Granulosazellen		+						+					
Thekazellen		+				+		+					
Antraler Follikel (klein)	Typ 5												
Oozyte													
Cumuluszellen		+						+					
Murale GC		+						+					
Theca		+				+		+					
Antraler Follikel (groß)	Typ 5a												
Oozyte													
Cumuluszellen		+						+					
Murale GC		+						+					
Thekazellen		+				+		+					

R: mRNA

P: Protein

GC: Granulosazellen

+: Expression vorhanden, ++: mittelstarke Expression vorhanden, +++: starke Expression vorhanden,

-: Keine Expression nachweisbar

7.6.11 Anti-Muellerian hormone oder Muellerian inhibing substance (AMH/MIS)

AMH (Anti-Muellerian hormone) auch MIS (Muellerian inhibing substance) genannt, ist ein Mitglied der TGFβ-Superfamilie. Es wird vor allem von den Sertolizellen fetaler Hoden produziert und induziert die Regression der Müller Gänge, den Anlagen wesentlicher Teile (Eileiter, Uterus, Teile der Vagina) des weiblichen Reproduktionstraktes (Josso et al., 1993). Nach der Geburt wird AMH in den GC wachsender Follikel exprimiert. Untersuchungen an Nagern haben ergeben, dass die Expression in den GC schon früh beginnt, nämlich unmittelbar nach der Differenzierung der GC aus Prägranulosazellen in den Primordialfollikeln. Die Expression wird in den GC präantraler und kleiner antraler Follikel am stärksten und nimmt dann während der weiteren Follikelentwicklung wieder ab. AMH wird in den FSH-abhängigen Follikelstadien nicht mehr exprimiert. Zudem verschwindet die AMH-Expression in atretischen Follikeln völlig. Interessanterweise finden während des Zeitraums der

Expression von AMH gleich zwei wichtige Schritte der Follikelentwicklung statt, nämlich die initiale und die zyklische Follikelrekrutierung.

Die Stärke der AMH-Expression in Follikeln der gleichen Kategorie scheint während des Östrus nicht zu variieren, dagegen wurden Unterschiede zwischen präantralen und antralen Follikeln sowohl im Östrus als auch im Diöstrus beobachtet (Durlinger et al., 1999, Durlinger et al., 2001, Durlinger et al., 2002a). Eine Expression von AMH findet in den GC bis zum frühen antralen Follikel bei der Maus, bis zum mittleren antralen Follikel beim Menschen und bis zum präovulatorischen Stadium beim Schaf statt.

In mehreren Studien, unter anderem mit Knock-out-Mäusen, wurde gezeigt, dass AMH für zwei Schritte der Follikulogenese von besonderer Bedeutung ist, und zwar für die initiale Follikelrekrutierung und für die zyklische Selektion des dominanten Follikels (DF) (Durlinger et al., 2002a, Durlinger et al., 2002b).

Erste Hinweise für eine Beteiligung von AMH an der initialen Rekrutierung kamen aus den Untersuchungen von Durlinger et al. (1999). Sie stellen mit Versuchen mit AMH-Knock-out-Mäusen fest, dass diese eine stark vermehrte Anzahl an rekrutierten Follikel aber weitaus weniger Primordialfollikel als die entsprechenden Wild-Type Mäuse besitzen. Damit dürfte AMH einen inhibitorischen Effekt auf die initiale Rekrutierung der Primordialfollikel bewirken. Dies wird durch die Untersuchungen von Durlinger et al. (2002) bestätigt, bei denen exogen zugeführtes AMH eindeutig das Follikelwachstum beeinträchtigt. Der genaue Mechanismus dieser Inhibition ist noch nicht geklärt. Eine direkte Wirkung von AMH auf die primordialen Follikel kann nicht ausgeschlossen werden, obwohl noch keine konkreten Angaben über die Expression des AMHR II Rezeptors in den primordialen Follikeln vorliegen. Alternativ kann die Wirkung von AMH auf die primordialen Follikel auch autokriner Natur sein, da die GC kleiner Follikel sowohl AMH als auch seinen Rezeptor exprimieren. Die kleinen Follikel werden eventuell durch AMH zu der Produktion eines noch nicht näher definierten Faktors, der auf die primordialen Follikel wirkt, stimuliert (Durlinger et al., 1999).

Weiters vermindert AMH die FSH-Sensitivität der Follikel, da AMH den FSH-abhängigen Anstieg der P450arom sowie der LHR verhindert und auch die Proliferation der GC reduziert (di Clemente et al., 1994, Durlinger et al., 1999). Diese Vorgänge spielen wahrscheinlich eine große Rolle bei der Selektion des dominanten Follikels (Visser et al., 2006).

Wie auch die anderen Mitglieder der TGF β Familie übt AMH seine Wirkung über Serin-Threonin-Kinase Rezeptoren aus. Auch hier liegt wieder ein Rezeptorkomplex vor, der

aus einem Typ I und einem Typ II Rezeptor besteht. AMH hat den gleichen Typ I Rezeptor wie die BMP-Familie. Der Typ II Rezeptor ist dagegen AMH spezifisch. Die intrazelluläre Signaltransduktion wird über die Smad 1,5 und 8, zusammen mit Smad 4, vermittelt (Baarends et al., 1995, Visser et al., 2006). Es wird angenommen, dass es nur einen Typ II Rezeptor gibt, da AMHR Knock-out Mäuse phänotypisch mit den AMH-defizienten Mäusen identisch sind (Visser et al., 2006). Der AMHR II wird postnatal vor allem in den GC von präantralen und antralen Follikeln exprimiert. Die Expression des Rezeptors zeigt dabei eine Kolokalisation mit der Expression von AMH (Baarends et al., 1995).

Tabelle 7.20 Wirkung von TGF β so wie AMH auf die Follikel

Ligand	Primordialer Follikel	Primärfollikel bis zum präantralen Follikel	antraler Follikel	Corpus Luteum
TGF β	?	?	Senkt die basale so wie die LH-Abhängige Androgen-Produktion in TC Unklare Wirkung auf GC	Vermittelt eventuell luteotrophe Wirkung, erhöht die Inhibin/Activin Expression in Granulosa-luteinzellen
AMH	Inhibiert die Rekrutierung primordialer Follikel	Senkt die GC-Mitosen und das FSH-responsive Follikelwachstum	?	?

?: noch nicht klar

GC: Granulosazellen, TC: Thekazellen, AMH: Anti-muellerian hormone, TGF β : Transforming growth factor β

7.7 Epidermal growth factor (EGF)

7.7.1 Familie (EGF-Familie)

Die EGF-Familie umfasst mindestens acht Mitgliedern, die eine ähnliche Struktur wie EGF aufweisen. Sie lassen sich in drei Kategorien einteilen:

- EGF und seine funktionellen Analoge TGF α (Transforming growth factor α) und AREG (Ampiregulin). Sie binden an EGFR aber nicht an andere Rezeptoren
- NRG (Neuregulin) und NRG-2. Sie binden an ihre Rezeptoren ErbB3 und ErbB4
- BTC (Betacellulin), EPR (Epiregulin) und HB-EGF (Heparin-binding EGF-like growth Factor). Sie binden an EGFR und ErbB4
- Insgesamt binden die Mitglieder der EGF-Familie an vier verschiedene Rezeptoren:
- Den EGFR auch HER oder ErbB genannt, den ErbB2 (Neu, HER-2), den ErbB3 (HER3), und den ErbB4 (HER4) (Riese und Stern, 1998).

7.7.2 EGF im Ovar

Die genauen Mechanismen, die nach dem LH-Peak zu den funktionellen Veränderungen in den Cumuluszellen führen, sind noch nicht vollständig geklärt. Offensichtlich ist, dass der LH-Peak der Auslöser verschiedener Veränderungen ist, aber weder Cumuluszellen noch die Oozyte exprimieren den LHR. Daher dürfte die Wirkung über parakrine und autokrine Faktoren vermittelt werden. EGF ist bei der Maus und bei der Ratte wesentlich an der Expansion des COC (Cumulus-oocyte-complex) beteiligt (Prochazka et al., 2000). Desweiteren spielt EGF eine wichtige Rolle bei der Reifung der Oozyte (Dekel und Sherizly, 1985) und kann somit als parakriner Mediator der LH-induzierten Ovulation angesehen werden.

Über die Expression des EGF ergibt sich zurzeit folgendes Bild:

EGF-Protein wurde in Oozyten und GC von frühen und späten Follikelstadien gefunden. Sie wurden beim Menschen (Maruo et al., 1993), beim Hamster (Roy und Greenwald, 1990), beim Schwein (Singh et al., 1995) und bei der Ziege (Silva et al., 2006) nachgewiesen. Die EGF mRNA wurde vor allem in der Oozyte und den GC antraler Follikel des Schweines (Singh et al., 1995) und der Ziege (Silva et al., 2006) lokalisiert.

Silva et al. (2006) haben als erste mRNA von EGF in frühen (Primordial-, Primär- und Sekundärfollikel) nachgewiesen. Dies unterstütze die Hypothese (Silva et al., 2004), dass EGF am Wachstum der Oozyte beteiligt ist. Die Hauptwirkungen von EGF im Follikel sind: Förderung der Proliferation der GC (Morbeck et al., 1993), Reduktion der Atresie-Rate (Wandji et al., 1996), Regulierung der TGFβR- und Connexin-43-Expression (Yang und Roy, 2001, Kennedy et al., 2003). Hinzu kommen die Stimulation der Oozyten-Reifung, die Verstärkung des Ca⁺⁺-Efflux in Cumuluszellen sowie die Förderung der Expansion der Cumuluszellen während der Reifung (Hill et al., 1999, Prochazka et al., 2000). Weiter stimuliert EGF ebenfalls die Antrumbildung (van den Hurk und Zhao, 2005). EGF nimmt zudem Einfluss auf die Östrogen-Produktion über die Inhibition der P450arom, aber inhibiert die FSH-induzierte StAR-Genexpression in GC (Misajon et al., 1999, Rusovici et al., 2005). Schließlich supprimiert EGF die cAMP- oder FSH-induzierte LH-R Expression in Granulosaluteinzellen (Pescador et al., 1999, Rusovici et al., 2005).

Tabelle 7.21 EGF-Expression

EGF	Maus		Ratte		Schaf		Ziege		Rind		Schwein	
	mRNA	Protein	mRNA	Protein	mRNA	Protein	mRNA	Protein	mRNA	Protein	mRNA	Protein
Primordialfollikel							+					
Oozyte								++				+++
Granulosazellen								++				
Primärfollikel							+					
Oozyte								++				+++
Granulosazellen								++				
Sekundärfollikel							+					
Oozyte								+			+++	++
Granulosazellen								++			+	+++
Thekazellen								+			+	+/-
Antraler Follikel (kl)												
Oozyte							+	+++			+++	++
Cumuluszellen							+	+++			+	+++
Murale GC							+	+++			+	+++
Thekazellen							+	+			+	+/-
Antraler Follikel (Gr)												
Oozyte							+	+			+++	++
Cumuluszellen							+	++			+	+++
Murale GC							+	++			+	+++
Thekazellen							+	+			+	+/-
Corpus luteum							-	+++			+	+
Atretischer Follikel											+	+

R: mRNA

P: Protein

GC: Granulosazellen

+: Expression vorhanden, ++: mittelstarke Expression vorhanden, +++: starke Expression vorhanden,

-: Keine Expression nachweisbar +/-: in Spuren

7.7.3 EGF-Rezeptor Expression (EGF-R)

Die Expression von EGF-mRNA und EGF-Protein sind in antralen Follikeln vieler Spezies gefunden worden, wie z.B. beim Schwein (Singh et al., 1995), Hamster (Garnett et al., 2002) und Mensch (Maruo et al., 1993). Garnett et al. (2002) fanden die Expression von EGFR mRNA und Protein vor allem in muralen GC, TC und in interstitiellen Zellen. Zudem wurde die Expression des EGF-R durch FSH in diesen Zellen verstärkt. Östrogen stimulierte die EGFR Expression in präantralen GC und Progesteron und hCG haben ausschließlich eine Wirkung auf die Expression in den TC und in den interstitiellen Zellen.

Der nach der Aktivierung von EGF-R eingeleitet Signaltransduktionsweg ist in den meisten Geweben der klassische MAP-Kinase Transduktionsweg. Allerdings können auch andere Signalübertragungswege wie der Protein-kinase-C (PKC), der PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase)-Transduktionsweg oder der G-Protein-gekoppelte Rezeptor aktiviert werden (Garnett et al., 2002).

Versuche am Hamster haben ergeben, dass EGF-R im Laufe der Follikelentwicklung nicht einheitlich exprimiert wird: in Follikeln, in denen die Zellproliferation dominiert, ist nur eine schwache Expression vorhanden, während in antralen Follikeln, bei denen die Zelldifferenzierung überwiegt, ist die EGF-R Expression deutlich höher ist.

Die EGF-R mRNA und Protein Expression in antralen Follikeln wird von FSH stimuliert (Garnett et al., 2002). Da EGF-R mRNA und das Protein ebenfalls in Primordial-, Primär- sowie Sekundärfollikeln gefunden wurde (Schwein (Singh et al., 1995), Hamster (Garnett et al., 2002), Ziege(Silva et al., 2006)) liegt die Vermutung nahe, dass EGF an dem Wachstum der frühen Follikelphasen beteiligt ist. Dies unterstützt die Untersuchungsergebnisse von Silva et al. (2004) in denen EGF das Wachstum der Oozyte fördert, und die Ergebnisse von Wandji et al. (1996) in denen EGF die Atresie-Rate reduziert.

Tabelle 7.22 Expression von EGF-R

EGF-R	Maus		Ratte		Schaf		Ziege		Rind		Schwein	
	mRNA	Protein	mRNA	Protein	mRNA	Protein	mRNA	Protein	mRNA	Protein	mRNA	Protein
Primordialfollikel							+					
Oozyte								++				+/-
Granulosazellen								+/-				++
Primärfollikel							+					
Oozyte								+				+/-
Granulosazellen								+				++
Sekundärfollikel							+					
Oozyte								+			+	++
Granulosazellen								++			+	++
Thekazellen								-			++	++
Antraler Follikel kl.												
Oozyte							+	+++			+	+
Cumuluszellen							+	+			++	++
Murale GC							+	+			++	++
Thecazellen							+	+/-			++	++
Antraler Follikel Gr.												
Oozyte							+	+			+	+
Cumuluszellen							+	++			++	++
Murale GC							+	++			++	++
Thecazellen							+	++			++	++
Corpus luteum							+	++			+	+
Atretischer Follikel												

R: mRNA

P: Protein,

Gr: gross, kl.: klein

GC: Granulosazellen

+: Expression vorhanden, ++: mittelstarke Expression vorhanden, +++: starke Expression vorhanden,

-: Keine Expression nachweisbar, +/-: in Spuren

7.7.4 EGF-like Growth factors

Neuere Untersuchungen belegen, dass LH in präovulatorischen Follikeln der Maus und der Ratte die Expression der EGF-like GF Amphiregulin (AREG), Epiregulin (EPR) und Betacellulin (BTC) induziert. Das räumliche und zeitliche Expressionsmuster dieser Faktoren ist der Expression von Prostaglandin Synthase 2 (Prgs2) und PGR sehr ähnlich (Shimada et al., 2006) sehr ähnlich.

Die Expression aller drei Faktoren wird durch eine ovulatorische Dosis des humanen LH Analogs hCG (humanes Choriogonadotropin) eine bis drei Stunden nach Verabreichung in Ovarien der Maus induziert. AREG und EPR mRNA erscheinen zuerst, BTC folgt kurz darauf (Park et al., 2004).

EPR wird vor allem in der Plazenta und in den peripheren Leukozyten adulter Tiere exprimiert. Strukturell ist EPR dem TGF α sehr ähnlich. Sein Gen-Locus befindet sich in unmittelbarer Nähe von AREG und BTC auf Chromosom 4 beim Menschen und auf Chromosom 5 bei der Maus (Harris et al., 2003).

AREG wurde ursprünglich als EGFR Ligand aus Phorbol-Ester-behandelten humanen Brustadenokarzinom-Zelllinien identifiziert. Reifes AREG wird zunächst als ein 252 transmembranöser Precursor synthetisiert. Als Ergebnis von posttranslationeller Modifizierung kommt es dann zur Bildung mehrerer Isoformen (Harris et al., 2003).

BTC wurde ursprünglich aus einer pankreatischen β -Zelllinie identifiziert und ist seitdem in vielen epithelialen so wie mesenchymalen Zellverbänden identifiziert worden. Die höchste Expression zeigt BTC im Pankreas, in der Leber, in der Niere und im Dünndarm (Harris et al., 2003).

Die meisten Studien über die „EGF-like Growth factors“ wurden in vitro durchgeführt. In Kulturen präovulatorischer Follikel induzieren AREG und EPR die Reifung der Oozyte fast genau so effektiv wie LH, während BTC nur partiell wirksam ist (Park et al., 2003, Park et al., 2004, Ashkenazi et al., 2005). Somit haben die EGF-like Faktoren parakrine Wirkung und vermitteln das LH-Signal. In vitro induzieren AR, EPR und BTC die Expression von COX-2 (Cyclooxygenase 2), tnfaip6 (TNF- α induced Protein) so wie von HAS-2 (Hyaluronsynthase 2), Gene die für die Synthese und Stabilisierung des extrazellulären Matrix durch Cumuluszellen nötig sind und potente Stimulatoren der Cumulus-Expansion darstellen (Hsieh et al., 2007).

Ashkenazi et al. (2005) haben in präovulatorischen Follikeln der Ratte die Wirkungen von AREG, ER und BTC untersucht. Diese Versuche wurden mit und ohne Inhibition der EGF-Rezeptoren durchgeführt. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass AR und ER die LH-induzierte Fortführung der Meiose in vitro stimulieren, während BTC hier bedeutend weniger wirksam ist.

7.7.5 Transforming Growth Factor α (TGF α)

Der TGF α oder „transforming growth factor alpha“ ist ein 5,6 kDa Protein, das biochemisch und physiologisch mit EGF verwandt ist. TGF α besitzt 40 % Homologie zu EGF. Er besteht aus 50 AS und wird wie EGF in einer Pro-Form synthetisiert, die erst durch die Abspaltung des Pro-Elementes aktiv wird. Zusammen mit EGF stimuliert TGF α die

Kernreifung der Oocyte sowie die Reifung des Zytoplasmas (Reeka et al., 1998), obwohl er mit EGF um den EGFR konkurriert.

Die erste umfassende Untersuchung von TGF α in Follikeln des Schweines wurde von Singh et al. (1995) durchgeführt. Sie stellten fest, dass die mRNA für TGF α in GC und in Cumuluszellen in relativ hoher Konzentration zu finden ist, in TC hingegen nur schwach nachweisbar ist. Immunhistochemisch zeigt TGF α Protein eine starke Anfärbung in GC und Cumuluszellen aller Follikelstadien. In primordialen und primären Follikeln ist TGF α Protein auch in der Oocyte zu finden. In antralen Follikeln ist das TGF α Protein ausschließlich in den GC lokalisiert. Später haben Reeka et al. (1998) beim Menschen die Expression von TGF α in den Oocytes der Primordial- und Primärfollikel, sowie in minimaler Menge in den präantralen Follikeln nachweisen können. In den präantralen Follikeln war die Expression von TGF α auch in GC vorhanden und die Expression in den TC, die ab dem präantralen Follikel nachweisbar war, nahm mit dem Wachstum der Follikel zu. Weiters haben Reeka et al. (1998) TGF α in atretischen Follikeln so wie im C.I. nachgewiesen. Die Expression von TGF α in den Follikeln anderer Tierarten ist noch nicht vollständig untersucht. Bisherige Untersuchungen haben ergeben, dass TGF α deutlich in den Oocytes der Rinde exprimiert wird (Glister et al., 2003). Desweiteren wird TGF α bei der Ratte vor allem in den GC und Blutgefäßen des Ovars gefunden (Ozcakir et al., 2005).

Die Wirkung von TGF α ist der von EGF sehr ähnlich. Es besitzt eine hohe mitogene Aktivität auf eine Vielzahl von entodermalen und ektodermalen Geweben. Beide Wachstumsfaktoren sind hoch potente angiogene Faktoren. Zudem bindet TGF α an die gleichen Rezeptoren wie EGF.

Beim Menschen sind EGF und TGF α besonders für die frühe FSH-induzierte Follikulogenese von Bedeutung. Sie spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Steroidogenese. In GC-Kulturen stimulieren TGF α und EGF, in Kombination mit FSH, die Synthese von Progesteron und 20- α -Dihydroprogesteron. Diese verstärkte Progesteronsynthese ist wahrscheinlich mit dem Mechanismus, durch den EGF und TGF α die GC vital erhalten, beteiligt.

In der Hypophyse wird TGF α nur im Vorderlappen exprimiert. Es wird vor allem von mammotropen so wie von somatotropen Zellen produziert. TGF α wirkt anschließend über den EGF-Rezeptor als parakriner Faktor auf die mammotropen Zellen. Östrogen verstärkt die TGF α Sekretion in der Hypophyse der Ratte und stimuliert dort die DNA-Replikation. Somit fördert TGF α die Proliferation der mammotropen Zellen (Oomizu et al., 2000). Damit wird

das Östrogen-induzierte Wachstum der mammotropen Zellen zum Teil von den TGF α produzierenden somatotropen Zellen dirigiert (Sharma et al., 2003).

7.8 Insulin-like growth factor-System, IGF-System

7.8.1 IGF-System

Das IGF-System beinhaltet mehrere für die Entwicklung der Follikel essentielle Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren. Es besteht aus zwei Liganden: IGF-I (7,6 kDa, früher Somatomedin-C) und IGF-II (7,4 kDa, früher Somatomedin-A). Die Namensgebung erfolgte von Humbel und Rinderknecht (1978) welche die Somatomedine als erste identifizierten. Desweiteren beinhaltet das System sechs Bindungsproteine, die IGFPs, und IGF-Rezeptoren (Monget und Monniaux, 1994).

IGF-I und IGF-II werden hauptsächlich von der Leber unter Einfluss von GH produziert. Sie sind niedermolekulare „single chain“ Polypeptide, mit starker Homologie zu Proinsulin. Sie wurden 1978 erstmals gereinigt und sequenziert (Rinderknecht und Humbel, 1978) und bestehen aus einer „A“-Kette und einer „B“-Kette, welchen noch um weitere C- und D-Segmente verlängert werden (Brzozowski et al., 2002). IGF-I wird von 70 AS gebildet und besitzt eine Homologie von etwa 50% zu Insulin und von 67% zu IGF-II (Daughaday und Rotwein, 1989, Clemmons, 1989, Brzozowski et al., 2002). Die beiden Ketten sind locker über Disulfidbrücken verbunden. Ein C-Peptid verbindet A und B. Ein D-Segment verlängert die A-Kette um jeweils 8(IGF I) bzw. 16 (IGF II) AS.

Das Gen für IGF-I liegt auf dem langen Arm von Chromosom 12 (Rotwein et al., 1986), das Gen für IGF-II auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 (Bell et al., 1985).

Des Weiteren besteht das IGF-System aus 2 Rezeptoren (IGF-IR und IGF-IIR), aus sechs Bindungsproteinen (IGFBP 1-6) und aus mehreren IGFBP-Proteasen (Fortune et al., 2004). IGF beeinflusst die Östradiol Synthese in antralen Follikeln und ist somit wesentlich an der Selektion beteiligt. IGFBPs wirken wiederum durch ihre Bindung von IGF negativ auf die Follikelentwicklung, Effekt der von IGFBP-Proteasen wieder aufgehoben werden kann (Fortune et al., 2004).

7.8.2 IGF-Rezeptor

Das IGF-System beinhaltet zwei Rezeptoren (Monget und Monniaux, 1994). Der Typ I Rezeptor ist genau wie der Insulinrezeptor ein Glykoprotein mit der Struktur eines Tetramers

und besteht aus zwei α - und β - Untereinheiten, die locker über Disulfidbrücken verbunden sind (Clemmons, 1989). Die extrazellulär gelegenen α -UE präsentieren die Bindungsdomäne für die Liganden (IGF-I, -II und Insulin) während die intrazellulär gelegenen hydrophoben β -UE eine ATP-Bindungsstelle, eine durch die Liganden aktivierbare Tyrosin-Kinase und eine Sequenz zur Autophosphorylierung zeigen. Der Rezeptor ist für fast alle Reaktionen von IGF-I und IGF-II verantwortlich und bindet mit absteigender Affinität IGF-I > IGF-II > Insulin (Clemmons, 1989). Die Bindungsstärke für IGF-II ist 4-mal niedriger für IGF-II und 800-mal niedriger für Insulin als für IGF-I (Clemmons, 1989).

Der Typ II Rezeptor bindet in vivo bevorzugt IGF-II und TGF β 1. Er bindet IGF-I mit 3-mal geringer Affinität und Insulin überhaupt nicht (Clemmons, 1989). Er besteht im Vergleich zu dem Insulinrezeptor und dem Typ I Rezeptor aus einer einfachen Kette (Clemmons, 1989) und ist dem Kationen unabhängigen Typ II des Mannose-6-phosphat-Rezeptors identisch (M6P) (Clemmons, 1989). Seine Hauptaufgabe ist das Erkennen so wie der Transport von lysosomalen Enzymen.

7.8.3 IGF-Bindungsprotein (IGFBP)

Das IGF-System beinhaltet weiter sechs IGF-Bindungsproteine (IGFBP), die in der Reihenfolge ihrer Charakterisierung durchnummeriert wurden. Sie binden IGF-I und IGF-II. Sie können in zwei Gruppen unterteilt werden: Die erste Gruppe besteht aus IGFBP-3. Dieses Bindungsprotein kommt am häufigsten vor und ist ein großer Komplex mit einem Molekulargewicht von 150 kDa. Seine Synthese wird durch GH stimuliert. In der Form dieses großen Komplexes ist es nur im Ovar anzutreffen, sonst hat es ein Molekulargewicht von 40-50 kDa, das dem der anderen Bindungsproteine entspricht (Monget und Monniaux, 1994). Die zweite Gruppe besteht aus IGFBPs, die ein Molekulargewicht von weniger als 40 kDa (IGF-1, -2, -5, -4, -6) aufweisen. Sie sind in nahezu allen Körperflüssigkeiten nachgewiesen worden und ihre Expression findet unabhängig oder umgekehrt proportional zur Konzentration von GH und/oder Insulin statt (Monget und Monniaux, 1994).

Die IGFBPs haben unterschiedliche Affinitäten für IGF-I und IGF-II und ihre Affinität für die IGFs kann durch posttranslationelle Modifikation moduliert werden (z.B. Phosphorylierung) (Mazerbourg et al., 2003). Weiter können manche IGFBPs an die Zellmembranen binden (IGFBP-1, -2, -3, -5) oder an einige Moleküle der extrazellulären Matrix (ECM), wie Laminin, Fibronectin, Kollagen Typ III und IV (IGFBP-5) (Jones et al., 1993). Sie befinden sich in löslicher Form in Körperflüssigkeiten und sind für den Transport

der IGFs zuständig. Sie binden die IGFs und speichern diese somit in der ECM so wie in der Zellmembran.

Die IGFBPs besitzen vielfältige Funktionen: Sie erhöhen die Halbwertszeit der IGFs, stellen ein Reservoir für die IGFs in allen Kompartimenten des Körpers dar und konkurrieren mit dem Typ I Rezeptor um die IGFs. Die Wirkung von IGF wird verstärkt wenn die IGFBPs (IGFBP-2,-3,-4,-5) hydrolytisch abgebaut werden oder wenn sie an die Zellmembran oder ECM gebunden werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die IGFBPs die Bioverfügbarkeit von IGF-I und IGF-II maßgeblich beeinflussen. Sie werden durch Proteolyse inaktiviert, wodurch die IGFs wieder frei gesetzt werden (Mazerbourg et al., 2003).

7.8.4 Expression von IGF I

Die Lokalisation der IGF-I Expression ist tierartlich sehr unterschiedlich. Bei den Nagern und beim Schwein ist die Expression von IGF-I mit der Expression von FSH-R in den GC gesunder wachsender Follikel kolokalisiert (Zhou et al., 1996, Adashi et al., 1997). Die Angaben über die IGF-Expression bei den Wiederkäuern sind kontrovers. Perks et al. (1995) haben beim Schaf mit in situ Hybridisierung keine IGF-I Expression im Follikel nachweisen können, auch Armstrong et al. (2000) beim Rind nicht. Andere Studien haben aber positive Ergebnisse hinsichtlich der IGF-I Expression im Follikel gefunden (Leeuwenberg et al., 1995, Yuan et al., 1998 Hastie und Haresign, 2006). Nach Hastie et al. (2006) beruhen diese unterschiedlichen Ergebnisse darauf, dass die IGF-I-Konzentrationen im Follikel bei den Wiederkäuern nicht besonders hoch sind und daher je nach Durchführung des Versuches falsch-negative Ergebnisse möglich sind. Beim Menschen sind niedrige Spiegel von IGF-I mRNA in den TC von Follikeln von 3-5 mm Durchmesser zu finden. Nach Hastie et al. (2004) ist IGF-I mRNA sowohl in GC als auch in TC zu finden. Es besteht kein Unterschied in der Expression zwischen den kleinen, mittleren und großen Follikeln. Neuere Untersuchungen beim Rind ergaben, dass in GC keine IGF-I Expression (Sudo et al. 2007). Die Autoren sind der Meinung, dass das in der Follikelflüssigkeit vorhandene IGF-I vor allem aus dem Blut stammt (Sudo et al., 2007).

Bei der Ratte existieren zwei IGF-I mRNA Transkripte, die sich am 5'-Ende unterscheiden (Shimatsu und Rotwein, 1987). Die Struktur des Gens wurde schon 1987 von Shimatsu und Rotwein (1987) charakterisiert.

Die Expression von IGF-I wird durch GH und durch Gonadotropine über den cAMP-Signaltransduktionsweg induziert und außerdem von (Hatey et al., 1992) EGF und TGF α stimuliert (Mondschein und Hammond, 1988).

7.8.5 Expression von IGF II

Das Muster der IGF-II-Expression weicht von dem der IGF-I-Expression ab. IGF-II wird ausschließlich in den TC exprimiert. Die Expression von IGF-II variiert im Laufe der Follikelentwicklung und findet auch noch in atretischen Follikeln statt. Beim Nager wird IGF-II ausschließlich in den TC exprimiert (Hernandez et al., 1990). Beim Rind und beim Schaf kann IGF-II mRNA in TC lokalisiert werden und seine Expression ist in Gonadotropin-unabhängigen Follikeln höher als in Gonadotropin-abhängigen Follikeln. Mit der Atresie der Follikel nimmt sie stark ab (Spicer und Echterkamp, 1995, Perks et al., 1995, Hastie und Haresign, 2006). IGF-II spielt eine Rolle für die Zellproliferation und in der Steroidogenese und korreliert mit dem Auftreten von LH-Rezeptoren in den TC. Beim Schwein ist in Primär- und präantralen Follikeln keine IGF-II Expression zu finden. IGF-II kommt in der TI von kleinen antralen und großen antralen Follikeln vor (Yuan et al., 1996). Obwohl die Lokalisation der IGF-II mRNA bei den meisten Tierarten ziemlich ähnlich ist, gibt es tierartige Unterschiede im zeitlichen Verlauf: so findet die IGF-II Expression beim Rind schon mit dem Beginn der Antrumbildung statt, während sie beim Schwein erst im ausgebildeten antralen Follikel erfolgt (Yuan et al., 1996).

Hastie et al. (2006) haben beim Schaf die Expressionen von IGF-I, IGF-II, und deren Rezeptoren untersucht. Sie stellen fest, dass der Typ I Rezeptor eine weitaus höhere Affinität für IGF-II als für IGF-I besitzt und postulieren daher, dass IGF-II wahrscheinlich der physiologisch wichtigere auto-/parakrine Faktor bei der Follikelentwicklung ist.

7.8.6 Wirkung der IGFs

IGF-I stimuliert bei Nagern, beim Schaf, beim Rind und beim Schwein sowohl die Proliferation als auch die Differenzierung der GC. Zudem stimuliert IGF-I die Steroidogenese in den TC (Giudice, 1992, Adashi et al., 1997, Mazerbourg et al., 2003).

Als Grundregel kann gelten, dass IGF-I die Wirkung von FSH auf die GC und von LH auf die TC und GC potenziert.

Beim Schaf stimuliert IGF-I in kleinen Follikeln (1-3 mm) eher die Proliferation der GC und in großen Follikeln (>5 mm) eher die Sekretion von Progesteron (Monniaux und

Pisselet, 1992). Dies geschieht unter anderem dadurch, dass IGF-I die Effekte von FSH oder GH auf die Steroidbiosynthese verstärkt (Hammond et al., 1988). Die Frage, ob IGF-I eine Rolle bei Atresie der Follikel spielt, bleibt noch zu klären (Hastie und Haresign, 2006).

IGF-I steigert die Progesteron-Synthese beim Schwein unter anderem, in dem es die Genexpression und Aktivität der P450scc sowie die Aktivität der P450arom erhöht. Bei der Ratte findet vor allem eine Steigerung der Aromatase Aktivität und eine Erhöhung LH-R Synthese statt (Giudice, 1992). Diese Steigerung der Steroidbiosynthese findet entweder allein oder zusammen mit einer Vermehrung der Gonadotropine statt (Giudice et al., 1995).

Versuche mit IGF-I-Knockout Mäuse zeigen, dass diese Tiere mit nur 60% des normalen Gewichtes zur Welt kamen. Außerdem besteht eine hohe perinatale Letalität. Allerdings zeigen erwachsene Tiere ein Follikelpopulation, die bis zum antralen Stadium nicht besonders beeinträchtigt erscheint, was darauf hindeutet, dass IGF-I in der Rekrutierung der Primordialfollikel keine besondere Bedeutung besitzen dürfte (Baker et al., 1996). Die FSH-Rezeptor-Expression ist aber stark beeinträchtigt. Daher wird vermutet, dass IGF-I wesentlich an der FSH-Responsivität der Follikel beteiligt sein könnte (Mazerbourg et al., 2003).

Auch synergistischen Wirkungen von IGF-I und FSH wurden vielfach untersucht. Besonders Velhuis et al. (1987) beschäftigen sich lange mit einer möglichen Synergie und stellen fest, dass die Progesteronproduktion, die Konzentration der Gesamtsteroiden und auch die Pregnenolonproduktion unter dem Einfluss beider Faktoren wesentlich höher ist als unter den Einfluss nur eines dieser Elemente.

Dessweiteren ist bekannt, dass E und IGF-I im Hinblick auf die Progesteronbiosynthese synergistisch wirken (Giudice, 1992). Ebenfalls wurde deutlich, dass die Östrogen-Produktion, welche von FSH induziert wird, von IGF-I verstärkt wird (van den Hurk und Zhao, 2005).

Monniaux et al. (1992) untersuchten den Einfluss von IGF-I auf die Zelldifferenzierung und Zellproliferation. Sie fanden heraus, dass IGF-I einen eher einen proliferativen Effekt auf die muralen GC und einen eher zelldifferenzierenden Effekt auf die Cumuluszellen besitzt.

Die proliferativen Eigenschaften von IGF-II wurden schon früh nachgewiesen (Monniaux, 1987, Kamada et al., 1992). IGF-II scheint ebenfalls eine Rolle bei der Steroidogenese zu spielen, da sein Expressionsmuster an das Auftreten von LH-R gekoppelt zu sein scheint (Carson et al., 1979). Da aber IGF-II bisher weitaus weniger untersucht wurde als IGF-I sind einige Funktionen von IGF-II noch unklar.

7.8.7 IGF-Rezeptor-Expression

Es gibt, wie weiter oben schon erwähnt, zwei Rezeptoren für die IGFs, nämlich den Typ I- und den Typ II-Rezeptor.

Die Angaben über ihre Expression sind sehr unterschiedlich:

Nach Monget et al. (1994) findet die Expression des IGF-Typ I Rezeptors beim Menschen, der Ratte, dem Rind und dem Schaf ab dem Zeitpunkt der Antrumbildung in den GC statt und bleibt bis zur Ovulation bestehen. Weiterhin behaupten diese Autoren, dass die Expression durch Gonadotropine und E stimuliert wird. Zudem wird bei dem Menschen und der Ratte der Rezeptor in den TC und der Ooc exprimiert. (Monget und Monniaux, 1994). Die Rezeptorexpression in TC wurde auch beim Schaf (Perks et al., 1995, Hastie und Haresign, 2006) und beim Rind (wenngleich auch nur in niedrigen Konzentrationen) in den TC nachgewiesen (Sudo et al., 2007).

Beim Rind und beim Schwein wurden von verschiedenen Autoren unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Während Perks et al. (1995) beim Schaf und Perks et al. (1999) beim Rind fanden, dass sich die Größe und Vitalität eines Follikels sich auf die Rezeptorexpression auswirkt und diese mit zunehmender Follikelgröße abnimmt, fanden Armstrong et al. (2000) wie auch Sudo et al. (2007) beim Rind zwar eine Rezeptorexpression in allen Follikelstadien, die jedoch während der gesamten Follikelentwicklung konstant blieb. Nach Mazerbourg et al. (2003) hingegen kommt es zu einer deutlichen Veränderung in der IGF-RI Expression während der Follikulogenese: so steigt die Expression beim Schaf vom Primärfollikel bis zum 1 mm großen Follikel, aber nicht vom 1mm großen Follikel bis zum präovulatorischen Follikel. Beim Rind ist eine Erhöhung der Expression von IGF-RI von Primärfollikel bis zum großen antralen gonadotropin-abhängigen-Follikel zu beobachten. Diese Unterschiede sind möglicherweise methodisch bedingt. Daher postulieren Sudo et al. (2007), dass der entscheidende Faktor beim IGF-System nicht die Expression von IGF im Ovar ist, sondern viel eher Menge an freien IGF-I in der Follikelflüssigkeit.

Zhou et al. (1996) fanden beim Schwein wieder eine von der Follikelgröße und Follikelgesundheit beeinflusste Expression des IGF-RI: so ist die Expression in gesunden wachsenden und dominanten Follikeln in den GC am größten. In atretischen Follikeln ist sie, unabhängig von Follikelgröße, nicht nachweisbar. Möglicherweise ist das Fehlen der Rezeptorexpression an der Atresie der Follikel beteiligt.

Die Expression von IGF-RI und IGF-II findet beim Schaf sowohl in den GC als auch in den TC statt (Perks et al., 1995, Mazerbourg et al., 2003, Hastie und Haresign, 2006), obwohl auch hier wieder die Konzentration in den GC größer ist.

Beim Rind wurde die Expression von IGF-IIR ebenfalls in TC und GC gefunden und zwar in gesunden als auch in atretischen Follikeln. Beim Menschen und beim Schwein wird der IGF-II ebenfalls in TC und GC exprimiert (Liu et al., 2000, Mazerbourg et al., 2003). Da der Typ II Rezeptor auch noch andere Liganden als IGF besitzt, bleibt die genaue Rolle des Typ II Rezeptors im Ovar noch zu klären.

Tabelle 7.23 IGF-R Expression und beeinflussende Faktoren

Quelle	Tierart	IGF-RI
Perks et al., 1995 Hastie et al., 2006	Schaf	Einfluss von Follikelgröße auf IGF-RI Expression
Perks et al., 1999 Armstrong et al., 2000	Rind	Einfluss von Follikelgröße auf IGF-RI Expression; Kein Einfluss von Follikelgröße auf IGF-RI Expression.
Zhou et al., 1996	Schwein	Follikelgröße nimmt Einfluss auf IGF-RI Expression.

7.8.8 IGF-Bindungsprotein-1 (IGFBP-1)

Über die Expression von IGFBP 1 in den Follikeln gibt es kontroverse Ergebnisse. Hastie et al. (2004) fanden eine Expression beim Schaf, die allerdings schwach und unregelmäßig war. Schams et al. (2002) erzielten beim Rind ein ähnliches Ergebnis und fanden, wenn überhaupt, nur eine sehr schwache Expression. Beim Menschen fanden El-Roeiy et al. (1994) eine IGFBP Expression in nicht Polyzystisches ovarielles Syndrom (PCOS) Ovarien. Weiter gibt es auch Studien beim Schwein, beim Menschen und bei der Ratte, die überhaupt keine Expression nachweisen konnten (Nakatani et al., 1991, Zhou et al., 1996, Voutilainen et al., 1996, Mazerbourg et al., 2003). Daher postulierten Hastie et al. (2006), dass es wahrscheinlich keine de novo IGFBP-Synthese im Follikel gibt, sondern das gefundene IGFBP aus dem Serum stammt.

7.8.9 IGF-Bindungsprotein-2 (IGFBP-2)

IGFBP-2 ist sowohl in den GC als auch in den TC zu finden, allerdings ist die Expression in den GC stärker als in den TC. Desweiteren ist die Expression in kleinen Follikeln höher als in großen (Liu et al., 2000). Beim Rind ist dabei allerdings die Expression in Subdominanten Follikeln (SDF) größer als in dominanten Follikeln (DF) (Sudo et al., 2007). Die Expression von IGFBP-2 nimmt also im Laufe der Follikelentwicklung beim Rind

ab. Diese Abnahme findet sich auch beim Schaf (Hastie und Haresign, 2006) und beim Schwein (Giudice, 1992).

Die Expression von IGFBP-2 wird von verschiedenen Hormonen und Wachstumsfaktoren beeinflusst. So sind IGF-I und FSH beide für die maximale Produktion von IGFBP-2 wichtig. FSH übt einen negativen Einfluss auf die Expression von IGFBP-2 aus und inhibiert dessen Expression in GC (van den Hurk und Zhao, 2005). Nach Roberts und Echternkamp (2003) ist die Expression von IGFBP-2 in den GC wesentlich von der Progesteronkonzentration in der FF abhängig und die Expression von IGFBP-2 mRNA in der FF korreliert negativ mit dem Progesteron- und Östradiol-Spiegel. Für Abnahme von IGFBP-2 in den späteren Follikelstadien gibt es zwei mögliche Ursachen: ersten eine Hemmung der Synthese und zweiten einen proteolytischen Abbau. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Speziesunterschiede bei der Proteolyse von IGFBP in der FF zu klären.

7.8.10 IGF-Bindungsprotein-4 (IGFBP-4)

Die Expression von IGFBP-4 ist der von IGFBP-2 sehr ähnlich und findet auch hier in allen Follikelstadien statt, und zwar vor allem in den TC. IGFBP-4 wird während des gesamten Zyklus exprimiert und auch ist die Expression in kleinen Follikeln stärker als in großen Follikeln. Gesunde Follikel exprimieren im Vergleich zu atretischen Follikeln ebenfalls höhere Konzentrationen (Hastie und Haresign, 2006). Weiter bestehen tierartliche Unterschiede in der IGFBP-4 Expression. So sind beim Rind und beim Schaf nur geringe IGFBP-4 Konzentrationen in den GC so wie in den TC zu finden. Zusätzlich findet mit dem Follikelwachstum eine Abnahme der Konzentration im Follikel statt (Mazerbourg et al., 2003, Hastie und Haresign, 2006). Bei der Ratte ist eine starke Zunahme der Konzentration an IGFBP-4 in den GC der atretischen Follikel zu finden (Erickson et al., 1992a). Beim Schwein und beim Menschen kommt es, im Unterschied zu den Wiederkäuern zu einer Erhöhung der mRNA im Laufe des Follikelwachstums (Zhou et al., 1996, Liu et al., 2000, Zhou et al., 2003). Beim Schwein ist die Expression in den TC größer als in den GC. Das Follikelstadium beeinflusst die IGFBP-4-Expression vor allem in der TI aber nicht in den GC. (Liu et al., 2000).

Das sinken der intrafollikulären Level von IGFBP-4 beim Schaf ist sehr stark auf eine proteolytische Degradation zurückzuführen (Mazerbourg et al., 2003). Auch in anderen Spezies ist die Proteolyse als Hauptelement, das die Aktivität von IGFBP-4 herabsetzt identifiziert worden (Primaten (Zhou et al., 2003), Schwein (Zhou et al., 1996)).

7.8.11 IGF-Bindungsprotein-5 (IGFBP-5)

Auch hier sind in der Expression wieder tierartliche Unterschiede vorhanden. So wird beim Schaf IGFBP-5 vor allem in den TC exprimiert und die Konzentration nimmt von kleinen Follikeln zu großen Follikeln ab (Besnard et al., 1996). Zu dem kommt eine massive Zunahme der Konzentration in den GC der atretischen Follikeln (Mazerbourg et al., 2003). Die Zunahme der Konzentration in den GC ist ebenfalls beim Rind und auch bei der Ratte zu beobachten (Erickson et al., 1992b). Im Kontrast dazu ist bei der Maus die Expression von IGFBP-5 in den GC von gesunden Primärfollikeln und Sekundärfollikeln hoch und nimmt in späteren Follikelstadien so wie bei der Atresie ab (Wandji et al., 1998). Beim Schwein ist die Expression von IGFBP-5 auf die Oberfläche des germinalen Epithels und des Epithels in den Kapillaren beschränkt (Zhou et al., 1996).

Wie auch schon IGFBP-2 und IGFBP-4 wird die Expression von IGFBP-5 stark durch FSH in der Ratte inhibiert (Liu et al., 1993). Beim Schaf ist kein solcher Einfluss von FSH auf die IGFBP-5 Expression nachweisbar (Mazerbourg et al., 2003).

7.8.12 IGF-Bindungsprotein-6 (IGFBP-6)

Lange Zeit gab es keine Ergebnisse über eine signifikante Expression von IGFBP-6 in Säugetieren (Mazerbourg et al., 2003). Erst neuere Untersuchungen von Hastie et al. (2006) haben gezeigt, dass beim Schaf IGFBP-6 in wachsenden Follikeln exprimiert wird. In kleinen Follikeln gibt es keine Unterschiede in den IGFBP-6-Konzentrationen, unabhängig von der Vitalität des Follikels. Bei der Ratte haben Rohan et al. (1993) gezeigt, dass IGFBP-6 im Ovar exprimiert wird, allerdings vor allem im Ovar juveniler Ratten und bedeutend weniger bei adulten Tieren. Bei den Primaten haben Arraztoa et al. (2002) gezeigt, dass die IGFBP-6 Expression im Interstitium des Ovar und in der TI nur im geringem Maße, verstärkt aber im Oberflächenepithel des Ovars vorkommt.

7.8.13 IGF-Bindungsprotein-3 (IGFBP-3)

Im Gegensatz zu IGFBP-1, -2, -4, -5, -6 ist IGFBP-3 ein großer Komplex von über 150 kDa. Er kommt vor allem im Serum und in der Follikelflüssigkeit vor (Ongeri et al., 2005). Mazerbourg fanden, dass die IGFBP-3 Expression im Follikel niedrig ist und kaum mit dem Follikelwachstum und der Follikelatresie assoziiert ist. Hastie et al. (2006) fanden hingegen beim Schaf eine deutliche IGFBP-3 Expression im Follikel, sowohl in den GC als auch in den

TC. Dabei war die Expression in kleinen Follikeln intensiver als in großen und in gesunden größer als in atretischen. IGFBP-3 wirkt sowohl über die Modulation der IGF-Bioverfügbarkeit als auch über IGF-unabhängige Mechanismen (Ongeri et al., 2005). Faktoren, welche die IGFBP-3-Expression beeinflussen, sind unter anderem IGF-I und cAMP (Ongeri et al., 2005).

7.9 Growth Hormon oder Somatotropin (GH, STH) und sein Rezeptor GH-R

Das Wachstumshormon (Growth hormone, GH, Somatotropin STH) ist ein in dem vorderen Hypophysenlappen produziertes Hormon, das in vielen verschiedenen Geweben das Wachstum fördert. GH stimuliert dabei die Produktion von IGF-I. Die Sekretion von GH ist während der Pubertät am höchsten. Einfluss auf die Sekretion von GH haben unter anderem GHRH (GnRH-releasing hormone), Schlaf, Bewegung, die Blutzuckerwerte und hormonale Einflüsse, wie die Konzentration an Östrogenen. Unter den Inhibitoren von GH sind unter anderem Somatostatin und die Glukokortikoide zu nennen.

Das GH-Sekretion zeigt ein charakteristisches circadianes Muster, bei dem der Großteil von GH über mehrere große Peaks über den Tag verteilt abgegeben wird.

GH beeinflusst das Follikelwachstum auf mehreren Wegen. Zu den Wirkungen von GH, die das Follikelwachstum beeinflussen, gehört die Freisetzung von Gonadotropinen und Einflussnahme auf die ovarielle Steroidogenese. Dies wurde unter anderem bei Untersuchungen der Expression von Rezeptoren für Wachstumshormon (GH-R) während der Follikulogenese gefunden.

Über die Expression von GH-R in den Follikeln liegen erst relativ wenige Daten vor. GH-R wurde schon bei verschiedenen Säugetierarten identifiziert, so bei der Maus, der Ratte, dem Hasen, dem Schwein, dem Schaf, dem Rind und dem Menschen, aber das zeitliche Muster der GH-R-Expression ist noch nicht vollständig geklärt (Leung et al., 1987, Smith et al., 1989, Mathews et al., 1989, Adams et al., 1990, Cioffi et al., 1990, Hauser et al., 1990). Die wichtigsten Ergebnisse der Untersuchungen über die GH-R-Expression sind im Folgenden kurz zusammen gefasst:

Bei der Ratte wird GH-R sowohl in den GC gesunder Follikel als auch im C.I. gefunden (Carlsson et al., 1993).

Spätere Untersuchungen von Eckery et al. (1997) ergaben beim Schaf, dass GH-R in allen Follikeln, von den Primordialfollikeln bis zu dem kleinen antralen Follikel exprimiert wird. Die Expression erfolgt dabei sowohl in den GC als auch in der Oozyte. Zusammen mit

dem Befund, dass die Rezeptoren für FSH, LH und IGF-I nicht die limitierenden Faktoren bei der Rekrutierung der Follikel zu sein scheinen, ergibt dies einen starken Hinweis dafür, dass GH eine direkte Funktion, eine Schlüsselrolle, bei der Follikulogenese beim Schaf spielen könnte (Eckery et al., 1997).

Untersuchungen beim Rind haben gezeigt, dass die Expression von GH-R vor allem in den Primordialfollikel und Primärfollikel vorkommt, daneben vor allem auch in den GC sekundärer Follikel und in den Cumuluszellen tertiärer Follikel (Kölle et al., 1998). Dieses Ergebnis weist darau hin, das GH von großer Bedeutung für die frühen Phasen der Follikulogenese sein dürfte. Beim Schwein liegen über die GH-R-Lokalisation im Ovar noch keine Ergebnisse vor.

Neuere Versuche von Shimizu et al. (2007), in denen die Expression des GH-R mit der Konzentration von Östrogen und FSH korreliert wurden, ergaben folgende Befunde: die Konzentration von GH-R in GC wird durch Behandlung mit Östrogen vermindert und durch Behandlung mit FSH erhöht. Obwohl die maximale GH-R Expression in jenen Follikeln stattfindet, die eine starke Östrogen-Sekretion aufweisen, wird die Regulation der GH-R-Expression in den Follikeln durch andere Faktoren als auch Östrogen reguliert. Eventuell ist GH-R mit der Proliferation der GC nach dem FSH-Anstieg assoziiert. Daher vermutet man, dass die Erhöhung der GH-R-Expression in den Follikeln von entscheidender Bedeutung für den Eintritt der Follikel in die ovulatorische Phase sein könnte.

Tabelle 7.24 Faktoren, welche die Expression von GH-R beeinflussen

Faktoren	Wirkung auf GH-R
FSH	Erhöht die Expression von GH-R in den GC
Östrogen	Vermindert die Konzentration von GH-R in den GC
Östrogen und FSH zeitgleich	Keine Induktion von GH-R

FSH: Follikelstimulierendes Hormon, GC: Granulosazellen, GH-R: GH Rezeptor

Die Studien über die Expression von GH-R in den Follikeln müssen noch fortgeführt werden, um die Bedeutung von GH auf die Follikelentwicklung, und die Rolle, welche der GH-R dabei spielt, genauer abzuklären.

7.10 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

7.10.1 Vaskulogenese und Angiogenese, ihre Bedeutung für die Follikelentwicklung

Die Vaskulogenese ist die de novo Synthese von Blutgefäßen aus mesenchymalen Vorläuferzellen. Sie tritt vor allem in der pränatalen Periode auf. Die Angiogenese hingegen ist das Bilden neuer Blutgefäße durch Proliferation und Wanderung von Endothelzellen aus schon existierenden Gefäßen. Die pathologische Form der Angiogenese ist im wachsenden Tumor zu finden sowie bei der Blutgefäßversorgung von Metastasen. Physiologische Neubildung von Blutgefäßen kommt beim adulten Säugetier nur beim weiblichen Tier vor, und zwar im Uterus, in der Plazenta, in den Milchdrüsen und in den Ovarien.

Die Entwicklung der Follikels ist von der Angiogenese abhängig. Der Atresie der Follikel geht eine Reduktion der Vaskularisation voraus. Die Angiogenese tritt besonders im späten präantralen Follikel-Stadium auf, wenn die TC-Schicht rasch an Dicke zunimmt (Findlay, 1986). Die Blutgefäße der Follikel beschränken sich auf die Theca interna und die Theca externa. Dabei werden zwei kapilläre Netzwerke ausgebildet, ein inneres und ein äußeres, die in den entsprechenden Thekazell-Schichten liegen. Alle Blutgefäße bleiben außerhalb der Basalmembran der Granulosazell-Schicht, die damit bis zum Zeitpunkt der Ovulation, avaskulär bleibt (Shimizu et al., 2002).

Mehrere Studien belegen, dass der dominante Follikel ein besser ausgebildetes Kapillarbett als die untergeordneten Follikel besitzt und somit von einer erhöhten Gonadotropinzufuhr besonders profitiert (Zeleznik et al., 1981, Ferrara, 2000, Shimizu et al., 2002). Diese Beobachtung führte zu der Vorstellung, dass die Vaskularisation des Follikels eine wichtige Rolle bei der Follikelselektion spielt (Zeleznik et al., 1981).

Die frühesten Zeichen der Follikeldegeneration bzw. Atresie sind assoziiert mit einer reduzierten DNA-Synthese der Endothelzellen und mit einer daraus resultierenden verminderten Vaskularisation der Follikel (Greenwald, 1989).

Der wichtigste Faktor bei der Angiogenese der Follikel ist VEGF. Er ist ein potenter Stimulator der endothelialen Zell-Proliferation und Wanderung und beeinflusst zudem die Permeabilität der Kapillaren. VEGF vermittelt seine Wirkung durch folgende zwei Tyrosin-Kinase Rezeptoren: VEGFR1 und VEGFR2 (Neufeld et al., 1999). FGF-2 ist ebenfalls ein potentes endotheliales Mitogen. Es ist primär in den endothelialen Zellen und Perizyten der

TC lokalisiert und wird in weiter entwickelten Follikeln stärker exprimiert (Berisha et al., 2000).

7.10.2 VEGF-Familie

Die VEGF Familie der Wachstumsfaktoren wird auch als Cystin-Knoten Familie bezeichnet. Ihre Mitglieder binden an spezielle Tyrosin-kinase-Rezeptoren und spielen häufig eine entscheidende Rolle bei der Neovaskularisation. Die VEGF-Familie besteht aus sieben Mitgliedern: VEGF-A, VEGF-B, Placenta growth factor (PlGF), VEGF-C, VEGF-D, virales VEGF (VEGF-E) und snake venom VEGF (VEGF-F). Obwohl die Mitglieder strukturell stark homolog sind, besteht eine große Diversität unter den Subtypen und einige Isoformen werden durch alternatives Spleißen bedingt. Diese Spleiß-Varianten besitzen unterschiedliche Eigenschaften, insbesondere hinsichtlich ihrer Bindung an die Rezeptoren (VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR) und VEGFR-3 (Flt-4)) und an die Co-Rezeptoren Neuropilin und Heparin.

VEGF-A ist ein homodimeres Glykoprotein, welches in 9 Isoformen exprimiert wird: VEGF_{121, 145, 148, 162, 165, 165b, 183, 189} und ₂₀₆. Sie stammen alle von einem einzigen Gen ab. Funktionell sind alle Mitglieder der VEGF-Familie potent Mitogen für endotheliale Zellen und ein Stimulatoren der vaskulären Permeabilität. Damit zählen sie zu den wichtigsten Faktoren bei der Regulierung der normalen und anormalen Angiogenese.

7.10.3 VEGF Expression

VEGF ist für die Follikelentwicklung von besonderer Bedeutung, da er einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren für die Bildung des kapillaren Netzwerkes ist und somit entscheidend die Blut-, Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr zu dem Follikel beeinflusst. In den frühen Follikelphasen werden die Follikel hauptsächlich durch passive Diffusion von den Blutgefäßen her ernährt. Mit zunehmendem Follikelwachstum entsteht ein individuell strukturiertes kapillares Netzwerk, das den Anforderungen der wachsenden Follikel angepasst ist. Dieser Gefäßmantel ist auf die TI beschränkt und ist durch die Basalmembran der Granulosazellschicht bis zur Ovulation von den GC getrennt.

Die Expression von VEGF mRNA folgt im Allgemeinen folgendem Muster: VEGF wird in Primordialfollikeln, Primärfollikeln so wie frühen Sekundärfollikeln nicht exprimiert. VEGF kommt erst in den GC und TC der späten Sekundärfollikel vor, die ein eigenes Kapillarnetzwerk ausgebildet haben, auf (Fraser, 2006). Interessanterweise nimmt die Expression von VEGF bei Follikeln, die der Ovulation sehr nah sind, in den GC wieder ab.

Nach Celik-Ozenci et al. (2003) findet bei der Ratte nur eine schwache VEGF Expression statt. In primordialen so wie primären Follikeln fanden sie keine VEGF Expression in GC. Diese beginnt erst mit der Antrumbildung und nimmt dann mit der weiteren Follikelentwicklung an Stärke zu. Eine schwache Immunoreaktivität für VEGF ist auch in den Oozyten der sekundären Follikel zu finden. Anschließend nimmt in den GC und TC die VEGF Expression mit wachsendem Follikel (Sekundärfollikel und Tertiärfollikel) zu (Celik-Ozenci et al., 2003). Allerdings ist die Zunahme des VEGF-Gehalts in den GC deutlich höher als in den TC (Fraser et al., 2006). Frühe Ergebnisse von Phillips et al. (1990) zeigten, dass kaum eine Expression von VEGF in den GC der Ratte zu beobachten ist. Spätere Untersuchungen von Koos et al. (1995) haben jedoch gezeigt, dass VEGF sowohl von den GC als auch von den TC exprimiert wird, und dass diese Expression von hCG stimuliert werden kann.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch 1997 von Yamamoto et al. erzielt, die beim Menschen in primordialen und primären GC keine VEGF-Expression nachweisen konnten (Yamamoto et al., 1997).

Berisha et al. (2000) haben nachgewiesen, dass beim Rind vor allem die kleinen Spleißvarianten VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ exprimiert werden. Allerdings sind die genauen Unterschiede der Varianten in dem Follikel noch nicht bekannt (Shimizu et al., 2002). Zudem haben sie klar demonstriert, dass die mRNA und das Protein von VEGF beim Rind mit dem Follikelwachstum in den GC zunimmt. VEGF mRNA ist in den GC kleiner Follikel nur in geringer Menge vorhanden, die Expression nimmt allerdings mit dem Follikelwachstum zu und ist in den präovulatorischen Follikeln am größten. Hingegen kann die Expression von VEGF in der TI schon bei kleinen Follikeln deutlich nachgewiesen werden, und steigt im Verlauf des weiteren Follikelwachstums stark an (Berisha et al., 2000). Die hohe Expression von VEGF in reifen präovulatorischen Follikeln (zusammen mit FGF2) lässt vermuten, dass beide Faktoren stark an der Angiogenese um die wachsenden Follikel beteiligt sind. Die Tatsache dass VEGF vor allem in den TC exprimiert wird, lässt darauf schließen, dass VEGF als chemisches Signal für die aussprossenden endotheliale Zellen dient.

Ergebnisse von Barboni et al. (2000) haben gezeigt, dass bei dem Schwein die Expression von VEGF in mittleren und großen Follikeln nach eCG (equines Chorogonadotropin)-Gabe ansteigt. Dieser Anstieg findet allerdings nur in den GC statt, während die Expression in den TC von eCG unbeeinflusst scheint. Dieser Befund lässt vermuten, dass die Zunahme der VEGF-Expression nicht von der Größe des Follikels an sich

sondern von seiner Entwicklung abhängt. Weiters hat dieselbe Gruppe nachweisen können, dass die Expression nach hCG-Gabe aufhört und dass die Expression von VEGF in antralen Follikeln als Antwort auf eine Stimulation mit FSH ansteigt. Dieses Muster der VEGF-Expression führt zur Ausbildung eines Gradienten, der angiogenen Wachstumsfaktoren, der die Bildung von Kapillaren fördert. Die Expression von VEGF in den GC scheint die GC nicht autokrin zu beeinflussen, da nur sehr wenige Rezeptoren für VEGF in den GC in der reifen Follikelstadien vorhanden sind (Berisha et al., 2000).

7.10.4 Funktion von VEGF

Wie schon erwähnt besitzt VEGF mehrere wichtige Funktionen in der Follikulogenese. VEGF ist an der Bildung des Gefäßnetzes der Follikel beteiligt, VEGF ist sehr stark mitogen (Senger et al., 1993, Ferrara und Davis-Smyth, 1997) und stimuliert die vaskuläre Permeabilität. Diese Eigenschaften von VEGF wurden durch Versuche geklärt, bei denen VEGF durch Gabe von VEGF-Antikörpern ausgeschaltet wurde. Dadurch wurde das normale Follikelwachstum deutlich beeinträchtigt (Zimmermann et al., 2001). Weiter führt das Blockieren der VEGF-Wirkung mit einer modifizierten Form des Fms-like Tyrosin Kinase (Flt-1) Rezeptors zu einem 87% Abfall der Thekazell-Proliferation der sekundären und tertiären Follikel, zu einer Abnahme der Proliferation der Endothelzellen und einem Abfall der Flt-1 mRNA Expression (Wulff et al., 2001). Des Weiteren führt das Behandeln des Ovars mit einer Injektion von VEGF-Genfragmenten zu einem deutlichem Wachstum des Ovars, zu einer höheren Anzahl an Graaf Follikeln, sowie zur verstärkten Ausbildung von Blutgefäßen um diese Follikel herum (Shimizu und Sato, 2005).

Die Angiogenese spielt, wie erwähnt, bei der Follikelbildung eine sehr wichtige Rolle. Bedingt durch einen angiogenen Gradienten, entsteht ein inneres und ein äußeres kapillares Netzwerk in der TI und TE. Dieses Kapillar-Netzwerk ist nötig, um den ansteigenden Bedürfnissen an Substraten des wachsenden Follikels gerecht zu werden. Die Fähigkeit des Follikels, VEGF zu synthetisieren ist somit ein essentieller limitierender Faktor für sein Wachstum. Barboni et al. (2000) haben untersucht, ab wann ein Follikel VEGF produziert und konnten nachweisen, dass die VEGF-Produktion stark von der Follikelgröße abhängig ist. Beim Schwein erlangen Follikel mit einer Größe von 4-5mm die Fähigkeit, VEGF zu produzieren. Außerdem steigen die Menge an VEGF mRNA und das VEGF Protein im Laufe der Follikelentwicklung deutlich an (Barboni et al., 2000).

7.10.5 VEGF-Rezeptoren (VEGFR)

An der Wirkung von VEGF sind drei Tyrosin-Kinase Rezeptoren und zwei nicht Tyrosin-Kinase Rezeptoren beteiligt. Zu den Tyrosin-Kinase Rezeptoren gehören VEGFR-1 (Flt-1, fms-like tyrosin-kinase-1), VEGFR-2 (Flt-1/KDR, kinase insert domain-containing receptor) sowie VEGFR-3 (Flt-4). Zu den Membranproteinen gehören Neuropilin 1 (NRP-1) und Neuropilin 2 (NRP-2). Hierbei handelt es sich um Co-Rezeptoren für einige Subtypen der VEGF-Isoformen (Yamazaki und Morita, 2006).

Die VEGFR besitzen sieben Immunglobulin-ähnliche Domänen in der extrazellulären Region, eine transmembranöse Region und eine Tyrosin-Kinase Domäne (Berisha et al., 2000).

Die Expression von VEGFR-1 und VEGFR-2 findet vor allem in den TC statt und scheint parallel zur VEGF Expression zu verlaufen. Dies deutet darauf hin, dass VEGF eventuell die Expression seines Rezeptors beeinflusst (Shimizu et al., 2002). Jede VEGF Isoform bindet mit unterschiedlicher Affinität und Selektivität an die VEGF-Rezeptoren und Co-Rezeptoren. Dies unterstreicht die Diversität ihrer biologischen Funktionen (Yamazaki und Morita, 2006).

Shimizu et al. (2007) haben die Expression der Rezeptoren in den Follikeln untersucht und festgestellt, dass die mRNA vor allem in den endothelialen Zellen der TC lokalisiert ist und erstmals ab späten sekundären Follikel nachweisbar ist. Die Expression nimmt anschließend in den Tertiärfollikeln zu. In den atretischen Follikeln ist die Expression stark vermindert (Wulff et al., 2001). Eine frühere Studie von Shimizu et al. (2003) hat gezeigt, dass nach einer Injektion von VEGF in die GC der Flt-1 stärker ansteigt als der Flk-1. Ein Unterschied zwischen den beiden Rezeptoren ist, dass der Gehalt an Flt-1 in GC des Rindes im Verlauf der Follikelselektion konstant bleibt, während Flk-1 von dem Prä-selektionsfollikel zu dem Post-selektionsfollikel ansteigt (Shimizu et al., 2007). Des Weiteren vermuten Shimizu et al., dass Flk-1 für die Transduktion des biologischen Signals von VEGF in bovinen GC wichtig ist.

Die VEGFR-Expression in den TC ist bei verschiedenen Tierarten unterschiedlich: Flt-1 und Flk-1 verändern ihre Expression in den Follikeln des Rindes nicht im Laufe des Follikelwachstums (Berisha et al., 2000, Shimizu et al., 2007). Beim Schwein hingegen nimmt die Expression von Flk-1 in TI von mittleren und großen antralen Follikeln nach eCG-Behandlung stark zu, parallel zu einem Anstieg von VEGF₁₂₀ und VEGF₁₆₄ (Shimizu et al.,

2002). Dieser Unterschied zwischen den beiden Spezies könnte an einer unterschiedlichen Follikelentwicklung bei mono- im Vergleich zu multiovulatorischen Spezies liegen.

7.10.6 Neuropilin-1 (NRP-1), Neuropilin-2 (NRP-2)

Über die Expression der VEGF-Rezeptoren NRP-1 und NRP-2 während der Follikelentwicklung ist noch wenig bekannt. NRP-1 wurde erstmals in Brustkrebszellen als VEGF-Rezeptor identifiziert. Kurz darauf wurde ein zweiter Rezeptor für VEGF₁₆₅ identifiziert, der als NRP-2 bezeichnet wurde (Soker et al., 1998). Die NRP haben kurze intrazelluläre Domänen und sind daher als eigenständige Rezeptoren ungeeignet. Dies wurde in einem Versuch bestätigt, in dem VEGF₁₆₅ in Zellen ohne VEGFR-2 Expression keine Reaktion hervorrief (Soker et al., 1998). Somit ist wahrscheinlich, dass NRP-1 ein Co-Rezeptor für VEGF darstellt. Diese Vermutung wurde durch Studien bestätigt, in denen VEGFR-2 VEGF₁₆₅ intensiver bindet, wenn zur gleichen Zeit auch NRP-1 exprimiert wird (Soker et al., 1998).

NRP-1 und NRP-2 werden in Ovarien zyklischer aber auch von nicht geschlechtsreifen Ratten exprimiert (Pavelock et al., 2001, Miyabayashi et al., 2005). NRP-1 und NRP-2 sind dabei stark an der Vaskularisation der Follikel beteiligt.

Shimizu et al. (2006) haben die Expression von NRP-1 und NRP-2 beim Rind untersucht und gezeigt, dass NRP-1 sowohl in den GC als auch in den TC exprimiert wird, während NRP-2 ausschließlich in den TC exprimiert wird. Diese Ergebnisse deuten auf unterschiedliche Funktionen der beiden Rezeptoren im Ovar des Rindes während der Follikelentwicklung hin.

Östradiol steigt in der späten Follikelentwicklung stark an und der Östrogen-Anstieg ist wichtig für die Follikelselektion. Die Expression von NRP-1 steigt in Zellkulturen nach Östradiol-Gabe ebenfalls stark an. Somit könnte NRP-1 eventuell an der Follikelselektion beteiligt sein. Progesteron dagegen reduziert die NRP-1 Expression in GC, deutlich, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass das NRP-1 Gen durch den Progesteron-Rezeptor gehemmt werden kann. Allerdings ist der genaue Mechanismus der durch Progesteron induzierten NRP-1 Hemmung noch weitgehend unklar (Shimizu et al., 2006).

Bis jetzt ist die NRP-2 Genexpression nur in den TC bekannt (Shimizu et al., 2006).

Es sind auch hier noch weitere Untersuchungen notwendig, um tierartlich Vergleiche der NRP-Expression herzustellen, so wie um die Mechanismen der NRP-Expression genauer zu erforschen.

8 Abschließende Betrachtung

Die Follikulogenese ist ein äußerst komplexer Prozess, der durch eine Vielzahl von Regelkreisen, in denen Wachstumsfaktoren und Hormone sich gegenseitig beeinflussen, gekennzeichnet ist.

In den letzten Jahren sind viele neue Erkenntnisse über die Follikulogenese hinzugekommen. So war es lange Zeit gängige Meinung, dass der embryonal angelegte Pool an Follikeln eine definitive Größe darstellt, welche nur noch durch Abnahme der Follikelanzahl (durch Ovulation und Atresie) verändert werden kann. Neuere Befunde deuten aber darauf hin, dass es eine Stammzellpopulation (im Oberflächenepithel des Ovars) an Keimzellen gibt, von der aus der Pool der Primordialfollikel auch postnatal erneuert werden kann (Johnson et al., 2004, Bukovsky et al., 2005).

Ein wichtiger Punkt, der noch nicht vollständig geklärt ist, ist die initiale Rekrutierung der Follikel. Dieser Prozess stellt einen langsam ablaufenden Übergang dar, in dem Primordialfollikel über Transitionsfollikel zu Primärfollikeln werden. Obwohl viele Faktoren bekannt sind, welche sich an dieser Initiierung der Rekrutierung beteiligen ist der genaue Mechanismus, der der initialen Rekrutierung der PROF zugrunde liegt, noch nicht vollständig geklärt. Zum Beispiel ist die Bedeutung von LIF (Leukemia inhibiting factor) bei diesem Schritt der Follikelentwicklung noch nicht klar. LIF stimuliert in Zellkulturen der Ratte deutlich den Übergang der PROF (Primordialfollikel) in PRIF (Primärfollikel) (Nilsson et al., 2002), allerdings findet die Follikulogenese auch in LIF-defizienten Mäusen statt (Nilsson et al., 2002). Somit ist die Bedeutung von LIF für diesen Schritt der Follikulogenese nicht gesichert. Wahrscheinlich ist, dass LIF einen Einfluss auf KL ausübt und somit die PROF aktiviert. Besonders bei GDF-9 wird klar, dass viele tierartspezifische Besonderheiten noch unbekannt sind. So wird GDF-9 in einigen Tieren (Maus, Ratte, Mensch) erst in den Primärfollikeln exprimiert, in anderen hingegen (Schaf und Rind) schon in den Primordialfollikeln. Somit stellt sich die Frage, ob in den verschiedenen Tierarten GDF-9 verschiedene Funktionen aufweist, oder die gleiche Funktionen zu unterschiedlichen Zeitpunkten übernimmt.

Bei der Rekrutierung der Follikel weist das Schwein eine Besonderheit auf: es exprimiert die P450arom als einziges Tier auch in der Theca interna und kann so deutlich mehr Östrogen als andere Spezies zu produzieren

Weiterhin sind auch bei der Follikelselektion, obgleich dieser Vorgang intensiv erforscht wurde, noch viele Fragen offen. So ist zum Beispiel unklar, worauf die Sonderstellung des (bzw. der) selektierten Follikel aus einer Kohorte resultiert. Gesichert scheint eine Beteiligung von VEGF an der Follikelselektion. VEGF spielt durch seine angiogene Wirkung eine wichtige Rolle bei der Etablierung der Dominanz eines Follikels (Garrido et al., 1993). Aber wie wichtig VEGF für die Selektion und die Dominanz eines Follikels wirklich ist, bleibt für die einzelnen Spezies noch zu klären. Ein wesentliches Kriterium bei der Selektion der Follikel ist auch die Expression von LH-R (LH Rezeptor) in den Granulosazellen. Diese findet zu einem Zeitpunkt statt, in dem die Expression von FSH sinkt und somit ein Großteil der Follikel atresieren. Die Expression von LH-R ermöglicht den Follikeln, diese Atresie zu umgehen. Allerdings gibt es auch hier wieder Autoren, welche die Frage aufwerfen, ob die LH-R Expression tatsächlich die Selektion bewirkt (Gong et al., 1996, Fortune et al., 2001, Fortune et al., 2004). Evans et al. (1997) haben herausgefunden, dass die Expression von LH-R sich während der Selektion nicht verändert, und somit seine Schlüsselstellung bei der Follikelselektion wenig wahrscheinlich ist. Andere hingegen, so zum Beispiel Bao et al. (1998) fanden sehr wohl eine zeitliche Korrelation zwischen der Expression von LH-R und der Follikelselektion.

Weiter ist anzumerken, dass wahrscheinlich erhebliche Unterschiede zwischen mono- und polyovulatorischen Spezies bestehen. So ist beim Rind in der Regel nur ein dominanter Follikel vorhanden, welcher die Entwicklung weiterer Follikel der Kohorte unterdrückt, wodurch diese dann atresieren. Beim Schaf hingegen können sowohl der dominante Follikel der aktuellen Follikelwelle als auch der dominante Follikel der vorherigen Welle zur gleichen Zeit vorhanden sein (Duggavathi et al., 2004). Dies wurde durch Versuche klar, in denen beim Schaf durch eine FSH-Gabe eine neue Follikelwelle erzeugt wurde, obwohl noch ein dominanter Follikel vorhanden war. Damit wird deutlich, dass der dominante Follikel beim Schaf nicht in gleicher Weise seine Dominanz ausübt, wie der dominante Follikel beim Rind. Beim Schwein ist die Wirkung eines dominanten Follikels auch nicht ausgeprägt, da sich hier durch einen Shift von FSH zu LH gleich eine ganze Gruppe von Follikeln zu antralen Follikeln entwickeln und keine Follikelwellen zu beobachten sind (Knox et al., 2005).

Obwohl in den letzten Jahren viele Ergebnisse auf dem Gebiet der Follikulogenese hinzugekommen sind, bleiben viele Fragen offen und ungeklärt. Ein besonderes Desiderat der Forschung besteht hinsichtlich folgender Fragen:

- Mit welchen Mechanismen reagieren die GnRH-Neurone auf Östrogene, obwohl sie keine Östrogen-Rezeptoren exprimieren (Wintermantel et al., 2006)?
- Welche Bedeutung haben BMP-6 und BMP-7 bei der FSH β - und LH β -Expression? Huang et al. (2001) haben für diese beiden Elemente eine Wirkung auf die Expression der FSH β - und LH β -Untereinheiten gefunden, aber es ist nicht klar, ob diese Faktoren alleine wirken, oder ob sie ihre Wirkung als Homodimere oder Heterodimere ausüben.
- Ist der FSH-R (FSH Rezeptor) an der Selektion beteiligt?
- Welche Funktion haben die verschiedenen Spleißvarianten für LH bei der Follikulogenese?
- Wirkt sich KL positiv auf die Proliferation der GC aus? Reynaud et al. (2000) so wie Otsuka und Shimasaki (2002) haben bestätigt, dass sich KL positiv auf die Proliferation der GC auswirkt. Allerdings wird kein c-Kit (KL Rezeptor) in den GC exprimiert. Daher stellt sich die Frage, wie dieses Signal von KL übermittelt wird. Eine Hypothese besagt, dass dieses KL-Signal eventuell von Faktoren wie GDF-9 (Growth differentiation factor 9) oder BMP-15 (Bone morphogenetic protein 15) übermittelt wird (Otsuka und Shimasaki, 2002, Gilchrist et al., 2004).
- Es konnte gezeigt werden, dass das Activin-Inhibin-Follistatin-System die Expression von FSH maßgeblich beeinflusst (Winters et al., 2007). Ein vergleichbares Peptid-System ist bei der Expression von LH bisher nicht gefunden worden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Follikulogenese ein hochkomplexer Prozess ist, der durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst wird, die sich gegenseitig in vielfältiger Weise beeinflussen. Wenngleich eine Vielzahl von Befunden vorliegt, müssen viele der bei der Follikulogenese ablaufenden Teilprozesse bei den Haussäugetieren noch eingehender charakterisiert werden.

9 Zusammenfassung

Diese Literaturstudie befasst sich mit der Genexpression während der Follikulogenese bei Haus- und Versuchstieren, insbesondere bei den Tierarten Maus, Ratte, Schaf, Rind und Schwein. Sie soll darstellen, wie sich verschiedene Wachstumsfaktoren und Hormone auf das Follikelwachstum auswirken und wie sie sich gegenseitig beeinflussen. In dieser Studie werden besonders tierartliche Unterschiede hervorgehoben.

Die Follikelentwicklung wird von einer Vielzahl von Hormonen und Wachstumsfaktoren induziert und beeinflusst. Diese werden teilweise in der Hypophyse produziert (zum Beispiel FSH, LH; Activin, BMP-6, BMP-7) und wirken endokrin auf die Follikel oder autokrin auf die Hypophyse selbst. Teilweise werden diese Faktoren auch lokal produziert und wirken autokrin auf das Kompartiment, in dem sie produziert werden, parakrin auf ein angrenzendes Kompartiment (zum Beispiel AMH), oder endokrin auf die Hypophyse (zum Beispiel Activin, Inhibin und FSH) oder den Hypothalamus (Zum Beispiel Östrogen).

Die beteiligten Faktoren können in mehrere Kategorien eingeteilt werden:

- Die hypophysären und hypothalamischen Hormone. Dazu gehören das Follikelstimulierende Hormon (FSH), das luteinisierende Hormon (LH) sowie das Gonadotropin releasing Hormon (GnRH).
- Die Hormone Testosteron, Progesteron und Östrogen und ihre Metaboliten.
- Die an der lokalen Hormon-Produktion beteiligten Enzyme. Dazu gehören das Steroid acute regulatory protein (StAR), das Enzym Cytochrom P450 side chain cleavage (P450scc), das Enzym 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3 β -HSD), das Enzym Cytochrom 17- α Hydroxylase (P450c17) sowie das Enzym P450 Aromatase (P450arom).
- Das Activin-Inhibin-Follistatin System, welches sowohl lokal im Ovar als auch hypophysäre Wirkungen aufweist.
- Die lokal gebildeten Wachstumsfaktoren.
 - KL und sein Rezeptor c-Kit.
 - die HGF-Familie (Hepatocyte growth factor-Familie).
 - die FGF-Familie (Fibroblast growth factor-Familie).
 - der KGF (Keratinocyte growth factor), der zwar zur FGF-Familie gehört, aber funktionell dem HGF zuzurechnen ist.

- die TGF β -Familie (Transforming growth factor β -Familie).
- die EGF-Familie (Epidermal growth factor-Familie).
- die IGF-Familie (Insulin-like growth factor Familie).
- GH (Growth hormone).
- und die VEGF-Familie (Vascular endothelial growth factor-Familie).

Hinsichtlich der verschiedenen Phasen der Follikelentwicklung lassen sich unterscheiden:

- Bildung der primordialen Keimzellen, ihre Wanderung in die Gonaden-Anlagen sowie die Bildung der Primordialfollikel,
- Initiale Rekrutierung und Gonadotropin-unabhängiges Wachstum zum Primärfollikel und zum frühen Sekundärfollikel,
- Zyklische Rekrutierung und Gonadotropin-abhängiges Wachstum zum Tertiärfollikel,
- Selektion und Wachstum zum Graaf Follikel, die unter LH-Einfluss erfolgen.

Die tierartlichen Unterschiede der Zyklen (zum Beispiel monoovulatorisch, polyovulatorisch) wurde besonders eingegangen.

An den verschiedenen Phasen der Follikelentwicklung sind unterschiedliche Faktoren involviert.

- Bis zum Primordialfollikel sind vor allem BMP-2 (Bone morphogenetic protein), BMP-4 und BMP-8, so wie KL (Kit Ligand) und sein Rezeptor c-Kit beteiligt.
- Der genaue Mechanismus der initialen Follikelrekrutierung ist noch nicht geklärt, aber es dürften unter anderem KL, der c-Kit Rezeptor, als Faktoren der Transforming growth factor β Familie vor allem die Mitglieder BMP-4 und BMP-7, der basische Fibroblast growth factor (Nilsson et al., 2002), KGF, sowie Wachstumsfaktoren der Hepatocyte growth factor Familie involviert sein. Nilsson et al. (2004) kamen zu dem Ergebnis, dass KL zusammen mit bFGF am Übergang des Primordialfollikel zum Primärfollikel beteiligt ist. Weiterhin wirken KL, KGF und HGF bei der Rekrutierung der Primordialfollikel synergistisch. AMH hingegen hat eine inhibitorische Wirkung auf die initiale Follikelrekrutierung (Durlinger et al., 1999).

- Alle diese Faktoren sind an dem Follikelwachstum und an der Proliferation und Differenzierung der Follikelzellen beteiligt. Weiterhin sind auch Hormone (LH, FSH, und Steroide) am Follikelwachstum beteiligt.

Besonders hervorzuheben sind GDF-9 und BMP-15. Diese beiden Faktoren stellen von den Oozyten sezernierte Faktoren da, welche im frühen Follikelwachstum von großer Bedeutung sind und sowohl die Reifung und Entwicklung der Oozyten als auch die Proliferation der Granulosazellen fördern (Bodensteiner et al., 1999). Allerdings ist bis heute keine eindeutige Funktion dieser beiden Faktoren bei der initialen Rekrutierung nachgewiesen. Die Expression von BMP-15 kann erst im Primärfollikel nachgewiesen werden (Dube et al., 1998).

- An der zyklischen Rekrutierung sowie an der Selektion sind vor allem die Hormone LH und FSH so wie Östrogen und Progesteron beteiligt.

- Weiterhin spielen beim Follikelwachstum die steroidogenen Enzyme, die Faktoren Activin-Inhibin-Follistatin, Mitglieder der Insulin-like growth factor (IGF)-Familie, die Faktoren der Epidermal growth factor (EGF)-Familie sowie die Vascular endothelial growth factor(VEGF)-Familie eine bedeutende Rolle. IGF kann dabei als ein Verstärker von FSH in den Granulosazellen und von LH in den TC betrachtet werden (Giudice, 1992, Adashi et al., 1997, Mazerbourg et al., 2003).

EGF ist wesentlich an der Expansion des Cumulus-Oozyten.Komplexes sowie an der Oozyten Reifung beteiligt (Prochazka et al., 2000) und dürfte als Mediator der LH-induzierten Follikelreifung fungieren. VEGF seinerseits ist nötig, um bei den wachsenden Follikeln die Angiogenese zu stimulieren und damit die gesteigerte Blutversorgung zu gewährleisten.

10 Summary

In this study, data from the literature on the gene expression during folliculogenesis in both domestic and laboratory animals, especially mice, rats, sheep, cows and pigs has been evaluated. The focus was on hormones and growth factors involved in folliculogenesis. Furthermore, the differences between these species are highlighted.

The development of follicles in the ovary is induced and controlled by a great number of hormones, enzymes and growth factors. Some of these are produced in the hypothalamus, some in the pituitary (for example FSH, LH; Activin, BMP-6, BMP-2), and others in the follicles. These components act in an endocrine, parakrine or autokrine manner on the hypothalamus, the pituitary or the follicle.

The factors involved in folliculogenesis can be classified as follows:

- The hypothalamic hormone gonadotropin releasing hormone and the pituitary hormones (FSH and LH).
- Hormones like testosterone, progesterone, oestrogen and their metabolites.
- Steroidogenic enzymes like steroid acute regulatory protein (StAR), the cytochrome P450 side chain cleavage enzyme (P450_{scc}), the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD), the cytochrom 17 α -hydroxylase (P450_{c17}) and P450 aromatase (P450_{arom}).
- The Activin-Inhibin-Follistatin- System, which is involved in regulating the function of the ovary and the pituitary.
- Locally produced growth factors of the ovary.
 - KL (kit ligand) and its receptor c-Kit
 - Hepatocyte growth factor (HGF) family
 - Fibroblast growth factor (FGF) family
 - Keratinocyte growth factor (KGF)
 - Members of the transforming growth factor β (TGF β) family
 - Epidermal growth factor (EGF) family
 - Members of the insulin like growth factor (IGF) family
 - Growth hormone (GH)

- Finally the vascular endothelial growth factor (VEGF) family

During folliculogenesis, the following classification of follicle growth can be made:

- Origin of primordial germ cells, migration and proliferation, generation of the primordial follicle
- Initial recruitment, where a pool of follicle starts to grow, without being dependent on gonadotropins.
- Cyclic recruitment, where an increase of FSH rescues a cohort of follicles from atresia
- Selection and growth of the Graffian follicle

The differences between the different animals have been looked at (monoovulatory vs. polyovulatory).

During the different steps of the folliculogenesis, a great number of growth factors and hormones are involved

- Up to the primordial follicle, these are BMP-2 (bone morphogenetic protein 2), BMP-4, BMP-8, KL (Kit Ligand) and its receptor c-Kit.
- The exact mechanism of the initial recruitment is not yet understood fully, but many factors have been shown to be involved: for example KL, c-Kit, bone morphogenetic protein (BMP)-4 and -7, the basic fibroblast growth factor (bFGF), KGF, and factors of the HGF family. KL induces together with bFGF the primordial to primary follicle transition. Moreover KL, KGF and HGF work in synergy on the initial follicle recruitment. AMH has an inhibitory effect on primordial follicle growth (Durlinger et al., 1999).
- All these factors are involved in growth and differentiation of the follicle. Additionally the hormones androgen, oestrogen and progesterone and their building enzymes play an essential role. The differentiation factor 9 (GDF-9) and the bone morphogenetic protein-15 (BMP15) appear to be especially important. These two factors are secreted by the oocyte and are essential during early follicular growth. They induce granulosa cell proliferation and maturation of the oocyte (Bodensteiner et al., 1999). There is no evidence that these factors are involved in initial follicle recruitment.
- Furthermore factors like the activin-inhibin-follistatin-system, VEGF (vascular endothelial growth factor), EGF (epidermal growth factor) and members of the IGF-family (Insulin like growth factor) must be named and play important

roles during folliculogenesis. IGF is an enhancer of FSH in the granulosa cells and of LH in the theca cells. EGF is especially involved in the maturation of oocytes and in the expansion of the cumulus-oocyte-complex. VEGF is necessary for growing follicles to assure blood supply.

III. Literaturverzeichnis

---, (1992). Report on the nomenclature of the IGF binding proteins.

Abdennebi, L., Monget, P., Pisselet, C., Remy, J. J., Salesse, R. and Monniaux, D., (1999). Comparative expression of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptors in ovarian follicles from high and low prolific sheep breeds.

Abdennebi, L., Lesport, A. S., Remy, J. J., Grebert, D., Pisselet, C., Monniaux, D. and Salesse, R., (2002). Differences in splicing of mRNA encoding LH receptor in theca cells according to breeding season in ewes. *Reproduction* 123 (6), 819-26.

Adams, T. E., Baker, L., Fiddes, R. J. and Brandon, M. R., (1990). The sheep growth hormone receptor: molecular cloning and ontogeny of mRNA expression in the liver. *Mol Cell Endocrinol* 73 (2-3), 135-45.

Adams, G. P., (1999). Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J Reprod Fertil Suppl* 54 17-32.

Adashi, E. Y., Resnick, C. E., Croft, C. S., May, J. V. and Gospodarowicz, D., (1988). Basic fibroblast growth factor as a regulator of ovarian granulosa cell differentiation: a novel non-mitogenic role. *Mol Cell Endocrinol* 55 (1), 7-14.

Adashi, E. e. a., (1989). Tumor necrosis factor alpha inhibits gonadotropin hormonal action in nontransformed ovarian granulosa cells. A modulatory noncytotoxic property. 264 (20), 11591-7.

Adashi, E. Y., Resnick, C. E., Payne, D. W., Rosenfeld, R. G., Matsumoto, T., Hunter, M. K., Gargosky, S. E., Zhou, J. and Bondy, C. A., (1997). The mouse intraovarian insulin-like growth factor I system: departures from the rat paradigm. *Endocrinology* 138 (9), 3881-90.

Adashi, E. Y., (1998). The potential role of interleukin-1 in the ovulatory process: an evolving hypothesis. *Mol Cell Endocrinol* 140 (1-2), 77-81.

Agca, C., Ries, J. E., Kolath, S. J., Kim, J., Forrester, L. J., Antoniou, E., Whitworth, K. M., Mathialagan, N., Springer, G. K., Prather, R. S. and Lucy, M. C., (2006). Luteinization of porcine preovulatory follicles leads to systematic changes in follicular gene expression. *Reproduction* 132 (1), 133-45.

Albano, R. M., Groome, N. and Smith, J. C., (1993). Activins are expressed in

preimplantation mouse embryos and in ES and EC cells and are regulated on their differentiation. *Development* 117 (2), 711-23.

Albarracin, C. T., Kaiser, U. B. and Chin, W. W., (1994). Isolation and characterization of the 5'-flanking region of the mouse gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Endocrinology* 135 (6), 2300-6.

Albertini, D. F. and Carabatsos, M. J., (1998). Comparative aspects of meiotic cell cycle control in mammals. *J Mol Med* 76 (12), 795-9.

Allan Edgar V., (1922). The oestrous cycle in the mouse. *American journal of anatomy* (30), 297-348.

Amelang D., (1983). Kopulationsverhalten und relative Darwin-Fitness bei männlichen Ratten verschiedener Inzuchtstämme und congenitaler Sublinien.

Amsterdam, A., Hanoch, T., Dantes, A., Tajima, K., Strauss, J. F. and Seger, R., (2002). Mechanisms of gonadotropin desensitization. *Mol Cell Endocrinol* 187 (1-2), 69-74.

Andrews, W. V., Staley, D. D., Huckle, W. R. and Conn, P. M., (1986). Stimulation of luteinizing hormone (LH) release and phospholipid breakdown by guanosine triphosphate in permeabilized pituitary gonadotropes: antagonist action suggests association of a G protein and gonadotropin-releasing hormone receptor. *Endocrinology* 119 (6), 2537-46.

Aono, A., Hazama, M., Notoya, K., Taketomi, S., Yamasaki, H., Tsukuda, R., Sasaki, S. and Fujisawa, Y., (1995). Potent ectopic bone-inducing activity of bone morphogenetic protein-4/7 heterodimer. *Biochem Biophys Res Commun* 210 (3), 670-7.

Arai, K. Y., Ohshima, K., Watanabe, G., Arai, K., Uehara, K. and Taya, K., (2002). Dynamics of messenger RNAs encoding inhibin/activin subunits and follistatin in the ovary during the rat estrous cycle. *Biol Reprod* 66 (4), 1119-26.

Armstrong, J. and Childs, G. V., (1997). Changes in expression of epidermal growth factor receptors by anterior pituitary cells during the estrous cycle: cyclic expression by gonadotropes. *Endocrinology* 138 (5), 1903-8.

Ascoli, M., Fanelli, F. and Segaloff, D. L., (2002). The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocr Rev* 23 (2), 141-74.

Ashkenazi, H., Cao, X., Motola, S., Popliker, M., Conti, M. and Tsafiriri, A., (2005). Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. *Endocrinology* 146 (1), 77-84.

Attardi, B., Marshall, G. R., Zorub, D. S., Winters, S. J., Miklos, J. and Plant, T. M., (1992). Effects of orchidectomy on gonadotropin and inhibin subunit messenger

ribonucleic acids in the pituitary of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Endocrinology* 130 (3), 1238-44.

Attardi, B. and Winters, S. J., (1998). Transcriptional regulation of the glycoprotein hormone alpha-subunit gene by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in alphaT3-1 cells. *Mol Cell Endocrinol* 137 (2), 97-107.

Attisano, L., Carcamo, J., Ventura, F., Weis, F. M., Massague, J. and Wrana, J. L., (1993). Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell* 75 (4), 671-80.

Baarends, W. M., Uilenbroek, J. T., Kramer, P., Hoogerbrugge, J. W., van Leeuwen, E. C., Themmen, A. P. and Grootegoed, J. A., (1995). Anti-mullerian hormone and anti-mullerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. *Endocrinology* 136 (11), 4951-62.

Bach, L. A., (2005). IGFBP-6 five years on; not so 'forgotten'? *Growth Horm IGF Res* 15 (3), 185-92.

Bahceci, M., Ulug, U., Turan, E. and Akman, M. A., (2006). Comparisons of follicular levels of sex steroids, gonadotropins and insulin like growth factor-1 (IGF-1) and epidermal growth factor (EGF) in poor responder and normoresponder patients undergoing ovarian stimulation with GnRH antagonist. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* .

Baird, D., (2006). Role des gonadotrophines du follicule preantral au preovulatoire. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 35 (5 Pt 2), 2S24-2S29.

Baker, B. L., Karsch, F. J., Hoffman, D. L. and Beckman, W. C. J., (1977). The presence of gonadotropic and thyrotropic cells in the pituitary pars tuberalis of the monkey (*Macaca mulatta*). *Biol Reprod* 17 (2), 232-40.

Baker, J. C. and Harland, R. M., (1997). From receptor to nucleus: the Smad pathway. *Curr Opin Genet Dev* 7 (4), 467-73.

Bakker, J. and Baum, M. J., (2000). Neuroendocrine regulation of GnRH release in induced ovulators. *Front Neuroendocrinol* 21 (3), 220-62.

Bao, B., Garverick, H. A., Smith, G. W., Smith, M. F., Salfen, B. E. and Youngquist, R. S., (1997a). Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biol Reprod* 56 (5), 1158-68. (a)

Bao, B., Garverick, H. A., Smith, G. W., Smith, M. F., Salfen, B. E. and

Youngquist, R. S., (1997b). Expression of messenger ribonucleic acid (mRNA) encoding 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase delta4,delta5 isomerase (3beta-HSD) during recruitment and selection of bovine ovarian follicles: identification of dominant follicles by expression of 3beta-HSD. *Biol Reprod* 56 (6), 1466-73. (b)

Bao, B. and Garverick, H. A., (1998). Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J Anim Sci* 76 (7), 1903-21.

Bao, B., Calder, M. D., Xie, S., Smith, M. F., Salfen, B. E., Youngquist, R. S. and Garverick, H. A., (1998). Expression of steroidogenic acute regulatory protein messenger ribonucleic acid is limited to theca of healthy bovine follicles collected during recruitment, selection, and dominance of follicles of the first follicular wave. *Biol Reprod* 59 (4), 953-9.

Bao, B., Kumar, N., Karp, R. M., Garverick, H. A. and Sundaram, K., (2000). Estrogen receptor-beta expression in relation to the expression of luteinizing hormone receptor and cytochrome P450 enzymes in rat ovarian follicles. *Biol Reprod* 63 (6), 1747-55.

Baratta, M., West, L. A., Turzillo, A. M. and Nett, T. M., (2001). Activin modulates differential effects of estradiol on synthesis and secretion of follicle-stimulating hormone in ovine pituitary cells. *Biol Reprod* 64 (2), 714-9.

Barboni, B., Turriani, M., Galeati, G., Spinaci, M., Bacci, M. L., Forni, M. and Mattioli, M., (2000). Vascular endothelial growth factor production in growing pig antral follicles. *Biol Reprod* 63 (3), 858-64.

Bedecarrats, G. Y. and Kaiser, U. B., (2003). Differential regulation of gonadotropin subunit gene promoter activity by pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in perfused L beta T2 cells: role of GnRH receptor concentration. *Endocrinology* 144 (5), 1802-11.

Beg, M. A. and Ginther, O. J., (2006). Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. *Reproduction* 132 (3), 365-77.

Bell, G. I., Gerhard, D. S., Fong, N. M., Sanchez-Pescador, R. and Rall, L. B., (1985). Isolation of the human insulin-like growth factor genes: insulin-like growth factor II and insulin genes are contiguous. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 (19), 6450-4.

Ben Said, S., Lomet, D., Chesneau, D., Lardic, L., Canepa, S., Guillaume, D., Briant, C., Fabre-Nys, C. and Caraty, A., (2007). Differential estradiol requirement for the induction of estrus behavior and the luteinizing hormone surge in two breeds of sheep. *Biol Reprod* 76 (4), 673-80.

Bendell, J. J. and Dorrington, J., (1988). Rat thecal/interstitial cells secrete a transforming growth factor-beta-like factor that promotes growth and differentiation in rat granulosa cells. *Endocrinology* 123 (2), 941-8.

Bendell, J. J. and Dorrington, J. H., (1990). Epidermal growth factor influences growth and differentiation of rat granulosa cells. *Endocrinology* 127 (2), 533-40.

Bergland, R. M. and Torack, R. M., (1969). An ultrastructural study of follicular cells in the human anterior pituitary. *Am J Pathol* 57 (2), 273-97.

Berisha, B., Schams, D., Kosmann, M., Amselgruber, W. and Einspanier, R., (2000). Expression and localisation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. *J Endocrinol* 167 (3), 371-82.

Berisha, B., Sinowatz, F. and Schams, D., (2004). Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family members during the final growth of bovine ovarian follicles. *Mol Reprod Dev* 67 (2), 162-71.

Berisha, B., Welter, H., Shimizu, T., Miyamoto, A., Meyer, H. H. D. and Schams, D., (2006). Expression of fibroblast growth factor 1 (FGF1) and FGF7 in mature follicles during the periovulatory period after GnRH in the cow. *J Reprod Dev* 52 (2), 307-13.

Bernard, D. J. and Woodruff, T. K., (2001). Inhibin binding protein in rats: alternative transcripts and regulation in the pituitary across the estrous cycle. *Mol Endocrinol* 15 (4), 654-67.

Bernard, D. J., Chapman, S. C. and Woodruff, T. K., (2001). Mechanisms of inhibin signal transduction. *Recent Prog Horm Res* 56 417-50.

Besnard, N., Pisselet, C., Monniaux, D., Locatelli, A., Benne, F., Gasser, F., Hatey, F. and Monget, P., (1996). Expression of messenger ribonucleic acids of insulin-like growth factor binding protein-2, -4, and -5 in the ovine ovary: localization and changes during growth and atresia of antral follicles. *Biol Reprod* 55 (6), 1356-67.

Biernacka-Lukanty, J. M., Lehmann, T. P. and Trzeciak, W. H., (2004). Inhibition of CYP17 expression by adrenal androgens and transforming growth factor beta in adrenocortical cells. *Acta Biochim Pol* 51 (4), 907-17.

Bilezikjian, L. M., Vaughan, J. M. and Vale, W. W., (1993). Characterization and the regulation of inhibin/activin subunit proteins of cultured rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 133 (6), 2545-53.

Bilezikjian, L. M., Corrigan, A. Z., Blount, A. L. and Vale, W. W., (1996).

Pituitary follistatin and inhibin subunit messenger ribonucleic acid levels are differentially regulated by local and hormonal factors. *Endocrinology* 137 (10), 4277-84.

Bilezikjian, L. M., Blount, A. L., Leal, A. M. O., Donaldson, C. J., Fischer, W. H. and Vale, W. W., (2004). Autocrine/paracrine regulation of pituitary function by activin, inhibin and follistatin. *Mol Cell Endocrinol* 225 (1-2), 29-36.

Bley, M. A., Saragueta, P. E. and Baranao, J. L., (1997). Concerted stimulation of rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis by sex steroids and follicle-stimulating hormone. *J Steroid Biochem Mol Biol* 62 (1), 11-9.

Blume-Jensen, P., Janknecht, R. and Hunter, T., (1998). The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Curr Biol* 8 (13), 779-82.

Bodensteiner, K. J., Clay, C. M., Moeller, C. L. and Sawyer, H. R., (1999). Molecular cloning of the ovine Growth/Differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biol Reprod* 60 (2), 381-6.

Bodensteiner, K. J., McNatty, K. P., Clay, C. M., Moeller, C. L. and Sawyer, H. R., (2000). Expression of growth and differentiation factor-9 in the ovaries of fetal sheep homozygous or heterozygous for the inverdale prolificacy gene (FecX(I)). *Biol Reprod* 62 (6), 1479-85.

Bottaro, D. P., Rubin, J. S., Ron, D., Finch, P. W., Florio, C. and Aaronson, S. A., (1990). Characterization of the receptor for keratinocyte growth factor. Evidence for multiple fibroblast growth factor receptors. *J Biol Chem* 265 (22), 12767-70.

Brankin, V., Hunter, M. G., Horan, T. L., Armstrong, D. G. and Webb, R., (2004). The expression patterns of mRNA-encoding stem cell factor, internal stem cell factor and c-kit in the prepubertal and adult porcine ovary. *J Anat* 205 (5), 393-403.

Brankin, V., Quinn, R. L., Webb, R. and Hunter, M. G., (2005). BMP-2 and -6 modulate porcine theca cell function alone and co-cultured with granulosa cells. *Domest Anim Endocrinol* 29 (4), 593-604.

Braw-Tal, R., (2002). The initiation of follicle growth: the oocyte or the somatic cells? *Mol Cell Endocrinol* 187 (1-2), 11-8.

Braw-Tal, R. and Roth, Z., (2005). Gene expression for LH receptor, 17 alpha-hydroxylase and StAR in the theca interna of preantral and early antral follicles in the bovine ovary. *Reproduction* 129 (4), 453-61.

Bridges, P. J., Komar, C. M. and Fortune, J. E., (2006). Gonadotropin-induced

expression of mRNA for cyclooxygenase-2 (COX-2) and production of prostaglandins E and F₂alpha in bovine preovulatory follicles are regulated by the progesterone receptor.

Endocrinology .

Bristol-Gould, S. K., Kreeger, P. K., Selkirk, C. G., Kilen, S. M., Cook, R. W., Kipp, J. L., Shea, L. D., Mayo, K. E. and Woodruff, T. K., (2006). Postnatal regulation of germ cells by activin: the establishment of the initial follicle pool. *Dev Biol* 298 (1), 132-48.

Britt, J. H., Esbenshade, K. L. and Ziecik, A. J., (1991). Roles of estradiol and gonadotropin-releasing hormone in controlling negative and positive feedback associated with the luteinizing hormone surge in ovariectomized pigs. *Biol Reprod* 45 (3), 478-85.

Britt, K. L. and Findlay, J. K., (2002). Estrogen actions in the ovary revisited. *J Endocrinol* 175 (2), 269-76.

Brown, R. W., Hungerford, J. W., Greenwood, P. E., Bloor, R. J., Evans, D. F., Tsonis, C. G. and Forage, R. G., (1990). Immunization against recombinant bovine inhibin alpha subunit causes increased ovulation rates in gilts. *J Reprod Fertil* 90 (1), 199-205.

Brzozowski, A. M., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Murshudov, G. N., Verma, C., Turkenburg, J. P., de Bree, F. M. and Dauter, Z., (2002). Structural origins of the functional divergence of human insulin-like growth factor-I and insulin. *Biochemistry* 41 (30), 9389-97.

Buehr, M., McLaren, A., Bartley, A. and Darling, S., (1993). Proliferation and migration of primordial germ cells in We/We mouse embryos. *Dev Dyn* 198 (3), 182-9.

Bukovsky, A., Caudle, M. R., Svetlikova, M., Wimalasena, J., Ayala, M. E. and Dominguez, R., (2005). Oogenesis in adult mammals, including humans: a review. *Endocrine* 26 (3), 301-16.

Burger, L. L., Haisenleder, D. J., Dalkin, A. C. and Marshall, J. C., (2004a). Regulation of gonadotropin subunit gene transcription. *J Mol Endocrinol* 33 (3), 559-84. (a)

Burger, L. L., Haisenleder, D. J., Aylor, K. W., Dalkin, A. C., Prendergast, K. A. and Marshall, J. C., (2004b). Regulation of luteinizing hormone-beta and follicle-stimulating hormone (FSH)-beta gene transcription by androgens: testosterone directly stimulates FSH-beta transcription independent from its role on follistatin gene expression. *Endocrinology* 145 (1), 71-8. (b)

Burger, L. L., Haisenleder, D. J., Wotton, G. M., Aylor, K. W., Dalkin, A. C. and Marshall, J. C., (2007). The regulation of FSHbeta transcription by gonadal steroids: testosterone and estradiol modulation of the activin intracellular signaling pathway. *Am J*

Physiol Endocrinol Metab 293 (1), E277-85.

Burnside, J., Buckland, P. R. and Chin, W. W., (1988). Isolation and characterization of the gene encoding the alpha-subunit of the rat pituitary glycoprotein hormones. *Gene* 70 (1), 67-74.

Byskov, A. G., Hoyer, P. E. and Westergaard, L., (1985). Origin and differentiation of the endocrine cells of the ovary. *J Reprod Fertil* 75 (1), 299-306.

Byskov A. G. und Hoyer P.E., (1994), Raven Press, Ltd., New York, E. Knobil and J.D. Neill.

Byskov, A. G., Faddy, M. J., Lemmen, J. G. and Andersen, C. Y., (2005). Eggs forever? *Differentiation* 73 (9-10), 438-46.

Cai, Z., Kwintkiewicz, J., Young, M. E. and Stocco, C., (2007). Prostaglandin E2 increases cyp19 expression in rat granulosa cells: implication of GATA-4. *Mol Cell Endocrinol* 263 (1-2), 181-9.

Camp, T. A., Rahal, J. O. and Mayo, K. E., (1991). Cellular localization and hormonal regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary. *Mol Endocrinol* 5 (10), 1405-17.

Campbell, B. K. and Baird, D. T., (2001). Inhibin A is a follicle stimulating hormone-responsive marker of granulosa cell differentiation, which has both autocrine and paracrine actions in sheep. *J Endocrinol* 169 (2), 333-45.

Campbell, B. K., Souza, C., Gong, J., Webb, R., Kendall, N., Marsters, P., Robinson, G., Mitchell, A., Telfer, E. E. and Baird, D. T., (2003). Domestic ruminants as models for the elucidation of the mechanisms controlling ovarian follicle development in humans. *Reprod Suppl* 61 429-43.

Campion, C. E., Turzillo, A. M. and Clay, C. M., (1996). The gene encoding the ovine gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor: cloning and initial characterization. *Gene* 170 (2), 277-80.

Caprio, M., Fabbrini, E., Isidori, A. M., Aversa, A. and Fabbri, A., (2001). Leptin in reproduction. *Trends Endocrinol Metab* 12 (2), 65-72.

Caraty, A. and Skinner, D. C., (1999). Progesterone priming is essential for the full expression of the positive feedback effect of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge in the ewe. *Endocrinology* 140 (1), 165-70.

Carlsson, B., Nilsson, A., Isaksson, O. G. and Billig, H., (1993). Growth hormone-receptor messenger RNA in the rat ovary: regulation and localization. *Mol Cell Endocrinol*

95 (1-2), 59-66.

Carmeliet, P., (2000). Fibroblast growth factor-1 stimulates branching and survival of myocardial arteries: a goal for therapeutic angiogenesis? *Circ Res* 87 (3), 176-8.

Carson, R. S., Findlay, J. K., Burger, H. G. and Trounson, A. O., (1979). Gonadotropin receptors of the ovine ovarian follicle during follicular growth and atresia. *Biol Reprod* 21 (1), 75-87.

Carvalho, C. R. O., Carnevalheira, J. B. C., Lima, M. H. M., Zimmerman, S. F., Caperuto, L. C., Amanso, A., Gasparetti, A. L., Meneghetti, V., Zimmerman, L. F., Velloso, L. A. and Saad, M. J. A., (2003). Novel signal transduction pathway for luteinizing hormone and its interaction with insulin: activation of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription and phosphoinositol 3-kinase/Akt pathways. *Endocrinology* 144 (2), 638-47.

Celik-Ozenci, C., Akkoyunlu, G., Kayisli, U. A., Arici, A. and Demir, R., (2003). Localization of vascular endothelial growth factor in the zona pellucida of developing ovarian follicles in the rat: a possible role in destiny of follicles. *Histochem Cell Biol* 120 (5), 383-90.

Cepica, S., Prochazka, R., Civanova, K., Knoll, A., Nemcova, L., Masopust, M., Kubickova, S., Musilova, P. and Rubes, J., (2004). Partial molecular characterization and mapping of the GDF9 gene to porcine chromosome 2. *Anim Genet* 35 (3), 261-2.

Chapman, S. C. and Woodruff, T. K., (2003). Betaglycan localization in the female rat pituitary: implications for the regulation of follicle-stimulating hormone by inhibin. *Endocrinology* 144 (12), 5640-9.

Chase, C. C. J., Kirby, C. J., Hammond, A. C., Olson, T. A. and Lucy, M. C., (1998). Patterns of ovarian growth and development in cattle with a growth hormone receptor deficiency. *J Anim Sci* 76 (1), 212-9.

Chegini, N. and Flanders, K. C., (1992). Presence of transforming growth factor-beta and their selective cellular localization in human ovarian tissue of various reproductive stages. *Endocrinology* 130 (3), 1707-15.

Chedid, M., Hoyle, J. R., Csaky, K. G. and Rubin, J. S., (1996). Glucocorticoids inhibit keratinocyte growth factor production in primary dermal fibroblasts. *Endocrinology* 137 (6), 2232-7.

Cheng, G., Weihua, Z., Makinen, S., Makela, S., Saji, S., Warner, M., Gustafsson, J. and Hovatta, O., (2002). A role for the androgen receptor in follicular atresia of estrogen receptor beta knockout mouse ovary. *Biol Reprod* 66 (1), 77-84.

Chin, W. W., Godine, J. E., Klein, D. R., Chang, A. S., Tan, L. K. and Habener, J. F., (1983). Nucleotide sequence of the cDNA encoding the precursor of the beta subunit of rat lutropin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80 (15), 4649-53.

Choi, Y. and Rajkovic, A., (2006). Genetics of early mammalian folliculogenesis. *Cell Mol Life Sci* 63 (5), 579-90.

Christian, C. A. and Moenter, S. M., (2007). Estradiol induces diurnal shifts in GABA transmission to gonadotropin-releasing hormone neurons to provide a neural signal for ovulation. *J Neurosci* 27 (8), 1913-21.

Christopher, B., (2000). Immunolocalization of transforming growth factor-beta1 during follicular development and atresia in the mouse ovary. *Endocr J* 47 (4), 475-80.

Chun, S. Y., Eisenhauer, K. M., Minami, S., Billig, H., Perlas, E. and Hsueh, A. J., (1996). Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology* 137 (4), 1447-56.

Cioffi, J. A., Wang, X. and Kopchick, J. J., (1990). Porcine growth hormone receptor cDNA sequence. *Nucleic Acids Res* 18 (21), 6451.

Clark, D. E., Tisdall, D. J., Fidler, A. E. and McNatty, K. P., (1996). Localization of mRNA encoding c-kit during the initiation of folliculogenesis in ovine fetal ovaries. *J Reprod Fertil* 106 (2), 329-35.

Clarke, I. J., (1988). Gonadotrophin-releasing hormone secretion (GnRH) in anoestrous ewes and the induction of GnRH surges by oestrogen. *J Endocrinol* 117 (3), 355-60.

Clemmons, D. R., (1989). Structural and functional analysis of insulin-like growth factors. *Br Med Bull* 45 (2), 465-80.

Conley, A. J., Kaminski, M. A., Dubowsky, S. A., Jablonka-Shariff, A., Redmer, D. A. and Reynolds, L. P., (1995). Immunohistochemical localization of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and P450 17 alpha-hydroxylase during follicular and luteal development in pigs, sheep, and cows. *Biol Reprod* 52 (5), 1081-94.

Conneely, O. M., Kettelberger, D. M., Tsai, M. J., Schrader, W. T. and O'Malley, B. W., (1989). The chicken progesterone receptor A and B isoforms are products of an alternate translation initiation event. *J Biol Chem* 264 (24), 14062-4.

Conneely, O. M., Mulac-Jericevic, B., DeMayo, F., Lydon, J. P. and O'Malley, B. W., (2002). Reproductive functions of progesterone receptors. *Recent Prog Horm Res* 57 339-55.

Corbin, C. J., Moran, F. M., Vidal, J. D., Ford, J. J., Wise, T., Mapes, S. M., Njar, V. C., Brodie, A. M. and Conley, A. J., (2003). Biochemical assessment of limits to estrogen synthesis in porcine follicles. *Biol Reprod* 69 (2), 390-7.

Coss, D., Thackray, V. G., Deng, C. and Mellon, P. L., (2005). Activin regulates luteinizing hormone beta-subunit gene expression through Smad-binding and homeobox elements. *Mol Endocrinol* 19 (10), 2610-23.

Coss, D., Hand, C. M., Yaphockun, K. K., Ely, H. A. and Mellon, P. L., (2007). p38 MAPK Is Critical for Synergistic Induction of the FSHbeta Gene by GnRH and Activin Through Augmentation of c-Fos Induction and Smad Phosphorylation. *Mol Endocrinol* .

Coucovanis, E. and Martin, G. R., (1999). BMP signaling plays a role in visceral endoderm differentiation and cavitation in the early mouse embryo. *Development* 126 (3), 535-46.

Counis, R., Laverriere, J., Garrel, G., Bleux, C., Cohen-Tannoudji, J., Lerrant, Y., Kottler, M. and Magre, S., (2005). Gonadotropin-releasing hormone and the control of gonadotrope function. *Reprod Nutr Dev* 45 (3), 243-54.

Couse, J. F. and Korach, K. S., (1999). Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 20 (3), 358-417.

Culler, M. D. and Paschall, C. S., (1991). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) potentiates the gonadotropin-releasing activity of luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology* 129 (4), 2260-2.

D'Haeseleer, M., Cornillie, P., Simoens, P. and van den Broeck, W., (2006). Localization of oestrogen receptors within various bovine ovarian cell types at different stages of the oestrous cycle. *Anat Histol Embryol* 35 (5), 334-42.

Dalkin, A. C., Haisenleder, D. J., Ortolano, G. A., Ellis, T. R. and Marshall, J. C., (1989). The frequency of gonadotropin-releasing-hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 125 (2), 917-24.

Dalkin, A. C., Haisenleder, D. J., Yasin, M., Gilrain, J. T. and Marshall, J. C., (1996). Pituitary activin receptor subtypes and follistatin gene expression in female rats: differential regulation by activin and follistatin. *Endocrinology* 137 (2), 548-54.

Dalkin, A. C., Haisenleder, D. J., Gilrain, J. T., Aylor, K., Yasin, M. and Marshall, J. C., (1998). Regulation of pituitary follistatin and inhibin/activin subunit messenger ribonucleic acids (mRNAs) in male and female rats: evidence for inhibin regulation of follistatin mRNA in females. *Endocrinology* 139 (6), 2818-23.

Daughaday, W. H. and Rotwein, P., (1989). Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev* 10 (1), 68-91.

Davis, J. S., Weakland, L. L., West, L. A. and Farese, R. V., (1986). Luteinizing hormone stimulates the formation of inositol trisphosphate and cyclic AMP in rat granulosa cells. Evidence for phospholipase C generated second messengers in the action of luteinizing hormone. *Biochem J* 238 (2), 597-604.

Davis, J. S., Weakland, L. L., Farese, R. V. and West, L. A., (1987). Luteinizing hormone increases inositol trisphosphate and cytosolic free Ca²⁺ in isolated bovine luteal cells. *J Biol Chem* 262 (18), 8515-21.

Davis, J. S., (1994). Mechanisms of hormone action: luteinizing hormone receptors and second-messenger pathways. *Curr Opin Obstet Gynecol* 6 (3), 254-61.

Davis, G. H., Dodds, K. G., Wheeler, R. and Jay, N. P., (2001). Evidence that an imprinted gene on the X chromosome increases ovulation rate in sheep. *Biol Reprod* 64 (1), 216-21.

Davis, G. H., Dodds, K. G., Wheeler, R. and Jay, N. P., (2001). Evidence that an imprinted gene on the X chromosome increases ovulation rate in sheep. *Biol Reprod* 64 (1), 216-21.

Davis, G. H., Farquhar, P. A., O'Connell, A. R., Everett-Hincks, J. M., Wishart, P. J., Galloway, S. M. and Dodds, K. G., (2006). A putative autosomal gene increasing ovulation rate in Romney sheep. *Anim Reprod Sci* 92 (1-2), 65-73.

Davis, G. H., Farquhar, P. A., O'Connell, A. R., Everett-Hincks, J. M., Wishart, P. J., Galloway, S. M. and Dodds, K. G., (2006). A putative autosomal gene increasing ovulation rate in Romney sheep. *Anim Reprod Sci* 92 (1-2), 65-73.

de Kretser, D. M., Hedger, M. P., Loveland, K. L. and Phillips, D. J., (2002). Inhibins, activins and follistatin in reproduction. *Hum Reprod Update* 8 (6), 529-41.

De Lean, A. and Rodbard, D., (1980). Kinetic analysis of cooperative ligand binding: applications to the insulin receptor. *Fed Proc* 39 (1), 116-20.

Dean, J., (2002). Oocyte-specific genes regulate follicle formation, fertility and early mouse development. *J Reprod Immunol* 53 (1-2), 171-80.

Deaver, D. R. and Bryan, K. A., (1999). Effects of exogenous somatotropin (ST) on gonadal function in ruminants and swine. *Domest Anim Endocrinol* 17 (2-3), 287-97.

Dekel, N. and Sherizly, I., (1985). Epidermal growth factor induces maturation of rat

follicle-enclosed oocytes. *Endocrinology* 116 (1), 406-9.

Demeestere, I., Gervy, C., Centner, J., Devreker, F., Englert, Y. and Delbaere, A., (2004). Effect of insulin-like growth factor-I during preantral follicular culture on steroidogenesis, in vitro oocyte maturation, and embryo development in mice. *Biol Reprod* 70 (6), 1664-9.

DePaolo, L. V., Bicsak, T. A., Erickson, G. F., Shimasaki, S. and Ling, N., (1991). Follistatin and activin: a potential intrinsic regulatory system within diverse tissues. *Proc Soc Exp Biol Med* 198 (1), 500-12.

Dekel, N. and Sherizly, I., (1985). Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle-enclosed oocytes. *Endocrinology* 116 (1), 406-9.

Doneda, L., Klinger, F., Larizza, L. and De Felici, M., (2002). KL/KIT co-expression in mouse fetal oocytes. *Int J Dev Biol* 46 (8), 1015-21.

Dong, J., Albertini, D. F., Nishimori, K., Kumar, T. R., Lu, N. and Matzuk, M. M., (1996). Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 383 (6600), 531-5.

Downing, J. A. and Scaramuzzi, R. J., (1991). Nutrient effects on ovulation rate, ovarian function and the secretion of gonadotrophic and metabolic hormones in sheep. *J Reprod Fertil Suppl* 43 209-27.

Driancourt, M. A., Webb, R. and Fry, R. C., (1991). Does follicular dominance occur in ewes? *J Reprod Fertil* 93 (1), 63-70.

Driancourt, M. A., Reynaud, K., Cortvrindt, R. and Smitz, J., (2000). Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function. *Rev Reprod* 5 (3), 143-52.

Driancourt, M. A., (2001). Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 55 (6), 1211-39.

Drummond, A. E. and Findlay, J. K., (1999). The role of estrogen in folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 151 (1-2), 57-64.

Drummond, A. E., Tellbach, M., Dyson, M. and Findlay, J. K., (2007). Fibroblast growth factor 9, a local regulator of ovarian function. *Endocrinology* .

Drummond, A. E., (2005). TGFbeta signalling in the development of ovarian function. *Cell Tissue Res* 322 (1), 107-15.

Drummond, A. E., (2006). The role of steroids in follicular growth. *Reprod Biol Endocrinol* 4 16.

Dube, J. L., Wang, P., Elvin, J., Lyons, K. M., Celeste, A. J. and Matzuk, M. M.,

(1998). The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Mol Endocrinol* 12 (12), 1809-17.

Duffy, D. M., (2003). Growth differentiation factor-9 is expressed by the primate follicle throughout the periovulatory interval. *Biol Reprod* 69 (2), 725-32.

Duggavathi, R., Bartlewski, P. M., Barrett, D. M. W., Gratton, C., Bagu, E. T. and Rawlings, N. C., (2004). Patterns of antral follicular wave dynamics and accompanying endocrine changes in cyclic and seasonally anestrous ewes treated with exogenous ovine follicle-stimulating hormone during the inter-wave interval. *Biol Reprod* 70 (3), 821-7.

Dunkel, L., Tilly, J. L., Shikone, T., Nishimori, K. and Hsueh, A. J., (1994). Follicle-stimulating hormone receptor expression in the rat ovary: increases during prepubertal development and regulation by the opposing actions of transforming growth factors beta and alpha. *Biol Reprod* 50 (4), 940-8.

Durlinger, A. L., Kramer, P., Karels, B., de Jong, F. H., Uilenbroek, J. T., Grootegoed, J. A. and Themmen, A. P., (1999). Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 140 (12), 5789-96.

Durlinger, A. L., Gruijters, M. J., Kramer, P., Karels, B., Kumar, T. R., Matzuk, M. M., Rose, U. M., de Jong, F. H., Uilenbroek, J. T., Grootegoed, J. A. and Themmen, A. P., (2001). Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 142 (11), 4891-9.

Durlinger, A. L. L., Gruijters, M. J. G., Kramer, P., Karels, B., Ingraham, H. A., Nachtigal, M. W., Uilenbroek, J. T. J., Grootegoed, J. A. and Themmen, A. P. N., (2002a). Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 143 (3), 1076-84. (a)

Durlinger, A. L. L., Visser, J. A. and Themmen, A. P. N., (2002b). Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. *Reproduction* 124 (5), 601-9. (b)

Duval, D. L., Nelson, S. E. and Clay, C. M., (1997). The tripartite basal enhancer of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene promoter regulates cell-specific expression through a novel GnRH receptor activating sequence. *Mol Endocrinol* 11 (12), 1814-21.

Eckery, D. C., Moeller, C. L., Nett, T. M. and Sawyer, H. R., (1997). Localization and quantification of binding sites for follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, growth hormone, and insulin-like growth factor I in sheep ovarian follicles. *Biol Reprod* 57 (3), 507-13.

Eimerl, S. and Orly, J., (2002). 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. *Biol Reprod* 67 (3), 900-10.

Elvin, J. A., Clark, A. T., Wang, P., Wolfman, N. M. and Matzuk, M. M., (1999a). Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol* 13 (6), 1035-48. (a)

Elvin, J. A., Yan, C., Wang, P., Nishimori, K. and Matzuk, M. M., (1999b). Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9-deficient ovary. *Mol Endocrinol* 13 (6), 1018-34. (b)

Elvin, J. A., Yan, C. and Matzuk, M. M., (2000). Oocyte-expressed TGF-beta superfamily members in female fertility. *Mol Cell Endocrinol* 159 (1-2), 1-5.

England, B. G., Webb, R. and Dahmer, M. K., (1981). Follicular steroidogenesis and gonadotropin binding to ovine follicles during the estrous cycle. *Endocrinology* 109 (3), 881-7.

Eppig, J. J., (1996). Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev* 8 (4), 485-9.

Eppig, J. J., Wigglesworth, K., Pendola, F. and Hirao, Y., (1997). Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. *Biol Reprod* 56 (4), 976-84.

Erickson, G. F. and Sorensen, R. A., (1974). In vitro maturation of mouse oocytes isolated from late, middle, and pre-antral graafian follicles. *J Exp Zool* 190 (1), 123-7.

Erickson, G. F., Nakatani, A., Ling, N. and Shimasaki, S., (1992a). Cyclic changes in insulin-like growth factor-binding protein-4 messenger ribonucleic acid in the rat ovary. *Endocrinology* 130 (2), 625-36. (a)

Erickson, G. F., Nakatani, A., Ling, N. and Shimasaki, S., (1992b). Localization of insulin-like growth factor-binding protein-5 messenger ribonucleic acid in rat ovaries during the estrous cycle. *Endocrinology* 130 (4), 1867-78. (b)

Erickson, G. F. and Shimasaki, S., (2000). The role of the oocyte in folliculogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 11 (5), 193-8.

Erickson, G. F. and Shimasaki, S., (2003). The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol* 1 9.

Esch, F. S., Shimasaki, S., Cooksey, K., Mercado, M., Mason, A. J., Ying, S. Y., Ueno, N. and Ling, N., (1987). Complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) cloning and DNA sequence analysis of rat ovarian inhibins. *Mol Endocrinol* 1 (5), 388-96.

Ethier, J., Farnworth, P. G., Findlay, J. K. and Ooi, G. T., (2002). Transforming growth factor-beta modulates inhibin A bioactivity in the LbetaT2 gonadotrope cell line by competing for binding to betaglycan. *Mol Endocrinol* 16 (12), 2754-63.

Evans, J. J., Hurd, S. J. and Mason, D. R., (1995). Oxytocin modulates the luteinizing hormone response of the rat anterior pituitary to gonadotrophin-releasing hormone in vitro. *J Endocrinol* 145 (1), 113-9.

Evans, A. C. and Fortune, J. E., (1997). Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinology* 138 (7), 2963-71.

Evans, J. J., (1999). Modulation of gonadotropin levels by peptides acting at the anterior pituitary gland. *Endocr Rev* 20 (1), 46-67.

Fafioffe, A., Ethier, J., Fontaine, J., JeanPierre, E., Taragnat, C. and Dupont, J., (2004). Activin and inhibin receptor gene expression in the ewe pituitary throughout the oestrous cycle. *J Endocrinol* 182 (1), 55-68.

Fair, T., Hulshof, S. C., Hyttel, P., Greve, T. and Boland, M., (1997). Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anat Embryol (Berl)* 195 (4), 327-36.

Fan, N. C., Peng, C., Krisinger, J. and Leung, P. C., (1995). The human gonadotropin-releasing hormone receptor gene: complete structure including multiple promoters, transcription initiation sites, and polyadenylation signals. *Mol Cell Endocrinol* 107 (2), R1-8.

Fasciana, C., van der Made, A. C., Faber, P. W. and Trapman, J., (1996). Androgen regulation of the rat keratinocyte growth factor (KGF/FGF7) promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 220 (3), 858-63.

Fatehi, A. N., van den Hurk, R., Colenbrander, B., Daemen, A. J. J. M., van Tol, H. T. A., Monteiro, R. M., Roelen, B. A. J. and Bevers, M. M., (2005). Expression of bone morphogenetic protein2 (BMP2), BMP4 and BMP receptors in the bovine ovary but absence of effects of BMP2 and BMP4 during IVM on bovine oocyte nuclear maturation and subsequent embryo development. *Theriogenology* 63 (3), 872-89.

Ferguson, S. S., Zhang, J., Barak, L. S. and Caron, M. G., (1996). G-protein-

coupled receptor kinases and arrestins: regulators of G-protein-coupled receptor sequestration. *Biochem Soc Trans* 24 (4), 953-9.

Ferrara, N. and Davis-Smyth, T., (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18 (1), 4-25.

Ferrara, N., (2000). Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res* 55 15-35; discussion 35-6.

Ferris, H. A. and Shupnik, M. A., (2006). Mechanisms for pulsatile regulation of the gonadotropin subunit genes by GNRH1. *Biol Reprod* 74 (6), 993-8.

Fiddes, J. C. and Goodman, H. M., (1981). The gene encoding the common alpha subunit of the four human glycoprotein hormones. *J Mol Appl Genet* 1 (1), 3-18.

Fiddes, J. C. and Talmadge, K., (1984). Structure, expression, and evolution of the genes for the human glycoprotein hormones. *Recent Prog Horm Res* 40 43-78.

Findlay, J. K., Doughton, B., Robertson, D. M. and Forage, R. G., (1989). Effects of immunization against recombinant bovine inhibin alpha subunit on circulating concentrations of gonadotrophins in ewes. *J Endocrinol* 120 (1), 59-65.

Findlay, J. K., (1993). An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol Reprod* 48 (1), 15-23.

Findlay, J. K. and Drummond, A. E., (1999). Regulation of the FSH Receptor in the Ovary. *Trends Endocrinol Metab* 10 (5), 183-188.

Findlay, J. K., Drummond, A. E., Dyson, M., Baillie, A. J., Robertson, D. M. and Ethier, J. F., (2001). Production and actions of inhibin and activin during folliculogenesis in the rat. *Mol Cell Endocrinol* 180 (1-2), 139-44.

Findlay, J. K., (1986). Angiogenesis in reproductive tissues. *J Endocrinol* 111 (3), 357-66.

Findlay, J. K., Drummond, A. E., Dyson, M. L., Baillie, A. J., Robertson, D. M. and Ethier, J., (2002). Recruitment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor-beta superfamily. *Mol Cell Endocrinol* 191 (1), 35-43.

Fitzpatrick, S. L., Carlone, D. L., Robker, R. L. and Richards, J. S., (1997). Expression of aromatase in the ovary: down-regulation of mRNA by the ovulatory luteinizing hormone surge. *Steroids* 62 (1), 197-206.

Fitzpatrick, S. L., Sindoni, D. M., Shughrue, P. J., Lane, M. V., Merchenthaler, I. J. and Frail, D. E., (1998). Expression of growth differentiation factor-9 messenger ribonucleic acid in ovarian and nonovarian rodent and human tissues. *Endocrinology*

139 (5), 2571-8.

Flaws, J. A., Abbud, R., Mann, R. J., Nilson, J. H. and Hirshfield, A. N., (1997). Chronically elevated luteinizing hormone depletes primordial follicles in the mouse ovary. *Biol Reprod* 57 (5), 1233-7.

Fleischman, R. A., (1993). From white spots to stem cells: the role of the Kit receptor in mammalian development. *Trends Genet* 9 (8), 285-90.

Flowers, B., Martin, M. J., Cantley, T. C. and Day, B. N., (1989). Endocrine changes associated with a dietary-induced increase in ovulation rate (flushing) in gilts. *J Anim Sci* 67 (3), 771-8.

Fortune J.E. and Quik S.M., (1988). Regulation of steroidogenesis in bovine preovulatory follicle. *J Anim Sci* 66 (Suppl 1-2), 1-8.

Fortune, J. E., (1994). Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* 50 (2), 225-32.

Fortune, J. E., Cushman, R. A., Wahl, C. M. and Kito, S., (2000). The primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol* 163 (1-2), 53-60.

Fortune, J. E., Rivera, G. M., Evans, A. C. and Turzillo, A. M., (2001). Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol Reprod* 65 (3), 648-54.

Fortune, J. E., Rivera, G. M. and Yang, M. Y., (2004). Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim Reprod Sci* 82-83 109-26.

Fraser, H. M., (2006). Regulation of the ovarian follicular vasculature. *Reprod Biol Endocrinol* 4 18.

Freeman ME, (1994), Raven Press, E Knobil und J D Neill.

Freeman, B., (2003). The active migration of germ cells in the embryos of mice and men is a myth. *Reproduction* 125 (5), 635-43.

Galloway, S. M., McNatty, K. P., Cambridge, L. M., Laitinen, M. P., Juengel, J. L., Jokiranta, T. S., McLaren, R. J., Luiro, K., Dodds, K. G., Montgomery, G. W., Beattie, A. E., Davis, G. H. and Ritvos, O., (2000). Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet* 25 (3), 279-83.

Garmey, J. C., Guthrie, H. D., Garrett, W. M., Stoler, M. H. and Veldhuis, J. D., (2000). Localization and expression of low-density lipoprotein receptor, steroidogenic acute regulatory protein, cytochrome P450 side-chain cleavage and P450 17-alpha-

hydroxylase/C17-20 lyase in developing swine follicles: in situ molecular hybridization and imm. *Mol Cell Endocrinol* 170 (1-2), 57-65.

Garnett, K., Wang, J. and Roy, S. K., (2002). Spatiotemporal expression of epidermal growth factor receptor messenger RNA and protein in the hamster ovary: follicle stage-specific differential modulation by follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estradiol, and progesterone. *Biol Reprod* 67 (5), 1593-604.

Garrett, W. M. and Guthrie, H. D., (1997). Steroidogenic enzyme expression during preovulatory follicle maturation in pigs. *Biol Reprod* 56 (6), 1424-31.

Garrido, C., Saule, S. and Gospodarowicz, D., (1993). Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ovarian bovine granulosa cells. *Growth Factors* 8 (2), 109-17.

Garverick, H. A., Baxter, G., Gong, J., Armstrong, D. G., Campbell, B. K., Gutierrez, C. G. and Webb, R., (2002). Regulation of expression of ovarian mRNA encoding steroidogenic enzymes and gonadotrophin receptors by FSH and GH in hypogonadotrophic cattle. *Reproduction* 123 (5), 651-61.

Gault, P. M., Maudsley, S. and Lincoln, G. A., (2003). Evidence that gonadotropin-releasing hormone II is not a physiological regulator of gonadotropin secretion in mammals. *J Neuroendocrinol* 15 (9), 831-9.

Gether, U., (2000). Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* 21 (1), 90-113.

Ghiglieri, C., Khatchadourian, C., Tabone, E., Hendrick, J. C., Benahmed, M. and Menezo, Y., (1995). Immunolocalization of transforming growth factor-beta 1 and transforming growth factor-beta 2 in the mouse ovary during gonadotrophin-induced follicular maturation. *Hum Reprod* 10 (8), 2115-9.

Gilchrist, R. B., Ritter, L. J. and Armstrong, D. T., (2004a). Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci* 82-83 431-46. (a)

Gilchrist, R. B., Ritter, L. J., Cranfield, M., Jeffery, L. A., Amato, F., Scott, S. J., Myllymaa, S., Kaivo-Oja, N., Lankinen, H., Mottershead, D. G., Groome, N. P. and Ritvos, O., (2004b). Immunoneutralization of growth differentiation factor 9 reveals it partially accounts for mouse oocyte mitogenic activity. *Biol Reprod* 71 (3), 732-9. (b)

Ginther, O. J., Wiltbank, M. C., Fricke, P. M., Gibbons, J. R. and Kot, K., (1996). Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod* 55 (6), 1187-94.

Ginther, O. J., Beg, M. A., Donadeu, F. X. and Bergfelt, D. R., (2003). Mechanism

of follicle deviation in monovular farm species. *Anim Reprod Sci* 78 (3-4), 239-57.

Gitay-Goren, H., Kim, I. C., Miggans, S. T. and Schomberg, D. W., (1993). Transforming growth factor beta modulates gonadotropin receptor expression in porcine and rat granulosa cells differently. *Biol Reprod* 48 (6), 1284-9.

Gittens, J. E. I., Barr, K. J., Vanderhyden, B. C. and Kidder, G. M., (2005). Interplay between paracrine signaling and gap junctional communication in ovarian follicles. *J Cell Sci* 118 (Pt 1), 113-22.

Giudice, L. C., (1992). Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. *Endocr Rev* 13 (4), 641-69.

Giudice, L. C., van Dessel, H. J., Cataldo, N. A., Chandrasekher, Y. A., Yap, O. W. and Fauser, B. C., (1995). Circulating and ovarian IGF binding proteins: potential roles in normo-ovulatory cycles and in polycystic ovarian syndrome. *Prog Growth Factor Res* 6 (2-4), 397-408.

Glencross, R. G., Bleach, E. C., Wood, S. C. and Knight, P. G., (1994). Active immunization of heifers against inhibin: effects on plasma concentrations of gonadotrophins, steroids and ovarian follicular dynamics during prostaglandin-synchronized cycles. *J Reprod Fertil* 100 (2), 599-605.

Glister, C., Groome, N. P. and Knight, P. G., (2003). Oocyte-mediated suppression of follicle-stimulating hormone- and insulin-like growth factor-induced secretion of steroids and inhibin-related proteins by bovine granulosa cells in vitro: possible role of transforming growth factor alpha. *Biol Reprod* 68 (3), 758-65.

Glister, C., Kemp, C. F. and Knight, P. G., (2004). Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. *Reproduction* 127 (2), 239-54.

Goddard, I., Hendrick, J. C., Benahmed, M. and Morera, A. M., (1995). Transforming growth factor beta receptor expression in cultured porcine granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 115 (2), 207-13.

Gong, J. G., Bramley, T. and Webb, R., (1991). The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. *Biol Reprod* 45 (6), 941-9.

Goodwin, R. G., Moncman, C. L., Rottman, F. M. and Nilson, J. H., (1983). Characterization and nucleotide sequence of the gene for the common alpha subunit of the

bovine pituitary glycoprotein hormones. *Nucleic Acids Res* 11 (19), 6873-82.

Gordo, A. C., He, C. L., Smith, S. and Fissore, R. A., (2001). Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology, and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 59 (1), 106-14.

Gore, A. J., Philips, D. P., Miller, W. L. and Bernard, D. J., (2005). Differential regulation of follicle stimulating hormone by activin A and TGFB1 in murine gonadotropes. *Reprod Biol Endocrinol* 3 73.

Gospodarowicz, D. and Thakral, K. K., (1978). Production a corpus luteum angiogenic factor responsible for proliferation of capillaries and neovascularization of the corpus luteum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75 (2), 847-51.

Gospodarowicz, D. and Lau, K., (1989). Pituitary follicular cells secrete both vascular endothelial growth factor and follistatin. *Biochem Biophys Res Commun* 165 (1), 292-8.

Grapes, L. and Rothschild, M. F., (2002). BMP15 maps to the X chromosome in swine. *Anim Genet* 33 (2), 165-6.

Gray, S. A., Mannan, M. A. and O'Shaughnessy, P. J., (1996). Development of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase (P450c17) mRNA and enzyme activity in neonatal ovaries of normal and hypogonadal (hpg) mice. *J Mol Endocrinol* 17 (1), 55-60.

Greenwald, G. S., (1989). Temporal and topographic changes in DNA synthesis after induced follicular atresia. *Biol Reprod* 41 (1), 175-81.

Gregory, S. J. and Kaiser, U. B., (2004). Regulation of gonadotropins by inhibin and activin. *Semin Reprod Med* 22 (3), 253-67.

Gregory, S. J., Lacza, C. T., Detz, A. A., Xu, S., Petrillo, L. A. and Kaiser, U. B., (2005). Synergy between activin A and gonadotropin-releasing hormone in transcriptional activation of the rat follicle-stimulating hormone-beta gene. *Mol Endocrinol* 19 (1), 237-54.

Gudermann, T., Birnbaumer, M. and Birnbaumer, L., (1992). Evidence for dual coupling of the murine luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phosphoinositide breakdown and Ca²⁺ mobilization. Studies with the cloned murine luteinizing hormone receptor expressed in L cells. *J Biol Chem* 267 (7), 4479-88.

Gueripel, X., Brun, V. and Gougeon, A., (2006). Oocyte bone morphogenetic protein 15, but not growth differentiation factor 9, is increased during gonadotropin-induced follicular development in the immature mouse and is associated with cumulus oophorus

expansion. *Biol Reprod* 75 (6), 836-43.

Guillemin, R., (1977). Purification, isolation, and primary structure of the hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor of ovine origin. A historical account. *Am J Obstet Gynecol* 129 (2), 214-8.

Guthrie, H. D. and Bolt, D. J., (1990). Changes in plasma follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estrogen and progesterone during growth of ovulatory follicles in the pig. *Domest Anim Endocrinol* 7 (1), 83-91.

Guthrie, H. D., Rohan, R. M., Rexroad, C. E. J. and Cooper, B. S., (1992). Changes in concentrations of follicular inhibin alpha and beta A subunit messenger ribonucleic acids and inhibin immunoactivity during preovulatory maturation in the pig. *Biol Reprod* 47 (6), 1018-25.

Gutierrez, C. G., Ralph, J. H., Telfer, E. E., Wilmut, I. and Webb, R., (2000). Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. *Biol Reprod* 62 (5), 1322-8.

Habermann, F. A., Wuensch, A., Sinowatz, F. and Wolf, E., (2007). Reporter genes for embryogenesis research in livestock species. *Theriogenology* 68 Suppl 1 S116-24.

Haisenleder, D. J., Dalkin, A. C., Ortolano, G. A., Marshall, J. C. and Shupnik, M. A., (1991). A pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulus is required to increase transcription of the gonadotropin subunit genes: evidence for differential regulation of transcription by pulse frequency in vivo. *Endocrinology* 128 (1), 509-17.

Halvorson, L. M., Weiss, J., Bauer-Dantoin, A. C. and Jameson, J. L., (1994). Dynamic regulation of pituitary follistatin messenger ribonucleic acids during the rat estrous cycle. *Endocrinology* 134 (3), 1247-53.

Hammond, J. M., Hsu, C. J., Klindt, J., Tsang, B. K. and Downey, B. R., (1988). Gonadotropins increase concentrations of immunoreactive insulin-like growth factor-I in porcine follicular fluid in vivo. *Biol Reprod* 38 (2), 304-8.

Hampton, J. H., Manikkam, M., Lubahn, D. B., Smith, M. F. and Garverick, H. A., (2004). Androgen receptor mRNA expression in the bovine ovary. *Domest Anim Endocrinol* 27 (1), 81-8.

Hanrahan, J. P., Gregan, S. M., Mulsant, P., Mullen, M., Davis, G. H., Powell, R. and Galloway, S. M., (2004). Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biol Reprod* 70 (4), 900-9.

Hapgood, J. P., Sadie, H., van Biljon, W. and Ronacher, K., (2005). Regulation of expression of mammalian gonadotrophin-releasing hormone receptor genes. *J Neuroendocrinol* 17 (10), 619-38.

Harlow, C. R., Davidson, L., Burns, K. H., Yan, C., Matzuk, M. M. and Hillier, S. G., (2002). FSH and TGF-beta superfamily members regulate granulosa cell connective tissue growth factor gene expression in vitro and in vivo. *Endocrinology* 143 (9), 3316-25.

Harris, R. C., Chung, E. and Coffey, R. J., (2003). EGF receptor ligands. *Exp Cell Res* 284 (1), 2-13.

Harrison, G. S., Wierman, M. E., Nett, T. M. and Glode, L. M., (2004). Gonadotropin-releasing hormone and its receptor in normal and malignant cells. *Endocr Relat Cancer* 11 (4), 725-48.

Hastie, P. M. and Haresign, W., (2006). Expression of mRNAs encoding insulin-like growth factor (IGF) ligands, IGF receptors and IGF binding proteins during follicular growth and atresia in the ovine ovary throughout the oestrous cycle. *Anim Reprod Sci* 92 (3-4), 284-99.

Hatey, F., Langlois, I., Mulsant, P., Bonnet, A., Benne, F. and Gasser, F., (1992). Gonadotropins induce accumulation of insulin-like growth factor I mRNA in pig granulosa cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 86 (3), 205-11.

Hauser, S. D., McGrath, M. F., Collier, R. J. and Krivi, G. G., (1990). Cloning and in vivo expression of bovine growth hormone receptor mRNA. *Mol Cell Endocrinol* 72 (3), 187-200.

Hedin, L., McKnight, G. S., Lifka, J., Durica, J. M. and Richards, J. S., (1987). Tissue distribution and hormonal regulation of messenger ribonucleic acid for regulatory and catalytic subunits of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases during ovarian follicular development and luteinization in the rat. *Endocrinology* 120 (5), 1928-35.

Hermann, B. P. and Heckert, L. L., (2007). Transcriptional regulation of the FSH receptor: new perspectives. *Mol Cell Endocrinol* 260-262 100-8.

Hernandez, E. R., Roberts, C. T. J., Hurwitz, A., LeRoith, D. and Adashi, E. Y., (1990). Rat ovarian insulin-like growth factor II gene expression is theca-interstitial cell-exclusive: hormonal regulation and receptor distribution. *Endocrinology* 127 (6), 3249-51.

Herrlich, A., Kuhn, B., Grosse, R., Schmid, A., Schultz, G. and Gudermann, T., (1996). Involvement of Gs and Gi proteins in dual coupling of the luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phospholipase C. *J Biol Chem* 271 (28), 16764-72.

Herrmann, M., Scholmerich, J. and Straub, R. H., (2002). Influence of cytokines and growth factors on distinct steroidogenic enzymes in vitro: a short tabular data collection. *Ann N Y Acad Sci* 966 166-86.

Hickey, T. E., Marrocco, D. L., Gilchrist, R. B., Norman, R. J. and Armstrong, D. T., (2004). Interactions between androgen and growth factors in granulosa cell subtypes of porcine antral follicles. *Biol Reprod* 71 (1), 45-52.

Hill, J. L., Hammar, K., Smith, P. J. and Gross, D. J., (1999). Stage-dependent effects of epidermal growth factor on Ca²⁺ efflux in mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 53 (2), 244-53.

Hillier, S. G. and Miro, F., (1993). Inhibin, activin, and follistatin. Potential roles in ovarian physiology. *Ann N Y Acad Sci* 687 29-38.

Hillier, S. G., (2001). Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. *Mol Cell Endocrinol* 179 (1-2), 39-46.

Hillier, S., (2004). Roles respectifs des gonadotrophines sur la croissance folliculaire et la maturation ovocytaire. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 33 (6 Pt 2), 3S11-4.

Hirshfield, A. N., (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 124 43-101.

Hogan, B. L., (1996). Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 10 (13), 1580-94.

Horton, C. D. and Halvorson, L. M., (2004). The cAMP signaling system regulates LHbeta gene expression: roles of early growth response protein-1, SP1 and steroidogenic factor-1. *J Mol Endocrinol* 32 (1), 291-306.

Hosoe, M. and Shioya, Y., (1997). Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. *Zygote* 5 (4), 371-6.

Hsieh, M., Lee, D., Panigone, S., Horner, K., Chen, R., Theologis, A., Lee, D. C., Threadgill, D. W. and Conti, M., (2007). Luteinizing hormone-dependent activation of the epidermal growth factor network is essential for ovulation. *Mol Cell Biol* 27 (5), 1914-24.

Hsu, Y. R., Wu, G. M., Mendiaz, E. A., Syed, R., Wypych, J., Toso, R., Mann, M. B., Boone, T. C., Narhi, L. O., Lu, H. S. and Langley, K. E., (1997). The majority of stem cell factor exists as monomer under physiological conditions. Implications for dimerization mediating biological activity. *J Biol Chem* 272 (10), 6406-15.

Huang, E. J., Nocka, K. H., Buck, J. and Besmer, P., (1992). Differential expression and processing of two cell associated forms of the kit-ligand: KL-1 and KL-2. *Mol*

Biol Cell 3 (3), 349-62.

Huang, E. J., Manova, K., Packer, A. I., Sanchez, S., Bachvarova, R. F. and Besmer, P., (1993). The murine steel panda mutation affects kit ligand expression and growth of early ovarian follicles. *Dev Biol* 157 (1), 100-9.

Huang, H. J., Sebastian, J., Strahl, B. D., Wu, J. C. and Miller, W. L., (2001). The promoter for the ovine follicle-stimulating hormone-beta gene (FSHbeta) confers FSHbeta-like expression on luciferase in transgenic mice: regulatory studies in vivo and in vitro. *Endocrinology* 142 (6), 2260-6.

Hulshof, S. C., Figueiredo, J. R., Beckers, J. F., Bevers, M. M. and van den Hurk, R., (1994). Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *Vet Q* 16 (2), 78-80.

Hunter, M. G., Robinson, R. S., Mann, G. E. and Webb, R., (2004). Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Anim Reprod Sci* 82-83 461-77.

Hunzicker-Dunn, M., Barisas, G., Song, J. and Roess, D. A., (2003). Membrane organization of luteinizing hormone receptors differs between actively signaling and desensitized receptors. *J Biol Chem* 278 (44), 42744-9.

Hutt, K. J., McLaughlin, E. A. and Holland, M. K., (2006). Kit ligand and c-Kit have diverse roles during mammalian oogenesis and folliculogenesis. *Mol Hum Reprod* 12 (2), 61-9.

Ireland, J. L. and Ireland, J. J., (1994). Changes in expression of inhibin/activin alpha, beta A and beta B subunit messenger ribonucleic acids following increases in size and during different stages of differentiation or atresia of non-ovulatory follicles in cows. *Biol Reprod* 50 (3), 492-501.

Ismail, R. S., Okawara, Y., Fryer, J. N. and Vanderhyden, B. C., (1996). Hormonal regulation of the ligand for c-kit in the rat ovary and its effects on spontaneous oocyte meiotic maturation. *Mol Reprod Dev* 43 (4), 458-69.

Ismail, R. S., Dube, M. and Vanderhyden, B. C., (1997). Hormonally regulated expression and alternative splicing of kit ligand may regulate kit-induced inhibition of meiosis in rat oocytes. *Dev Biol* 184 (2), 333-42.

Israel, D. I., Nove, J., Kerns, K. M., Kaufman, R. J., Rosen, V., Cox, K. A. and Wozney, J. M., (1996). Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo. *Growth Factors* 13 (3-4), 291-300.

Ito, M., Harada, T., Tanikawa, M., Fujii, A., Shiota, G. and Terakawa, N., (2001). Hepatocyte growth factor and stem cell factor involvement in paracrine interplays of theca and granulosa cells in the human ovary. *Fertil Steril* 75 (5), 973-9.

Iwasaki, S., Iguchi, M., Watanabe, K., Hoshino, R., Tsujimoto, M. and Kohno, M., (1999). Specific activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway and induction of neurite outgrowth in PC12 cells by bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* 274 (37), 26503-10.

Izadyar, F., Dijkstra, G., Van Tol, H. T., Van den Eijnden-van Raaij, A. J., Van den Hurk, R., Colenbrander, B. and Bevers, M. M., (1998). Immunohistochemical localization and mRNA expression of activin, inhibin, follistatin, and activin receptor in bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. *Mol Reprod Dev* 49 (2), 186-95.

Jablonka-Shariff, A., Grazul-Bilska, A. T., Redmer, D. A. and Reynolds, L. P., (1997). Cellular proliferation and fibroblast growth factors in the corpus luteum during early pregnancy in ewes. *Growth Factors* 14 (1), 15-23.

Jameson, L., Chin, W. W., Hollenberg, A. N., Chang, A. S. and Habener, J. F., (1984). The gene encoding the beta-subunit of rat luteinizing hormone. Analysis of gene structure and evolution of nucleotide sequence. *J Biol Chem* 259 (24), 15474-80.

Jamnongjit, M. and Hammes, S. R., (2005). Oocyte maturation: the coming of age of a germ cell. *Semin Reprod Med* 23 (3), 234-41.

Jayawardana, B. C., Shimizu, T., Nishimoto, H., Kaneko, E., Tetsuka, M. and Miyamoto, A., (2006). Hormonal regulation of expression of growth differentiation factor-9 receptor type I and II genes in the bovine ovarian follicle. *Reproduction* 131 (3), 545-53.

Jennes, L. and Conn, P. M., (1994). Gonadotropin-releasing hormone and its receptors in rat brain. *Front Neuroendocrinol* 15 (1), 51-77.

Jennes, L., Eyigor, O., Janovick, J. A. and Conn, P. M., (1997). Brain gonadotropin releasing hormone receptors: localization and regulation. *Recent Prog Horm Res* 52 475-90; discussion 490-1.

Jeong, K., Chin, W. W. and Kaiser, U. B., (2004). Essential role of the homeodomain for pituitary homeobox 1 activation of mouse gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression through interactions with c-Jun and DNA. *Mol Cell Biol* 24 (14), 6127-39.

Jiang, Z., Gibson, J. P., Archibald, A. L. and Haley, C. S., (2001). The porcine

gonadotropin-releasing hormone receptor gene (GNRHR): genomic organization, polymorphisms, and association with the number of corpora lutea. *Genome* 44 (1), 7-12.

Jin, X., Han, C., Zhang, X., Yuan, J., Hu, Z. and Liu, Y., (2005a). Signal transduction of stem cell factor in promoting early follicle development. *Mol Cell Endocrinol* 229 (1-2), 3-10. (a)

Jin, X., Han, C., Yu, F., Wei, P., Hu, Z. and Liu, Y., (2005b). Anti-apoptotic action of stem cell factor on oocytes in primordial follicles and its signal transduction. *Mol Reprod Dev* 70 (1), 82-90. (b)

Jin, X., Han, C., Zhang, X., Yu, F., Guo, S., Hu, Z. and Liu, Y., (2005c). Stem cell factor modulates the expression of steroidogenesis related proteins and FSHR during ovarian follicular development. *Front Biosci* 10 1573-80. (c)

Jo, M., Komar, C. M. and Fortune, J. E., (2002). Gonadotropin surge induces two separate increases in messenger RNA for progesterone receptor in bovine preovulatory follicles. *Biol Reprod* 67 (6), 1981-8.

Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J. K. and Tilly, J. L., (2004). Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 428 (6979), 145-50.

Jones, J. I., Gockerman, A., Busby, W. H. J., Camacho-Hubner, C. and Clemmons, D. R., (1993). Extracellular matrix contains insulin-like growth factor binding protein-5: potentiation of the effects of IGF-I. *J Cell Biol* 121 (3), 679-87.

Josso, N., Lamarre, I., Picard, J. Y., Berta, P., Davies, N., Morichon, N., Peschanski, M. and Jeny, R., (1993). Anti-mullerian hormone in early human development. *Early Hum Dev* 33 (2), 91-9.

Joyce, I. M., Pendola, F. L., Wigglesworth, K. and Eppig, J. J., (1999). Oocyte regulation of kit ligand expression in mouse ovarian follicles. *Dev Biol* 214 (2), 342-53.

Joyce, I. M., Clark, A. T., Pendola, F. L. and Eppig, J. J., (2000). Comparison of recombinant growth differentiation factor-9 and oocyte regulation of KIT ligand messenger ribonucleic acid expression in mouse ovarian follicles. *Biol Reprod* 63 (6), 1669-75.

Juengel, J. L., Quirke, L. D., Tisdall, D. J., Smith, P., Hudson, N. L. and McNatty, K. P., (2000). Gene expression in abnormal ovarian structures of ewes homozygous for the inverdale prolificacy gene. *Biol Reprod* 62 (6), 1467-78.

Juengel, J. L., Hudson, N. L., Heath, D. A., Smith, P., Reader, K. L., Lawrence, S. B., O'Connell, A. R., Laitinen, M. P. E., Cranfield, M., Groome, N. P., Ritvos, O. and

McNatty, K. P., (2002a). Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biol Reprod* 67 (6), 1777-89.

Juengel, J. L., Sawyer, H. R., Smith, P. R., Quirke, L. D., Heath, D. A., Lun, S., Wakefield, S. J. and McNatty, K. P., (2002a). Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries. *Mol Cell Endocrinol* 191 (1), 1-10. (a)

Juengel, J. L., Bodensteiner, K. J., Heath, D. A., Hudson, N. L., Moeller, C. L., Smith, P., Galloway, S. M., Davis, G. H., Sawyer, H. R. and McNatty, K. P., (2004a). Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. *Anim Reprod Sci* 82-83 447-60. (a)

Juengel, J. L., Bibby, A. H., Reader, K. L., Lun, S., Quirke, L. D., Haydon, L. J. and McNatty, K. P., (2004b). The role of transforming growth factor-beta (TGF-beta) during ovarian follicular development in sheep. *Reprod Biol Endocrinol* 2 (1), 78. (b)

Juengel, J. L., Heath, D. A., Quirke, L. D. and McNatty, K. P., (2006a). Oestrogen receptor alpha and beta, androgen receptor and progesterone receptor mRNA and protein localisation within the developing ovary and in small growing follicles of sheep. *Reproduction* 131 (1), 81-92. (a)

Juengel, J. L., Reader, K. L., Bibby, A. H., Lun, S., Ross, I., Haydon, L. J. and McNatty, K. P., (2006b). The role of bone morphogenetic proteins 2, 4, 6 and 7 during ovarian follicular development in sheep: contrast to rat. *Reproduction* 131 (3), 501-13. (b)

Kaiser, U. B., Conn, P. M. and Chin, W. W., (1997). Studies of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) action using GnRH receptor-expressing pituitary cell lines. *Endocr Rev* 18 (1), 46-70.

Kakar, S. S., Winters, S. J., Zacharias, W., Miller, D. M. and Flynn, S., (2003). Identification of distinct gene expression profiles associated with treatment of LbetaT2 cells with gonadotropin-releasing hormone agonist using microarray analysis. *Gene* 308 67-77.

Kamada, S., Kubota, T., Taguchi, M., Ho, W. R., Sakamoto, S. and Aso, T., (1992). Effects of insulin-like growth factor-II on proliferation and differentiation of ovarian granulosa cells. *Horm Res* 37 (4-5), 141-9.

Kanasaki, H., Bedecarrats, G. Y., Kam, K., Xu, S. and Kaiser, U. B., (2005). Gonadotropin-releasing hormone pulse frequency-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase pathways in perfused LbetaT2 cells. *Endocrinology* 146 (12), 5503-13.

Kaneko, H., Noguchi, J., Kikuchi, K., Todoroki, J. and Hasegawa, Y., (2002). Alterations in peripheral concentrations of inhibin A in cattle studied using a time-resolved immunofluorometric assay: relationship with estradiol and follicle-stimulating hormone in

various reproductive conditions. *Biol Reprod* 67 (1), 38-45.

Kanematsu, T., Irahara, M., Miyake, T., Shitsukawa, K. and Aono, T., (1991). Effect of insulin-like growth factor I on gonadotropin release from the hypothalamus-pituitary axis in vitro. *Acta Endocrinol (Copenh)* 125 (2), 227-33.

Kang, J. S., Lee, C. J., Lee, J. M., Rha, J. Y., Song, K. W. and Park, M. H., (2003). Follicular expression of c-Kit/SCF and inhibin-alpha in mouse ovary during development. *J Histochem Cytochem* 51 (11), 1447-58.

Kapur, R., Cooper, R., Xiao, X., Weiss, M. J., Donovan, P. and Williams, D. A., (1999). The presence of novel amino acids in the cytoplasmic domain of stem cell factor results in hematopoietic defects in Steel(17H) mice. *Blood* 94 (6), 1915-25.

Kawakami, S. and Winters, S. J., (1999). Regulation of lutenizing hormone secretion and subunit messenger ribonucleic acid expression by gonadal steroids in perfused pituitary cells from male monkeys and rats. *Endocrinology* 140 (8), 3587-93.

Kawase, E., Hashimoto, K. and Pedersen, R. A., (2004). Autocrine and paracrine mechanisms regulating primordial germ cell proliferation. *Mol Reprod Dev* 68 (1), 5-16.

Kawate, N., (2004). Studies on the regulation of expression of luteinizing hormone receptor in the ovary and the mechanism of follicular cyst formation in ruminants. *J Reprod Dev* 50 (1), 1-8.

Kennedy, K. L., Floyd, A. A., Clarkson, A. M. and Lee, V. H., (2003). Epidermal growth factor regulation of connexin 43 in cultured granulosa cells from preantral rabbit follicles. *Mol Reprod Dev* 64 (1), 61-9.

Keshet, E., Lyman, S. D., Williams, D. E., Anderson, D. M., Jenkins, N. A., Copeland, N. G. and Parada, L. F., (1991). Embryonic RNA expression patterns of the c-kit receptor and its cognate ligand suggest multiple functional roles in mouse development. *EMBO J* 10 (9), 2425-35.

Kesner, J. S., Convey, E. M. and Anderson, C. R., (1981). Evidence that estradiol induces the preovulatory LH surge in cattle by increasing pituitary sensitivity to LHRH and then increasing LHRH release. *Endocrinology* 108 (4), 1386-91.

Kezele, P., Nilsson, E. E. and Skinner, M. K., (2005). Keratinocyte growth factor acts as a mesenchymal factor that promotes ovarian primordial to primary follicle transition. *Biol Reprod* 73 (5), 967-73.

Kim, H. H., Wolfe, A., Smith, G. R., Tobet, S. A. and Radovick, S., (2002). Promoter sequences targeting tissue-specific gene expression of hypothalamic and ovarian

gonadotropin-releasing hormone in vivo. *J Biol Chem* 277 (7), 5194-202.

Kim, H. H., DiVall, S. A., Deneau, R. M. and Wolfe, A., (2005). Insulin regulation of GnRH gene expression through MAP kinase signaling pathways. *Mol Cell Endocrinol* 242 (1-2), 42-9.

Kim, H. H., Wolfe, A., Cohen, R. N., Eames, S. C., Johnson, A. L., Wieland, C. N. and Radovick, S., (2006). In Vivo Identification of a 107 bp Promoter Element Mediating Neuron-Specific Expression of Mouse GnRH. *Mol Endocrinol* .

Kim, H. H., (2007). Regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression. *Semin Reprod Med* 25 (5), 313-25.

King, J. A. and Millar, R. P., (1980). Comparative aspects of luteinizing hormone-releasing hormone structure and function in vertebrate phylogeny. *Endocrinology* 106 (3), 707-17.

Kipp, J. L., Kilen, S. M., Woodruff, T. K. and Mayo, K. E., (2007). Activin regulates estrogen receptor gene expression in the mouse ovary. *J Biol Chem* 282 (50), 36755-65.

Kipp, J. L., Kilen, S. M., Bristol-Gould, S., Woodruff, T. K. and Mayo, K. E., (2007a). Neonatal exposure to estrogens suppresses activin expression and signaling in the mouse ovary. *Endocrinology* 148 (5), 1968-76.

Klein, R., Robertson, D. M., Shukovski, L., Findlay, J. K. and de Kretser, D. M., (1991). The radioimmunoassay of follicle-stimulating hormone (FSH)-suppressing protein (FSP): stimulation of bovine granulosa cell FSP secretion by FSH. *Endocrinology* 128 (2), 1048-56.

Klinger, F. G. and De Felici, M., (2002). In vitro development of growing oocytes from fetal mouse oocytes: stage-specific regulation by stem cell factor and granulosa cells. *Dev Biol* 244 (1), 85-95.

Knecht, M., Ranta, T. and Catt, K. J., (1983). Granulosa cell differentiation in vitro: induction and maintenance of follicle-stimulating hormone receptors by adenosine 3',5'-monophosphate. *Endocrinology* 113 (3), 949-56.

Knecht, M., Tsai-Morris, C. H. and Catt, K. J., (1985). Estrogen dependence of luteinizing hormone receptor expression in cultured rat granulosa cells. Inhibition of granulosa cell development by the antiestrogens tamoxifen and keoxifene. *Endocrinology* 116 (5), 1771-7.

Knight, P. G. and Glister, C., (2001). Potential local regulatory functions of

inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reproduction* 121 (4), 503-12.

Knight, P. G., (1996). Roles of inhibins, activins, and follistatin in the female reproductive system. *Front Neuroendocrinol* 17 (4), 476-509.

Knobil, E., (1988). The neuroendocrine control of ovulation. *Hum Reprod* 3 (4), 469-72.

Knobil, E., (1990). The GnRH-pulse generator, s.1721-1727.

Knox, R. V., (2005). Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in the pig. *Domest Anim Endocrinol* 29 (2), 385-97.

Ko, J. C., Kastelic, J. P., Del Campo, M. R. and Ginther, O. J., (1991). Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers. *J Reprod Fertil* 91 (2), 511-9.

Kogawa, K., Ogawa, K., Hayashi, Y., Nakamura, T., Titani, K. and Sugino, H., (1991). Immunohistochemical localization of follistatin in rat tissues. *Endocrinol Jpn* 38 (4), 383-91.

Koji, T., Chedid, M., Rubin, J. S., Slayden, O. D., Csaky, K. G., Aaronson, S. A. and Brenner, R. M., (1994). Progesterone-dependent expression of keratinocyte growth factor mRNA in stromal cells of the primate endometrium: keratinocyte growth factor as a progestomedin. *J Cell Biol* 125 (2), 393-401.

Kolle, S., Sinowatz, F., Boie, G. and Lincoln, D., (1998). Developmental changes in the expression of the growth hormone receptor messenger ribonucleic acid and protein in the bovine ovary. *Biol Reprod* 59 (4), 836-42.

Koos, R. D. and Olson, C. E., (1989). Expression of basic fibroblast growth factor in the rat ovary: detection of mRNA using reverse transcription-polymerase chain reaction amplification. *Mol Endocrinol* 3 (12), 2041-8.

Kuhn, B. and Gudermann, T., (1999). The luteinizing hormone receptor activates phospholipase C via preferential coupling to Gi2. *Biochemistry* 38 (38), 12490-8.

Kumar, T. R., Wang, Y., Lu, N. and Matzuk, M. M., (1997). Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet* 15 (2), 201-4.

Kwintkiewicz, J., Cai, Z. and Stocco, C., (2007). Follicle-stimulating hormone-induced activation of Gata4 contributes in the up-regulation of Cyp19 expression in rat granulosa cells. *Mol Endocrinol* 21 (4), 933-47.

LaVoie, H. A., Singh, D. and Hui, Y. Y., (2004). Concerted regulation of the porcine

steroidogenic acute regulatory protein gene promoter activity by follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor I in granulosa cells involves GATA-4 and CCAAT/enhancer binding protein beta. *Endocrinology* 145 (7), 3122-34.

Laborde, P., Barkey, R. J., Belair, L., Remy, J. J., Djiane, J. and Salesse, R., (1996). Ontogenesis of LH and FSH receptors in postnatal rabbit testes: age-dependent differential expression of long and short RNA transcripts. *J Reprod Fertil* 108 (1), 25-30.

Laissue, P., Christin-Maitre, S., Touraine, P., Kuttann, F., Ritvos, O., Aittomaki, K., Bourcigaux, N., Jacquesson, L., Bouchard, P., Frydman, R., Dewailly, D., Reyss, A., Jeffery, L. and Bache,, (2006). Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. *Eur J Endocrinol* 154 (5), 739-44.

Lamba, P., Santos, M. M., Philips, D. P. and Bernard, D. J., (2006). Acute regulation of murine follicle-stimulating hormone beta subunit transcription by activin A. *J Mol Endocrinol* 36 (1), 201-20.

Langley, K. E., Mendiaz, E. A., Liu, N., Narhi, L. O., Zeni, L., Parseghian, C. M., Clogston, C. L., Leslie, I., Pope, J. A. and Lu, H. S., (1994). Properties of variant forms of human stem cell factor recombinantly expressed in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 311 (1), 55-61.

Lawler, S., Candia, A. F., Ebner, R., Shum, L., Lopez, A. R., Moses, H. L., Wright, C. V. and Derynck, R., (1994). The murine type II TGF-beta receptor has a coincident embryonic expression and binding preference for TGF-beta 1. *Development* 120 (1), 165-75.

Lawson, K. A. and Hage, W. J., (1994). Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. *Ciba Found Symp* 182 68-84; discussion 84-91.

Lawson, K. A., Dunn, N. R., Roelen, B. A., Zeinstra, L. M., Davis, A. M., Wright, C. V., Korving, J. P. and Hogan, B. L., (1999). Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* 13 (4), 424-36.

Lawson, M. A., Tsutsumi, R., Zhang, H., Talukdar, I., Butler, B. K., Santos, S. J., Mellon, P. L. and Webster, N. J. G., (2007). Pulse sensitivity of the luteinizing hormone beta promoter is determined by a negative feedback loop involving early growth response-1 and Ngfi-A binding protein 1 and 2. *Mol Endocrinol* 21 (5), 1175-91.

Lee, W. S., Otsuka, F., Moore, R. K. and Shimasaki, S., (2001). Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biol Reprod* 65 (4), 994-9.

Lee, K. B., Khivansara, V., Santos, M. M., Lamba, P., Yuen, T., Sealfon, S. C. and Bernard, D. J., (2007). Bone morphogenetic protein 2 and activin A synergistically stimulate follicle-stimulating hormone beta subunit transcription. *J Mol Endocrinol* 38 (1-2), 315-30.

Leeuwenberg, B. R., Hurst, P. R. and McNatty, K. P., (1995). Expression of IGF-I mRNA in the ovine ovary. *J Mol Endocrinol* 15 (3), 251-8.

Leigh, S. E. and Stewart, F., (1990). Partial cDNA sequence for the donkey chorionic gonadotrophin-beta subunit suggests evolution from an ancestral LH-beta gene. *J Mol Endocrinol* 4 (2), 143-50.

Lemmon, M. A., Pinchasi, D., Zhou, M., Lax, I. and Schlessinger, J., (1997). Kit receptor dimerization is driven by bivalent binding of stem cell factor. *J Biol Chem* 272 (10), 6311-7.

Leung, D. W., Spencer, S. A., Cachianes, G., Hammonds, R. G., Collins, C., Henzel, W. J., Barnard, R., Waters, M. J. and Wood, W. I., (1987). Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. *Nature* 330 (6148), 537-43.

Levacher, C., Gautier, C., Saez, J. M. and Habert, R., (1996). Immunohistochemical localization of transforming growth factor beta 1 and beta 2 in the fetal and neonatal rat ovary. *Differentiation* 61 (1), 45-51.

Lewis, K. A., Gray, P. C., Blount, A. L., MacConell, L. A., Wiater, E., Bilezikjian, L. M. and Vale, W., (2000). Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature* 404 (6776), 411-4.

Li, M. D., DePaolo, L. V. and Ford, J. J., (1997). Expression of follistatin and inhibin/activin subunit genes in porcine follicles. *Biol Reprod* 57 (1), 112-8.

Liang, L., Soyal, S. M. and Dean, J., (1997). FIGalpha, a germ cell specific transcription factor involved in the coordinate expression of the zona pellucida genes. *Development* 124 (24), 4939-47.

Liao, W. X., Moore, R. K., Otsuka, F. and Shimasaki, S., (2003). Effect of intracellular interactions on the processing and secretion of bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) and growth and differentiation factor-9. Implication of the aberrant ovarian phenotype of BMP-15 mutant sheep. *J Biol Chem* 278 (6), 3713-9.

Limonta, P., Moretti, R. M., Marelli, M. M. and Motta, M., (2003). The biology of gonadotropin hormone-releasing hormone: role in the control of tumor growth and progression in humans. *Front Neuroendocrinol* 24 (4), 279-95.

Lincoln, A. J., Wickramasinghe, D., Stein, P., Schultz, R. M., Palko, M. E., De Miguel, M. P., Tessarollo, L. and Donovan, P. J., (2002). Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. *Nat Genet* 30 (4), 446-9.

Lindzey, J., Jayes, F. L., Yates, M. M., Couse, J. F. and Korach, K. S., (2006). The bi-modal effects of estradiol on gonadotropin synthesis and secretion in female mice are dependent on estrogen receptor-alpha. *J Endocrinol* 191 (1), 309-17.

Ling, N., Ying, S. Y., Ueno, N., Shimasaki, S., Esch, F., Hotta, M. and Guillemin, R., (1986). Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin. *Nature* 321 (6072), 779-82.

Liu, X. J., Malkowski, M., Guo, Y., Erickson, G. F., Shimasaki, S. and Ling, N., (1993). Development of specific antibodies to rat insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBP-2 to -6): analysis of IGFBP production by rat granulosa cells. *Endocrinology* 132 (3), 1176-83.

Liu, F., Ventura, F., Doody, J. and Massague, J., (1995). Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol* 15 (7), 3479-86.

Liu, Z. H., Shintani, Y., Sakamoto, Y., Harada, K., Zhang, C. Y., Fujinaka, Y., Abe, M., Goto, T. and Saito, S., (1996). Effects of LHRH, FSH and activin A on follistatin secretion from cultured rat anterior pituitary cells. *Endocr J* 43 (3), 321-7.

Liu, J., Aronow, B. J., Witte, D. P., Pope, W. F. and La Barbera, A. R., (1998a). Cyclic and maturation-dependent regulation of follicle-stimulating hormone receptor and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in the porcine ovary. *Biol Reprod* 58 (3), 648-58. (a)

Liu, K., Wahlberg, P. and Ny, T., (1998b). Coordinated and cell-specific regulation of membrane type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP) and its substrate matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) by physiological signals during follicular development and ovulation. *Endocrinology* 139 (11), 4735-8. (b)

Liu, J., Koenigsfeld, A. T., Cantley, T. C., Boyd, C. K., Kobayashi, Y. and Lucy, M. C., (2000). Growth and the initiation of steroidogenesis in porcine follicles are associated with unique patterns of gene expression for individual components of the ovarian insulin-like growth factor system. *Biol Reprod* 63 (3), 942-52.

Liu, M., Albanese, C., Anderson, C. M., Hilty, K., Webb, P., Uht, R. M., Price, R. H. J., Pestell, R. G. and Kushner, P. J., (2002). Opposing action of estrogen receptors alpha

and beta on cyclin D1 gene expression. *J Biol Chem* 277 (27), 24353-60.

Logan, K. A., Juengel, J. L. and McNatty, K. P., (2002). Onset of steroidogenic enzyme gene expression during ovarian follicular development in sheep. *Biol Reprod* 66 (4), 906-16.

Loosfelt, H., Misrahi, M., Atger, M., Salesse, R., Vu Hai-Luu Thi, M. T., Jolivet, A., Guiochon-Mantel, A., Sar, S., Jallal, B. and Garnier, J., (1989). Cloning and sequencing of porcine LH-hCG receptor cDNA: variants lacking transmembrane domain. *Science* 245 (4917), 525-8.

Lu, H. S., Clogston, C. L., Wypych, J., Parker, V. P., Lee, T. D., Swiderek, K., Baltera, R. F. J., Patel, A. C., Chang, D. C. and Brankow, D. W., (1992). Post-translational processing of membrane-associated recombinant human stem cell factor expressed in Chinese hamster ovary cells. *Arch Biochem Biophys* 298 (1), 150-8.

Lucy, M. C., Liu, J., Boyd, C. K. and Bracken, C. J., (2001). Ovarian follicular growth in sows. *Reprod Suppl* 58 31-45.

Lundy, T., Smith, P., O'Connell, A., Hudson, N. L. and McNatty, K. P., (1999). Populations of granulosa cells in small follicles of the sheep ovary. *J Reprod Fertil* 115 (2), 251-62.

Luo, W. and Wiltbank, M. C., (2006). Distinct regulation by steroids of messenger RNAs for FSHR and CYP19A1 in bovine granulosa cells. *Biol Reprod* 75 (2), 217-25.

Lydon, J. P., DeMayo, F. J., Conneely, O. M. and O'Malley, B. W., (1996). Reproductive phenotypes of the progesterone receptor null mutant mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol* 56 (1-6 Spec No), 67-77.

Lyrakou, S., Hulten, M. A. and Hartshorne, G. M., (2002). Growth factors promote meiosis in mouse fetal ovaries in vitro. *Mol Hum Reprod* 8 (10), 906-11.

MacConell, L. A., Widger, A. E., Barth-Hall, S. and Roberts, V. J., (1998). Expression of activin and follistatin in the rat hypothalamus: anatomical association with gonadotropin-releasing hormone neurons and possible role of central activin in the regulation of luteinizing hormone release. *Endocrine* 9 (3), 233-41.

Machelon, V., Emilie, D., Lefevre, A., Nome, F., Durand-Gasselien, I. and Testart, J., (1994). Interleukin-6 biosynthesis in human preovulatory follicles: some of its potential roles at ovulation. *J Clin Endocrinol Metab* 79 (2), 633-42.

Magoffin, D. A., Gancedo, B. and Erickson, G. F., (1989). Transforming growth factor-beta promotes differentiation of ovarian thecal-interstitial cells but inhibits androgen

production. *Endocrinology* 125 (4), 1951-8.

Magoffin, D. A., (2005). Ovarian theca cell. *Int J Biochem Cell Biol* 37 (7), 1344-9.

Mahakali Zama, A., Hudson, F. P. 3. and Bedell, M. A., (2005). Analysis of hypomorphic KitlSl mutants suggests different requirements for KITL in proliferation and migration of mouse primordial germ cells. *Biol Reprod* 73 (4), 639-47.

Mamluk, R., Wolfenson, D. and Meidan, R., (1998). LH receptor mRNA and cytochrome P450 side-chain cleavage expression in bovine theca and granulosa cells luteinized by LH or forskolin. *Domest Anim Endocrinol* 15 (2), 103-14.

Manikkam, M., Calder, M. D., Salfen, B. E., Youngquist, R. S., Keisler, D. H. and Garverick, H. A., (2001). Concentrations of steroids and expression of messenger RNA for steroidogenic enzymes and gonadotropin receptors in bovine ovarian follicles of first and second waves and changes in second wave follicles after pulsatile LH infusion. *Anim Reprod Sci* 67 (3-4), 189-203.

Manova, K., Nocka, K., Besmer, P. and Bachvarova, R. F., (1990). Gonadal expression of c-kit encoded at the W locus of the mouse. *Development* 110 (4), 1057-69.

Manova, K., Huang, E. J., Angeles, M., De Leon, V., Sanchez, S., Pronovost, S. M., Besmer, P. and Bachvarova, R. F., (1993). The expression pattern of the c-kit ligand in gonads of mice supports a role for the c-kit receptor in oocyte growth and in proliferation of spermatogonia. *Dev Biol* 157 (1), 85-99.

Mao, J., Wu, G., Smith, M. F., McCauley, T. C., Cantley, T. C., Prather, R. S., Didion, B. A. and Day, B. N., (2002). Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation in vitro. *Biol Reprod* 67 (4), 1197-203.

Marshall J.C. et al, (1997), Regulators of Gonadotropin Subunit Gene Expression .

Maruo, T., Ladines-Llave, C. A., Samoto, T., Matsuo, H., Manalo, A. S., Ito, H. and Mochizuki, M., (1993). Expression of epidermal growth factor and its receptor in the human ovary during follicular growth and regression. *Endocrinology* 132 (2), 924-31.

Massague, J., (1990). The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 6 597-641.

Mathews, L. S., Enberg, B. and Norstedt, G., (1989). Regulation of rat growth hormone receptor gene expression. *J Biol Chem* 264 (17), 9905-10.

Matos, M. H. T., Lima-Verde, I. B., Bruno, J. B., Lopes, C. A. P., Martins, F. S., Santos, K. D. B., Rocha, R. M. P., Silva, J. R. V., Bao, S. N. and Figueiredo, J. R., (2007).

Follicle stimulating hormone and fibroblast growth factor-2 interact and promote goat primordial follicle development in vitro. *Reprod Fertil Dev* 19 (5), 677-84.

Matous, J. V., Langley, K. and Kaushansky, K., (1996). Structure-function relationships of stem cell factor: an analysis based on a series of human-murine stem cell factor chimera and the mapping of a neutralizing monoclonal antibody. *Blood* 88 (2), 437-44.

Matsui, Y., Toksoz, D., Nishikawa, S., Nishikawa, S., Williams, D., Zsebo, K. and Hogan, B. L., (1991). Effect of Steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature* 353 (6346), 750-2.

Maurer, R. A., (1985). Analysis of several bovine lutropin beta subunit cDNAs reveals heterogeneity in nucleotide sequence. *J Biol Chem* 260 (8), 4684-7.

May, J. V., Stephenson, L. A., Turzycynski, C. J., Fong, H. W., Mau, Y. H. and Davis, J. S., (1996). Transforming growth factor beta expression in the porcine ovary: evidence that theca cells are the major secretory source during antral follicle development. *Biol Reprod* 54 (2), 485-96.

Mazerbourg, S., Bondy, C. A., Zhou, J. and Monget, P., (2003). The insulin-like growth factor system: a key determinant role in the growth and selection of ovarian follicles? a comparative species study. *Reprod Domest Anim* 38 (4), 247-58.

McCoshen, J. A. and McCallion, D. J., (1975). A study of the primordial germ cells during their migratory phase in Steel mutant mice. *Experientia* 31 (5), 589-90.

McCue, J. M., Quirk, C. C., Nelson, S. E., Bowen, R. A. and Clay, C. M., (1997). Expression of a murine gonadotropin-releasing hormone receptor-luciferase fusion gene in transgenic mice is diminished by immunoneutralization of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 138 (8), 3154-60.

McFarland, K. C., Sprengel, R., Phillips, H. S., Kohler, M., Roseblit, N., Nikolics, K., Segaloff, D. L. and Seeburg, P. H., (1989). Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family. *Science* 245 (4917), 494-9.

McGee, E. A. and Hsueh, A. J., (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 21 (2), 200-14.

McGrath, S. A., Esqueda, A. F. and Lee, S. J., (1995). Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol Endocrinol* 9 (1), 131-6.

McNatty, K. P., Heath, D. A., Lundy, T., Fidler, A. E., Quirke, L., O'Connell, A., Smith, P., Groome, N. and Tisdall, D. J., (1999). Control of early ovarian follicular

development. *J Reprod Fertil Suppl* 54 3-16.

McNatty, K. P., Fidler, A. E., Juengel, J. L., Quirke, L. D., Smith, P. R., Heath, D. A., Lundy, T., O'Connell, A. and Tisdall, D. J., (2000). Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. *Mol Cell Endocrinol* 163 (1-2), 11-20.

McNatty, K. P., Juengel, J. L., Wilson, T., Galloway, S. M. and Davis, G. H., (2001). Genetic mutations influencing ovulation rate in sheep. *Reprod Fertil Dev* 13 (7-8), 549-55.

McNatty, K. P., Galloway, S. M., Wilson, T., Smith, P., Hudson, N. L., O'Connell, A., Bibby, A. H., Heath, D. A., Davis, G. H., Hanrahan, J. P. and Juengel, J. L., (2005). Physiological effects of major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genet Sel Evol* 37 Suppl 1 S25-38.

McNeilly, A. S., Crawford, J. L., Taragnat, C., Nicol, L. and McNeilly, J. R., (2003). The differential secretion of FSH and LH: regulation through genes, feedback and packaging. *Reprod Suppl* 61 463-76.

McRae, R. S., Johnston, H. M., Mihm, M. and O'Shaughnessy, P. J., (2005). Changes in mouse granulosa cell gene expression during early luteinization. *Endocrinology* 146 (1), 309-17.

Meduri, G., Charnaux, N., Driancourt, M., Combettes, L., Granet, P., Vannier, B., Loosfelt, H. and Milgrom, E., (2002). Follicle-stimulating hormone receptors in oocytes? *J Clin Endocrinol Metab* 87 (5), 2266-76.

Mehlmann, L. M., (2005). Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction* 130 (6), 791-9.

Melcangi, R. C., Galbiati, M., Messi, E., Piva, F., Martini, L. and Motta, M., (1995). Type 1 astrocytes influence luteinizing hormone-releasing hormone release from the hypothalamic cell line GT1-1: is transforming growth factor-beta the principle involved? *Endocrinology* 136 (2), 679-86.

Melcangi, R. C., Cavarretta, I., Magnaghi, V., Martini, L. and Galbiati, M., (2001). Interactions between growth factors and steroids in the control of LHRH-secreting neurons. *Brain Res Brain Res Rev* 37 (1-3), 223-34.

Menon, K. M. J., Munshi, U. M., Clouser, C. L. and Nair, A. K., (2004). Regulation of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor expression: a perspective. *Biol Reprod* 70 (4), 861-6.

Meunier, H., Rivier, C., Evans, R. M. and Vale, W., (1988). Gonadal and extragonadal expression of inhibin alpha, beta A, and beta B subunits in various tissues predicts diverse functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (1), 247-51.

Millar, R., Lowe, S., Conklin, D., Pawson, A., Maudsley, S., Troskie, B., Ott, T., Millar, M., Lincoln, G., Sellar, R., Faurholm, B., Scobie, G., Kuestner, R., Terasawa, E. and Katz, A., (2001). A novel mammalian receptor for the evolutionarily conserved type II GnRH. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (17), 9636-41.

Millar, R. P., (2003). GnRH II and type II GnRH receptors. *Trends Endocrinol Metab* 14 (1), 35-43.

Millar, R. P., Lu, Z., Pawson, A. J., Flanagan, C. A., Morgan, K. and Maudsley, S. R., (2004). Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocr Rev* 25 (2), 235-75.

Miller, C. D. and Miller, W. L., (1996). Transcriptional repression of the ovine follicle-stimulating hormone-beta gene by 17 beta-estradiol. *Endocrinology* 137 (8), 3437-46.

Minegishi, T., Nakamura, K., Takakura, Y., Miyamoto, K., Hasegawa, Y., Ibuki, Y., Igarashi, M. and Minegishi T. [corrected to Minegishi, T.], (1990). Cloning and sequencing of human LH/hCG receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 172 (3), 1049-54.

Minegishi, T., Tano, M., Nakamura, K., Karino, S., Miyamoto, K. and Ibuki, Y., (1995). Regulation of follicle-stimulating hormone receptor messenger ribonucleic acid levels in cultured rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 108 (1-2), 67-73.

Minegishi, T., Tano, M., Shinozaki, H., Nakamura, K., Abe, Y., Ibuki, Y. and Miyamoto, K., (1997). Dual coupling and down regulation of human FSH receptor in CHO cells. *Life Sci* 60 (23), 2043-50.

Miro, F., Smyth, C. D., Whitelaw, P. F., Milne, M. and Hillier, S. G., (1995). Regulation of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase delta 5/delta 4-isomerase and cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 by activin in rat granulosa cells. *Endocrinology* 136 (8), 3247-52.

Misajon, A., Hutchinson, P., Lolatgis, N., Trounson, A. O. and Almahbobi, G., (1999). The mechanism of action of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha on aromatase activity in granulosa cells from polycystic ovaries. *Mol Hum Reprod* 5 (2), 96-103.

Miyabayashi, K., Shimizu, T., Kawauchi, C., Sasada, H. and Sato, E., (2005). Changes of mRNA expression of vascular endothelial growth factor, angiopoietins and their

receptors during the periovulatory period in eCG/hCG-treated immature female rats. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 303 (7), 590-7.

Miyake, A., Tasaka, K., Otsuka, S., Kohmura, H., Wakimoto, H. and Aono, T., (1985). Epidermal growth factor stimulates secretion of rat pituitary luteinizing hormone in vitro. *Acta Endocrinol (Copenh)* 108 (2), 175-8.

Miyazono, K., Kusanagi, K. and Inoue, H., (2001). Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J Cell Physiol* 187 (3), 265-76.

Mizunuma, H., Liu, X., Andoh, K., Abe, Y., Kobayashi, J., Yamada, K., Yokota, H., Ibuki, Y. and Hasegawa, Y., (1999). Activin from secondary follicles causes small preantral follicles to remain dormant at the resting stage. *Endocrinology* 140 (1), 37-42.

Molter-Gerard, C., Fontaine, J., Guerin, S. and Taragnat, C., (1999). Differential regulation of the gonadotropin storage pattern by gonadotropin-releasing hormone pulse frequency in the ewe. *Biol Reprod* 60 (5), 1224-30.

Molyneaux, K. and Wylie, C., (2004). Primordial germ cell migration. *Int J Dev Biol* 48 (5-6), 537-44.

Mondschein, J. S. and Hammond, J. M., (1988). Growth factors regulate immunoreactive insulin-like growth factor-I production by cultured porcine granulosa cells. *Endocrinology* 123 (1), 463-8.

Monget, P. and Monniaux, D., (1994). Role du systeme IGF dans l'ovaire. *Contracept Fertil Sex* 22 (9), 556-63.

Monniaux, D. and Pisselet, C., (1992). Control of proliferation and differentiation of ovine granulosa cells by insulin-like growth factor-I and follicle-stimulating hormone in vitro. *Biol Reprod* 46 (1), 109-19.

Monniaux, D., (1987). Short-term effects of FSH in vitro on granulosa cells of individual sheep follicles. *J Reprod Fertil* 79 (2), 505-15.

Moore D.M, (1990), Rats CRC Press, B.E. Rollin, M.L. Kesel.

Moore, R. K., Otsuka, F. and Shimasaki, S., (2003). Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells. *J Biol Chem* 278 (1), 304-10.

Moore, R. K. and Shimasaki, S., (2005). Molecular biology and physiological role of the oocyte factor, BMP-15. *Mol Cell Endocrinol* 234 (1-2), 67-73.

Morand, I., Fonlupt, P., Guerrier, A., Trouillas, J., Calle, A., Remy, C., Rousset, B. and Munari-Silem, Y., (1996). Cell-to-cell communication in the anterior pituitary: evidence for gap junction-mediated exchanges between endocrine cells and folliculostellate

cells. *Endocrinology* 137 (8), 3356-67.

Morbeck, D. E., Flowers, W. L. and Britt, J. H., (1993). Response of porcine granulosa cells isolated from primary and secondary follicles to FSH, 8-bromo-cAMP and epidermal growth factor in vitro. *J Reprod Fertil* 99 (2), 577-84.

Morris, J. K. and Richards, J. S., (1995). Luteinizing hormone induces prostaglandin endoperoxide synthase-2 and luteinization in vitro by A-kinase and C-kinase pathways. *Endocrinology* 136 (4), 1549-58.

Mulheron, G. W., Mulheron, J. G., Danielpour, D. and Schomberg, D. W., (1992). Porcine granulosa cells do not express transforming growth factor-beta 2 (TGF-beta 2) messenger ribonucleic acid: molecular basis for their inability to produce TGF-beta activity comparable to that of rat granulosa cells. *Endocrinology* 131 (6), 2609-14.

Mulsant, P., Lecerf, F., Fabre, S., Schibler, L., Monget, P., Lanneluc, I., Pisselet, C., Riquet, J., Monniaux, D., Callebaut, I., Crihiu, E., Thimonier, J., Teyssier, J., Bodin, L., Cognie, Y., Chitour, N. and Elsen, J. M., (2001). Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (9), 5104-9.

Murdoch, J., Van Kirk, E. A. and Murdoch, W. J., (1999). Hormonal control of urokinase plasminogen activator secretion by sheep ovarian surface epithelial cells. *Biol Reprod* 61 (6), 1487-91.

Muttukrishna, S., Fowler, P. A., Groome, N. P., Mitchell, G. G., Robertson, W. R. and Knight, P. G., (1994). Serum concentrations of dimeric inhibin during the spontaneous human menstrual cycle and after treatment with exogenous gonadotrophin. *Hum Reprod* 9 (9), 1634-42.

Nahum, R., Beyth, Y., Chun, S. Y., Hsueh, A. J. and Tsafiriri, A., (1996). Early onset of deoxyribonucleic acid fragmentation during atresia of preovulatory ovarian follicles in rats. *Biol Reprod* 55 (5), 1075-80.

Nakamura, T., Takio, K., Eto, Y., Shibai, H., Titani, K. and Sugino, H., (1990). Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science* 247 (4944), 836-8.

Nakamura, M., Minegishi, T., Hasegawa, Y., Nakamura, K., Igarashi, S., Ito, I., Shinozaki, H., Miyamoto, K., Eto, Y. and Ibuki, Y., (1993). Effect of an activin A on follicle-stimulating hormone (FSH) receptor messenger ribonucleic acid levels and FSH receptor expressions in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 133 (2), 538-44.

Nakamura, K., Shirai, T., Morishita, S., Uchida, S., Saeki-Miura, K. and

Makishima, F., (1999). p38 mitogen-activated protein kinase functionally contributes to chondrogenesis induced by growth/differentiation factor-5 in ATDC5 cells. *Exp Cell Res* 250 (2), 351-63.

Nakatani, A., Shimasaki, S., Erickson, G. F. and Ling, N., (1991). Tissue-specific expression of four insulin-like growth factor-binding proteins (1, 2, 3, and 4) in the rat ovary. *Endocrinology* 129 (3), 1521-9.

Naor, Z., Benard, O. and Seger, R., (2000). Activation of MAPK cascades by G-protein-coupled receptors: the case of gonadotropin-releasing hormone receptor. *Trends Endocrinol Metab* 11 (3), 91-9.

Natraj, U. and Richards, J. S., (1993). Hormonal regulation, localization, and functional activity of the progesterone receptor in granulosa cells of rat preovulatory follicles. *Endocrinology* 133 (2), 761-9.

Neill, J. D., (2002). GnRH and GnRH receptor genes in the human genome. *Endocrinology* 143 (3), 737-43.

Neufeld, G., Ferrara, N., Schweigerer, L., Mitchell, R. and Gospodarowicz, D., (1987). Bovine granulosa cells produce basic fibroblast growth factor. *Endocrinology* 121 (2), 597-603.

Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S. and Poltorak, Z., (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 13 (1), 9-22.

Nilsson, E. and Skinner, M. K., (2001). Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis. *J Soc Gynecol Investig* 8 (1 Suppl Proceedings), S17-20.

Nilsson, E., Parrott, J. A. and Skinner, M. K., (2001). Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 175 (1-2), 123-30.

Nilsson, E. E., Kezele, P. and Skinner, M. K., (2002). Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. *Mol Cell Endocrinol* 188 (1-2), 65-73.

Nilsson, E. E. and Skinner, M. K., (2003). Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biol Reprod* 69 (4), 1265-72.

Nilsson, E. E. and Skinner, M. K., (2004). Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition. *Mol*

Cell Endocrinol 214 (1-2), 19-25.

Nogueira, M. F. G., Buratini, J. J., Price, C. A., Castilho, A. C. S., Pinto, M. G. L. and Barros, C. M., (2007). Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: changes with follicle size and regulation by FSH in vitro. *Mol Reprod Dev* 74 (6), 680-6.

Norwitz, E. R., Xu, S., Jeong, K., Bedecarrats, G. Y., Winebrenner, L. D., Chin, W. W. and Kaiser, U. B., (2002). Activin A augments GnRH-mediated transcriptional activation of the mouse GnRH receptor gene. *Endocrinology* 143 (3), 985-97.

O'Conner, J. L., Wade, M. F., Brann, D. W. and Mahesh, V. B., (1993). Direct anterior pituitary modulation of gonadotropin secretion by neuropeptide Y: role of gonadal steroids. *Neuroendocrinology* 58 (1), 129-35.

Oktay, K., Briggs, D. and Gosden, R. G., (1997). Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 82 (11), 3748-51.

Ongeri, E. M., Verderame, M. F. and Hammond, J. M., (2005). Follicle-stimulating hormone induction of ovarian insulin-like growth factor-binding protein-3 transcription requires a TATA box-binding protein and the protein kinase A and phosphatidylinositol-3 kinase pathways. *Mol Endocrinol* 19 (7), 1837-48.

Oomizu, S., Honda, J., Takeuchi, S., Kakeya, T., Masui, T. and Takahashi, S., (2000). Transforming growth factor-alpha stimulates proliferation of mammothrophs and corticotrophs in the mouse pituitary. *J Endocrinol* 165 (2), 493-501.

Orisaka, M., Orisaka, S., Jiang, J. Y., Craig, J., Wang, Y., Kotsuji, F. and Tsang, B. K., (2006a). Growth Differentiation Factor-9 Is Anti-Apoptotic during Follicular Development from Preantral to Early Antral Stage. *Mol Endocrinol* . (a)

Orisaka, M., Mizutani, T., Tajima, K., Orisaka, S., Shukunami, K., Miyamoto, K. and Kotsuji, F., (2006b). Effects of ovarian theca cells on granulosa cell differentiation during gonadotropin-independent follicular growth in cattle. *Mol Reprod Dev* 73 (6), 737-44. (b)

Ornitz, D. M. and Itoh, N., (2001). Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2 (3), REVIEWS3005.

Otsuka, F., Yao, Z., Lee, T., Yamamoto, S., Erickson, G. F. and Shimasaki, S., (2000). Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem* 275 (50), 39523-8.

Otsuka, F., Yamamoto, S., Erickson, G. F. and Shimasaki, S., (2001a). Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. *J Biol Chem* 276 (14), 11387-92. (a)

Otsuka, F., Moore, R. K., Iemura, S., Ueno, N. and Shimasaki, S., (2001b). Follistatin inhibits the function of the oocyte-derived factor BMP-15. *Biochem Biophys Res Commun* 289 (5), 961-6. (b)

Otsuka, F. and Shimasaki, S., (2002a). A novel function of bone morphogenetic protein-15 in the pituitary: selective synthesis and secretion of FSH by gonadotropes. *Endocrinology* 143 (12), 4938-41. (a)

Otsuka, F. and Shimasaki, S., (2002b). A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (12), 8060-5. (b)

Otsuka, F., Moore, R. K., Wang, X., Sharma, S., Miyoshi, T. and Shimasaki, S., (2005). Essential role of the oocyte in estrogen amplification of follicle-stimulating hormone signaling in granulosa cells. *Endocrinology* 146 (8), 3362-7.

Ozcakir, H. T., Giray, S. G., Ozbilgin, M. K., Uyar, Y., Lacin, S. and Caglar, H., (2005). Immunohistochemical detection of transforming growth factor-alpha, epidermal growth factor, and vascular endothelial growth factor expression in hyperstimulated rat ovary. *Acta Obstet Gynecol Scand* 84 (9), 887-93.

Packer, A. I., Hsu, Y. C., Besmer, P. and Bachvarova, R. F., (1994). The ligand of the c-kit receptor promotes oocyte growth. *Dev Biol* 161 (1), 194-205.

Pall, M., Hellberg, P., Brannstrom, M., Mikuni, M., Peterson, C. M., Sundfeldt, K., Norden, B., Hedin, L. and Enerback, S., (1997). The transcription factor C/EBP-beta and its role in ovarian function; evidence for direct involvement in the ovulatory process. *EMBO J* 16 (17), 5273-9.

Park, O. K. and Mayo, K. E., (1991). Transient expression of progesterone receptor messenger RNA in ovarian granulosa cells after the preovulatory luteinizing hormone surge. *Mol Endocrinol* 5 (7), 967-78.

Park, J., Richard, F., Chun, S., Park, J., Law, E., Horner, K., Jin, S. C. and Conti, M., (2003). Phosphodiesterase regulation is critical for the differentiation and pattern of gene expression in granulosa cells of the ovarian follicle. *Mol Endocrinol* 17 (6), 1117-30.

Park, J., Su, Y., Ariga, M., Law, E., Jin, S. C. and Conti, M., (2004). EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* 303 (5658), 682-4.

Partanen, J., Vainikka, S. and Alitalo, K., (1993). Structural and functional specificity of FGF receptors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 340 (1293), 297-303.

Parrott, J. A., Vigne, J. L., Chu, B. Z. and Skinner, M. K., (1994). Mesenchymal-epithelial interactions in the ovarian follicle involve keratinocyte and hepatocyte growth factor production by thecal cells and their action on granulosa cells. *Endocrinology* 135 (2), 569-75.

Parrott, J. A. and Skinner, M. K., (1997). Direct actions of kit-ligand on theca cell growth and differentiation during follicle development. *Endocrinology* 138 (9), 3819-27.

Parrott, J. A. and Skinner, M. K., (1998a). Thecal cell-granulosa cell interactions involve a positive feedback loop among keratinocyte growth factor, hepatocyte growth factor, and Kit ligand during ovarian follicular development. *Endocrinology* 139 (5), 2240-5. (a)

Parrott, J. A. and Skinner, M. K., (1998b). Developmental and hormonal regulation of hepatocyte growth factor expression and action in the bovine ovarian follicle. *Biol Reprod* 59 (3), 553-60. (b)

Parrott, J. A. and Skinner, M. K., (1999). Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology* 140 (9), 4262-71.

Parrott, J. A. and Skinner, M. K., (2000). Kit ligand actions on ovarian stromal cells: effects on theca cell recruitment and steroid production. *Mol Reprod Dev* 55 (1), 55-64.

Pavelock, K., Braas, K., Ouafik, L., Osol, G. and May, V., (2001). Differential expression and regulation of the vascular endothelial growth factor receptors neuropilin-1 and neuropilin-2 in rat uterus. *Endocrinology* 142 (2), 613-22.

Peng, X. R., Hsueh, A. J., LaPolt, P. S., Bjersing, L. and Ny, T., (1991). Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. *Endocrinology* 129 (6), 3200-7.

Pepling, M. E. and Spradling, A. C., (1998). Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. *Development* 125 (17), 3323-8.

Pepper, M. S., Mandriota, S. J., Jeltsch, M., Kumar, V. and Alitalo, K., (1998). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C synergizes with basic fibroblast growth factor and VEGF in the induction of angiogenesis in vitro and alters endothelial cell extracellular proteolytic activity. *J Cell Physiol* 177 (3), 439-52.

Perks, C. M., Denning-Kendall, P. A., Gilmour, R. S. and Wathes, D. C., (1995). Localization of messenger ribonucleic acids for insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, and the type 1 IGF receptor in the ovine ovary throughout the estrous cycle. *Endocrinology*

136 (12), 5266-73.

Pernasetti, F., Vasilyev, V. V., Rosenberg, S. B., Bailey, J. S., Huang, H. J., Miller, W. L. and Mellon, P. L., (2001). Cell-specific transcriptional regulation of follicle-stimulating hormone-beta by activin and gonadotropin-releasing hormone in the LbetaT2 pituitary gonadotrope cell model. *Endocrinology* 142 (6), 2284-95.

Pescador, N., Soumano, K., Stocco, D. M., Price, C. A. and Murphy, B. D., (1996). Steroidogenic acute regulatory protein in bovine corpora lutea. *Biol Reprod* 55 (2), 485-91.

Picton, H. M. and McNeilly, A. S., (1991). Evidence to support a follicle-stimulating hormone threshold theory for follicle selection in ewes chronically treated with gonadotrophin-releasing hormone agonist. *J Reprod Fertil* 93 (1), 43-51.

Pierre, A., Pisselet, C., Dupont, J., Mandon-Pepin, B., Monniaux, D., Monget, P. and Fabre, S., (2004). Molecular basis of bone morphogenetic protein-4 inhibitory action on progesterone secretion by ovine granulosa cells. *J Mol Endocrinol* 33 (3), 805-17.

Pierre, A., Pisselet, C., Dupont, J., Bontoux, M. and Monget, P., (2005). Bone morphogenetic protein 5 expression in the rat ovary: biological effects on granulosa cell proliferation and steroidogenesis. *Biol Reprod* 73 (6), 1102-8.

Pollack, S. E., Furth, E. E., Kallen, C. B., Arakane, F., Kiriakidou, M., Kozarsky, K. F. and Strauss, J. F. 3., (1997). Localization of the steroidogenic acute regulatory protein in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 82 (12), 4243-51.

Prendergast, K. A., Burger, L. L., Aylor, K. W., Haisenleder, D. J., Dalkin, A. C. and Marshall, J. C., (2004). Pituitary follistatin gene expression in female rats: evidence that inhibin regulates transcription. *Biol Reprod* 70 (2), 364-70.

Prochazka, R., Srsen, V., Nagyova, E., Miyano, T. and Flechon, J. E., (2000). Developmental regulation of effect of epidermal growth factor on porcine oocyte-cumulus cell complexes: nuclear maturation, expansion, and F-actin remodeling. *Mol Reprod Dev* 56 (1), 63-73.

Prochazka, R., Nemcova, L., Nagyova, E. and Kanka, J., (2004). Expression of growth differentiation factor 9 messenger RNA in porcine growing and preovulatory ovarian follicles. *Biol Reprod* 71 (4), 1290-5.

Puett, D., Li, Y., DeMars, G., Angelova, K. and Fanelli, F., (2007). A functional transmembrane complex: the luteinizing hormone receptor with bound ligand and G protein. *Mol Cell Endocrinol* 260-262 126-36.

R.E. Gore-Langton und D.T. Armstrong, (1994), Raven Press, Ltd., New York,

E.Knobil and J.D.Neil.

Rajagopalan-Gupta, R. M., Rasenick, M. M. and Hunzicker-Dunn, M., (1997). Luteinizing hormone/choriogonadotropin-dependent, cholera toxin-catalyzed adenosine 5'-diphosphate (ADP)-ribosylation of the long and short forms of Gs alpha and pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation of Gi alpha*. *Mol Endocrinol* 11 (5), 538-49.

Rajkovic, A. and Matzuk, M. M., (2002). Functional analysis of oocyte-expressed genes using transgenic models. *Mol Cell Endocrinol* 187 (1-2), 5-9.

Ravindranath, N., Little-Ihrig, L., Phillips, H. S., Ferrara, N. and Zeleznik, A. J., (1992). Vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid expression in the primate ovary. *Endocrinology* 131 (1), 254-60.

Reeka, N., Berg, F. D. and Brucker, C., (1998). Presence of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in human ovarian tissue and follicular fluid. *Hum Reprod* 13 (8), 2199-205.

Reshef, E., Lei, Z. M., Rao, C. V., Pridham, D. D., Chegini, N. and Luborsky, J. L., (1990). The presence of gonadotropin receptors in nonpregnant human uterus, human placenta, fetal membranes, and decidua. *J Clin Endocrinol Metab* 70 (2), 421-30.

Resnick, J. L., Ortiz, M., Keller, J. R. and Donovan, P. J., (1998). Role of fibroblast growth factors and their receptors in mouse primordial germ cell growth. *Biol Reprod* 59 (5), 1224-9.

Reynaud, K., Cortvrindt, R., Smitz, J. and Driancourt, M. A., (2000). Effects of Kit Ligand and anti-Kit antibody on growth of cultured mouse preantral follicles. *Mol Reprod Dev* 56 (4), 483-94.

Rice, S., Ojha, K., Whitehead, S. and Mason, H., (2007). Stage-Specific Expression of Androgen Receptor, Follicle-Stimulating Hormone Receptor, and Anti-Mullerian Hormone Type II Receptor in Single, Isolated, Human Preantral Follicles: Relevance to Polycystic Ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 92 (3), 1034-1040.

Richards, J. S., (1994). Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev* 15 (6), 725-51.

Richards, J. S., Russell, D. L., Robker, R. L., Dajee, M. and Alliston, T. N., (1998). Molecular mechanisms of ovulation and luteinization. *Mol Cell Endocrinol* 145 (1-2), 47-54.

Riese, D. J. 2. and Stern, D. F., (1998). Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays* 20 (1), 41-8.

Rinderknecht, E. and Humbel, R. E., (1978). Primary structure of human insulin-

like growth factor II. *FEBS Lett* 89 (2), 283-6.

Rivier, C., Rivier, J. and Vale, W., (1986). Inhibin-mediated feedback control of follicle-stimulating hormone secretion in the female rat. *Science* 234 (4773), 205-8.

Robert, C., Gagne, D., Lussier, J. G., Bousquet, D., Barnes, F. L. and Sirard, M., (2003). Presence of LH receptor mRNA in granulosa cells as a potential marker of oocyte developmental competence and characterization of the bovine splicing isoforms. *Reproduction* 125 (3), 437-46.

Roberts, A. J. and Skinner, M. K., (1991). Transforming growth factor-alpha and -beta differentially regulate growth and steroidogenesis of bovine thecal cells during antral follicle development. *Endocrinology* 129 (4), 2041-8.

Roberts, V., Meunier, H., Vaughan, J., Rivier, J., Rivier, C., Vale, W. and Sawchenko, P., (1989). Production and regulation of inhibin subunits in pituitary gonadotropes. *Endocrinology* 124 (1), 552-4.

Robinson, J. E., Healey, A. E., Harris, T. G., Messent, E. A., Skinner, D. C., Taylor, J. A. and Evans, N. P., (2000). The negative feedback action of progesterone on luteinizing hormone release is not associated with changes in GnRH mRNA expression in the Ewe. *J Neuroendocrinol* 12 (2), 121-9.

Robker, R. L. and Richards, J. S., (1998). Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: a coordinated balance of the cell cycle regulators cyclin D2 and p27Kip1. *Mol Endocrinol* 12 (7), 924-40.

Robker, R. L., Russell, D. L., Yoshioka, S., Sharma, S. C., Lydon, J. P., O'Malley, B. W., Espey, L. L. and Richards, J. S., (2000). Ovulation: a multi-gene, multi-step process. *Steroids* 65 (10-11), 559-70.

Roelen, B. A., Van Eijk, M. J., Van Rooijen, M. A., Bevers, M. M., Larson, J. H., Lewin, H. A. and Mummery, C. L., (1998). Molecular cloning, genetic mapping, and developmental expression of a bovine transforming growth factor beta (TGF-beta) type I receptor. *Mol Reprod Dev* 49 (1), 1-9.

Roskoski, R. J., (2005). Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 338 (3), 1307-15.

Rotwein, P., Pollock, K. M., Didier, D. K. and Krivi, G. G., (1986). Organization and sequence of the human insulin-like growth factor I gene. Alternative RNA processing produces two insulin-like growth factor I precursor peptides. *J Biol Chem* 261 (11), 4828-32.

Roy, S. K. and Greenwald, G. S., (1990). Immunohistochemical localization of

epidermal growth factor-like activity in the hamster ovary with a polyclonal antibody. *Endocrinology* 126 (3), 1309-17.

Roy, S. K. and Kole, A. R., (1998). Ovarian transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptors: in-vitro effects of follicle stimulating hormone, epidermal growth factor and TGF-beta on receptor expression in human preantral follicles. *Mol Hum Reprod* 4 (3), 207-14.

Roy, D., Angelini, N. L. and Belsham, D. D., (1999). Estrogen directly respresses gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression in estrogen receptor-alpha (ERalpha)- and ERbeta-expressing GT1-7 GnRH neurons. *Endocrinology* 140 (11), 5045-53.

Roy, S. K., (2000). Regulation of transforming growth factor-beta-receptor type I and type II messenger ribonucleic acid expression in the hamster ovary by gonadotropins and steroid hormones. *Biol Reprod* 62 (6), 1858-65.

Rusovici, R., Hui, Y. Y. and Lavoie, H. A., (2005). Epidermal growth factor-mediated inhibition of follicle-stimulating hormone-stimulated StAR gene expression in porcine granulosa cells is associated with reduced histone H3 acetylation. *Biol Reprod* 72 (4), 862-71.

Saade, G., London, D. R., Lalloz, M. R. and Clayton, R. N., (1989). Regulation of LH subunit and prolactin mRNA by gonadal hormones in mice. *J Mol Endocrinol* 2 (3), 213-24.

Sadighi, M., Bodensteiner, K. J., Beattie, A. E. and Galloway, S. M., (2002). Genetic mapping of ovine growth differentiation factor 9 (GDF9) to sheep chromosome 5. *Anim Genet* 33 (3), 244-5.

Saito, S., Nakamura, T., Titani, K. and Sugino, H., (1991). Production of activin-binding protein by rat granulosa cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 176 (1), 413-22.

Sakata, S., Sakamaki, K., Watanabe, K., Nakamura, N., Toyokuni, S., Nishimune, Y., Mori, C. and Yonehara, S., (2003). Involvement of death receptor Fas in germ cell degeneration in gonads of Kit-deficient Wv/Wv mutant mice. *Cell Death Differ* 10 (6), 676-86.

Salvador, L. M., Maizels, E., Hales, D. B., Miyamoto, E., Yamamoto, H. and Hunzicker-Dunn, M., (2002). Acute signaling by the LH receptor is independent of protein kinase C activation. *Endocrinology* 143 (8), 2986-94.

Schally, A. V., Arimura, A., Kastin, A. J., Matsuo, H., Baba, Y., Redding, T. W.,

Nair, R. M., Debeljuk, L. and White, W. F., (1971). Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science* 173 (4001), 1036-8.

Schechter, J., Pattison, A. and Pattison, T., (1996). Basic fibroblast growth factor within endothelial cells during vascularization of the anterior pituitary. *Anat Rec* 245 (1), 46-52.

Schmid, P., Cox, D., van der Putten, H., McMaster, G. K. and Bilbe, G., (1994). Expression of TGF-beta s and TGF-beta type II receptor mRNAs in mouse folliculogenesis: stored maternal TGF-beta 2 message in oocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 201 (2), 649-56.

Schneyer A.L., (1997), . Follistatin Physiology and potential mechanisms of action in the human, in *Inhibin, Activin and Follistatin*, from Aono T.

Schnorr, B., (1996). Embryologie der Haustiere, ein Kurzlehrbuch.

Schwall, R. H., Mason, A. J., Wilcox, J. N., Bassett, S. G. and Zeleznik, A. J., (1990). Localization of inhibin/activin subunit mRNAs within the primate ovary. *Mol Endocrinol* 4 (1), 75-9.

Schwall, R. H., Chang, L. Y., Godowski, P. J., Kahn, D. W., Hillan, K. J., Bauer, K. D. and Zioncheck, T. F., (1996). Heparin induces dimerization and confers proliferative activity onto the hepatocyte growth factor antagonists NK1 and NK2. *J Cell Biol* 133 (3), 709-18.

Schwanzel-Fukuda, M. and Pfaff, D. W., (1989). Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature* 338 (6211), 161-4.

Schwartz TW, G. U. S. H. H. S., (1995). Molecular Mechanism of action of non-peptide ligands for peptide receptors. *current pharmaceutical design* (1), 325-342.

Segaloff, D. L., Wang, H. Y. and Richards, J. S., (1990). Hormonal regulation of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor mRNA in rat ovarian cells during follicular development and luteinization. *Mol Endocrinol* 4 (12), 1856-65.

Senger, D. R., Van de Water, L., Brown, L. F., Nagy, J. A., Yeo, K. T., Yeo, T. K., Berse, B., Jackman, R. W., Dvorak, A. M. and Dvorak, H. F., (1993). Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev* 12 (3-4), 303-24.

Shamgochian, M. D. and Leeman, S. E., (1992). Substance P stimulates luteinizing hormone secretion from anterior pituitary cells in culture. *Endocrinology* 131 (2), 871-5.

Sharma, S. C., Clemens, J. W., Pisarska, M. D. and Richards, J. S., (1999).

Expression and function of estrogen receptor subtypes in granulosa cells: regulation by estradiol and forskolin. *Endocrinology* 140 (9), 4320-34.

Sharma, S., Oomizu, S., Kakeya, T., Masui, T., Takeuchi, S. and Takahashi, S., (2003). Gene expression and the physiological role of transforming growth factor- α in the mouse pituitary. *Zoolog Sci* 20 (1), 83-9.

Sher, N., Yivgi-Ohana, N. and Orly, J., (2007). Transcriptional regulation of the cholesterol side chain cleavage cytochrome P450 gene (CYP11A1) revisited: binding of GATA, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein and activating protein (AP)-1 proteins to a distal novel cl. *Mol Endocrinol* 21 (4), 948-62.

Shimada, M., Yamashita, Y., Ito, J., Okazaki, T., Kawahata, K. and Nishibori, M., (2004). Expression of two progesterone receptor isoforms in cumulus cells and their roles during meiotic resumption of porcine oocytes. *J Mol Endocrinol* 33 (1), 209-25.

Shimada, M., Hernandez-Gonzalez, I., Gonzalez-Robayna, I. and Richards, J. S., (2006). Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. *Mol Endocrinol* 20 (6), 1352-65.

Shimasaki, S., Koga, M., Esch, F., Cooksey, K., Mercado, M., Koba, A., Ueno, N., Ying, S. Y., Ling, N. and Guillemin, R., (1988a). Primary structure of the human follistatin precursor and its genomic organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (12), 4218-22. (a)

Shimasaki, S., Koga, M., Esch, F., Mercado, M., Cooksey, K., Koba, A. and Ling, N., (1988b). Porcine follistatin gene structure supports two forms of mature follistatin produced by alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* 152 (2), 717-23. (b)

Shimasaki, S., Zachow, R. J., Li, D., Kim, H., Iemura, S., Ueno, N., Sampath, K., Chang, R. J. and Erickson, G. F., (1999). A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (13), 7282-7.

Shimasaki, S., Moore, R. K., Erickson, G. F. and Otsuka, F., (2003). The role of bone morphogenetic proteins in ovarian function. *Reprod Suppl* 61 323-37.

Shimasaki, S., Moore, R. K., Otsuka, F. and Erickson, G. F., (2004). The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev* 25 (1), 72-101.

Shimatsu, A. and Rotwein, P., (1987). Sequence of two rat insulin-like growth factor I mRNAs differing within the 5' untranslated region. *Nucleic Acids Res* 15 (17), 7196.

Shimizu, T., Jiang, J., Sasada, H. and Sato, E., (2002). Changes of messenger RNA expression of angiogenic factors and related receptors during follicular development in gilts.

Biol Reprod 67 (6), 1846-52.

Shimizu, T., Iijima, K., Sasada, H. and Sato, E., (2003a). Messenger ribonucleic acid expressions of hepatocyte growth factor, angiopoietins and their receptors during follicular development in gilts. *J Reprod Dev* 49 (3), 203-11. (a)

Shimizu, T., Jiang, J., Iijima, K., Miyabayashi, K., Ogawa, Y., Sasada, H. and Sato, E., (2003b). Induction of follicular development by direct single injection of vascular endothelial growth factor gene fragments into the ovary of miniature gilts. *Biol Reprod* 69 (4), 1388-93. (b)

Shimizu, T., Miyahayashi, Y., Yokoo, M., Hoshino, Y., Sasada, H. and Sato, E., (2004). Molecular cloning of porcine growth differentiation factor 9 (GDF-9) cDNA and its role in early folliculogenesis: direct ovarian injection of GDF-9 gene fragments promotes early folliculogenesis. *Reproduction* 128 (5), 537-43

Shimizu, T. and Sato, E., (2005). Manipulation of ovarian follicle development by injecting vascular endothelial growth factor (VEGF) gene. *Reprod Biol* 5 (3), 257-68.

Shimizu, T., (2006). Promotion of ovarian follicular development by injecting vascular endothelial growth factor (VEGF) and growth differentiation factor 9 (GDF-9) genes. *J Reprod Dev* 52 (1), 23-32.

Shimizu, T., Jayawardana, B. C., Nishimoto, H., Kaneko, E., Tetsuka, M. and Miyamoto, A., (2006a). Involvement of the bone morphogenetic protein/receptor system during follicle development in the bovine ovary: Hormonal regulation of the expression of bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) and its receptors (ActRII and ALK-2). *Mol Cell Endocrinol* 249 (1-2), 78-83. (a)

Shimizu, T., Jayawardana, B. C., Nishimoto, H., Kaneko, E., Tetsuka, M. and Miyamoto, A., (2006b). Hormonal regulation and differential expression of neuropilin (NRP)-1 and NRP-2 genes in bovine granulosa cells. *Reproduction* 131 (3), 555-9. (b)

Shimizu, T., Jayawardana, B. C., Tetsuka, M. and Miyamoto, A., (2007). Differential effect of follicle-stimulating hormone and estradiol on expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) 120, VEGF164 and their receptors in bovine granulosa cells. *J Reprod Dev* 53 (1), 105-12.

Shimomura, T., Denda, K., Kitamura, A., Kawaguchi, T., Kito, M., Kondo, J., Kagaya, S., Qin, L., Takata, H., Miyazawa, K. and Kitamura, N., (1997). Hepatocyte growth factor activator inhibitor, a novel Kunitz-type serine protease inhibitor. *J Biol Chem* 272 (10), 6370-6.

Shimonaka, M., Inouye, S., Shimasaki, S. and Ling, N., (1991). Follistatin binds to both activin and inhibin through the common subunit. *Endocrinology* 128 (6), 3313-5.

Shupnik, M. A., Weinmann, C. M., Notides, A. C. and Chin, W. W., (1989). An upstream region of the rat luteinizing hormone beta gene binds estrogen receptor and confers estrogen responsiveness. *J Biol Chem* 264 (1), 80-6.

Shupnik, M. A., (1990). Effects of gonadotropin-releasing hormone on rat gonadotropin gene transcription in vitro: requirement for pulsatile administration for luteinizing hormone-beta gene stimulation. *Mol Endocrinol* 4 (10), 1444-50.

Shupnik, M. A., (1996). Gonadotropin gene modulation by steroids and gonadotropin-releasing hormone. *Biol Reprod* 54 (2), 279-86.

Sidis, Y., Fujiwara, T., Leykin, L., Isaacson, K., Toth, T. and Schneyer, A. L., (1998). Characterization of inhibin/activin subunit, activin receptor, and follistatin messenger ribonucleic acid in human and mouse oocytes: evidence for activin's paracrine signaling from granulosa cells to oocytes. *Biol Reprod* 59 (4), 807-12.

Silva, J. M. and Price, C. A., (2002). Insulin and IGF-I are necessary for FSH-induced cytochrome P450 aromatase but not cytochrome P450 side-chain cleavage gene expression in oestrogenic bovine granulosa cells in vitro. *J Endocrinol* 174 (3), 499-507.

Silva, J. R. V., van den Hurk, R., van Tol, H. T. A., Roelen, B. A. J. and Figueiredo, J. R., (2004a). Gene expression and protein localisation for activin-A, follistatin and activin receptors in goat ovaries. *J Endocrinol* 183 (2), 405-15. (a)

Silva, J. R. V., van den Hurk, R., de Matos, M. H. T., dos Santos, R. R., Pessoa, C., de Moraes, M. O. and de Figueiredo, J. R., (2004b). Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue. *Theriogenology* 61 (9), 1691-704. (b)

Silva, J. R. V., van den Hurk, R., van Tol, H. T. A., Roelen, B. A. J. and Figueiredo, J. R., (2005). Expression of growth differentiation factor 9 (GDF9), bone morphogenetic protein 15 (BMP15), and BMP receptors in the ovaries of goats. *Mol Reprod Dev* 70 (1), 11-9.

Silva, J. R. V., Tharasanit, T., Taverne, M. A. M., van der Weijden, G. C., Santos, R. R., Figueiredo, J. R. and van den Hurk, R., (2006a). The activin-follistatin system and in vitro early follicle development in goats. *J Endocrinol* 189 (1), 113-25. (a)

Silva, J. R. V., van den Hurk, R. and Figueiredo, J. R., (2006b). Expression of mRNA and protein localization of epidermal growth factor and its receptor in goat ovaries.

Zygote 14 (2), 107-17. (b)

Singh, B., Rutledge, J. M. and Armstrong, D. T., (1995). Epidermal growth factor and its receptor gene expression and peptide localization in porcine ovarian follicles. *Mol Reprod Dev* 40 (4), 391-9.

Singh, J. and Adams, G. P., (1998). Immunohistochemical distribution of follistatin in dominant and subordinate follicles and the corpus luteum of cattle. *Biol Reprod* 59 (3), 561-70.

Singh, J., Brogliatti, G. M., Christensen, C. R. and Adams, G. P., (1999). Active immunization against follistatin and its effect on FSH, follicle development and superovulation in heifers. *Theriogenology* 52 (1), 49-66.

Sites, C. K., Patterson, K., Jamison, C. S., Degen, S. J. and LaBarbera, A. R., (1994). Follicle-stimulating hormone (FSH) increases FSH receptor messenger ribonucleic acid while decreasing FSH binding in cultured porcine granulosa cells. *Endocrinology* 134 (1), 411-7.

Skinner, M. K., (2005). Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update* 11 (5), 461-71.

Slomczynska, M. and Tabarowski, Z., (2001). Localization of androgen receptor and cytochrome P450 aromatase in the follicle and corpus luteum of the porcine ovary. *Anim Reprod Sci* 65 (1-2), 127-34.

Smith, W. C., Kuniyoshi, J. and Talamantes, F., (1989). Mouse serum growth hormone (GH) binding protein has GH receptor extracellular and substituted transmembrane domains. *Mol Endocrinol* 3 (6), 984-90.

Smyth, C. D., Miro, F., Whitelaw, P. F., Howles, C. M. and Hillier, S. G., (1993). Ovarian thecal/interstitial androgen synthesis is enhanced by a follicle-stimulating hormone-stimulated paracrine mechanism. *Endocrinology* 133 (4), 1532-8.

Soker, S., Takashima, S., Miao, H. Q., Neufeld, G. and Klagsbrun, M., (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92 (6), 735-45.

Souza, C. J. H., Campbell, B. K., McNeilly, A. S. and Baird, D. T., (2002). Effect of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on oestradiol and inhibin A production by sheep granulosa cells, and localization of BMP receptors in the ovary by immunohistochemistry. *Reproduction* 123 (3), 363-9.

Soyal, S. M., Amleh, A. and Dean, J., (2000). FIGalpha, a germ cell-specific

transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development* 127 (21), 4645-54.

Spady, T. J., Shayya, R., Thackray, V. G., Ehrensberger, L., Bailey, J. S. and Mellon, P. L., (2004). Androgen regulates follicle-stimulating hormone beta gene expression in an activin-dependent manner in immortalized gonadotropes. *Mol Endocrinol* 18 (4), 925-40.

Spangelo, B. L., Judd, A. M., Isakson, P. C. and MacLeod, R. M., (1989). Interleukin-6 stimulates anterior pituitary hormone release in vitro. *Endocrinology* 125 (1), 575-7.

Spicer, L. J. and Echtenkamp, S. E., (1995). The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domest Anim Endocrinol* 12 (3), 223-45.

Spicer, L. J. and Aad, P. Y., (2007). Insulin-Like Growth Factor (IGF) 2 Stimulates Steroidogenesis and Mitosis of Bovine Granulosa Cells Through the IGF1 Receptor: Role of Follicle-Stimulating Hormone and IGF2 Receptor. *Biol Reprod* .

Srisuparp, S., Strakova, Z., Brudney, A., Mukherjee, S., Reierstad, S., Hunzicker-Dunn, M. and Fazleabas, A. T., (2003). Signal transduction pathways activated by chorionic gonadotropin in the primate endometrial epithelial cells. *Biol Reprod* 68 (2), 457-64.

Steinkampf, M. P., Mendelson, C. R. and Simpson, E. R., (1988). Effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the levels of mRNA encoding aromatase cytochrome P-450 of human ovarian granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 59 (1-2), 93-9.

Stenvers, K. L., Tursky, M. L., Harder, K. W., Kountouri, N., Amatayakul-Chantler, S., Grail, D., Small, C., Weinberg, R. A., Sizeland, A. M. and Zhu, H., (2003). Heart and liver defects and reduced transforming growth factor beta2 sensitivity in transforming growth factor beta type III receptor-deficient embryos. *Mol Cell Biol* 23 (12), 4371-85.

Sterneck, E., Tessarollo, L. and Johnson, P. F., (1997). An essential role for C/EBPbeta in female reproduction. *Genes Dev* 11 (17), 2153-62.

Stirling, D., Waterman, M. R. and Simpson, E. R., (1991). Expression of mRNA encoding basic fibroblast growth factor (bFGF) in bovine corpora lutea and cultured luteal cells. *J Reprod Fertil* 91 (1), 1-8.

Stocco, D. M. and Clark, B. J., (1997). The role of the steroidogenic acute regulatory protein in steroidogenesis. *Steroids* 62 (1), 29-36.

Stocco, D. M., (1997). A StAR search: implications in controlling steroidogenesis. *Biol Reprod* 56 (2), 328-36.

Stocco, D. M., (2001). Tracking the role of a star in the sky of the new millennium. *Mol Endocrinol* 15 (8), 1245-54.

Stojilkovic, S. S., Reinhart, J. and Catt, K. J., (1994). Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure and signal transduction pathways. *Endocr Rev* 15 (4), 462-99.

Su, Y., Nyegaard, M., Overgaard, M. T., Qiao, J. and Giudice, L. C., (2006). Participation of mitogen-activated protein kinase in luteinizing hormone-induced differential regulation of steroidogenesis and steroidogenic gene expression in mural and cumulus granulosa cells of mouse preovulatory follicles. *Biol Reprod* 75 (6), 859-67.

Sudo, N., Shimizu, T., Kawashima, C., Kaneko, E., Tetsuka, M. and Miyamoto, A., (2007). Insulin-like growth factor-I (IGF-I) system during follicle development in the bovine ovary: relationship among IGF-I, type 1 IGF receptor (IGFR-1) and pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A). *Mol Cell Endocrinol* 264 (1-2), 197-203.

Sugino, K., Kurosawa, N., Nakamura, T., Takio, K., Shimasaki, S., Ling, N., Titani, K. and Sugino, H., (1993). Molecular heterogeneity of follistatin, an activin-binding protein. Higher affinity of the carboxyl-terminal truncated forms for heparan sulfate proteoglycans on the ovarian granulosa cell. *J Biol Chem* 268 (21), 15579-87.

Suzumori, N., Pangas, S. A. and Rajkovic, A., (2007). Candidate genes for premature ovarian failure. *Curr Med Chem* 14 (3), 353-7.

Tajima, Y., Huang, E. J., Vosseller, K., Ono, M., Moore, M. A. and Besmer, P., (1998). Role of dimerization of the membrane-associated growth factor kit ligand in juxtacrine signaling: the S117H mutation affects dimerization and stability-phenotypes in hematopoiesis. *J Exp Med* 187 (9), 1451-61.

Takeuchi, Y., Molyneaux, K., Runyan, C., Schaible, K. and Wylie, C., (2005). The roles of FGF signaling in germ cell migration in the mouse. *Development* 132 (24), 5399-409.

Tamura, N., Irahara, M., Kuwahara, A., Ushigoe, K., Sugino, H. and Aono, T., (2000). Effect of activin on production and secretion of prolactin and growth hormone in cultured rat GH3 cells. *Eur J Endocrinol* 142 (5), 506-11.

Taniguchi, F., Couse, J. F., Rodriguez, K. F., Emmen, J. M. A., Poirier, D. and Korach, K. S., (2007). Estrogen receptor-alpha mediates an intraovarian negative feedback loop on thecal cell steroidogenesis via modulation of Cyp17a1 (cytochrome P450, steroid 17alpha-hydroxylase/17,20 lyase) expression. *FASEB J* 21 (2), 586-95.

Tebar, M., de Jong, F. H. and Sanchez-Criado, J. E., (2000). Regulation of inhibin/activin subunits and follistatin mRNA expression in the rat pituitary at early estrus. *Life Sci* 67 (21), 2549-62.

Telfer, E. and Gosden, R. G., (1987). A quantitative cytological study of polyovular follicles in mammalian ovaries with particular reference to the domestic bitch (*Canis familiaris*). *J Reprod Fertil* 81 (1), 137-47.

Tena-Sempere, M., Manna, P. R. and Huhtaniemi, I., (1999). Molecular cloning of the mouse follicle-stimulating hormone receptor complementary deoxyribonucleic acid: functional expression of alternatively spliced variants and receptor inactivation by a C566T transition in exon 7 of the coding sequence. *Biol Reprod* 60 (6), 1515-27.

Tena-Sempere, M., (2007). Roles of ghrelin and leptin in the control of reproductive function. *Neuroendocrinology* 86 (3), 229-41.

Terasawa, E. and Fernandez, D. L., (2001). Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. *Endocr Rev* 22 (1), 111-51.

Tetsuka, M., Whitelaw, P. F., Bremner, W. J., Millar, M. R., Smyth, C. D. and Hillier, S. G., (1995). Developmental regulation of androgen receptor in rat ovary. *J Endocrinol* 145 (3), 535-43.

Tetsuka, M. and Hillier, S. G., (1997). Differential regulation of aromatase and androgen receptor in granulosa cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 61 (3-6), 233-9.

Tetsuka, M., Thomas, F. J., Thomas, M. J., Anderson, R. A., Mason, J. I. and Hillier, S. G., (1997). Differential expression of messenger ribonucleic acids encoding 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 82 (6), 2006-9.

Tetsuka, M., Milne, M., Simpson, G. E. and Hillier, S. G., (1999). Expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase, glucocorticoid receptor, and mineralocorticoid receptor genes in rat ovary. *Biol Reprod* 60 (2), 330-5.

Thackray, V. G., McGillivray, S. M. and Mellon, P. L., (2006). Androgens, progestins, and glucocorticoids induce follicle-stimulating hormone beta-subunit gene expression at the level of the gonadotrope. *Mol Endocrinol* 20 (9), 2062-79.

Themmen, A. P., Blok, L. J., Post, M., Baarends, W. M., Hoogerbrugge, J. W., Parmentier, M., Vassart, G. and Grootegoed, J. A., (1991). Follitropin receptor down-regulation involves a cAMP-dependent post-transcriptional decrease of receptor mRNA expression. *Mol Cell Endocrinol* 78 (3), R7-13.

Thind, K. K. and Goldsmith, P. C., (1988). Infundibular gonadotropin-releasing hormone neurons are inhibited by direct opioid and autoregulatory synapses in juvenile monkeys. *Neuroendocrinology* 47 (3), 203-16.

Thomas, F. H., Ethier, J., Shimasaki, S. and Vanderhyden, B. C., (2005). Follicle-stimulating hormone regulates oocyte growth by modulation of expression of oocyte and granulosa cell factors. *Endocrinology* 146 (2), 941-9.

Thomas, F. H. and Vanderhyden, B. C., (2006). Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reprod Biol Endocrinol* 4 19.

Tilly, J. L., LaPolt, P. S. and Hsueh, A. J., (1992). Hormonal regulation of follicle-stimulating hormone receptor messenger ribonucleic acid levels in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 130 (3), 1296-302.

Timossi, C. M., Barrios-de-Tomasi, J., Gonzalez-Suarez, R., Arranz, M. C., Padmanabhan, V., Conn, P. M. and Ulloa-Aguirre, A., (2000). Differential effects of the charge variants of human follicle-stimulating hormone. *J Endocrinol* 165 (2), 193-205.

Tisdall, D. J., Hudson, N., Smith, P. and McNatty, K. P., (1994). Localization of ovine follistatin and alpha and beta A inhibin mRNA in the sheep ovary during the oestrous cycle. *J Mol Endocrinol* 12 (2), 181-93.

Tisdall, D. J., Quirke, L. D. and Galloway, S. M., (1996). Ovine stem cell factor gene is located within a syntenic group on chromosome 3 conserved across mammalian species. *Mamm Genome* 7 (6), 472-3.

Tisdall, D. J., Quirke, L. D., Smith, P. and McNatty, K. P., (1997). Expression of the ovine stem cell factor gene during folliculogenesis in late fetal and adult ovaries. *J Mol Endocrinol* 18 (2), 127-35.

Tisdall, D. J., Fidler, A. E., Smith, P., Quirke, L. D., Stent, V. C., Heath, D. A. and McNatty, K. P., (1999). Stem cell factor and c-kit gene expression and protein localization in the sheep ovary during fetal development. *J Reprod Fertil* 116 (2), 277-91.

Topilko, P., Schneider-Maunoury, S., Levi, G., Trembleau, A., Gourdji, D., Driancourt, M. A., Rao, C. V. and Charnay, P., (1998). Multiple pituitary and ovarian defects in Krox-24 (NGFI-A, Egr-1)-targeted mice. *Mol Endocrinol* 12 (1), 107-22.

Tremblay, J. J. and Drouin, J., (1999). Egr-1 is a downstream effector of GnRH and synergizes by direct interaction with Ptx1 and SF-1 to enhance luteinizing hormone beta gene transcription. *Mol Cell Biol* 19 (4), 2567-76.

Trounson, A., Anderiesz, C. and Jones, G., (2001). Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction* 121 (1), 51-75.

Tsafiriri, A., (1979). Mammalian oocyte maturation: model systems and their physiological relevance. *Adv Exp Med Biol* 112 269-81.

Tsafiriri, A. and Reich, R., (1999). Molecular aspects of mammalian ovulation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 107 (1), 1-11.

Turgeon, J. L., Kimura, Y., Waring, D. W. and Mellon, P. L., (1996). Steroid and pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) regulation of luteinizing hormone and GnRH receptor in a novel gonadotrope cell line. *Mol Endocrinol* 10 (4), 439-50.

Turzillo, A. M. and Fortune, J. E., (1990). Suppression of the secondary FSH surge with bovine follicular fluid is associated with delayed ovarian follicular development in heifers. *J Reprod Fertil* 89 (2), 643-53.

Uccella, S., La Rosa, S., Genasetti, A. and Capella, C., (2000). Localization of inhibin/activin subunits in normal pituitary and in pituitary adenomas. *Pituitary* 3 (3), 131-9.

Ueda, S., Ikeda, H., Mizuki, M., Ishiko, J., Matsumura, I., Tanaka, H., Shibayama, H., Sugahara, H., Takai, E., Zhang, X., Machii, T. and Kanakura, Y., (2002). Constitutive activation of c-kit by the juxtamembrane but not the catalytic domain mutations is inhibited selectively by tyrosine kinase inhibitors STI571 and AG1296. *Int J Hematol* 76 (5), 427-35.

Ulloa-Aguirre, A., Zambrano, E., Timossi, C., Olivares, A., Quintanar, A., Aguinaga, M., Diaz-Cueto, L. and Mendez, J. P., (1995). On the nature of the follicle-stimulating signal delivered to the ovary during exogenously controlled follicular maturation. A search into the immunological and biological attributes and the molecular composition of two preparations of urofollitropin. *Arch Med Res* 26 Spec No S219-30.

Urban, R. J., Garmey, J. C., Shupnik, M. A. and Veldhuis, J. D., (1990). Insulin-like growth factor type I increases concentrations of messenger ribonucleic acid encoding cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme in primary cultures of porcine granulosa cells. *Endocrinology* 127 (5), 2481-8.

Uzumcu, M., Pan, Z., Chu, Y., Kuhn, P. E. and Zachow, R., (2006). Immunolocalization of the hepatocyte growth factor (HGF) system in the rat ovary and the anti-apoptotic effect of HGF in rat ovarian granulosa cells in vitro. *Reproduction* 132 (2), 291-9.

Van Vugt, D. A., Heisler, L. E. and Reid, R. L., (1992). Progesterone inhibits the

estrogen-induced gonadotropin surge in the rhesus monkey independent of endogenous opiates. *J Clin Endocrinol Metab* 74 (6), 1312-9.

Vanderhyden, B. C., (1996). Oocyte-secreted factors regulate granulosa cell steroidogenesis. *Zygote* 4 (4), 317-21.

Vegetti, W. and Alagna, F., (2006). FSH and folliculogenesis: from physiology to ovarian stimulation. *Reprod Biomed Online* 12 (6), 684-94.

Virgin, J. B., Silver, B. J., Thomason, A. R. and Nilson, J. H., (1985). The gene for the beta subunit of bovine luteinizing hormone encodes a gonadotropin mRNA with an unusually short 5'-untranslated region. *J Biol Chem* 260 (11), 7072-7.

Visser, J. A., de Jong, F. H., Laven, J. S. E. and Themmen, A. P. N., (2006). Anti-Mullerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction* 131 (1), 1-9.

Visser, J., (2006). Role de l'AMH (hormone anti-Mullerienne) dans le recrutement folliculaire initial et cyclique. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 35 (5 Pt 2), 2S30-2S34.

Vitt, U. A., Hayashi, M., Klein, C. and Hsueh, A. J., (2000). Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biol Reprod* 62 (2), 370-7.

Vitt, U. A., Mazerbourg, S., Klein, C. and Hsueh, A. J. W., (2002). Bone morphogenetic protein receptor type II is a receptor for growth differentiation factor-9. *Biol Reprod* 67 (2), 473-80.

Voutilainen, R., Franks, S., Mason, H. D. and Martikainen, H., (1996). Expression of insulin-like growth factor (IGF), IGF-binding protein, and IGF receptor messenger ribonucleic acids in normal and polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 81 (3), 1003-8.

Walters, K. A., Allan, C. M., Jimenez, M., Lim, P. R., Davey, R. A., Zajac, J. D., Illingworth, P. and Handelsman, D. J., (2007). Female mice haploinsufficient for an inactivated androgen receptor (AR) exhibit age-dependent defects that resemble the AR null phenotype of dysfunctional late follicle development, ovulation and fertility. *Endocrinology* .

Wandji, S. A., Eppig, J. J. and Fortune, J. E., (1996). FSH and growth factors affect the growth and endocrine function in vitro of granulosa cells of bovine preantral follicles. *Theriogenology* 45 (4), 817-32.

Wandji, S. A., Wood, T. L., Crawford, J., Levison, S. W. and Hammond, J. M., (1998). Expression of mouse ovarian insulin growth factor system components during follicular development and atresia. *Endocrinology* 139 (12), 5205-14.

Wang, X. N. and Greenwald, G. S., (1993). Hypophysectomy of the cyclic mouse. I. Effects on folliculogenesis, oocyte growth, and follicle-stimulating hormone and human chorionic gonadotropin receptors. *Biol Reprod* 48 (3), 585-94.

Webb, R., Campbell, B. K., Garverick, H. A., Gong, J. G., Gutierrez, C. G. and Armstrong, D. G., (1999). Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *J Reprod Fertil Suppl* 54 33-48.

Webb, R., Nicholas, B., Gong, J. G., Campbell, B. K., Gutierrez, C. G., Garverick, H. A. and Armstrong, D. G., (2003). Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reprod Suppl* 61 71-90.

Weiss, J., Crowley, W. F. J., Halvorson, L. M. and Jameson, J. L., (1993). Perfusion of rat pituitary cells with gonadotropin-releasing hormone, activin, and inhibin reveals distinct effects on gonadotropin gene expression and secretion. *Endocrinology* 132 (6), 2307-11.

Welt, C. K., Smith, Z. A., Pauler, D. K. and Hall, J. E., (2001). Differential regulation of inhibin A and inhibin B by luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and stage of follicle development. *J Clin Endocrinol Metab* 86 (6), 2531-7.

White, R. B., Eisen, J. A., Kasten, T. L. and Fernald, R. D., (1998). Second gene for gonadotropin-releasing hormone in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1), 305-9.

Whitelaw, P. F., Smyth, C. D., Howles, C. M. and Hillier, S. G., (1992). Cell-specific expression of aromatase and LH receptor mRNAs in rat ovary. *J Mol Endocrinol* 9 (3), 309-12.

Wierman, M. E., Gharib, S. D., Wang, C., LaRovere, J. M., Badger, T. M. and Chin, W. W., (1990). Divergent regulation of gonadotropin subunit mRNA levels by androgens in the female rat. *Biol Reprod* 43 (2), 191-5.

Wierman ME, (1996), Gonadotropin releasing hormone, Lippincott-raven Publishers,.

Wilson, T., Wu, X. Y., Juengel, J. L., Ross, I. K., Lumsden, J. M., Lord, E. A., Dodds, K. G., Walling, G. A., McEwan, J. C., O'Connell, A. R., McNatty, K. P. and Montgomery, G. W., (2001). Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. *Biol Reprod* 64 (4), 1225-35.

Wintermantel, T. M., Elzer, J., Herbison, A. E., Fritzemeier, K. H. and Schutz, G., (2006). Genetic dissection of estrogen receptor signaling in vivo. *Ernst Schering Found Symp Proc* 1 25-44.

- Winters, S. J., Ishizaka, K., Kitahara, S., Troen, P. and Attardi, B., (1992).** Effects of testosterone on gonadotropin subunit messenger ribonucleic acids in the presence or absence of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 130 (2), 726-34.
- Winters, S. J. and Moore, J. P., (2007).** Paracrine control of gonadotrophs. *Semin Reprod Med* 25 (5), 379-87.
- Winters, S. J., Ghooray, D., Fujii, Y., Moore, J. P. J., Nevitt, J. R. and Kakar, S. S., (2007b).** Transcriptional regulation of follistatin expression by GnRH in mouse gonadotroph cell lines: evidence for a role for cAMP signaling. *Mol Cell Endocrinol* 271 (1-2), 45-54.
- Wise, P. M., Camp-Grossman, P. and Barraclough, C. A., (1981).** Effects of estradiol and progesterone on plasma gonadotropins, prolactin, and LHRH in specific brain areas of ovariectomized rats. *Biol Reprod* 24 (4), 820-30.
- Witkin, J. W., (1999).** Synchronized neuronal networks: the GnRH system. *Microsc Res Tech* 44 (1), 11-8.
- Wrathall, J. H. and Knight, P. G., (1995).** Effects of inhibin-related peptides and oestradiol on androstenedione and progesterone secretion by bovine theca cells in vitro. *J Endocrinol* 145 (3), 491-500.
- Wu, T. C., Jih, M. H., Wang, L. and Wan, Y. J., (1994).** Expression of activin receptor II and IIB mRNA isoforms in mouse reproductive organs and oocytes. *Mol Reprod Dev* 38 (1), 9-15.
- Wulff, C., Wiegand, S. J., Saunders, P. T., Scobie, G. A. and Fraser, H. M., (2001).** Angiogenesis during follicular development in the primate and its inhibition by treatment with truncated Flt-1-Fc (vascular endothelial growth factor Trap(A40)). *Endocrinology* 142 (7), 3244-54.
- Xiao, L., Yuan, X. and Sharkis, S. J., (2006).** Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 24 (6), 1476-86.
- Xu, Z., Garverick, H. A., Smith, G. W., Smith, M. F., Hamilton, S. A. and Youngquist, R. S., (1995).** Expression of messenger ribonucleic acid encoding cytochrome P450 side-chain cleavage, cytochrome p450 17 alpha-hydroxylase, and cytochrome P450 aromatase in bovine follicles during the first follicular wave. *Endocrinology* 136 (3), 981-9.
- Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Shibuya, H., Irie, K., Oishi, I., Ueno, N., Taniguchi, T., Nishida, E. and Matsumoto, K., (1995).** Identification of a member of the

MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science* 270 (5244), 2008-11.

Yamamoto, N., Christenson, L. K., McAllister, J. M. and Strauss, J. F. 3., (2002). Growth differentiation factor-9 inhibits 3'5'-adenosine monophosphate-stimulated steroidogenesis in human granulosa and theca cells. *J Clin Endocrinol Metab* 87 (6), 2849-56.

Yamamoto, S., Konishi, I., Tsuruta, Y., Nanbu, K., Mandai, M., Kuroda, H., Matsushita, K., Hamid, A. A., Yura, Y. and Mori, T., (1997). Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) during folliculogenesis and corpus luteum formation in the human ovary. *Gynecol Endocrinol* 11 (6), 371-81.

Yamashita, H., ten Dijke, P., Huylebroeck, D., Sampath, T. K., Andries, M., Smith, J. C., Heldin, C. H. and Miyazono, K., (1995). Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. *J Cell Biol* 130 (1), 217-26.

Yamazaki, Y. and Morita, T., (2006). Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. *Mol Divers* .

Yan, W., Suominen, J., Samson, M., Jegou, B. and Toppari, J., (2000). Involvement of Bcl-2 family proteins in germ cell apoptosis during testicular development in the rat and pro-survival effect of stem cell factor on germ cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 165 (1-2), 115-29.

Yan, C., Wang, P., DeMayo, J., DeMayo, F. J., Elvin, J. A., Carino, C., Prasad, S. V., Skinner, S. S., Dunbar, B. S., Dube, J. L., Celeste, A. J. and Matzuk, M. M., (2001). Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol* 15 (6), 854-66.

Yang, P. and Roy, S. K., (2001). Epidermal growth factor modulates transforming growth factor receptor messenger RNA and protein levels in hamster preantral follicles in vitro. *Biol Reprod* 65 (3), 847-54.

Yasuda, K., Fukuoka, M., Taii, S., Takakura, K. and Mori, T., (1990). Inhibitory effects of interleukin-1 on follicle-stimulating hormone induction of aromatase activity, progesterone secretion, and functional luteinizing hormone receptors in cultures of porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 43 (6), 905-12.

Ying, S. Y., Becker, A., Ling, N., Ueno, N. and Guillemin, R., (1986). Inhibin and beta type transforming growth factor (TGF beta) have opposite modulating effects on the follicle stimulating hormone (FSH)-induced aromatase activity of cultured rat granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 136 (3), 969-75.

- Ying, Y., Liu, X. M., Marble, A., Lawson, K. A. and Zhao, G. Q., (2000).** Requirement of Bmp8b for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol Endocrinol* 14 (7), 1053-63.
- Ying, Y. and Zhao, G. Q., (2001).** Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. *Dev Biol* 232 (2), 484-92.
- Yoshida, H., Takakura, N., Kataoka, H., Kunisada, T., Okamura, H. and Nishikawa, S. I., (1997).** Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Dev Biol* 184 (1), 122-37.
- Yuan, W., Lucy, M. C. and Smith, M. F., (1996).** Messenger ribonucleic acid for insulin-like growth factors-I and -II, insulin-like growth factor-binding protein-2, gonadotropin receptors, and steroidogenic enzymes in porcine follicles. *Biol Reprod* 55 (5), 1045-54.
- Yuan, W., Bao, B., Garverick, H. A., Youngquist, R. S. and Lucy, M. C., (1998).** Follicular dominance in cattle is associated with divergent patterns of ovarian gene expression for insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II, and IGF binding protein-2 in dominant and subordinate follicles. *Domest Anim Endocrinol* 15 (1), 55-63.
- Zachow, R. J., Ramski, B. E. and Lee, H., (2000).** Modulation of estrogen production and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase-type 1, cytochrome P450 aromatase, c-met, and protein kinase Balpha messenger ribonucleic acid content in rat ovarian granulosa cells by hepatocyte growth factor and follicle-stimu. *Biol Reprod* 62 (6), 1851-7.
- Zachow, R. J. and Woolery, J. K., (2002).** Effects of hepatocyte growth factor on cyclic nucleotide-dependent signaling and steroidogenesis in rat ovarian granulosa cells in vitro. *Biol Reprod* 67 (2), 454-9.
- Zachow, R. J., Weitsman, S. R. and Magoffin, D. A., (1997).** Hepatocyte growth factor regulates ovarian theca-interstitial cell differentiation and androgen production. *Endocrinology* 138 (2), 691-7.
- Zachow, R. and Uzumcu, M., (2007).** The hepatocyte growth factor system as a regulator of female and male gonadal function. *J Endocrinol* 195 (3), 359-71.
- Zambrano, E., Barrios-de-Tomasi, J., Cardenas, M. and Ulloa-Aguirre, A., (1996).** Studies on the relative in-vitro biological potency of the naturally-occurring isoforms of intrapituitary follicle stimulating hormone. *Mol Hum Reprod* 2 (8), 563-71.
- Zelevnik, A. J., Midgley, A. R. J. and Reichert, L. E. J., (1974).** Granulosa cell

maturation in the rat: increased binding of human chorionic gonadotropin following treatment with follicle-stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* 95 (3), 818-25.

Zeleznik, A. J., Schuler, H. M. and Reichert, L. E. J., (1981). Gonadotropin-binding sites in the rhesus monkey ovary: role of the vasculature in the selective distribution of human chorionic gonadotropin to the preovulatory follicle. *Endocrinology* 109 (2), 356-62.

Zeleznik, A. J., Saxena, D. and Little-Ihrig, L., (2003). Protein kinase B is obligatory for follicle-stimulating hormone-induced granulosa cell differentiation. *Endocrinology* 144 (9), 3985-94.

Zeleznik, A. J., (2004). The physiology of follicle selection. *Reprod Biol Endocrinol* 2 31.

Zhang, Z., Zhang, R., Joachimiak, A., Schlessinger, J. and Kong, X. P., (2000). Crystal structure of human stem cell factor: implication for stem cell factor receptor dimerization and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (14), 7732-7.

Zhang, M., Shi, H., Segaloff, D. L. and Van Voorhis, B. J., (2001). Expression and localization of luteinizing hormone receptor in the female mouse reproductive tract. *Biol Reprod* 64 (1), 179-87.

Zhao J., (2000). Development of rat pre-antral follicles in vitro.

Zheng, J., Redmer, D. A. and Reynolds, L. P., (1993). Vascular development and heparin-binding growth factors in the bovine corpus luteum at several stages of the estrous cycle. *Biol Reprod* 49 (6), 1177-89.

Zhou, W. and Sealfon, S. C., (1994). Structure of the mouse gonadotropin-releasing hormone receptor gene: variant transcripts generated by alternative processing. *DNA Cell Biol* 13 (6), 605-14.

Zhou, J., Adesanya, O. O., Vatzias, G., Hammond, J. M. and Bondy, C. A., (1996). Selective expression of insulin-like growth factor system components during porcine ovary follicular selection. *Endocrinology* 137 (11), 4893-901.

Zhou, J., Wang, J., Penny, D., Monget, P., Arraztoa, J. A., Fogelson, L. J. and Bondy, C. A., (2003). Insulin-like growth factor binding protein 4 expression parallels luteinizing hormone receptor expression and follicular luteinization in the primate ovary. *Biol Reprod* 69 (1), 22-9.

Zhu, X., Gilbert, S., Birnbaumer, M. and Birnbaumer, L., (1994). Dual signaling potential is common among Gs-coupled receptors and dependent on receptor density. *Mol Pharmacol* 46 (3), 460-9.

Zimmermann, R. C., Xiao, E., Husami, N., Sauer, M. V., Lobo, R., Kitajewski, J. and Ferin, M., (2001). Short-term administration of antivascular endothelial growth factor antibody in the late follicular phase delays follicular development in the rhesus monkey. *J Clin Endocrinol Metab* 86 (2), 768-72.

Zlotkin, T., Farkash, Y. and Orly, J., (1986). Cell-specific expression of immunoreactive cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology* 119 (6), 2809-20.

Zoeller, R. T., Seeburg, P. H. and Young, W. S. 3., (1988). In situ hybridization histochemistry for messenger ribonucleic acid (mRNA) encoding gonadotropin-releasing hormone (GnRH): effect of estrogen on cellular levels of GnRH mRNA in female rat brain. *Endocrinology* 122 (6), 2570-7.

di Clemente, N., Wilson, C., Faure, E., Boussin, L., Carmillo, P., Tizard, R., Picard, J. Y., Vigier, B., Josso, N. and Cate, R., (1994). Cloning, expression, and alternative splicing of the receptor for anti-Mullerian hormone. *Mol Endocrinol* 8 (8), 1006-20.

van den Hurk, R., B. M., B. J., (1997). In vivo and in vitro development of preantral Follicles. *Theriogenology* 47 (1), 73-82.

van den Hurk, R. and Van de Pavert, S. A., (2001). Localization of an activin/activin receptor system in the porcine ovary. *Mol Reprod Dev* 60 (4), 463-71.

van den Hurk, R. and Zhao, J., (2005). Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 63 (6), 1717-51.

von Bubnoff, A. and Cho, K. W., (2001). Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? *Dev Biol* 239 (1), 1-14.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Prof. Sinowatz für die Überlassung des Themas sowie für zügige und freundliche Hilfe.

Weiterhin bedanke ich mich bei meinem Sohn Constantin für seine große Geduld und bei meinen Eltern und Geschwistern für Ihre Unterstützung, sowie bei Stephanie Cura für Ihre Hilfe.

Mein Dank gilt ebenfalls Johannes Erling, der mir Hilfestellung geboten hat für alle Computertechnischen Fragen.

Vielen Dank auch an Peter Jochimsen für seine energische Präsenz in den richtigen Momenten.