

Aus dem Institut für Tierhaltung und Tierzuchtung
Universität Hohenheim
Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie
Prof. Dr. Dr. habil. R. Claus

Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Fötalentwicklung beim Schwein

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Agrarwissenschaften

vorgelegt
der Fakultät Agrarwissenschaften

von
Susanne Häußler
aus Reutlingen

Hohenheim 2007

Die vorliegende Arbeit wurde am 13.09.2007 von der Fakultät Agrarwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften“ angenommen.

Tag der mündlichen Prüfung: 24. September 2007

Prodekan: Prof. Dr. W. Bessei

Berichterstatter, 1. Prüfer: Prof. Dr. Dr. R. Claus

Mitberichterstatterin, 2. Prüferin: Prof. Dr. Dr. H. Sauerwein

3. Prüfer: Prof. Dr. R. Mosenthin

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht.....	3
2.1	<i>Definition und allgemeine Prinzipien der Embryonal- und Fötalentwicklung.....</i>	3
2.1.1	Entwicklung auf zellulärer Ebene.....	3
2.2	<i>Relevanz der allometrischen Wachstumsvorgänge für die Fötalentwicklung.....</i>	4
2.2.1	Besonderheiten des Fötalwachstums beim Schwein.....	6
2.2.1.1	Gewichtsentwicklung im Uterus.....	7
2.2.1.2	Einfluss der Lage der Föten im Uterus auf das Fötalwachstum.....	7
2.2.1.3	Einfluss des Geschlechts auf das Fötalwachstum.....	8
2.3	<i>Somatisches Wachstum und seine Regulation.....</i>	9
2.3.1	Prinzip der Regulation.....	9
2.3.2	Einfluss der Glucocorticoide.....	10
2.3.3	Bedeutung der 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 2.....	12
2.4	<i>Beitrag der Plazenta zur Fötalentwicklung.....</i>	13
2.4.1	Aufbau und Funktion der Plazenta.....	13
2.4.2	Mechanismen der plazentären Stoffwechselfvorgänge.....	15
2.4.3	Plazentäre Hormone beim Schwein.....	16
2.5	<i>Sexualdifferenzierung.....</i>	17
2.5.1	Prinzip des basic femaleness.....	17
2.5.2	Morphologie fötaler Hoden.....	19
2.5.3	Morphologie fötaler Ovarien.....	21
2.6	<i>Regulation der Gonadenentwicklung.....</i>	24
2.6.1	Prinzip der Regulation.....	24
2.6.2	Die Rolle der Androgene während der Sexualdifferenzierung.....	25
2.6.3	Die Rolle der Östrogene während der Sexualdifferenzierung.....	26
2.6.4	Die Rolle der Aromatase und ihre spezielle Bedeutung in den Gonaden.....	27
3	Fragestellung.....	30

4	Material und Methoden.....	31
4.1	<i>Tiere.....</i>	31
4.1.1	Herkunft, Haltung und Fütterung.....	31
4.1.2	Venenverweilkatheter und Blutentnahme.....	31
4.1.3	Fötenentnahme und Gewinnung der Gewebeproben.....	32
4.1.4	Neugeborene Ferkel.....	33
4.2	<i>Hormonanalytik.....</i>	33
4.2.1	Extraktion.....	34
4.2.2	Bestimmung der Qualitätskriterien.....	36
4.2.3	Übersicht der verwendeten Antiseren.....	37
4.2.4	Radioimmunologische Bestimmungen im Plasma und der Amnionflüssigkeit..	39
4.2.4.1	Durchführung der Radioimmunoassays (RIA).....	39
4.2.4.2	Progesteron.....	40
4.2.4.3	Testosteron.....	41
4.2.4.4	17 β Östradiol.....	42
4.2.4.5	Gesamtöstrogene.....	43
4.2.4.6	Cortisol.....	44
4.2.4.7	Proteohormone.....	45
4.2.5	Enzymimmunologische Bestimmungen im Plasma und der Amnionflüssigkeit.....	47
4.2.5.1	Prinzip und Durchführung des Enzymimmunoassays (EIA).....	47
4.2.5.2	Cortison.....	48
4.2.5.3	19-Nortestosteron.....	49
4.3	<i>Histologische Grundlagen und immuncytochemische Methoden.....</i>	51
4.3.1	Fixierung und Anfertigung der Schnitte.....	51
4.3.2	Färbetechnik.....	51
4.3.3	Übersicht der verwendeten Antikörper.....	51
4.3.4	Apoptose-Nachweis.....	52
4.3.5	Auswertung gefärbter Schnitte.....	53
4.4	<i>Molekularbiologische Methoden.....</i>	54
4.4.1	Isolierung von RNA aus fötalem Gewebe.....	54
4.4.2	Quantifizierung der RNA.....	55
4.4.3	cDNA Synthese (reverse transcription).....	55

4.4.4	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	56
4.4.5	Quantitative real-time RT-PCR.....	57
4.4.6	Relative Quantifizierung.....	59
4.4.7	Effizienzberechnung.....	60
4.5	<i>Statistische Auswertung</i>	60
5	Ergebnisse	61
5.1	<i>Fötenparameter</i>	61
5.1.1	Übersicht Fötalgewichte.....	61
5.1.2	Geschlechtsverhältnis.....	63
5.1.3	Lage der Föten im Uterus.....	63
5.2	<i>Steroide im maternalen Plasma</i>	63
5.2.1	Progesteron und 17 β Östradiol.....	63
5.2.2	Glucocorticoide.....	65
5.3	<i>Steroide in der Amnionflüssigkeit</i>	65
5.4	<i>Hormone im Blutplasma von Föten und Neugeborenen</i>	68
5.4.1	Geschlechtsspezifische Hormone.....	68
5.4.1.1	Männliche Föten und Neugeborene.....	68
5.4.1.2	Weibliche Föten und Neugeborene.....	69
5.4.1.3	Vergleich männlicher und weiblicher Föten und Neugeborener..	70
5.4.2	Cortisol.....	70
5.5	<i>Charakterisierung der Gonaden</i>	72
5.5.1	Hoden.....	72
5.5.1.1	Hodengewichte.....	72
5.5.1.2	Morphologische Parameter der Hodenentwicklung.....	73
5.5.2	Ovar.....	75
5.5.2.1	Ovargewichte.....	75
5.5.2.2	Morphologische Parameter der Ovarentwicklung.....	75
5.5.3	Vergleich der Gonadengewichte.....	79
5.6	<i>Immuncytochemische Bestimmungen</i>	80
5.6.1	Hoden.....	80
5.6.1.1	Steroidrezeptoren.....	80
5.6.1.1.1	Androgenrezeptor im Hoden.....	80

5.6.1.1.2	Glucocorticoidrezeptor im Hoden.....	80
5.6.1.2	Enzyme.....	82
5.6.1.2.1	Aromatase im Hoden.....	82
5.6.1.2.2	11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase im Hoden.....	84
5.6.1.3	Vergleich der immuncytochemisch untersuchten Parameter.....	87
5.6.1.4	Mitose und Apoptose im Hoden.....	89
5.6.2	Ovar.....	91
5.6.2.1	Androgenrezeptor im Ovar.....	91
5.6.2.2	Aromatase im Ovar.....	92
5.7	<i>Molekularbiologische Bestimmungen.....</i>	93
5.7.1	Androgenrezeptor in Hoden und Ovarien.....	93
5.7.2	Glucocorticoidrezeptor im Hoden.....	93
5.7.3	Aromatase in Hoden und Ovarien.....	93
6	Diskussion.....	94
6.1	<i>Diskussion des Versuchsdesigns, der tierexperimentellen Vorgehensweise und der Laborverfahren.....</i>	94
6.2	<i>Diskussion der Befunde zum Fötalwachstum.....</i>	95
6.3	<i>Diskussion der Hormonkonzentrationen in maternalen und fötalen Kompartimenten.....</i>	97
6.3.1	Maternales Plasma und Amnionflüssigkeit.....	97
6.3.2	Diskussion der Regulation fötaler Hormonkonzentrationen.....	98
6.3.3	Die Bedeutung der Androgene während der Fötalentwicklung.....	99
6.3.4	Die Bedeutung der Östrogene während der Fötalentwicklung.....	100
6.4	<i>Weibliche Gonadenentwicklung.....</i>	101
6.5	<i>Männliche Gonadenentwicklung.....</i>	102
7	Zusammenfassung.....	105
8	Summary.....	107
9	Literaturverzeichnis.....	109

Abbildungsverzeichnis

	Seite	
Abbildung 2.1	Schema des Zellzyklus (nach Liebich 1990). S= Synthesephase, G ₂ =post-synthetische Phase, M= Mitosephase, G ₁ = Arbeitsphase, G ₀ = Ruhephase.....	4
Abbildung 2.2	Veränderung der Körperproportionen beim Rinderfötus (Rüsse & Sinowatz 1991).....	5
Abbildung 2.3	Wachstumsverlauf unterschiedlicher Gewebe bei Sauen (nach Reeds et al. 1993).....	6
Abbildung 2.4	Einfluss der Nährstoffzufuhr auf Regulationsfaktoren und deren Bedeutung für das Fötalwachstum, am Beispiel einer erhöhten fötalen Nährstoffzufuhr (nach Fowden & Forhead 2004); (+): Förderung; (-):Hemmung.....	10
Abbildung 2.5	Maternaler und fötaler Glucocorticoidverlauf kurz vor der Geburt (Dissertation Zeifang 2000).....	12
Abbildung 2.6	Prinzip des Stoffaustausches zwischen mütterlichem und fötalem Blutkreislauf (Claus in Kräusslich 1981).....	14
Abbildung 2.7	Entwicklung des männlichen und weiblichen Geschlechts aus der indifferenten Anlage (Spindler 1997).....	17
Abbildung 2.8	Schematische Darstellung des Ablaufs der Sexualdifferenzierung..	18
Abbildung 2.9	Schematische Darstellung eines Primordialfollikels und eines Primärfollikels im fötalen Ovar (Rüsse & Sinowatz 1991).....	23
Abbildung 2.10	Vereinfachte Darstellung der Östrogenbiosynthese.....	28
Abbildung 4.1	Überblick über die Zeitpunkte der Fötenentnahmen.....	31
Abbildung 4.2	Abkürzung der Antiseren am Beispiel Testosteron.....	37
Abbildung 4.3	Fluoreszenzbestimmung bei der quantitativen real-time PCR (vereinfachte, schematische Darstellung).....	58
Abbildung 5.1	Fötalgewichte in den untersuchten Trächtigkeitsstadien (MW ± SEM).....	62
Abbildung 5.2	Progesteron (ng/ml) und 17β Östradiol (pg/ml) im maternalen Plasma im Verlauf der Gravidität.....	64

Abbildung 5.3	Entwicklung des Hoden- und Körpergewichtes bei männlichen Föten und Neugeborenen.....	72
Abbildung 5.4	Entwicklung des Ovar- und Körpergewichts bei weiblichen Föten..	75
Abbildung 5.5	Ovarausschnitt eines 15 Wochen alten Fötus (Vergr. 10fach).....	78
Abbildung 5.6	Gewichte (mg) der fötalen Hoden und Ovarien in der 6., 10., 13. und 15. Trächtigkeitswoche.....	79
Abbildung 5.7	Immuncytochemische Färbung des GCR in der 10. (A) und 15. (B) Trächtigkeitswoche im Hoden beim Schwein. Der Balken entspricht 20 µm.....	81
Abbildung 5.8	Relativer Anteil (%) GCR positiver Keimzellen (-◆-) und Leydigzellen (--■-) im fötalen Hoden in der 6., 10., 13. und 15. Trächtigkeitswoche sowie bei neugeborenen Ferkeln.....	81
Abbildung 5.9	Relativer Beitrag (%) der Keimzellen (--■-) und der Leydigzellen (-◆-) an der Aromatase Expression.....	83
Abbildung 5.10	Immuncytochemische Färbung der Aromatase in der 6. (A), 10. (B), 13. (C) und 15. (D) Trächtigkeitswoche im Hoden beim Schwein. Aromatase positive Keimzellen in der 10. Woche sind beispielhaft mit Pfeilen gekennzeichnet.....	84
Abbildung 5.11	Immuncytochemische Färbungen des Enzyms 11β-HSD 2 im Hoden von 6.(A), 10.(B), 13.(C) und 15.(D) Wochen alten Föten. 11β-HSD 2 positive Keimzellen sind in der 10. und 13. Woche beispielhaft mit Pfeilen gekennzeichnet. Der Balken entspricht 20 µm.....	86
Abbildung 5.12	11β-HSD 2 (◆—◆), GCR (▲----▲) und Aromatase (■----■) in den Keimzellen im Verlauf der Trächtigkeit und bei neugeborenen Ferkeln.....	87
Abbildung 5.13	11β-HSD 2 (◆—◆) und Aromatase (■----■) in den Leydigzellen im Verlauf der Trächtigkeit und bei neugeborenen Ferkeln.....	88
Abbildung 5.14	Immuncytochemische Färbung des AR in der 10. Trächtigkeitswoche im Ovar beim Schwein. Der Balken entspricht 20 µm.....	92
Abbildung 5.15	Immuncytochemische Färbung von Aromatase in der 10. (A) und der 15. (B) Trächtigkeitswoche im Ovar beim Schwein. Der Balken entspricht 20µm.....	92

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 2.1 Stadien der pränatalen Entwicklung (in Tagen) bei unterschiedlichen Spezies (nach Rüsse & Sinnowatz 1991; Schnorr 1996; Loeffler 1994).	3
Tabelle 2.2 Funktion der Plazenta beim Schwein.....	14
Tabelle 2.3 Transportmechanismen in der Plazenta.....	15
Tabelle 2.4 Plazentär gebildete Hormone beim Schwein.....	16
Tabelle 2.5 Übersicht über die Entwicklung der fötalen Hoden beim Schwein.....	21
Tabelle 2.6 Übersicht über die Entwicklung weiblicher Gonaden beim Schwein.....	24
Tabelle 2.7 Aromataseexpression im Hoden verschiedener Spezies.....	29
Tabelle 4.1 Anzahl der Tiere in den untersuchten Trächtigkeitsstadien.....	32
Tabelle 4.2 Publikationsübersicht der angewandten Methoden.....	34
Tabelle 4.3 Extrahierte aliquote Teile der gemessenen Hormone in der Amnionflüssigkeit sowie im Plasma.....	35
Tabelle 4.4 Übersicht der verwendeten Antiseren.....	38
Tabelle 4.5 Qualitätskriterien der radioimmunologischen Progesteronbestimmung...	40
Tabelle 4.6 Qualitätskriterien der Testosteronbestimmungen.....	41
Tabelle 4.7 Qualitätskriterien der radioimmunologischen Bestimmung von 17 β Östradiol.....	42
Tabelle 4.8 Qualitätskriterien der Gesamtöstrogenbestimmung.....	43
Tabelle 4.9 Qualitätskriterien der Cortisolbestimmungen.....	44
Tabelle 4.10 Testparameter und Qualitätskriterien der FSH-Tests.....	45
Tabelle 4.11 Testparameter und Qualitätskriterien der LH-Tests.....	46
Tabelle 4.12 Qualitätskriterien der Cortisonbestimmungen.....	49
Tabelle 4.13 Qualitätskriterien der 19-Nortestosterontests.....	50
Tabelle 4.14 Übersicht der verwendeten Antikörper sowie der Blockseren.....	52
Tabelle 4.15 Reaktionsschritte der PCR.....	56
Tabelle 4.16 Sequenzen der verwendeten Primerpaare, deren Größe und Annealingtemperatur.....	57
Tabelle 5.1 Mittelwerte (MW \pm SEM) sowie Minimum und Maximum der Fötengewichte (g) innerhalb der einzelnen Würfe in der 6., 10., 13. und 15. Trächtigkeitswoche.....	61

Tabelle 5.2	Anzahl männlicher und weiblicher Föten innerhalb der einzelnen Sauen in den untersuchten Trächtigkeitsstadien.....	63
Tabelle 5.3	Cortisol- und Cortisonkonzentrationen (ng/ml) im maternalen Blutplasma im Verlauf der Gravidität (MW \pm SEM).....	65
Tabelle 5.4	Progesteron, 17 β Östradiol, Testosteron und 19-Nortestosteron in der Amnionflüssigkeit männlicher und weiblicher Föten in der 6., 10., 13. und 15. Trächtigkeitswoche (MW \pm SEM).....	66
Tabelle 5.5	Cortisol und Cortison (ng/ml) in der Amnionflüssigkeit männlicher und weiblicher Föten in der 6., 10., 13. und 15. Trächtigkeitswoche (MW \pm SEM).....	67
Tabelle 5.6	Hormone (ng/ml) aus der Nabelarterie männlicher Föten in unterschiedlichen Trächtigkeitsstadien sowie bei neugeborenen Ferkeln (MW \pm SEM).....	68
Tabelle 5.7	FSH, LH, Testosteron und Gesamtöstrogene (alle in ng/ml) in der Nabelarterie bei weiblichen Föten in unterschiedlichen Trächtigkeitsstadien sowie bei neugeborenen Ferkeln (V. jugularis) (MW \pm SEM).....	69
Tabelle 5.8	Cortisol (ng/ml) in der Nabelarterie männlicher und weiblicher Föten in der 6., 10., 13. und 15. Trächtigkeitswoche sowie im peripheren Plasma neugeborener Ferkel (MW \pm SEM).....	71
Tabelle 5.9	Anzahl der Leydigzellen pro mm ² sowie der Keim- und Sertolizellen je Tubulus in den Hoden der untersuchten Trächtigkeitsstadien sowie bei neugeborenen Ferkeln (MW \pm SEM).....	73
Tabelle 5.10	Flächenanteile (%) des Interstitiums und der Tubuli im Hoden in der 10., 13. und 15. Trächtigkeitswoche sowie bei neugeborenen Ferkeln (MW \pm SEM).....	74
Tabelle 5.11	Tubulusdurchmesser (μ m) in den untersuchten Trächtigkeitsstadien sowie bei neugeborenen Ferkeln (MW \pm SEM).....	74

Tabelle 5.12 Flächenanteile (%) der Keimballen, Primordialfollikel und Primärfollikel im Ovar in Prozent in den untersuchten Trächtigkeitsstadien und bei neugeborenen Ferkeln.....	76
Tabelle 5.13 Anzahl der Keimballen, Primordial- und Primärfollikel je mm ² in den Ovarien der untersuchten Trächtigkeitsstadien sowie bei neugeborenen Ferkeln (MW ± SEM).....	77
Tabelle 5.14 Breite der „Rindenzone“ (µm) in der 10., 13. und 15. Trächtigungswoche sowie bei neugeborenen Ferkeln.....	78
Tabelle 5.15 Anteil (%) der AR positiven Zellen im fötalen Hoden der 10. und der 15. Trächtigungswoche.....	80
Tabelle 5.16 Aromatase positive Zellen/mm ² im fötalen Hoden in verschiedenen Trächtigungsstadien.....	82
Tabelle 5.17 11β-HSD 2 in Leydig- und Keimzellen (positive Zellen je 100 Zellen) im Verlauf der Trächtigkeit sowie bei neugeborenen Ferkeln (MW ± SEM)...	85
Tabelle 5.18 Mitose in den Keim-, Sertoli- und Leydigzellen in der 6., 10., 13. und 15. Trächtigungswoche sowie bei neugeborenen Ferkeln (MW ± SEM).....	89
Tabelle 5.19 Mitose- und Apoptoserate (%) in den Keimzellen der untersuchten Trächtigungsstadien sowie bei neugeborenen Ferkeln.....	90
Tabelle 5.20 Anteil (%) der AR positiven Keimballen und Primordialfollikel in der 10., 13. und 15. Trächtigungswoche.....	91

Abkürzungen

A.	arteria
AB-Komplex	Avidin-Biotin-Komplex
ACTH	Adenocorticotropes Hormon
AMH	Anti Mullerian Hormon
ANOVA	analysis of variance
CMO	Carboxymethyloxim
cpm	counts per minute
CRH	Corticotropin Releasing Hormon
Ct	Cycle Threshold
5 α -DHT	5 α -Dihydrotestosteron
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dUTP	deoxy-uridin-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIA	Enzymimmunoassay
EtAc	Ethylacetat
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
GA	Gesamtaktivität
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GC	Glucocorticoide
GCR	Glucocorticoid Rezeptor
GH	Growth Hormon
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
GRH	Growth Hormon Releasing Hormon
11 β -HSD 2	11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 2
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Horse radish peroxidase
HS	Hemisuccinat
IGF	Insulinlike growth factor
IgG	Immunglobulin Gamma

Abkürzungen

LH	Luteinisierendes Hormon
M.	musculus
MJME	Megajoule metabolizable energy
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
MW	Mittelwert
NSB	Nicht spezifische Bindung
NT	Nortestosteron
NTC	Non template control
NTP	Nucleotidtriphosphat
OD	Optische Dichte
p.c.	post conceptum
PCR	Polymerase chain reaction
PGF ₂ α	Prostaglandin F ₂ α
p.p.	post partum
rmp	rounds per minute
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonucleinsäure
RSA	Rinderserumalbumin
RT	Reverse Transcriptase
SSL	Scheitel-Steiß-Länge
SRY	Sex determining region Y
TB-Puffer	Transformations-Puffer
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBM-Ether	Tertiärer Butyl-Methyl-Ether
TdF	Testes determinierender Faktor
TMB	Tetramethylbenzidin
TdT	Terminal deoxynucleotidyl transferase
TRH	Thyrotropin Releasing Hormon
TUNEL	Terminal Transferase mediated dUTP nick end labeling
SEM	Standard error of the mean / Standardfehler
V.	vena

1 Einleitung

Die Geschlechtsdifferenzierung beim Schwein erfolgt wie bei anderen höheren Spezies nach dem bekannten Prinzip des basic femaleness. Hierzu bilden die Leydigzellen männlicher Föten Androgene (z. B. Testosteron) unter deren Einfluss sich die Wolffschen Gänge, also die männlichen Geschlechtsgänge differenzieren. Gleichzeitig wird in den Sertolizellen das Anti-Müllerian Hormon (AMH) gebildet, das zur Rückbildung der Müllerschen Gänge und damit der weiblichen Geschlechtsgängen führt (Claus & Karg 1981).

Neben den für die Sexualdifferenzierung essentiellen Androgenen können beim Schwein bereits beim männlichen Fötus große Mengen an Östrogenen nachgewiesen werden, wie sie auch für mature Eber charakteristisch sind (Claus & Hoffmann 1980; Raeside et al. 1993). Während beim erwachsenen Tier ein mitogener Effekt auf die Spermatogenese besteht (Wagner et al. 2005), konnte eine eventuelle Bedeutung der Östrogene für die männliche Fötalentwicklung noch nicht geklärt werden. Sie wurden zwar als „Überlebensfaktoren“ der Keimzellen beschrieben, allerdings wird dabei nicht auf Detailmechanismen eingegangen (Pentikäinen et al. 2000).

Solche Mechanismen sind zusätzlich zu den Gonadenhormonen auf differenzierungsfördernde Glucocorticoide angewiesen. Da Glucocorticoide essentiell für die Differenzierung fötaler Organe sind (Brown & Seckl 2005), beeinflussen sie vermutlich auch die Gonadenentwicklung. Bei matura Ebern konnte ein Einfluss der Glucocorticoide auf die Spermatogenese, speziell die Spermienausbeute gezeigt werden (Wagner & Claus 2004), gleichzeitig ist in diesem Zusammenhang eine Feinregulierung über das Enzym 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 2 (11 β -HSD 2) bekannt (Claus et al. 2005). Beim fötalen Hoden wurde dieses Zusammenspiel von Glucocorticoiden, ihren Rezeptoren sowie dem Enzym 11 β -HSD 2 bislang noch nicht untersucht.

Bei weiblichen Föten ist sowohl die Synthese von Östrogenen als auch von Androgenen dokumentiert (Quirke et al. 2001). Im Ovar bei matura Schweinen sind Androgene neben ihrer Rolle als Substrat für die Östrogensynthese, auch für die Follikeldifferenzierung essentiell (Slomczynska & Tabarowski 2001). Während bei matura Tieren verschiedener Spezies die Expression des Androgenrezeptors in den Granulosazellen des Ovars bekannt ist (z. B. Horie et al. 1992), gibt es keine Daten bei weiblichen Föten. Damit fehlen auch Aussagen über die Bedeutung der Androgene während der Fötalentwicklung des Schweins.

Da geschlechtsspezifische Unterschiede im Verlauf der Fötaientwicklung im Vordergrund stehen, sollte in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung der Östrogene für die männliche sowie die der Androgene für die weibliche Entwicklung charakterisiert werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, einige dieser Mechanismen durch immunologische, immuncytochemische aber auch molekularbiologische Methoden näher zu beschreiben.

2 Literaturübersicht

2.1 Definitionen und allgemeine Prinzipien der Embryonal- und Fötalentwicklung

Während der pränatalen Entwicklung werden Gewebe und Organe manifestiert und damit die Weichen für die spätere Entwicklung gestellt. Die Zeitspanne vor der Geburt kann grundsätzlich in Blasto-, Embryo- und Fötogenese eingeteilt werden (Kräusslich 1981). Als Blastogenese wird die Zeit von der Befruchtung bis zur Ausbildung einer zweischichtigen Keimscheibe bezeichnet (Rüsse & Sinowatz 1991). Die Embryonalentwicklung ist durch die Anlage der einzelnen Organe gekennzeichnet. Sie ist beim Schwein etwa bis zum 30. Tag post conceptum (p.c.) abgeschlossen, so dass während der anschließenden Fötogenese die Organentwicklung durch weiteres Wachstum und Differenzierung der Gewebe charakterisiert ist.

Eine Übersicht über den zeitlichen Verlauf der einzelnen Entwicklungsphasen bei unterschiedlichen Spezies findet sich in Tabelle 2.1.

Tabelle 2.1 Stadien der pränatalen Entwicklung (in Tagen) bei unterschiedlichen Spezies (nach Rüsse & Sinowatz 1991; Schnorr 1996; Loeffler 1994)

	Schwein	Schaf	Rind	Mensch
Blastogenese	~ 9	~ 10	~ 14	~ 14
Embryogenese	~ 32	~ 35	~ 42	~ 56
Graviditätssdauer (Fötogenese)	~ 115	~ 150	~ 285	~ 270

2.1.1 Entwicklung auf zellulärer Ebene

Für Zellen, die in der Lage sind, sich zu vermehren, lässt sich ein kontinuierlicher Zellzyklus beschreiben (Hees & Sinowatz 2000). Der Zellzyklus besteht aus mehreren Phasen unterschiedlicher Dauer, die in Abbildung 2.1 dargestellt sind.

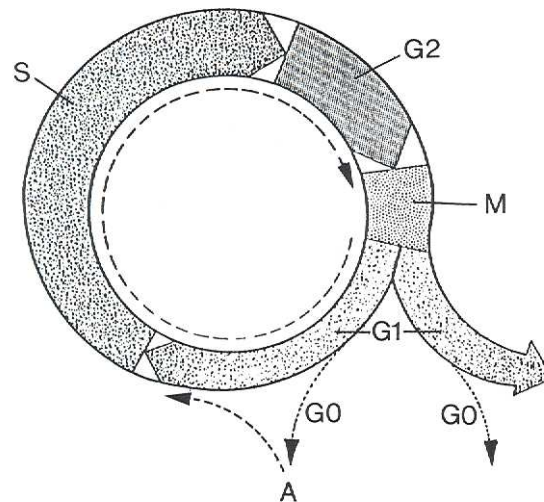


Abbildung 2.1 Schema des Zellzyklus (nach Liebich 1990).
S= Synthesephase, G₂= post-synthetische Phase, M= Mitosephase,
G₁= Arbeitsphase, G₀= Ruhephase, A= Apoptose

Während der Mitose (M-Phase) teilt sich die Zelle, wobei die Chromosomen unverändert von der Mutterzelle auf die Tochterzelle weitergegeben werden. Die weiteren Phasen des Zellzyklus, die als Interphase zusammengefasst werden können, fungieren als stoffwechselaktive Wachstumsphasen und dienen der Vorbereitung weiterer Mitosen (Rüsse & Sinowatz 1991).

Der programmierte Zelltod (Apoptose) wird von der betreffenden Zelle selbst durchgeführt und dient der Feinkontrolle des Wachstums sowie dem Entfernen defekter Zellen. Dabei werden die Zellen wieder in ihre einzelnen Bestandteile zerlegt, die dann für eine Wiederverwertung zur Verfügung stehen. Im Normalfall steuert die Apoptose der Mitose gegen, um so im Gewebe ein Gleichgewicht bezüglich der Funktionalität aufrechtzuerhalten (Verhagen 1998; Medh & Thompson 2000).

2.2 Relevanz der allometrischen Wachstumsvorgänge für die Fötalentwicklung

Die Größen- und Gewichtszunahmen eines Organismus werden im Allgemeinen unter dem Begriff Wachstum zusammengefasst (Reeds et al. 1993). Tritt das Wachstum von Organen und Geweben in einer genetisch definierten Reihenfolge auf, spricht man von allometrischem Wachstum, das bereits in der pränatalen Entwicklung eine bedeutende Rolle spielt. Dieses ungleichmäßige Wachstum lässt sich anhand unterschiedlicher Proportionen zwischen den

Körperteilen nachweisen, wie das in Abbildung 2.2 in verschiedenen Entwicklungsstadien des Rinderfötus zu erkennen ist.

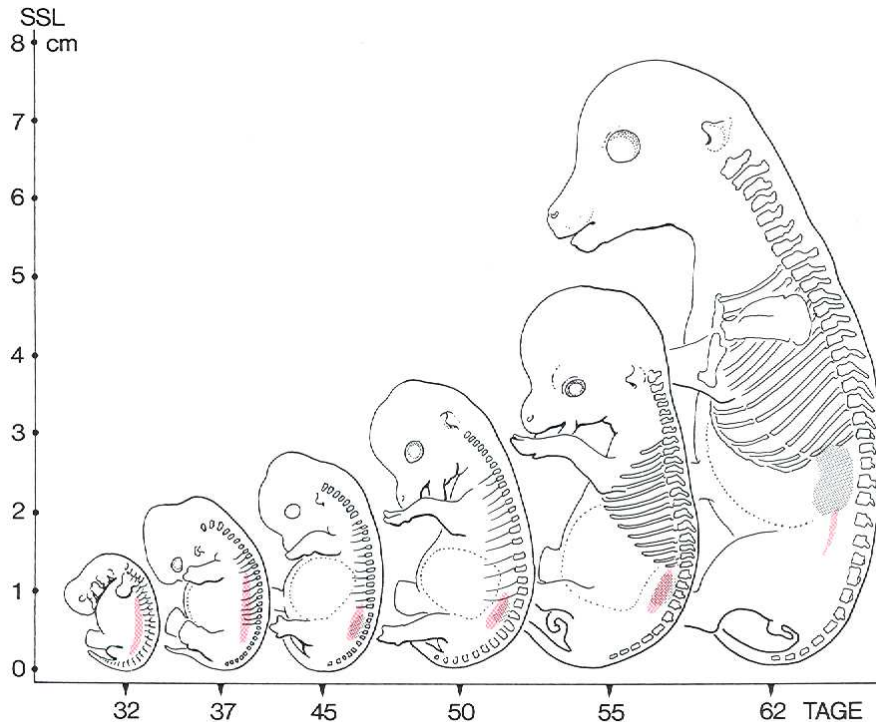


Abbildung 2.2 Veränderung der Körperproportionen beim Rinderfötus (Rüsse & Sinowatz 1991)

Beim frühen Embryo entwickeln sich das Gehirn und das Rückenmark zuerst. Die Knochenbildung folgt kurz darauf und überlappt mit der Bildung des zentralen Nervensystems. Die Knochen formen das Gerüst, um das sich dann später während der Fötalentwicklung die Muskelfasern gruppieren (Hossner 2005), deren endgültige Anzahl bereits pränatal weitgehend festgelegt wird (Pond & Mersmann 2001). Das Fettgewebe bildet sich schließlich als letztes Gewebe (Hossner 2005).

Das allometrische Wachstum ist in Hinblick auf Veränderungen des Energie- und Proteinbedarfs bei wachsenden Tieren sowie der Schlachtkörperzusammensetzung von Bedeutung. Als Beispiel für allometrische Wachstumsvorgänge sind in Abbildung 2.3 die Wachstumskurven für verschiedene Organe und Gewebe bei Sauen dargestellt.

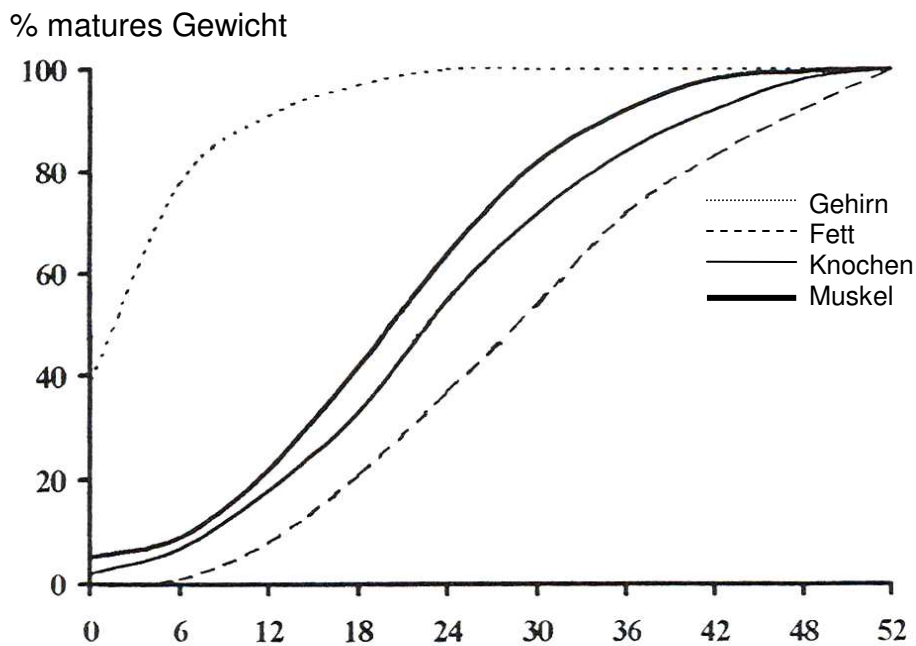


Abbildung 2.3 Wachstumsverlauf unterschiedlicher Gewebe bei Sauen
(nach Reeds et al. 1993)

Diesem Prinzip der Gewebepreferenzen folgt auch die Nährstoffverwertung bei Unterversorgung. So wird bei mangelnder Versorgung mit Nährstoffen das Nervensystem der Föten bevorzugt mit Substraten versorgt, die dann aber anderen Organen nicht verfügbar sind. Solche Föten haben zwar ein gut entwickeltes Gehirn, die Ausbildung der Knochen und der Muskulatur ist hingegen zurückgeblieben (Kolb 1989).

2.2.1 Besonderheiten des Fötalwachstums beim Schwein

Das Schwein ist ein multipares Tier, mit einer durchschnittlichen Wurfgröße von 10 Ferkeln. Größenordnungen zwischen 6 und 20 Ferkel können dabei durchaus normal sein (Zentralverband der deutschen Schweineproduktion, 2007). Die Trächtigkeitsdauer beträgt 115 Tage (Schwankungsbreite von 112 – 117 Tage), in dieser Zeitspanne ferkeln 90 % aller Sauen (Hoy et al. 2006). Die Föten wachsen in dieser Zeit bis zu einem Geburtsgewicht von durchschnittlich 1400 g heran (Engelhardt & Breves 2005; Hoy et al. 2006).

Faktoren, die das pränatale Wachstum beeinflussen, sind der Genotyp des Fötus, sein Geschlecht, die uterine Umgebung der Föten sowie die Anzahl der Würfe (Kräusslich 1981). Neben diesen Faktoren ist das Wachstum auch von den Nährstoffen abhängig, die dem

Fötus durch die Plazenta zugeführt werden. Maternale Faktoren, die darauf einen Einfluss haben, sind die Sauerstoffzufuhr und der plazentäre Blutfluss, aber auch die Nahrungsaufnahme der Mutter (Gluckmann 1986).

2.2.1.1 Gewichtsentwicklung im Uterus

Für die Überlebensrate der Ferkel ist das Geburtsgewicht von entscheidender Bedeutung (van der Lende et al. 2001). Zudem werden in der Praxis einheitliche Geburtsgewichte angestrebt, um Chancengleichheit bei der Konkurrenz am Gesäuge zu sichern. Bei einer starken Streuung der Gewichte innerhalb eines Wurfes, bleiben zu leichte Ferkel in ihrer Entwicklung zum Teil weit hinter den schweren Wurfgeschwistern zurück und sind nur eingeschränkt überlebensfähig. Dementsprechend liegt bei Ferkeln mit einem Gewicht von 0,9 – 1,2 kg die Sterberate bei 56,1 %. Mit zunehmendem Geburtsgewicht (1,8 – 2,0 kg) sinkt diese auf 6,9 % ab (Pond & Mersmann 2001). Die Ursachen für schwankende Geburtsgewichte werden bereits in der pränatalen Entwicklung manifestiert, d.h., unterentwickelte Föten holen dieses Defizit im weiteren Verlauf der Trächtigkeit meistens nicht wieder auf (Ashworth et al. 2001; van der Lende et al. 2001).

Eine wichtige Rolle bei der fötalen Gewichtsentwicklung spielt die Kapazität des Uterus (Van der Lende et al. 2001). Je größer das uterine Platzangebot, desto besser können sich die Föten entwickeln. In diesem Zusammenhang steht auch der steigende Anteil totgeborener Ferkel bei steigender Wurfgröße, bei der sich die Föten aufgrund des mangelnden Platzangebotes nicht ausreichend entwickeln können.

Dass sich eingeschränktes intrauterines Wachstum auch in häufig auftretenden Herz-Kreislauf- sowie Stoffwechselerkrankungen bei Erwachsenen zeigen kann, ergaben Untersuchungen beim Menschen (Barker 1994).

2.2.1.2 Einfluss der Lage der Föten im Uterus auf das Fötalwachstum

Spätestens bis zum 15. Tag p.c. sind die Blastozysten im Uterus noch frei beweglich. Die Embryonen können von einem Ende des Uterushorns an das Ende des gegenüber liegenden Horns wandern (migration) und verteilen sich dabei gleichmäßig auf beide Hörner (spacing) (Rüsse & Sinowatz 1991).

Hinsichtlich des Einflusses der Lage der Föten im Uterus gibt es zum Teil widersprüchliche Aussagen. Während der frühen Fötalentwicklung (30 Tage p.c.) konnten Wise et al. (1997) keinen Zusammenhang zwischen dem Gewicht und der Lage der Föten im Uterus feststellen.

Später (70. und 104. Trächtigkeitstag) waren jedoch die schwersten Föten in dem ovarnahen Uterusende und die leichten Föten im cervikalen Uterusbereich (Wise et al. 1997). Im Gegensatz dazu fanden Perry & Rowell (1969) in früheren Studien, dass Föten in den mittleren Positionen im Uterushorn leichter sind, als die Föten sowohl am Ovarende, als auch die am cervixnahen Ende. Es wurde vermutet, dass die Position in der Uterusmitte mit Nachteilen verbunden ist, da hier ein verstärkter Konkurrenzkampf der Föten stattfinden soll, aber auch die arterielle Versorgung der Föten nicht optimal sei und die Föten in der Nähe des Uterushorns mehr Platz für die Entwicklung haben. Allerdings konnte in diesen Studien kein Zusammenhang zwischen Fötalgröße und uteriner Gefäßanordnung festgestellt werden (Perry & Rowell 1969).

2.2.1.3 Einfluss des Geschlechts auf das Fötalwachstum

Der Einfluss des Geschlechts auf die Fötalentwicklung ist bei Mäusen dokumentiert. Hier konnten bei weiblichen Föten, die im Uterus von männlichen Geschwistern umgeben waren, überdurchschnittlich hohe Testosteronkonzentrationen in der Amnionflüssigkeit sowie im Blutplasma gemessen werden. Dies hatte eine später einsetzende Pubertät und eine Verlängerung des Zyklus zur Folge, im Gegensatz zu weiblichen Föten, die ausschließlich von weiblichen Geschwistern umgeben waren (vom Saal & Bronson 1980).

Beim Schwein zeigten sich keine Auswirkungen des Geschlechts der Föten auf die Zykluslänge. Jedoch wiesen männliche Tiere, die im Uterus von männlichen Föten umgeben waren, ein erhöhtes aggressives Verhalten auf (Rhode Parfet et al. 1990), wobei bei ihnen gleichzeitig die Testosteronkonzentrationen erhöht waren (vom Saal et al. 1983). Auch bei Primaten wurde der signifikante Zusammenhang zwischen den Testosteronkonzentrationen im Plasma und aggressiven Verhalten in mehreren Untersuchungen nachgewiesen (z. B. Rose et al. 1971, Michael & Zumpe 1978).

Hinsichtlich des Gewichts ergaben sich ähnliche Ergebnisse. In Studien von Wise & Christenson (1992) wurde die Fötengröße innerhalb des Uterus gegen Ende der Trächtigkeit durch das Geschlecht der Nachbarföten beeinflusst. So waren Föten, die von zwei Föten des anderen Geschlechts umgeben waren, leichter, als jene, die von Föten desselben Geschlechts umgeben waren. Es wird vermutet, dass diese Föten Nachteile in ihrer Entwicklung haben, jedoch sind die Gründe hierfür nicht bekannt.

2.3 Somatisches Wachstum und seine Regulation

2.3.1 Prinzip der Regulation

Während der frühen Trächtigkeit wird die Fötalentwicklung primär durch genetische Faktoren reguliert, wohingegen in der späteren Entwicklung Faktoren, wie beispielsweise die Substratversorgung eine wichtige Rolle spielen (Pond & Mersmann 2001). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Hormone sowohl direkt (über Gene), als auch indirekt (plazentäres Wachstum, fötaler Stoffwechsel, Synthese fötaler Faktoren und Hormone) auf das Fötalwachstum wirken (Fowden & Forhead 2001; Fowden 2003).

Sowohl Insulin als auch insulinähnliche Wachstumsfaktoren (IGF-I+II) scheinen bei der Regulation des Fötalwachstums beteiligt zu sein (Pond & Mersmann 2001). Das GH-abhängige Wachstum ist dagegen für die Fötalentwicklung nicht relevant, es tritt erst nach der Geburt auf (Gluckmann 1986). Die Hormonkonzentrationen im fötalen Organismus ändern sich sowohl in Abhängigkeit des Entwicklungsstandes als auch von maternalen Einflüssen wie zum Beispiel der Nährstoffzufuhr. Ganz allgemein lässt sich sagen, dass bei reduzierter Nährstoffversorgung weniger anabole Hormone (Insulin, IGF, Thyroxin) zur Verfügung stehen und gleichzeitig katabole Hormone (Cortisol, Katecholamine) ansteigen (Fowden & Forhead 2001).

Abbildung 2.4 zeigt den Einfluss der Nährstoffzufuhr auf eine Vielzahl an Regulationsfaktoren sowie deren Bedeutung für das Fötalwachstum.

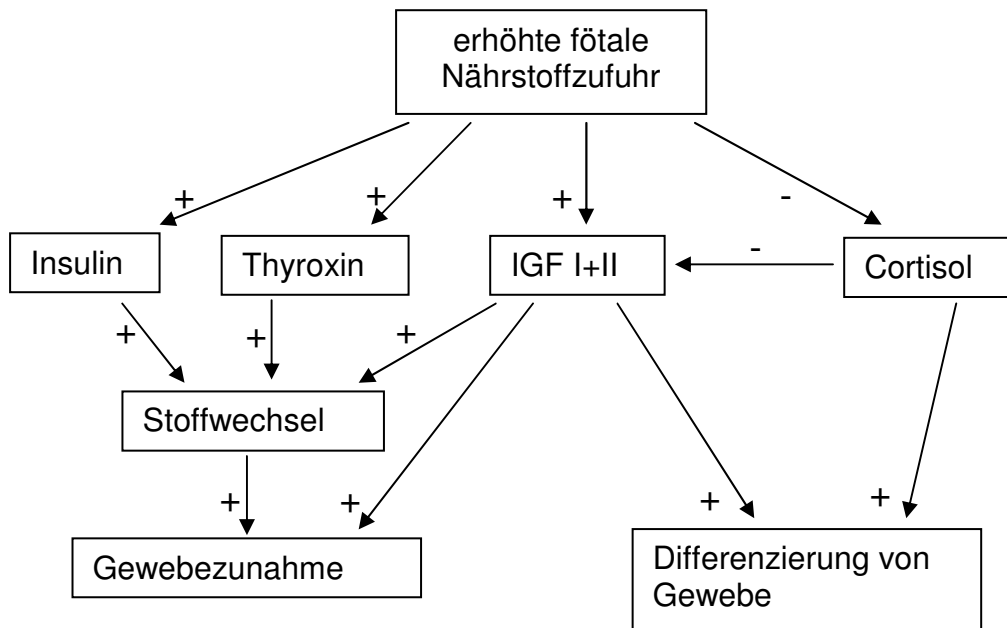


Abbildung 2.4 Einfluss der Nährstoffzufuhr auf Regulationsfaktoren und deren Bedeutung für das Fötalwachstum, am Beispiel einer erhöhten fötalen Nährstoffzufuhr (nach Fowden & Forhead 2004);
 (+): Förderung; (-): Hemmung

Bereits während der Trächtigkeit kann durch die Ernährung der Sau das postnatale Wachstum der Ferkel beeinflusst werden (Dwyer et al. 1994). Eine limitierte Nährstoffzufuhr kann sich dabei negativ auf die postnatale Entwicklung auswirken (z. B. Retardierungen; Musser et al. 2004). Hingegen bewirkt eine erhöhte maternale Futteraufnahme eine Steigerung der fötalen Nährstoffzufuhr, wodurch der Bedarf der Föten sichergestellt wird. Dabei ändert sich die Glucosekonzentration im fötalen Plasma nicht, da der Fötus die maternale Glucose zu Fructose umwandelt (Alexander et al. 1966).

2.3.2 Einfluss der Glucocorticoide

Glucocorticoide (GC) sind Steroidhormone, die in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde synthetisiert werden. Wichtigster Vertreter der Glucocorticoide beim Schwein ist das Cortisol, das bereits in der fötalen Nebennierenrinde gebildet wird (Lohse & First 1981). Die Cortisolausschüttung wird durch ACTH aus dem Hypophysenvorderlappen stimuliert.

Die Wirkungen von Cortisol sind vielfältig, wobei es grundsätzlich als kataboles Stoffwechselformon bezeichnet wird (Sharpe et al. 1986). Je nach auftretender Konzentration kann Cortisol im gleichen Gewebe entweder stimulieren oder hemmen (Klemcke et al. 1999). Es spielt eine wichtige Rolle, wenn es um die Entwicklung bzw. Differenzierung fötaler Organe geht (z. B. Gastrointestinaltrakt, Lunge, Leber, Niere; Sanglid et al. 2000).

Da die Cortisolkonzentrationen im Plasma überall gleich sind, wird die Wirkung unter anderem durch die Anzahl an Glucocorticoidrezeptoren (GCR) in den Geweben gesteuert. Zwischen dem 25. und 35. Tag p.c. wurde ein starker Cortisolanstieg im fötalen Plasma beim Schwein gemessen, dies spiegelt das Anschalten und die schnelle Reifung der Steroidsynthese in der fötalen Nebenniere wider (Klemcke et al. 1999). Zu diesem Zeitpunkt kam es zu einer Stagnation der Fötalgewichte in Abhängigkeit der auftretenden Cortisolkonzentration. In der Annahme, dass hohe Glucocorticoidkonzentrationen das Fötalwachstum verlangsamen und sogar zu einem Anstieg der Fötenverluste führen, vermuteten Klemcke & Christenson (1997) in Folge dessen auch eine Verringerung der Geburtsgewichte.

Etwa 105 Tage nach der Befruchtung kommt es erneut zu einer erhöhten fötalen Cortisolsynthese (Lohse & First 1981), während im maternalen Plasma lediglich 1-2 Tage vor der Geburt ein geringer Anstieg beobachtet werden konnte (siehe Abbildung 2.5).

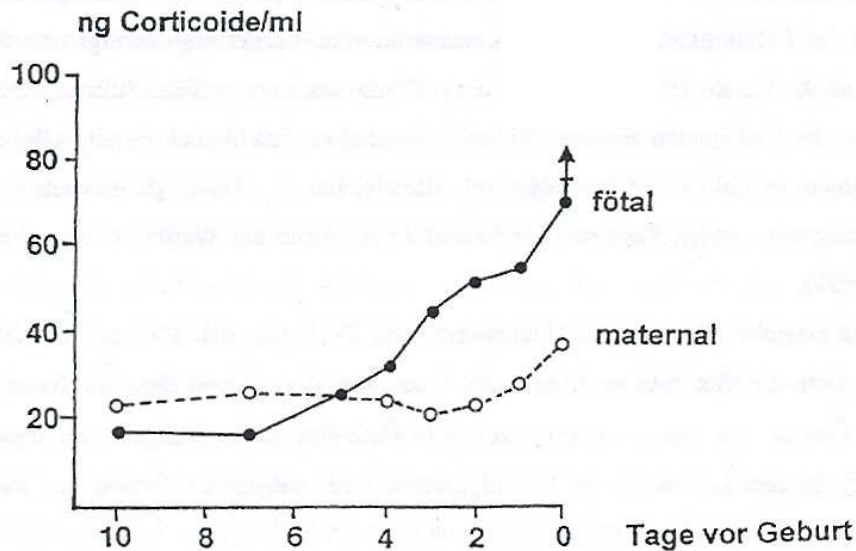


Abbildung 2.5 Maternaler und fötaler Glucocorticoidverlauf kurz vor der Geburt (Zeifang 2000)

Der Glucocorticoidanstieg steht in Zusammenhang mit den Vorbereitungen und dem Ablauf der Geburt, wobei seine Funktion in der Reifung und dem Funktionsbeginn fötaler Organe zu sehen ist (z. B. Lungenreifung, Darmreifung, etc.). Des Weiteren sind die Glucocorticoide das „Startsignal“ für die geburtseinleitenden Vorgänge (Claus & Karg 1981).

Nach der Geburt sinken die Glucocorticoidkonzentrationen wieder ab und zeigen lediglich während des Absetzens der Ferkel kleine Schwankungen (Sanglid et al. 2000).

Da Glucocorticoide an einer Vielzahl von Differenzierungsmechanismen beteiligt sind, liegt es nahe, dass sie auch eine Rolle bei der Hodendifferenzierung spielen. Allerdings wurden diese Zusammenhänge beim Schwein bislang noch nicht untersucht.

2.3.3 Bedeutung der 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 2

Obwohl Glucocorticoide für die Differenzierung und das Wachstum während der Fötalentwicklung essentiell sind, können zu hohe Glucocorticoidkonzentrationen zu Schäden im Verlauf der fötalen Entwicklung führen. Dabei kann es unter anderem zu Fehldifferenzierungen kommen (Yang 1997). Ein Mechanismus, der die Föten vor Glucocorticoiden schützt, ist die Umwandlung des aktiven Cortisols zu seinem inaktiven

Metaboliten Cortison (Klemcke & Christenson 1996) durch das Enzym 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 2 (11 β -HSD 2), das unter anderem in der Plazenta (Syncytiotrophoblast) gebildet wird (Yang 1997).

Dadurch wird zum einen sichergestellt, dass maternales Cortisol die Fötalentwicklung nicht negativ beeinflusst, zum anderen, dass hohe fötale Cortisolkonzentrationen nicht frühzeitig geburtsauslösend wirken (siehe Kapitel 2.3.2).

Neben ihrer Bedeutung in der Plazenta wurde die Rolle des Glucocorticoid/11 β -HSD-Systems auch für den Hoden im maturen Eber hinsichtlich der Spermatogenese beschrieben (Wagner & Claus 2004). Für den fötalen Hoden ist seine Bedeutung allerdings noch nicht bekannt.

2.4 Beitrag der Plazenta zur Fötalentwicklung

2.4.1 Aufbau und Funktion der Plazenta

Die Plazenta stellt die direkte Verbindung zwischen maternalem und fötalem Organismus dar. Mit der Nidation, also dem Anschmiegen des Trophoblasten an das Endometrium (beim Schwein 14 Tage p.c.) beginnt die Bildung der Plazenta (Kräusslich 1981).

Das Chorion bildet Zotten, die in entsprechende Krypten des Endometriums eindringen, wobei die Eindringtiefe und die zwischen maternalem und fötalem Organismus bestehenden Gewebeschichten die Intensität der plazentären Schranke bestimmen. Jede der beteiligten Schichten übernimmt spezielle Funktionen, wobei sowohl Struktur als auch Funktion der Plazenta tierartspezifische Unterschiede aufweisen. Über das Chorion verteilt sich ein stark verzweigtes Blutgefäßsystem, das sich auf fötaler Seite bündelt und über den Nabelstrang die direkte Verbindung zum Fötus herstellt. Der Blutfluss zwischen Fötus und Mutter ist in Abbildung 2.6 dargestellt.

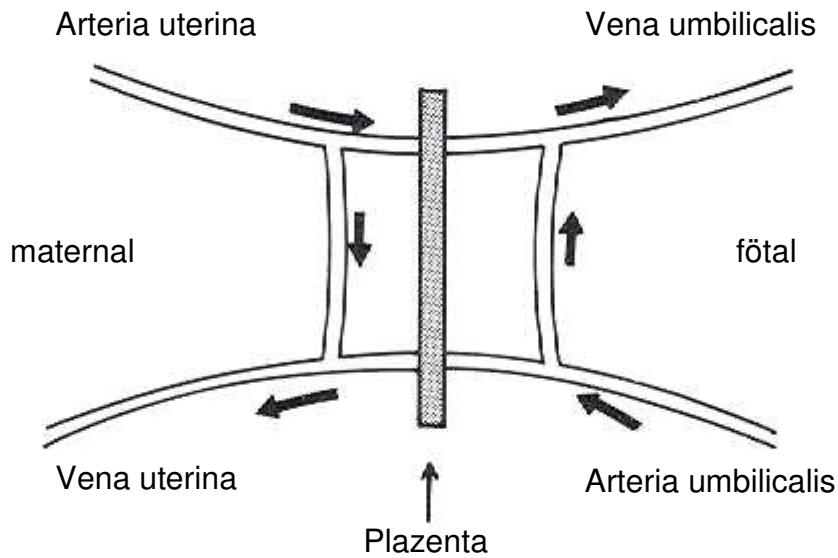


Abbildung 2.6 Prinzip des Stoffaustausches zwischen mütterlichem und fötalem Blutkreislauf (Claus in Kräusslich 1981)

Die Nabelarterien verzweigen sich in der Plazenta in ein großes Kapillarnetz, über das die Aufnahme von Substraten, Sauerstoff und essentiellen Nährstoffen in das fötale Blut sowie die Abgabe von Endprodukten des fötalen Stoffwechsels in das maternale Blut stattfindet. Die Plazenta besitzt eine Vielzahl an Funktionen, wodurch die fötale Versorgung gewährleistet wird (siehe Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2 Funktionen der Plazenta beim Schwein

Funktionen	
• Stoffaustausch	Nährstoffe, Gase
• Plazentarschranke	morphologische und enzymatische Barriere
• Speicher	Lipide, Vitamine, Hormone
• Endokrine Drüse	plazentäre Hormone (siehe Tabelle 2.4)

Die Plazentarschranke des Schweins ist zwar morphologisch nicht sehr dicht (Hoy et al. 2006), dennoch können keine Immunglobuline von der Sau auf die Föten übertragen werden. Ferkel sind daher auf die Versorgung mit Kolostrum in den ersten 12-36 Stunden nach der Geburt angewiesen, um die notwendigen Immunglobuline aufzunehmen, bevor die Darmwand geschlossen ist.

2.4.2 Mechanismen der plazentären Stoffwechselfvorgänge

Faktoren, die den Stofftransport beeinflussen, sind die Oberfläche der Plazenta, der maternale und fötale Blutfluss, die plazentäre Durchblutung (Blutgefäße), die Anzahl der Gewebeschichten und die Durchlässigkeit dieser Schichten (Garnica & Chan 1996). Der Stoffaustausch beruht auf folgenden zellulären Grundlagen: einfache Diffusion, erleichterte Diffusion (Carrier vermittelt) und aktiver Transport (Endocytose) (Engelhardt & Breves 2005). Die wichtigsten Transportmechanismen sind in Tabelle 2.3 zusammengefasst.

Tabelle 2.3 Transportmechanismen in der Plazenta

Stoff	Transportmechanismus
<u>Gase</u>	Einfache Diffusion entlang des Konzentrationsgefälles
<u>Glucose</u> (wichtigster Energie-lieferant der Föten)	Carrier vermittelter, aktiver Transport -> GLUT-1-Uniport Carrier
<u>Aminosäuren</u>	Aktiver Transport durch Carrier
<u>Ionen</u> (Na ⁺ , Ca ²⁺ , etc.)	Ausgleich des Gleichgewichtsgefälles über Ionenpumpen
<u>Proteine</u>	Endocytose
<u>Eisen</u> (Transferrin)	

2.4.3 Plazentäre Hormone beim Schwein

Während der Trächtigkeit entwickelt sich die Plazenta zu einer hoch aktiven Hormondrüse. Implantation, Aufrechterhaltung der Trächtigkeit sowie die Geburt sind abhängig von einer komplexen Interaktion an Hormonen der maternal-fötal-plazentären Einheit. Im Folgenden sind die wichtigsten Hormone, die während der Trächtigkeit beim Schwein eine Rolle spielen aufgeführt.

Tabelle 2.4 Plazentär gebildete Hormone beim Schwein

Gruppe	Hormone
Steroide	Progesteron, Östrogene, 19-Nortestosteron
Trächtigkeitsspezifische Hormone	Gonadotropine, Prostaglandine, Prolaktin, Relaxin
Hypothalamische Hormone	TRH (Thyrotropin Releasing Hormon) GRH (Growth Hormon Releasing Hormon) GnRH (Gonadotropin Releasing Hormon) CRH (Corticotropin Releasing Hormon)
Hypophysenhormone	ACTH, β -Endorphin, β -Lipotrophin

Die zwischen dem 10. und 12. Trächtigkeitstag messbaren Östrogene werden vom Blastozysten synthetisiert und dienen der maternalen Trächtigkeitserkennung (Bazer & Thatcher 1977). Wiederum sind die stark ansteigenden Östrogenkonzentrationen gegen Ende der Trächtigkeit plazentärer Herkunft und führen zur Freisetzung von Prostaglandin F₂ α (PGF₂ α) in der Plazenta, das die Luteolyse bewirkt und somit die Progesteronsynthese absinken lässt.

Das Absinken des Progesteronspiegels wird von einer kurzfristigen Relaxinfreisetzung aus den Gelbkörpern begleitet. Durch Relaxin wird das Myometrium ruhig gestellt und eine erhöhte Dehnbarkeit der Geburtswege erreicht (Waldmann & Wendt 2001). Kurz vor der Geburt geht die Relaxinkonzentration zurück (Sherwood 1982) und PGF₂ α kann zusammen mit Oxytocin die Kontraktionen des Myometriums auslösen (Ellendorff et al. 1979).

2.5 Sexualdifferenzierung

2.5.1 Prinzip des basic femaleness

Am Anfang der Entwicklung stehen bipotente Gonadenanlagen, das heißt männliche und weibliche Anlagen sind parallel vorhanden. Auch die Müllerschen (weiblich) und Wolffschen Gänge (männlich) existieren nebeneinander, wobei während der Differenzierungsphase eines der beiden Gangsysteme zurück gebildet und gleichzeitig das andere gefördert wird (Elsässer & Parvizi 1982). Die männliche Entwicklung erfolgt dabei stets vor der Ausbildung des weiblichen Geschlechts (Kaminski et al. 1999).

Die Entwicklung der beiden Geschlechter aus der indifferenten Anlage zeigt Abbildung 2.7.

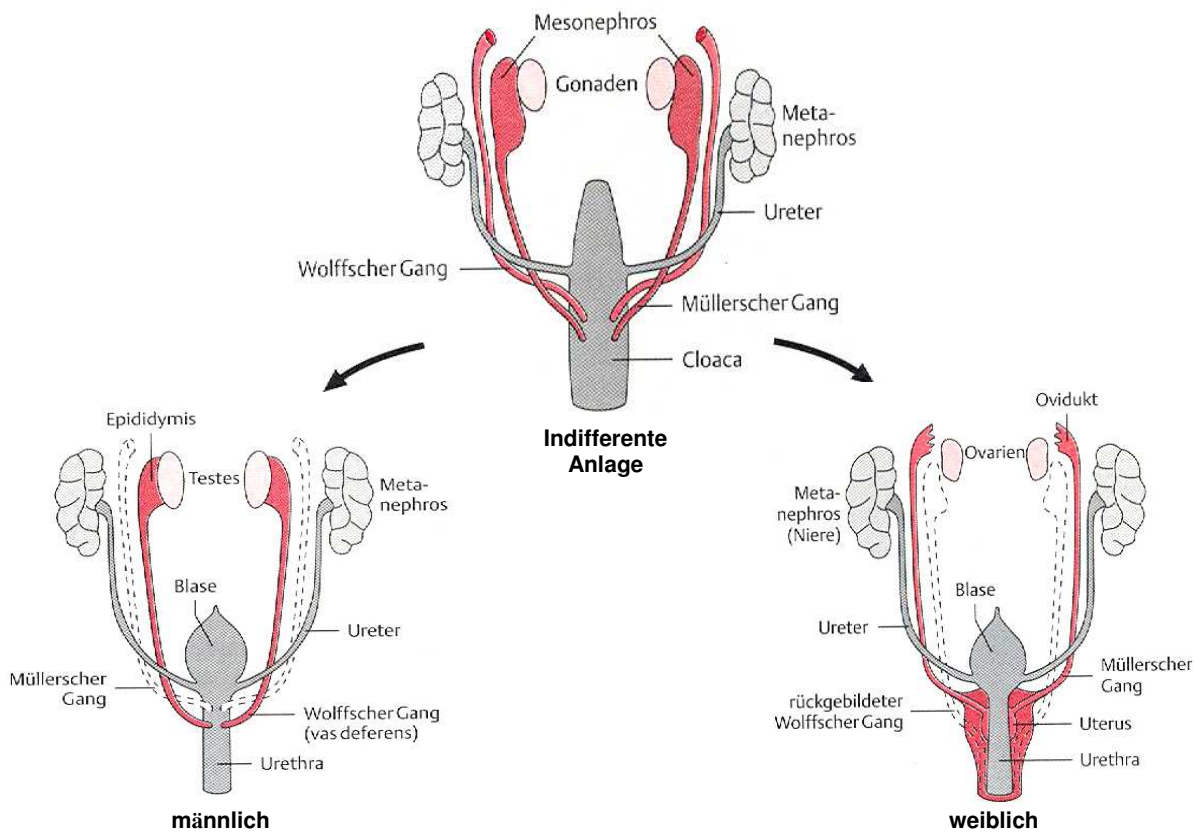


Abbildung 2.7 Entwicklung des männlichen und weiblichen Geschlechts aus der indifferenten Anlage (Spindler 1997)

Bereits bei der Befruchtung wird das chromosomale Geschlecht festgelegt, die Kombination der Geschlechtschromosomen erfolgt dabei zufällig. Auf dem Y-Chromosom befindet sich

der determinierende Faktor für die Ausbildung zum männlichen Geschlecht, das SRY-Gen (sex-determining region Y). Dieses Gen codiert für den Testes determinierenden Faktor (TdF), der wiederum die Genexpression stimuliert, die für die Hodenbildung notwendig ist (Mc Coard et al. 2002).

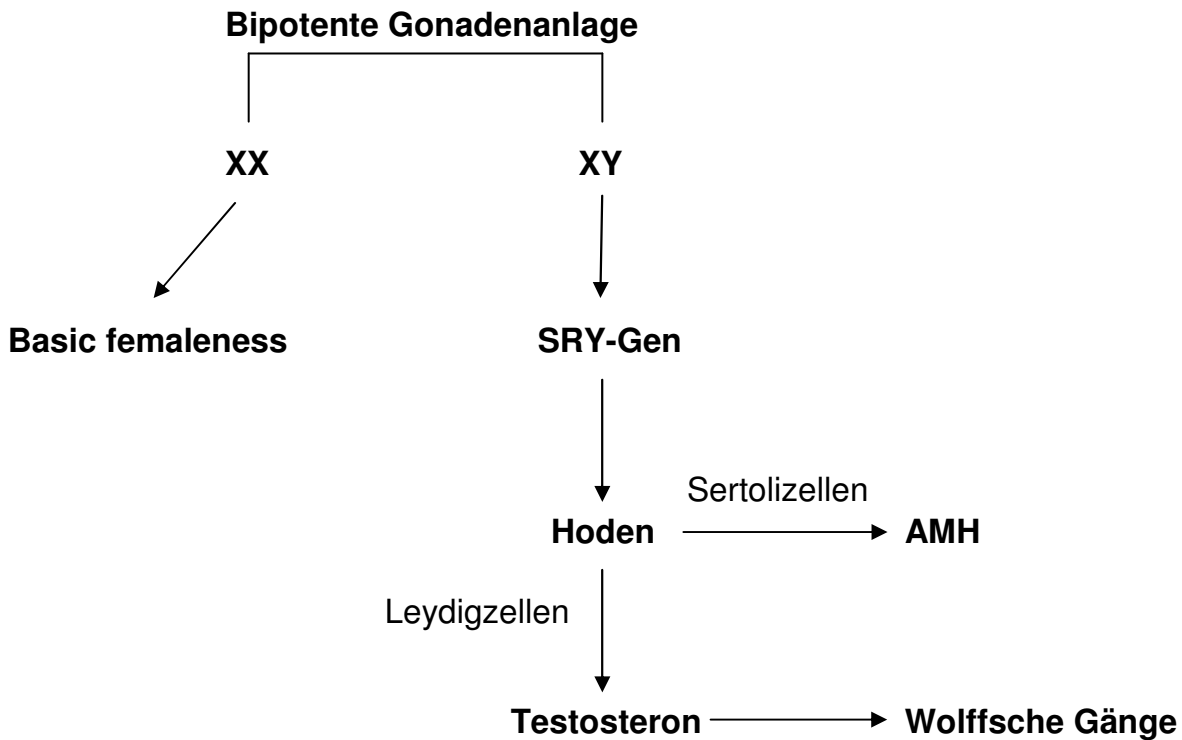


Abbildung 2.8 Schematische Darstellung des Ablaufs der Sexualdifferenzierung

Die weitere Differenzierung der männlichen Geschlechtsgänge und die parallel dazu verlaufende Rückbildung des weiblichen Geschlechts sind abhängig von der Androgensynthese in den Leydigzellen (Kaminski et al. 1999) sowie des Anti-Mullerian-Hormons (AMH) in den Sertolizellen des fötalen Hodens (siehe Abbildung 2.8).

Die für die männliche Sexualdifferenzierung essentiellen Androgene werden zu diesem Zeitpunkt (bis zum 30. Tag p.c.) von den Mesenchymzellen, den Vorläuferzellen der Leydigzellen gebildet (Pelliniemi 1975, Pelliniemi et al. 1979) und wirken nur in bestimmten Phasen der Geschlechtsentwicklung. Beim genetisch weiblichen Fötus, kann es unter Androgeneinfluss in den kritischen Differenzierungsphasen zur Virilisierung kommen (Elsässer & Parvizi 1982).

Wenn kein männlich determinierendes Signal kommt, bildet sich automatisch das weibliche Geschlecht aus (Prinzip des basic femaleness; Claus & Karg 1981). Dabei kommt es unabhängig vom Vorhandensein der Ovarien zur Ausbildung der Müllerschen Gänge (Schnorr 1996), aus denen die Eileiter, Uterus und Vagina entstehen. In diesem Fall werden die Wolffschen Gänge parallel zurück gebildet.

Unter der Wirkung von Testosteron (aus dem fötalen Hoden) entwickeln sich die Wolffschen Gänge zu Nebenhoden, Samenleiter und Samenblase (Schnorr 1996). Hier wird das weibliche Gangsystem unter dem Einfluss des Anti-Mullerian-Hormon (AMH) parallel zurück gebildet.

2.5.2 Morphologie fötaler Hoden

Die Gonaden entwickeln sich aus der Keimdrüsenleiste mit der Einwanderung der Primordialkeimzellen in die Keimdrüsenanlage (Schnorr 1996). 24 Tage nach der Befruchtung sind Hoden und Ovarien beim Schwein morphologisch noch nicht zu unterscheiden. Bereits 2 Tage später findet allerdings eine sichtbare Differenzierung statt und die fötalen Hoden sind zu erkennen (Pelliniemi 1975). Das erste Unterscheidungsmerkmal ist die Ausbildung der Tunica albuginea (Bindegewebskapsel) im Hoden etwa 26/27 Tage p.c. (Black & Erickson 1968), sie setzt sich deutlich vom auftretenden Hodenblastem ab (Rüsse & Sinowatz 1991).

Nachdem die primären Keimzellen am 24. Tag p.c. in die Gonaden eingewandert sind, bilden sich dort die Keimstränge, durch Zusammenlagern von Keimzellen und somatischen Blastemzellen. Die Keimstränge (Hodenstränge) stellen die Anlage der Tubuli seminiferi (Samenkanälchen) dar. Zentral gelegene Keimstränge, in denen sich keine Keimzellen befinden bilden das Rete blastem, aus dem sich später das Rete testis (Hodennetz) entwickelt (Schnorr 1996).

Die Entwicklung der Keimzellen verläuft in charakteristischen Wellen (Pelliniemi 1975). Die birnenförmigen Keimzellen werden rund und wandern von der Mitte der Keimstränge an deren Rand. 90 Tage p.c. befinden sich die meisten Keimzellen am Rand der Hodenstränge und werden nun als Spermatogonien bezeichnet. Durch apoptotische Vorgänge degenerieren Keimzellen, die nicht an den Rand der Tubuli wandern (Van Vorstenbosch et al. 1987). Insgesamt nimmt die Zahl der Keimzellen im Verlauf der Entwicklung stetig zu und geht erst nach der Geburt wieder zurück (Van Vorstenbosch et al. 1987).

Erste Präsertolizellen sind etwa 26 bzw. 27 Tage p.c. zu erkennen. Ihre Aufgabe besteht in der Synthese des AMH, dessen Aktivität zwischen 27 – 37 Tage p.c. deutlich ansteigt (Van Straaten & Wensing 1978). Die Anzahl der Sertolizellen nimmt im Verlauf der fötalen und neonatalen Entwicklung kontinuierlich zu (Mc Coard et al. 2003b). Während der Hodenentwicklung konnten keine apoptotischen Sertolizellen nachgewiesen werden (Wang et al. 1998), wodurch sich gegen Ende der Trächtigkeit die Länge der Tubuli erhöht (Van Straaten & Wensing 1977). Kurz nach den Sertolizellen differenzieren sich die Leydigischen Zwischenzellen aus den Mesenchymzellen (Mc Coard et al. 2003b). Ihre Entwicklung lässt sich in drei Phasen einteilen: die frühe Fötalentwicklung, die perinatale Periode und die Entwicklung ab der Pubertät. Unmittelbar nach der Gonadendifferenzierung (ca. 30 Tage p.c.) kommt es zur ersten Welle der Leydigzellentwicklung, die bis ca. 60 Tage p.c. anhält (Van Vorstenbosch et al. 1982; Van Staaten & Wensing 1978). Bereits 30 Tage p.c. synthetisieren Leydigzellen Testosteron, das für die Differenzierung der fötalen Hoden essentiell ist. Die erste Leydigzellgeneration ist gut entwickelt und synthetisiert zusätzliche Mengen an Testosteron, was sich im Testosteron-Maximum 35 – 38 Tage p.c. widerspiegelt (Raeside & Sigman 1975; Ford et al. 1980). Die Hodenentwicklung ist in dieser Phase noch nicht von Gonadotropinen abhängig (Van Straaten & Wensing, 1978), sondern beruht auf der Regulation durch genetische Faktoren.

Zwischen 80 Tage p.c. und 20 Tage p.p. (post partum) beginnt die zweite Entwicklungsphase der Leydigzellen (perinatale Phase), die durch eine Vergrößerung des Zellvolumens sowie dem Descendus testes (Hodenabstieg) charakterisiert wird. Dieser wird durch Androgene gefördert und ist beim Schwein mit der Geburt abgeschlossen, wenn die Hoden im Skrotum angelangt sind (Schnorr 1996).

Die dritte Generation der Leydigzellen entwickelt sich in der Pubertät und bleibt dann bestehen (Rüsse & Sinowatz 1991). In Tabelle 2.5 sind die wichtigsten Stadien der Hodenentwicklung nochmals zusammengefasst.

Tabelle 2.5 Übersicht über die Entwicklung der fötalen Hoden beim Schwein

Tag	Entwicklungsphase	Literatur
26/27	Sichtbare Differenzierung der Gonaden Präsertolizellen → AMH Anstieg	Ford et al. 1980 Van Straaten & Wensing 1978
30	Erste Leydigzellen Anstieg Testosteron	Ford et al. 1980
31	Östrogenbildung	Ford et al. 1980
35/38	Maximum der Leydigzellendifferenzierung Testosteronmaximum im fötalen Hoden	Ford et al. 1980
38 - 60	1. Welle der Leydigzellentwicklung	Van Vorstenbosch et al. 1982
45	Beginn der LH Synthese	Van Vorstenbosch et al. 1984
55	Differenzierung der Geschlechtsgänge	Colenbrander et al. 1982
60	Nachweisbare Mengen an LH und FSH	Van Vorstenbosch et al. 1984
ab 80	2. Welle der Leydigzellendifferenzierung Beginn Hodenabstieg	Van Straaten & Wensing 1978
85	Anstieg der Leydigzellaktivität FSH Anstieg	Colenbrander et al. 1982

Während des weiteren Hodenwachstums nimmt die Schlängelung der Samenkanälchen kontinuierlich zu. Jedoch bleibt die fötal gebildete Grundstruktur des Hodens erhalten und es findet lediglich ein Wachstum sowie eine Vermehrung der Keimzellen statt (Rüsse & Sinowatz 1991).

Das Hodengewicht nimmt parallel zu dem der Ovarien zwischen dem 75. und 90. Trächtigkeitstag zu und setzt sich bis zur Geburt fort (Goxe et al. 1993).

2.5.3 Morphologie fötaler Ovarien

Die Differenzierung der Ovarien erfolgt wenige Tage nach der Hodenanlage (Rüsse & Sinowatz 1991). Schlüsselereignisse in der Ovarentwicklung, die bei allen Mammalia in der selben chronologischen Reihenfolge ablaufen, sind die Besiedlung des Ovars mit Primordialkeimzellen, das Zusammenschließen der Primordialkeimzellen mit somatischen

Zellen, die Entstehung von Keimsträngen und schließlich das Auflösen der Keimstränge und die gleichzeitige Bildung der endgültigen Primordialfollikel (Sawyer et al. 2002).

Die Keimzellen besiedeln etwa 26 Tage p.c. die weiblichen Gonaden (Mc Coard et al. 2003a). Zwei Tage später werden bereits erste Keimzellen zu Ovogonien differenziert, die die Keimzellen zuerst nach außen in die Randzone des entstehenden Ovars drücken (Garrett & Guthrie 1999), um sich dort mit somatischen Zellen (Vorläuferzellen der Follikelzellen) über Intrazellularbrücken zusammen zu schließen. Diese Zellverbände werden als Keimballen bezeichnet (Rüsse & Sinowatz 1991). Parallel dazu verlaufen die mitotischen Teilungen der Ovogonien, die 50 Tage p.c. ein Maximum erreichen.

Vom Ovarrand ausgehend in Richtung Markzone entstehen Keimstränge (Rüsse & Sinowatz 1991), in denen die am weitesten gereiften Keimzellen am weitesten vom Ovarrand entfernt sind. In dieser Phase (Vermehrungsphase) ist die Gesamtzahl der Keimzellen mit etwa 1,1 Mio pro Schwein am höchsten (Garrett & Guthrie 1999). Ovogonien sind bis zur Geburt vorhanden, danach bilden sich keine neuen Ovogonien (Moore 1990) und die Zellzahl geht auf etwa 500.000 zurück (Garrett & Guthrie 1999), da während der Bildung und des Wachstums der Follikel viele Ovogonien und Oozyten atretisch werden (Mc Coard et al. 2003a). Etwa 40 Tage p.c. entwickeln sich aus den Ovogonien die größeren Oozyten, die tiefer in den Keimsträngen liegen und ebenfalls über Intrazellularbrücken miteinander verbunden sind (Rüsse & Sinowatz 1991). Nach und nach werden die Oozyten von einzelnen, abgeflachten Follikelzellen eingeschlossen und bilden die Primordialfollikel (Schnorr 1996). Zwischen den Primordialfollikeln bildet sich Bindegewebe, wodurch sie voneinander getrennt werden und sich der Zellverband (Keimballen) auflöst. Die Anzahl der Follikelzellen in den Keimsträngen ist zunächst begrenzt und erhöht sich erst, wenn die Oozyten ein bestimmtes Reifestadium (Prophase) erreicht haben (Rüsse & Sinowatz 1991). In der nachfolgenden Entwicklungsstufe werden die Primordialfollikel von einer Schicht kubischer oder flachzylindrischer Follikelepithelzellen eingeschlossen und bilden die Primärfollikel (siehe Abbildung 2.9).

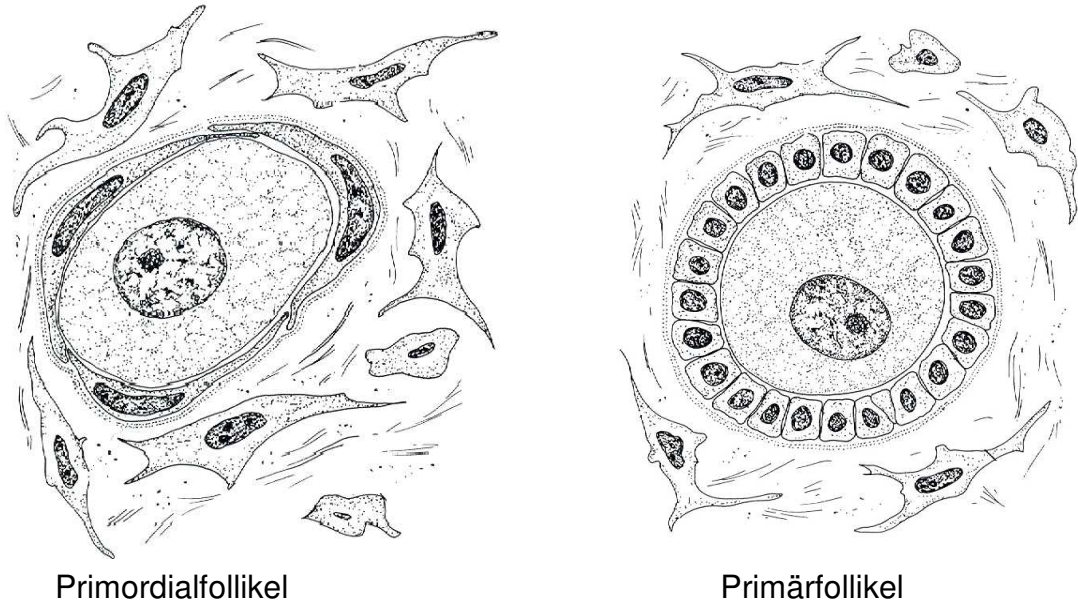


Abbildung 2.9 Schematische Darstellung eines Primordialfollikels und eines Primärfollikels im fötalen Ovar (Rüsse & Sinowatz 1991).

Ab Tag 95 p.c. sind 80 % aller Oozyten mit Follikelzellen umgeben und bleiben in dieser Form bis zur Pubertät erhalten. Oozyten, die nicht von Follikelzellen eingeschlossen werden, degenerieren.

Mit der Vergrößerung des Ovars verringert sich die Rindenschicht und die Primordialfollikel, die zu Beginn der Entwicklung noch im Inneren des Ovars lagen, sind nun nach außen gewandert (Rüsse & Sinowatz 1991).

Tabelle 2.6 Übersicht über die Entwicklung weiblicher Gonaden beim Schwein

Tag	Entwicklungsphase	Literatur
28	Bildung der Keimballen (Ovogonien)	Rüsse & Sinowatz 1991
40	Erste Ovozyten	Rüsse & Sinowatz 1991
50 - 60	Maximale Keimzellzahl	Wesley et al. 1999
	Anstieg des Ovargewichts	Mc Coard et al. 2003a
60	Mitose Anstieg in den Ovogonien	Mc Coard et al. 2003a
65/70	Ausbildung der Primordialfollikel	Colenbrander et al. 1982
80	Starker FSH Anstieg	Colenbrander et al. 1982
95	80 % aller Keimzellen sind Primordialfollikel	Wesley et al. 1999
115	Erste Bildungen von Primär- und Sekundärfollikel (nicht beständig)	Mc Coard et al. 2003a

Das Gewicht der Ovarien steigt bis zum 90. Trächtigkeitstag kontinuierlich an und bleibt danach konstant (Goxe et al. 1993).

2.6 Regulation der Gonadenentwicklung

2.6.1 Prinzip der Regulation

Während die frühe Sexualdifferenzierung durch genetische Faktoren reguliert wird, unterliegt die weitere Entwicklung der Gonaden einem genau aufeinander abgestimmten Zusammenwirken endokriner Parameter. Den Gonadotropinen FSH (Follikel stimulierendes Hormon) und LH (Luteinisierendes Hormon) aus der Hypophyse kommt dabei eine zentrale Bedeutung zu. Mechanismen, die die pulsatile Ausschüttung von Gonadotropinen steuern, sind zu Beginn der Trächtigkeit noch nicht entwickelt, die Steuerung durch Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) beginnt etwa zwischen dem 70. und 80. Trächtigkeitstag (Parvizi 2006). Die Reaktion der Hypophyse auf den Hypothalamus steigt dann mit zunehmender Fötalentwicklung an (Colenbrander et al. 1982). Ein Fehlen oder zu niedrige Konzentrationen dieser Hormone kann unterentwickelte Gonaden zur Folge haben (Colenbrander et al. 1977).

Der Hypothalamus-Hypophysen-Komplex reift beim Schwein zwischen dem 45. und 100. Trächtigkeitstag heran, erst ab dem 60. Trächtigkeitstag können Gonadotropine

nachgewiesen werden (Elsaesser et al. 1988). Ab diesem Zeitpunkt beginnt die LH-abhängige Regulation der Leydigzellen (Van Vorstenbosch et al. 1984) und etwa 10 Tage später werden die Sertolizellen durch FSH stimuliert. Gleichzeitig beginnt auch bei weiblichen Föten die Regulation der Granulosazellen durch FSH (Colenbrander et al. 1982). Die FSH-Konzentrationen im Serum sind bis zum 80. Tag p.c. bei männlichen und auch bei weiblichen Schweineföten gering, wobei sie bei weiblichen Föten stets höher sind (Goxe et al. 1993). Anschließend kommt es zu einem starken Anstieg der FSH-Konzentrationen im Blutplasma weiblicher Föten, die sich auch nach der Geburt nicht mehr verändern (Colenbrander et al. 1982). Dagegen steigt bei männlichen Föten FSH nach dem 80. Tag p.c. an, erreicht innerhalb der ersten drei Wochen nach der Geburt ein Maximum und geht dann wieder zurück (Colenbrander et al. 1982). Allerdings scheinen die Änderungen der FSH Konzentrationen beim weiblichen Fötus keinen Einfluss auf morphologische Veränderungen zu haben, bei männlichen Föten wurde indessen ein deutlicher Zusammenhang zwischen veränderten FSH-Werten und der Gonadenentwicklung nachgewiesen (Colenbrander et al. 1982). Der Anstieg der FSH Konzentration nach dem 85. Tag p.c. verläuft parallel zur Verlängerung der Tubuli seminiferi (Van Straaten & Wensing 1977), sowie der erhöhten Leydigzellaktivität (van Straaten & Wensing 1978), die sich in einem Anstieg der Testosteronkonzentration im Serum widerspiegelt (Colenbrander et al. 1979). Wahrscheinlich werden auf Grund negativer feedback Mechanismen - ausgelöst durch Androgene im fötalen Hoden - bei männlichen Föten niedrigere Gonadotropinkonzentrationen nachgewiesen als bei weiblichen (Colenbrander et al. 1982).

2.6.2 Die Rolle der Androgene während der Sexualdifferenzierung

Die normale männliche Entwicklung wird von drei fötalen Hormonen gesteuert: Testosteron, 5α -Dihydrotestosteron (5α -DHT) sowie dem Anti-Müllerian-Hormon. Testosteron und AMH werden direkt im fötalen Hoden synthetisiert. Bereits 30 Tage nach der Befruchtung lässt sich Testosteron nachweisen (Ford et al. 1980), das zwischen Tag 35 und 38 p.c. maximale Werte erreicht (Raeside & Sigman 1975; Ford et al. 1980). Es ist das wichtigste im fötalen Hoden synthetisierte Hormon und für die Differenzierung der männlichen Gonaden essentiell. Testosteron kann in der Amnionflüssigkeit männlicher und weiblicher Föten nachgewiesen werden, wie auch im Blutplasma sind allerdings die Konzentrationen bei den männlichen Föten deutlich höher (Framstad et al. 1990, Ford et al. 1980).

5 α -DHT wird aus Testosteron synthetisiert, entscheidend hierfür ist die Präsenz der 5 α -Reduktase in den Zielorganen (akzessorische Geschlechtsdrüsen, externe Genitalien). In den Wolffschen Gängen findet sich erst nach ihrer Differenzierung zu Nebenhoden, Samenleiter und akzessorischen Drüsen 5 α -DHT. Die eigentliche Differenzierung wird demzufolge durch Testosteron bewirkt, für die weitere Entwicklung ist dagegen die Anwesenheit von 5 α -DHT relevant (Schweikert & Romalo 1990).

Neben der Gonadendifferenzierung sind Androgene für die geschlechtsspezifische Prägung des Gehirns von Bedeutung, wodurch bereits fötal Teile des männlichen Verhaltens festgelegt werden. Diese Prägung verläuft vermutlich über Östrogenrezeptoren, da im Gehirn Androgenrezeptoren fehlen (Aurich & Töpfer-Petersen 2000). So scheint die Prägung des männlichen Verhaltens von den Östrogenen übernommen zu werden, die aus den Androgenen aromatisiert wurden (Ford & Christenson 1986). Dies wurde durch Studien beim Schaf bestätigt, in denen das Enzym Aromatase, das die Umwandlung von Androgenen zu Östrogenen katalysiert, im fötalen Gehirn nachgewiesen werden konnte (Roselli et al. 2003). Während Testosteron bei der männlichen Gonadenentwicklung der wichtigste Vertreter der Androgene ist, spielt bei den fötalen Ovarien Androstendion eine wichtige Rolle (Raeside 1983). Mittels Rezeptornachweis bei Mäusen wurde gezeigt, dass Androgene die Anzahl der Primärfollikel erhöhten und gleichzeitig die FSH-Rezeptor-mRNA in Follikelzellen regulierten (Duda et al. 2004). Bei Rhesusaffen konnte unter Androgeneinfluss im Ovar eine Erhöhung der Primärfollikel nachgewiesen werden. Allerdings ist nicht bekannt, ob Androgene das Wachstum direkt oder indirekt beeinflussen (Vendola et al. 1999).

Androgene vermitteln ihre Wirkung über den Androgenrezeptor. Der Androgenrezeptor ist ein kernständiger Transkriptionsfaktor, der nach Ligandenbindung an spezifische DNA-Elemente (androgen responsive elements) bindet und über nach geschaltete Gene seine Funktion (z. B. Gonadendifferenzierung, Entwicklung der männlichen Geschlechtsdrüsen, Spermatogenese, etc.) vermittelt (Yong et al. 1998). Er konnte in einer Vielzahl verschiedener Gewebe nachgewiesen werden.

2.6.3 Die Rolle der Östrogene während der Sexualdifferenzierung

Erste Östrogenkonzentrationen werden beim Schwein etwa 10 - 12 Tage p.c. nachgewiesen. Sie werden vom Blastozysten in der frühen Embryonalphase gebildet und dienen als Trächtigkeitssignal für das Muttertier (Bazer & Thatcher 1977).

Die fötal gebildeten Östrogene werden in der Plazenta zu biologisch inaktivem Östronsulfat umgewandelt und gelangen so ins Blutplasma der Sau. Die Bestimmung von Östronsulfat im maternalen Plasma zwischen dem 25. und 30. Graviditätstag kann in der tierärztlichen Praxis zur frühen Trächtigkeitsdiagnose herangezogen werden, gleichzeitig ist damit auch eine grobe Aussage über die zu erwartende Wurfgröße möglich (Plonait 2001). Das durch Östrogene der Blastozysten stimulierte $\text{PGF2}\alpha$ besitzt im Uteruslumen nur exokrine Wirkung (Engelhardt 2005) und führt somit nicht zur Luteolyse.

Eine Besonderheit beim Schwein ist die Synthese hoher Östrogenkonzentrationen im Hoden sowohl bei erwachsenen (Claus & Hoffman 1980) als auch bei neugeborenen Tieren (Raeside et al. 1988). Diese gelangen beim Eber über das Ejakulat in den weiblichen Genitaltrakt und bewirken dort eine Steigerung der Uteruskontraktionen, die den Spermientransport erleichtern und ovulationsfördernd wirken (Claus et al. 1990). Daneben spielen sie bei der Funktion der akzessorischen Geschlechtsdrüsen eine Rolle (Raeside et al. 1999). Zusätzlich konnte ein mitogener Effekt der Östrogene auf die Spermatogenese beim Eber nachgewiesen werden (Wagner et al. 2005).

Im fötalen Hoden beginnt die Östrogensynthese zum selben Zeitpunkt wie die Testosteronsynthese (Raeside et al. 1993), letztere ist in der frühen Entwicklungsphase allerdings sehr viel höher. Erst mit zunehmender Trächtigkeitsdauer steigen die Östrogenkonzentrationen an.

Eine Rolle der Östrogene im fötalen Hoden ist nicht bekannt, es wird aber eine parakrine Wirkung der Östrogene vermutet (Raeside et al. 1993). Bei Ratten konnte eine östrogenabhängige Regulation der Testosteronsynthese nachgewiesen werden (Tsai-Morris et al., 1988), dies scheint allerdings beim Schwein nicht der Fall zu sein (Raeside et al. 1993).

2.6.4 Die Rolle der Aromatase und ihre spezielle Bedeutung in den Gonaden

Die Umwandlung der Androgene zu Östrogenen wird durch das Enzym Cytochrom P450 Aromatase (kurz: Aromatase) katalysiert (Lambard et al. 2005). Sowohl Androstendion, als auch Testosteron können durch dieses Enzym zu Östrogenen umgewandelt werden (Greco & Payne 1994). Über einen parallel verlaufenden Syntheseweg entstehen bei der Östrogensynthese neben der direkten Umwandlung der Androgene zu Östrogenen auch Norandrogene (siehe Abbildung 2.10), die auf Grund ihrer hohen anabolen Wirkung in der Veterinär- und Humanmedizin beispielsweise bei Proteinmangelerkrankungen, Osteoporose oder Verbrennungen eingesetzt werden (Le Bizec et al. 1999). Die Aromatisierung der

Norandrogene verläuft allerdings wesentlich langsamer und mit geringerer Effizienz als die der Androgene (Raeside et al. 1989).

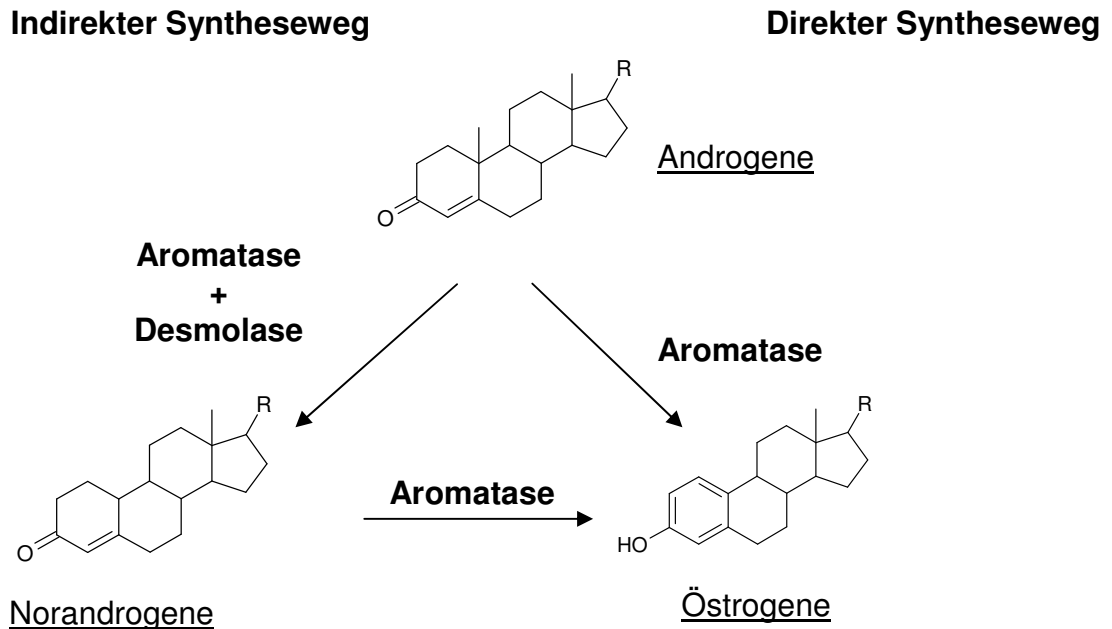


Abbildung 2.10 Vereinfachte Darstellung der Östrogenbiosynthese

Aromatase kommt in einer Vielzahl von Geweben vor und kann dabei unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterliegen (Weniger 1990). So wird zum Beispiel die plazentäre Aromatase beim Schaf durch Glucocorticoide reguliert, deren Bedeutung in diesem Zusammenhang allerdings nicht näher beschrieben wurde (France et al. 1988), hingegen im Endometrium des Kaninchens das Enzym durch Progesteron stimuliert wird (Tseng et al. 1988). Im Ovar konnte in den Granulosazellen präovulatorischer Follikel eine höhere Aromataseexpression nachgewiesen werden als bei kleinen Follikeln (Hickey et al. 1988). Bei einigen Spezies wie Mensch und Nager kann Aromatase auch im Gelbkörper lokalisiert sein (Doody et al. 1990). Während im fötalen Ovar die Regulation der Aromatase durch Gonadotropine nicht nachgewiesen werden konnte, wurde ihre Stimulation (in vitro) im Hoden durch FSH belegt (Weniger 1990).

Mit Hilfe der Umwandlung radioaktiver Androgene konnte die Aromataseaktivität in fötalen Gonaden (sowohl Hoden als auch Ovar) bei verschiedenen Spezies nachgewiesen werden (Weniger 1990), die im Laufe der Fötalentwicklung ansteigt (Tsai-Morris et al. 1985; Greco &

Payne 1994). Lokalisiert wurde das Enzym allerdings bisher nur bei adulten und neonatalen Spezies, wie der Überblick in Tabelle 2.7 zeigt.

Tabelle 2.7 Aromataseexpression im Hoden verschiedener Spezies

Spezies	Zelltyp	Literatur
Ratte (postnatal)	Sertolizellen	Tsai-Morris et al. 1985
Ratte (adult)	Leydigzellen	Tsai-Morris et al. 1985
Schwein (neonatal)	Leydigzellen	Conley et al. 1996
Eber	Leydigzellen	Carreau et al. 2001; Fraczek et al. 2001
Mensch (adult)	Leydigzellen	Carreau et al. 2001
Maus/Wühlmaus (adult)	Leydigzellen, Sertolizellen, Keimzellen	Nitta et al. 1993
Hengst (adult)	Leydigzellen Sertolizellen	Sipahutar et al. 2003 Hess & Roser 2004

Bei den meisten Spezies konnte die Aromataseexpression eindeutig den Leydigzellen zugeschrieben werden. Eine räumliche Verlagerung der Aromataseexpression wurde bei Ratten nachgewiesen, bei denen das Enzym postnatal in den Sertolizellen exprimiert wurde, während bei adulten Ratten die Leydigzellen die primäre Aromatasequelle darstellen (Tsai-Morris et al. 1985).

3 Fragestellung

Die Geschlechtsdifferenzierung beim Schwein verläuft nach dem Prinzip des basic femaleness. Das bedeutet, dass die weibliche Differenzierung automatisch erfolgt, also ohne Mitwirkung von Steroiden. Die Differenzierung der männlichen Föten erfolgt hingegen durch Bildung von Androgenen in den fötalen Hoden.

Allerdings konnten bei weiblichen Föten unterschiedlicher Spezies Androgene nachgewiesen werden. Ebenso ist auch bekannt, dass männliche Föten sehr hohe Konzentrationen an Östrogenen im Hoden synthetisieren. Die Tatsache, dass Androgene und Östrogene bei beiden Geschlechtern synthetisiert werden, führt zu der Frage, welche Bedeutung Östrogene bei männlichen Föten und Androgene bei weiblichen Föten haben.

Es ist nicht bekannt, warum sich in diesem Zusammenhang auch in Hinblick auf die bekannten Prinzipien der Sexualdifferenzierung keine Fehldifferenzierungen der fötalen Gonaden ergeben.

In dieser Arbeit wurden zunächst allgemeine Daten zur Fötalentwicklung beim Schwein herangezogen und diese bezüglich geschlechtsspezifischer Unterschiede verglichen. Im Weiteren sollte dann speziell auf die Geschlechtsunterschiede im Rahmen der Gonadenentwicklung eingegangen werden. Dabei sollte jedoch zuerst das Zusammenspiel GC/GCR/11 β -HSD 2 im fötalen Hoden während der Differenzierung untersucht werden, um im Folgenden Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Gonaden aufzuzeigen.

Neben dem Nachweis der relevanten Steroide (LH, FSH, Östrogene, Testosteron) für die Gonadenentwicklung sowie der Lokalisation ihrer spezifischen Rezeptoren, standen auch Enzyme, die bei der Steroidsynthese eine Rolle spielen im Vordergrund. Eine Schlüsselrolle nahm dabei das Enzym Aromatase (Östrogensynthese) ein, das in fötalen Gonaden bislang noch nicht lokalisiert wurde.

4 Material und Methoden

4.1 Tiere

4.1.1 Herkunft, Haltung und Fütterung

Der Tierversuch war vom zuständigen Regierungspräsidium genehmigt worden (V198/2004THs). Er umfasste 16 Sauen der Deutschen Landrasse aus vier unterschiedlichen Trächtigkeitswochen. Dabei handelte es sich ausschließlich um Altsauen, also Tiere, die mindestens einmal geworfen hatten. Die Tiere stammten von der Versuchsstation Unterer Lindenhof der Universität Hohenheim. Die Sauen wurden gruppenweise ($n = 4$) über den Verlauf eines Jahres gedeckt. Die Gruppen waren so konzipiert, dass eine Fötenentnahme in der 6., 10., 13. und 15. Graviditätswoche erfolgen konnte (siehe Abbildung 4.1). Vier Wochen vor Erreichen der jeweiligen Trächtigkeitswoche wurde die entsprechende Sauengruppe nach Hohenheim transferiert.

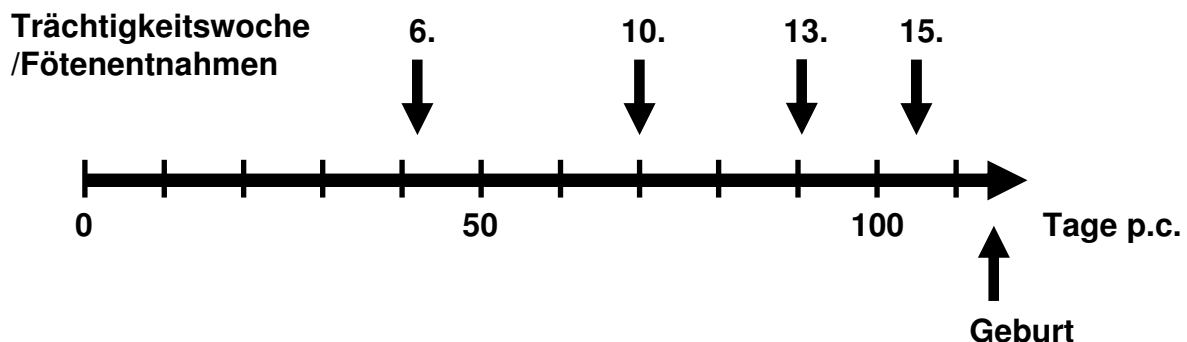


Abbildung 4.1 Überblick über die Zeitpunkte der Fötenentnahmen

In Hohenheim wurden die Sauen in Einzelbuchten (2 x 3 m) auf Stroh mit Sichtkontakt gehalten. Die Fütterung wurde bedarfsgerecht dem jeweiligen Trächtigkeitsstadium angepasst. So erhielten niedertragende Sauen (bis 85 Tage p.c.) 2,2 kg einer Standardmischung für Zuchtsauen mit 12,7 MJ ME /kg pro Tag und hochtragende Tiere (ab 85 Tag p.c.) 2,8 kg / Tag der gleichen Futtermischung (12,7 MJ ME/kg).

4.1.2 Venenverweilkatheter und Blutentnahme

Zwei Wochen vor der Fötenentnahme wurden bei den Sauen Venenverweilkatheter über die V. cephalica verlegt (Claus et al. 1990; Kraetzel & Weiler 1998), um eine stressfreie Blutentnahme der Tiere zu gewährleisten. Neun Tage vor der Entnahme der Föten wurden

zweimal täglich (8.00 und 15.00 Uhr) Blutproben genommen und das Plasma bis zur analytischen Auswertung bei – 20°C gelagert.

4.1.3 Fötenentnahme und Gewinnung der Gewebeprobe

In den definierten Trächtigkeitsstadien (siehe Kapitel 4.1.1) wurden insgesamt 158 Föten entnommen. Die Anzahl der Föten und Sauen je Trächtigkeitswoche sowie das Geschlechtsverhältnis sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

Tabelle 4.1 Anzahl der Tiere in den untersuchten Trächtigkeitsstadien

Trächtigkeitswoche (Fötenentnahme)	Sauenzahl	Fötanzahl m / w	Fötanzahl (insgesamt)
6	4	23 / 23	46
10	4	19 / 23	42
13	4	22 / 18	40
15	4	14 / 16	30

Die Entnahme der Föten wurde unter Narkose (O₂/N₂O (2:1,5), Isofluran (ratio 0,5 – 1; Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) der Sauen durchgeführt. Die Narkose wurde bis zur Entnahme des letzten Fötus der Sau aufrechterhalten, um die Sauerstoffversorgung der narkotisierten Föten zu gewährleisten. Zur Fötenentnahme wurde die Bauchhöhle der Sauen entlang der Linea alba mit seitlichen Entlastungsschnitten geöffnet und der Uterus vorverlagert. Die Lage der Föten wurde vorsichtig abgetastet, die beiden Uterushörner als rechter und linker Uterus definiert und die Position der Föten ausgehend vom Uterushals bis in die Uterushörner durchnummeriert. Jede Fruchtblase wurde vorsichtig geöffnet. Dabei wurde die Amnionflüssigkeit der einzelnen Föten in Falkonröhrchen sichergestellt und bei – 20 °C bis zur analytischen Auswertung gelagert. Soweit es möglich war, wurde bei den narkotisierten Föten aus der A. umbilicalis Blut entnommen und in Heparinröhrchen überführt. Das Plasma wurde ebenfalls bei – 20°C gelagert. Nach der Durchtrennung des Nabelstrangs wurden die Föten mit 0,3 ml T61 (Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) pro kg Körpergewicht eingeschläfert. Anschließend wurden das Gewicht, die Scheitel-Steiß-Länge (SSL) und das Geschlecht der Föten protokolliert. Die Gewebeentnahmen für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden unmittelbar nach der Bestimmung der Fötendaten durchgeführt. Um Kontaminationen der Gewebe mit

RNasen weitgehend zu vermeiden, wurde auf eine sterile Entnahme geachtet. Die fötalen Gewebe wurden innerhalb von 10 Minuten nach dem Einschläfern entnommen und fixiert. Eine der beiden Gonaden sowie ein definierter Teil des M. gluteus wurden für die spätere RNA Bestimmung in RNA Later (eigene Herstellung nach Clarke & Amaral 2003; Zusammensetzung: 70% Amoniumsulfat, 0,5 M EDTA, 1 M Natriumcitrat, DEPC-H₂O) gelagert. Damit der Puffer das Gewebe vollständig durchtränken konnte, wurde es zunächst 24 Stunden bei 4 °C aufbewahrt und konnte danach bei -20 °C gelagert werden.

Parallel dazu wurden die zweite Gonade und derselbe Teil der Muskulatur für die immunocytochemischen Untersuchungen in 4% Formaldehyd fixiert und bis zur weiteren Behandlung (siehe Kapitel 4.3) bei Raumtemperatur gelagert.

Nach der Fötenentnahme wurden die Sauen mit 0,2 ml Eutha[®]/ kg Körpergewicht eingeschläfert (Essex Pharma, München, Deutschland).

4.1.4 Neugeborene Ferkel

Zusätzlich zu den Föten wurden je vier männliche und vier weibliche Ferkel aus zwei unterschiedlichen Würfen (Deutsche Landrasse x Pietrain) in dieser Arbeit untersucht. Die Ferkel stammten ebenfalls von der Versuchsstation Unterer Lindenhof und wurden am Tag der Geburt nach Hohenheim transportiert. Der 45 minütige Transport erfolgte in Transportkisten, die mit Wärmflaschen versehen waren, um ein Auskühlen der Ferkel zu vermeiden. Bis zum Transport befanden sich die Neugeborenen beim Muttertier, sie konnten bis zu diesem Zeitpunkt Kolostrum aufnehmen. Die Ferkel wurden 6 bzw. 12 Stunden nach der Geburt mit 0,2 ml Eutha[®] / kg Körpergewicht eingeschläfert. Nach dem Wiegen und Abmessen der Ferkel wurden wie bereits unter Kapitel 4.1.3 für die Föten beschrieben, die Gonaden sowie ein Teil des M. gluteus für die mRNA Quantifizierung und die histologischen Untersuchungen entnommen und fixiert. Zusätzlich wurde peripheres Blut aus der V. jugularis in Heparinröhrchen sichergestellt und das Plasma bei -20 °C gelagert.

4.2 Hormonanalytik

Die Hormonmessungen wurden in dem bei -20 °C gelagerten Blutplasma und der Amnionflüssigkeit durchgeführt. Bei den verwendeten Methoden wird auf frühere Methodenentwicklungen hingewiesen, die bereits publiziert sind (siehe Tabelle 4.2). Sie werden daher nur kurz beschrieben, wobei auf die Qualitätskriterien im Einzelnen

eingegangen wird. Soweit Methoden neu entwickelt wurden, werden sie im Folgenden detailliert charakterisiert.

Tabelle 4.2 Publikationsübersicht der angewandten Methoden

Parameter	Meßmethode	Literatur
Progesteron Testosteron 17 β Östradiol Gesamtöstrogene Cortisol LH / FSH	RIA	Claus et al. 1985 Bubenik et al. 1982 Claus et al. 1983 Claus et al. 1985 Janning 1993 Claus & Weiler 1996 Claus et al. 1990 Over 1992
19-Nortestosteron	EIA	Claus et al. 2007a

4.2.1 Extraktion

Mit Ausnahme der Progesteronbestimmung im maternalen Plasma (Direkttest), ging allen immunologischen Tests im Steroidbereich eine Extraktion mit destilliertem tertiärem Buthyl Methyl Ether (TBM – Ether) bzw. Ethylacetat (EtAc) voraus. Durch die Extraktion werden störende Bestandteile im Plasma entfernt und das Hormon aus der Probe angereichert.

Je nach zu erwartenden Hormongehalten wurden unterschiedliche aliquote Teile der zu messenden Proben extrahiert (siehe Tabelle 4.3), um beim anschließenden Immunoassay im empfindlichen Bereich der Eichkurve zu liegen.

Tabelle 4.3 Extrahierte aliquote Teile der gemessenen Hormone in der Amnionflüssigkeit sowie im Plasma

Substrat	Parameter	extrahierter Probenanteil [µl]	Trächtigkeitsstadium
Amnionflüssigkeit	Progesteron	10	6. – 13.
		50	15.
	Testosteron	100	6.
		200	10. – 15.
	17β Östradiol	10	15.
		50	13.
		100	10.
		200	6.
	19-Nortestosteron	200	6. – 15.
	Cortisol	50	6. – 15.
Cortison	200	6. – 15.	
fötales Plasma	Testosteron	100	6. – 15. + Neonaten
		50	15.
	Gesamtöstrogene	100	10. – 13.
		50	6. – 15. + Neonaten
	Cortisol	5	6.
		10	10. – 15. + Neonaten
maternales Plasma	17β Östradiol	250	13. – 15.
		500	6. – 10.
	Cortisol	10	6. – 15.
	Cortison	100	6. – 15.

Bei einem Aliquot von 10 µl Plasma wurden 100 µl aqua bidest hinzugefügt, um den Anteil der wässrigen Phase für die Extraktion zu erhöhen.

Probenaliquote $> 50 \mu\text{l}$ wurden mit je 3 ml des unpolaren Lösungsmittels (TBM – Ether bzw. EtAc) 30 min auf einem Horizontalschüttler geschüttelt. Bei einem Aliquot $\leq 50 \mu\text{l}$ waren 2 ml Lösungsmittel zur Extraktion ausreichend. Anschließend wurden die Proben 1 Stunde bei -20°C tiefgefroren. Das mit Steroiden angereicherte Lösungsmittel konnte nun durch Dekantieren von der gefrorenen Phase getrennt und mit dem Vakuumrotationsverdampfer (Thermo Electron GmbH, Dreieich, Deutschland) verdampft werden. Das Steroid wurde dann durch Zugabe von Phosphatpuffer (PBS; 67 mM, pH 7,2) wieder in die wässrige Phase überführt und bis zur Fortsetzung des jeweiligen Tests bei 4°C gelagert (höchstens jedoch 1 Tag).

4.2.2 Bestimmung der Qualitätskriterien

Das Mitführen von Kontrollen in jedem Test diene der Qualitätssicherung. Die Kontrollen enthielten genau definierte Hormonzusätze in „gestripptem“ Kastratenplasma bzw. Amnionflüssigkeit (Fruchtwasserpool mehrerer Föten), das heißt im Plasma bzw. der Amnionflüssigkeit wurden durch Zugabe von pulverisierter Aktivkohle die noch enthaltenen Steroidhormone entfernt. Anschließend wurden den beiden Medien unterschiedliche Mengen an Hormon zudosiert.

Zur Bestimmung der Interassayvarianz wurden die Kontrollproben mehrerer Tests miteinander verglichen. Dabei wurden zur Berechnung der Variationskoeffizienten die Mittelwerte und Standardabweichungen herangezogen.

Um Schwankungen innerhalb eines Tests zu erfassen, wurde die Intraassayvarianz ermittelt. Sie wurde durch Mehrfachmessung einer Kontrollprobe innerhalb eines Tests bestimmt.

Mit Hilfe der Wiederfindung wurden die Verluste an Hormon während der Extraktion bestimmt. Beim Radioimmunoassay wurde der Probe dazu vor der Extraktion eine definierte Menge an radioaktivmarkiertem Steroid zugesetzt und anschließend die verbleibende Menge in einem Aliquot bestimmt. Beim enzymimmunologischen Test wurden zur Bestimmung der Wiederfindung Kontrollen mit bekannter Steroidkonzentration während des Tests mitgeführt. Die gemessene Konzentration wurde dann auf die ursprünglich eingesetzte Konzentration bezogen.

Die Bestimmung der unteren Nachweisgrenze erfolgte durch Addition von zwei Standardabweichungen zum Mittelwert des niedrigsten Eichpunktes (Chard 1987).

4.2.3 Übersicht der verwendeten Antiseren

Die verwendeten Antiseren waren größtenteils am Institut erzeugt worden. Um immunogene Eigenschaften zu erhalten, müssen Haptene (z. B. Steroide) zunächst über einen Spacer (Abstandshalter) an ein hochmolekulares, körperfremdes Trägerprotein (z. B. RSA) gekoppelt werden. Soll die Hydroxygruppe exponiert werden, wird der Spacer O-(Carboxymethyl)-Hydroxylamin (CMO) mit der Ketogruppe des Steroids (an C-3-Position) verknüpft. Entsteht dagegen die optimale Spezifität des Antiserums bei exponierter Ketogruppe, wird Bernsteinsäureanhydrid (HS: Hemisuccinat) an die C-17 ständige Hydroxygruppe des Steroids gekoppelt.

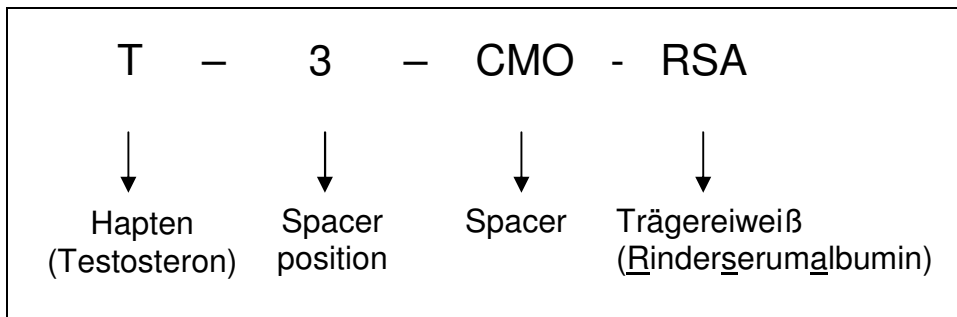


Abbildung 4.2 Abkürzung der Antiseren am Beispiel Testosteron

In der folgenden Tabelle sind die in den radioimmunologischen Test verwendeten Antiseren sowie ihre Verdünnungen dargestellt.

Tabelle 4.4 Übersicht der verwendeten Antiseren

Steroid	Antiserum gegen	Arbeitsverdünnung	Testsystem
Cortisol	C1/Pool 2 (31.8.77) C1-21-HS-RSA ¹	1 : 30.000	RIA
Progesteron	P11 α -HS-RSA ²	1 : 15.000	
17 β Östradiol	E2-6-CMO-RSA ³	1 : 56.000 (Amnion) 1 : 47.000 (Plasma)	
Gesamtöstrogene	E1-17-CMO-RSA ⁴	1 : 15.000	
Testosteron	T-3-CMO-RSA ⁵	1 : 70.000	
Cortison	C2-21-HS-RSA ⁶	1 : 4.000	EIA
19-Nortestosteron	NT-17-HS-RSA ⁷	1 : 11.000	

¹ Cortisol-21-Hemisuccinat-Rinderserumalbumin

² Progesteron-11 α -Hemisuccinat-Rinderserumalbumin

³ Estradiol-6-Carboxymethyloxim-Rinderserumalbumin

⁴ Estron-17-Carboxymethyloxim-Rinderserumalbumin

⁵ Testosteron-3-Carboxymethyloxim-Rinderserumalbumin

⁶ Cortison-21-Hemisuccinat-Rinderserumalbumin

⁷ 19-Nortestosteron-17-Hemisuccinat-Rinderserumalbumin

Cortisol, Progesteron sowie 17 β Östradiol wurden sowohl im Plasma (fötal, maternal) als auch in der Amnionflüssigkeit nachgewiesen.

4.2.4 Radioimmunologische Bestimmungen im Plasma und in der Amnionflüssigkeit

4.2.4.1 Durchführung des Radioimmunoassays (RIA)

Bei radioimmunologischen Tests wird die Analytkonzentration durch Messung der Radioaktivität im Antigen-Antikörper-Komplex bestimmt. Im Folgenden handelte sich um kompetitive Immunoassays, das heißt Plasmaantigen und markiertes Antigen konkurrieren um eine begrenzte Anzahl an Antikörperbindungsstellen. Mit Ausnahme der Progesteronbestimmung im maternalen Plasma war allen Radioimmuntests eine Extraktion vorgeschaltet (siehe Kapitel 4.2.1). In jedem Test wurde ein Leerwert mitgeführt, der aus dem jeweiligen abgezogenen Extraktionsmittel bestand. Durch ihn konnten Verunreinigungen des Lösungsmittels sowie der verwendeten Gebrauchsgegenstände ausgeschlossen werden. Des Weiteren wurde in jedem Test eine in RSA angesetzte Eichkurve, Kontrollen zur Qualitätsabsicherung, eine Gesamtaktivität (GA, enthält nur Tracer), ein NSB (nicht-spezifische Bindung, enthält Tracer aber keinen Antikörper) sowie ein blank-Wert (enthält weder Tracer noch Antikörper) mitgeführt.

Während der 2 x 10 minütigen Inkubation im Wasserbad bei 37 °C erfolgte die immunologische Reaktion der hormonspezifischen Antiseren mit dem Probenhormon bzw. dem ³H-markierten Hormon. Dabei stellte sich ein Gleichgewicht zwischen dem Tracer-Antikörper- und Probenhormon-Antikörper-Komplex ein, das im Eisbad (0°C, 1h) stabilisiert wurde, wobei gleichzeitig die Immunreaktion abgestoppt wurde. In der anschließend folgenden bound-free-Trennung wurden nicht gebundenes, radioaktiv markiertes Antigen sowie sämtliche nicht gebundene Serumbestandteile entfernt. Sie erfolgte mit Hilfe einer Kohlesuspension und anschließender Zentrifugation (20 min bei 3000 U). Freie Steroide wurden dabei von der Kohle adsorbiert und im Überstand befanden sich nur noch Hormone, die an Antikörper gebunden waren. Nach Überführen des Überstandes in mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit gefüllte Gefäße, konnte im Flüssigkeitsszintillationszähler (Beckmann Instruments, Inc., Fullerton USA) die Radioaktivität in counts pro Minute (cpm) bestimmt werden.

4.2.4.2 Progesteron

Progesteron wurde im maternalen Blutplasma sowie in der Amnionflüssigkeit gemessen (Claus et al. 1985). Bei den Progesteronbestimmungen im maternalen Plasma handelte es sich um einen Direkttest, wohingegen den Messungen in der Amnionflüssigkeit eine Extraktion vorgeschaltet war. Der Messbereich der Eichkurve lag zwischen 0,1 – 12,5 ng /ml.

Testparameter:

Die Nicht-spezifische Bindung der Progesteronbestimmungen betrug 2,3 % in der Amnionflüssigkeit und 2,6 % im Plasma. Die Gesamtaktivität lag bei ca. 7500 cpm (Amnionflüssigkeit) bzw. ca. 6700 cpm (Plasma).

Qualitätskriterien:

Für die Progesteronbestimmungen in der Amnionflüssigkeit sowie im maternalen Plasma sind die Qualitätskriterien in Tabelle 4.5 aufgeführt.

Tabelle 4.5 Qualitätskriterien der radioimmunologische Progesteronbestimmung

Substrat	Qualitätskriterien	Konzentration*
Amnionflüssigkeit	Untere Nachweisgrenze	0,10 ng/ml
	Absolute Bindung	52,0 %
	Wiederfindung	98,8 %
	Interassayvarianz	5 ng/ml 6,0 %
	Intraassayvarianz	1 ng/ml 5,2 %
Plasma	Untere Nachweisgrenze	0,10 ng/ml
	Absolute Bindung	38,9 %
	Wiederfindung	88,9 %
	Interassayvarianz	10 ng/ml 8,5 %
	Intraassayvarianz	2 ng/ml 3,7 %

*Konzentration der Kontrollen, die für die jeweiligen Qualitätskriterien herangezogen wurden

Die Kreuzreaktionen mit strukturell ähnlichen Steroiden (17 β Östradiol, 5 α Pregnan-3,20-dion, Cortisol, Corticosteron, Deoxycorticosteron, Testosteron, Androstendion) betrug weniger als 0,1 %.

4.2.4.3 Testosteron

Die Testosteronkonzentrationen wurden in der Amnionflüssigkeit, im fötalen Plasma der A. umbilicalis sowie im peripheren Blut der Neugeborenen gemessen (Bubenik et al. 1982). Der messbare Bereich der Eichkurve lag zwischen 0,05 – 10 ng/ml.

Testparameter:

Der NSB betrug für die Testosteronbestimmung in der Amnionflüssigkeit 1,3 % bei einer GA von ca. 7400 cpm. Im Plasma lag der NSB bei 2,2 % bei einer GA von ca. 8000 cpm.

Qualitätskriterien:

Die Qualitätskriterien der Testosteronbestimmung in der Amnionflüssigkeit und im Plasma sind in Tabelle 4.6 dargestellt.

Tabelle 4.6 Qualitätskriterien der Testosteronbestimmungen

Substrat	Qualitätskriterien	Konzentration*
Amnionflüssigkeit	Untere Nachweisgrenze	0,04 ng/ml
	Absolute Bindung	43,3 %
	Wiederfindung	95,3 %
	Interassayvarianz	5 ng/ml 8,3 %
	Intraassayvarianz	5 ng/ml 5,3 %
Plasma	Untere Nachweisgrenze	0,04 ng/ml
	Absolute Bindung	43,5 %
	Wiederfindung	93,4 %
	Interassayvarianz	0,5 ng/ml 5,3 %
	Intraassayvarianz	0,1 ng/ml 5,6 %

*Konzentration der Kontrollen, die für die jeweiligen Qualitätskriterien herangezogen wurden

Das verwendete Antiserum gegen T-3-CMO-RSA war hochspezifisch und reagierte lediglich gegen 5 α -Dihydrotestosteron zu 30 % kreuz. Die Kreuzreaktivitäten gegenüber Dehydroepitestosteron (0,46 %), Androstenon (0,06 %) und 17 β Östradiol (0,05 %) waren gering.

4.2.4.4 17β Östradiol

17β Östradiol wurde im maternalen Blutplasma und in der Amnionflüssigkeit gemessen (Claus et al. 1983). Aufgrund der begrenzten Plasmamenge (A. umbilicalis) wurde das Steroid nur in einzelnen, zufällig ausgewählten Proben von Föten der 10., 13. und 15. Trächtigswoche gemessen. Für die Bestimmungen im Blutplasma wurde eine in Kastratenplasma angesetzte Eichkurve verwendet, deren Meßbereich zwischen 0,02 - 10 ng/ml lag. Die Messungen in der Amnionflüssigkeit erfolgten anhand einer in Phosphatpuffer angesetzten Eichkurve.

Testparameter:

Für die 17β Östradiolmessungen wurde eine GA von ca. 3000 cpm (Amnionflüssigkeit) sowie ca. 4700 cpm (Plasma) bestimmt. Der NSB lag bei 3,5 % (Amnionflüssigkeit) bzw. 3,0 % (Plasma).

Qualitätskriterien:

Die Qualitätskriterien der 17β Östradiolbestimmungen sind sowohl für die Amnionflüssigkeit als auch für das Plasma in Tabelle 4.7 dokumentiert.

Tabelle 4.7 Qualitätskriterien der radioimmunologischen Bestimmung von 17β Östradiol

Substrat	Qualitätskriterien	Konzentration*
Amnionflüssigkeit	Untere Nachweisgrenze	0,01 ng/ml
	Absolute Bindung	37,4 %
	Wiederfindung	93 %
	Interassayvarianz	1 ng/ml 13,9 %
	Intraassayvarianz	18 %
Plasma	Untere Nachweisgrenze	0,01 ng/ml
	Absolute Bindung	24,1 %
	Wiederfindung	93,1 %
	Interassayvarianz	0,1 ng/ml 11,1 %
	Intraassayvarianz	0,9 ng/ml 11,8 %

*Konzentration der Kontrollen, die für die jeweiligen Qualitätskriterien herangezogen wurden

Das verwendete Antiserum gegen E2-6-CMO-RSA war hochspezifisch, die Kreuzreaktivitäten gegenüber strukturell ähnlichen Steroiden (17α Östradiol und Östron) lagen unter 0,5 %.

4.2.4.5 Gesamtöstrogene

In der A. umbilicalis der Föten sowie im peripheren Blutplasma der neugeborenen Ferkel wurden die Konzentrationen an Gesamtöstrogenen bestimmt. Die Plasmaproben von zwei zufällig ausgewählten Föten der 15. Trächtigkeitswoche wurden in jedem Test als biologische Kontrolle mitgeführt. Der Meßbereich der Eichkurve lag zwischen 0,02 – 10 ng/ml

Testparameter:

Bei der Bestimmung der Gesamtöstrogene im Plasma betrug der NSB 4,3 % bei einer GA von ca. 5000 cpm.

Qualitätskriterien:

Die für die Bestimmung der Gesamtöstrogene durchgeführten Qualitätskriterien sind in Tabelle 4.8 festgehalten.

Tabelle 4.8 Qualitätskriterien der Gesamtöstrogenbestimmung

Substrat	Qualitätskriterien	Konzentration*
Plasma	Untere Nachweisgrenze	0,02 ng /ml
	Absolute Bindung	39,6 %
	Wiederfindung	95,0 %
	Interassayvarianz	6,2 ng/ml 10,7 %
	Intraassayvarianz	0,6 ng/ml 3,7 %

*Konzentration der Kontrollen, die für die jeweiligen Qualitätskriterien herangezogen wurden

Kreuzreaktivitäten des Antiserums gegen E1-17-CMO-RSA konnten nur gegen andere Östrogene (17β Östradiol 50 %; 17α Östradiol 14,3 % und Östriol 2,0 %) ermittelt werden (Diplomarbeit Münster 1983).

4.2.4.6 Cortisol

Die Bestimmung von Cortisol erfolgte in den täglichen Blutplasmaproben der Sauen, im fötalen Plasma der A. umbilicalis, im peripheren Plasma der neugeborenen Ferkel sowie in der Amnionflüssigkeit (nach: Janning, 1993; Claus & Weiler, 1996).

Das für die Kontrollen (Konzentration dotiert: 1 – 10 ng/ml) verwendete Plasma wurde zusätzlich eine Stunde mit Eisessig inkubiert, um Cortisol von seinem Bindungsprotein Transcortin zu trennen. Eine Inkubation der Proben mit Eisessig war nicht erforderlich, da in diesem Fall die Lösungsmittelextraktion ausreicht, um das freie Hormon vollständig aus der Probe zu lösen, wohingegen die Kontrollen vollständig hormonfrei sein müssen.

Testparameter:

Für Cortisol lag die GA sowohl für Bestimmungen in der Amnionflüssigkeit, als auch bei den Plasmamessungen bei ca. 7500 cpm. Der NSB betrug 1,7 % (Amnionflüssigkeit) bzw. 3,0 % (Plasma).

Qualitätskriterien:

Die untere Nachweisgrenze, die absolute Bindung, die Wiederfindung sowie der Inter- und Intraassay-Variationskoeffizient der Cortisolmessungen in der Amnionflüssigkeit sowie im Plasma sind in Tabelle 4.9 aufgeführt.

Tabelle 4.9 Qualitätskriterien der Cortisolbestimmungen

Substrat	Qualitätskriterien	Konzentration*
Amnionflüssigkeit	Untere Nachweisgrenze	0,10 ng/ml
	Absolute Bindung	41,6 %
	Wiederfindung	90,3 %
	Interassayvarianz	2 ng/ml 6,8 %
	Intraassayvarianz	2 ng/ml 7,2 %
Plasma	Untere Nachweisgrenze	0,10 ng/ml
	Absolute Bindung	41,0%
	Wiederfindung	90,8 %
	Interassayvarianz	10 ng/ml 10,3 %
	Intraassayvarianz	1 ng/ml 5,0 %

*Konzentration der Kontrollen, die für die jeweiligen Qualitätskriterien herangezogen wurden

Das Antiserum gegen C1-21-HS-RSA reagierte mit den Steroiden Cortison (18,3 %), Corticosteron (11,8 %) und Desoxycorticosteron (9,0 %) kreuz. Allerdings kommen die beiden letztgenannten Steroide nur bei Nagern vor (Brown & Seckl 2005), wodurch ihre gemessene Kreuzreaktivität für physiologische Messungen beim Schwein von geringer Bedeutung ist.

4.2.4.7 Proteohormone

Die Messung der Proteohormone LH und FSH sowie deren Markierung wurden von Dr. A. Wagner durchgeführt. Gemessen wurden LH und FSH im fötalen Plasma der Nabelarterie sowie im peripheren Plasma der Neugeborenen. Bei den Messungen handelte es sich um Direkttests. Die Antiseren (LH: AFP 15103194; FSH: AFP 2062096Rb) wie auch die Proteohormone (LH: AFP 11043B; FSH: AFP 10640B) selbst, stammten von Dr. Parlow (NIDDK, Torrance, CA, USA). Das Antiserum gegen LH konnte mit der Endverdünnung 1:166.000 eingesetzt werden. Für die FSH-Bestimmung erfolgte eine Verdünnung des Antiserums von 1:200.000. Zur analytischen Bestimmung wurden beide Proteohormone mit tritiiertem Jod (J^3) markiert (Salacinsky et al. 1981; Claus et al. 1990). Die Qualität der Markierung wurde mit dem Trichloressigsäure-Talkum-Test (Tower et al. 1980) überprüft. Die Messungen wurden wie in der Dissertation Wagner (2005) im Detail beschrieben durchgeführt.

Testparameter und Qualitätskriterien der FSH Bestimmung:

In Tabelle 4.10 sind GA und NSB sowie die Qualitätskriterien der FSH-Bestimmungen aufgeführt.

Tabelle 4.10 Testparameter und Qualitätskriterien der FSH-Tests

Qualitätskriterien	Kontrollen*	
GA		~ 15.000 cpm
NSB		2,8 %
Untere Nachweisgrenze		0,36 ng/ml
Absolute Bindung		25,4 %
Interassayvarianz	2,01 ng/ml	12,0 %
Intraassayvarianz	0,4 ng/ml	11,0 %

*Konzentration der Kontrollen, die für die jeweiligen Qualitätskriterien herangezogen wurden

Die Kreuzreaktivitäten des FSH-Antiserums wurden der Produktinformation von Dr. Parlow (NIDDK) entnommen. Das Antiserum reagierte lediglich gegen pTSH (AFP 7957A; 6,4 %), pGH (AFP 10864B; 0,04 %), pPRL (AFP 9764B; 0,016 %) sowie LH (AFP 3197A) kreuz.

Testparameter und Qualitätskriterien der LH Bestimmung:

Tabelle 4.11 zeigt die Testparameter NSB und GA sowie die Qualitätskriterien untere Nachweisgrenze, absolute Bindung sowie Inter- und Intraassayvarianz.

Tabelle 4.11 Testparameter und Qualitätskriterien der LH-Tests

Qualitätskriterien	Kontrollen*	
GA		~ 15.000 cpm
NSB		2,8 %
Untere Nachweisgrenze		0,36 ng/ml
Absolute Bindung		25,4 %
Interassayvarianz	0,42 ng/ml	12,0 %
Intraassayvarianz	0,13 ng/ml	11,0 %

*Konzentration der Kontrollen, die für die jeweiligen Qualitätskriterien herangezogen wurden

4.2.5 Enzymimmunologische Bestimmungen im Plasma und in der Amnionflüssigkeit

4.2.5.1 Prinzip und Durchführung des Enzymimmunoassays (EIA)

Im Gegensatz zu den Radioimmunassays erfolgt bei dem enzymimmunologischen Test nach der immunchemischen Reaktion eine photometrische Bestimmung der im Antigen-Antikörper-Komplex gebundenen Enzymaktivität.

Über die Bindungskapazität wurde zunächst die optimale Kombination von Antikörper und Tracer bestimmt. Die Relation zwischen beiden Testparametern soll dabei so eingestellt sein, dass die Extinktion im Bereich von etwa 1,0 liegt, gleichzeitig aber der Antikörper durch den Tracer gesättigt werden kann. Dadurch wird die beim kompetitiven Immunoassay gewünschte Verdrängungsreaktion (Konkurrenz) zwischen Probenhormon und enzymmarkiertem Hormon gewährleistet. Den enzymimmunologischen Tests wurde eine Extraktion vorgeschaltet, um das Hormon anzureichern und störende Plasmabestandteile zu entfernen. Die Extraktion wurde wie unter Kapitel 4.2.1 beschrieben durchgeführt. Die niedergetrockneten Steroide wurden in PBS-Puffer aufgenommen. Durch das Extraktionsvolumen sowie durch die Menge an PBS-Puffer, mit der das niedergetrocknete Steroid aufgenommen wurde, ließen sich die Proben (entsprechend der erwarteten Konzentrationen) in den sensitiven Bereich der Eichkurve legen.

Zur Beschichtung der Mikrotiterplatte (Nunc Maxi Sorp) wurden 100 µl der Arbeitsverdünnung des Antikörpers pro Vertiefung (Kavität, well) bei 4° C über Nacht (mindestens 20 h) inkubiert. Dabei wurden vier Vertiefungen nicht mit Antikörpern beschichtet, sie dienten als Kontrolle der Mikrotiterplattenbeschichtung (NSB) und des Puffers (blank). Die mit Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte wurde mehrmals mit Waschpuffer gewaschen, um freie Antikörper zu entfernen. Um freie Bindungsstellen zwischen den Antikörpern zu blockieren, erfolgte im nächsten Schritt eine Nachbeschichtung der Mikrotiterplatte mit RSA (Ausnahme: 19-Nortestosteron-EIA siehe Kapitel 4.2.3.2). Danach wurden 100 µl der Eichkurve, Kontrollen und Proben im Doppelansatz auf die Platte pipettiert und zusätzlich jeder Kavität 20 µl Tracer hinzugefügt (Ausnahme: blank, dieser enthält weder Tracer noch Antikörper). Der Ansatz wurde dann 75 min im Horizontalschüttler bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte die bound-free Trennung, bei der der ungebundene Tracer vom gebundenen Antikörper-Tracer-Komplex getrennt wurde, durch mehrmaliges Waschen und anschließendem Dekantieren der Mikrotiterplatte. Für die nun folgende Farbreaktion wurden 150 µl Substratlösung (Zusammensetzung: Substratpuffer,

0,6 % TMB-Lösung (Tetramethylbenzidin in Dimethylsulfoxid) und 1 % H_2O_2) in jede Vertiefung pipettiert und 40 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Dabei ruft das Enzym des Tracers am eingesetzten Substrat (H_2O_2) unter Anwesenheit des Farbstoffs (TMB) eine Farbreaktion hervor. Nach der Inkubation wurde die Farbreaktion mit 50 μl 2 M H_2SO_4 abgestoppt und die Extinktion photometrisch bei 450 nm (Referenzfilter 690 nm) bestimmt. Die Qualitätskriterien der enzymimmunologischen Tests wurden wie bereits unter Kapitel 4.2.2 beschrieben durchgeführt.

4.2.5.2 Cortison

Cortison wurde in den täglichen Plasmaproben der Muttersauen eine Woche vor der Fötenentnahme sowie in der Amnionflüssigkeit gemessen. Das verwendete Enzymkonjugat bestand aus Cortison, das an das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt wurde (Cortison-21-Hemisuccinat-HRP). Die Antikörper wurden durch Immunisierung von Kaninchen mit Cortison-21-Hemisuccinat-RSA erzeugt und in einer Endverdünnung von 1:4.000 verwendet. Der Messbereich der Eichkurve lag zwischen 0,05 und 10 ng/ml. Die Durchführung des Cortison-Tests erfolgte wie unter Kapitel 4.2.5.1 beschrieben.

Qualitätskriterien:

In Tabelle 4.12 finden sich die untere Nachweisgrenze, Wiederfindung sowie Inter- und Intraassay- Variationskoeffizienten der Cortisonbestimmungen in der Amnionflüssigkeit und im Plasma.

Tabelle 4.12 Qualitätskriterien der Cortisonbestimmungen

Substrat	Qualitätskriterien	Konzentration*
Amnionflüssigkeit	Untere Nachweisgrenze	0,05 ng/ml
	Wiederfindung	1,0 ng/ml 94,5 %
	Interassayvarianz	2,0 ng/ml 3,5 %
	Intraassayvarianz	0,1 ng/ml 0,9 %
Plasma	Untere Nachweisgrenze	0,05 ng/ml
	Wiederfindung	1,0 ng/ml 85,0 %
	Interassayvarianz	5,0 ng/ml 10,2 %
	Intraassayvarianz	0,1 ng/ml 8,2 %

*Konzentration der Kontrollen, die für die jeweiligen Qualitätskriterien herangezogen wurden

Die Kreuzreaktivitäten des Antiserums (gegen Cortison-21-HS-RSA) gegen strukturell ähnliche Steroide lagen für Cortisol bei 1,9 %, für Corticosteron bei 0,2 %, für Deoxycorticosteron bei 7,9 % und für Progesteron bei 1,9 %.

4.2.5.3 19-Nortestosteron

19-Nortestosteron wurde lediglich in der Amnionflüssigkeit bestimmt (nach Claus et al. 2007a). Als Tracer wurde 19-Nortestosteron verwendet, an das das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gebunden war (19-NT-17-HS-HRP). Das Antiserum (s_A 21.5.04) wurde im Kaninchen gegen 19-NT-17-HS-RSA gebildet. Die Kombination von Antikörper- und Tracerkonzentration wurde in einer Tracertitration bestimmt. Die optimalen Testbedingungen ergaben sich bei einer Antikörperverdünnung von 1:11.000 und einer Tracerkonzentration von 5ng/20µl. Die Eichkurve verlief in einem Messbereich von 0,05 – 10 ng/ml, wobei der empfindliche Ablesebereich zwischen 0,25 und 2 ng/ml lag. Die Durchführung des 19-Nortestosteron-EIAs verlief wie unter Kapitel 4.2.5.1 beschrieben. Die Besonderheit des 19-Nortestosterontests lag in der fehlenden Nachbeschichtung (Absättigung) der Mikrotiterplatte mit Protein. Dadurch wurden hohe, unspezifische Bindungen am Protein vermieden. Durch das im Waschpuffer enthaltene Detergenz TWEEN 20 konnte die Adsorption von Substanzen an der freien Oberfläche der Mikrotiterplatte ausreichend gehemmt werden.

Qualitätskriterien:

Die Qualitätskriterien der 19-Nortestosteronbestimmungen in der Amnionflüssigkeit sind in Tabelle 4.13 aufgeführt.

Tabelle 4.13 Qualitätskriterien der 19-Nortestosterontests

Substrat	Qualitätskriterien	Konzentration*	
Amnionflüssigkeit	Untere Nachweisgrenze		0,6 ng/ml
	Wiederfindung	1,0 ng/ml	87,1 %
	Interassayvarianz	0,5 ng/ml	12,3 %
		2,5 ng/ml	17,6 %
	Intraassayvarianz	1,0 ng/ml	16,8 %

*Konzentration der Kontrollen, die für die jeweiligen Qualitätskriterien herangezogen wurden

Das verwendete Antiserum war hochspezifisch gegen 19-Nortestosteron, es lagen keine Kreuzreaktionen mit strukturell ähnlichen Steroiden (Androstendion, DHEA, 5 α -DHT, 17 β Östradiol, Östron, Testosteron, alle < 0,05 %) vor.

Literaturangaben zufolge beträgt die Kreuzreaktion zwischen 19-Nortestosteron und Norandrostendion 242 % (Haasnoot et al. 1990), d.h., es wird weniger Norandrostendion benötigt um eine 50 %ige Bindung am Antikörper zu erreichen. Allerdings sind die physiologisch vorkommenden 19-Nortestosteronkonzentrationen etwa doppelt so hoch, weshalb 19-Nortestosteron eine bedeutendere Rolle bei physiologischen Messungen zukommt.

4.3 Histologische Grundlagen und immuncytochemische Methoden

4.3.1 Fixierung und Anfertigung der Schnitte

Für die morphologischen und immuncytochemischen Bestimmungen wurden die in 4 % Formaldehyd fixierten Proben (siehe Kapitel 4.1.3 Fötenentnahme) zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 %, 3 x 100 % Ethanol) entwässert. Anschließend wurden sie in flüssigem Paraffin eingebettet (Romeis 1989).

Mit einem Schlittenmikrotom (Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Deutschland) wurden 4 µm dicke Schnitte hergestellt, auf Objektträger gebracht und im Trockenschrank bei 37 °C für 24 Stunden getrocknet.

4.3.2 Färbetechnik

Die Anfärbungen der Schnitte erfolgte wie bei Mentschel et al. (2001) beschrieben. Nach der Entparaffinierung erfolgte die Demaskierung der Antigene im Mikrowellenofen durch mehrfaches Aufkochen der Gewebeschnitte in Citratpuffer (pH 6,0), um die Sensibilität der Antikörper zu erhöhen (Pellicer & Sundblad, 1994). Anschließend wurde mittels eines aqua bidest/H₂O₂-Gemischs die endogene Peroxidaseaktivität blockiert. Nach dem Blockieren der unspezifischen Bindungen wurde der Primärantikörper aufgetragen und inkubiert (Übersicht der verwendeten Antikörper und Blockseren siehe Tabelle 4.14). Der biotinylierte Sekundärantikörper sowie ein Avidin-Biotin (AB) Komplex (StreptABComplex/HRP, Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark) wurden inkubiert. Als Chromogen diente DAB (3,3-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid; Fluka, Deutschland), das als Substrat für die Peroxidase fungierte. Die Gewebeschnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt.

Als Negativkontrolle dienten jeweils Gewebeschnitte von murenen Eberhoden, bei denen die Inkubation mit dem ersten Antikörper wegfiel. Um die Spezifität des Primärantikörpers zu überprüfen, wurden auf einen Objektträger zwei Schnitte gezogen, wobei der eine Schnitt mit Präimmunserum bzw. IgG und der andere Schnitt mit dem spezifischen Primärantikörper inkubiert wurde.

4.3.3 Übersicht der verwendeten Antikörper

Die immuncytochemischen Färbungen zur Erfassung des Glucocorticoidrezeptors (Wagner & Claus 2004) und des Androgenrezeptors, der Enzyme Aromatase (Haeussler et al. 2007) und 11β-Hydroxysteroid Dehydrogenase 2 (11β-HSD 2; Claus et al. 2007b) sowie der Transkriptionsfaktoren GATA-4 (Mc Coard et al. 2001) und Mitose (Ki-67; Mentschel et al.

2001) wurden nach dem in Kapitel 4.3.2 vorgestellten Färbeschema durchgeführt. Das Färbeprotokoll wurde den jeweiligen Eigenschaften des Primärantikörpers angepasst (siehe Tabelle 4.14).

Tabelle 4.14 Übersicht der verwendeten Antikörper sowie der Blockseren

1. Antikörper (Verdünnung)	Eigenschaften	Bezug	Blockserum (1:10)	2. Antikörper (1:400)
<u>Rezeptoren</u>				
GCR (1:1000)	polyklonal Kaninchen	Institut für Tierhaltung	Schaf-Serum	Schaf-gegen- Kaninchen ¹
AR (1:1000)	polyklonal Kaninchen		Schaf-Serum	Schaf-gegen- Kaninchen ¹
<u>Enzyme</u>				
Aromatase (1:1000)	polyklonal Kaninchen	Dr. Harada FHU, Japan	Schaf-Serum	Schaf-gegen- Kaninchen ¹
11β-HSD 2 (1:1000)	polyklonal Kaninchen	Institut für Tierhaltung	Schaf-Serum	Schaf-gegen- Kaninchen ¹
<u>Transkriptionsfaktoren</u>				
GATA-4 (1:200)	polyklonal Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	Kaninchen- Serum	Kaninchen- gegen-Ziege ²
Ki-67 (MIB-1) (1:4)	monoklonal Maus	Histoprime® Linaris, Wertheim- Bettingen	Ziegen-Serum	Ziege-gegen- Maus ³

¹Schaf-gegen-Kaninchen IgG, biotinyliert, Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark

²Kaninchen-gegen-Ziege IgG, biotinyliert, Biozol, Eching, Deutschland

³Ziege-gegen-Maus IgG, biotinyliert, Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark

4.3.4 Apoptose-Nachweis

Der Apoptose-Nachweis wurde mit Hilfe der sogenannten TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated 2`deoxyuridine 5` triphosphate (dUTP) nick end labelling) – Färbung in Anlehnung an Gravrieli et al. (1992) durchgeführt.

Die Proben wurden nach der unter Kapitel 4.3.2 beschriebenen Methode zunächst entparaffiniert und rehydriert. Durch 10 minütige Inkubation der Gewebeschnitte mit Proteinkinase wurden die Proben demaskiert und anschließend 10 min mit TdT – Puffer benetzt. Im Folgenden wurde ein Gemisch aus TdT und Biotin-dUTP 60 min bei 37°C inkubiert. Nach dem Abspülen der Schnitte mit TB-Puffer (NaCl/Citrat-Puffer) wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit 3 % RSA blockiert. Der Streptavidin/Biotin-Peroxidase Komplex wurde nach der Vorschrift verdünnt, auf die Schnitte aufgetragen und 30 min inkubiert. Die Farbentwicklung und die Eindeckung der Schnitte erfolgte wie bereits unter Kapitel 4.3.2 beschrieben. Als Positivkontrolle dienten Schnitte vom Eber, die mit DNase behandelt wurden. Dieser Behandlungsschritt führt zur Spaltung der DNA in sämtlichen Zellen und bewirkt eine intensive Färbung aller Zellkerne. Bei der Negativkontrolle (Fötenschnitte) wurde keine Behandlung mit terminaler Transferase durchgeführt.

4.3.5 Auswertung gefärbter Schnitte

Aus jedem Trächtigkeitsstadium wurden 6 männliche und 6 weibliche Föten ausgewertet. Neonatal konnten je Geschlecht 4 Proben untersucht werden. Die Gonaden wurden zunächst anhand morphologischer Parameter charakterisiert.

Zur Bestimmung der Hodengewichte wurden deren Länge und Breite festgehalten und anschließend das Gewicht berechnet (Volumen eines Ellipsoids: $V = 4/3 \pi abc$).

Die Anzahl der Keimzellen pro Tubulus sowie die Anzahl der Sertolizellen pro Tubulus (s. GATA-4 Färbung) wurden mikroskopisch (Leitz DM RBE; Leica Mikrosysteme GmbH, Bensheim, Deutschland) bei 400facher Vergrößerung bestimmt. Die Zellen wurden bei jeweils 10 Tubuli pro Schnitt erfasst. Die Bestimmung der Leydigzellzahl pro mm² erfolgte mittels Neubauerzählkammer. Die Zellzahlen wurden auf Grund ihrer unterschiedlichen Kerndurchmesser nach der Methode von Abercrombie (1946) korrigiert. Hierzu wurde bei den runden Kernen der Keimzellen und Leydigzellen der Kerndurchmesser gemessen, bei den ovalen Sertolizellen wurde der Durchmesser aus dem Mittelwert der Länge und der Breite des Kerns gebildet (Lino 1971). Neben der Zellkerngröße wurde bei der Korrektur auch die Schnittdicke berücksichtigt. Für die Korrektur wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Korrigierte Zellzahl} = \frac{\text{Anzahl positiver Zellen} \times \text{Schnittdicke}}{\text{Zellkerndurchmesser} + \text{Schnittdicke}}$$

Zusätzlich wurde der prozentuale Anteil an Tubuli und Interstitium pro mm² planimetrisch bestimmt (OTT-Planimeter, A.OTT, Kempten, Bayern).

Ovarien

Bei den fötalen Ovarien konnten drei Entwicklungsstadien unterschieden werden: Keimballen, Primordialfollikel und Primärfollikel. Die Keimballen (bestehend aus mehreren Ovogonien) befinden sich in der äußersten Randzone des Ovars. Weiter innen in Richtung Mark bilden sich die Primordialfollikel. Sie bestehen aus Ovozyten, die von abgeflachten, einzelnen Follikelepithelzellen umgeben sind. Ein weiteres Entwicklungsstadium sind die Primärfollikel. Sie sind erst ab der 13. Woche zu erkennen und unterscheiden sich von den Primordialfollikeln durch ein zusammenhängendes Follikelepithel. Der prozentuale Anteil der Keimballen, der Primordial- und Primärfollikel wurde planimetrisch bestimmt. Daneben wurden die Anzahl der Keimballen und die Anzahl der einzelnen Ovozyten-Stadien (Primordialfollikel und Primärfollikel) pro mm² ausgewertet. Zusätzlich wurde die Dicke der ovariellen Rindenschicht, in der die Follikulogenese stattfindet abgemessen.

4.4 Molekularbiologische Methoden

4.4.1 Isolierung von RNA aus fötalem Gewebe

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um Degradierungen der RNA zu vermeiden. Die Isolation der RNA aus fötalen Gonaden und Muskeln erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin[®] RNA II Kit von Machery & Nagel. 350 µl Lyse-Puffer und 3,5 µl Mercaptoethanol wurden in 2 ml Fast Prep[®] Tubes vorgelegt. Die Fast Prep[®] Tubes waren mit 0,1 g Matrix Green[®] Kügelchen vorbereitet. Die bei der Probennahme in RNA-Later (Zusammensetzung siehe Kapitel 4.1.3) sichergestellten Gewebe wurden aufgetaut. Das Gewebe (mindestens 20 mg) wurde direkt in die Röhrchen eingewogen und anschließend mit Hilfe des Fast Prep[®] Homogenisators (FP120, Q.Biogene, Illkirch, Frankreich) 30 Sekunden bei einer Einstellung von 6,0 homogenisiert.

Danach wurden 350 µl 70 % Ethanol in jedes Röhrchen pipettiert und gründlich durchmischt. Das Lysat wurde in eine NucleoSpin[®] RNA II Säule mit der maximalen Ladekapazität von 750 µl überführt, 30 Sekunden bei 9100 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. War das Volumen des Lysats größer als 750 µl, konnte die Säule mit dem restlichen Lysat beladen und der vorangegangene Zentrifugationsschritt wiederholt werden. Nach Zugabe von 350 µl Entsalzungspuffer wurde die Membran der Säule durch einminütige Zentrifugation

bei 10600 rpm getrocknet. Im folgenden DNase-Verdau wurden 95 μl DNase + Puffer (1:10) direkt im Zentrum der Membran platziert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Im darauf folgenden ersten Waschschrift wurde mit 200 μl Waschpuffer (RA2) die DNase inaktiviert und die Membran der Säule durch zentrifugieren bei 9100 rpm (30 Sekunden) getrocknet. Der zweite und dritte Waschschrift erfolgte mit demselben Waschpuffer (RA3) und diente dem weiteren Aufreinigen der RNA. Um die Membran vollständig zu trocknen, wurde nach dem letzten Waschschrift 2 min bei 10600 rpm zentrifugiert. Das Eluieren der RNA erfolgte gewebespezifisch mit unterschiedlichen Mengen an DEPC-H₂O. Die RNA der fötalen Gonaden wurde mit jeweils 60 μl DEPC-H₂O eluiert, die der fötalen Muskeln mit 40 μl DEPC-H₂O, da hier eine geringere Ausbeute zu erwarten war. Die extrahierte mRNA wurde bei -80 °C gelagert.

4.4.2 Quantifizierung der RNA

Die Überprüfung der Qualität und die Quantifizierung der RNA erfolgte mit Hilfe eines BioPhotometers[®] (Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland). Hierzu wurde die RNA mit RNase freiem H₂O 1:35 verdünnt und die Extinktion bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ und $\lambda = 280 \text{ nm}$ gemessen.

Bei der optischen Dichte (OD) von 260 nm (Absorptionsmaximum von Nucleinsäuren) erfolgte die Bestimmung der RNA Konzentration. Aus dem Verhältnis der OD bei 260 nm und der OD bei 280 nm erhält man eine Aussage über die Proteinkontaminationen in der Lösung, der Wert sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

4.4.3 cDNA Synthese (reverse transcription)

Es wurde eine konstante Menge an RNA (1000 ng) zur cDNA Synthese eingesetzt und durch Zugabe von DEPC-H₂O auf ein Volumen von 15 μl gebracht. Um die Sekundärstrukturen aufzulösen wurden die Proben 3 Minuten bei 70 °C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gelagert, um die Rückbildung der Sekundärstruktur zu verhindern. Pro Ansatz wurde ein Mastermix aus folgenden Reagenzien zupipettiert: RT-Reaktionspuffer (5x), 50 μM Hexamere, 10mM dNTPs, 200U Reverse Transkriptase (Promega) und mit DEPC-H₂O auf ein Endvolumen von 50 μl gebracht. Zunächst erfolgte die cDNA Synthese im Thermocycler (Mastercycler gradient, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei 30°C (5 min), die darauf folgende 45 minütige RT -Reaktion bei 42°C, wurde anschließend durch zweiminütiges Erhitzen auf 90°C abgestoppt. Als Negativkontrolle wurde anstatt RNA H₂O pipettiert, als weitere Kontrolle diente ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase (RT-). Die cDNA wurde

mittels einer Standard-PCR für das Housekeeping Gen GAPDH und anschließender Gelelektrophorese überprüft. Die cDNA wurde bei -20°C bis zur quantitativen Auswertung gelagert.

4.4.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Das Prinzip der Polymerase Kettenreaktion (PCR) beruht auf der Amplifizierung einer DNA-Vorlage (template) mit Hilfe der hitzestabilen taq-Polymerase, wobei ein Zyklus von drei Reaktionsschritten bis zu 40mal durchlaufen wird (siehe Tabelle 4.15).

Bei der PCR werden Primer (DNA-Oligonukleotide) verwendet, die an die template-DNA hybridisieren. Somit kann durch die Wahl der Primerpaare gezielt eine bestimmte Sequenz auf der DNA vervielfältigt werden.

Das entscheidende Prinzip der PCR ist die zielgerichtete Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte, wodurch die Ausgangs-DNA exponentiell amplifiziert wird. Ein PCR-Zyklus beginnt mit der thermischen Denaturierung des DNA-Doppelstrangs bei 95°C. Danach erfolgt die Primer-Hybridisierung an die einzelsträngige DNA. Die Annealingtemperatur ist je nach Primer unterschiedlich, für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primerpaare ist sie in Tabelle 4.16 aufgeführt. Die nun folgende Elongation, also die Amplifikation des zwischen den Primern liegenden Sequenzabschnittes erfolgt bei 72°C. Für diesen Schritt wird eine hitzebeständige Polymerase (hot star taq, benötigt eine längere initiale Denaturierungsphase) benötigt. Die einzelnen Schritte der PCR sind in Tabelle 4.15 im Detail aufgeführt.

Tabelle 4.15 Reaktionsschritte der PCR

	Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1.	Initiale Denaturierung	95 °C	15 min	1
2.	Denaturierung	95 °C	15 sec	25 - 40
3.	Annealing	58 °C - 62 °C (primerspez.)	20 sec	
4.	Elongation	72 °C	30 sec	
	Abkühlen	4 °C – 8 °C	bis zur Analyse	

In Tabelle 4.16 sind die Primerpaare aufgeführt, die bei der quantitativen real-time PCR verwendet wurden.

Tabelle 4.16 Sequenzen der verwendeten Primerpaare, deren Größe und Annealingtemperatur

Name	Primer	Sequenz	Größe	Annealing-temperatur	Bezug
18s	for rev	5'-AAG TCT TTG GGT TCC GGG-3' 5'-GGA CAT CTA AGG GCA TCA CA-3'	365 bp	60 °C	AF 176811
Ubiquitin	for rev	5'-AGA TCC AGG ATA AGG AAG GCA T-3' 5'-GCT CCA CCT CCA GGG TGA T-3'	198 bp	60 °C	Z18245
GAPDH	for rev	5'-GTC TTC ACT ACC ATG GAG AAG G-3' 5'-TCA TGG ATG ACC TTG GCC AG-3'	197 bp	60 °C	U85042/ U94889
AR	for rev	5'-ATT GTC CAT CTT GTC GCC TC-3' 5'-CTG GCT CAA TGG CTT CTA GG-3'	219 bp	60 °C	AF 336151
Aromatase	for rev	5'-CTC GAG TTT TTC CCC AAG C-3' 5'-ACT GGC CTT GCT GTG TTT G-3'	190 bp	62 °C	SSU 92246
GCR	for rev	5'-AAT GGG CAA AGG CAA TAC C-3' 5'-GGA GCA AAA CAC AGC AAG C-3'	148 bp	60 °C	AF 141371

4.4.5 Quantitative real time PCR

Mit Hilfe der PCR wird ein kurzer genau definierter Teil eines DNA-Stranges vervielfältigt, wobei die real-time PCR zusätzlich zur herkömmlichen PCR die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Während der real-time PCR wird in die Doppelstränge der DNA ein Fluoreszenzfarbstoff (SYBR®-Green, Qiagen, Deutschland) eingelagert. Die Fluoreszenz nimmt daher mit der Menge der gebildeten PCR-Produkte zu, sie wird während aller drei Reaktionsschritte dokumentiert. Die Fluoreszenzwerte werden dabei graphisch dargestellt, worauf die Quantifizierung beruht. Durch den Farbstoff, aber auch durch die Reaktionsgefäße kommt es zu einer gewissen Grundfluoreszenz, dieser Bereich wird als Baseline bezeichnet (siehe Abbildung 4.3). Mit Hilfe des Schwellenwertes (Threshold) wird der Punkt definiert, bei der sich das Fluoreszenzsignal von der Hintergrundfluoreszenz unterscheidet. Der Punkt auf der x-Achse, an dem der Schwellenwert die Fluoreszenzkurve der Probe schneidet, wird als Ct-Wert (Cycle-Threshold) bezeichnet. Der Ct-Wert ist demzufolge die Zyklenzahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal deutlich vom Hintergrund abgrenzt. Ist der Ct-Wert niedrig, so ist die DNA Menge hoch und umgekehrt ist bei einem hohen Ct-Wert die DNA Menge niedrig (geringe Fluoreszenz -> wenig Farbstoff -> wenig DNA).

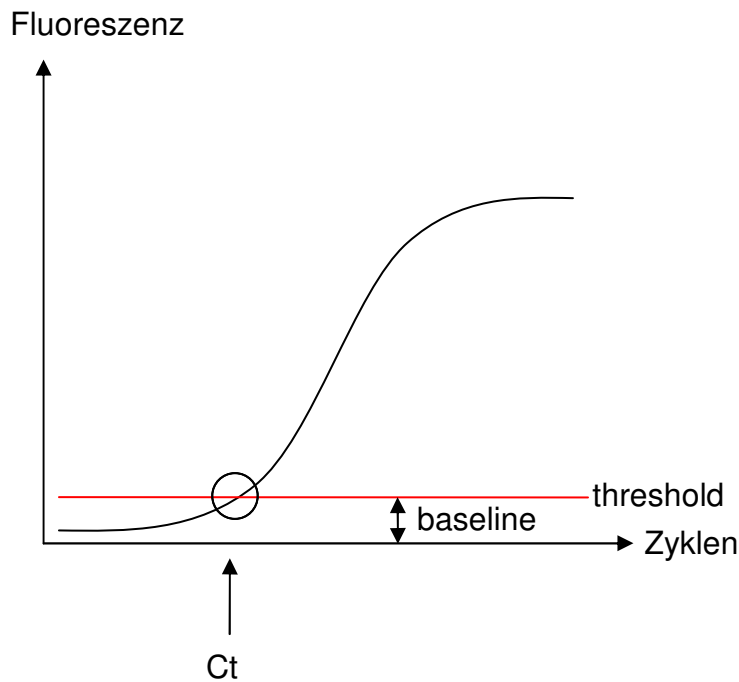


Abbildung 4.3 Fluoreszenzbestimmung bei der quantitativen real-time PCR (vereinfachte, schematische Darstellung)

Als Kontrolle wurden neben der RT- (Kontrolle bei der cDNA Synthese) noch eine Non Template Control (NTC) bei der real-time PCR mitgeführt. Bei der NTC wurde das template (Probe) durch H₂O ersetzt.

4.4.5.1 Analyse der quantitativen real-time PCR

Schmelzkurvenanalyse:

Um Kontaminationen sowie die Bildung von Primer-Dimeren auszuschließen, wird im Rahmen der real-time PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dazu wird direkt im Anschluß an die real-time PCR die Temperatur kontinuierlich erhöht und dabei die Fluoreszenz gemessen. Mit steigender Temperatur trennen sich die DNA Doppelstränge und verlieren den SYBR Green Farbstoff, wodurch die Fluoreszenzaktivität abnimmt. Je nach Länge des Produktes entsteht ein spezifischer Schmelzkurvenverlauf.

Gelelektrophorese:

Die Analyse der angesetzten PCR Reaktion erfolgt mit Hilfe eines 1,5 %igem Agarosegel. Das Prinzip der Gelelektrophorese beruht auf der Wanderung eines zu trennenden Molekülgemisches unter Einfluß eines elektrischen Feldes durch ein Agarosegel, welches in

einer ionischen Pufferlösung liegt. Je nach Größe und Ladung der Moleküle bewegen sich diese unterschiedlich schnell durch das als Molekularsieb wirkende Gel. Dabei wandern kleine, negativ geladene Moleküle (Anionen) am schnellsten in Richtung der positiv geladenen Anode und positiv geladene Moleküle (Kationen) in Richtung der negativ geladenen Kathode.

Da Agarosegele relativ großporig sind, eignen sie sich gut zur Trennung von DNA. Die Agarose wurde in 1x TBE-Puffer durch mehrmaliges vorsichtiges Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach anschließendem Abkühlen auf ca. 60 °C wurden 0,1 µl Ethidiumbromid / ml Agarosegel zugegeben und das flüssige Gel in eine horizontale Gelkammer mit bereits eingesetztem Probenaschenkamm gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde der Schlitten in die Elektrophoresekammer gesetzt und mit 1x TBE-Puffer (Elektrophoresepuffer) bedeckt.

Die Proben wurden mit etwa einem Fünftel des Volumens an 10x DNA-Ladepuffer versetzt und davon 7 µl in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Zusätzlich wurde 2 µl DNA Ladder (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) als Größenstandard mitgeführt, die ebenfalls mit DNA-Ladepuffer versetzt wurde. Bei einer konstanten Spannung von 10 bis 12 V / cm wurden die Proben innerhalb von etwa 30 min elektrophoretisch getrennt.

4.4.6 Relative Quantifizierung

Um die Varianz der Expressionsergebnisse zu reduzieren, wurde die Expression der Zielgene (AR, GCR, Aromatase) auf die Expression des Housekeeping Gens GAPDH bezogen (Normalisierung der Expressionsergebnisse nach Rasmussen 2001). GAPDH kommt ubiquitär und in einer konstanten Menge in den verwendeten Zellen vor und dient somit als Bezugsbasis für die Zielgene. Zunächst wurde die Normalverteilung, d.h. die konstante Expression von GAPDH in allen Proben mittels Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft. Die Berechnung der relativen Expression erfolgte nach der $\Delta\Delta$ Ct Methode in Anlehnung an Livak & Schmittgen (2001), nach folgender Formel:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{GAPDH}}$$
$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{(Kontrolle - Behandlung)}}$$

Dabei wurde die Effizienz der zu untersuchenden Faktoren mit berücksichtigt (siehe Kapitel 4.4.7 Effizienzberechnung), was zu einem genaueren Ergebnis führte.

Bei der Berechnung wurde im ersten Schritt für jede untersuchte Probe der Ct Wert des Referenzgens (GAPDH) vom Ct Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert. Im folgenden Schritt wurden die Proben der einzelnen Trächtigkeitsstadien im Verhältnis zur 6. Trächtigkeitswoche berechnet, wobei diese gleich Null (Ausgangs- bzw. Kontrollprobe) gesetzt werden.

4.4.7 Effizienzberechnung

Durch die Berücksichtigung der Effizienz der untersuchten Faktoren wurde die real-time PCR weiter optimiert. Die Effizienz bewegt sich normalerweise zwischen 1,7 und 1,9. Zur Berechnung wurde eine Standardkurve aus unterschiedlichen Verdünnungsstufen (20 ng; 4 ng; 0,8 ng; 0,016 ng; 0,0032 ng) im dreifach Ansatz erstellt. Die Verdünnungsreihe wurde aus einer cDNA Pool-Probe erstellt, die aus allen zu untersuchenden cDNA-Proben eines Gewebes zusammengesetzt waren.

Über die Steigung wurde mit Hilfe der folgenden Formel die Effizienz berechnet:

$$E = 10^{-1/\text{Steigung}}$$

4.5 Statistische Auswertung

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (MW \pm SEM) angegeben. Die Mittelwerte der Daten wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS (Version 11, SPSS, Chicago, IL, USA) auf Signifikanzen geprüft.

Die Daten wurden zunächst mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf ihre Normalverteilung getestet. Waren die Daten nicht normalverteilt, wurden sie logarithmisch transformiert.

Die statistische Auswertung der Steroide der fötalen Nabelarterie innerhalb des gleichen Geschlechts, sowie die Auswertung der morphologischen Parameter erfolgten mittels einfaktorier Varianzanalyse (ANOVA). Der Vergleich zwischen den Geschlechtern erfolgte gruppenspezifisch mit dem t-Test für ungepaarte Stichproben.

Berechnungen von Korrelationen zwischen einzelnen Parametern wurden ebenfalls mit Hilfe des Programms SPSS durchgeführt.

Zur Prüfung der Signifikanzen wurden folgende Wahrscheinlichkeiten zugrunde gelegt:

- p > 0,05: nicht signifikant
- p \leq 0,05: signifikant (*)
- p \leq 0,01: hoch signifikant (**)
- p \leq 0,001: höchst signifikant (***)

5 Ergebnisse

5.1 Fötenparameter

5.1.1 Übersicht Fötalgewichte

Während der Fötenentnahme wurden die Fötendaten (Geschlecht, Lage im Uterus, Gewicht, Scheitel-Steiß-Länge) festgehalten. Dabei konnten sehr starke Schwankungen bei der Größe und den Gewichten der Föten innerhalb der einzelnen Entwicklungsstadien, aber auch innerhalb der einzelnen Sauen festgestellt werden. Neben den mittleren Fötalgewichten innerhalb der einzelnen Würfe, ist in Tabelle 5.1 die Spanne der Fötengewichte (Minimum – Maximum) innerhalb der einzelnen Sauen in den untersuchten Trächtigkeitswochen dargestellt.

Tabelle 5.1 Mittelwerte (MW \pm SEM) sowie Minimum und Maximum der Fötengewichte (g) innerhalb der einzelnen Würfe in der 6., 10., 13. und 15. Trächtigkeitswoche

6. Woche	Quinta	Quitte	Trüffel	Tiffy
MW \pm SEM	12,8 \pm 0,1	13,8 \pm 0,2	18,7 \pm 0,4	11,0 \pm 0,1
min - max	12,4 - 13,1	11,9 – 15,0	15,7 - 21,2	10,1 - 11,7

10. Woche	Pasta	Paella	Toska	Thea
MW \pm SEM	292,0 \pm 16,7	281,1 \pm 13,2	190,8 \pm 15,8	324,9 \pm 5,9
min - max	165 - 375	109 - 345	148 - 248	292 - 340

13. Woche	Otilie	Ornella	Paprika	Parma
MW \pm SEM	561,7 \pm 40,0	636,3 \pm 37,4	669,2 \pm 11,3	795,3 \pm 29,5
min - max	312 - 779	456 - 803	615 - 730	633 - 982

15. Woche	Odette	Olivia	Quirina	Qualle
MW \pm SEM	991,4 \pm 56,7	1230,0 \pm 87,1	1149,3 \pm 51,8	1177,3 \pm 36,7
min - max	526 - 1088	1018 - 1357	839 - 1406	998 - 1295

Die Gewichte der Föten innerhalb eines Wurfes wichen teilweise um fast 50 % voneinander ab (Beispiel Odette: leichtester Fötus: 526 g, schwerster Fötus: 1088 g).

Bereits in der 6. Trächtigkeitswoche begann ein „Auseinanderdriften“ der Fötalgewichte, das sich mit zunehmender Trächtigkeit immer stärker ausprägte.

In Abbildung 5.1 sind die Gewichte der Föten aus den jeweiligen Trächtigkeitsstadien zusammengefasst, gleichzeitig wird über den Standardfehler die Streuung der Gewichte verdeutlicht.

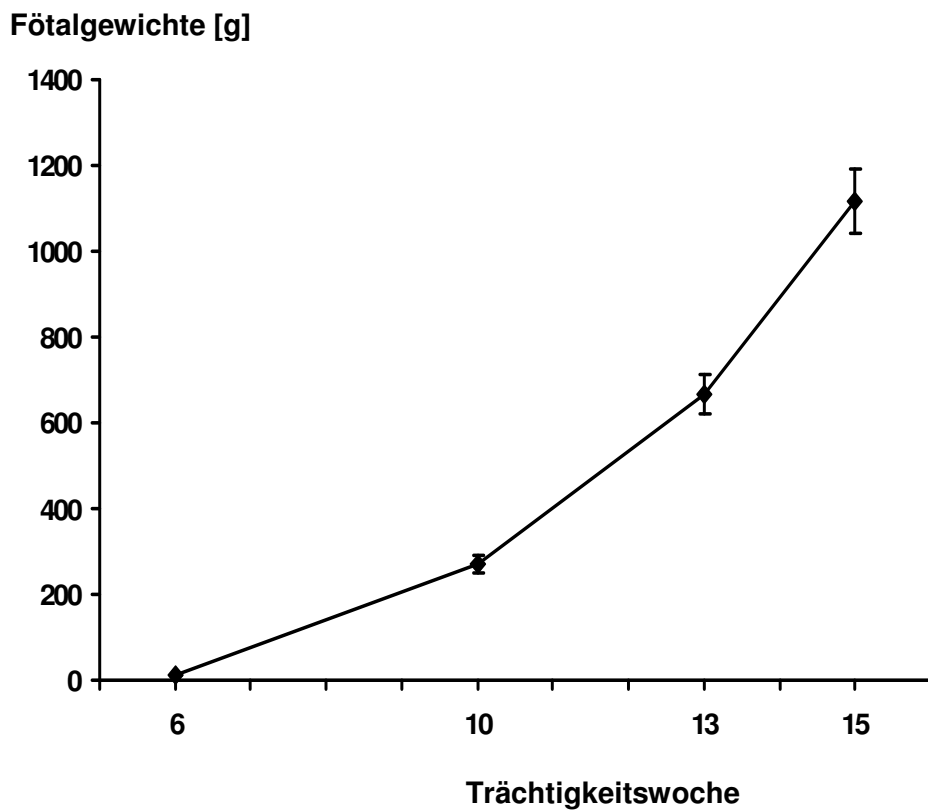


Abbildung 5.1 Fötalgewichte in den untersuchten Trächtigkeitsstadien (MW ± SEM)

Zwischen den Fötengewichten und der Lage der Föten im Uterus sowie dem Geschlecht konnte kein Zusammenhang festgestellt werden.

5.1.2 Geschlechtsverhältnis

Es wurden insgesamt 158 Föten entnommen, davon waren 78 der Föten männlich und 80 weiblich. Das Verhältnis männlicher zu weiblicher Föten war innerhalb der untersuchten Trächtigtkeitswochen homogen, jedoch nicht innerhalb der einzelnen Würfe (siehe Tabelle 5.2).

Tabelle 5.2 Anzahl männlicher und weiblicher Föten innerhalb der einzelnen Sauen in den untersuchten Trächtigtkeitsstadien

	Trächtigtkeitswoche			
	6. (m/w)	10. (m/w)	13. (m/w)	15. (m/w)
Sau				
I	2/6	4/7	4/6	4/6
II	8/7	10/8	8/2	1/2
III	7/4	3/3	3/6	7/3
IV	6/6	6/1	3/8	4/3
Gesamt	23/23	23/19	18/22	16/14

m: männlich; w: weiblich

5.1.3 Lage der Föten im Uterus

Die Lage der Föten im Uterus wurde durch Abtasten während der Fötenentnahme festgehalten. Bereits in der frühen Embryonalentwicklung werden die Embryonen gleichmäßig auf beide Uterushörner verteilt. Die Verteilung der Föten war in dieser Studie homogen, der Unterschied zwischen den Uterushörnern lag im Einzelfall lediglich bei einem Fötus.

5.2 Steroide im maternalen Plasma

5.2.1 Progesteron und 17 β Östradiol

Im maternalen Blutplasma wurden Progesteron und 17 β Östradiol jeweils eine Woche vor den Fötenentnahmen täglich gemessen. Die Probennahmen fanden folglich bereits in der 5., der 9., der 12. und der 14. Trächtigtkeitswoche statt und dauerten entsprechend bis zur

Fötenentnahme in der 6., 10., 13. und 15. Trächtigtkeitswoche. Somit ergaben sich die in Abbildung 5.2 dargestellten Verlaufskurven der beiden Parameter.

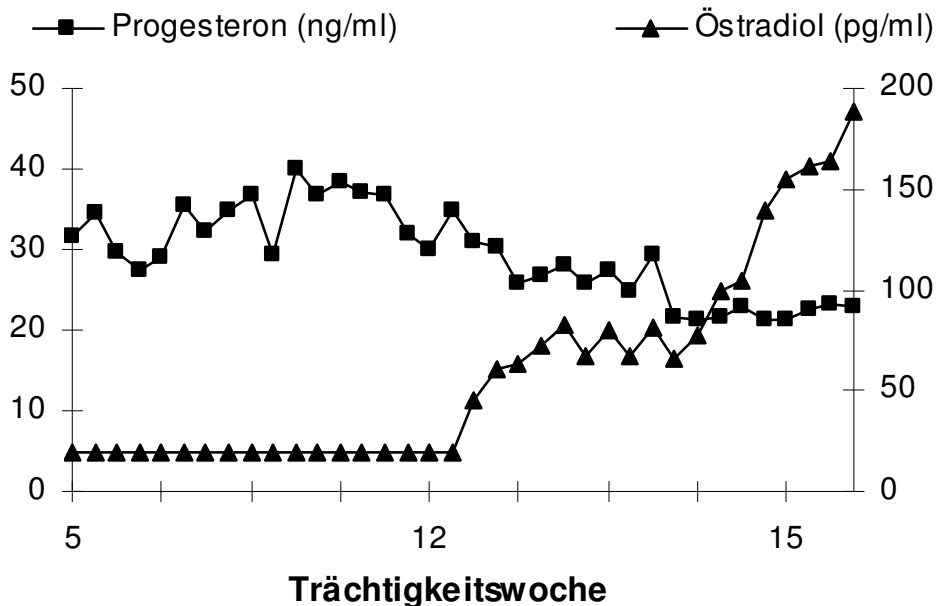


Abbildung 5.2 Progesteron (ng/ml) und 17 β Östradiol (pg/ml) im maternalen Plasma im Verlauf der Gravidität

Die 17 β Östradiolkonzentrationen im peripheren Plasma der Sauen lagen bis zur 12. Woche unter der Nachweisgrenze (20 pg/ml). Danach stiegen sie auf 45 pg/ml an. In der 15. Woche erfolgte ein signifikanter Anstieg auf 132,0 pg/ml ($p \leq 0,001$).

Progesteron war zwischen der 5. und der 10. Trächtigtkeitswoche mit durchschnittlich $33,7 \pm 0,84$ ng/ml auf konstant hohem Niveau. Danach zeigten die Progesteronkonzentrationen einen signifikanten Rückgang auf $27,7 \pm 0,67$ ng/ml ($p \leq 0,05$).

5.2.2 Glucocorticoide

Im peripheren Plasma der tragenden Sauen wurden eine Woche vor der Fötenentnahme täglich Cortisol und Cortison bestimmt, sie sind in Tabelle 5.3 dargestellt.

Tabelle 5.3 Cortisol- und Cortisonkonzentrationen (ng/ml) im maternalen Blutplasma im Verlauf der Gravidität (MW \pm SEM)

	Trächtigungswoche			
	6.	10.	13.	15.
Cortison	7,3 \pm 0,2	9,9 \pm 0,4	5,6 \pm 0,2	5,4 \pm 0,2
Cortisol	17,2 \pm 1,9	21,4 \pm 2,8	18,1 \pm 1,4	22,6 \pm 1,2

Die Cortisolkonzentrationen im maternalen Plasma lagen im Verlauf der Trächtigkeit durchschnittlich bei 19,82 \pm 1,82 ng/ml. Es konnte kein Einfluß der Trächtigungsstadien auf die Cortisolkonzentrationen festgestellt werden.

Die Cortisonwerte waren im Durchschnitt in allen untersuchten Stadien um Faktor 3 niedriger als die des Cortisols (Mittelwert der Cortisonkonzentrationen: 6,90 \pm 0,58 ng/ml). Auch hier konnte kein Einfluß der Trächtigungsstadien auf die Konzentrationen festgestellt werden.

5.3 Steroide in der Amnionflüssigkeit

In den untersuchten Trächtigungsstadien wurden bei männlichen und weiblichen Föten Nortestosteron, 17 β Östradiol, Progesteron und Testosteron in der Amnionflüssigkeit gemessen. In Tabelle 5.4 sind die Konzentrationen der Steroide in der Amnionflüssigkeit dargestellt.

Tabelle 5.4 Progesteron, 17 β Östradiol, Testosteron und 19-Nortestosteron in der Amnionflüssigkeit männlicher und weiblicher Föten in der 6., 10., 13. und 15. Trächtigkeitswoche (MW \pm SEM)

Steroide (ng/ml)	Trächtigkeitswoche				
		6.	10.	13.	15.
Progesteron	m	6,63 \pm 0,38 ^a	8,92 \pm 0,39 ^b	8,74 \pm 1,41 ^{a,b,c}	4,69 \pm 0,82 ^d
	w	7,07 \pm 0,36 ^{a,b}	8,29 \pm 0,52 ^a	8,38 \pm 1,34 ^{a,b}	6,07 \pm 1,04 ^b
17 β Östradiol	m	0,06 \pm 0,01 ^a	0,21 \pm 0,04 ^b	1,10 \pm 0,45 ^c	4,61 \pm 1,14 ^d
	w	0,07 \pm 0,01 ^a	0,34 \pm 0,13 ^b	0,89 \pm 0,27 ^c	5,08 \pm 1,18 ^d
Testosteron	m	0,15 \pm 0,01 ^a	0,07 \pm 0,00 ^b	0,08 \pm 0,01 ^b	0,09 \pm 0,01 ^b
	w	0,04 \pm 0,00	0,05 \pm 0,00	0,09 \pm 0,02	0,09 \pm 0,01
Nortestosteron	m	0,17 \pm 0,04 ^a	0,25 \pm 0,03 ^b	0,30 \pm 0,07 ^b	0,43 \pm 0,17 ^b
	w	0,15 \pm 0,04 ^a	0,26 \pm 0,03 ^b	0,31 \pm 0,04 ^b	0,50 \pm 0,14 ^b

m: männlich; w: weiblich

Ungleiche Buchstaben in den Zeilen weisen auf signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Stadien hin.

Mit Ausnahme von Testosteron, das in der 6. Woche bei männlichen Föten gegenüber den Konzentrationen in der Amnionflüssigkeit weiblicher Föten deutlich höher war ($p \leq 0,01$), konnte kein Unterschied zwischen den Steroidkonzentrationen männlicher und weiblicher Föten festgestellt werden. Allerdings gab es in Bezug auf die Trächtigkeitswochen deutliche Unterschiede.

Die Progesteronkonzentrationen in der Amnionflüssigkeit männlicher Föten waren in der 15. Trächtigkeitswoche gegenüber allen voraus gegangenen Wochen niedriger ($p \leq 0,001$). Bei den weiblichen Föten waren sie in der 15. Trächtigkeitswoche lediglich gegenüber der 10. Woche geringer.

17 β Östradiol stieg im Verlauf der untersuchten Trächtigkeitsstadien in der Amnionflüssigkeit männlicher und weiblicher Föten stetig an.

In der Amnionflüssigkeit männlicher Föten waren die Testosteronkonzentrationen in der 6. Trächtigkeitswoche am höchsten. Danach erfolgte ein Rückgang um ca. 50 %. Die Konzentrationen blieben mit durchschnittlich $0,08 \pm 0,01$ ng/ml bis zum Ende der Trächtigkeit niedrig. In der 15. Woche konnte Testosteron nur bei 5 männlichen Föten in der

Amnionflüssigkeit nachgewiesen werden. Die Testosteronkonzentrationen im Plasma der verbleibenden 11 Tiere lagen unterhalb der Nachweisgrenze.

Die 19 Nortestosteronkonzentrationen waren in der 6. Trächtigkeitswoche bei männlichen und weiblichen Föten am niedrigsten. Die Werte stiegen in der 10. Trächtigkeitswoche signifikant an ($p < 0,05$) und blieben im weiteren Verlauf der Gravidität auf diesem Niveau.

In Tabelle 5.5 sind die Konzentrationen der Glucocorticoide Cortisol und Cortison männlicher und weiblicher Föten dargestellt, die in der Amnionflüssigkeit im Verlauf der Trächtigkeit bestimmt wurden.

Tabelle 5.5 Cortisol und Cortison (ng/ml) in der Amnionflüssigkeit männlicher und weiblicher Föten in der 6., 10., 13. und 15. Trächtigkeitswoche (MW \pm SEM)

		Trächtigkeitswoche			
		6.	10.	13.	15.
Cortisol	m	4,53 \pm 0,20 ^a	2,87 \pm 0,12 ^b	3,11 \pm 0,37 ^b	3,19 \pm 0,22 ^b
	w	4,39 \pm 0,16 ^a	2,77 \pm 0,12 ^b	3,03 \pm 0,64 ^b	3,57 \pm 0,32 ^c
Cortison	m	3,24 \pm 0,13 ^a	2,44 \pm 0,20 ^b	1,60 \pm 0,14 ^c	2,07 \pm 0,12 ^b
	w	3,09 \pm 0,15 ^a	2,40 \pm 0,11 ^b	1,57 \pm 0,12 ^c	2,10 \pm 0,15 ^b

m: männlich; w: weiblich

Ungleiche Buchstaben in den Zeilen weisen auf signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Stadien hin.

Es konnte kein Unterschied der Cortisol- und Cortisonkonzentrationen zwischen männlichen und weiblichen Föten festgestellt werden. Allerdings waren die Cortisolkonzentrationen in der 6. Trächtigkeitswoche gegenüber den späteren Stadien bei beiden Geschlechtern erhöht ($p \leq 0,001$). Cortison war in allen Trächtigkeitsstadien niedriger als Cortisol. Auch bei Cortison wurden in der 6. Woche die höchsten Konzentrationen gemessen ($p \leq 0,001$).

Wurden die fötalen Glucocorticoidkonzentrationen mit den maternalen verglichen, so waren im Fall von Cortisol die maternalen Werte durchschnittlich fünfmal so hoch wie die der Föten ($p \leq 0,05$). Bei Cortison waren die maternalen Konzentrationen etwa um Faktor 3 höher als in der Amnionflüssigkeit ($p \leq 0,05$).

5.4 Hormone im Blutplasma von Föten und Neugeborenen

5.4.1 Geschlechtsspezifische Hormone

5.4.1.1 Männliche Föten und Neugeborene

Im Plasma männlicher Föten (A. umbilicalis) und neugeborener Ferkel (V. jugularis) wurden FSH und LH sowie Testosteron, Gesamtöstrogene sowie in einzelnen, zufällig ausgewählten Plasmaproben 17β Östradiol gemessen. Die Konzentrationen im Plasma männlicher Föten und Ferkel sind in Tabelle 5.6 dargestellt.

Tabelle 5.6 Hormone (ng/ml) aus der Nabelarterie männlicher Föten in unterschiedlichen Trächtigkeitsstadien sowie bei neugeborenen Ferkeln (MW \pm SEM)

	Trächtigkeitswoche				
	6.	10.	13.	15.	1 Tag p.p.
FSH	0,36 \pm 0,01 ^a	0,37 \pm 0,04 ^a	0,40 \pm 0,03 ^a	0,58 \pm 0,03 ^b	0,70 \pm 0,08 ^b
LH	--	0,21 \pm 0,09 ^{a,b}	0,11 \pm 0,03 ^a	0,09 \pm 0,02 ^a	0,88 \pm 0,43 ^b
Testosteron	2,01 \pm 0,25 ^a	0,40 \pm 0,01 ^b	0,39 \pm 0,02 ^{b,c}	0,37 \pm 0,02 ^b	0,68 \pm 0,15 ^c
Östrogene	0,41 \pm 0,03 ^a	0,19 \pm 0,04 ^a	2,04 \pm 0,24 ^b	8,44 \pm 1,32 ^{b,c}	3,23 \pm 0,87 ^{a,b}

1 Tag p.p.: Ferkel 1 Tag post partum

Ungleiche Buchstaben in den Zeilen weisen auf signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Stadien hin.

Die FSH Konzentrationen im Plasma männlicher Föten waren in der 6. und 10. Woche niedrig. In der 15. Trächtigkeitswoche kam es zu einem signifikanten Anstieg ($p \leq 0,01$). Im peripheren Plasma der neugeborenen Ferkel konnten die höchsten FSH Konzentrationen gemessen werden.

LH wurde auf Grund der begrenzten Plasmamenge erst ab der 10. Woche gemessen. Die Konzentrationen während der Fötalentwicklung waren niedrig und stiegen erst bei den neugeborenen Ferkeln um das 9-fache an ($p \leq 0,01$).

In der 6. Trächtigkeitswoche wurden Testosteronkonzentrationen von $2,01 \pm 0,25$ ng/ml gemessen. Diese gingen in der 10. Trächtigkeitswoche um Faktor 5 zurück und blieben bei

durchschnittlich 0,39 ng/ml, um nach der Geburt auf $0,68 \pm 0,15$ ng/ml anzusteigen ($p \leq 0,001$).

Die Gesamtöstrogene stiegen in der 13. Trächtigswoche auf $2,04 \pm 0,24$ ng/ml an ($p \leq 0,05$). Ein weiterer Anstieg folgte in der 15. Woche um das Vierfache ($8,44 \pm 1,32$ ng/ml). Postnatal wurde ein Rückgang der Konzentrationen um Faktor 3 verzeichnet.

Um den Anteil an 17β Östradiol an den Gesamtöstrogenen zu bestimmen, wurde bei zufällig ausgewählten Plasmaproben der 10., 13. und 15. Woche 17β Östradiol bestimmt. In der 10. Woche lag der Anteil von 17β Östradiol an den Gesamtöstrogenen bei 80 %, in der 13. Woche bei 15 % und in der 15. Woche bei 7 %.

5.4.1.2 Weibliche Föten und Neugeborene

Die im Blutplasma (A. umbilicalis) weiblicher Föten sowie neugeborener Ferkel (V. jugularis) gemessenen Konzentrationen von FSH, LH, Testosteron sowie Gesamtöstrogenen sind in Tabelle 5.7 aufgeführt.

Tabelle 5.7 FSH, LH, Testosteron und Gesamtöstrogene (alle in ng/ml) in der Nabelarterie bei weiblichen Föten in unterschiedlichen Trächtigsstadien sowie bei neugeborenen Ferkeln (V. jugularis) (MW \pm SEM)

	Trächtigswoche				
	6.	10.	13.	15.	1 Tag p.p.
FSH	$0,43 \pm 0,04^{a,b}$	$0,39 \pm 0,01^a$	$1,15 \pm 0,17^{b,c}$	$0,74 \pm 0,07^c$	$1,68 \pm 0,14^{a,b,c}$
LH	--	$0,09 \pm 0,02^a$	$1,01 \pm 0,39^b$	$0,10 \pm 0,03^a$	$0,97 \pm 0,17^b$
Testosteron	$0,23 \pm 0,06$	$0,22 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,03$	$0,22 \pm 0,00$	$0,41 \pm 0,04$
Östrogene	$0,30 \pm 0,03^a$	$0,68 \pm 0,18^a$	$1,83 \pm 0,20^b$	$8,05 \pm 1,47^c$	$5,22 \pm 0,83^c$

1 Tag p.p.: Ferkel 1 Tag post partum

Ungleiche Buchstaben in den Zeilen weisen auf signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Stadien hin.

Die FSH Konzentrationen weiblicher Föten stiegen in der 13. Trächtigkeitswoche um das 3-fache an ($p \leq 0,05$) und blieben auf diesem Niveau.

Auch im Plasma weiblicher Föten wurde LH auf Grund der begrenzten Plasmamenge, erst ab der 10. Trächtigkeitswoche bestimmt. In der 13. Trächtigkeitswoche kam es zu einem peak von $1,01 \pm 0,39$ ng/ml. Ein erneuter signifikanter Anstieg der LH Konzentrationen wurde bei den neugeborenen Ferkeln nachgewiesen ($p \leq 0,001$).

Die Testosteronkonzentrationen waren in den untersuchten Stadien durchgängig niedrig.

In der 13. Trächtigkeitswoche stiegen die Konzentrationen der Gesamtöstrogene signifikant an. Die höchsten Konzentrationen konnten in der 15. Trächtigkeitswoche gemessen werden ($8,05 \pm 1,47$ ng/ml).

Wie auch bei den männlichen Föten wurde in einzelnen, zufällig ausgewählten Plasmaproben 17β Östradiol bestimmt. Der Anteil von 17β Östradiol an den Gesamtöstrogenen betrug in der 10. Trächtigkeitswoche 64 %, in der 13. Woche 14 % und in der 15. Woche 6 %.

5.4.1.3 Vergleich männlicher und weiblicher Föten und Neugeborener

Die FSH Konzentrationen im Plasma weiblicher Föten waren in der 13. Trächtigkeitswoche gegenüber denen der männlichen signifikant erhöht ($p \leq 0,05$). Bei den Neugeborenen waren die Konzentrationen der weiblichen Föten mehr als doppelt so hoch ($p \leq 0,01$).

In der 13. Trächtigkeitswoche kam es bei den weiblichen Föten zu einem LH Anstieg, der bei den männlichen Föten ausblieb.

Die Testosteronkonzentrationen waren bei männlichen Föten in allen Trächtigkeitsstadien höher ($p \leq 0,05$) als bei den weiblichen Föten.

Die Östrogenkonzentrationen der weiblichen Föten waren in der 10. Trächtigkeitswoche höher ($p = 0,03$). Im weiteren Verlauf der Östrogenkonzentrationen zeigten sich keine Unterschiede in Hinblick auf das Geschlecht.

Wie bereits unter Kapitel 5.2.1 beschrieben lagen die Östrogenkonzentrationen im maternalen Plasma in den ersten beiden untersuchten Trächtigkeitsstadien unterhalb der Nachweisgrenze, sie erreichten in der 15. Trächtigkeitswoche mit 132 pg/ml ihr Maximum. Die fötalen Östrogenkonzentrationen waren in allen untersuchten Stadien deutlich höher. Sie erreichten ebenfalls in der 15. Trächtigkeitswoche ihr Maximum ($8,25 \pm 1,40$ ng/ml), wobei sie etwa 60 Mal höher waren als die Östrogenkonzentrationen der Muttertiere.

5.4.2 Cortisol

Cortisol wurde im Plasma der A. umbilicalis männlicher und weiblicher Föten sowie im peripheren Plasma der einen Tag alten Ferkel gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.8 dargestellt.

Tabelle 5.8 Cortisol (ng/ml) in der Nabelarterie männlicher und weiblicher Föten in der 6., 10., 13. und 15. Trächtigungswoche sowie im peripheren Plasma neugeborener Ferkel (MW \pm SEM)

Trächtigungswoche		6.	10.	13.	15.	1 Tag p.p.
m		87,68 \pm 4,77 ^a	38,26 \pm 2,63 ^b	32,74 \pm 1,15 ^b	41,68 \pm 0,99 ^b	36,87 \pm 8,67 ^b
w		73,84 \pm 8,71 ^a	38,05 \pm 1,32 ^b	32,12 \pm 2,02 ^b	39,35 \pm 2,09 ^b	39,89 \pm 7,21 ^b

1 Tag p.p.: Ferkel 1 Tag post partum; m: männlich; w: weiblich

Ungleiche Buchstaben in den Zeilen weisen auf signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Stadien hin.

Es konnte kein Einfluß des Geschlechts auf die Cortisolkonzentrationen festgestellt werden. Die höchsten Cortisolwerte konnten sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Föten in der 6. Trächtigungswoche nachgewiesen werden ($p < 0,001$).

Zusätzlich wurde Cortisol im peripheren Plasma der Muttertiere bestimmt. Die maternalen Cortisolkonzentrationen unterschieden sich im Verlauf der Trächtigkeit nicht. Sie lagen im Mittel bei 19,82 \pm 1,82 ng/ml. In der 6. Trächtigungswoche waren die fötalen Cortisolkonzentrationen um das 5-fache höher als im maternalen Plasma. Auch im weiteren Verlauf der Trächtigkeit war Cortisol im fötalen Plasma stets doppelt so hoch wie im maternalen Plasma.

5.5 Charakterisierung der Gonaden

5.5.1 Hoden

5.5.1.1 Hodengewichte

Die Entwicklung der Hoden im Verhältnis zum gesamten Körpergewicht ist in Abbildung 5.3 dargestellt.

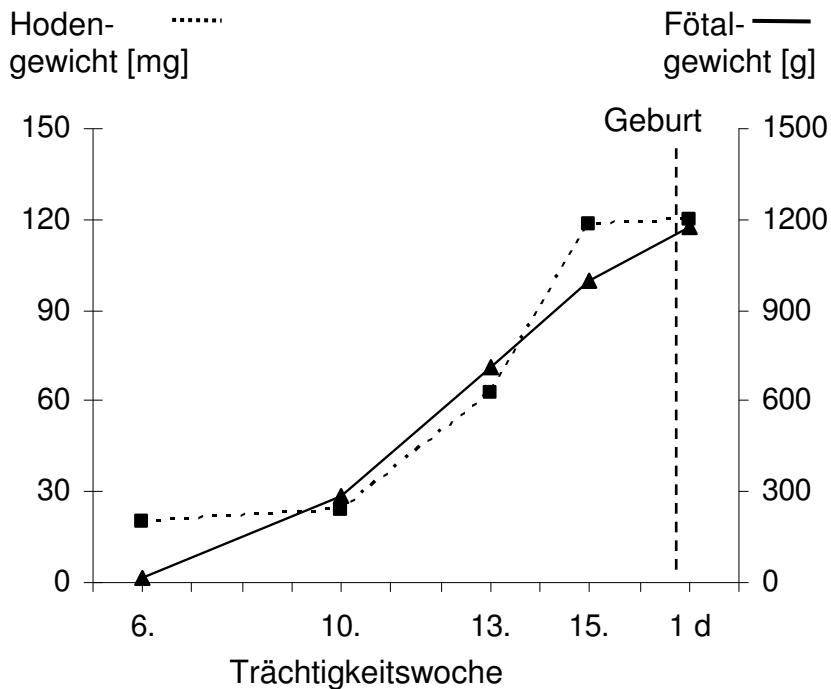


Abbildung 5.3 Entwicklung des Hoden- und Körpergewichtes bei männlichen Föten und Neugeborenen

Das Wachstum der Hoden sowie die Entwicklung des gesamten Körpergewichtes zeigten einen nahezu linearen Anstieg während des untersuchten Zeitraums. Die Verläufe der beiden Gewichte wiesen eine Korrelation von $r = 0,95$ auf. Allerdings gab es hinsichtlich des absoluten Wachstums Unterschiede zwischen den beiden Parametern. Im Vergleich zu Föten der 6. Woche war das Körpergewicht bei Neugeborenen um Faktor 65 höher, wohingegen das Hodengewicht in diesem Zeitraum nur um das 6-fache anstieg.

5.5.1.2 Morphologische Parameter der Hodenentwicklung

In Tabelle 5.9 ist die Entwicklung der fötalen Hoden auf zellulärer Ebene dargestellt.

Tabelle 5.9 Anzahl der Leydigzellen pro mm² sowie der Keim- und Sertolizellen je Tubulus in den Hoden der untersuchten Trächtigkeitsstadien sowie bei neugeborenen Ferkeln (MW \pm SEM)

	Trächtigkeitswoche				
	6.	10.	13.	15.	1Tag p.p.
Leydigzellen (Zellen / mm ²)	2948 \pm 385 ^a	4121 \pm 296 ^b	4676 \pm 187 ^b	4663 \pm 420 ^b	3670 \pm 353 ^{a,b}
Sertolizellen (Zellen / Tubulus)	--	8,71 \pm 0,69 ^{a,b}	10,25 \pm 0,15 ^a	8,48 \pm 0,56 ^b	10,35 \pm 0,34 ^a
Keimzellen (Zellen / Tubulus)	0,76 \pm 0,10 ^a	2,85 \pm 0,18 ^{b,c}	1,95 \pm 0,19 ^b	2,95 \pm 0,24 ^c	1,30 \pm 0,13 ^a

1 Tag p.p: Ferkel 1 Tag post partum

Ungleiche Buchstaben in den Zeilen weisen auf signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Stadien hin

Die Anzahl der Leydigzellen stieg nach der 6. Trächtigkeitswoche signifikant an ($p \leq 0,05$).

In der 6. Trächtigkeitswoche konnten mit Hilfe der GATA-4 Färbung noch keine Sertolizellen nachgewiesen werden. Danach lag die Anzahl an Sertolizellen im Durchschnitt bei 9 Zellen/Tubulus. In der 15. Trächtigkeitswoche kam es zu einem Rückgang der Sertolizellen pro Tubulus.

Die Anzahl der Keimzellen/Tubulus stieg in der 10. Trächtigkeitswoche um das 3-fache an. Anschließend ging die Keimzellzahl wieder zurück, um in der 15. Woche erneut anzusteigen. Der Rückgang der Keimzellen in den Hoden der neugeborenen Ferkel auf 1,30 + 0,13 Zellen/Tubulus war signifikant ($p \leq 0,05$).

In Tabelle 5.10 ist der Flächenanteil der Tubuli und des Interstitiums im fötalen Hoden in den untersuchten Trächtigkeitsstadien dargestellt. Die fötalen Hoden der 6. Trächtigkeitswoche konnten dabei nicht ausgewertet werden, da bei der Übertragung des realen Schnittes auf die zu planimetrierende Fläche keine deutlichen morphologischen Strukturen zu erkennen waren.

Tabelle 5.10 Flächenanteile (%) des Interstitiums und der Tubuli im Hoden in der 10., 13. und 15. Trächtigswoche sowie bei neugeborenen Ferkeln (MW \pm SEM)

	Trächtigswoche			
	10.	13.	15.	1 Tag p.p.
Tubulus	41,0 \pm 1,5 ^a	39,1 \pm 1,7 ^{a,b}	33,8 \pm 2,5 ^b	36,8 \pm 0,9 ^{a,b}
Interstitium	57,5 \pm 1,4 ^a	62,0 \pm 0,9 ^{a,b}	66,2 \pm 2,5 ^b	63,0 \pm 0,7 ^{a,b}

1 Tag p.p.: Ferkel 1 Tag post partum

Ungleiche Buchstaben in den Zeilen weisen auf signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Stadien hin.

Das Interstitium nahm mit durchschnittlich 62 % in allen untersuchten Stadien eine größere Fläche als die Tubuli ein. In der 15. Trächtigswoche ging der Anteil der Tubuli an der Gesamtfläche im Vergleich zur 10. Trächtigswoche signifikant zurück ($p \leq 0,05$), gleichzeitig nahm die Interstitiumfläche zu. Die Durchmesser der Tubuli in den untersuchten Trächtigsstadien sowie bei den neugeborenen Ferkeln sind in Tabelle 5.11 dargestellt.

Tabelle 5.11 Tubulusdurchmesser (μm) in den untersuchten Trächtigsstadien sowie bei neugeborenen Ferkeln (MW \pm SEM)

	Trächtigswoche				
	6.	10.	13.	15.	1 Tag p.p.
Tubulusdurchmesser	51,3 \pm 1,2 ^a	67,8 \pm 2,4 ^b	63,2 \pm 1,6 ^b	52,0 \pm 3,1 ^a	57,3 \pm 2,3 ^{a,b}

1 Tag p.p.: Ferkel 1 Tag post partum

Ungleiche Buchstaben weisen auf signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Stadien hin

Der Tubulusdurchmesser vergrößerte sich in der 10. Trächtigswoche deutlich. Die kleinsten Durchmesser fanden sich in der 6. und 15. Woche.

5.5.2 Ovar

5.5.2.1 Ovargewichte

In Abbildung 5.4 ist die Entwicklung der Ovarien im Verhältnis zum gesamten Körpergewicht im Verlauf der Trächtigkeit dargestellt.

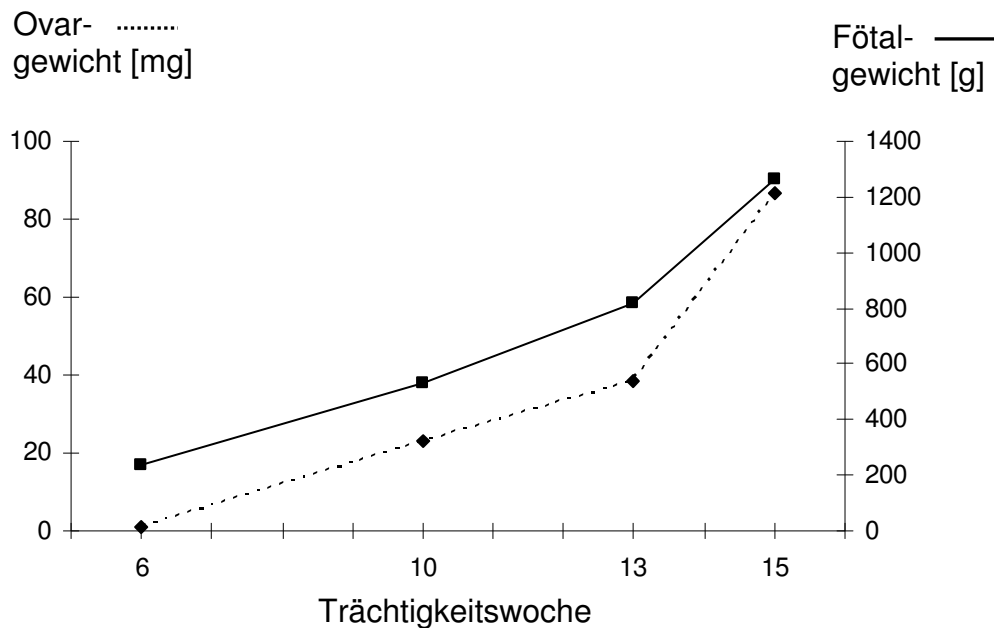


Abbildung 5.4 Entwicklung des Ovar- und Körpergewichts bei weiblichen Föten

Wie auch bei den Hodengewichten zeigten sowohl die Ovargewichte als auch die Körpergewichte der weiblichen Föten einen linearen Anstieg im Verlauf der Entwicklung. Das Ovargewicht stieg von der 6. zur 15. Trächtigkeitswoche um das fünffache an, wohingegen sich das Körpergewicht in diesem Zeitraum um Faktor 90 erhöhte. Die Verläufe der Gewichte wiesen eine Korrelation von $r = 0,99$ auf.

5.5.2.2 Morphologische Parameter der Ovarentwicklung

In Tabelle 5.12 sind die Anteile der Keimballen, Primordialfollikel und Primärfollikel bezogen auf die Gesamtfläche der Ovarien in den untersuchten Trächtigkeitsstadien sowie bei neugeborenen Ferkeln dargestellt.

Tabelle 5.12 Flächenanteile (%) der Keimballen, Primordialfollikel und Primärfollikel im Ovar in Prozent in den untersuchten Trächtigkeitsstadien und bei neugeborenen Ferkeln

	Trächtigkeitswoche			
	10.	13.	15.	1 Tag p.p.
Keimballen	45,6 ± 2,2 ^a	29,5 ± 2,8 ^b	37,7 ± 3,0 ^{a,b}	13,9 ± 2,9 ^c
Primordialfollikel	5,7 ± 0,6 ^a	10,3 ± 1,7 ^{a,b}	11,0 ± 0,6 ^b	10,7 ± 2,0 ^{a,b}
Primärfollikel	0	2,3 ± 1,0	1,2 ± 0,3	7,6 ± 2,6

1 Tag p.p.: Ferkel 1 Tag post partum

Ungleiche Buchstaben in den Zeilen weisen auf signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Stadien hin.

In der 6. Trächtigkeitswoche waren die morphologischen Strukturen der Ovarien noch nicht zu erkennen. Ab der 10. Woche ließen sich die Flächen in Keimballen und Primordialfollikel unterscheiden. Primärfollikel wurden erst ab der 13. Woche sichtbar.

Mit zunehmendem Alter der Föten ging der Anteil der Keimballen an der Gesamtfläche zurück, der niedrigste Flächenanteil fand sich bei den neugeborenen Ferkeln (13,9 %).

Im Gegensatz dazu nahm der Anteil an Primordialfollikeln an der Gesamtfläche des Ovars im Verlauf der Trächtigkeit zu. In der 15. Trächtigkeitswoche kam es zu einer Verdoppelung der Fläche in Bezug auf die 10. Woche.

Primärfollikel wurden erst ab der 13. Trächtigkeitswoche nachgewiesen. Ihr Anteil an der Gesamtfläche war niedrig und änderte sich in den untersuchten Stadien nicht.

In Tabelle 5.13 ist die Anzahl der Keimballen, Primordialfollikel und Primärfollikel in den untersuchten Trächtigkeitsstadien sowie bei neugeborenen Ferkeln dargestellt.

Tabelle 5.13 Anzahl der Keimballen, Primordial- und Primärfollikel je mm² in den Ovarien der untersuchten Trächtigkeitsstadien sowie bei neugeborenen Ferkeln (MW \pm SEM)

	Trächtigkeitswoche			
	10.	13.	15.	1 Tag p.p.
Keimballen	72,4 \pm 6,86	81,2 \pm 6,02	74,3 \pm 3,56	71,6 \pm 10,02
Primordialfollikel	66,1 \pm 8,78 ^a	157,5 \pm 32,92 ^{a,b}	171,4 \pm 17,03 ^b	144,4 \pm 34,15 ^{a,b}
Primärfollikel	--	16,0 \pm 6,22	6,7 \pm 1,8	47,9 \pm 16,9

1Tag p.p.: Ferkel 1 Tag post partum

Ungleiche Buchstaben in den Zeilen weisen auf signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Stadien hin.

Der einzige signifikante Unterschied bestand in der Verdoppelung der Anzahl der Primordialfollikel / mm² von der 10. zur 15. Woche.

Da der Anteil der Keimballen an der Gesamtfläche im Verlauf der untersuchten Stadien zurück ging, sich jedoch die Anzahl der Keimballen nicht veränderte, kann von einer Verkleinerung der Keimballen und somit einem Rückgang der Ovozytenzahl innerhalb der Keimballen ausgegangen werden.

Abbildung 5.5 zeigt beispielhaft einen Ovarausschnitt eines 15 Wochen alten Fötus. In der Abbildung ist die „Rindenzone“ (äußerer Bereich des Ovars, in dem die Follikulogenese stattfindet) gekennzeichnet.

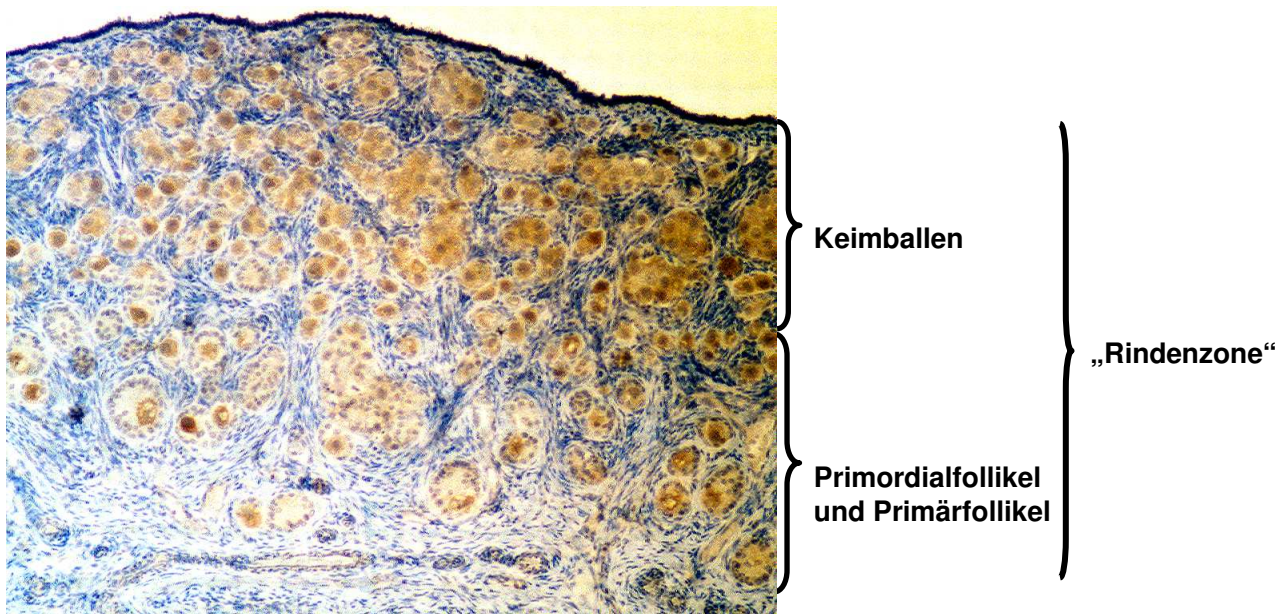


Abbildung 5.5 Ovarausschnitt eines 15 Wochen alten Fötus (Vergrößerung 10fach)

In Tabelle 5.14 ist der Bereich der „Rindenzone“ im Verlauf der Trächtigkeit sowie bei neugeborenen Tieren aufgeführt.

Tabelle 5.14 Breite der „Rindenzone“ (μm) in der 10., 13. und 15. Trächtigkeitswoche sowie bei neugeborenen Ferkeln

	Trächtigkeitswoche			
	10.	13.	15.	1Tag p.p.
„Rindenzone“	548 ± 28	561 ± 42	630 ± 34	578 ± 22

1Tag p.p.: Ferkel 1 Tag post partum

Wie Tabelle 5.14 zeigt, veränderte sich der Bereich der Randzone im Verlauf der Trächtigkeit nicht.

5.5.3 Vergleich der Gonadengewichte

In Abbildung 5.6 sind die Verläufe der Hoden- und Ovargewichte in den vier untersuchten Trächtigkeitsstadien dargestellt.

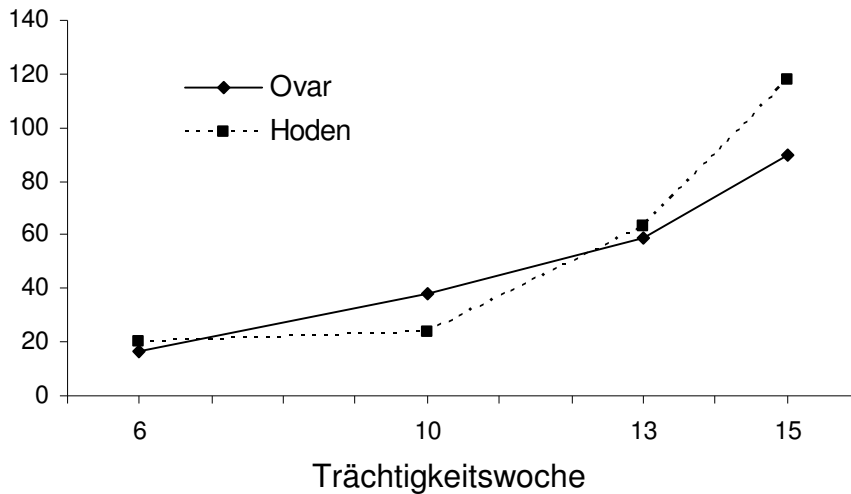


Abbildung 5.6 Gewichte (mg) der fötalen Hoden und Ovarien in der 6., 10., 13. und 15. Trächtigkeitswoche

Bei der Entwicklung der Gonadengewichte war kein Unterschied zwischen Hoden und Ovarien im Verlauf der Trächtigkeit festzustellen. Die Verläufe wiesen eine Korrelation von $r = 0,97$ auf.

5.6 Immuncytochemische Bestimmungen

5.6.1 Hoden

5.6.1.1 Steroidrezeptoren

5.6.1.1.1 Androgenrezeptor im Hoden

Der Androgenrezeptor wurde im fötalen Hoden nur in der 10. und 15. Trächtigungswoche nachgewiesen, da hier lediglich ein Überblick über die AR Lokalisation gegeben werden sollte. Die Ergebnisse der Färbung des Androgenrezeptors im fötalen Hoden sind in Tabelle 5.15 aufgeführt.

Tabelle 5.15 Anteil (%) der AR positiven Zellen im fötalen Hoden der 10. und der 15. Trächtigungswoche

	Trächtigungswoche	
	10.	15.
Sertolizellen	100	100
Keimzellen	98,8	63,7
Leydigzellen	74,3	40,5

In beiden Trächtigungsstadien waren alle Sertolizellen AR positiv. In der 10. Woche wiesen nahezu alle Keimzellen eine positive Färbung auf, die in der 15. Trächtigungswoche deutlich um Faktor 1,7 zurückging ($p \leq 0,05$). Um fast den gleichen Faktor (ca. 1,7) gingen die AR positiven Leydigzellen von der 10. zur 15. Woche zurück.

5.6.1.1.2 Glucocorticoidrezeptor im Hoden

Der Glucocorticoidrezeptor (GCR) wurde im Hoden der Föten im Trächtigkeitsverlauf sowie bei den neugeborenen Ferkeln nachgewiesen. Die immuncytochemische Färbung ist anhand der 10. und 15. Trächtigungswoche in Abbildung 5.7 beispielhaft dargestellt.

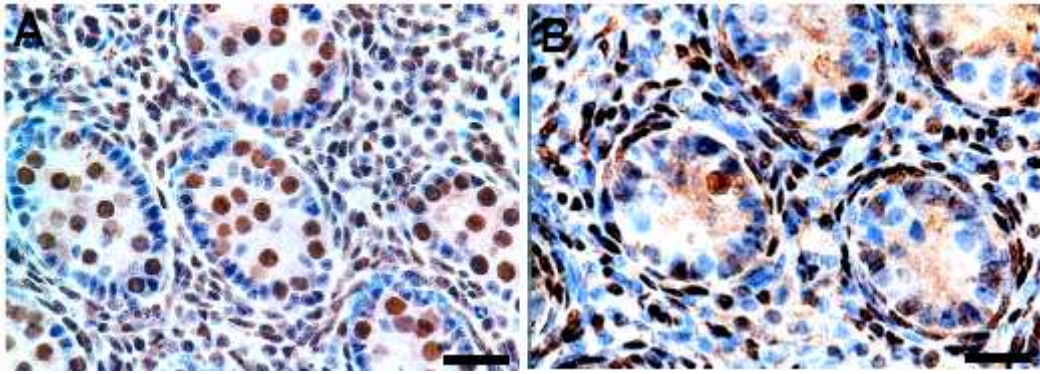


Abbildung 5.7 Immuncytochemische Färbung des GCR in der 10. (A) und 15. (B) Trächtigswoche im Hoden beim Schwein. GCR-positive Zellen sind braun gefärbt. Der Balken entspricht 20 μ m.

In Abbildung 5.8 sind die GCR positiven Keimzellen und Leydigzellen relativ zu ihrer Gesamtzellzahl dargestellt.

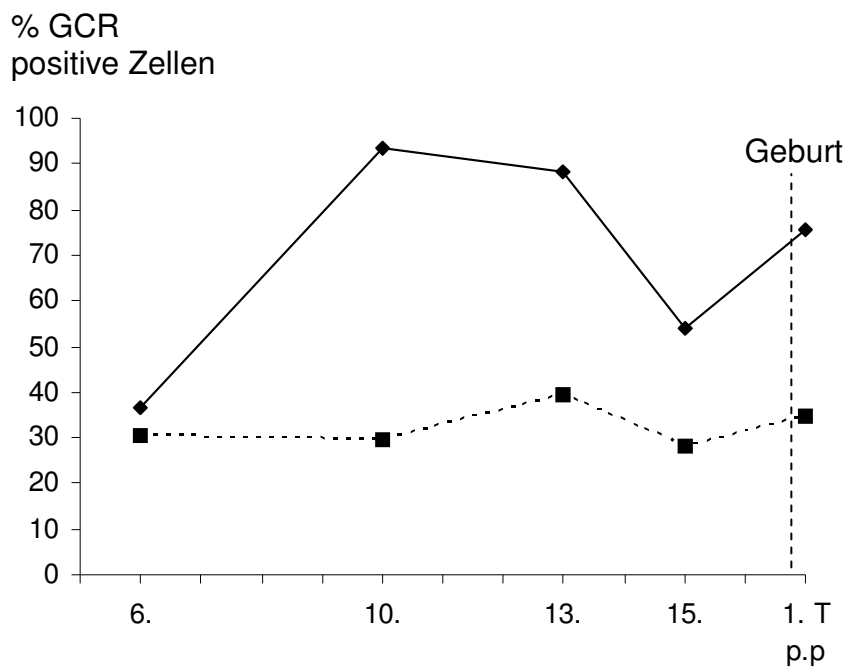


Abbildung 5.8 Relativer Anteil (%) GCR positiver Keimzellen (-◆-) und Leydigzellen (--■--) im fötalen Hoden in der 6., 10., 13. und 15. Trächtigswoche sowie bei neugeborenen Ferkeln

In den Leydigzellen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Stadien.

Die GCR positiven Keimzellen stiegen von der 6. Trächtigkeitswoche zur 10. Trächtigkeitswoche um das 2,5-fache an ($p=0,03$) und blieben auch in der 13. Trächtigkeitswoche auf diesem Niveau. Der Rückgang der GCR positiven Keimzellen auf $55,9 \pm 13$ positive Zellen / 100 Zellen in der 15. Trächtigkeitswoche war nicht signifikant.

In den Sertolizellen konnte der GCR nicht nachgewiesen werden.

5.6.1.2 Enzyme

5.6.1.2.1 Aromatase im Hoden

In Tabelle 5.16 sind die Aromatase positiven Zellzahlen (Leydigzellen/mm² und Keimzellen/Tubulus) dargestellt.

Tabelle 5.16 Aromatase positive Zellen/mm² im fötalen Hoden in verschiedenen Trächtigkeitsstadien

	Trächtigkeitswoche				
	6.	10.	13.	15.	1Tag p.p.
Leydigzellen [Zellen/ mm ²]	879 ± 35^a	1070 ± 57^a	1686 ± 116^b	2400 ± 44^c	$2415 \pm 135^{b,c}$
Keimzellen [Zellen/Tubulus]	$0.13 \pm 0.05^{a,d}$	1.74 ± 0.14^b	$0.63 \pm 0.12^{a,c}$	0.32 ± 0.09^d	$0.40 \pm 0.07^{a,b,c,d}$

1Tag p.p.: Ferkel 1 Tag post partum

Ungleiche Buchstaben in den Zeilen weisen auf signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Stadien hin.

Der relative Anteil der Aromatase positiven Zellen ist in Abbildung 5.9 dargestellt.

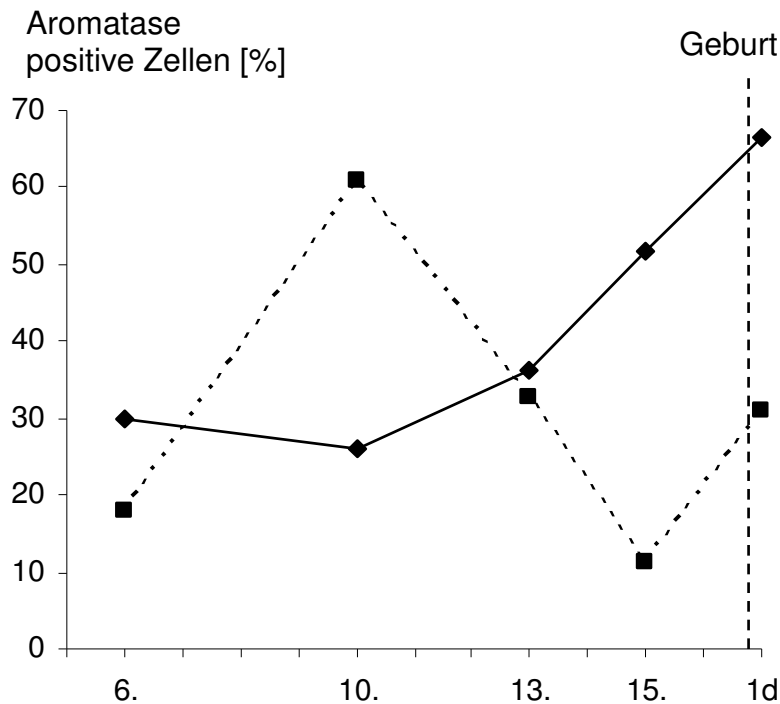


Abbildung 5.9 Relativer Beitrag (%) der Keimzellen (--■--) und der Leydigzellen (-◆-) an der Aromatase Expression

Wie in Abbildung 5.9 ersichtlich, änderte sich der Hauptsyntheseort der Östrogene während der fötalen Entwicklung: in der 6. Trächtigungswoche waren sowohl die Leydigzellen, als auch die Keimzellen an der Östrogensynthese beteiligt. Ab der 10. Woche wurde Aromatase hauptsächlich in den Keimzellen exprimiert. Parallel zum Anstieg der Aromataseexpression in den Keimzellen, ging die Expression in den Leydigzellen zurück (siehe Abbildung 5.9).

Danach war ein kontinuierlicher Anstieg der Aromatase in den Leydigzellen zu beobachten, wohingegen die Expression in den Keimzellen bis zum Ende der Fötalentwicklung stetig zurückging.

Im Cytoplasma der Sertolizellen konnte Aromatase nicht nachgewiesen werden.

Ein Beispiel für die immunocytochemischen Färbungen und den deutlichen Wechsel des Syntheseortes der Aromatase ist in Abbildung 5.10 aufgezeigt.

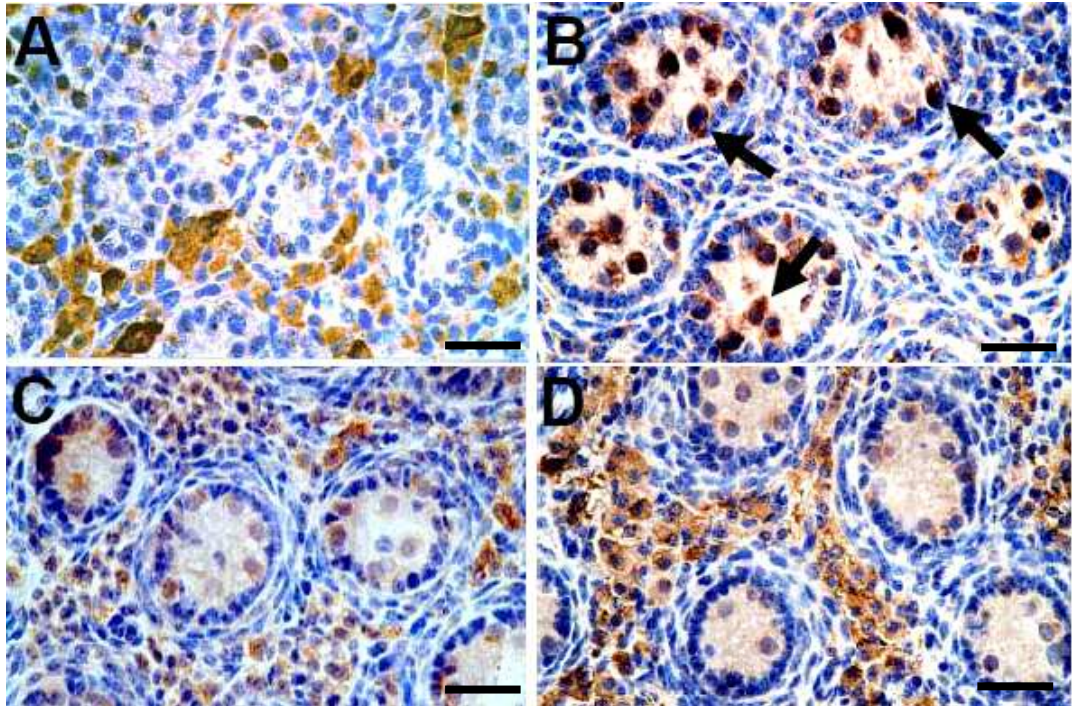


Abbildung 5.10 Immuncytochemische Färbung der Aromatase in der 6. (A), 10. (B), 13. (C) und 15. (D) Trächtigkeitswoche im Hoden beim Schwein. Aromatase positive Keimzellen in der 10. Woche sind beispielhaft mit Pfeilen gekennzeichnet, der Balken entspricht 20 μm .

5.6.1.2.2 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 2 im Hoden

Die Lokalisation des Enzyms 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 2 (11 β -HSD 2) wurde immuncytochemisch in der 6., 10., 13. und 15. Trächtigkeitswoche sowie bei neugeborenen Ferkeln im Hoden nachgewiesen. In Tabelle 5.17 sind die positiven Leydig- sowie Keimzellen bezogen auf 100 Zellen angegeben.

Tabelle 5.17 11 β -HSD 2 in Leydig- und Keimzellen (positive Zellen je 100 Zellen) im Verlauf der Trächtigkeit sowie bei neugeborenen Ferkeln (MW \pm SEM)

	Trächtigkeitswoche				
	6.	10.	13.	15.	1Tag p.p.
Leydigzellen	36,4 \pm 5,66 ^{a,b,c,d}	16,6 \pm 1,87 ^a	22,0 \pm 1,61 ^{a,b}	36,3 \pm 3,91 ^{b,c}	65,7 \pm 0,83 ^d
Keimzellen	9,1 \pm 4,73 ^{a,b,c}	25,5 \pm 6,92 ^b	25,4 \pm 6,83 ^{a,b}	0,73 \pm 0,42 ^c	10,3 \pm 3,67 ^{a,b}

1Tag p.p.: Ferkel 1 Tag post partum

Ungleiche Buchstaben in den Zeilen weisen auf signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Stadien hin.

In den Sertolizellen konnte die Aktivität des Enzyms 11 β -HSD 2 nicht nachgewiesen werden. Die Leydigzellen zeigten bereits in der 6. Trächtigkeitswoche einen hohen Anteil an positiv gefärbten Zellen. Zur 10. Trächtigkeitswoche erfolgte ein Rückgang der positiven Zellen, der allerdings nicht signifikant war. Danach nahm die Anzahl 11 β -HSD 2 positiver Zellen kontinuierlich zu, der Anstieg zur 13. Trächtigkeitswoche war jedoch nicht signifikant. Erst ab der 15. Trächtigkeitswoche war die Zunahme an positiven Zellen in Bezug auf das Minimum in Woche 10 deutlich zu erkennen ($p=0,04$).

Die Anzahl positiver Keimzellen war in der 6. Trächtigkeitswoche um Faktor 3 niedriger als in den Leydigzellen. Ab der 10. Trächtigkeitswoche kam es zu einem Anstieg, der allerdings nicht signifikant war. In der 15. Trächtigkeitswoche ging die Anzahl der positiv gefärbten Keimzellen jedoch signifikant zurück ($p\leq 0,05$).

Abbildung 5.11 zeigt beispielhaft die Lokalisation des Enzyms 11 β -HSD 2 in den untersuchten Trächtigkeitsstadien.

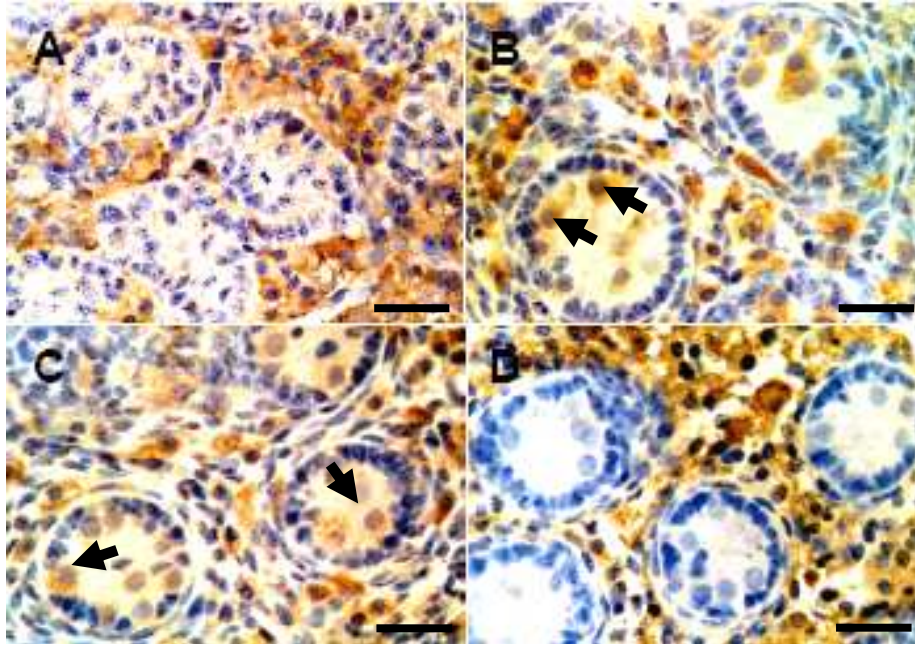


Abbildung 5.11 Immuncytochemische Färbungen des Enzyms 11 β -HSD 2 im Hoden von 6 (A), 10 (B), 13 (C) und 15 (D) Wochen alten Föten.

11 β -HSD 2 positive Keimzellen sind in der 10. und 13. Woche beispielhaft mit Pfeilen gekennzeichnet. Der Balken entspricht 20 μ m.

Wie in Abbildung 5.11 zu erkennen ist, konnte in der 15. Trächtigkeitswoche lediglich in den Leydigzellen das Enzym nachgewiesen werden, die Expression in den Keimzellen war mit $0,73 \pm 0,42$ Zellen /100 Zellen sehr gering.

5.6.1.3 Vergleich der immunocytochemisch untersuchten Parameter

In Abbildung 5.12 wurden Aromatase, der GCR sowie 11 β -HSD 2 in Bezug auf die Keimzellen, in Abbildung 5.13 11 β -HSD 2 und Aromatase in den Leydigzellen zusammengefasst dargestellt.

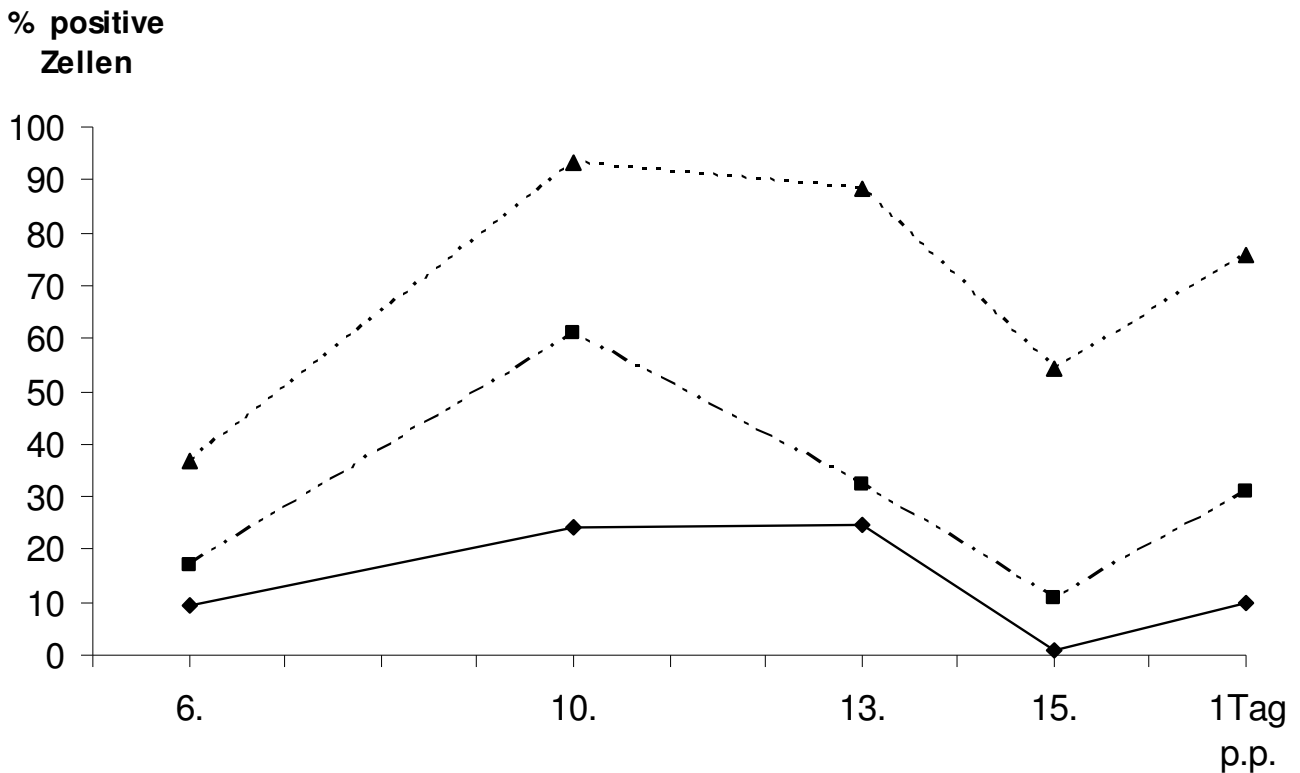


Abbildung 5.12 11 β -HSD 2 (\blacklozenge — \blacklozenge), GCR (\blacktriangle ----- \blacktriangle) und Aromatase (\blacksquare ----- \blacksquare) in den Keimzellen im Verlauf der Trächtigkeit und bei neugeborenen Ferkeln

Auffällig ist bei allen drei Parametern der Anstieg der positiven Keimzellen von der 6. zur 10. Trächtigkeitswoche sowie der Rückgang positiver Keimzellen von der 13. zur 15. Trächtigkeitswoche. Zwischen den Verläufen von GCR und Aromatase besteht eine Korrelation von $r = 0,61$ ($p \leq 0,01$). GCR und 11 β -HSD 2 weisen eine Korrelation von $r = 0,50$ ($p \leq 0,01$) auf.

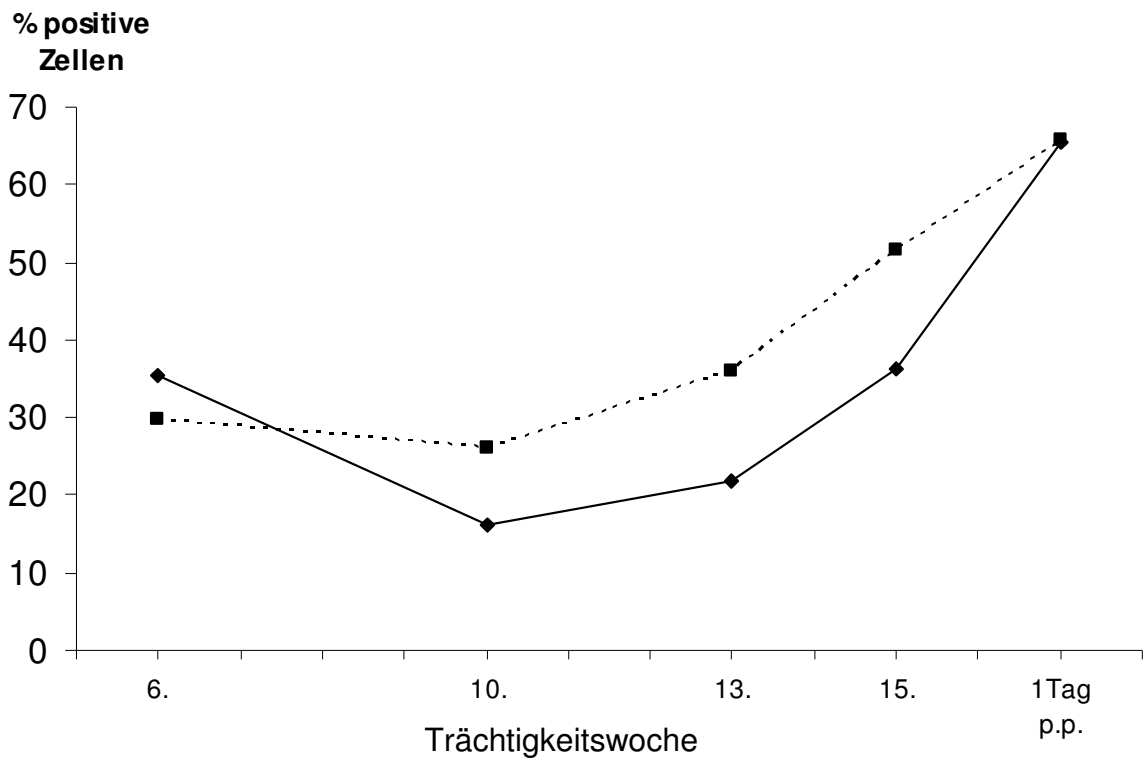


Abbildung 5.13 11β-HSD 2 (◆—◆) und Aromatase (■----■) in den Leydigzellen im Verlauf der Trächtigkeit und bei neugeborenen Ferkeln

In den Leydigzellen konnte zwischen Aromatase und 11β-HSD 2 ein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden ($p \leq 0,01$). Die Korrelation zwischen den beiden Parametern betrug $r = 0,78$. Die Anzahl der GCR positiven Zellen veränderte sich im Verlauf der untersuchten Stadien nicht und zeigte keinen Zusammenhang zu den beiden anderen untersuchten Parametern.

5.6.1.4 Mitose und Apoptose im Hoden

Die Mitoserate wurde im Hoden der Föten und neugeborenen Ferkel quantifiziert. Die Ergebnisse der Ki-67 Färbungen in Keim-, Sertoli- und Leydigzellen sind in Tabelle 5.18 dargestellt.

Tabelle 5.18 Mitose in den Keim-, Sertoli- und Leydigzellen in der 6., 10., 13. und 15. Trächtigkeitswoche sowie bei neugeborenen Ferkeln (MW \pm SEM)

	Trächtigkeitswoche				
	6.	10.	13.	15.	1Tag p.p.
Keimzellen (Zellen /Tubulus)	0,29 \pm 0,02 ^{a,b,c}	0,26 \pm 0,05 ^{a,c}	0,41 \pm 0,05 ^b	0,15 \pm 0,05 ^c	0,32 \pm 0,05 ^{a,b}
Sertolizellen (Zellen /Tubulus)	0,31 \pm 0,06 ^a	0,74 \pm 0,13 ^{a,c,d}	1,63 \pm 0,23 ^{b,d}	0,93 \pm 0,17 ^c	1,74 \pm 0,34 ^d
Leydigzellen (Zellen /mm ²)	340 \pm 57 ^a	1480 \pm 149 ^b	1367 \pm 147 ^b	770 \pm 97 ^c	880 \pm 149 ^c

1Tag p.p.: Ferkel 1 Tag post partum

Ungleiche Buchstaben in den Zeilen weisen auf signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Stadien hin.

In der 6. Trächtigkeitswoche zeigten 47 % der Keimzellen mitotische Aktivität. Die Mitoserate in den Keimzellen verdoppelte sich in der 13. Trächtigkeitswoche ($p=0,02$). Die geringste Anzahl Mitose-positiver Keimzellen konnte in der 15. Trächtigkeitswoche nachgewiesen werden.

Die Mitoserate in den Sertolizellen nahm von der 6. zur 13. Trächtigkeitswoche um Faktor 5 zu. In der 15. Trächtigkeitswoche war ein Rückgang positiver Zellen zu verzeichnen ($p=0,02$). Die Sertolizellen im Hoden der neugeborenen Ferkel zeigten wiederum mit 1,74 \pm 0,34 positiven Zellen je Tubulus die höchste mitotische Aktivität.

In der 6. Trächtigkeitswoche waren lediglich 4,6 % der Leydigzellen mitotisch aktiv. In der 10. Woche kam es zu einem signifikanten Anstieg positiver Zellen auf 1480 \pm 149 pro mm² ($p \leq 0,001$), die erst in der 15. Trächtigkeitswoche wieder zurückging.

Apoptose wurde in den fötalen Hoden in den Trächtigkeitsstadien sowie bei den neugeborenen Ferkeln mit Hilfe der TUNEL Färbung bestimmt. Sie konnte ausschließlich in den Keimzellen nachgewiesen werden.

In Tabelle 5.19 werden die apoptotischen und mitotischen Keimzellen in den untersuchten Trächtigkeitsstadien sowie bei neugeborenen Ferkeln verglichen.

Tabelle 5.19 Mitose- und Apoptoserate (%) in den Keimzellen der untersuchten Trächtigkeitsstadien sowie bei neugeborenen Ferkeln

	Trächtigkeitswoche				
	6.	10.	13.	15.	1Tag p.p.
Mitose	46,6 ± 0,3	13,8 ± 0,3	21,8 ± 0,2	9,8 ± 0,2	25,5 ± 0,4
Apoptose	4,7 ± 0,8	2,2 ± 0,9	2,4 ± 1,4	2,6 ± 0,8	2,3 ± 0,9

1Tag p.p.: Ferkel 1 Tag post partum

Die Apoptose-positiven Zellen waren während des untersuchten Zeitraums durchgängig niedrig. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Stadien festgestellt werden. Wobei in der 6. Trächtigkeitswoche eine Tendenz zu erhöhten apoptotischen Zellen festzustellen war.

Die mitotischen Zellen zeigten in der 6. Trächtigkeitswoche ein Maximum und waren dann im weiteren Verlauf der Trächtigkeit ebenfalls auf einem niedrigeren Niveau. Im Gegensatz zu den apoptotischen Zellen kam es in den Keimzellen der neugeborenen Ferkel zu einer Verdoppelung an Mitose positiven Zellen.

5.6.2 Ovar

5.6.2.1 Androgenrezeptor im Ovar

Der Androgenrezeptor (AR) wurde in den Ovarien der Föten im Verlauf der Trächtigkeit lokalisiert. Da die Zellstrukturen der Ovarien in der 6. Trächtigungswoche noch nicht differenziert werden konnten, wurden sie im Folgenden nicht ausgewertet. Tabelle 5.20 zeigt die AR-positiven Zellen (%).

Tabelle 5.20 Anteil (%) der AR positiven Keimballen und Primordialfollikel in der 10., 13. und 15. Trächtigungswoche

	Trächtigungswoche		
	10.	13.	15.
Oozyten (Keimballen)	86,0 ± 3,7	80,8 ± 3,9	83,2 ± 4,6
Primordialfollikel	73,5 ± 3,1	73,8 ± 3,1	69,6 ± 4,7

Der AR wurde in den Oozyten der Keimballen, aber auch in den Primordialfollikeln in allen untersuchten Trächtigungsstadien konstant exprimiert.

Bei den neugeborenen Ferkeln konnten lediglich bei zwei Ferkeln vereinzelt AR-positiv Oozyten nachgewiesen werden. Sie konnten statistisch nicht ausgewertet werden und sind daher nicht aufgeführt.

In Abbildung 5.14 ist die immunocytochemische Färbung des AR im Ovar der 10. Trächtigungswoche exemplarisch dargestellt.

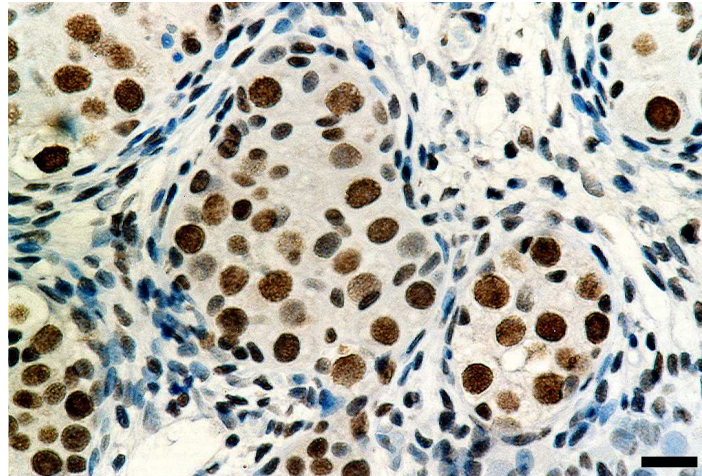


Abbildung 5.14 Immuncytochemische Färbung des AR in der 10. Trächtigswoche im Ovar beim Schwein. AR-positive Zellen sind braun gefärbt. Der Balken entspricht 20 μm .

5.6.2.2 Aromatase im Ovar

In Abbildung 5.15 ist beispielhaft bei Föten der 10. und 15. Trächtigswoche die Aromatase Färbung im Ovar dargestellt.

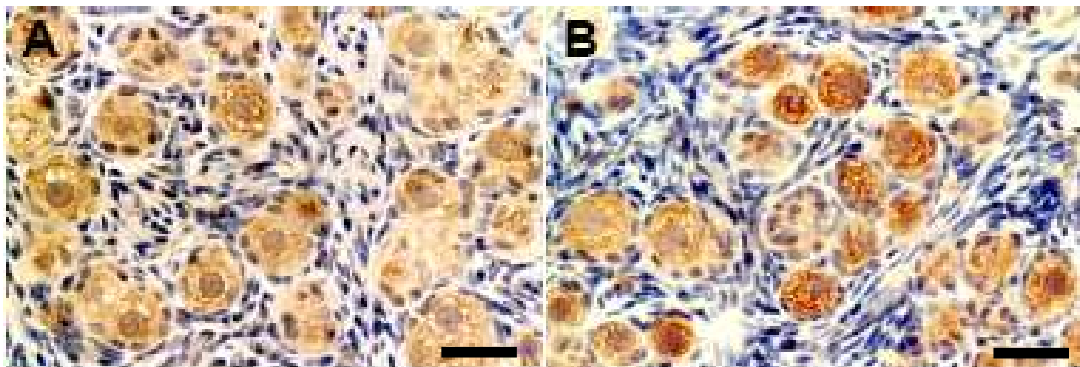


Abbildung 5.15 Immuncytochemische Färbung von Aromatase in der 10. (A) und der 15. (B) Trächtigswoche im Ovar beim Schwein. Braun gefärbte Zellen sind Aromatase positiv. Der Balken entspricht 20 μm .

In allen Trächtigsstadien (6., 10., 13. und 15. Woche) waren alle Oozyten, Primordial- sowie Primärfollikel Aromatase positiv (100 % positive Zellen).

5.7 Molekularbiologische Bestimmungen

5.7.1 Androgenrezeptor in Hoden und Ovarien

Die Expression des Androgenrezeptors wurde mittels quantitativer real time RT-PCR auf mRNA Ebene nachgewiesen. Nach der Normalisierung gegen das Housekeeping Gen GAPDH wurden die Expressionsunterschiede des AR zwischen den Trächtigkeitsstadien der beiden Geschlechter, sowie der Unterschied zwischen Hoden und Ovarien dargestellt.

Dabei zeigten sich in Bezug auf die untersuchten Trächtigkeitsstadien weder bei männlichen noch bei weiblichen Föten signifikante Unterschiede.

Auch beim Vergleich der AR Expression in den fötalen Hoden mit der in den fötalen Ovarien konnten keine Signifikanzen festgestellt werden. Bemerkenswert ist allerdings, dass die fötalen Ovarien eine ebensogroße Menge an AR exprimieren wie die fötalen Hoden.

5.7.2 Glucocorticoidrezeptor im Hoden

Nach der Normalisierung über das Housekeeping Gen GAPDH in den Proben fötaler und neonataler Hoden, erfolgte die Berechnung der mRNA Expression auf die unter 4.4.6 beschriebenen Methode. Die Ergebnisse der GCR mRNA Expression in den fötalen Hoden unterschieden sich in den untersuchten Trächtigkeitsstadien nicht.

5.7.3 Aromatase in Hoden und Ovarien

Die Aromataseexpression im fötalen und neonatalen Hoden wurde parallel zum immunocytochemischen Nachweis mittels quantitativer real time RT-PCR belegt.

Die Expression der Aromatase mRNA nahm im Verlauf der Trächtigkeit zu. In der 15. Trächtigkeitswoche war ein 3-facher Anstieg der Aromatase mRNA gegenüber Woche 6 zu verzeichnen ($p \leq 0,05$).

Gleichzeitig wurde die Aromatase mRNA auch in zwei Trächtigkeitsstadien (10. und 15. Woche) der fötalen Ovarien nachgewiesen. Die Expression in der 15. Trächtigkeitswoche war um Faktor 4 höher als in der 10. Woche.

In der 15. Trächtigkeitswoche exprimierten die Hoden 9-mal mehr Aromatase mRNA als die Ovarien. In der 10. Woche war die Expression der Aromatase mRNA in den fötalen Hoden durchschnittlich um Faktor 10 höher als in den Ovarien derselben Trächtigkeitswoche.

6 Diskussion

6.1 Diskussion des Versuchsdesigns, der tierexperimentellen Vorgehensweise und der Laborverfahren

In bisherigen Studien zur Fötalentwicklung beim Schwein wurden lediglich Teilaspekte der Fötalentwicklung dargestellt, z. B. Geschlechts- und Gewichtsentwicklung, die sich zudem nur auf kurze Zeitabschnitte bezogen (siehe u. a. Ford et al. 1980, Robertson et al. 1985, Wise & Christenson 1992, Raeside & Sigman 1975, Klemcke & Christenson 1997). In der vorliegenden Arbeit gelang es, zahlreiche Parameter der Fötalentwicklung über einen längeren Zeitraum vergleichend darzustellen. Voraussetzung dafür war zunächst die Sicherstellung des umfangreichen Probenmaterials. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden dabei in vier definierten Trächtigkeitsstadien (6., 10., 13. und 15. Trächtigkeitswoche) insgesamt 158 Föten entnommen.

Während der Fötenentnahme wurden sowohl Amnionflüssigkeit, als auch fötales und maternales Plasma für die Steroidbestimmungen sichergestellt. Dadurch konnten endokrine Wechselbeziehungen zwischen dem maternalen und fötalen Organismus erfasst werden. Zudem wurden die Auswirkungen auf Parameter des Fötalwachstums, z. B. der Gewichtsentwicklung und der Länge der Föten und die Wechselbeziehung zur Lage der Föten im Uterus dargestellt.

Da im Rahmen der Fötenentnahme die fötalen Gewebeproben innerhalb kürzester Zeit konserviert werden konnten, stand ein exzellentes Material für vielfältige molekularbiologische und histologische Untersuchungen zur Verfügung. Die Lokalisierung und Quantifizierung von Enzymen (11 β -HSD 2 und Aromatase) sowie von Rezeptoren (Androgen- und Glucocorticoidrezeptor) in fötalen Gonaden standen dabei im Vordergrund. Damit konnten auch unmittelbare Vergleiche zwischen Hormonkonzentrationen im Blut und der Rezeptor- sowie Enzymexpression im Gewebe hergestellt werden. Durch die zügige Entnahme konnte der Abbau durch Endopeptidasen insbesondere in Bezug auf Enzyme und Rezeptoren verringert werden, wodurch eine sehr hohe Qualität der Proben gewährleistet wurde. Die Sicherstellung der Proben erfolgte für jeden einzelnen Fötus, es wurde somit eine optimale Basis für die vorliegende Untersuchung gelegt.

Zur Hormonmessung wurden immunologische Messverfahren eingesetzt. Dabei konnte zum Teil auf bereits etablierte Verfahren zurückgegriffen werden, wie für Östrogene, Androgene, Glucocorticoide sowie LH und FSH dokumentiert (Bubenik et al. 1982, Claus et al. 1985,

Claus et al. 1990). Zur Messung von Nortestosteron und Cortison mussten enzymimmunologische Verfahren neu etabliert werden (Claus et al. 2007a, Dissertation Wagner 2005). Ebenfalls neu etabliert werden mussten der immunocytochemische Nachweis sowie die quantitative mRNA Bestimmung mittels real-time RT-PCR des Enzyms Aromatase und 11 β -HSD 2 (Haeussler et al. 2007, Claus et al. 2007b). Mit Hilfe dieser Methoden war es möglich zum ersten Mal die Enzyme Aromatase und 11 β -HSD 2 in den fötalen Hoden beim Schwein zu lokalisieren und quantifizieren. Aber auch die Lokalisierung des Glucocorticoidrezeptors in den Hoden des fötalen Schweins war bis dato nicht bekannt und konnte mit Hilfe der von Gutscher et al. (2001) etablierten Methode bestimmt werden. Die Antiseren zur Bestimmung des GCR sowie des Enzyms 11 β -HSD 2 wurden am Fachgebiet hergestellt, das Antiserum gegen Aromatase stammte von Dr. N. Harada (Fujita Health University, Japan). Wie anhand der Qualitätskriterien gezeigt werden konnte, waren alle verwendeten Antiseren hochspezifisch und die Ergebnisse reproduzierbar. Die Spezifität der immunocytochemischen Färbung von 11 β -HSD 2 wurde durch Western Blot und quantitative PCR bestätigt (Claus et al. 2007b). Mit Hilfe des spezifischen Antiserums konnte der GCR sowohl im Kern als auch im Cytoplasma nachgewiesen werden. Die Spezifität wurde durch Western Blot abgesichert (Gutscher et al. 2001). Neben der Kontrolle der Spezifität des Aromataseantiserums über das Präimmunserum, konnte der immunocytochemische Nachweis durch quantitative PCR abgesichert werden (Haeussler et al. 2007).

Insgesamt ging damit das eingesetzte und zum Teil erstmals aufgebaute Methodenrepertoire weit über jenes hinaus, das bisher zu Fragen der Fötalentwicklung beim Schwein eingesetzt wurde.

6.2 Diskussion der Befunde zum Fötalwachstum

Dass das Fötalwachstum in seiner Wechselbeziehung zur Uteruskapazität einen entscheidenden Einfluss auf die Wurfgröße hat, aber auch die Geburtsgewichte beeinflusst, die dann die postnatale Entwicklung der Ferkel entscheidend prägen, wurde bereits von van der Lende et al. (2001) zusammengefasst und ist unter Kapitel 2.2.1 näher diskutiert worden. Wichtige Einflussfaktoren auf die fötale Gewichtsentwicklung sind neben dem Genotyp und der maternalen Fütterung auch die Lage der Föten im Uterus sowie ihr Geschlecht (vom Saal & Bronson 1980; Wise & Christenson 1992; Chen & Dziuk 1993; Wise et al. 1997; Wilson & Ford 2001). Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die Fötenparameter mit erfasst, sie bildeten allerdings nicht den Schwerpunkt der Untersuchung.

Auffällig waren die bereits zu Beginn der Entwicklung stark streuenden Fötalgewichte, die gegen Ende der Trächtigkeit noch deutlichere Unterschiede aufwiesen. So differierten bereits in der 6. Trächtigungswoche die absoluten Fötalgewichte um bis zu 25 %, offenbar werden damit die Geburtsgewichte sehr früh in der Fötalzeit vorgegeben. Unterschiede im Gewicht der Föten differierten dann am Ende der Gravidität (15. Trächtigungswochen) zu etwa 50 %. Dies war mit Ergebnissen aus anderen Studien beim Schwein vergleichbar, bei denen die leichten Föten am 45. Trächtigkeitstag 80 %, am 65. Trächtigkeitstag 73 % und schließlich am 100. Trächtigkeitstag 58 % der mittleren Wurfgewichte aufwiesen (McNeil et al. 2007). Die Spanne zwischen leichten und schweren Föten wurde immer größer. Als Grund für die großen Unterschiede der Fötalgewichte innerhalb eines Wurfs wurde auf die unterschiedliche Durchblutung der Plazenten hingewiesen, mit der Folge einer ungleichen „Substratzuteilung“ (Ashworth et al. 2001), allerdings wurden sie im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. In diesem Zusammenhang sollte auch der Einfluss der maternalen Fütterung auf die Fötalgewichte berücksichtigt werden, er wurde u. a. von Musser et al. (2004) aufgezeigt. Bei Föten von ad libitum gefütterten Sauen in der ersten Hälfte der Trächtigkeit konnte lediglich ein Anstieg des fötalen IGF-I nachgewiesen werden. Eine Änderung der maternalen Futteraufnahme beeinflusst das Geburtsgewicht der Ferkel erst nach dem 80. Trächtigkeitstag (Noblet et al. 1985), obwohl Dwyer et al. (1994) bei einer gesteigerten Futteraufnahme während der Gravidität (25. – 80. Trächtigkeitstag) einen Anstieg der fötalen Muskelfasern nachweisen konnten. Dabei kam es zu einem schnelleren Wachstum der Ferkel nach der Geburt, deren Schlachtkörper schließlich magerer war, als der der Kontrollgruppe.

Der von Wise & Christenson (1992) beschriebene Zusammenhang zwischen dem Geschlecht der Föten und deren Gewicht (siehe Kapitel 2.2.1.3) konnte in dieser Arbeit nicht belegt werden. Auch bezüglich der Lage der Föten im Uterus konnte kein Einfluss der Fötengewichte festgestellt werden. Diesbezüglich bestehen in anderen Studien widersprüchliche Meinungen, die bereits unter Kapitel 2.2.1.2 dargelegt wurden.

6.5 Diskussion der Hormonkonzentrationen in maternalen und fötalen Kompartimenten

6.3.1 Maternales Plasma und Amnionflüssigkeit

Die im maternalen Plasma sowie in der Amnionflüssigkeit gemessenen Steroidkonzentrationen spiegeln die direkte Umgebung der Föten wider. Progesteron, das zur Aufrechterhaltung der Trächtigkeit dient, war im maternalen Plasma wie erwartet in allen untersuchten Trächtigkeitsstadien hoch (27,7 – 33,7 ng/ml). Der Anstieg von 17 β Östradiol ab der 12. Trächtigkeitswoche war ebenfalls zu erwarten, da beim Schwein gegen Ende der Trächtigkeit vermehrt Östrogene in der Plazenta gebildet werden (Robertson & King 1974). Sie sind für die Geburtsvorbereitung von Bedeutung (z. B. gesteigerter Blutfluss im Uterus, Vorbereitung der Ansprechbarkeit des Myometriums für Kontraktionen (Garnica & Chan 1996)). Zudem wird der Abfall der Progesteronkonzentrationen im Rahmen der Luteolyse von einem weiteren 17 β Östradiol Anstieg begleitet, der vermutlich durch eine erhöhte Aromataseaktivität hervorgerufen wird und demzufolge vermehrt Progesteron zu Östrogenen aromatisiert (Hoffmann 1994).

Die Verläufe der Progesteron- und Östrogenkonzentrationen in der Amnionflüssigkeit bei Schweinen wurden bereits von Knight et al. (1977) beschrieben. Auch in der vorliegenden Arbeit zeigten die Progesteronwerte einen Rückgang in der 15. Trächtigkeitswoche von 25 %, das heißt von 8,0 ng/ml auf 5,2 ng/ml. Dieser Abfall spiegelt sich auch auf niedrigerem Niveau in der fötalen Amnionflüssigkeit wider. Die plazentäre Synthese von 17 β Östradiol beim Schwein ist bekannt (Craig 1982), wie unter Kapitel 6.3.4 näher diskutiert, dürfte allerdings auch ein nennenswerter Beitrag der Föten insbesondere zu den Konzentrationen in der Amnionflüssigkeit hinzukommen.

Mit Ausnahme der bei männlichen Föten der 6. Trächtigkeitswoche höheren Testosteronkonzentrationen, ergaben sich beim Vergleich zwischen den in der Amnionflüssigkeit gemessenen Steroiden, keine geschlechtsspezifischen Unterschiede. Hier spiegelte sich die hohe Testosteronsynthese der fötalen Hoden in der Amnionflüssigkeit wider. Die fötale Herkunft wurde für Testosteron bei Meerschweinchen in der Amnionflüssigkeit nachgewiesen. Dazu wurde den Tieren tritiiertes Testosteron plazentär injiziert, das anschließend nicht in der Amnionflüssigkeit nachgewiesen werden konnte (Rigaudière 1982).

Wie bereits Ford et al. (1980) zeigten, waren die Plasmakonzentrationen an unkonjugierten Steroiden stets höher, als die der Amnionflüssigkeit. Dies ist darauf zurückzuführen, dass in

der Amnionflüssigkeit Hormone größtenteils in konjugierter Form als Glucuronide, Sulfate oder Disulfate vorkommen (Schmidt 1992) und in der vorliegenden Arbeit lediglich unkonjugierte Steroide gemessen wurden.

Ein weiteres Augenmerk wurde auf Nortestosteron gelegt, da dieses Steroid beim weiblichen Tier während der Gravidität vorkommt (Vandenbroeck et al. 1991; De Brabander et al. 1994) und seine anabole Wirkung über den Androgenrezeptor vermittelt (Toth & Zakar 1982). Wie bei murenen Tieren bekannt, handelt es sich bei den Norandrogenen um anabole Steroide, die im Verlauf der Östrogensynthese aus Androgenen entstehen (Greco & Payne 1994). Nortestosteron wurde im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal in der Amnionflüssigkeit beim Schwein bestimmt, deshalb stehen keine Vergleichsdaten zur Verfügung. Die gemessenen Konzentrationen waren bei männlichen und weiblichen Föten gleich, sie nahmen im Verlauf der Gravidität zu. Da die Norandrogensynthese gekoppelt an die Östrogensynthese erfolgt, ergaben sich im Verlauf der Gravidität keine geschlechtsspezifischen Unterschiede. Allerdings fällt auf, dass die Nortestosteronkonzentrationen in der 6. Trächtigswoche höher waren, als die der Östrogene. Mit zunehmender Entwicklung wurde der Anteil von Nortestosteron an den Östrogenen geringer, die Aromatisierung der Androgene verläuft dementsprechend zu Gunsten der Östrogene.

Im fötalen Plasma wurde Nortestosteron nicht bestimmt, da die für den enzymimmunologischen Test benötigte Plasmamenge nicht ausreichend war, es ist jedoch ein ähnlicher Verlauf wie in der Amnionflüssigkeit zu erwarten.

6.3.2 Diskussion der Regulation fötaler Hormonkonzentrationen

Mechanismen, die die pulsatile Ausschüttung der Gonadotropine steuern, sind beim Schwein noch nicht vollständig entwickelt (Parvizi 2006). Zwar ist die Hypophyse schon 35 Tage p.c. sichtbar, die Reifung des Hypothalamus-Hypophysen-Komplexes findet allerdings erst zwischen dem 45. und 100. Trächtigkeitstag statt (Elsaesser et al. 1988). Obwohl bereits 28 Tage p.c. in den fötalen Gonaden beim Schwein LH- und FSH-Rezeptoren bestimmt wurden (Goxe et al. 1993), konnten in der vorliegenden Arbeit FSH und LH erst ab dem 70. Trächtigkeitstag nachgewiesen werden, was jedoch in anderen Studien bestätigt wurde (van Vorstenbosch et al. 1984). Vor diesem Zeitpunkt verläuft die fötale Steroidsynthese unabhängig von Gonadotropinen, entsprechend ist auch die Gonadenentwicklung nicht von LH oder FSH abhängig (van Vorstenbosch et al. 1987), sondern wird genetisch reguliert (Zuckerman & Baker 1977). Erst in der 13. Trächtigswoche konnte ein signifikanter

Anstieg der Gonadotropine im Plasma weiblicher Föten aufgezeigt werden. Allerdings waren die FSH-Konzentrationen in anderen Studien mehr als dreimal so hoch als in der vorliegenden Arbeit (Colenbrander et al. 1982; Goxe et al. 1993). Entsprechend den Untersuchungen von Colenbrander et al. (1977) stiegen die Gonadotropinkonzentrationen im fötalen Plasma während des letzten Monats der Trächtigkeit beim Schwein an. Die Konzentrationen von LH und FSH waren im Plasma weiblicher Föten stets höher, als bei männlichen Föten, dies konnte auch in anderen Studien bestätigt werden (Goxe et al. 1993). Als Grund wird hierfür der negative feedback-Mechanismus genannt, der bei männlichen Föten durch die testikuläre Testosteronsekretion ausgelöst wird (Goxe et al. 1993). Auch bei Rhesusaffen konnte während der Fötalentwicklung gezeigt werden, dass die LH- und FSH-Konzentrationen nach einer Gonadenentnahme bei männlichen Föten anstiegen, während sie bei weiblichen Föten gleich blieben (Ellinwood et al. 1980; Winter et al. 1987).

6.3.3 Die Bedeutung der Androgene während der Fötalentwicklung

Die Androgene Testosteron und 5α -Dihydrotestosteron (5α -DHT) sind essentiell für die männliche Entwicklung während der pränatalen Phase. Dabei ist Testosteron für das Wachstum der Hoden und Nebenhoden verantwortlich, während 5α -DHT die Ausbildung von Penis, Skrotum und Akzessorischen Drüsen steuert (Hoppe et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde von den beiden Androgenen nur Testosteron im fötalen Plasma sowie in der Amnionflüssigkeit gemessen, wobei die Konzentrationen mit Werten aus anderen Studien übereinstimmten (Ford et al. 1980). Sie waren im fötalen Plasma in der 6. Trächtigungswoche am höchsten ($2,01 \pm 0,25$ ng/ml). Die Werte in der 6. Trächtigungswoche sind allerdings bereits wieder rückläufig, da das Testosteron-Maximum etwa 35 Tage p.c. auftritt (Ford et al. 1980).

Im Plasma weiblicher Föten wurde ebenfalls Testosteron nachgewiesen, allerdings waren die Konzentrationen stets niedriger als im Plasma männlicher Föten. Nach Quirke et al. (2001) ist Androstendion das am häufigsten vorkommende Androgen beim weiblichen Fötus, in der vorliegenden Arbeit wurde es jedoch nicht bestimmt. Den Androgenen werden dabei drei unterschiedliche Wirkungen zugeschrieben: eine Erhöhung der Follikeldifferenzierung, das Hemmen der Follikulogenese sowie als Substrat für die Östrogensynthese (Slomczynska & Tabarowski 2001). In den fötalen Ovarien konnten in allen untersuchten Trächtigungsstadien der vorliegenden Studie AR-positive Ovogonien und Oozyten nachgewiesen werden (70-80 %). Bei murenen Tieren verschiedener Spezies ist die Expression des AR in

Granulosazellen des Ovars bekannt (Mensch: Horie et al. 1992, Suzuki et al. 1993, Primaten: Hild-Petito et al. 1991, Hillier et al. 1997; Schwein: Garrett & Gurthie 1996; Schaf: Campo et al, 1985; Ratten: Hirai et al, 1994, Tetsuka & Hillier 1996). Eine Bedeutung der Androgene beim weiblichen Fötus ist nicht bekannt, es ist jedoch sicher, dass Androgene keinen Einfluss auf die weibliche Sexualdifferenzierung haben, da diese unabhängig von Hormonen erfolgt (Prinzip des „basic femaleness“). Eine mögliche Bedeutung könnte in der bereits beschriebenen Follikeldifferenzierung liegen.

Die Stimulation der IGF-I-Synthese durch Androgene wurde bei ovariectomierten Ratten beschrieben (Sahlin et al. 1994). Ferner wurde gezeigt, dass IGF-I im Uterus der Ratte durch AR stimuliert wird (Weihua et al. 2002, Cardenas & Pope 2003). Allerdings ist eine direkte Beziehung zwischen Androgenen und IGF-I/II bei Föten nicht bekannt.

6.3.4 Die Bedeutung der Östrogene während der Fötalentwicklung

Die im fötalen Plasma gemessenen Östrogenkonzentrationen sind weitgehend mit den in der Literatur gemessenen Werten vergleichbar (Raeside 1983; Ford & Christenson 1986). Dabei war kein Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Föten zu erkennen.

Im fötalen Ovar übernehmen die Östrogene die Differenzierung der Primordialfollikel (George et al. 1978; George & Ojeda 1987) und sichern damit die Ausbildung der weiblichen Gonade. Die Rolle der Östrogene während der männlichen Entwicklung konnte in früheren Studien nicht ausreichend geklärt werden. Neben einer parakrinen Funktion (Raeside et al 1993), wurde von Pentikäinen et al. (2000) ein antiapoptotischer Effekt vermutet, da eine exogene Zufuhr von Östrogenen zu einer Reduzierung der Apoptose führte. Allerdings ist nicht bekannt, ob in diesem Sinne Östrogene direkt die Apoptose inhibieren oder ob eine indirekte Wirkung, z. B. durch Stimulierung der IGF-I Bildung zugrunde liegt (weitere Diskussion der Apoptosevorgänge siehe Kapitel 6.5).

In allen bisherigen Studien, in denen Östrogene als „Überlebensfaktoren“ der Keimzellen beschrieben werden, sind keine genauen Mechanismen bekannt. In der vorliegenden Arbeit konnte die Bedeutung der Östrogene für die männliche Gonadenentwicklung als „Überlebensfaktoren“ der Keimzellen bekräftigt werden.

Daneben besitzen Östrogene beim Schwein eine luteotrope Wirkung (Flint et al. 1978, Magness et al. 1983), daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die fötalen Östrogene zur Aufrechterhaltung der Trächtigkeit dienen. Sie könnten allerdings auch einen zusätzlichen anabolen Effekt für das Fötalwachstum darstellen, da im fötalen Muskel beider

Geschlechter Östrogenrezeptoren nachgewiesen werden konnten (Bader 2006). Verstärkt wird dies durch die hohe Korrelation ($r = 0,82$) zwischen den im Plasma gemessenen Östrogenen und den Fötalgewichten.

6.6 Weibliche Gonadenentwicklung

Mit der Gruppierung der Keimzellen zu Keimballen beginnt etwa 33 Tage p.c. die Differenzierung der Ovarien (Rüsse & Sinowatz 1991). Die ersten erkennbaren Follikel sind die Primordialfollikel (Oxender et al. 1979), deren Ausbildung etwa 65 Tage nach der Befruchtung erfolgt. Davor sind alle Keimzellen (Ovogonien) in Keimballen angeordnet (Colenbrander et al. 1982). In der vorliegenden Arbeit konnten in der 6. Trächtigkeitswoche noch keine morphologischen Strukturen im Ovar unterschieden werden, sie wurden daher nicht histologisch ausgewertet.

Wie schon von Colenbrander et al. (1982) beschrieben, nahmen die Keimballen in der 10. Trächtigkeitswoche den größten Anteil der Ovarfläche ein. Während der Anteil der Primordialfollikel im weiteren Trächtigkeitsverlauf stetig zunahm, ging gleichzeitig der Anteil der Keimballen zurück, die Anzahl der Keimballen je mm^2 blieb jedoch konstant.

Der Rückgang der Ovogonien während der pränatalen Entwicklung wurde von Black & Erickson (1968) beim Schwein beschrieben. Trotz des Rückgangs bleiben die Ovogonien jedoch während der gesamten fötalen Ovarentwicklung bestehen (Bielanska-Osuchowska 2006).

Bereits in der 6. Trächtigkeitswoche konnten im Plasma weiblicher Föten Steroide (Östrogene und Testosteron) bestimmt werden. Da Aromatase in den Oozyten und Ovogonien der weiblichen Gonaden lokalisiert werden konnte, kann die fötale Herkunft der Östrogene abgeleitet werden. Die Aromataseaktivität in fötalen Ovarien wurde bereits bei mehreren Spezies durch Inkubation mit ^3H -Testosteron bzw. ^3H -Androstendion nachgewiesen (Kaninchen: Milewich & Axelrod 1977; Mensch: George & Wilson 1978; Primaten: Sholl 1982; Ratte: Weniger et al. 1984), der immunocytochemische Nachweis in den fötalen Ovarien beim Schwein erfolgt im Rahmen dieser Arbeit erstmals. Analog zu ihrer Funktion im fötalen Hoden kann auch hier eine mitogene Wirkung der Östrogene vermutet werden.

6.5 Männliche Gonadenentwicklung

Wachstumsfördernde Prozesse

Im Gegensatz zur weiblichen Entwicklung, die automatisch verläuft, benötigt die männliche Differenzierung ein Signal. Unter Anwesenheit des SRY-Gens (auf dem Y-Chromosom) differenzieren sich die fötalen Hoden (Koopman et al. 1990). Die dort stattfindende Steroidsynthese ist entscheidend für die Differenzierung der inneren und äußeren Geschlechtsorgane (Schweikert & Romalo 1990). Die in diesem Zusammenhang relevante Androgensynthese wurde bereits in Kapitel 6.3.3 diskutiert. Während zu Beginn der männlichen Entwicklung Testosteron im Vordergrund steht, nimmt beim männlichen Fötus mit zunehmender Trächtigkeit die Östrogensynthese eine wichtige Stellung ein. Sie konnte durch immunocytochemische Färbung des Enzyms Aromatase in den fötalen Gonaden lokalisiert werden und wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals während der Fötalentwicklung beim Schwein dokumentiert.

Während der postnatalen Entwicklung wurde das Enzym bei mehreren Spezies bestimmt, dabei war die Aktivität meistens auf die Leydigzellen begrenzt (Schwein: Conley et al. 1996; Ratte: Tsai-Morris et al. 1985, Mensch: Carreau et al 1999). Jedoch wurde bei Maus (Nitta et al. 1993), Mensch (Lambard 2003) und Hahn (Kwon et al. 1995) die Aromatase zusätzlich in den Keimzellen lokalisiert. Eine Verlagerung der Aromataseexpression von den Sertolizellen kurz nach der Geburt auf die Leydigzellen bei maturen Tieren ist bei Ratten bekannt (Tsai-Morris et al. 1985).

Im Hoden des fötalen Schweins der 6. Trächtigkeitswoche zeigten bereits ca. 30 % der Leydigzellen eine positive Aromatase-Färbung. In dieser Phase ist die Hodendifferenzierung beendet und wird im weiteren Verlauf durch Wachstumsprozesse (z. B. Volumenvergrößerung der Leydigzellen) ersetzt. In der 10. Trächtigkeitswoche gingen die Aromatase-positiven Leydigzellen weiter auf ca. 25 % zurück. Durch den Rückgang der Aromatase in den Leydigzellen wird sichergestellt, dass genügend Testosteron für die zu diesem Zeitpunkt stattfindende Differenzierung der Geschlechtsgänge zur Verfügung steht (Colenbrander et al. 1982). Etwa ab dem 55. Trächtigkeitstag werden unter seinem Einfluß die Wolffschen Gänge differenziert (Colenbrander et al. 1982), wobei Testosteron durch das Enzym 5 α Reduktase „vor Ort“ zum aktiven 5 α DHT umwandelt wird (Schweikert & Romalo 1990). Da 5 α -DHT nicht aromatisiert werden kann, ist das gleichzeitige Vorkommen von AR-positiven Zellkernen und Aromatase im Cytoplasma der fötalen Hoden möglich. Die Anwesenheit der 5 α Reduktase konnte im fötalen Hoden nachgewiesen werden, allerdings

wurde das Enzym lediglich im Gewebehomogenat gemessen und kann demzufolge keinem Zelltyp zugeordnet werden (George et al. 1987).

Parallel zur Differenzierung der Wolffschen Gänge befindet sich die Leydigzellentwicklung in einer „Ruhephase“. Ihre in der Literatur beschriebene wellenförmige Entwicklung (Van Straaten & Wensing 1978; Van Vorstenbosch et al. 1982) konnte auch in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden. Während der ersten Entwicklungswelle (bis ca. 60. Trächtigkeitstag) fand eine deutliche Zunahme der Leydigzellzahl statt, die durch eine erhöhte Mitoserate belegt wurde. Anschließend blieben die Zellzahlen konstant, obwohl insgesamt das Hodenwachstum deutlich zunahm. Daraus lässt sich auf eine Vergrößerung des Zellvolumens schließen, das auch in der Literatur dokumentiert ist (Moon & Hardy 1973). Die unter dem Einfluss von Aromatase entstandenen Östrogene besitzen eine antiapoptotische Wirkung auf die Keimzellen und fungieren damit als „Überlebensfaktoren“ (Pentikäinen et al. 2000). Auch in anderen Studien wurde dieser antiapoptotische Effekt von 17β Östradiol auf die Keimzellen beschrieben (Carreau et al. 2003), allerdings sind die Regulationsmechanismen in diesem Zusammenhang noch nicht geklärt. Denkbar wäre eine Stimulation der 11β -HSD 2 durch die Östrogene, wie sie bereits von Burton et al. (1998) im Uterus der Ratte beschrieben wurde, wodurch indirekt die apoptotische Wirkung von Cortisol gehemmt werden könnte.

Derselbe Zusammenhang lässt sich für Leydigzellen nachweisen, die während der 2. Entwicklungswelle eine Zunahme des Cytoplasmas verzeichnen (Moon & Hardy 1973). In dieser Phase war die Aromataseaktivität im fötalen Hoden erhöht, während gleichzeitig zunehmende Östrogenkonzentration im Plasma sowie eine Zunahme des Enzyms 11β -HSD 2 nachgewiesen werden konnten. Wie bereits im Rahmen der Keimzellentwicklung diskutiert, steht die mitogene Rolle der Östrogene im Vordergrund.

Differenzierende Prozesse:

Für die Fötalentwicklung sind differenzierende Vorgänge essentiell, sie können unter anderem über die Wirkung von Glucocorticoiden an ihren Rezeptoren (GCR) beschrieben werden. Die Feinregulierung dieses Hormon-Rezeptor-Systems wird u. a. über das Enzym 11β -HSD 2 gesteuert.

Bereits in früheren Studien konnten hohe Cortisolkonzentrationen bei Föten nachgewiesen werden (Klemcke & Christenson 1997), sie sind mit den Konzentrationen in der vorliegenden Arbeit vergleichbar. Diese Cortisol- als auch Cortisonkonzentrationen waren in der

6. Trächtigswoche sowohl im fötalen Plasma als auch in der Amnionflüssigkeit am höchsten. Dabei waren die Konzentrationen im fötalen Plasma in allen untersuchten Trächtigsstadien höher, als die im maternalen Plasma. Die auf fötaler Seite höheren Cortisolkonzentrationen deuten auf die aktive Synthese in den Nebennieren der Föten hin, sie ist essentiell für die Differenzierung fötaler Organe (Silver 1990). Durch das Enzym 11 β -HSD 2 in der Plazenta wird garantiert, dass kein fötal gebildetes Cortisol zur Mutter gelangt und frühzeitig das Geburtssignal gibt (Klemcke & Christenson 1997).

Beim Eber konnte gezeigt werden, dass GCR und somit auch Cortisol eine Rolle bei der Apoptose in weiter entwickelten Stadien der Spermatogonien spielen und demzufolge auch für die Spermienausbeute von Bedeutung sind (Wagner & Claus 2004). Im fötalen Hoden werden durch Apoptose jene Keimzellen entfernt, die nicht an den Rand der Tubuli wandern. Die Degeneration der Keimzellen, die in der Mitte bleiben, wurde sowohl beim Schwein (Van Vorstenbosch et al. 1987) als auch beim Menschen beschrieben (Gondos & Hobel 1971). In diesem Zusammenhang wird eine Regulation durch Cortisol angenommen (Silver 1990), da zwischen der 10. und 13. Trächtigswoche über 90 % der Keimzellen GCR positiv waren. Die geringe Expression von 11 β -HSD 2 während dieser Periode dürfte darauf zurückzuführen sein, dass Keimzellen, die sich bereits differenziert haben, vor weiteren katabolen Einflüssen von Cortisol geschützt werden müssen.

Wie bereits in mehreren Studien mit murenen Tieren verschiedener Spezies beschrieben (u.a. Ratte: Boulogne et al. 1999; Eber: Wagner & Claus 2004), konnte in der vorliegenden Arbeit Apoptose in fötalen Hoden nur in den Keimzellen nachgewiesen werden. Die fötalen Leydigzellen zeigten analog zu Untersuchungen beim murenen Eber keine apoptotische Aktivität (Wagner & Claus 2004), sie werden nicht erneuert und bleiben im Verlauf ihrer Entwicklung bestehen (Kerr & Knell 1988). Auch bei Ratten wird 11 β -HSD 2 in Leydigzellen murener Tiere gebildet. Dabei handelt es sich vermutlich um einen Mechanismus, der Leydigzellen vor einer hemmenden Wirkung von Cortisol auf die Steroidbiosynthese schützt (Welsh et al. 1982, Monder 1990, Ge et al. 1997, Kusakabe et al. 2003).

Die immunocytochemischen Nachweise von Aromatase, 11 β -HSD 2 und GCR im fötalen Hoden beim Schwein wurden in dieser Arbeit erstmals dokumentiert. Auch konnte die Bedeutung der Steroide für die Gonadenentwicklung näher beschrieben werden. Die Zusammenhänge zwischen den einzelnen Parametern bedürfen allerdings noch weiterer Untersuchungen.

7 Zusammenfassung

Grundsätzlich sind Ablauf und Regulation der Geschlechtsdifferenzierung während der Fötalentwicklung beim Schwein bekannt. Während die Differenzierung der bivalenten Gonadenanlage zum Hoden vom Y-Chromosom initiiert wird, unterliegen die weiteren Entwicklungen des Geschlechtsapparates dem basic femaleness, d. h., ohne Signal bildet sich automatisch das weibliche Geschlecht, wohingegen die männliche Entwicklung unter Anwesenheit von Testosteron stattfindet. Da auch im Blutplasma beim weiblichen Fötus Androgene nachgewiesen wurden, ohne dass es zu Störungen der normalen Sexualdifferenzierung kam, stellte sich die Frage nach dem Einfluss der Androgene für die weibliche Fötalentwicklung. Zudem wurden beim männlichen Schweinefötus testikulär hohe Östrogenkonzentrationen nachgewiesen, deren Bedeutung ebenfalls noch nicht geklärt ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Bildung von Androgenen und Östrogenen in den Gonaden im Verlauf der Fötalentwicklung zu verfolgen und ihre Bedeutung für die Hodenentwicklung insbesondere beim männlichen Fötus näher zu charakterisieren. Während bisherige Untersuchungen lediglich Teilaspekte der Fötalentwicklung darstellen, die sich zudem nur auf kleine Zeitabschnitte beziehen, wurden in der vorliegenden Arbeit zahlreiche Parameter über den Verlauf der Fötalentwicklung verglichen.

Für die Untersuchung wurden bei Sauen in vier unterschiedlichen Trächtigkeitsstadien (6., 10., 13. und 15. Trächtigkeitswoche) insgesamt 158 Föten entnommen. Mittels radio- und enzymimmunologischer Messverfahren konnten Steroide im fötalen und maternalen Plasma sowie in der Amnionflüssigkeit gemessen werden. Es wurde gezeigt, dass die Föten bereits in der frühen Entwicklung (6. Trächtigkeitswoche) Testosteron und Östrogene bilden, deren Biosynthese unabhängig von Gonadotropinen erfolgt. Das im Verlauf der Östrogensynthese gebildete 19-Nortestosteron wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals mit Hilfe eines neu etablierten Enzymimmunoassays in der Amnionflüssigkeit im Graviditätsverlauf gemessen. Parallel zu den geschlechtsspezifischen Steroiden wurden auch Glucocorticoide auf maternaler und fötaler Seite nachgewiesen. Die hohen fötalen Konzentrationen bestätigen die frühe Nebennierentätigkeit. Neben den analytischen Bestimmungen ließen sich auch die Enzyme Aromatase und 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 2 (11 β -HSD 2) sowie Steroidrezeptoren (Androgenrezeptor, Glucocorticoidrezeptor) in fötalen Gonaden lokalisieren. Die Ergebnisse wurden zusätzlich mit Hilfe der quantitativen PCR bestätigt. Sowohl der immunocytochemische als auch der molekularbiologische Nachweis der beiden

Enzyme wurde im Rahmen dieser Arbeit neu etabliert. Bezüglich der Enzyme Aromatase und 11 β -HSD 2 im fötalen Hoden des Schweins ergaben sich neue Ergebnisse, mit deren Hilfe Aussagen über die Bedeutung der Östrogene bei männlichen Föten gemacht werden konnten. So konnte ein Zusammenhang zwischen den Enzymaktivitäten und der wellenförmig verlaufenden Zellentwicklung hergestellt werden, d. h., die Enzymaktivitäten waren während der Entwicklungsschübe sowohl von Spermatogonien als auch von Leydigzellen erhöht. Bemerkenswert ist dabei, dass sich die Keimzellen genau zu dem Zeitpunkt weiterentwickeln, in dem sich die Leydigzellen in einer Ruhephase befinden. Umgekehrt wurde bei erhöhter Leydigzellaktivität ein Rückgang der Keimzellvermehrung beobachtet. Die Aromataseaktivität und demzufolge auch Östrogene korrelieren mit Entwicklungsschüben beider Zelltypen, da die Aromatisierung während der Ruhephase der Leydigzellen von den Spermatogonien übernommen wird. Es ist zu vermuten, dass die testikulären Östrogene aktiv an der Mitosesteuerung beider Zelltypen beteiligt sind.

Dass Glucocorticoide ein wichtiges Differenzierungssignal für neu gebildete Zellen darstellen, ist bekannt. Ein vergleichbarer Effekt ist auch durch die im Föthalhoden nachgewiesene Expression der Glucocorticoidrezeptoren zumindest in den Spermatogonien anzunehmen. Zudem erfolgt eine Feinststeuerung der Glucocorticoide durch das Enzym 11 β -HSD 2 das seinerseits wiederum in jenen Phasen exprimiert wird, in denen Östrogene erhöht sind. Ob tatsächlich ein Effekt der Östrogene auf das Enzym 11 β -HSD 2 im fötalen Hoden besteht, konnte in dieser Arbeit nicht untersucht werden.

Im Plasma und der Amnionflüssigkeit weiblicher Föten wurden Androgene in allen untersuchten Trächtigkeitsstadien nachgewiesen, auch waren Androgenrezeptoren im fötalen Ovar präsent. Dass diese Androgene keinen Einfluss auf die weibliche Sexualdifferenzierung haben, dürfte auf deren Konzentrationen zurückzuführen sein. In der für die Geschlechtsdifferenzierung kritischen Phase waren die Testosteronkonzentrationen im Plasma männlicher Föten mit durchschnittlich 2,01 ng/ml zehnmal höher als die der weiblichen Föten. Dennoch waren Androgene bei weiblichen Föten nachzuweisen. Vermutlich haben sie eine Bedeutung für die Follikeldifferenzierung, wie sie auch bei Ovarien maturaer Tiere gezeigt werden konnte. Jedoch wäre auch eine mitogene Wirkung über die insulinartigen Wachstumsfaktoren (IGF I + II) möglich.

Damit konnten speziell für die Gonadenentwicklung beim Schwein völlig neue Mechanismen nachgewiesen werden. Ein weiterführender Beweis der vermuteten Detailmechanismen könnte durch medikamentöse Hemmung der Aromatase erfolgen.

8 Summary

Basic mechanisms of sexual differentiation in higher mammals are well established. The development of the testes is controlled by genetic mechanisms and initiated by the Y-chromosome. Further differentiation of the “Anlagen” is performed by the presence of testicular androgens but requires no specific signal in females (basic femaleness).

Speculation exists during the fetal development of pigs, because androgens are also measurable in female fetuses. In addition, the male gonad is able to synthesize remarkably high levels of estrogens.

The aim of the present study was to follow up concentrations of steroids in peripheral plasma throughout fetal development, starting with week 6, and in particular to analyze changes in testicular cell populations (spermatogonia, Leydig cells) and to correlate them with testicular androgens, estrogens, 19-nortestosterone and cortisol. The expression of steroid converting enzymes such as 11 β -HSD 2 and aromatase as well as receptors were determined by immunocytochemistry and quantitative PCR.

Altogether each of the stages of gestation (weeks 6, 10, 13, and 15 of pregnancy) was represented by 4 sows, so that a total of 158 fetuses were collected. Testicular steroid synthesis (testosterone, estradiol) could be demonstrated as early as week 6, but was independent of gonadotropine. 19-nortestosterone, which is formed during estrogen synthesis, was detected in amniotic fluid using a new established enzymeimmunoassay in this study.

Aromatase activity clearly correlated with a wave-like pattern of cell development. Therefore the activity was elevated both during an alternating rise of Leydig cells or spermatogonia mitosis.

During the rise of spermatogonia development Leydig cells remained quiescent and during the Leydig cell mitosis spermatogonia remained inactive. An increased aromatase activity was observed both during the rise of spermatogonia and Leydig cell mitosis, and in consequence an elevated concentration of estradiol was found. But during an increased Leydig cell formation aromatase expression and thus estradiol synthesis was taken over by spermatogonia. It is therefore reasonable to resume that estrogens are important mitogenic signals as it was also found earlier in mature boars.

The expression of glucocorticoid receptors by spermatogonia could be demonstrated for the first time in fetal pig testes. As also shown for other tissues, its likely role in testes is the

differentiation of new cells. This important role also explains the expression of the enzyme 11 β -HSD 2 both by Leydig cells and spermatogonia. This enzyme is a well known fine-tuning mechanism which indicates cortisol and thus the ligand for the glucocorticoid receptor. Its expression in parallel to the rise of estrogens suggests a dependency on estrogens. Investigating this was, however, not the topic of the present study.

The demonstration of androgens both in blood plasma and amniotic fluid in female fetuses seems to contradict the principle of basic femaleness. It was shown however, that concentrations of testosterone in males increase up to 2.01 ng/ml plasma during the main period of sexual differentiation whereas female levels remain at 0.2 ng/ml so that it is simply the concentration which decides where the male differentiation does occur.

It can not be ruled out, however, that low concentrations in female fetuses may have an effect on follicular differentiation, as was also demonstrated in mature sows. At the same time androgens could have a mitotic effect caused by insulin-like growth factors (IGF I + II).

Thus the present investigation was able to clarify of several new mechanisms and basic data of fetal pig development. Further confirmation of the mechanisms suspected in this study may be served by an aromatase inhibitor.

9 Literaturverzeichnis

Abercrombie M 1946

Estimation of nuclear population from microtome sections

Anatomical Records 94 239-247

Alexander DP, Britton HG, Nixon DA 1966

Observations on the isolated fetal sheep with particular reference to the metabolism of glucose and fructose.

Journal of Physiology 185(2) 382-399

Ashworth CJ, Finch AM, Page KR, Nwagwu MO, McArdle HJ 2001

Causes and consequences of fetal growth retardation in pigs.

Reproduction Supplement 58 233-246

Aurich C & Töpfer-Petersen E 2000

Reproduktion bei männlichen Haussäugetieren. In: *Physiology der Haustiere*. Engelhardt W & Breves G (Hsg.), 2. Auflage, Enke Verlag Stuttgart

Bader I 2006

Myogenese bei Schweineföten.

Bachelorarbeit, Institut für Tierhaltung und Tierzucht Hohenheim

Barker DJP 1994

Mothers, Babies and Diseases in later life.

London: BMJ Publishing

Bazer FW & Thatcher WW 1977

Theory of maternal recognition of pregnancy in swine based on estrogen controlled endocrine versus exocrine secretion of prostaglandin F_{2α} by the uterine endometrium.

Prostaglandines 14 397-401

Bielanska-Osuchowska Z 2006

Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry.

Reproductive Biology 6(2) 161-193

Black JL & Erickson BH 1968

Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig.

Anatomical Records 161 45-56

Boulogne B, Olaso R, Levacher C, Durand P, Habert R 1999

Apoptosis and mitosis in gonocytes of the rat testis during foetal and neonatal development.

International Journal of Andrology 22(6) 356-65

Brown RW & Seckl JR 2005

Glucocorticoid action in development.

Current Opinion in Endocrinology and Diabetes **12**, 224–283

Bubenik GA, Morris JM, Schams D & Claus R 1982

Photoperiodicity and circannual levels of LH, FSH and testosterone in normal and castrated male, white-tailed deer.

Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 60 788-793

Burton PJ, Krozowski ZS, Waddell BJ 1998

Immunolocalization of 11 β -HSD1 and 2 in rat uterus: variation across the estrous cycle and regulation by estrogen and progesterone.

Endocrinology 139 376-382

Campo SM, Carson RS, Findlay JK 1985

Distribution of specific androgen binding sites within the ovine ovarian follicle.

Molecular and Cellular Endocrinology 39(3) 255-65

Carreau S, Genissel C, Bilinska B & Levallet J 1999

Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male.

International Journal of Andrology 22 211-223

Carreau S, Bourguiba S, Lambard S, Galeraud-Denis I, Genissel C, Bilinska B, Benahmed M, Levallet J 2001

Aromatase expression in male germ cells.

Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 79 203-208

Carreau S, Lambard S, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bilinska B, Bourguiba S 2003

Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review.

Reproduction Biological Endocrinology 35 1-6

Cardenas H & Pope WF 2003

Distribution and changes in amounts of the androgen receptor in the pig uterus during the estrous cycle, early pregnancy and after treatment with sex steroids.

Journal of Endocrinology 177 461-469

Chard T 1987

Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Vol. 6, Part 2 Auflage 3, Elsevier Applied Science Publishers, Amsterdam, New York, Oxford

Chen Z-Y & Dziuk PJ 1993

Influence of initial length of uterus per embryo and gestation stage on prenatal survival, development, and sex ratio in the pig.

Journal of Animal Science 71 1895-1901

Claus R & Hoffman B 1980

Oestrogens, compared to other steroids of testicular origin, in bloodplasma of boars.

Acta Endocrinologica 94 404-411

Claus R & Karg H 1981

Fortpflanzung. In: Rinderzucht, Kräusslich H (Hsg), Eugen Ulmer Verlag Stuttgart, 6. Auflage

Claus R, Schopper D, & Wagner HG 1983

Seasonal effect on steroids bloodplasma and seminal plasma of boars.

Journal Steroid Biochemistry 19 725-729

Claus R, Münster E, Heinzmann B 1985

Development of a microtiterplate – enzymimmunoassay for progesterone determination in pig blood plasma and its validation and comparison to radioimmunological methods for progesterone determination.

Zuchthygiene 20 184-191

Claus R, Bingel A, Hofäcker S & Weiler U 1990

Twenty-four hour profiles of growth hormone (GH) concentrations in mature female and entire male domestic pigs in comparison to mature wild boars (*sus scrofa* L.).

Livestock Production Science 25 247-255

Claus R & Weiler U 1996

Relationship between IGF-I, cortisol, and osteocalcin in peripheral plasma of growing pigs.

Experimental and Clinical Endocrinology and Metabolism 104 344-349

Claus R, Wagner A, Lambert T 2005

Characterization of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in testicular tissue of normal and GnRH-immunized boars as a possible regulator of spermatogenesis.

Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes 113 262-268

Claus R, Häußler S, Lacorn M 2007a

Rise of testosterone, nortestosterone, and 17 β -estradiol concentrations in peripheral blood plasma of pigs after sublingual application in vivo.

Food and Chemical Toxicology 45 225-228

Claus R, Lacorn M, Welter H, Lekhkota O, Messe, N, Wagner A, Bergmann M 2007b

Expression of 11 β -hydroxysteroid-dehydrogenase 2 in Sertoli cells of boar testes.

Molecular and Cellular Endocrinology 272 (in press)

Clarke LA & Amaral MD 2003

Protocol for RNase retarding solution for cell samples.

Provided: The European working group on CFTR Expression.

Colenbrander B, Kruip TAM Dieleman SJ Wensing CJG 1977

Changes in serum LH concentrations during normal and abnormal sexual development in the pig.

Biology of Reproduction 17 506-517

Colenbrander B, Macdonald AA, Elsaesser F, Parvizi N, Van de Weil DFM 1982

Response of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone to luteinizing hormone releasing hormone in the fetal pig.

Biology of Reproduction 27 556-561

Colenbrander B, Van de Weil DFM, Van Rossum-Kok CMJE, Wensing CJG 1982

Changes in serum FSH concentrations in the pig during development.

Biology of Reproduction 26 105-109

Colenbrander B, van Rossum-Kok CMJE, Oxender WD, Wensing CJG 1979

The effect of fetal decapitation on the testis and other endocrine organs in the pig

Biology of Reproduction 20 198-204

Conley AJ, Corbin CJ, Hinshelwood MM 1996

Functional aromatase expression in porcine adrenal gland and testis.

Biology of Reproduction 54 497-505

Craig JV 1982

Placental steroid metabolism in late pregnancy.

In: Control of pig reproduction, Butterworth, pp 405-418

De Brabander HF, Hende J, Batjoens P, Hendriks L, Raus J, Smets F, Pottie G, van Ginkel L, Stephany RW 1994

Endogenic nortestosterone in cattle?

Analyst 119 2581-2585

Doody KJ, Lorence MD, Mason JI, Simpson ER 1990

Expression of ribonucleic acid species encoding steroidogenic enzymes in human follicles and corpora lutea throughout the menstrual cycle.

Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 70 1041-1045

Duda M, Burek M, Galas J, Koziol K, Kozirowski M, Slomczynska M 2004

Immunohistochemical localization of androgen receptor and aromatase in the ovary of the pregnant pig.

Reproductive Biology 4(3) 289-298

Dwyer CM, Stickland NC, Fletcher JM 1994

The influence of maternal nutrition on muscle fiber number development in the porcine fetus and on subsequent postnatal growth.

Journal of Animal Science 72 911-917

Ellendorff F, Forsling M, Parvizi N, Williams H, Taverne M, Smidt D 1979

Plasma oxytocin and vasopressin concentrations in response to prostaglandin injection into the pig.

Journal of Reproduction and Fertility 56(2) 573-577

Ellinwood WE, Baughman WL, Resko JA 1980

The effects of gonadoectomy and testosterone treatment on luteinizing hormone secretion in fetal rhesus monkeys.

Endocrinology 107 902-1007

Elsaesser F & Parvizi N 1982

Endokrinologie der sexuellen Differenzierung, der Sexualentwicklung und der Pubertät beim Schwein.

Züchtungskunde 54 325-332

Elsaesser F, Bruhn TO, Parvizi N 1988

Ontogeny of pituitary gonadotrophin secretion in the fetal and post-natal pig in response to LHRH in vitro.

Journal of Reproduction and Fertility 82(1) 71-80

Engelhardt W & Breves G 2005

Physiologie der Haustiere. 2. Auflage; Enke Verlag Stuttgart

Flint AP, Burton RD, Gadsby JE, Saunders PT, Heap RB 1978

Blastocyst oestrogen synthesis and the maternal recognition of pregnancy.

Ciba Foundation Symposium 64 209-238

Ford JJ & Christenson RK 1986

Differentiation of sexual behavior.

Swine in biomedical research (proceedings of a conference on swine in biomedical research) 1 191-200

Ford JJ, Christenson RK, Maurer RR 1980

Serum testosterone concentrations in embryonic and fetal pigs during sexual differentiation.

Biology of Reproduction 23 583-587

Fowden AL 2003

The insulin-like growth factors and feto-placental growth.

Placenta 24 803-812

Fowden AL & Forhead AJ 2001

The role of hormones in intrauterine development.

In: Lung Biology in health and disease, vol. 151, pp 199-228, Barker DJP (Hsg), New York: Marcel Dekker

Fowden AL & Forhead AJ 2004

Endocrine mechanism of intrauterine programming.

Reproduction 127 515-526

Frączek B, Kotula-Balak M, Wojtusiak A, Pierściński A & Bilińska B 2001

Cytochrome P450 aromatase in the testis of immature and mature pigs.

Reproductive Biology 1 51-59.

Framstad T, Gronset D, Norman N 1990

Androgens in fetal pigs in relation to sex of neighbours.

Journal of Veterinary Medicine A 37 45-50

France JT, Magness RR, Murry BA, Rosenfeld CR, Mason JI 1988

The regulation of ovine placental steroid 17 α -hydroxylase and aromatase by glucocorticoids.

Molecular Endocrinology 2 193-199

Garnica AD & Chan WY 1996

The role of the placenta in fetal nutrition and growth.

Journal of American College of Nutrition 15 206-222

Garrett WM & Gurthie HD 1996

Expression of androgen receptors and steroidogenic enzymes in relation to follicular growth and atresia following ovulation in pigs.

Biology of Reproduction 55 949-955

Garrett WM & Guthrie HD 1999

Expression of bcl-2 and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase protein during oocyte and follicle development in fetal and post-natal ovaries.

Reproduction Fertility and Development 11 463-470

Ge R-S, Gao H-B, Nacharaju VL, Gunsalus GL, Hardy MP 1997

Identification of a kinetically distinct activity of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in rat Leydig cells.

Endocrinology 138 2435-2442

George FW & Wilson JD 1978

Conversion of androgen to estrogen by the human fetal ovary.

The Journal Clinical Endocrinology and Metabolism 47 550-555

George FW, Carr BR, Noble JF, Wilson JD 1987

5 alpha-reduced androgens in the human fetal testis.

The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 64(3) 628-30

George FW, Milewich L, Wilson JD 1978

Oestrogen content of the embryonic rabbit ovary.

Nature 274 172-173

George FW & Ojeda SR 1987

Vasoactive intestinal peptide enhances aromatase activity in the neonatal rat ovary before development of primary follicles or responsiveness to follicle-stimulating hormone.

Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84 5803-5807

Gluckmann PD 1986

The endocrine regulation of fetal growth in late gestation: The role of insline-like growth factors.

Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 80(4) 1047-1050

Gondos B & Hobel CJ 1971

Ultrastructure of germ cell development in the human fetal testis.

Zeitschrift für Zellforschung 119 1–20

Goxe B, Prunier A, Remy JJ 1993

Ontogeny of gonadal luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptors in the fetal pig and related changes in gonadotropin and testosterone secretion.

Biology of Reproduction 49 609-616

Greco TL & Payne AH 1994

Ontogeny of expression of the genes for steroidogenic enzymes P450 side-chain cleavage, 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase, P450 17 α -hydroxylase/C17-20 lyase, and P450 aromatase in fetal mouse gonads.

Endocrinology 135 262-268

Gravrieli Y, Shermon Y, Ben-Sasson SA 1992

Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation

Journal of Cellular Biology 11 493-501

Gutscher M, Eder S, Müller M, Claus R 2001

The porcine glucocorticoid receptor: sequencing a 2.1 kb cDNA fragment and raising specific polyclonal antibodies for western blotting, immunoprecipitation and immunohistochemistry.

Animal Science 73 267-278

Haasnoot W, Bruchem GD, Paulussen RJA 1990

Endogenous 19-nortestosterone in biological samples of pigs. Analyses with an enzyme immunoassay and HPLC with on-line immunoaffinity chromatography.

Archiv für Lebensmittelhygiene 41 129-152

Haeussler S, Wagner A, Welter H, Claus R 2007

Changes of testicular aromatase expression during fetal development in male pigs (*sus scrofa*).

Reproduction 133 323-330

Hees H & Sinowatz F 2000

Histologie. Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie. 3. Auflage
Deutscher Ärzte Verlag. Köln

Hess MF & Roser JF 2004

Immunocytochemical localization of cytochrome p450 aromatase in the testis of prepubertal, pubertal, and postpubertal horses.

Theriogenology 61 293-299

Hickey GJ, Chen SA, Besman MJ, Shively JE, Hall PF, Gaddy-Kurten D, Richards JS 1988

Hormonal regulation, tissue distribution and content of aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid and enzyme in rat ovarian follicles and corpora lutea: relationship to estradiol biosynthesis.

Endocrinology 122 1426-1436

Hild-Petito S, West NB, Brenner RM, Stouffer RL 1991

Localization of androgen receptor in the follicle and corpus luteum of the primate ovary during the menstrual cycle.

Biology of Reproduction 44 561-568

Hillier GG, Tetsuka M, Fraser HM 1997

Location and developmental regulation of androgen receptor in primate ovary.

Human Reproduction 12(1) 107-111

Hirai M, Hirata S, Osada T, Hagihara K, Kato J 1994

Androgen receptor mRNA in the rat ovary and uterus.

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 49(1) 1-7

Hoffmann B 1994

Gravidität, Geburt und Puerperium

In: Endokrinologie der Haustiere; Eds: Döcke F

Hoppe U, Holterhus PM, Wunsch L, Jocham D, Drechler T, Thiele S, Marschke C, Hiort O 2006

Tissue-specific transcription profiles of sex steroid biosynthesis enzymes and the androgen receptor.

Journal of Molecular Medicine 84 651-659

Horie K, Takakura K, Imai K, Liao S, Mori T 1992

Immunohistochemical localization of androgen receptor in the human endometrium, decidua, placenta and pathological conditions of the endometrium.

Human Reproduction 7(10) 1461-1466

Hossner KL 2005

Hormonal regulation of farm animal growth.

CABI, Wallingford; 1. Auflage

Hoy S, Gaulty M, Krieter J 2006

Nutztierhaltung und –hygiene. 1. Auflage

Ulmer Verlag Stuttgart

Janning T 1993

Glukokortikoide als katabole Stoffwechselformone: Methodische Entwicklungen und Messungen beim Schwein.

Diplomarbeit Tierhaltung Hohenheim

Kaminski MA, Corbin CJ, Conley AJ 1999

Development and differentiation of the interstitial and tubular compartments of fetal porcine testes.

Biology of Reproduction 60 119-127

Kerr JB & Knell CM 1988

The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis.

Development 103 535–544.

Klemcke HG, McGuire WJ, Christenson RK 1999

Cortisol concentrations in early porcine embryos.

Life science 64 1307-1312

Klemcke HG & Christenson RK 1996

Porcine placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity.

Biology of Reproduction 55 217-223

Klemcke HG & Christenson RK 1997

Porcine fetal and maternal adrenocorticotrophic hormone and corticosteroid concentrations during gestation and their relation to fetal size.

Biology of Reproduction 57 99-106

Knight JW, Bazer FW, Thatcher WW, Franke DE, Wallace HD 1977

Conceptus development in intact and unilaterally hysterectomized-ovariectomized gilts: interrelations among hormonal status, placental development, fetal fluids and fetal growth.

Journal Animal Science 44(4) 620-637

Kolb E 1989

Lehrbuch der Physiologie der Haustiere 5. Auflage Hsg: Kolb E

Fischer Verlag Stuttgart (bearbeitet von Gürtler H)

Koopman P, Munsterberg A, Capel B, Vivian N, Lovell-Badge R 1990

Expression of a caudale sex-determining gene during mouse testis differentiation.

Nature 348 450-452

Kraetzi WD & Weiler U 1998

Erfahrungen mit einem implantierbaren Kathetersystem zur frequenten und chronischen Blutentnahme bei Schafen in Gruppenhaltung und bei säugenden Sauen.

Tierärztliche Umschau 53 567-574.

Kräusslich H 1981

Rinderzucht 6. Auflage Ulmer Verlag Stuttgart (unter Mitarbeit von R Claus)

Kusakabe M, Nakamura I, Young G 2003

11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase complementary deoxyribonucleic acid in rainbow trout: cloning, sites of expression, and seasonal changes in gonads.

Endocrinology 144 2534-2545

Kwon S, Hess RA, Bunich D, Nitta H, Janulie L, Osawa Y, Baw JM 1995

Rooster testicular germ cells and epididymal sperm contain P450 aromatase.

Biology of Reproduction 53 1259-1264

Lambard S, Galeraud-Denis I, Bouraima H, Bourguiba S, Chocat A, Carreau S 2003

Expression of aromatase in human ejaculated spermatozoa: a putative marker of mortality.

Molecular and Human Reproduction 9 117-124

Lambard S, Silandre D, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bourguiba S & Carreau S 2005

Aromatase in testis: Expression and role in male reproduction.

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 95 63-69

Le Bizec B, Monteau F, Gaudin I, André F 1999

Evidence for the presence of endogenous 19-norandrosterone in human urine.

Journal of Chromatography B 723 157-172

Liebich H-G 1990

Funktionelle Histologie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis.

1. Auflage Schattauer Stuttgart

Lino BF 1971

Cell count correction factors for the quantitative histological analysis of the germinal epithelium of the ram.

Anatomical Records 170 413-419

Livak KJ & Schmittgen TD 2001

Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

Methods 25 402-405

Loeffler K 1994

Anatomie und Physiologie der Haustiere.

9. Auflage Verlag Eugen Ulmer Stuttgart

Lohse JK & First NL 1981

Development of the porcine fetal adrenal in late gestation.

Biology of Reproduction 25 181-190

Magness RR, Christenson RK, Ford SP 1983

Ovarian blood flow throughout the estrus cycle and early pregnancy in sows.

Biology of Reproduction 28 1090-1096

Mc Coard SA, Lunstra DD, Wise TH, Ford JJ 2001

Specific staining of sertoli cell nuclei and evaluation of sertoli cell number and proliferative activity in Meishan and white composite boars during the neonatal period.

Biology of Reproduction 64 689-695

Mc Coard SA, Wise TH, Ford JJ 2002

Expression levels of Mullerian-inhibiting substance, GATA4 and 17 α -hydroxylase/17,20-lyase cytochrome P450 during embryonic gonadal development in two diverse breeds of swine.

Journal of Endocrinology 175 365-374

Mc Coard SA, Wise TH, Ford JJ 2003a

Germ cell development in meishan and white composite gilts.

Animal Reproduction Science 77 85-105

Mc Coard SA, Wise TH, Lunstra DD, Ford JJ 2003b

Stereological evaluation of sertoli cell ontogeny during fetal and neonatal life in two diverse breeds of swine.

Journal of Endocrinology 178 395-403

McNeil CJ, Nwagwu MO, Finch AM, Page KR, Thain A, McArdle HJ, Ashworth CJ 2007

Glucocorticoid exposure and tissue gene expression of 11 β HSD1, 11 β HSD2 and glucocorticoid receptor in a porcine model of differential fetal growth.

Reproduction 133 653-661

Medh RD & Thompson EB 2000

Hormonal regulation of physiological cell turnover and apoptosis.

Cell and Tissue Research 301 101-124

Mentschel J, Leiser R, Mülling C, Pfarrer C, Claus R 2001

Butyric acid stimulates rumen mucosa development in the calfs mainly by a reduction of apoptosis.

Archive of Animal Nutrition 55 85-102

Michael RP & Zumpe D 1978

Animal cycles of aggression and plasma testosterone in captive male rhesus monkeys.

Psychoneuroendocrinology 3 217-220

Milewich L & Axelrod LR 1977

Testosterone metabolism by placental microsomes from baboons. Identification of 19-nortestosterone and 19-nor-4-androstenedione.

Journal of Steroid Biochemistry 10 241-243

Monder C 1990

Characterization and biological significance of corticosteroid 11 β -dehydrogenase, the oxidizing component of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase.

Annals of the New York Academy of Science 595 26–39

Moon YS & Hardy MH 1973

The early differentiation of the testis and interstitial cells in the fetal pig, and its duplication in organ culture.

American Journal of Anatomy 138 253-268

Moore KL 1990

Embryologie. Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen.

3. Auflage Schattauer Stuttgart New York

**Musser RE, Davis DL, Dritz SS, Tokach MD, Nelssen JL, Minton JE, Goodband RD
2004**

Conceptus and maternal responses to increased feed intake during early gestation in pigs.

Journal of Animal Science 82 3154-3161

Münster E 1983

Erzeugung und Charakterisierung von Antiseren gegen Steroidhormone.

Diplomarbeit Universität Hohenheim Institut für Tierhaltung

**Nitta H, Bunick D, Hess RA, Janulis L, Newton SC, Millette CF, Osawa Y, Shizuta Y,
Toda K, Bahr JM 1993**

Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase.

Endocrinology 132(3) 1396-401

Noblet J, Close WH, Heavens PR, Brown D 1985

Studies on the energy metabolism of the pregnant sow. 1. Uterus and mammary tissue development.

British Journal of Nutrition 53 251

Oxender WD, Colenbrander B, van de Weil DFM, Wensing CJG 1979

Ovarian development in fetal and prepubertal pigs.

Biology of Reproduction 21 715-721

Over R 1992

Physiologische Wirkungen und Arbeiten zur Isolierung der Pheromone von Ziegen- und Schafböcken.

Dissertation Universität Hohenheim, Institut für Tierhaltung

Parvizi N 2006

Foetal and neonatal development of luteinising hormone and its regulatory systems in the pig.

Society of Reproduction and Fertility Supplement 62 19-32

Pellicer EM & Sundblad A 1994

Antigen retrieval by microwave oven with buffer of citric acid.

Medicina (B Aires) 54(2) 129-132

Pelliniemi LJ 1975

Ultrastructure of the early ovary and testis in pig embryos.

American Journal of Anatomy 144 89-112

Pelliniemi LJ, Kellokumpu-Lehtinen PL, Dym M 1979

Development of the testes.

Duodecim 95(16) 940-946

Pentikäinen V, Erkkilä K, Suomalainen L, Parvinen M, Dunkel L 2000

Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro.

Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 85(5) 2057-2067

Perry JS & Rowell JG 1969

Variations in foetal weight and vascular supply along the uterine horn of the pig.

Journal of Reproduction and Fertility 19(3) 527-534

Plonait H 2001

Fortpflanzungsphysiologie und Gynäkologie der Sau. In: Lehrbuch der Schweinekrankheiten. Waldmann & Wendt Parey Verlag 3. Auflage

Pond WG & Mersmann HJ 2001

Biology of the domestic pig.

Ithaca, NY Comstock Publishing

Quirke LD, Juengel JL, Tisdall DJ, Lun S, Heath DA, McNatty KP 2001

Ontogeny of steroidogenesis in the fetal sheep gonad.

Biology of Reproduction 65 216-228

Raeside JI & Sigman DM 1975

Testosterone levels in early fetal testes of domestic pigs.

Biology of Reproduction 13 318-321

Raeside JI 1983

Gonadotrophic stimulation of androgen secretion by the early fetal pig ovary in organ culture.

Biology of Reproduction 28 128-133

Raeside JI, Berthelon MC, Sanchez P, Saez JM 1988

Stimulation of aromatase activity in immature porcine leydig cells by fibroblast growth factor (FGF).

Biochemical and Biophysical Research Communications 151 163-169

Raeside JI, Renaud RL, Friendship RM 1989

Aromatization of 19-norandrogens by porcine leydig cells.

Journal of steroid Biochemistry 32(5) 729-735

Raeside JI, Wilkinson CR, Farkas G 1993

Ontogenesis of estrogen secretion by porcine fetal testes.

Acta Endocrinologica 128 549-554

Raeside JI, Christie HL, Renaud RL 1999

Metabolism of oestrone and oestradiol-17 β to conjugated steroids by the accessory sex glands of the male pig.

Journal of Endocrinology 163(1) 49-53

Rasmussen R 2001

Quantification on the LightCycler. In: Meurer S, Wittwer C, Nakagawara K, eds. Rapid Cycle Real time PCR, Methods and Applications. Springer Press, Heidelberg 21-34 ISBN 3-540-66736-9

Reeds PJ, Burrin DG, Davis TA, Fioretto ML 1993

Postnatal growth of gut and muscle: competitors or collaborators.

Proceedings of Nutritional Society 52 57-67

Rigaudière N 1982

Testosterone and dihydrotestosterone in amniotic fluid and foeto-placental membranes from the guinea pig.

Acta Endocrinologica 100 301-307

Robertson HA & King GJ 1974

Plasma concentrations of progesterone, oestrone, oestradiol-17 β and of oestrone sulphate in the pig at implantation, during pregnancy, and at parturition.

Journal of Reproduction and Fertility 40 133-142

Robertson HA, Dwyer RJ, King GJ 1985

Oestrogens in fetal and maternal fluids throughout pregnancy in the pig and comparisons with the ewe and cow.

Journal of Endocrinology 106 355-360

Rhode Parfet KA, Lamberson WR, Rieke AR, Cantley TC, Ganjam VK, vom Saal FS, Day BN 1990

Intrauterine position effects in male and female swine: subsequent survivability, growth rate, morphology and semen characteristics.

Journal of Animal Science 68 179-185

Romeis B 1989

Mikroskopische Technik. 17th edn, ch 5, pp 113-133. P Böck. München Wien Baltimore: Urban und Schwarzenberg.

Rose RM, Holaday JW, Bernstein IS 1971

Plasma testosterone, dominance rank and aggressive behaviour in male rhesus monkeys.

Nature 231 366-368

Roselli CE, Resko JA, Stormshak F 2003

Estrogen synthesis in fetal sheep brain: Effect of maternal treatment with an aromatase inhibitor

Biology of Reproduction 68 370-374

Rüsse I & Sinnowatz F 1991

Lehrbuch der Embryologie der Haustiere.

Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg

Sahlin L, Norstedt G, Eriksson H 1994

Androgen regulation of the insulin-like growth factor-1 and the estrogen receptor in rat uterus and liver.

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 51 57-66

Salacinsky PR, McLean C, Sykes JE, Clement-Jones VV, Lowry PJ 1981

Iodination of proteins, glycoproteins and peptides using a solid-phase oxidizing agent, 1,3,4,6-tetrachloro-3 α ,6 α -diphenyl glycouril (Iodogen).

Analytical Biochemistry 117 136-146

Sanglid PT, Fowden AL, Trahair JF 2000

How does the foetal gastrointestinal tract develop in preparation for enteral nutrition after birth?

Livestock Production Science 66 141-150

Sawyer HR, Smith P, Heath DA, Juengel JL, Wakefield SJ, McNatty KP 2002

Formation of ovaries and follicles during fetal development in sheep.

Biology of Reproduction 66 1134-1150

Schmidt W 1992

Amniotic fluid. in: the amniotic fluid compartment.

Springer; ISBN 3-540-55162-X

Schnorr B 1996

Embryologie der Haustiere.

3. Auflage, Stuttgart: Enke Verlag

Schweikert HU & Romalo G 1990

Syndromes caused by androgen resistance.

In: Testosterone. Action, deficiency, substitution. Hsg: Nieschlag E, Behre HM

Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York

Sharpe PM, Haynes NB, Buttery PJ 1986

Glucocorticoid status and growth. in: Control and manipulation of animal growth;

Herausgeber: Buttery PJ, Haynes NB, Lindsay DB. Butterworths London, Boston, Durban, Singapore, Sydney, Toronto, Wellington

Sherwood OD 1982

Relaxin at parturition in the pig.

In: Control of reproduction, Butterworth, 343-376

Sholl SA 1982

Estrogen synthetase and C17-20lyase activity in the fetal monkey gonad.

Journal of Steroid Biochemistry 16(2) 141-145

Silver M 1990

Prenatal maturation, the timing of birth and how it may be regulated in domestic animals.

Experimental Physiology 75 285–307

Sipahutar H, Sourdain P, Moslemi S, Plainfosse B, Seralini GE 2003

Immunolocalization of aromatase in stallion leydig cells and seminiferous tubules.

Journal of Histochemistry and Cytochemistry 51 311-318

Slomczynska M & Tabarowski Z 2001

Localization of androgen receptor and cytochrome P450 aromatase in the follicle and corpus luteum of the porcine ovary.

Animal Reproduction Science 65 127-134

Spindler K-D 1997

Vergleichende Endokrinologie.

1. Auflage Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York

Suzuki T, Sasano H, Tamura M, Aoki H, Fukaya T, Yajima A, Nagura H, Mason JI 1993

Temporal and spatial localization of steroidogenic enzymes in premenopausal human ovaries: in situ hybridization and immunohistochemical study.

Molecular and cellular Endocrinology 97(1-2) 135-143

Tetsuka M & Hillier SG 1996

Androgen receptor gene expression in rat granulosa cells: the role of follicle-stimulating hormone and steroid hormones.

Endocrinology 137(10) 4392-4397

Tsai-Morris CH, Knox GF, Dufau ML 1988

Gonadotropin induction of a regulatory mechanism of steroidogenesis in fetal leydig cell cultures.

Journal of Steroid Biochemistry 29 285-291

Tsai-Morris C, Aquilano DR, Dufau ML 1985

Cellular localization of rat testicular aromatase activity during development.

Endocrinology 116 38-46

Tseng JK, Sun B, Tseng L 1988

The effect of progestin on rabbit endometrial aromatase activity.

Journal of steroid Biochemistry 29(1) 9-13

Toth M & Zakar T 1982

Different binding of testosterone, 19-nortestosterone and their 5 α reduced derivatives to the androgen receptor of the rat seminal vesicle: a step toward the understanding of the anabolic action of nortestosterone.

Endokrinologie 80(2) 163-172

Tower BB, Sigel MB, Poland RE, VanderLaan WP, Rubin RT 1980

The talc-resin-trichloroacetic acid test for screening radioiodinated polypeptide hormones

Methods Enzymology 70(A) 322-34

Vandenbroeck M, Van Vyncht G, Gaspar P, Dasnois C, Delahaut P, Pelzer G, Graeve J, Maghuin-Rogister G 1991

Identification and characterization of 19-nortestosterone in urine of meat producing animals.

Journal of Chromatography 564(2) 405-412

Van der Lende T, Knol EF, Leenhouders JI 2001

Prenatal development as a predisposing factor for perinatal losses in pigs.

Reproduction supplement 58 247-261

Van Straaten HWM & Wensing CJG 1977

Histomorphometric aspects of testicular morphogenesis in the pig.

Biology of Reproduction 17 467-472

Van Straaten HWM & Wensing CJG 1978

Leydig cell development in the testis of the pig.

Biology of Reproduction 18 86-93

Van Vorstenbosch C, Colenbrander B, Wensing CJG 1982

Leydig cell development of pig testis in the early fetal period: an ultrastructural study.

American Journal of Anatomy 165 305-318

Van Vorstenbosch CJAHV, Colenbrander B, Wensing CJG 1984

Leydig cell development in the pig testis during the late fetal and early postnatal period: an electron microscopic study with attention to the influence of fetal decapitation.

American Journal of Anatomy 169 121-136

Van Vorstenbosch CJAHV, Spek E, Colenbrander B, Wensing CJG 1987

The ultrastructure of normal fetal and neonatal pig testis germ cells and the influence of fetal decapitation on the germ cell development.

Development 99 553-563

Vendola K, Zhou J, Wang J, Oluyemisi A, Famuyiwa A, Bievre M, Bondy CA 1999

Androgens promote oocyte insulin-like growth factor I expression and initiation of follicle development in the primate ovary.

Biology of Reproduction 61 353-357

Verhagen S 1998

Microscopical study of cell death via apoptosis.

European Microscopical Analysis 31-33

Vom Saal FS & Bronson 1980

Sexual characteristics of adult female mice are correlated with their blood testosterone levels during prenatal development.

Science 208(4444) 597-599

Vom Saal FS, Grant WM, McMullen, Layes KS 1983

High fetal estrogen concentrations: correlation with increased adult sexual activity and decreased aggression in male mice.

Science 220(4603) 1306-1309

Wagner A 2005

Erfassung der Bedeutung von FSH und Östrogenen für die Spermatogenese GnRH-immunisierter Eber

Dissertation Universität Hohenheim, Institut für Tierhaltung

Wagner A, Messe N, Bergmann M, Lekhkota O, Claus R 2005

Effects of Estradiol Infusion in GnRH Immunized Boars on Spermatogenesis.

Journal of Andrology 27 880-889

Wagner A & Claus R 2004

Glucocorticoids are involved in testicular involution after active immunization in boars against GnRH.

Reproduction 127 275-283

Waldmann K-H & Wendt M 2001

Lehrbuch der Schweinekrankheiten. (Hsg K-H Waldmann)

3. Auflage; Parey Berlin

Wang R-A, Nakane PK, Koji T 1998

Autonomous cell death of mouse male germ cells during fetal and postnatal period.

Biology of Reproduction 58 1250-1256

Weihua Z, Ekman J, Almkvist A, Saji S, Wang L, Warner M, Gustafsson J-A 2002

Involvement of androgen receptor in 17 β - estradiol induced cell proliferation in rat uterus.

Biology of Reproduction 67 616-623

Welsh TH, Bambino TH, Hsueh AJM 1982

Mechanism of glucocorticoid-induced suppression of testicular androgen biosynthesis.

Biology of Reproduction 27 1138-1146

Weniger JP 1990

Aromatase activity in fetal gonads of mammals.

Journal of Developmental Physiology 14 303-306

Weniger JP, Chouraqi J, Zeis A 1984

Conversion of testosterone and progesterone to oestrone by the ovary of the rat embryo in organ culture.

Journal of Steroid Biochemistry 21(3) 347-349

Wesley M, Garrett WM, Guthrie HD 1999

Expression of Bcl-2 and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase protein during oocyte and follicle development in fetal and post-natal ovaries.

Reproduction, Fertility and Development 11 463-470

Wilson ME & Ford SP 2001

Comperative aspects of placental efficiency.

Reproduction Supplement 58 223-232

Winter JSD, Ellsworth L, Fuller G, Hobson WC, Reyes FI, Faiman C 1987

The role of gonadal steroids in feedback regulation of gonadotropin secretion at different stages of primate development.

Acta Endocrinologica 114 257-268

Wise TH & Christenson RK 1992

Relationship of fetal position within the uterus to fetal weight, placental weight, testosterone, estrogens and thymosin β 4 concentrations at 70 and 104 days of gestation in swine.

Journal of Animal Science 70 2787-2793

Wise T, Roberts AJ, Christenson RK 1997

Relationships of light and heavy fetuses to uterine position, placental weight, gestational age, and fetal cholesterol concentrations.

Journal of Animal Science 75 2197-2207

Yang K 1997

Placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase: barrier to maternal glucocorticoids.

Reviews of Reproduction 2 129-132

Yong EL, Ghadessy F, Wang Q, Mifsud A, Ng SC 1998

Androgen receptor transactivation domain and control of spermatogenesis.

Reviews of Reproduction 3 141-144

Zeifang A 2000

Einfluß des Splitweaning auf die pulsatile LH Freisetzung und das Wiederingangkommen des Zyklus nach dem Absetzen bei der Sau

Dissertation Universität Hohenheim; Institut für Tierhaltung

Zuckerman S & Baker TG 1977

The Ovary. Vol 1, Chap. 2, 3 Eds. Zuckerman S & Weir BJ
Academic Press, London

Danksagung

Danke sagen möchte ich vor allem Herrn Prof. Dr. Claus, dass er mir die Möglichkeit gab, diese Arbeit durchzuführen. Für seine ständige Hilfsbereitschaft, die vielen Ratschläge und wissenschaftlichen Anregungen, aber auch für das nette Arbeitsklima möchte ich mich recht herzlich bedanken.

Ein grosses Dankeschön an Frau Dr. A. Wagner, die mir stets mit Rat und Tat zu Hilfe kam und immer zu Diskussionen bereit war. Für das Korrekturlesen am Ende der Arbeit möchte mich nochmals ausdrücklich bei ihr bedanken.

Herr Dr. M. Lacorn sowie Herr Dr. H. Welter danke ich für die Hilfestellung in analytischen und molekularbiologischen Laborfragen.

Bei Helga Hägele möchte ich mich besonders für ihren Einsatz bei der Durchführung der immuncytochemischen Methoden bedanken. Steffi Mayer und Sybille Knöllinger ein ganz liebes Dankeschön für die Unterstützung in der Analytik, sowie Jessica Bzyl und Carmen Ostertag für die Hilfe bei den molekularbiologischen Methoden.

Mein Dank gilt auch C. Fischinger, W. Dunne und M. Mecellem für die gute Betreuung der Versuchstiere.

Allen, die bei der Fötenentnahme mitgemacht haben sei an dieser Stelle herzlich gedankt, ohne ihre Unterstützung wäre diese Arbeit nicht gelungen.

Für die Bewilligung des Stipendiums und der damit verbundenen finanziellen Unterstützung, danke ich der Landesgraduiertenförderung Baden-Württemberg.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich in jeder Weise in meiner Arbeit unterstützt und mir diese Ausbildung ermöglicht haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Susanne Häußler
Geburtstag: 4.12.1976
Geburtsort: Reutlingen

Schulbildung

09/1983 – 07/1987 Grundschule, Gönningen
09/1987 – 07/1996 Johannes-Kepler-Gymnasium, Reutlingen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

10/1997 – 12/2002 Studium der Allgemeinen Agrarwissenschaften an der Universität Hohenheim, mit der Vertiefungsrichtung Tierproduktion
02/2002 – 12/2002 Diplomarbeit am Institut für Tierhaltung und Tierzucht der Universität Hohenheim, am Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie
19. 12. 2002 Diplom in Agrarwissenschaften
01/2004 – 08/2006 Stipendiatin der Landesgraduiertenförderung
01/2004 – 07/2007 Promotion am Institut für Tierhaltung und Tierzucht der Universität Hohenheim, am Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie

Praktika:

08/1996 – 07/1997 Praktikum bei der Körperbehinderten-Förderung Neckar-Alb:
04/2000 – 09/2000 Studium begleitendes Praktikum auf einem staatlich anerkannten Milchviehbetrieb in Niedersachsen

Publikationen:

Haeussler S, Wagner A, Welter H, Claus R 2007

Changes of testicular aromatase expression during fetal development in male pigs (*sus scrofa*).

Reproduction 133 323-330

Haeussler S & Claus R 2007

Expression of the glucocorticoid receptor and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 in pig testes cells along fetal development.

Reproduction, Fertility and Development 19 664-669

Claus R, Häußler S, Lacorn M 2007

Rise of testosterone, nortestosterone, and 17 β -estradiol concentrations in peripheral blood plasma of pigs after sublingual application in vivo.

Food and Chemical Toxicology 45 225-228

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation von mir selbständig angefertigt wurde und dabei lediglich die angegebenen Quellen als Hilfsmittel verwendet wurden. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen wurden als solche gekennzeichnet.

Stuttgart-Hohenheim, 14. Juni 2007