
Kolokalisation von ABP und Oxytocin im männlichen Reproduktionstrakt der Ratte

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Sebastian Weigel
geboren am 2. April 1981 in Rudolstadt

Erster Gutachter:.....

Zweiter Gutachter:.....

Dritter Gutachter:.....

Tag der öffentlichen Verteidigung:.....

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	Seite 1
2. Zusammenfassung	Seite 3
3. Einleitung	Seite 5
3.1. Der Reproduktionstrakt der Ratte	Seite 5
3.2.. Steroide und SHBGs	Seite 8
3.2.1.. Steroidhormone	Seite 8
3.2.2. ABP/SHBG	Seite 9
3.2.3. Wirkungsweise der Steroide	Seite 11
3.3. Oxytocin	Seite 15
3.3.1. Hormonelles und intrinsisches Oxytocin	Seite 15
3.3.2. Funktionen	Seite 16
3.3.3. Oxytocin-Rezeptor	Seite 17
3.3.4. Oxytocin in der Samenflüssigkeit	Seite 18
3.3.5. Oxytocin in der Prostata	Seite 19
4. Ziele der Arbeit	Seite 22
5. Material und Methoden	Seite 23
5.1. Präparation und Fixierung der Gewebe	Seite 23
5.1.1. Tierpräparation	Seite 23
5.1.2. Herstellung der Gewebeschnitte	Seite 24
5.2. Immunhistochemische Untersuchungsmethoden	Seite 25
5.2.1. Einfache immunzytochemische Markierung mit DAB	Seite 25

5.2.2.	Immunzytochemische Doppelmarkierung	Seite 27
5.2.3.	Auswertung der immunzytochemischen Ergebnisse	Seite 29
5.3.	Biochemische Untersuchungsmethoden	Seite 30
5.3.1.	Affinitätschromatographie für ABP	Seite 30
5.3.2.	Westernblot-Analyse	Seite 31
5.3.3.	SELDI-TOF MS	Seite 33
5.3.4.	Auswertung der biochemischen Ergebnisse	Seite 34
5.4.	In situ Hybridisierung	Seite 35
5.4.1.	Auswertung der in situ Hybridisierung	Seite 38
5.5.	Verwendete Geräte und Chemikalien	Seite 38
6.	Ergebnisse	Seite 40
6.1.	Immunzytochemische Untersuchungen	Seite 40
6.1.1.	Einfache immunzytochemische Markierung mit DAB	Seite 40
6.1.2.	Immunzytochemische Doppelmarkierung	Seite 46
6.2.	Biochemische Untersuchungen	Seite 47
6.2.1.	Affinitätschromatographie	Seite 47
6.2.2.	Westernblot	Seite 48
6.2.3.	SELDI-TOF MS	Seite 49
6.3.	In situ Hybridisierung	Seite 52
7.	Diskussion	Seite 54
7.1	Etablierung der Methoden	Seite 54
7.2.	ABP	Seite 55
7.3.	Oxytocin	Seite 58

7.4. Kolokalisation	Seite 60
8. Schlussfolgerungen	Seite 62
9. Literatur- und Quellenverzeichnis	Seite 63
10. Anhang	Seite 89
10.1. Lebenslauf	Seite 89
10.2. Danksagung	Seite 91
10.3. Ehrenwörtliche Erklärung	Seite 92

1. Abkürzungsverzeichnis

aABP	Antikörper gegen ABP
aOT	Antikörper gegen OT
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
kDa	Kilodalton
mRNA	messenger-RNA
tRNA	transfer-RNA
Abb.	Abbildung
ABP	Androgenbindendes Protein (androgen-binding protein)
AR	Androgenrezeptor
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BPH	Prostataadenom (benign prostatic hyperplasia)
BrdU	5'-Bromo-2'desoxy-Uridin
BSA	Rinder-Serumalbumin (bovine serum albumin)
CY2	grüner Fluoreszenzfarbstoff
CY3	roter Fluoreszenzfarbstoff
DAB	Diaminobenzidin
DHT	Dihydrotestosteron
E	Östrogen (estrogen)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (ethylene diamine tetraacetic acid)
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
F_{a,b}	variabler Anteil des Antikörpers
F_c	konstanter Anteil des Antikörpers (artspezifisch)
H4	Chip mit hydrophober Oberfläche (hydrophobic surface chip)
HNS	menschliches Blutserum (human normal serum)
HPLC	Hochleistungschromatographie (high performance liquid chromatography)
KG	Kurvengipfel
MABS	Maleinsäure
NIH	National Institutes of Health
OT	Oxytocin

OTR	OT-Rezeptor
PKA	Proteinkinase A
PFA	Paraformaldehyd
PBSTX	PBS mit 0,05% Triton X
PAP	Peroxidase anti Peroxidase
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered salt solution)
PSA	prostataspezifisches Antigen (prostate specific antigen)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNS	Blutserum des Kaninchens (rabbit normal serum)
SAX2	starker Anionenaustauscher (strong anion exchanger)
SHBG	Sexhormonbindendes Globulin (sex hormone-binding globulin)
SHBGR	SHBG-Rezeptor
SELDI-TOF MS	surface-enhanced laser desorption ionization time of flight mass spectrometry
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SSC	5x standard saline citrat
TEA	Triethanolamin
TEN	Tris+ EDTA+ NaCl
WCX	schwacher Kationenaustauscher (weak cation exchanger)

2. Zusammenfassung

Vor etwa 40 Jahren wurden Oxytocin (OT) und das sex hormone-binding globulin (SHBG) erstmals charakterisiert, später auch das androgen-binding protein (ABP) als Isoform von SHBG. Wegen ihrer großen Bedeutung im gesamten Organismus sind beide Verbindungen ein aktueller Forschungsschwerpunkt. Diese Arbeit beschäftigt sich mit deren Kolokalisation im männlichen Reproduktionstrakt der Ratte.

Es ist bekannt, dass SHBG nicht nur die Halbwertszeit von Sexualhormonen verlängert, sondern höchstwahrscheinlich auch als SHBG-Hormon-Komplex über einen membranständigen Rezeptor eine second messenger Kaskade auslöst, zum Beispiel zur Regulation der Synthese von intrazellulären Steroidhormonrezeptoren. OT hat neben dem Einfluss auf die Kontraktion der glatten Muskulatur auch Einfluss auf die 5 α -Reduktase-Aktivität, die Testosteron seine aktivere Form DHT umwandelt. OT- und OT-Rezeptor-Synthese werden durch Steroide reguliert. Es wird eine Beziehung zwischen dem SHBG- und dem OT-Rezeptor vermutet und in diesem Zusammenhang ein Modell beschrieben.

Verschiedene Quellen zeigten uns die Beziehungen zwischen OT und Dihydrotestosteron (DHT) bzw. zwischen ABP und DHT in der Prostata. Deshalb versuchten wir, diesen Zusammenhang zwischen ABP und OT erstmals mit Hilfe einer Kolokalisation mit den Fluoreszenzfarbstoffen CY2 und CY3 lichtmikroskopisch darzustellen. Für die Kontrolle der α ABP und die qualitative Analyse des Proteins führten wir den Westernblot und die SELDI-TOF MS durch. Die in situ Hybridisierung sollte die lokale Expression von ABP demonstrieren.

Mit Hilfe der SELDI-TOF MS fanden wir ABP in allen Lappen der Prostata, im Testis, im Prostatasekret und im Ductus deferens. Immunzytochemisch konnten wir ABP und erstmals auch OT in allen Lappen der Prostata, im Prostatasekret und im Ductus deferens nachweisen. Beim Vergleich der Folgeschnitte stimmten die Lokalisationsorte der beiden Hormone überein. Die Ergebnisse der Doppelfärbung mit den Fluoreszenzfarbstoffen bestätigten ihre Koexistenz. Mit der in situ Hybridisierung zeigten wir erstmals, dass ABP in den Zellen der Prostata und in den Leydig-Zwischenzellen des Testis synthetisiert wird.

Mit den morphologischen Ergebnissen dieser Arbeit kann man Rückschlüsse auf physiologische Mechanismen ziehen. ABP im männlichen Reproduktionstrakt wahrscheinlich eine zentrale Rolle, weitestgehend unabhängig vom klassischen Steroidrezeptormodell. Das bestehende Modell eines nukleären Rezeptors für Androgene erklärt die Wirkmechanismen nur unvollständig. Auch OT scheint im männlichen Reproduktionstrakt eine große Rolle zu spielen. Auf diesem Gebiet ergänzen wir ältere morphologische Ergebnisse, so dass inzwischen in allen Geweben des männlichen Reproduktionstrakts OT nachgewiesen werden konnte. Neben dem Einfluss auf die glatte Muskulatur und die 5 α -Reduktase-Aktivität spielt es eine Rolle im Wachstum der Prostata.

Die Kollokalisierung von ABP und OT in den Organen des männlichen Reproduktionstrakts stützt die Hypothese, dass beide interagieren. Eine Interaktion kann nicht nur in physiologischen, sondern auch in pathophysiologischen Prozessen eine Rolle spielen, zum Beispiel in der Pathogenese der benign prostatic hyperplasia (BPH). Für BPH gibt es verschiedene medikamentöse Therapieansätze, wie Phytopharmaka, Aromatasehemmstoffe, 5 α -Reduktase-Hemmer oder α_1 -Blocker. In vitro Experimente haben den Einfluss von Phytopharmaka auf SHBG gezeigt und bestätigen damit die Theorie vom SHBG-Einfluss auf die Pathogenese von BPH. Die Aufklärung des Wirkmechanismus von ABP und OT kann hilfreich in der Aufklärung der Pathogenese von BPH sein und neuere und bessere Therapieansätze bieten.

3. Einleitung

3.1. Der Reproduktionstrakt der Ratte

Definition

Der männliche Reproduktionstrakt ist die Gesamtheit aller, der Arterhaltung und dem Geschlechtsverkehr dienenden männlichen Geschlechtsorgane. Dort werden Keimzellen gebildet, aufbewahrt und weitergeleitet (Pschyrembel 2002). Die männlichen Geschlechtsorgane werden in äußere, im Einzelnen Skrotum und Penis, und innere eingeteilt. Zu den inneren Geschlechtsorganen gehören der Testis, der Epididymis, der Ductus deferens und die Glandulae genitales accessoriae (Vesicula seminalis, Prostata und Glandula bulbourethralis) (Junqueira und Carneiro 1996).

Makroskopische Anatomie

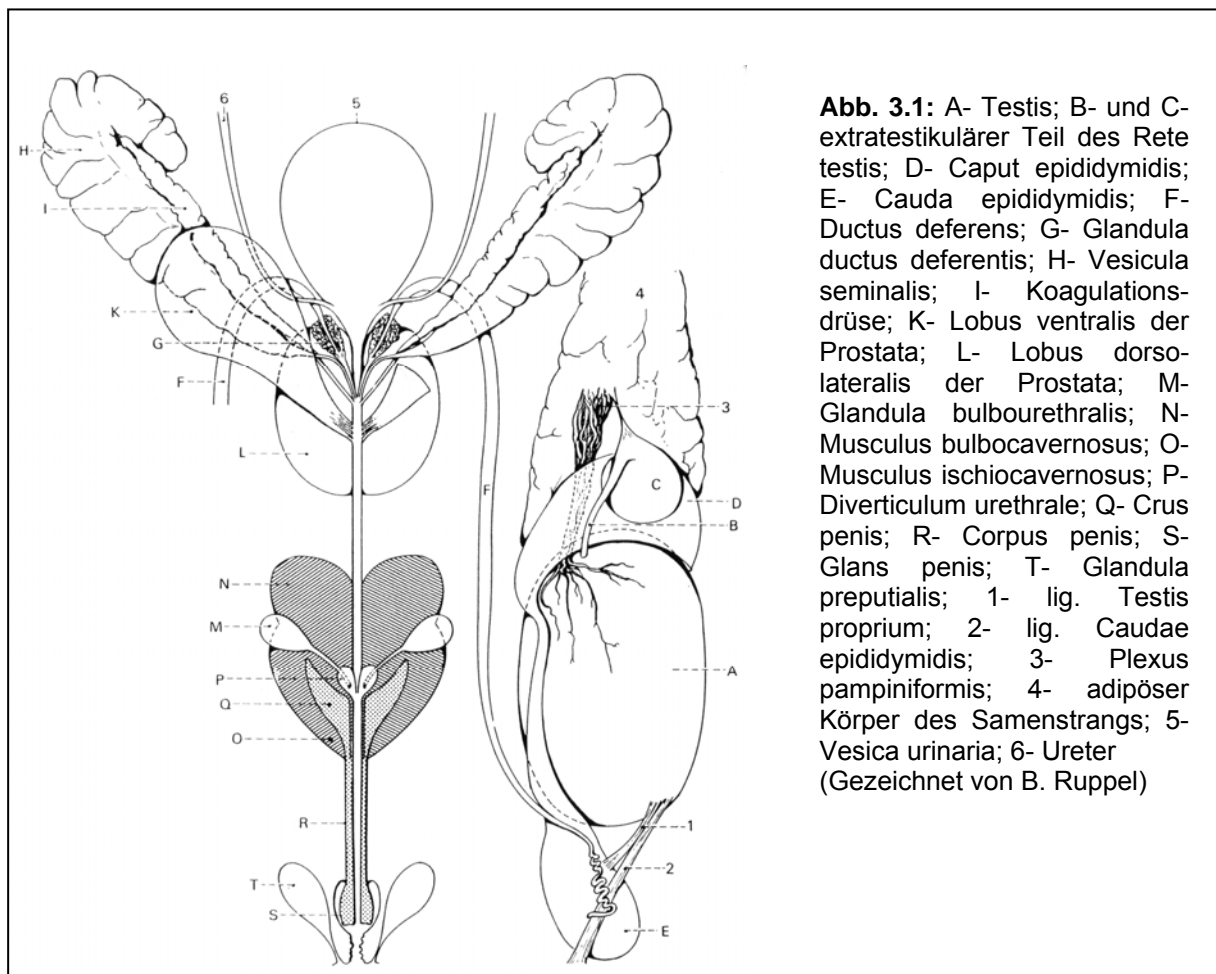


Abb. 3.1: A- Testis; B- und C- extratestikulärer Teil des Rete testis; D- Caput epididymidis; E- Cauda epididymidis; F- Ductus deferens; G- Glandula ductus deferentis; H- Vesicula seminalis; I- Koagulationsdrüse; K- Lobus ventralis der Prostata; L- Lobus dorso-lateralis der Prostata; M- Glandula bulbourethralis; N- Musculus bulbocavernosus; O- Musculus ischiocavernosus; P- Diverticulum urethrale; Q- Crus penis; R- Corpus penis; S- Glans penis; T- Glandula preputialis; 1- lig. Testis proprium; 2- lig. Caudae epididymidis; 3- Plexus pampiniformis; 4- adipöser Körper des Samenstrangs; 5- Vesica urinaria; 6- Ureter (Gezeichnet von B. Ruppel)

Die oben stehende Abbildung zeigt die makroskopische Anatomie des Reproduktionstraktes der Ratte. Es gibt einige Unterschiede zu den menschlichen Geschlechtsorganen, wie der etwas andere Aufbau der Prostata. Trotzdem ist die Ähnlichkeit sowohl in der makroskopischen als auch in der mikroskopischen Anatomie bei allen Säugetieren sehr groß. Deshalb kann man aus Ergebnissen von Experimenten an Tieren Parallelen zum Menschen ziehen. Für die Wahl der Ratte als Versuchsmodell sprachen zwei Gründe. Zum Einen ist die Beschaffung von Untersuchungsmaterial leicht, zum Anderen kann durch den künstlich herbeigeführten Tod das Gewebe sofort fixiert werden.

Mikroskopische Anatomie

Der Reproduktionstrakt der Ratte unterscheidet sich histologisch kaum von dem des Menschen. Ich möchte im Folgenden auf die Histologie der verschiedenen Gewebe näher eingehen.

1) Testis:

Der Testis der erwachsenen Ratte ist ca. 20mm lang, hat einen Durchmesser von ca. 14mm und wiegt 2-3,5g (Caster et al. 1956). Am kaudalen Pol des Testis entspringt das Gubernaculum testis. Es besteht aus zwei Teilen, dem Ligamentum proprium, welches den Testis mit der Cauda epididymidis verbindet, und dem Ligamentum caudae epididymidis, welche in den externen Cremaster einstrahlt. Die Tunica albuginea besteht aus zwei Blättern gleicher Stärke. Am kaudalen Pol ist sie 35-40µm dick, an den Seiten 20µm und am kranialen Pol aufgrund großer Venen 170µm (Roosen-Runge 1958).

Der Durchmesser der Tubuli seminiferi beträgt 250µm, die Länge durchschnittlich 32cm. Die Tubuli sind von einer subepithelialen Membran umschlossen, welche den glatten Muskelzellen ähnelnde Zellen enthält (Rolshoven 1937; Clermont und Messier 1959, Lacy und Rotblatt 1960, Leeson und Leeson 1964, Niemi 1965, Murakami 1966, Korman 1967).

2) Epididymis:

Der Epididymis legt sich halbmondförmig an der medialen Seite des Testis an. Dabei befindet sich der Kopf am kranialen Pol und der Schwanz am kaudalen Pol. Der Durchmesser hat sein Minimum am Corpus mit 1,5-2mm. Er erweitert sich an der Cauda bis 5-11mm. Das Gewicht liegt bei 0,76-0,98g, die Länge seines Ductus bei ca. 4m. Das Epithel enthält fünf verschiedene Arten von Zellen: Haupt-, Basal- und Apikalzellen, sowie helle und basophile Zellen (Reid und Cleland 1957, Höfer 1972).

3) Ductus deferens:

Der Ductus deferens taucht am medialen Teil des Corpus epididymis auf, zieht am medialen Rand des Testis nach kranial und erreicht die Cavitas abdominalis entlang des Ostium vaginale. Der Ductus ist 5-6cm lang bei einem Durchmesser von etwa 2,5mm. Nach Vereinigung der beiden Ductus, durchdringen sie den dorsolateralen Lappen der Prostata und münden dorsal in die Urethra.

4) Prostata

Die Prostata der Ratte besteht aus drei Lappen, dem ventralen Lappen, dem dorsolateralen Lappen und der Koagulationsdrüse.

- 1) Lobus ventralis: Der ventrale Lappen liegt ventrolateral der Harnblase an, ist 14-17mm lang und wiegt ca. 300mg. Der Lobus ventralis mündet über 5-7 sekretorische Gänge in die Urethra/Colliculus seminalis.
- 2) Lobus dorsolateralis: Der dorsale und der laterale Lappen, die zu einem Körper verschmolzen sind, haben einen Gesamtdurchmesser von 5-7mm. Dabei umschließen sie die Urethra, den Ductus deferens mit seiner Drüse, sowie die sekretorischen Gänge der Koagulationsdrüse und der Vesicula seminalis.
- 3) Koagulationsdrüse: Die Koagulationsdrüse legt sich an der konkaven Seite der Vesicula seminalis an. Sie ist zwischen 3 und 6mm lang und wiegt 40-110mg. Sie besteht aus 5 Tubuli, die sich wellenförmig an der Oberfläche präsentieren. Der sekretorische Ductus zieht ventrolateral zum Colliculus seminalis und mündet kranial lateral ein.

3.2. Steroide und SHBGs

3.2.1. Steroidhormone

Eine wesentliche Voraussetzung für das Funktionieren hochentwickelter Organismen (Zusammenschluss und Arbeitsteilung von Zellen) ist die Signalübertragung von Zellen. Das geschieht unter anderem durch Hormone. Dabei kann man verschiedene Arten der Signalübermittlung unterscheiden:

- 1) Die Übertragung kann auf humoralem Weg erfolgen, das heißt durch endokrine Sekretion in das Blut.
- 2) Das Signal wird direkt durch Diffusion auf eine benachbarte Zelle übertragen (parakrine Sekretion). Dabei ist die juxtakrine Sekretion eine Sonderform, bei welcher der hormonelle Faktor der produzierenden Zelle in der Plasmamembran verankert ist und für Wechselwirkungen mit der Zielzelle ein direkter Zell-Zell-Kontakt nötig ist.
- 3) Bei der autokrinen Sekretion wirken die eigenen Signalmoleküle auf die Zelle.

Eine Gruppe dieser Signalmoleküle sind die Steroidhormone. Steroidhormone sind natürliche Steroide (Steroide sind C18-C30-Körper mit dem Grundgerüst des Sterans), die in ihrer Biosynthese vom Isopren ausgehen. Zu den menschlichen Steroidhormonen gehören Sexualhormone (Androgene und Gestagene), Nebennierenrindenhormone (Glukokortikoide und Mineralokortikoide) und Calciferole. Die Biosynthese wird vom Hypothalamus-Hypophysen-System durch positive und negative Rückkopplung reguliert. Die Wirkung vermitteln Hormonrezeptoren an den Targetzellen. (Pschyrembel, 2002)

3.2.2. ABP/SHBG

SHBG (sex hormone binding globulin)

Das SHBG wurde erstmals in den 60er Jahren als ein Plasmaprotein, welches spezifisch Androgene und Östradiol bindet, beschrieben (Mercier et al. 1966, Rosner et al. 1966, Pearlman et al. 1967, Murphy 1968, Steeno et al. 1968, Vermeulen und Verdonck 1968). Inzwischen erscheint es eindeutig, dass seine biologische Rolle die Regulation der Verfügbarkeitszeit und der metabolischen Räumung der Sexualhormone ist (Siiteri et al. 1982).

Neueste Erkenntnisse der SHBG-Struktur, seiner Genexpression und die Identifikation von speziellen Membranrezeptoren lassen vermuten, dass SHBG als ein aktiver Regulator der Aktionen von Geschlechtshormonen in den Zielzellen fungiert.

SHBG ist ein Homodimer mit einem Molekulargewicht von 90-100kDa (Suzuki und Sinohara 1984). In jedem Monomer wurden verschiedene funktionelle Domänen entdeckt. Sowohl die Dimerisationsdomäne als auch die steroidbindende Domäne wurden in den ersten 177 Aminosäureresten gefunden (Bocchinfuso und Hammond 1995, Hildebrand et al. 1995). Die N-terminale Region beinhaltet die rezeptorbindende Domäne (Kahn et al. 1990). Das C-terminale Ende spielt keine Rolle in der Steroid- oder Rezeptorbindung. Es wird vermutet, dass es die Konformation des Dimers stabilisiert (Hildebrand et al. 1995).

Menschliches SHBG besitzt zwei Oligosaccharide als Seitenketten, eine O- und eine N-gebundene (Avvakumov et al. 1983, Danzo et al. 1989, Danzo und Black 1990). Als Variante des menschlichen SHBG wurde eine zusätzliche N-Glykosylierung beschrieben (Van Baelen et al. 1992, Hardy et al. 1995), verursacht durch eine Punktmutation auf dem Exon 8 (Power et al. 1992). SHBG mit dieser Mutation besitzt die gleichen Bindungseigenschaften wie das normale SHBG (Bocchinfuso et al. 1992), hat jedoch eine reduzierte Räumungsrate (Cousin et al. 1998). Weil die Oligosaccharid-Seitenketten des SHBG die strukturellen Determinanten für den Membranrezeptor bereitstellen (Gershagen et al. 1987), gibt es signifikante Veränderungen beim glykosylierten SHBG im SHBG/SHBG-R-Komplex.

Vergleich der Struktur und Eigenschaften von SHBG und ABP

SHBG und sein testikuläres Gegenstück ABP (androgen binding protein) sind extrazelluläre Proteine, die DHT, Testosteron und Östradiol mit einer hohen Affinität binden (Westphal 1986, Hammond 1990, Rosner 1990, Joseph 1994).

Sie haben eine identische Primärstruktur (d.h. die gleiche Aminosäure-Sequenz) und werden vom gleichen Gen codiert, lokalisiert auf dem menschlichen Chromosom Nr. 17 (Walsh et al. 1986, Joseph et al. 1987, Hammond et al. 1987, Berube et al. 1990). Unterschiede bestehen in den Synthesorten (Joseph et al. 1988; Hammond et al. 1989) und in ihren Oligosaccharidketten (Joseph et al. 1988, Hammond et al. 1989, Danzo et al. 1991, Joseph 1994).

Lokalisation

Menschliches SHBG wird in den Hepatozyten gebildet und in die Blutbahn ausgeschüttet (Kahn et al. 1981, Que und Petra 1987, Gershagen et al. 1989; Hammond et al. 1989, Fortunati und Catalano 1996).

Inzwischen ist bekannt, dass SHBG auch in anderen Geweben verschiedener Spezies synthetisiert wird, zum Beispiel im Testis von Mensch (Hammond et al. 1989) und Maus (Wang et al. 1989), im Gehirn der Ratte (Wang et al. 1990), im Endometrium des Menschen (Misao et al. 1994) und in der menschlichen Plazenta (Larrea et al. 1993). Weitere Synthesorte sind menschliche Krebszellen der Ovarien (Misao et al. 1995a), des Endometriums (Misao et al. 1995b) und der Mammæ (Moore et al. 1996), außerdem Krebszellkulturen des Menschen (Seguchi et al. 1998).

Eine Studie an transgenen Mäusen mit menschlichem SHBG (Janne et al. 1998) zeigte das erste Mal eine in vivo Expression des menschlichen SHBG-Gens in verschiedenen männlichen Geweben. Die menschlichen SHBG-Transgene wurden in den periportalen Hepatozyten und in den Epithelzellen der geknäuelten Tubuli der Niere, genauso wie in Sertolizellen exprimiert. Während die m-RNA der Leber- und Nierenzellen die volle Länge des SHBG-Vorläuferpeptids codiert, wurden im Testis die menschlichen SHBG-Transkripte von einem alternativen Promoter abgeleitet. Vermutlich gibt es Unterschiede in der Synthese von SHBG und ABP, aber in transgenen Mäusen wurden keine phänotypischen Abnormalitäten beobachtet. ABP

wird in den Sertolizellen der Tubuli seminiferi des Testis synthetisiert und in die luminale Flüssigkeit abgegeben (Hagenäs 1975, Danzo et al. 1991). Nach dem Transport in den Epididymis wird es vom Epithel des Caput epididymis über einen rezeptorvermittelten Prozess aufgenommen (French und Ritzen 1973, Danzo et al. 1977, Feldman et al. 1981, Gerard et al. 1988, Felden et al. 1992). Wahrscheinlich reguliert ABP die Spermatogenese und die Spermienreifung (Anthony et al. 1984a, Anthony et al. 1984b).

3.2.3. Wirkungsweise der Steroide

Steroidhormone regulieren die Transkription spezifischer Gene. Sie können dabei steigernd oder hemmend auf die Genexpression bestimmter Proteine (meist Enzyme) wirken. Dazu müssen sie jedoch an Rezeptoren binden. Die Wirkung kann auf zwei Wegen erfolgen, einmal über die Bindung an einen intrazellulären Rezeptor und über die Bindung eines SHBG-Steroid-Komplexes an einen putativen Rezeptor (Rosner et al. 1999).

Wirkung über intrazelluläre Rezeptoren

Die intrazellulären Rezeptoren können in ihrer inaktiven Form zytoplasmatisch oder nukleär lokalisiert sein. In dieser Form sind sie meist an andere Proteine gebunden, die ihre DNA-Bindungsdomäne blockieren.

Man unterscheidet zwei Bindungsdomänen. Einmal die Hormonbindungsdomäne, welche immer am C-terminalen Ende lokalisiert ist, und die DNA-Bindungsdomäne mit einer Enhancer-Sequenz für das entsprechende Gen.

Die Bindung des Steroidhormons an einen intrazellulären Rezeptor aktiviert diesen zu einem Transkriptionsfaktor. (Löffler und Petrides, 1998)

Signal-Transduktion über das SHBG-SHBG-Rezeptor-System

Ende der 60er Jahre wurde erstmals ein Modell für den Mechanismus der Steroid-Wirkungen entwickelt. Dieses relativ simple Modell wurde über drei Jahrzehnte zu einem komplexen System weiterentwickelt und verfeinert. Es entstand ein Modell einer Steroid-Rezeptor-Superfamilie, in der die Mitglieder untereinander Ko-Aktivatoren und Ko-Repressoren austauschen. Sie gehen aber nicht nur Reaktionen untereinander ein, sondern auch mit Mitgliedern anderer Signalwege (Gronemeyer 1993, Parker 1993, Truss und Beato 1993, Tsai und O'Malley 1994, Horwitz et al. 1996, Katzenellenbogen 1996). Alle diese Mitglieder sind Transkriptionsfaktoren, die inaktiv sind, bis sie (meist durch Bindung mit ihrem spezifischen Liganden) in einen Zustand transformiert werden, welcher die Initiation zur Transkription freischaltet. Obwohl die Verfolgung dieses Modells eine Fülle an Wissen einbrachte, können viele Steroid-Wirkungsweisen noch nicht erklärt werden.

In der letzten Dekade wurde ein großer Aufwand betrieben um weitere Mechanismen aufzuklären, mit denen die Steroidhormone Mitglieder der Rezeptoren-Superfamilie aktivieren, um biologische Effekte zu erzielen. Fast alle beteiligten Laboratorien untersuchten die Wege, in denen das Steroidhormon direkt mit der Zellmembran interagiert.

Alle Steroidhormone im Plasma sind entweder ungebunden oder gebunden an einem von zwei spezifischen steroidbindenden Proteinen, entweder am SHBG oder am corticosteroide binding globulin (CBG). Auch am Plasma-Albumin können Steroide binden (Westphal 1986, Rosner 1991). Um in die Zellen zu gelangen, müssen die Steroide von diesen Proteinen dissoziieren. Anschließend gelangen sie entlang des Konzentrationsgradienten in die Zelle, um an einen spezifischen Rezeptor zu binden (Mendel 1992). Aus dieser Sicht spielt SHBG eine passive Rolle zum Auffüllen der Menge von freien Steroiden und der Verlängerung der Lebensdauer der Plasmasteroide, die es bindet.

Eine andere Beobachtung ist, dass SHBG spezifisch an Zellmembranen bindet (Strel'chyonok et al. 1984, Hryb et al. 1985, Hryb et al. 1986, Kuhn 1988). Diese frühen Beobachtungen lassen Vermutungen zu, dass SHBG in einem Steroid-Signalsystem zwischengeschaltet ist, über cAMP wirkt und unabhängig von der Steroid-Rezeptoren Superfamilie agiert.

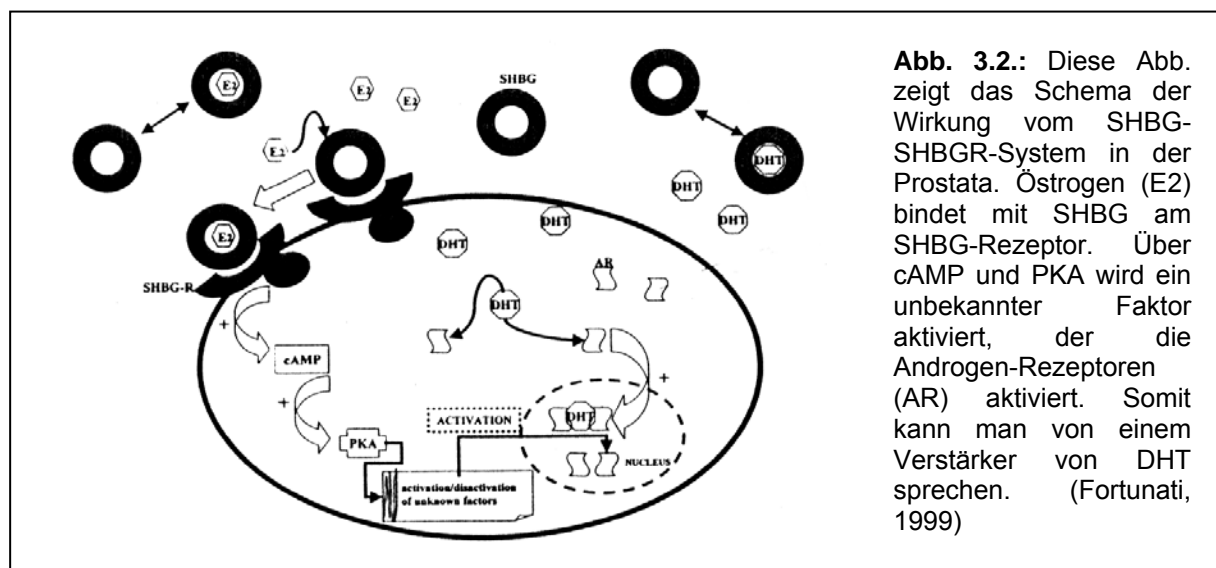
Nakhla et al. (1990) lieferten den ersten Bericht über eine Induktion durch das second messenger cAMP. Sie zeigten, dass nach der Bindung von SHBG an seinen Rezeptor eine Interaktion mit DHT oder Östradiol einen signifikanten Anstieg an intrazellulärem cAMP hervorruft. Ähnliche Beobachtungen machten Nakhla et al. (1995) auch in der Prostata. In dieser Prostata-Studie hatte SHBG ohne Steroid und Steroid ohne SHBG keinen Effekt auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration.

Fortunati et al. (1996a) und Nakhla et al. (1997) demonstrierten außerdem das Mitwirken von Proteinkinase A, dem Target von cAMP in der Signaltransduktion in Prostata- und Brustkrebszellen. Manche Autoren behaupten, dass es einen Verbindungsweg zwischen den Membranrezeptoren und den Steroidhormon-Kernrezeptoren gibt (Fortunati et al. 1996b, Nakhla et al. 1997, Ding et al. 1998). Zur Erläuterung sollen im Folgenden zwei Modelle dienen:

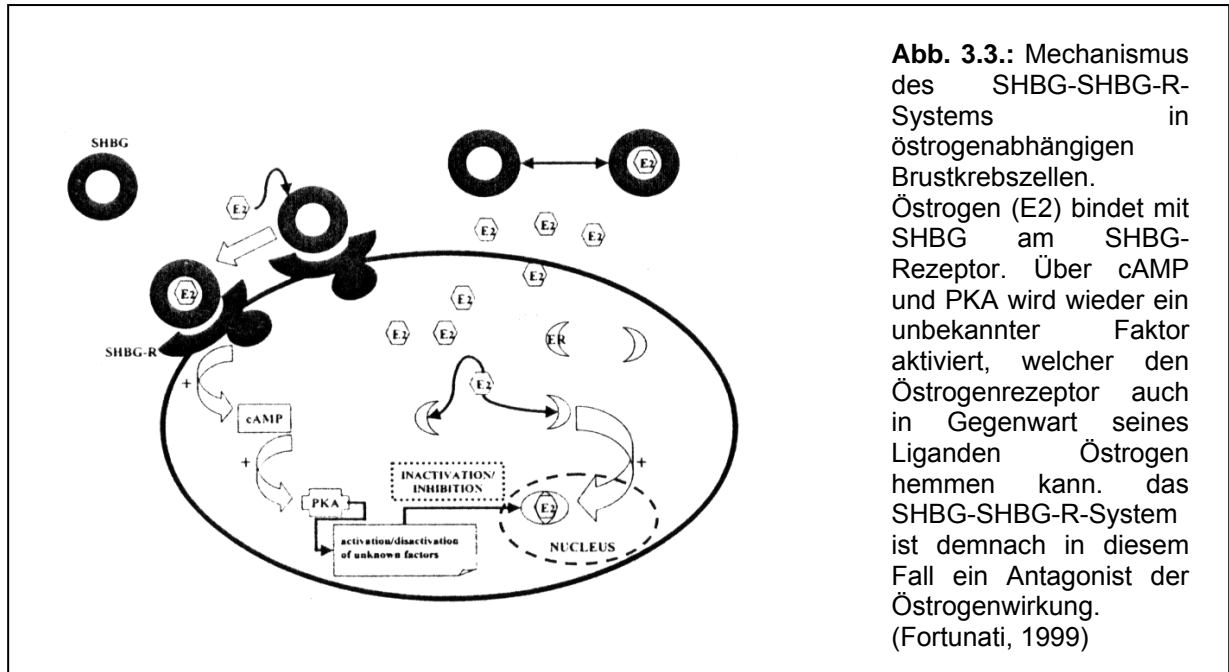
Mechanismen der Signaltransduktion

1) Nakhla et al. (1997) zeigte an Kulturen der menschlichen Prostata eine erhöhte PSA-Sekretion durch Zugabe von DHT (nur in Anwesenheit von SHBG). Ein vergleichbarer Anstieg konnte durch Zugabe von Östradiol und SHBG induziert werden, während weder Östradiol noch SHBG allein diesen Effekt hatten. Diesen Effekt konnte man mit Antiandrogenen, aber nicht mit Antiöstrogenen blockieren. Dies setzt das Mitwirken eines Androgen-Rezeptors voraus. Östrogen stellt mit dem SHBG-SHBGR-System wahrscheinlich einen Verstärker dar.

Aus diesen Erkenntnissen vermuten einige Autoren einen Zusammenhang zwischen dem SHBGR und dem AR.



2) Bei Brustkrebszellen wird die östrogeninduzierte Proliferation durch SHBG gehemmt (Fortunati et al. 1993, Fortunati et al. 1996b). Der antiproliferative Effekt hatte keinen Einfluss auf die in die Zelle gelangende Östrogenmenge (Fortunati et al. 1993), aber auf die cAMP-PKA-Kaskade.



Diese unterschiedlichen Wirkungsweisen können auf verschiedene Weise erklärt werden:

- a) Der pleiotrope Effekt von cAMP auf Zellwachstum (Gottesmann und Fleischmann 1986).
- b) Das Konzept, dass gleiche Hormone (oder Wirkstoffe) in unterschiedlichen Zellen/Geweben unterschiedlich wirken (Katzenellenbogen et al. 1996).

In Brustkrebszellen (Fissore et al. 1994) und in Prostatakrebszellen (Nakhla et al. 1990, Nakhla et al. 1994, Nakhla et al. 1997) wurde durch SHBG in Anwesenheit von Steroiden die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöht. Einige Autoren berichteten, wie Östradiol allein (ohne SHBG) den cAMP-Anstieg induzieren konnte (Aronica et al. 1994). Diese Diskrepanz kann auf unterschiedliche Prozeduren in unterschiedlichen Laboratorien zurückgeführt werden.

3.3. Oxytocin

3.3.1. Hormonelles und intrinsisches Oxytocin

hormonelles Oxytocin

OT ist ein Nonapeptid, das im hypothalamo-neurohypophysären System sezerniert wird. Magnozelluläre Neurone im Nucleus paraventricularis und im Nucleus supraopticus des Hypothalamus synthetisieren OT als Teil eines Precursorproteins zusammen mit Neurophysin I. Es hat bei beiden Geschlechtern eine ähnliche Funktion, die Kontraktion der glatten Muskulatur. Während OT bei der Frau die Wehen auslöst und für die Sekretion der Milch zuständig ist, wird es beim Mann für die Ejakulation und die Erektion benötigt (Jirikowski 1991).

OT kann auch als Neurotransmitter fungieren. Neben der Steuerung des Sexual- und Brutpflegeverhalten wird es bei physischem und psychischem Stress vermehrt ausgeschüttet (Pedersen et al. 1985, Pedersen und Prange 1985).

Seine Wirkung ist unter anderem steroidabhängig. Einen Beweis dafür lieferten Jirikowski et al. (1990a), als sie Östrogen- und Glukokortikoid-Rezeptoren an OTergen Neuronen nachweisen konnten. In elektrophysiologischen Experimenten konnte gezeigt werden, dass durch Östradiol die Feuerrate magnozellularer Neurone erhöht wird (Jirikowski et al. 1988).

intrinsisches Oxytocin

OT wurde schon vielfach in verschiedenen Organen unterschiedlicher Säugetiere nachgewiesen, zum Beispiel im Testis von Beuteltieren (Bathgate et al. 1993), in den Leydig-Zwischenzellen des Rattenhodens (Guldenaar und Pickering 1985, Yeung et al. 1988) und im Epididymis von Schafsbock, Ratte und Affe (Knickerbocker et al. 1988, Harris et al. 1996, Einspanier und Ivell 1997).

Es gibt mehrere Beweise, dass OT lokal produziert wird:

- 1) Nach Versuchen von Knickerbocker et al. (1988) war die Konzentration an OT im Testis größer als im zirkulierenden Blut.
- 2) Die OT-Konzentration der testikulären Venen überschritt die der testikulären Arterien (Knickerbocker et al. 1988).

- 3) Die OT-Sekretion in Leydig-Zwischenzellen war im Kulturmedium größer als in vivo (Nicholson und Hardy 1992).
- 4) Ein eindeutiger Beweis war der Nachweis von OT-mRNA im Rattenhoden (Rehbein et al. 1986, Foo et al. 1991).

Der OT-Spiegel wird hauptsächlich durch das Gonadotropin LH (Nicholson und Hardy 1992), durch Lipoproteine (Frayne und Nicholson 1994) sowie durch das Epithel der Tubuli seminiferi reguliert.

Auch die Spermatogenese ist sehr wichtig für die Regulation des OT-Spiegels im Testis (in der Samenflüssigkeit). Das bewiesen Pickering et al. (1990). Sie zeigten, dass der OT-Gehalt im Testis bei Ratten, bei denen kurz nach der Geburt in die Spermatogenese eingegriffen wurde, kleiner war als in normalen Ratten.

3.3.2. Funktionen

Oxytocin und die Kontraktion der glatten Muskulatur

Niemi und Kormano (1965) haben bewiesen, dass sich die Kontraktionsaktivität der Tubuli seminiferi in vitro bei Zugabe von OT steigert. Außerdem nimmt die Kontraktionsaktivität in Abwesenheit von OT ab (Nicholson et al. 1986). Sie kann aber durch Zugabe von OT wieder gesteigert werden (Nicholson et al. 1987). Besonders stark reagieren die Tubuli seminiferi während der Spermiation auf OT (Harris und Nicholson 1995). Diese Aktivitäten haben zur Folge, dass OT die Spermienzahl im Epididymis von Ratten bei einsetzender Geschlechtsreife erhöht (Nicholson und Fownsend 1995). Man konnte zudem nach Behandlung mit OT eher Spermien im Epididymis beobachten.

Oxytocin und die Steroidgenese

Tägliche subkutane Injektionen erhöhen die Menge an Testosteron im Plasma und im Testis in vivo, kontinuierliche Gabe von OT in den Testis senkt die Testosteronmenge (Nicholson et al. 1991, Ang et al. 1994). Diese Ergebnisse lassen sich damit erklären, dass im Reproduktionstrakt (nur im Testis ist das vorherrschende Androgen Testosteron) Testosteron nur als Prohormon fungiert. Seine aktive Form ist DHT. Als Enzym für die Konvertierung von Testosteron zu DHT

ist die 5 α -Reduktase wichtig. OT erhöht die 5 α -Reduktase-Aktivität (Nicholson und Jenkin 1994).

3.3.3. Oxytocin-Rezeptor

OT-bindende Proteine in Plasmamembranen konnten anfangs nicht genau charakterisiert werden. Die Größenangaben reichten von 40kDa bis hin zu mehreren 100kDa. 1988 fanden Soloff et al. mit Hilfe der Strahlungsinaktivierung heraus, dass die OTRs in den Glandulae mammae und im Myometrium des Uterus der Ratte sehr ähnlich in Größe und Molekulargewicht waren. Im Myometrium lag sie bei $57,5\pm 3,8$ kDa und in der Glandula mammae bei $58,8\pm 1,6$ kDa. OTRs sind bereits in unterschiedlichen Geweben gefunden worden: Unter anderem in den Leydig-Zwischenzellen des Menschen, des Makaken (Frayne und Nicholson 1998), des Marmosets (Einspanier und Ivell 1997) und der Ratte (Bathgate und Sernia 1994); außerdem in der peritubulären Muskulatur des Epididymis des Makaken (Frayne und Nicholson 1998) und des Marmosets (Einspanier und Ivell 1997). Im Epididymis, in der Tunica albuginea, in den Vasa deferentia und in der Capsula prostatica des Schweins lokalisierten erstmals Maggi et al. (1987) OTRs.

Brodanszky et al. (1992) konnten nachweisen, dass eine Zugabe von OT zur Capsula Prostatica des Meerschweins in vitro Kontraktionen hervorrief (Ivell und Russel, 1996). Das zeigte, dass in diesem Gewebe Rezeptoren vorhanden sein mussten. Einspanier und Ivell (1997) gelang dieser Beweis mit dem Nachweis von mRNA der OTRs im Gewebe der Prostata, des Testis und des Epididymis.

Diese Fakten bestätigen die Behauptung von Ivell und Russel (1996), dass die Ausschüttung von OT kurz vor bzw. während der Ejakulation den Mechanismus des Austriebs der Samenflüssigkeit moduliert und die Menge der Samenflüssigkeit und die der Spermien reguliert.

3.3.4. Oxytocin in der Samenflüssigkeit

In der Samenflüssigkeit konnte ebenfalls OT gefunden werden, unter anderem im Schafsbock (Knickerbocker et al. 1988) und in der Ratte (Nicholson et al. 1994). Die genaue Funktion und die Herkunft sind noch unklar. Man vermutet zwei wichtige Aufgaben vom OT für das Spermium. Erstens erhöht es die Kontraktilität der Muskulatur für den Spermientransport und zweitens die Spermienkonzentration (Knight und Lindsay 1970, Jirikowski 1991).

1) OT und die Kontraktilität

Der Transport der Spermien im Epididymis resultiert aus der Peristaltik der Wandmuskulatur. Während Caput und Corpus epididymidis nur wenige adrenerge Bereiche besitzen, ist die Cauda reich adrenerg innerviert (El-Badawi und Schenke 1967). Wie Knight (1974) demonstrierte, resultieren aus der Stimulation dieser Neurone Kontraktionen im Ductus epididymis. Eine Durchtrennung der sympathischen Nervenfasern zur Cauda bewirkt eine Reduktion der Transportrate der Spermien durch denselben (Ricker und Chang 1996). Die Kontraktilität kann aber auch durch andere Faktoren beeinflusst werden. Wie oben beschrieben, ist einer dieser Faktoren OT. Während man die Adrenalinwirkung mit entsprechenden Blockern hemmen kann, haben diese keinen Einfluss auf die OT-stimulierten Kontraktionen (Knight 1974). Den Nachweis erbrachten Nicholson et al. (1999): Die Erhöhung des OT-Spiegels in der Blutzirkulation während sexueller Erregung unterstützt signifikant den Spermientransport in die Vasa deferentis.

2) OT und die Spermienproduktion

OT erhöht die Zahl der Spermien und die Menge des Ejakulats in verschiedenen Spezies (Milovanov et al. 1962, Knight und Lindsay 1970, Kihlstrom und Agmo 1974). Auch Voglmayr berichtete 1975, dass nach einer regelmäßigen Behandlung mit OT nicht nur mehr Flüssigkeit im Testis, sondern auch eine höhere Konzentration an Spermien im Testis des Schafbocks zu finden war. Frayne et al. wiesen (1996) nach, dass die Behandlung mit OT-Antagonisten in spätpubertierenden Ratten einen Aufschub des ersten Erscheinens von Spermien im Epididymis hervorrief.

3.3.5. Oxytocin in der Prostata

Für diese Arbeit ist die Lokalisation von OT in der Prostata von großem Interesse, denn wie unten aufgeführt, hat es wahrscheinlich verschiedene Einflüsse auf dieses Gewebe.

Lokalisation

Die Prostata ist ein androgenabhängiges Organ, das heißt Androgene beeinflussen Wachstum und die Funktion der Prostata. Ein OT-ähnliches Peptid wurde in der Prostata der Ratte gefunden (Nicholson et al. 1985, Jenkin und Nicholson 1994).

Funktionen

OT steigert, wie andere neurohypophysäre Hormone (Vasopressin und Vasotocin) den Ruhetonus der Prostata (Brodanszky et al. 1992). OT hat dabei mehr Einfluss auf den Tonus als Adrenalin und Methacholine (Agonisten für das adrenerge und cholinerge System), welche laut Caine et al. (1975) ebenfalls Einfluss auf die motorische Aktivität besitzen. OT erhöht den Ruhetonus und fördert wahrscheinlich auch den Ausstoß des Sekrets bei der Ejakulation.

Pathophysiologie

BPH (benign prostatic hyperplasia) trifft 50% aller Männer im Alter von über 60 Jahren (Berry et al. 1984). Die Krankheit ist dabei abhängig von der Präsenz von Androgenen (Partin et al. 1991). Ein sehr häufiges Symptom ist ein erschwerter und schmerzhafter Harnlass (Caine et al. 1975). Die Behinderung beim Harnlassen muss nicht nur die Folge von physischem Prostatawachstum sein. Auch der erhöhte Ruhetonus der glatten Muskulatur der Prostata kann eine Rolle spielen, wobei man mit OT-Antagonisten eine Lockerung der Muskulatur und einen ungehinderten Harnlass erreichen kann (Nicholson und Jenkin 1995). Die Voraussetzung ist das Vorhandensein von OTRs.

OT kann aber nach Popovic et al. (1982) und Hristic et al. (1985) auch das Wachstum des Prostatagewebes stimulieren und die postkastrationale Atrophie der

Prostata kompensieren. OT-behandelte Ratten besitzen größere azinäre Lumina und mehr Epithelvolumen im Lobus ventralis der Prostata als unbehandelte kastrierte Ratten (Popovic et al. 1990). Die Mechanismen sind noch unklar.

Nicholson und Jenkin (1995) wiesen in der Prostata nach, dass OT die 5 α -Reduktase-Aktivität moduliert. Es wurden Abweichungen zwischen den Ergebnissen betreffend Testis und Epididymis (Nicholson und Jenkin 1994) festgestellt. In der Prostata konnte man nur in den ersten drei Tagen einen erhöhten DHT-Spiegel feststellen, im Testis und im Epididymis waren es zehn Tage.

Die Behandlung mit Testosteron ließ den Lobus ventralis wie erwartet wachsen, dafür nahm die absolute und die relative Menge an OT ab (Nicholson und Jenkin 1994). Demnach ist ein Zusammenhang zwischen dem Androgen und dem Peptid wahrscheinlich. Dazu stellten Nicholson und Jenkin (1995) die Theorie eines lokalen Feedback-Mechanismus auf, in dem die Verringerung des Testosteronspiegels eine Erhöhung der Konzentration an OT zur Folge hat. Das stimuliert wiederum die Testosteronproduktion im Testis. Von größerer Bedeutung ist hier, dass es die Konvertierungsrate von Testosteron in DHT erhöht. Durch den erhöhten Level von Testosteron oder DHT wird die Sekretion von OT verstärkt inhibiert oder die OTRs werden blockiert.

Es gibt demnach einen lokalen Feedback-Mechanismus, in dem ein erhöhter Testosteron- und/oder DHT-Spiegel eine Abnahme des OT-Spiegels zur Folge hat (Jenkin und Nicholson, 1999). OT und DHT erhöhen die 5 α -Reduktase-Aktivität, welche für die Konvertierung vom Prohormon Testosteron in der Prostata zu seinem aktiven Zustand DHT zuständig ist. Ob OT einen direkten Einfluss auf das Enzym oder auf seine Synthese hat, ist noch unklar. Wahrscheinlich erhöhen geringe Mengen an Östrogen die OT-Synthese.

Einen weiteren Feedback-Mechanismus vermuteten Jenkin und Nicholson in der Regulation der Synthese der OT-Rezeptoren. Östrogen hat in Gegenwart von hohen Konzentrationen DHT großen Einfluss auf die Anzahl der OT-Rezeptoren (Bale und Dorsa, 1995). Das bedeutet, bei Abwesenheit von DHT wächst die Zahl der Rezeptoren für OT; bei Zugabe von DHT sinkt deren Zahl. Eine Störung dieses Mechanismus könnte deshalb BPH zur Folge haben.

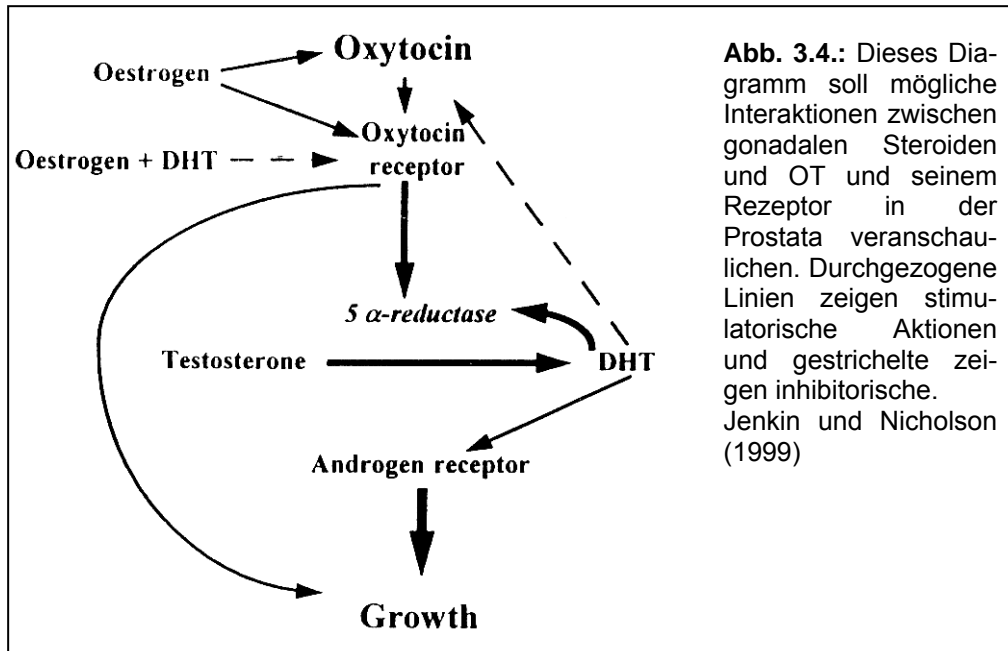


Abb. 3.4.: Dieses Diagramm soll mögliche Interaktionen zwischen gonadalen Steroiden und OT und seinem Rezeptor in der Prostata veranschaulichen. Durchgezogene Linien zeigen stimulatorische Aktionen und gestrichelte zeigen inhibitorische. Jenkin und Nicholson (1999)

Andererseits ist bei alten BPH-kranken Hunden der OT-Spiegel in der Prostata höher als in jungen gesunden Hunden (Nicholson und Jenkin 1995). Ebenfalls war in den alten Hunden die Aktivität der 5α-Reduktase höher. Diese Ergebnisse widersprechen denen der Ratte (Feedback-Mechanismus). Dies kann mit der Artspezifität der regulatorischen Funktionen von OT zusammenhängen. Nichtsdestotrotz kann man mit diesen Ergebnissen behaupten, dass OT eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung von BPH spielt. Möglicherweise kann man aufgrund dieser Erkenntnisse irgendwann in diese Krankheit eingreifen (Nicholson und Jenkin 1995). Die Frage ist, ob es noch andere Mechanismen gibt, zum Beispiel der Zusammenhang von SHBG und OT. Diesen kann man aus der Beziehung von Testosteron und OT vermuten.

4. Ziele der Arbeit

Aus der Einleitung geht hervor, dass OT und ABP einen funktionellen Zusammenhang haben könnten. Wir vermuten wie Caldwell et al. (2003) eine Interaktion zwischen diesen beiden Molekülen. Höchstwahrscheinlich ist diese Interaktion nicht nur auf den männlichen Reproduktionstrakt beschränkt, denn es existiert bereits eine Arbeit, in der OT und SHBG im Hypothalamus der Ratte kolokalisiert wurde (Herbert et al. 2003).

Wenn es eine Interaktion wirklich gibt und der Mechanismus aufgeklärt ist, wäre das unter Umständen der Schlüssel für die Therapie vieler Krankheiten, unter anderem für die beschriebene BPH.

Bevor man der Erforschung dieses Mechanismus' (zum Beispiel mit Kokulturen von Zellen) - in unserem Fall für die Bekämpfung von BPH - nachgehen kann, ist es erforderlich das Vorkommen von ABP und OT im männlichen Reproduktionstrakt genau zu charakterisieren und ihre Koexistenz zu prüfen. Dazu werden wir Gewebeschnitte und Gewebeextrakte der Ratte anfertigen. Ziele dieser Arbeit sind:

- ***ABP in Prostata, Prostatasekret, Ductus deferens, Epididymis und Testis qualitativ mit Hilfe der SELDI TOF Massenspektrometrie bestimmen und mit dem Westernblot bestätigen,***
- ***mit der in situ Hybridisierung prüfen, ob und wo in der Prostata ABP lokal synthetisiert wird,***
- ***mit der Immunzytochemie ABP in der Prostata und im Ductus deferens lichtmikroskopisch mit der DAB (Diaminobenzidin) Färbung darstellen,***
- ***OT in allen Teilen der Prostata und im Ductus deferens immunzytochemisch lokalisieren und***
- ***mit einer immunzytochemischen Doppelfärbung mit den Fluoreszenzfarbstoffen CY2 und CY3 die Koexistenz von ABP und OT in allen Organen des männlichen Reproduktionstrakts beweisen.***

5. Material und Methoden

5.1. Präparation und Fixierung der Gewebe

5.1.1. Tierpräparation

Die Tierpräparation wurde nach Vorschrift des deutschen Tierschutzgesetzes (nach dem erlaubten Protokoll #03-57\03) durchgeführt. Junge erwachsene Ratten (Wistarratten mit einem Bruttogewicht von 300g) wurden unter Standardbedingungen (3 Tiere pro Käfig mit freiem Zugang zu Wasser und Futter, 12h hell/dunkel Zyklus) gehalten. Die Tiere wurden mit einer Überdosis Ether getötet, das Abdomen und der Thorax mit zwei Schnitten geöffnet und anschließend das Gewebe entnommen. Dabei musste beachtet werden, dass die Gewebe für die verschiedenen Nachweismethoden unterschiedlich fixiert werden mussten.

1) immunzytochemischer Nachweis

Für den immunzytochemischen Nachweis wird der linke Ventrikel (rechtes Atrium wurde zuvor geöffnet) mit 4%iger PFA in PBS perfundiert. Anschließend ist der Canalis inguinalis zu öffnen, um den Ductus deferens, den Epididymis (Caput und Cauda) sowie den Testis zu entnehmen. Zum Schluss wird die Vesica urinaria aufgesucht, um die angrenzenden vier Lappen (dorsal, lateral, ventral und Koagulationsdrüse) der Prostata zu sezieren. Die Präparate werden nun in PFA fixiert.

2) biochemischer Nachweis

Für den biochemischen Nachweis ist eine Perfusion einer isotonischen NaCl-Lösung durch den linken Ventrikel vorzunehmen. Zur Entnahme geht man ähnlich vor wie oben, nur dass man zusätzlich Prostatasekret vor der Resektion der Prostata entnimmt. Dazu wird die Urethra distal der Vesica urinaria und proximal der Prostata abgeklemmt. Nun spült man die Vesica urinaria mit isotonischer NaCl-Lösung und entleert sie vollständig. Die Urethra wird ein zweites Mal distal der Prostata abgeklemmt. Die erste Klemme wird nun entfernt. Schließlich wird die Vesica urinaria erneut mit isotonischer NaCl-Lösung gespült, diesmal aber mit dem proximalen Teil der Urethra (Pars prostatica). Die Lösung wird nun gesammelt. Zum Schluss

entnimmt man die Prostata mit den vier Lappen.

Eingelegt werden die Präparate in einen Lysispuffer (0,1M NaHPO₄, 2mM NaCl, 5mM EDTA; pH 7,5). Sie werden homogenisiert - erst mechanisch, dann mit Ultraschall - und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren. Um eindeutige Ergebnisse bei der Westernblot-Analyse zu erhalten, werden für diese Methode mehrere Tiere verwendet.

5.1.2. Herstellung der Gewebeschnitte

1) Einbettung:

Vor der Eponeinbettung werden die Präparate in PBS (0,1M Phosphatpuffer, 0,9% NaCl; pH 7,3) gewaschen (ein Tag, 4°C, die Lösung mehrmals wechseln). Als nächstes werden sie zur Entwässerung in die Alkoholreihe gegeben:

- (1) in 50%igen Alkohol für 2-4h
- (2) in 70%igen Alkohol über Nacht
- (3) in 90%igen und 1-2h
- (4&5) in absoluten Alkohol jeweils 1h

Danach kommen sie 2h in Propylenoxid. Anschließend werden sie nacheinander in Propylenoxid gelöstes Epon gegeben: In den Verhältnissen 1:4 für 1h, 1:2 für 1h, dann 1:1 über Nacht.

Schließlich werden die Gewebeblöcke eine Woche bei 60°C in **Eponharzgemisch** eingelegt.

Eponharzgemisch:

- Epon 812: Lösungsmittelfreies Epoxyharz (Ferac)
- DDSA: Dodecenyln-Bernsteinsäureanhydrid (Ferac)
- MNA: Methylnadicanhydrid (Ferac)
- DMP 30: 2,4,6-Tris-(dimethylaminomethyl)-Phenol (Eponbeschleuniger; Ferac)

2) Schneiden und Aufziehen der Präparate auf Objektträger:

Die Eponblöcke mit den Präparaten spannt man in ein Ultramikrotom und fertigt

Semidünnschnitte (1 μ m) von den Präparaten an. Danach werden jeweils zwei benachbarte Schnitte auf einen silanbeschichteten Objektträger aufgezogen und bei 45°C über Nacht getrocknet.

3) Deeponierung:

Die in Eponharz eingelegten Schnitte werden deeponiert. Dazu werden sie jeweils 5min in verschiedenen Lösungen (methanolisches NaOH, methanolisches Benzol, Aceton I, Aceton II [in dieser Reihenfolge]) gespült. Schließlich werden sie 30min in PBSTX (PBS mit 0,05% Triton X), dann 30min in PBS gewaschen.

5.2. Immunhistochemische Untersuchungsmethoden

5.2.1. Einfache immunzytochemische Markierung mit DAB

Überblick über Methoden

Es gibt direkte und indirekte immunzytochemische Nachweismethoden. Bei den direkten Nachweismethoden ist der Primärantikörper gegen das nachzuweisende Antigen gerichtet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder einem Enzym (für die Detektion der Primärantikörper) gekoppelt.

Bei den indirekten Färbemethoden gibt es inzwischen eine große Auswahl. Zum Beispiel gibt es die Primärinkubation mit einem spezifischen, unmarkierten Primärantikörper und die anschließende Sekundärinkubation mit einem markierten Anti-Spezies-Antikörper (reagiert mit dem Fc-Teil des Primärantikörpers).

Nennenswert auch die Färbung mit der PAP-Methode, bei der weder die Primärantikörper, noch die Sekundärantikörper mit einem Farbstoff oder Enzym markiert sind. Erst die Tertiärantikörper sind mit einem Enzym gekoppelt. Daneben kann man Markierungen mit Biotin und Streptavidin durchführen, und deren hohe Affinität zueinander ausnutzen. Das Streptavidin ist bei unserer Nachweismethode mit einer radikalbildenden Peroxidase gekoppelt. Diese Radikale können mit DAB gefärbt werden. Der Vorteil gegenüber der PAP-Methode ist die höhere Spezifität der Färbung. Deshalb zogen wir sie der PAP-Methode vor. Mit dieser Technik konnten wir Kreuzreaktionen weitestgehend ausschließen.

Nachweis von Oxytocin und ABP

1) Präinkubation

Vor der Inkubation mit Primärantikörpern ist eine Präinkubation mit Normalserum (zum Beispiel mit dem Serum vom Mensch), 1:50 in 1h, nötig. Die Proteine dieses Serums binden an die geladenen Strukturen des Schnittes. Anschließend werden sie 15min in PBSTX gewaschen.

2) Inkubation mit Primärantikörpern

Die Schnitte werden nun mit aABP (Nr. 653) /aOT (1:500 in PBS/1:1000 in PBS) über Nacht bei 4°C in feuchter Umgebung inkubiert. Am nächsten Tag werden die Proben 15min in PBSTX und anschließend 15min in PBS gewaschen.

3) Inkubation mit Sekundärantikörpern

Für die zweite Inkubation werden mit Biotin gekoppelte Antikörper (gegen den Fc-Teil der Antikörper des Kaninchens gerichtet) verwendet. Die Verdünnung beträgt 1:200. Die Proben werden 2h inkubiert, dann wieder 30min in PBS gewaschen.

4) Zugabe von Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin

Mit Peroxidase gekoppeltes Streptavidin, welches wie oben beschrieben an Biotin bindet wird nun in einer Verdünnung von 1:200 hinzugegeben. Man lässt es für 1,5h reagieren. Danach werden die Proben erneut 30min in PBS gewaschen.

5) Färbung der Proben mit DAB

Für die farbliche Markierung wird DAB in Kombination mit H₂O₂ verwendet. Dazu wird jeweils eine Tablette in Aqua bidest. (Steriliseat) gelöst und bei 4000U/min bei 4°C für 5min zentrifugiert. Schließlich pipettiert man es auf die Präparate und lässt es für 1-2min wirken.

6) Entwässerung und Eindeckeln der Proben

Vor dem Eindeckeln werden alle Gewebeschnitte in der Alkoholreihe (jeweils 3min in 50%, 70%, 90%, abs., abs. Alkohol) und zweimal 3min in Xylol entwässert und abschließend unter Entellan eingedeckelt. Tabelle 5.1. zeigt übersichtlich die einzelnen Arbeitsschritte.

Arbeitsschritt (Inkubation)	Verdünnung	Dauer	Bedingungen
HNS	1:50	1 Stunde	Zimmertemperatur
aSHBG/aOT	1:500/1:1000	über Nacht	4°C
anti Kaninchen mit Biotin	1:200	2 Stunden	Zimmertemperatur
Streptavidin mit Peroxidase	1:200	1,5 Stunden	Zimmertemperatur
DAB und H ₂ O ₂ in Aqua bidest.	Jeweils 1 Tablette	1-2 min.	Zimmertemperatur

Tab. 5.1.: Übersicht über die Arbeitsschritte der ABC-Methode (DAB-Färbung), die Waschschritte wurden in dieser Tabelle vernachlässigt.

Kontrollen

Um Kreuzreaktionen und unspezifische Färbungen auszuschließen, werden außerdem Negativkontrollen durchgeführt, bei denen die Inkubation mit dem Primärantikörper weggelassen wurde.

5.2.2. Immunzytochemische Doppelmarkierung

Für die Kolokalisation von OT und ABP wählten wir eine Mehrfachmarkierungsstrategie mit den Fluoreszenzfarbstoffen CY2 und CY3, die an die Sekundärantikörper gekoppelt sind.

Färbung von Oxytocin mit CY2

1) Präinkubation

Auch bei dieser Methode werden die Schnitte mit 1:50 verdünntem HNS in PBS für 1h bei Zimmertemperatur präinkubiert und danach 30min in PBSTX gewaschen.

2) Inkubation mit Primärantikörpern

Nun erfolgt eine Inkubation mit aOT (Antikörper aus dem Kaninchen) über Nacht bei 4°C in feuchter Umgebung. Die Antikörper sind mit einer Verdünnung von 1:500 in

PBS gelöst. Die Lösung enthält außerdem 2% HNS. Am nächsten Tag werden die Schnitte erneut für 15min in PBSTX und 15min in PBS gewaschen.

3) Inkubation mit farbstoffgekoppelten Sekundärantikörpern

Die CY2-gekoppelten Sekundärantikörper (gegen den Fc-Teil der Antikörper des Kaninchens gerichtet) werden 1:500 in PBS gelöst, dazu kommt ca. 1mg BSA. Anschließend wird diese Lösung bei 4000U/min bei 4°C für 5min zentrifugiert. Nun werden die Proben für 4 Stunden bei Zimmertemperatur mit dieser Lösung inkubiert und danach für 30min in PBS gewaschen.

4) Blockierung aller übrig gebliebenen Bindungsstellen

Zum Ausschluss späterer Kreuzreaktionen und für die eindeutige Zuordnung der Färbungen mit CY2 und CY3 zu den entsprechenden Antigenen, werden die übrig gebliebenen Bindungsstellen mit Antikörpern des Kaninchens durch Inkubation mit RNS (wichtig ist deren Fc-Teil) besetzt (mit einer Verdünnung von 1:50 für 1h) und danach 15min in PBS und 30min in PBSTX gewaschen.

Danach wird mit unmarkierten monovalenten Antikörperfragmenten (Fab, Dianova), gerichtet gegen den Fc-Teil der Antikörper des Kaninchens, mit einer Verdünnung von 1:50 für 1h inkubiert (anschließend wieder 30min waschen). Damit werden alle unbesetzten Fc-Teile besetzt.

Färbung von SHBG/ABP mit CY3

1) Primärinkubation

Für die Primärinkubation des zweiten Teilschritts werden Antikörper gegen ABP verwendet. Diese Antikörper werden wie die Antikörper im ersten Teilschritt aus dem Kaninchen gewonnen. Deshalb wurden am Ende des ersten Teilschritts alle restlichen Bindungsstellen blockiert, um Kreuzreaktionen zu vermeiden.

Das aABP wird nun 1:500 in PBS mit 2% Serum des Menschen verdünnt und über Nacht bei 4°C in feuchter Umgebung auf die Proben gegeben. Danach werden die Präparate 30min in PBSTX gewaschen.

2) Sekundärinkubation

Für die Darstellung von ABP werden die Proben mit den CY3-markierten anti Kaninchen Antikörpern für 1,5h inkubiert. Die Lösung mit 1:200 BSA in PBS wird vor Anwendung bei 4000U/min und 4°C für 5min zentrifugiert. Nun wird alles gründlich für 30min in PBS gewaschen. Tabelle 5.2. veranschaulicht alle Teilschritte in einer Übersicht:

Arbeitsschritt (Inkubation)	Verdünnung	Dauer	Bedingungen
HNS	1:50	1 Stunde	Zimmertemperatur
aOT und 2% HNS	1:500	über Nacht	4°C
anti Kaninchen mit CY3 und BSA	1:500	4 Stunden	abgedunkelt bei Zimmertemperatur
RNS	1:50	1 Stunde	Zimmertemperatur
Fab	1:50	1 Stunde	Zimmertemperatur
aSHBG (653)	1:1000	über Nacht	4°C
anti Kaninchen mit CY2 und BSA	1:200	1,5 Stunden	abgedunkelt bei Zimmertemperatur

Tab. 5.2.: Tabelle zur Übersicht über die Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung ohne Waschschrte

Eindeckeln der Proben und Kontrollen

Die Proben werden unter Veronal Glycin eingedeckelt.

Für die Kontrollinkubation wird die Inkubation mit aABP ausgelassen, um Kreuzreaktionen von CY2 mit anderen Antigenen auszuschließen. In einem anderen Experiment wird der Ablauf von aABP und aOT gewechselt, um zu zeigen, dass die Muster auch getauscht werden können.

5.2.3. Auswertung der immunzytochemischen Ergebnisse

Die Auswertung der Schnitte erfolgte ausnahmslos mit dem Mikroskop Olympus Dp - Soft BX 50. Dieses Mikroskop ist unter anderem mit Fluoreszenzfiltern ausgestattet, die es uns erlaubten die Farbstoffe CY2 und CY3 zu untersuchen. Mit der dazugehörigen digitalen Olympus DP10 Kamera fotografierten wir sowohl die DAB-

als auch die fluoreszenzgefärbten Schnitte und werteten diese anschließend aus. Die Verarbeitung der Bilder wurde mit der Olympus DP-Soft 3.0 Software durchgeführt.

5.3. Biochemische Untersuchungsmethoden

5.3.1. Affinitätschromatographie für ABP

Bevor wir den Westernblot und die SELDI-TOF Massenspektrometrie durchführen konnten, mussten die Proben gereinigt werden. Es sollten alle Bestandteile, außer ABP, herausgefiltert werden. Um das zu erreichen führten wir die Affinitätschromatographie durch.

1) Ausschluss schwerster Bestandteile und Gewinnung einer dünnflüssigen Phase

Die homogenisierten Extrakte werden für 20min bei 8000U/min zentrifugiert. Der Überstand wird mit einer Pipette abgeschöpft und in ein neues Eppendorf-Gefäß eingefüllt.

2) Inkubation in der Säule

Die Proben werden nun mit der Affinitätschromatographie gereinigt. Dazu wird jeweils 1ml in einer aABP-konjugierten ProteinA-Sepharosesäule für 90min inkubiert. Das Waschen mit PBS wird vollzogen bis das Filtrat nach Prüfen (mit Proteinfärbung eines Dot-Blots mit Coomassie Blau) proteinfrei ist.

3) Eluierung des Proteins

Nun wird ABP mit einem 0,1M Glycin-HCl-Puffer (pH 4,0) eluiert. Damit wird die Bindung von ABP an den an der Säule verankerten Antikörper gelöst.

4) Substitution des Puffers

Um den Puffer zu entfernen werden die Proben in einen Dialyseschlauch gegeben. Dieser Schlauch ist nur für niedermolekulare Stoffe durchlässig (bis 5kDa), nicht für ABP. Er wird mit Inhalt über Nacht in ein Gefäß mit destilliertem Wasser gegeben. So kann der Puffer durch einfache Diffusion gegen destilliertes Wasser substituiert werden.

5) Aufkonzentration der Proben

In einer Vakuumzentrifuge werden die Proben nun gefriergetrocknet. Das Ergebnis ist aufkonzentriertes, entwässertes ABP. Zur Aufbewahrung wird es bei -80°C gelagert.

5.3.2. Westernblot-Analyse

Die gereinigten lyophilisierten Proben (Testis, Epididymis, Ductus Deferens, Prostatasekret, Prostata dorsolateralis, Prostata Ventralis und die Koagulationsdrüse der Prostata) werden in jeweils 25µl **Probenpuffer** gelöst und für 5min bei 100°C im Wasserbad gekocht.

Probenpuffer:

- 25µl Mercaptoethanol
- 25µl 2%iges Bromphenolblau in H₂O
- 450µl reduzierenden Probenpuffer

reduzierender Probenpuffer:

- 1,25ml Upper Tris
- 2ml SDS (10%)
- 3ml Glycerol
- 4,75ml Wasser

1) Elektrophorese

Es wird **Trenngel** mit 6% Polyacrylamid angesetzt, zwischen zwei Glasplatten gegeben und mit Wasser aufgefüllt (um das Gel zu glätten). Wenn es fest geworden ist (nach ca. 30min), wird das Wasser herausfiltriert, dafür **Sammelgel** hineingegeben, und der Kamm oben hineingeschoben (ca. 30min warten bis das Sammelgel fest ist). Anschließend wird der Kamm entnommen, die Glasplatten mit dem Gel aufrecht in eine Elektrophoresekammer gestellt und Elektrodenpuffer (25,2g Glycerin [Roth®], 6g Tris [Aidrich®], 2g SDS [Fluka®]) hinzugegeben.

Die in Probenpuffer gelösten Proben werden, nachdem sie bei 90°C für 5min gekocht haben, oben in das Sammelgel getrennt nebeneinander eingefüllt. Die Proben laufen ca. 1h bei 50V. Der Lauf der Proben wird anhand von Farbmarkern beobachtet.

Trenngel mit 6% Polyacrylamid:

- 2,5ml Lower Tris
- 2ml Acrylamid (Serva®)
- 5,5ml destilliertes Wasser
- 12µl APS (Ammoniumpersulfat)
- 12µl TEMED (Roth®)

4x Lower Tris pH 8,8 (100ml):

- 13,8g Tris (1,5M) (Aldrich®)
- 24ml 1M HCl
- 0,4g SDS (1,5M) (Fluka®)
- pH auf 8,8 einstellen

4% Sammelgel (3 ml):

- 1ml Upper Tris
- 0,67ml Acrylamidlösung
- 2,33ml Wasser
- 12µl APS
- 12µl TEMED

4x Upper Tris pH 6,8 (100 ml):

- 6,05g Tris (0,5M) (Aldrich®)
- 0,4% SDS (2 ml 20%)
- 0,4g SDS (Fluka®)

2) Elektroblootting

Beim Blotting wird ein Abklatsch der Banden des Gels auf Nitrozellulosepapier gebracht. Dazu wird das Trenngel (SDS-Gel) vorsichtig von den Glasplatten genommen, auf das Nitrozellulosepapier gegeben, in Anodenpuffer (635mg Tris Base [Aldrich®], 3,62g Glycerin [Roth®], 50ml Methanol [Roth®], 250ml Aqua dest.) getränktes Filterpapier eingeschlagen und außen mit Anodenpuffer getränktem Filzpapier eingefasst. Das Ganze kommt nun aufrecht in eine Wanne, diese wird mit Anodenpuffer aufgefüllt. Anschließend kann es 1h und 45min bei 200 mA laufen.

3) Absättigung unspezifischer Bindungsplätze

Die Folie wird für 1/2h in 50ml 2%iges Magermilchpulver in PBS getränkt und auf den Schüttler gegeben (danach Folie trocknen lassen).

4) Färbung

Die Folie wird nun mit 1:500 aABP vom Kaninchen in **PBS Tween** über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wird sie 3 mal 10min auf dem Schüttler in PBS Tween gewaschen. Jetzt erfolgt eine Inkubation mit anti-Rabbit IgG der Ziege (1:100 in PBS Tween) für 1h auf dem Schüttler. Danach wird es 3 mal 10min auf dem

Schüttler in PBS Tween gewaschen. Nun wird 1:100 PAP in PBS Tween gelöst und die Folie für eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert (dann 3 mal 10min in PBSTX waschen). Als letztes wird mit DAB und H₂O₂ gefärbt. Zum Stoppen der Reaktion wird die Folie für 5min in 1%iges Na₂S₂O₅ in Aqua dest. gegeben und dann mit Aqua dest. gespült.

PBS Tween (pH 7,2):

- 10ml 1 M Tris pH 7,9 Tris (=10 mM)
- 8,7g NaCl 0,15 M
- 4,6ml Tween (0,5%)
- 1000ml destilliertes Wasser

5) Konservierung

Die Folie wird zum Schluss für 2min in 10ml **Konservierungspuffer** eingelegt und anschließend auf Filterpapier getrocknet.

Konservierungspuffer:

- 125ml Ethanol
- 20ml Glycerin
- 355ml Aqua dest.

5.3.3. SELDI-TOF MS

1) Vorbereitung der Chips

Verwendet werden der H4-, der WCX2- und der SAX2-Chip. Die Testflächen dieser Chips werden mit einem Hydrophobmarker umrandet, um ein Verlaufen der Flüssigkeiten zu vermeiden. Danach werden sie mit entsprechenden Puffern dreimal 5min mit speziellen **SELDI-Puffer-Lösungen** (jeweils 5µl) gewaschen.

SELDI-Puffer-Lösungen:

- SAX2-Chiplösung (0,1M TRIS-Puffer, 0,02% PBS Tx; pH 8,5)
- WCX2-Chiplösung (100mM Ammoniumacetat-Puffer)
- H4-Chiplösung (100nM NaCl, 30% ACN in PBS)

2) Vorbereitung der Proben

Die vakuumzentrifugierten Proteinproben (Lobi ventralis und dorsolateralis der Prostata, Prostatasekret, Koagulationsdrüse, Ductus deferens, Testis und Epididymis) der Affinitätschromatographie werden nun, in für jeden Chip spezifischen Puffern, gelöst (siehe Kapitel 2.12).

3) Auftragen der Proben auf die Chips

Die gelösten Proben werden auf die, durch das Waschen aktivierten, Testflächen aufgetragen. Anschließend werden die SAX2- und WCX2-Chips mit den Proben für 90min in einer Luftfeuchtigkeitskammer geladen. Der H4-Chip wird nach dem Auflegen der Proben luftgetrocknet.

4) Sättigung der Proben mit Sinapinsäure und ihre Analyse

Nach dem Waschen der Chips mit den jeweiligen Puffern und HPLC werden die Proben mit Sinapinsäure (125µl ACN, 125µl 1%iges TFA) abgesättigt und können dann mit dem Proteinchip-laser analysiert werden. Er wird im positiven Ionenmodus verwendet (für Details siehe von Eggeling et al. 2000). Die Laserintensität wird auf 300nm eingestellt. Das entspricht annäherungsweise 200µJ. Bei der Anwendung eines Nitrogenlasers wird die Intensität auf 337nm eingestellt. Der Digitalisierer arbeitet bei 250MHz. Als Ergebnis wirft der Computer ein Datensammlungsprotokoll aus, welches eine Auswertung ermöglicht.

5) Anfertigen von Kontrollen

Für Kontrollzwecke werden die Ergebnisse mit den Ergebnissen des ABP-Nachweises des Testis der Ratte verglichen. Dieser wird dazu homogenisiert und affinitätsgereinigt. Die oben beschriebene Methode findet hier ebenfalls Anwendung.

5.3.4. Auswertung der biochemischen Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse des Westernblots wird ohne technische Hilfsmittel vorgenommen.

Die Kurven der SELDI-TOF MS werden vom Computer erstellt und ausgeworfen. Wir nutzten die Chipergen Proteinchipsoftware 2.01 für die Datenanalyse. Die

Auswertung der massenspektrometrischen Kurven erfolgte ebenfalls ohne technische Hilfsmittel.

5.4. In situ Hybridisierung

Vorbereitung der Schnitte

1) Vorbereiten des Gewebes

Die Tiere werden, wie für die Immunzytochemie mit Paraformaldehyd perfundiert. Das entnommene Gewebe (in diesem Fall der Testis, der Epididymis und sämtliche Lappen der Prostata) wird jedoch sofort nach der Resektion bei -20°C tiefgefroren.

2) Anfertigen der Schnitte

Für die in situ Hybridisierung müssen die Schnitte nach einem anderen Protokoll, als für die vorhergehenden Färbungen angefertigt werden. Von den Geweben werden in gefrorenem Zustand 15µm starke Schnitte mit dem Kryostat angefertigt und auf silanbeschichtete sterile Objektträger gegeben. Die Schnitte werden nun bei 55-65°C 3h getrocknet und mit 4% PFA in PBS, pH 7,4 für 10min bei Raumtemperatur fixiert.

Vorbereitung der Materialien

Nach dem Fixieren der Schnitte auf den silanisierten Objektträgern müssen sie für die Hybridisierung vorbereitet werden. Für sämtliche Arbeitsschritte muss man vollkommen RNase frei arbeiten. Dazu werden alle zu verwendenden Gerätschaften vor der Durchführung für 3h in 180°C „gebacken“. Die Lösungen müssen ebenfalls RNase frei zubereitet werden.

Protokoll der Markierung

1) Permeabilisierung der Zellen

Die Schnitte werden zuerst mit verschiedenen Chemikalien bei 37°C (wurde mit einem Wasserbad realisiert) behandelt. Das ist nötig, um die Zellen für die Sonde zu permeabilisieren ohne die mRNA in der Zelle zu zerstören. Die Objektträger kommen für 10min in 4%iges PFA (pH 7,4) und werden dann für 10min in ein Bad mit 0,2M

HCL gestellt. Nun werden sie für 5min mit frisch angesetzter 0,1M Tris und 1µg/ml **Proteinase K** behandelt. Zuletzt werden die Objektträger für 10min in ein Bad mit 5mM Acetanhydrid in 0,1M **TEA** gegeben. Zwischen den einzelnen Schritten und zum Schluss werden die Schnitte jeweils 5min in PBS gewaschen.

Proteinase K

- 2mg Proteinase K
- 2ml PBS_{DT}
- je 200ml aliquotieren
- bei -20°C einfrieren

0,1M TEA (pH 8,0):

- 15g Triethanolamin
- 3,6ml HCL 25%
- 1l Aqua dest., autoklavieren

2) Hybridisierung der mRNA

Für die Hybridisierung der ABP-mRNA werden komplementäre synthetische Oligonukleotidproben verwendet, die am 3'-Ende mit 5'-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrdU) gekoppelt sind (Jirikowski et al. 1989). Die Sequenz der Antisenseprobe ist TGT AGA ATC AAA TCC CGG GA (entnommen aus der cDNA-Sequenz in Sullivan et al. 1993).

Die Hybridisierung wird über Nacht bei 40°C in 50% Formamid, 5x SSC, 0,4mg/ml Torula-RNA und 0,1mg/ml tRNA ausgeführt.

3) Waschvorgänge

Vor den nächsten Arbeitsschritten müssen die Proben zuerst gründlich gewaschen werden. Zuerst für 30min bei 60°C in 50% Formamid und 2x **SSC**, dann für 1h bei 60°C in 0,2x SSC und zuletzt 15min bei Raumtemperatur in 0,2x SSC.

20x SSC (pH 7,0)

- 175g NaCl
- 88g Na-Citrat x H₂O
- 1l H₂O dest.
- pH mit HCl auf 7 einstellen
- 1ml DEPD, rühren, autoklavieren

4) Anwendung der RNase A

Um die Proben von den überschüssigen, einzelsträngigen Resten der Sonden-DNA und der mRNA zu befreien, werden sie mit dem Enzym RNase A inkubiert. Die RNase A ist zu 20µl/ml in **TEN** gelöst und wird bei 37°C für 30min auf die Proben gegeben. Darauf folgen wieder mehrere Waschschrte: 3 mal 10min bei 37°C in TEN, 15min bei 55°C in 50%igem Formamid mit 2xSSC, 15min bei 55°C in 0,2xSSC und zuletzt 15min bei Raumtemperatur in 0,2xSSC.

TEN (pH 7,4)

- 10ml 1M Tris
- 2ml 0,5M EDTA
- 100ml 5M NaCl
- auf 1l mit Aqua dest. auffüllen

5) Blocken der Proben

Um weitere Reaktionen zu verhindern, werden die Proben geblockt. Das geschieht mit der 2%igen Blockreagenz **MABS** bei Raumtemperatur über Nacht.

5x MABS (pH 7,5)

- 58,04g Maleinsäure
- 150ml 5M NaCl
- auf 1l mit Aqua dest.
- pH mit NaOH einstellen

6) Färbung

Die Färbung der Proben ist eine Immunreaktion. Es werden monoklonale Mausantikörper gegen BrdU mit einer Verdünnung von 1:400 in PBS verwendet. Die Inkubation läuft bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag werden sie mit der Biotin-Streptavidin-Methode wie oben beschrieben gefärbt.

Kontrollen

Die Negativkontrolle wird mit der komplementären sense-Sonde anstelle der antisense-Sonde angefertigt. Als Positivkontrolle dient bei diesen Versuchen das

nach unserer Methode gefärbte Gewebe des Testis. In diesem Gewebe wurde in früheren Arbeiten (Chen et al. 2000) ABP-mRNA in den Sertolizellen nachgewiesen.

5.4.1. Auswertung der in situ Hybridisierung

Bei der Auswertung dieser Schnitte wird wie oben das Mikroskop Olympus Dp -Soft BX 50 verwendet. Mit der digitalen Olympus DP10 Kamera wird fotografiert und ausgewertet.

Die Auswertung der Schnitte erfolgt ausnahmslos mit dem Mikroskop Olympus mit der Interferenz Kontrast-Beleuchtung. Mit der dazugehörigen digitalen Olympus DP10 Kamera fotografieren wir die DAB-gefärbten Schnitte und werten diese anschließend aus. Die Verarbeitung der Bilder wird mit der Olympus Dp-Soft 3.0 Software durchgeführt.

5.5. Verwendete Geräte und Chemikalien

Die noch nicht genauer charakterisierten Geräte und Chemikalien möchte ich in der folgenden Liste auführen:

Antikörper

Mouse-AntiBrdU monoclonal antibody	Progen®
Rabbit aOT	Sigma®
Rabbit aABP	Becchis et al. 1996
Fluoreszierende anti Rabbit, gekoppelt mit CY2 bzw CY3	Dianova®
Biotingekoppeltes anti-rabbit	Sigma®
Streptavidin, gekoppelt mit Peroxidase	Sigma®
monovalente Antikörperfragmente (Fab,)	Dianova®
anti-Rabbit-Brücken-IgG der Maus für PAP	Sigma®
Peroxidase konjugierte rabbit IgG	Sigma®

Geräte

Blotgerät (E802)	Consort®
BrdU (5'-Bromo-2'-Desoxyuridin)	Sigma®
Brutschrank	Inkubat®
Chips für SELDI (WCX2, SAX2, H4)	Chipergen®
Deckgläser	Menzel Deckgläser®
Dialyseschlauch (5kDa)	Neolab®
Elektrophoresekammer	Life Technologies®
Filterpapier	Whatman®
Kamera (DP10)	Olympus®
Kryostat Frigomt 2600E	Reichert ®
Mikroskop (Dp-Soft BX 50)	Olympus®
Nitrozellulosepapier	Pierce®
Objektträger	Menzel Deckgläser®
Ultramikrotom (Ultracut S,)	Reichert®
Vakuumpzentrifuge	Savant®
Vortexer (VF2,)	Janke& Kunkel®
Zentrifuge (16R)	Universal Technologies®

Software

MS-Word 2002
Olympus Dp-Soft 3.0
Chipergen Proteinchipsoftware 2.01
Paintshop Pro 7.02

6. Ergebnisse

6.1. Immunhistochemische Untersuchungen

6.1.1. Einfache immunzytochemische Markierung mit DAB

Im semidünnen Serienschnitt war es möglich Einzelzellen von Folgeschnitten mit verschiedenen Antikörpern zu färben. Somit sind mit der einfachen DAB-Färbemethode Koexistenzstudien möglich. Im Folgenden werden die Organe einzeln besprochen:

Lobi dorsolateralis und ventralis der Prostata

1) Ergebnisse der Färbungen von ABP

In den Schnitten erkennt man die Tubuli mit deren Epithelzellen, welche von interstitiellem Bindegewebe und glatten Muskelzellen umgeben sind. Die spezifische Färbung von ABP zeigt sich in den Epithelzellen (Abb. 6.2.A), in den subepithelialen Zellen (Abb. 6.1.A, weiße Pfeile) und in gefäßassoziierten, subepithelialen Zellen (Abb. 6.2.C, schwarzer Pfeil). Viele Zellen in diesem Teil der Prostata zeigen eine schlechte zytoplasmatische Immunfärbung der Epithelzellen (Abb. 6.1.A, viereckige Pfeile).

Eine Gruppe von intensiv gefärbten Zellen stellen die subepithelialen Zellen dar (Abb. 6.1.A, weiße Pfeile), davon sind einige mit Blutgefäßen assoziiert (Abb. 6.2.C, schwarzer Pfeil). Eine andere Gruppe dieser intensiv gefärbten Zellen haben direkten Kontakt zum Drüsenlumen (Abb. 6.2.A, schwarzer Pfeilkopf). Auch das Prostatasekret ist gefärbt (Abb. 6.1.A, schwarzer Pfeil). Die Färbungen der Epithelzellen zeigen Unregelmäßigkeiten in Menge und Farbintensität. Manche von diesen sind bis auf den Zellkern vollständig gefärbt, während andere eine schollenartige Struktur aufweisen.

Der ventrale Lappen der Prostata zeigt eine etwas schlechtere Immunreaktivität, aber ähnliche Färbemuster.

2) Ergebnisse der Färbung von Oxytocin

Die Bilder B und D der Abbildungen 6.1. und 6.2. zeigen die immunzytochemische Färbung von OT. Man sieht in Abb. 6.1.B das gefärbte Prostatasekret (weißer Pfeil), umgeben von schwach gefärbten subepithelialen Zellen (Abb. 6.1.B, viereckige Pfeile). Darunter liegen die etwas intensiver gefärbten subepithelialen Zellen (schwarze Pfeile).

Abb. 6.2. B zeigt an das Lumen angrenzend Epithelzellen, welche OT enthalten. Auch gefäßassoziierte Zellen der Prostata enthalten das Nonapeptid (Abb. 6.2.D).

Koagulationsdrüse der Prostata

1) Ergebnisse der Färbungen von ABP

In diesem Teil der Prostata sind die Tubuli im Semidünnschnitt unregelmäßiger in Größe und Form als in den anderen Teilen der Prostata. Auch in der Färbung unterscheiden sie sich. Während die Epithelzellen in den beiden anderen Lappen der Prostata teilweise oder vollständig im gesamten Zytosol gefärbt sein können, sind die Zellen in der Koagulationsdrüse ausschließlich basal (Pfeile in Abb. 6.1.C) gefärbt. Die apikalen (zum Lumen gewandte) Bereiche weisen keine Färbung auf. Allerdings kann man ebenfalls in diesen Schnitten Unterschiede in Menge und Farbintensität der gefärbten Antigene feststellen. Auch in diesem Lappen kann ABP im Drüsenlumen nachgewiesen werden.

2) Ergebnisse der Färbung von Oxytocin

Es ist sehr auffällig, dass bei der OT-Markierung die Zellen wie beim ABP-Nachweis ausschließlich basal (Pfeile im Bild 6.1.D) gefärbt sind. Kernfärbungen sind nicht zu sehen.

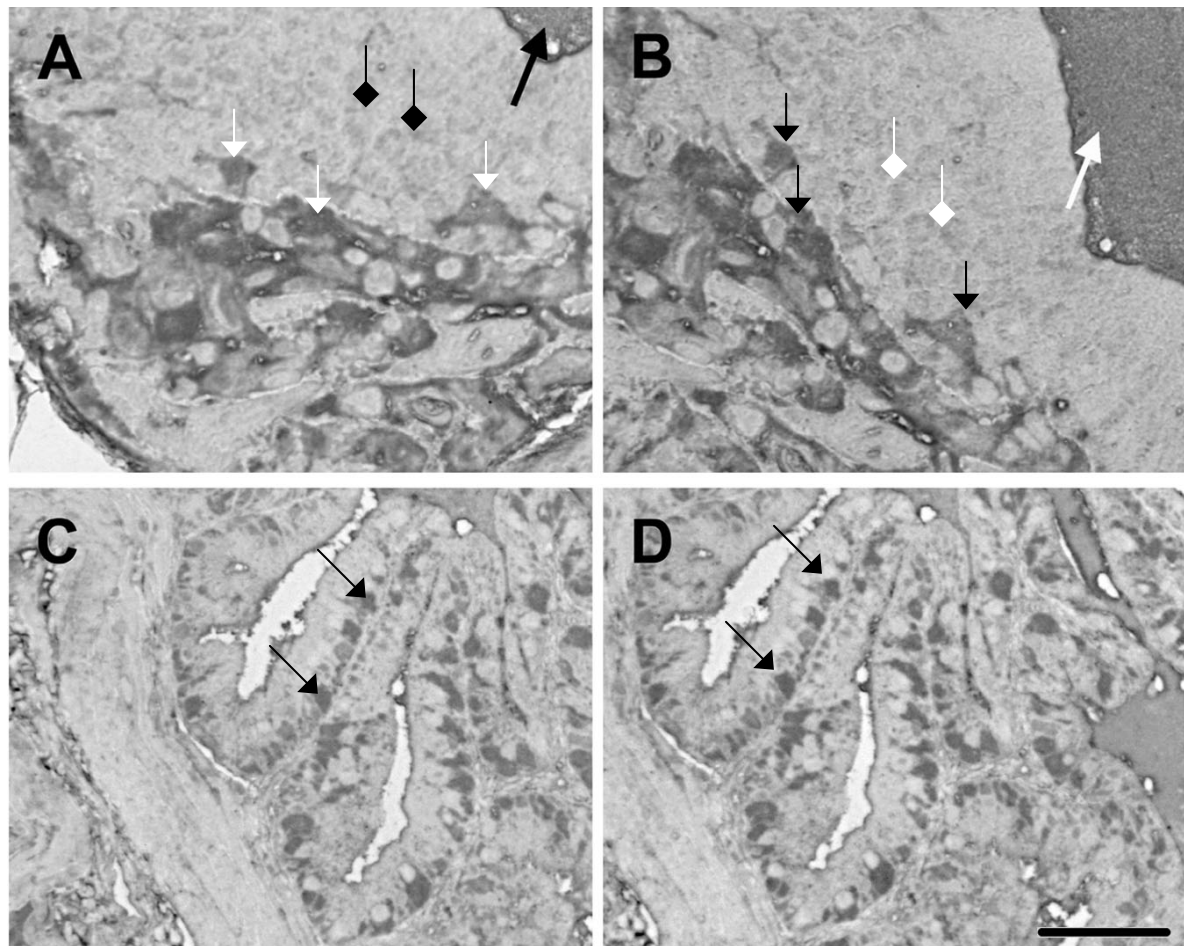


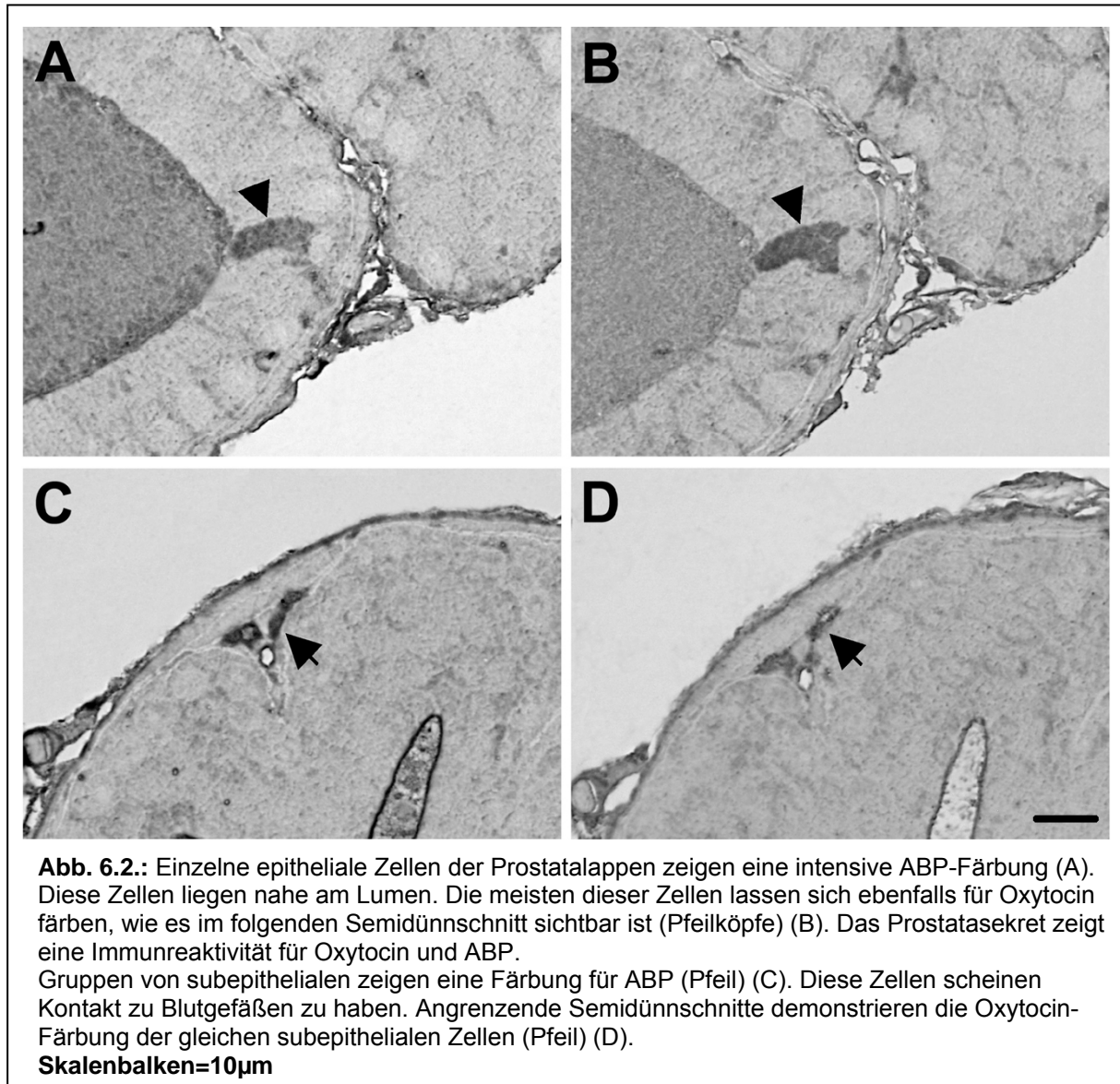
Abb. 6.1.: ABP- und Oxytocin-Immunreaktivität in den Lappen der Prostata, visualisiert mit der ABC-Methode.

A: Eine intensive zytoplasmatische Immunfärbung ist in zahlreichen subepithelialen Zellen (weiße Pfeile) des dorsolateralen Lappen der Prostata sichtbar. Eine Fraktion von epithelialen Zellen zeigt eine schwache ABP-Färbung (viereckige Pfeile). Das Lumen ist mit einem homogenen ABP-immunreaktiven Sekret gefüllt (schwarzer Pfeil).

B: Eine Oxytocin-Färbung kann an ähnlichen Stellen im Lobus dorsolateralis der Prostata beobachtet werden.

Eine starke, homogene Markierung von ABP (C) und Oxytocin (D) wurde in den Epithelien der Koagulationsdrüse der Prostata gefunden.

Skalenbalken=50µm



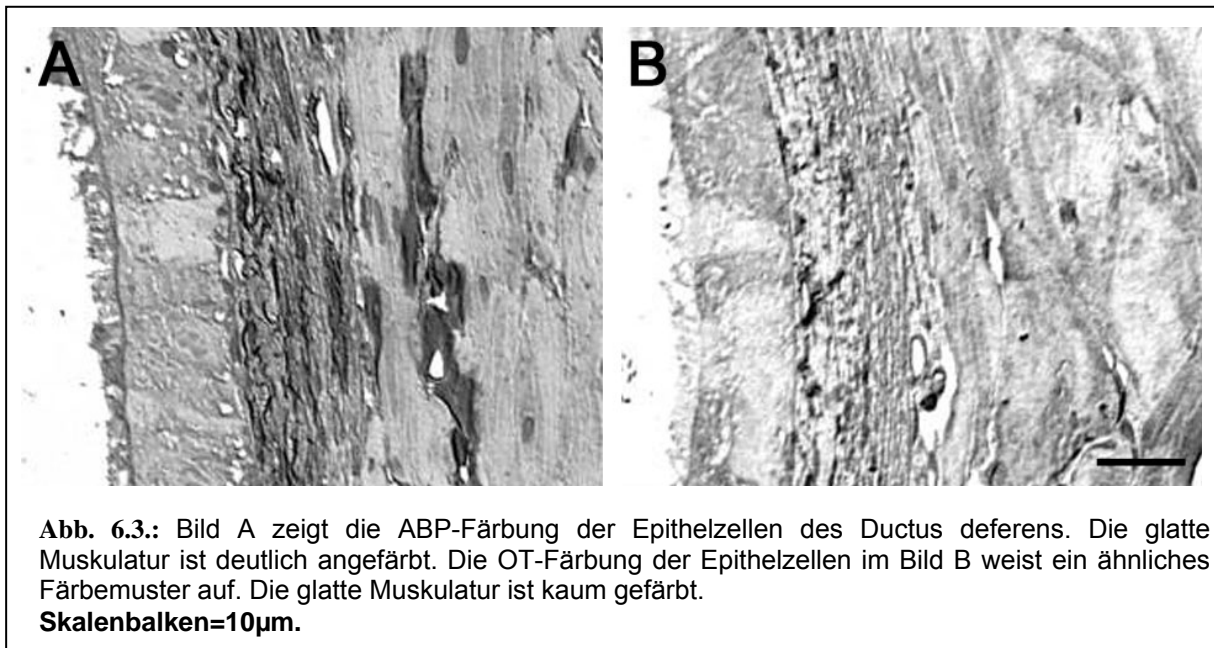
Ductus deferens

1) Ergebnisse der Färbungen von ABP

Im Ductus deferens erkennt man deutlich das hochprismatische Epithel, welches an sein Lumen grenzt. Auch in diesem Epithel können wir ABP lokalisieren. Die meisten Zellen sind schwach gefärbt. Es gibt vereinzelt Zellen, die eine starke Immunreaktivität aufweisen. Außerdem fanden wir eine starke homogene Färbung in der inneren longitudinalen Muskelschicht. Die Färbung der Zellkerne ist hier ebenfalls ausgeblieben.

2) Ergebnisse der Färbung von Oxytocin

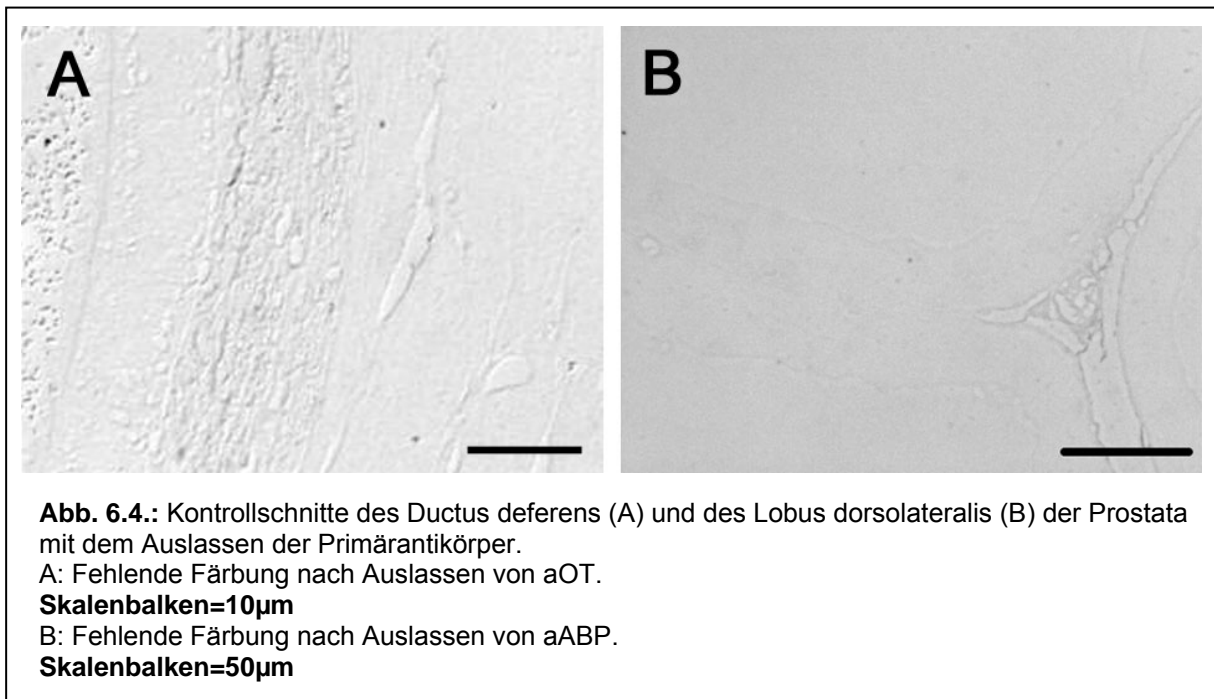
Es sind eindeutig Struktur und Zellgrenzen des Gewebes zu sehen. Die Färbemuster ähneln stark denen der ABP-Färbung. Die Farbintensität und die Zahl der angefärbten Zellen ist etwas geringer.



Ergebnisse der Kontrollen

Um jede Art von Kreuzreaktionen ausschließen zu können, haben wir Negativkontrollen angefertigt (Abb. 6.4.). Bei diesen wurde eine Inkubation mit dem Primärantikörper ausgelassen. Die Ergebnisse dieser Negativkontrollen entsprachen unseren Erwartungen, denn es wurde kein Gewebe gefärbt.

Unsere Positivkontrollen (Markierungen von ABP) zeigten die erwartete Färbung der Sertolizellen.



Vergleich der Folgeschnitte

Da wir immer in einem Gewebsschnitt ABP und im darauffolgenden OT gefärbt haben (bzw. umgekehrt), ist es leicht die Strukturen zu vergleichen. In den Folgeschnitten sind oftmals identisch angeschnittene Zellen zu erkennen. Wenn wir identische Areale der Folgeschnitte übereinander halten, können wir bei vielen Zellen eine Koexistenz von ABP und OT feststellen. Für die Koagulationsdrüse, die beiden anderen Lappen und den Ductus deferens kann man die Abbildungen vergleichen. In den Abbildungen 6.1, 6.2., 6.3 ist Bild B immer Folgeschnitt von Bild A und Bild D immer von Bild C. Die Färbemuster stimmen in den jeweiligen Folgeschnitten überein (man beachte die Pfeile). Dieses beeindruckende Ergebnis brachte uns auf die Idee einer Doppelmarkierung, um die Koexistenz anschaulicher und präziser darzustellen.

6.1.2. Immunzytochemische Doppelmarkierung

Etablierung der Doppelmarkierung mit Fluoreszenzfarbstoffen

1) Wahl der Antikörper

Vorversuche haben ergeben, dass hier dieselben Antikörper mit der gleichen Verdünnung wie bei der Einfachmarkierung mit DAB am besten funktionieren. Das sind ausschließlich Kaninchenantikörper.

2) Ausschluss der Kreuzreaktionen

Die Hintergrundfärbung kann durch Normalserum des Menschen verhindert werden. Aufgrund des identischen Fc-Teils von aABP und aOT waren Kreuzreaktionen der Sekundärantikörper möglich. Unsere ersten Versuche bestätigten das. Die Färbungen überlagerten sich und ergaben kein glaubhaftes Färbemuster. Kontrollen lieferten uns den Beweis für die falsche Färbung.

3) Verdünnung der Antikörpergekoppelten Fluoreszenzen

Die idealen Verdünnungen fanden wir bei 1:500 für CY3 und 1:200 in CY2. Der Grund für die geringere Verdünnung von CY2 besteht in der zu schwachen Farbintensität, die der Fluoreszenzfarbstoff CY2 bei 1:500 zeigte.

Ergebnisse der Doppelmarkierung

Wir haben in allen Geweben das Ergebnis einer Kolokalisation erhalten, beschränken uns aber mit der Darstellung der Doppelmarkierung auf den Ductus deferens (Abb. 6.5.A) und Ductus epididymidis (Abb. 6.5.B). Mit diesen kommt die Kolokalisation besonders gut zur Geltung. Auch bei dieser Färbung erkennen wir eine Inhomogenität der Färbungen in Struktur und Farbintensität. Trotzdem kann man deutlich das rotgefärbte ABP identifizieren. Ähnlich verteilt, aber in geringerer Menge sieht man auch das grüengefärbte OT. Man erkennt eine fast 100%ige Deckung in allen Geweben, auch wenn diese Deckung nicht immer mit der hervorstechenden orange-gelben Färbung (weiße Pfeile) demonstriert ist. Bei der Doppelmarkierung sind ebenfalls die ungefärbten Kerne zu sehen.

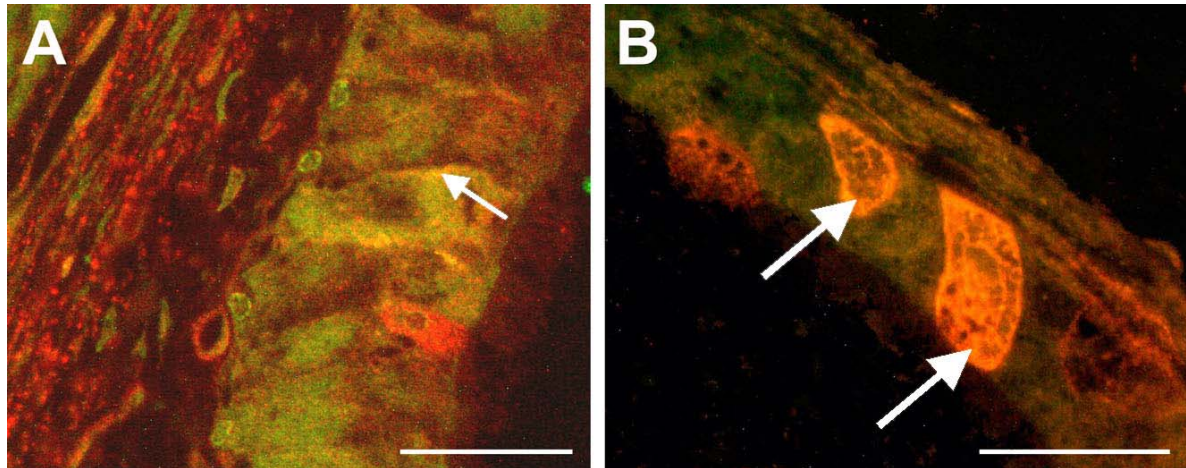


Abb. 6.5.: Doppelmarkierung mit den Fluoreszenzfarbstoffen CY3 (ABP, rot) und CY2 (Oxytocin, grün) des Ductus deferens (A) und des Ductus epididymidis.

A: Man sieht ihn mit der zum größten Teil rot gefärbten glatten Muskulatur (links im Bild) und den Epithelzellen (rechts im Bild). Einzelne Epithelzellen beinhalten sowohl ABP als auch OT. Die orange-gelben Färbungen weisen auf eine Überlagerung der beiden Moleküle hin (weiße Pfeile) (Mischfarbe). Kaum eine Koexistenz von ABP und OT sieht man in den Muskelzellen.

B: Man sieht die orange-gelbe Kolokalisation (weiße Pfeile) der grünen ABP- und roten OT-Immunfluoreszenz in den Epithelzellen des Epididymis.

Skalenbalken=30µm.

Ergebnisse der Kontrollen

Um Kreuzreaktionen zwischen den Farbstoffen auszuschließen, fertigten wir Kontrollfärbungen an. In diesen Kontrollfärbungen ließen wir die Inkubation mit den zweiten Primärantikörpern aus und erhielten das erwartete Ergebnis: Die Antikörper mit dem zweiten Fluoreszenzfarbstoff konnten nirgendwo gebunden werden.

6.2. Biochemische Untersuchungen

6.2.1. Affinitätschromatographie

Nach der Inkubation der Säule wurden die homogenisierten Extrakte mit PBS ausgewaschen. Zu Beginn war der Nachweis der Proteine des Filtrats positiv. Es trat eine intensive Färbung nach Proteinfärbung von einem Dot-Blot mit Coomassie-Blau auf. Beim Waschen wurde die Farbtintensität schwächer bis keine Färbung mehr zu sehen war.

Am Anfang der Eluation mit 0,1M Glycin-HCl-Puffer (pH 4,0) konnte man erneut eine

Färbung des Dot-Blots mit Coomassie-Blau feststellen. Das Eluat wurde aufgefangen bis die Färbung des Dot-Blots negativ war.

Nach Dialyse des Eluats und anschließender Vakuumzentrifugation war ein gefriergetrocknetes, aufkonzentriertes Protein (ABP) am Boden der Eppendorfs zu erkennen.

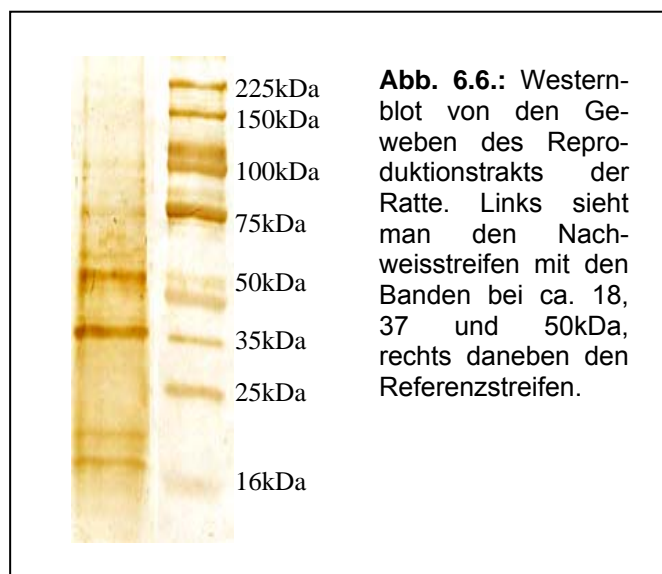
6.2.2. Westernblot

In der Abbildung 6.6. sieht man das DAB-gefärbte Nitrozellulosepapier des Westernblots. Auf der rechten Seite befindet sich der Referenzstreifen zum Festlegen der Molekülgröße der Banden des linken Streifens.

Man kann auf dem linken Streifen deutlich drei Banden identifizieren. Sie liegen bei ca. 18, 37 und 50kDa und weisen durch die Anwendung von DAB, nach einer Primärinkubation mit aABP und der PAP-Methode, eine braune Färbung auf.

Der Referenzstreifen wurde ebenfalls mit der PAP-Methode gefärbt, allerdings proteinunspezifisch. Er wurde zum Festlegen der Molekülgrößen im Teststreifens in derselben Elektrophorese erstellt.

Während die Banden im Bereich bei 37 und 50kDa sehr kräftig gefärbt und scharf begrenzt dargestellt sind, zeigt die Bande bei 18kDa eine schwächere Färbung und erscheint gesplittet. Trotzdem zeigt sie eine intensivere Färbung in dem Bereich, der näher an der 18kDa-Marke liegt (siehe die schwach markierte Bande bei 16kDa im rechten Streifen).



6.2.3. SELDI-TOF MS

Ergebnisse

In den gereinigten Extrakten der Lobi ventralis und dorsolateralis der Prostata, ihrer Koagulationsdrüse, des Prostatasekrets, und des Ductus deferens sowie zur Kontrolle im Testis haben wir ABP mit Hilfe der SELDI-TOF MS nachgewiesen (Abb. 6.7.). Wie schon erwähnt, wurde ABP anhand der Molekülgröße nachgewiesen und charakterisiert. Der schließlich verwendete Chip war der SAX2. Bei diesem sah man die KGs besonders deutlich. Die Massenspektrometrie des aABP ergab keine Spitzen, die sich mit denen der Extrakte decken, womit sicher ist, dass die Antikörper der Affinitätschromatographie nicht die Ursache der Spitzen in den Ergebnissen der SELDI-TOF-Analyse war. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Organe einzeln vorgestellt:

1) Testis

Im Diagramm des Testis kann man drei KG erkennen: bei 18,7, 37,3 und bei 47,5kDa. Der größte Ausschlag liegt bei 37,3kDa. Im Testis wurde in früheren Arbeiten bereits ein Vorkommen an ABP nachgewiesen. Somit kann man sich an der Kurve dieses Diagramms orientieren.

2) Lobi ventralis und dorsolateralis der Prostata

In diesem Diagramm sieht man einen großen KG bei 19,2kDa und zwei fast nur zu erahnende KGs bei 37kDa und 47,5kDa.

3) Prostatasekret

Im Prostatasekret ist der KG bei mittlerer Molekülmasse (37,3kDa) noch schwächer ausgeprägt, als bei den Prostatalappen. Ein KG bei 48kDa ist nicht zu finden. Nur der KG bei 19,2kDa ist deutlich zu erkennen.

4) Koagulationsdrüse

In der Koagulationsdrüse sind alle drei KGs wieder eindeutig zu erkennen. Sie liegen bei 19, 37,1 und 47,5kDa.

5) Ductus deferens

Man erkennt die drei typischen KGs bei 19,2, 37,2 und 47,5kDa sind eindeutig zu identifizieren. Der KG bei 37,2kDa ist am deutlichsten ausgeprägt.

6) Epididymis

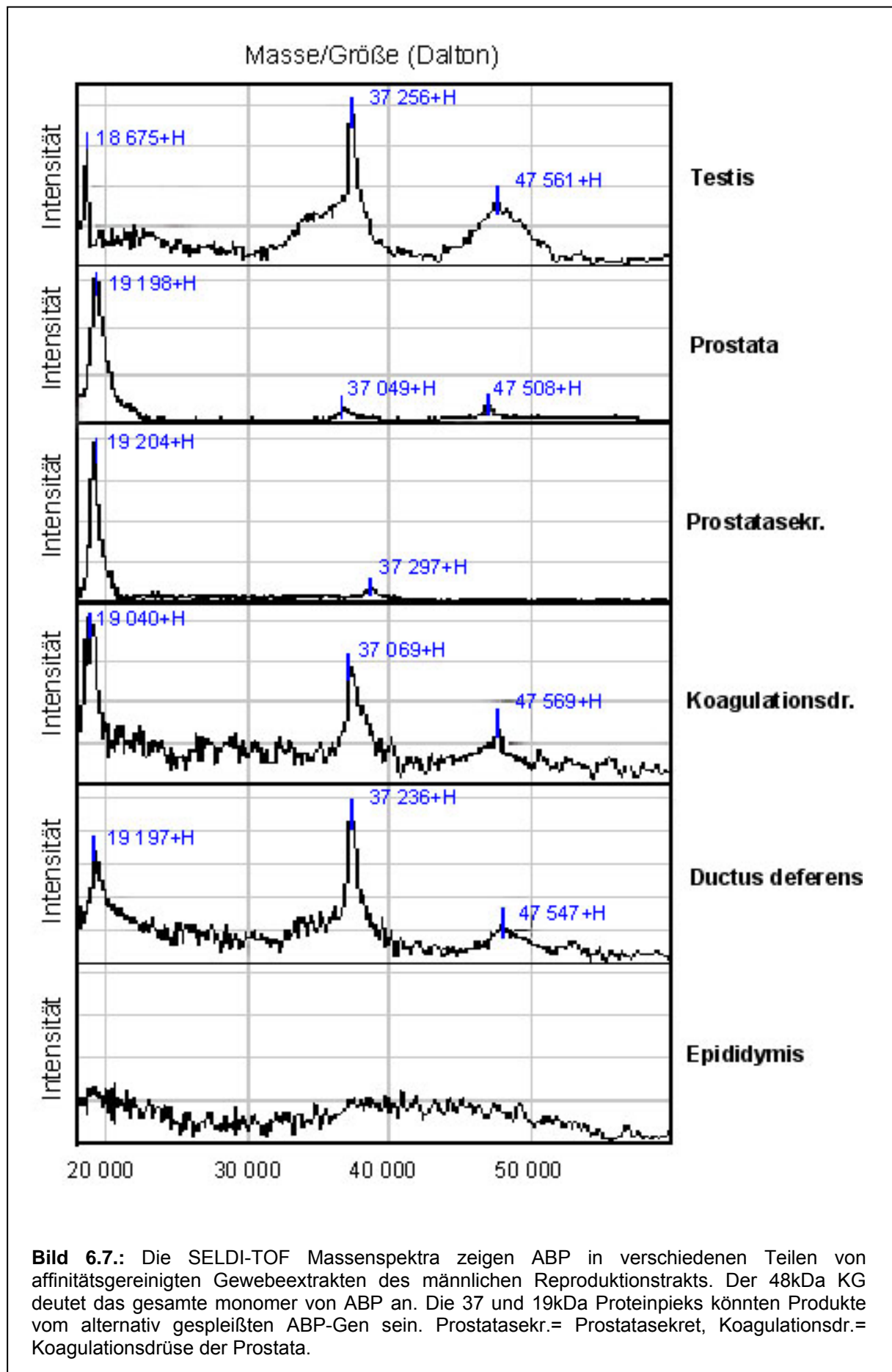
Im Epididymis hat man keine Spitzen. Man kann lediglich zwei Erhebungen, eine bei 19kDa und eine zwischen 37kDa und 50kDa erahnen.

Übersicht der Ergebnisse

Um die Ergebnisse übersichtlicher zu gestalten, habe ich eine Tabelle erstellt, in der man sich die Anordnung der KG der Massenspektrometrie in den Organen einmal vor Augen halten kann:

	19 KDA	37 KDA	48 KDA
Testis	+	+	+
Prost. V und DL	+	+	+/-
Prostatasekret	+	+/-	-
Koagulationsdrüse	+	+	+
Ductus Deferens	+/-	+	+/-
Epididymis	+/-	+/-	+/-

Tab. 6.1.: Legende: + = Spitze im jeweiligen Massebereich; - = keine Spitze vorhanden; +/- = Erhebung im jeweiligen Massenbereich



6.3. In situ Hybridisierung

Ergebnisse der Prostata

In den Bildern A, B und C der Abb. 6.8. sieht man Ausschnitte aus dem Gewebe der Prostata mit den Epithelzellen des Drüsenkörpers. Markiert ist in diesen Bildern das Hybridisierungsprodukt der BrdU markierten Oligonukleotide mit mRNA von ABP. Färbungen treten in vielen Zellen auf. Die Zellgrenzen sind nur zart angedeutet und oft sind die Kerne gefärbt. Die Färbung kann sich bis in das Zytosol ausdehnen. Es gibt Zellen, in denen ausschließlich Teile des Zytosols gefärbt sind. Die Färbung ist inhomogen, von unterschiedlicher Farbintensität und liegt im Zytosol und vielen Kernen schollenartig vor. Kontrollinkubationen mit der sense-Probe blieben ungefärbt (Abb. 6.8.D).

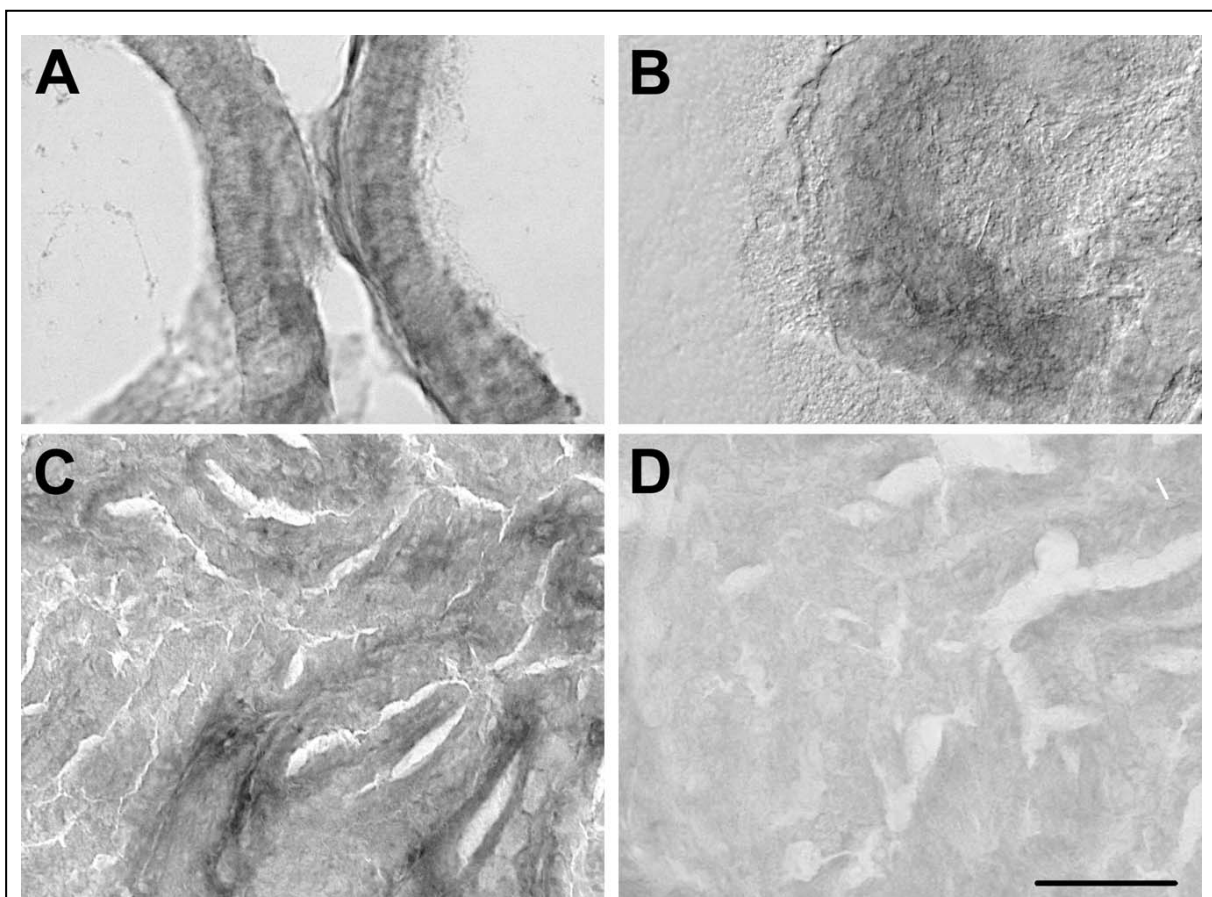


Abb. 6.8.: Die ABP-Expression wird mit der in situ Hybridisierung in den verschiedenen Lappen der Prostata demonstriert. Die hybridisierte ABP-mRNA wurde mit der immunzytochemischen ABC-Methode gegen die BrdU-gekoppelten Proben visualisiert. Immunreaktivität ist in den epithelialen Geweben des ventralen Lappen (A), dorsolateralen Lappen (B) und in der Koagulationsdrüse (C) der Prostata sichtbar.

D: Kontrolle: Der Schnitt der Koagulationsdrüse wurde mit der sense-Probe, statt mit der spezifischen antisense-Probe hybridisiert.

Skalenbalken=50µm

Ergebnisse des Testis

In Abb. 6.9.A ist ein Ausschnitt aus dem interstitiellen Bindegewebe des Testis zu sehen. Leydig-Zwischenzellen sind intensiv gefärbt und man erkennt einzelne Zytoplasmaausläufer. Sie haben engen Kontakt zu den Kapillaren (K).

Die Sertolizellen erstrecken sich von der Basalmembran bis zum Tubuluslumen. Der Zellkern liegt basal. Man sieht im Bild der Abb. 6.9.B, dass sich die Färbung unregelmäßig und sehr schwach über die gesamte Zelle erstreckt.

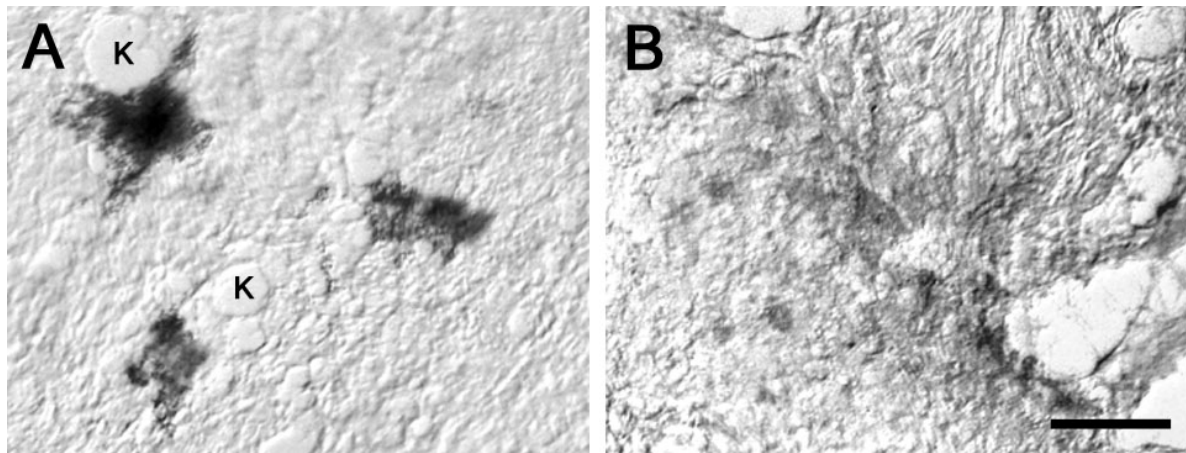


Abb. 6.9.: In situ Hybridisierung des Testis mit gefärbten Leydig-Zwischenzellen (A) und zur Kontrolle die Sertolizellen (B).

A: Interstitielles Bindegewebe des Testis mit den angefärbten Leydig-Zwischenzellen und den angrenzenden Kapillaren (K).

B: Sertolizelle, die sich im Tubulusepithel von der Basalmembran bis zum Lumen erstreckt.

Skalenbalken=10µm

7. Diskussion

7.1 Etablierung der Methoden

Unter den Möglichkeiten der Konservierung und Einbettung von Geweben entschieden wir uns für die Einbettung in Eponharz. Der Vorteil dieser Methode ist die optimale Konservierung der Nukleinsäuren in den Zellen (Jirikowski et al. 1990b) und die Möglichkeit für das Anfertigen von Semidünnschnitten mit einer Stärke von 1µm. Das ermöglichte den Vergleich der Färbemuster von OT und ABP in den Folgeschnitten. So konnten wir die Kolokalisation von ABP und OT nicht nur mit den beiden Fluoreszenzfarbstoffen CY2 und CY3 nachweisen, sondern auch mit der DAB-Färbemethode. Da wir bei dieser Methode die Kreuzreaktionen der Sekundärantikörper mit den Fc-Teilen der Primärantikörper (aABP und aOT) ausschließen können, ist die Spezifität der Doppelmarkierung untermauert. Die Kolokalisation von ABP und OT in Harz eingebetteten Geweben wurde bereits von Herbert et al. (2003) im Hypothalamus durchgeführt.

Kontrollinkubationen mit Normalserum anstelle der spezifischen Antikörper oder mit dem Weglassen der primären Antikörper zeigten keine Farbreaktion. Wir konnten deshalb davon ausgehen, dass es keine Kreuzreaktionen des Gewebes mit den nachfolgenden Inkubationen gab.

Die Aufreinigung der Proben für die Elektrophorese durch Affinitätschromatographie stellte sicher, dass die entstandenen Proteinbanden des Westernblots bei 19, 36 und 47kDa ausschließlich ABP enthalten. Diese Molekülgrößen entsprechen der Literatur (Joseph et al. 1994). Auch die SELDI-TOF MS zeigte ein Vorkommen von ABP in den untersuchten Geweben bei 19, 36 und 47kDa, was die immunzytochemischen Ergebnisse ebenfalls unterstützt.

Unsere immunzytochemischen Nachweise von OT in den Leydig-Zwischenzellen (Yeung et al. 1988) und ABP in den Sertolizellen (Oke und Suarez-Quian, 1993) im Testis stimmen mit der Literatur überein. Die Zellkerne blieben ungefärbt, weil OT und ABP keine Kernmembrangängigkeit besitzen.

Die erhaltenen Ergebnisse lassen vermuten, dass ABP nicht nur im Testis, sondern auch in anderen Teilen des männlichen Reproduktionstrakts synthetisiert wird. Für diesen Nachweis wählten wir die Methode der in situ Hybridisierung. Damit konnten wir die Anwesenheit von ABP codierender mRNA demonstrieren. Bei dieser

Untersuchung dienten uns die Sertolizellen des Testis als Kreuzvergleich und stimmten mit älteren Ergebnissen überein (Chen et al. 2000).

7.2. ABP

1) Lokalisation von ABP

ABP wurde im Testis vieler Säugetiere immunzytochemisch und biochemisch beschrieben, dazu gehören der Mensch, die Ratte und die Maus (Joseph 1994). Im Epididymis (Musto et al. 1980, Pelliniemi et al. 1981, Feldman et al. 1981) und in der Prostata (Larriva-Sahd et al. 1991) der Ratte wurde dieses Protein ebenfalls lokalisiert.

Mit der immunzytochemischen Färbemethode gelang uns der Nachweis von ABP im Testis, im Epididymis und in der Prostata der Ratte. Mit diesen Ergebnissen konnten frühere Arbeiten (Feldman et al. 1981 Larriva-Sahd et al. 1991 Joseph 1994) bestätigt, und damit die Legitimität unserer Schlussfolgerungen gesichert werden. Des Weiteren lokalisierten wir ABP erstmals immunzytochemisch im Ductus deferens. Im Testis und in der Prostata waren häufig blutgefäßassoziierte Zellen angefärbt. Damit besteht die Möglichkeit einer endokrinen ABP-Sekretion und damit auch ABP-Synthese dieser Zellen. Sie könnten infolgedessen den gesamten Reproduktionstrakt über den endokrinen Weg versorgen. In diesen beiden Geweben konnte ferner das luminale Sekret gefärbt werden. Daraus ergeben sich zwei mögliche Erklärungen, nämlich die Resorptions- oder die exokrine Sekretions-Aktivität der Sertoli- bzw. der Epithelzellen der Prostata. Bei mangelnder oder fehlender Eigensynthese dieser Zellen, würde das intrazellulär nachgewiesene ABP hauptsächlich oder vollständig der Resorption aus der luminalen Flüssigkeit entstammen. Dagegen würde das ABP bei vorhandener Eigensynthese der Sertoli- bzw. Epithelzellen in das Lumen sezerniert werden. Weil ABP in den Epithel- und Muskelzellen des Ductus deferens lokalisiert werden konnte, könnte es Einfluss auf Kontraktibilität und Wachstum haben. Demnach ist dieses Protein wahrscheinlich wichtig für den Spermientransport.

In dieser Arbeit führten wir erstmals eine SELDI-TOF MS im Reproduktionstrakt der Ratte für ABP durch. Diese Methode ist sehr sensitiv, denn man kann sehr kleine Mengen an Peptiden, in unserem Fall ABP, nachweisen. Die homogenen KGs zeigen, dass identisches ABP in den Geweben des Testis, des Ductus deferens und

der Prostata lokalisiert ist. Diese Massen ähneln denen des SHBG, welches im Hypothalamus der Ratte mit SELDI-TOF MS gefunden wurde (Herbert et al. 2003). Der 47kDa-KG, der in den meisten Proben beobachtet wurde, entspricht der Masse des ABP-Monomermoleküls, über die schon im Testis und in peripheren Geweben berichtet wurde (Joseph 1994). Die Proteinmassen von 19kDa und 36kDa können alternativ gespleißte Varianten des ABP-Gens zeigen, welche in unterschiedlichen Geweben und Spezies beschrieben wurden (Sullivan et al. 1993, Hammond und Joseph 1994, Bocchinfuso 1996). Sie wurden in vorhergehenden Studien vorausgesagt (Sullivan et al. 1993, Joseph 1994). Noch können wir nicht ausschließen, dass es sich bei den identifizierten KG um Spaltprodukte des ABP handelt, welche bei den biochemischen Prozeduren zur Vorbereitung der Proben für die SELDI-TOF MS-Analyse entstanden sind.

Im Epididymis war ABP mit der MS nur sehr schwach nachweisbar. Das sind die geringen Mengen ABP im Sekret und die resorbierten Anteile in den Zellen, die wir mit den immunzytochemischen Ergebnissen bereits dargestellt haben. Die ähnlichen Kurvenmuster der SELDI-TOF MS in der Prostata und im Prostatasekret lassen vermuten, dass ABP von den Epithelzellen sezerniert wird. Das unterstützt die Hypothese der Eigensynthese dieser Zellen. Das undetektierbare 47kDa-KG Fragment im Sekret ist wahrscheinlich in der geringen Menge des isolierten Sekrets eines einzelnen Tieres begründet. Es kann sich aber auch um eine gewebsspezifische ABP-Variante handeln, wie es beim ABP in den Akrosomen von Mensch und Maus beobachtet wurde (Selva et al. 2002). Die Funktion dieser ABP-Isoformen ist noch unbekannt. Sie wurden bereits in verschiedenen Geweben und Spezies beschrieben (Sullivan et al. 1993, Joseph et al. 1994, Hammond und Bocchinfuso 1996). Das Muster der KG der affinitätsgereinigten Proben des Ductus deferens ähnelt sehr dem des Testis. Der relative Anteil ist jedoch geringer, was sehr wahrscheinlich an der geringeren Menge an ABP liegt. Möglicherweise wird das im Testis sezernierte ABP von den Epithelzellen des Ductus deferens resorbiert.

Um der Frage der möglichen Synthese bzw. Sekretion von ABP in den Zellen auf den Grund zu gehen, führten wir auch in diesem Gewebe eine in situ Hybridisierung durch: Die Sequenz der verwendeten Oligonukleotid-Sonden-DNA wurde der Genbank des EMBL (Heidelberg) entnommen und ist komplementär zur ABP-kodierenden mRNA. Eine Kreuzhybridisierung der Sonde mit anderen Sequenzen konnte durch entsprechende Computeranalyse ausgeschlossen werden

(Designprogramm des NIH). Dass in manchen Zellen eher der Kern und in manchen Zellen eher das Plasma (in manchen auch beides) angefärbt ist, begründet sich wahrscheinlich in einer Hybridisierung des Primärtranskripts im Zellkern sowie der mRNA im Zytoplasma.

Im Testis wiesen wir erstmals die mRNA von ABP in den Leydig-Zwischenzellen nach. Viele dieser Zellen waren blutgefäßassoziiert, was die Vermutung einer endokrinen Sekretion zur lokalen Versorgung des Reproduktionstrakt absichert. Außerdem bestätigten wir die Arbeit von Chen et al. (2000), weil wir diese Transkripte auch in den Sertolizellen fanden. Diese Zellen könnten für die exokrine ABP-Sekretion in die Tubuluslumina zuständig sein. Somit haben wir mit dieser Methode auch unsere zweite Theorie der exokrinen Sekretionsaktivität im Testis untermauert. Auch eine autokrine und parakrine Sekretion kann eine Rolle spielen, denn es ist noch unklar, wie ABP in die Akrosomen der Spermien gelangt. Die Zellen des Epididymis blieben bei der in situ Hybridisierung ungefärbt. Daraus schlossen wir, dass ABP in diesem Organ nicht synthetisiert wird. Wahrscheinlich werden von den epididymalen Zellen geringe Mengen ABP aus der luminalen Flüssigkeit resorbiert. Diese Theorie vertraten auch Danzo et al. (1977), Pelliniemi et al. (1981) und Feldman et al. (1981). Die internalisierte Menge in den Zellen könnte vom funktionellen Status des Reproduktionstrakts abhängen.

In der Prostata fanden wir ABP-mRNA in den luminalen Epithelzellen. Damit ist die intrinsische Produktion von ABP und dessen exokrine Sekretion in diesem Gewebe denkbar. Vielleicht hat es auch hier endokrine und parakrine Funktionen. Eine Regulation der Prostatasekretproduktion und Exkretion erscheint möglich. Außerdem könnte es eine Rolle beim Transport der Spermien durch den Uterus bis zur Eizelle eine Rolle spielen. In den Zellen des Epididymis konnten wir keine spezifische mRNA für ABP nachweisen, was die Theorie der ABP-Resorption erhärtet.

2) ABP und die Androgenwirkungen im männlichen Reproduktionstrakt

Es ist bekannt, dass testikuläres ABP die Bioverfügbarkeit von Androgenen im interstitiellen Bindegewebe des Testis und im Epididymis regulieren kann, und damit möglicherweise Einfluss auf die Spermatogenese und Spermienreifung hat (Anthony et al. 1984). ABP schützt Androgene vor der Metabolisierung und erleichtert deren Aufnahme in Zellen mit nukleären Androgenrezeptoren (Dorrington und Fritz 1975). Über einen möglichen ABP-Rezeptor der Plasmamembran könnte ABP als Wachstumsfaktor wirken (Santemma et al. 1992). Die Überexpression von ABP in transgenen Mäusen erhöht die Zahl der Sertolizellen, reduziert die Fruchtbarkeit und inhibiert den programmierten Zelltod im Epithel der Tubuli seminiferi (Joseph et al. 1997, Jeyaray et al. 2003).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen erstmals ein Vorkommen von ABP im Ductus deferens. In anderen Arbeiten wurde ABP im Testis (Joseph 1994), in der Prostata (Larriva Sahd et al. 1991) und im Epididymis nachgewiesen (Musto et al. 1980, Pelliniemi et al. 1981, Feldman et al. 1981). Außerdem wird es im männlichen Reproduktionstrakt der Ratte (wie oben beschrieben) lokal synthetisiert.

Die morphologischen und physiologischen Ergebnisse legen nahe, dass ABP im männlichen Reproduktionstrakt eine zentrale Rolle spielt, weitestgehend unabhängig von klassischen Steroidrezeptoren. Das bestehende Modell eines nukleären Rezeptors für Androgene erklärt die Wirkmechanismen der Steroide wahrscheinlich nur unvollständig. Die intrazellulären Androgenrezeptoren wurden in den gleichen Geweben wie ABP lokalisiert, nämlich im Testis, im Epididymis (You und Sar 1994) und in den Lappen der Prostata (Paris et al. 1997). Eine Wirkung des ABP-Androgen-Komplexes über einen membranständigen Rezeptor wurde postuliert (Rosner et al. 1999). Dies könnte bekannte nichtgenomische Wirkungen von Steroidhormonen eine Erklärung näher bringen, ähnlich wie es bereits in früheren Arbeiten von Fortunati (1999) beschrieben wurde.

7.3. Oxytocin

Bei Frauen bewirkt das OT des Hypothalamus den Milcheinschuss (Neville et al. 2002) in die Milchgänge aus den Azini der Drüsen während der Stillzeit und die Kontraktionen des Uterus während des Geburtsvorgangs (Ivanisevic et al. 2001).

Verschiedene Studien demonstrieren die Synthese des neurohypophysären Hormons OT außerhalb des Gehirns, einschließlich des Reproduktionstrakts der Frau (Khan-Dawood et al. 1984, Ivell et al. 1985, Miller et al. 1993, Einspanier et al. 1994) und des Mannes (Nicholson 1996, Ivell et al. 1997).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmals OT mit immunzytochemischen Methoden in allen Lappen der Prostata (sowohl Epithelzellen, als auch subepitheliale Zellen), im Prostatasekret und im Ductus deferens. Das unterstützt vorhandene Theorien über die funktionelle Bedeutung von OT im Reproduktionstrakt für Erektion, Ejakulation und Orgasmus (Carmichael et al. 1987, Filippi et al. 2003).

OT-mRNA wurde bereits im Rattenhoden (Rehbein et al. 1986, Foo et al. 1991) nachgewiesen. OT kann dort über den autokrinen, parakrinen, endokrinen und exokrinen Weg lokal im Reproduktionstrakt wirken. Die Wirkungsweisen von OT sind vielseitig, was sich in der umfangreichen Lokalisation des OT-Rezeptors zeigt. OTR sind in allen Geweben des männlichen Reproduktionstrakts vertreten, sowohl in Muskelzellen als auch in den epithelialen und subepithelialen Zellen. Das betrifft die Tunica albuginea, den Epididymis, den Ductus deferens (Maggi et al. 1987), die Prostata (Einspanier und Ivell 1997) und den Testis (Bathgate und Sernia 1994).

OT spielt in männlichen Geschlechtsorganen unter anderem eine Rolle in der Regulation der Aktivität der glatten Muskelzellen und deren Ruhetonus (Brodanszky et al. 1992). OT steigert das Wachstum der Prostata bei Ratten (Plecas et al. 1992, Popovic et al. 1990), Hunden und beim Menschen (Nicholson 1996). Im Testis, im Epididymis und in der Prostata kann OT die Konversion von Testosteron zum wirkungsvolleren DHT durch die Stimulation des Enzyms 5 α -Reduktase regulieren (Nicholson und Jenkin 1999). Somit kann OT eine Rolle in der Entstehung von BPH spielen (nach Partin et al. 1991 ist die Pathogenese von BPH abhängig von der Präsenz von Androgenen). Der gesamte männliche Reproduktionstrakt besitzt reichlich glattes Muskelgewebe. So hat der Ductus deferens Muskulatur zum Transport der Spermien und die Vesicula seminalis benötigt sie zum Einschuss ihres Sekrets in den Colliculus. Vermutlich hat OT Einfluss auf die Aktivität aller Organe im Reproduktionstrakt und bewirkt Kontraktionen in der glatten Muskulatur, so dass Spermien vom Testis durch Peristaltik des Ductus deferens bis zur Urethra transportiert werden können. Von den subepithelialen Zellen wird das Peptidhormon wahrscheinlich in der Nähe der Gefäße in die Blutbahn abgegeben um so auf endokrinem Weg auf die Organe des Reproduktionstrakts zu wirken. Außerdem

scheint es möglich, dass OT in die Lumina sezerniert wird. Unsere immunzytochemischen Beobachtungen legen dies nahe. OT könnte förderlich für die Spermienmobilität und ihr Überleben sein. Es ist auch denkbar, dass das OT des Spermas auch im Uterus verschiedene Aufgaben erfüllt, zum Beispiel die Anregung der Sekretion von Drüsenzellen in der Uterusschleimhaut (um das Einnisten der Eizelle zu erleichtern) oder die Anregung der Peristaltik in der Tuba uterina für den Eitransport in den Uterus.

7.4. Kolokalisation

OT bzw. ABP werden lokal im männlichen Reproduktionstrakt synthetisiert, möglicherweise unabhängig vom neurohypophysären und adenohipophysären System bzw. von der ABP-Produktion in der Leber.

Jenkin und Nicholson (1999) zeigten den Einfluss von OT auf die Steroidgenese und damit eine Abhängigkeit der Hypertrophie des Prostatagewebes von einem erhöhten OT-Spiegel. Ein weiterer Einfluss von einem hohen OT-Spiegel auf die Pathogenese von BPH besteht in einem erhöhten Ruhetonus der glatten Muskulatur der Prostata.

Da ABP Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von Androgenen hat bzw. vor ihrem Metabolismus schützt und wahrscheinlich auch Androgensignale vermittelt (Fortunati 1999), kann es ebenfalls in der BPH-Pathogenese mitwirken. Daraus ergibt sich die Frage eines funktionellen Zusammenhangs von ABP und OT. Eine Kolokalisation von OT und ABP wurde in Organen des männlichen Reproduktionstrakts beobachtet. Besonders deutlich war die Koexistenz im Ductus deferens und im Epididymis. Die Kolokalisation von OT und ABP in der Prostata haben wir mit Folgeschnitten demonstriert. Hier war die Koexistenz nahezu 100%.

In den Axonen der Eminentia mediana und in den Heringkörpern der Hypophyse wurde bereits eine Koexistenz von ABP und OT demonstriert (Herbert et al. 2003). Laut Caldwell et al. (2003) kann die simultane Freisetzung dieser beiden Stoffe wichtig für die koordinierte Funktion in der Reproduktion sein. Die Kolokalisation von ABP und OT in den Organen des männlichen Reproduktionstrakts unterstützt die Hypothese, dass beide interagieren (Caldwell et al. 2003). Caldwell hat ein Modell für diesen Zusammenhang aufgestellt:

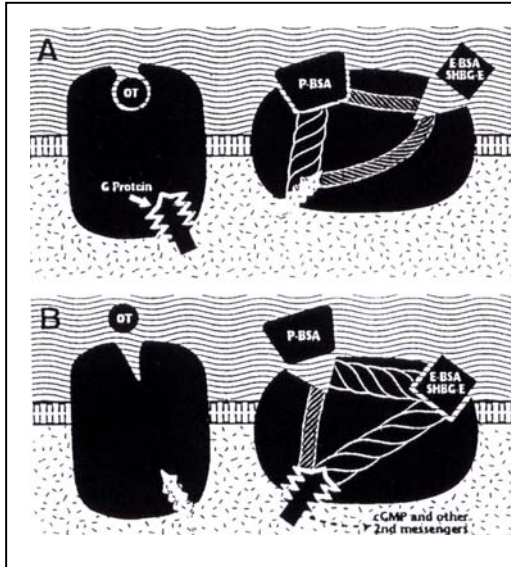


Abb. 7.1.: In Bild A ist OT an seinen Rezeptor gebunden, genauso wie P-BSA (Progesteron-BSA) an seinen. Bei Bindung von OT an seinen Rezeptor steigt die Affinität für P-BSA dessen Rezeptor, während die Affinität für E-BSA (Estrogen-BSA) bzw. SHBG-E an denselben Rezeptor sinkt. Wenn OT gebunden ist, ist das gemeinsame G-Protein am OT-Rezeptor zu lokalisieren. Somit ist der Weg des second messenger über den Steroid-Rezeptor ausgeschaltet.

Bild B zeigt, dass bei Bindung des G-Proteins an den Steroid-Rezeptor die Affinität für E-BSA bzw. SHBG-E steigt und für P-BSA abnimmt. Bei fehlendem G-Protein nimmt am OTR die Affinität für OT ab. Man kann aus diesem Modell einen Allosterischen Zusammenhang zwischen den Rezeptoren schließen. (Caldwell et al. 2003)

Die Kolo-kalisation von ABP und OT in einzelnen epithelialen Zellen und in, nahe den Gefäßen liegenden, subepithelialen Zellen lässt eine gegenseitige Regulation der ABP- und OT-Expression in den Zellen der Prostata vermuten. Solch eine Interaktion kann nicht nur in physiologischen Prozessen, sondern auch in pathophysiologischen Prozessen eine Rolle spielen. Zum Beispiel in der Pathogenese von BPH (bei einer Fehlregulation von ABP und/oder OT). Diese Vermutung kann erklären, dass sich die eingangs beschriebenen Daten von Fortunati (1999) und Jenkin und Nicholson (1999) in Bezug auf BPH nicht widersprechen. Der Vergleich der Ergebnisse von beiden Gruppen wirft neue Fragen für die Vollständigkeit dieser Modelle auf. Beide Gruppen sind nicht von einem funktionellen Zusammenhang ausgegangen, welcher von der vorliegenden Arbeit gestützt wird.

8. Schlussfolgerungen

Mit der vorliegenden Arbeit wurde eine mögliche funktionelle Rolle von ABP (Isoform des SHBG) im männlichen Reproduktionstrakt morphologisch demonstriert. ABP könnte für das Wachstum des Prostatagewebes wichtig sein und eine entsprechende Beeinflussung könnte unter Umständen eine Therapiemöglichkeit von BPH darstellen. Mit der Aufklärung des Wirkmechanismus von OT und ABP/SHBG ist es vielleicht möglich, gezielter in das Zellgeschehen einzugreifen.

Ein gutes Modell für weitere Untersuchungen ist das Anlegen von menschlichen Kokulturen. Diese würden Epithelzellen, Stromazellen und glatten Muskelzellen der Prostata enthalten, welche zuerst mit in vivo Konzentrationen von OT, ABP und DHT behandelt werden. Dann werden die Konzentrationen unter Beobachtung des Zellwachstums verändert. Des Weiteren wäre eine Studie über den quantitativen Vergleich der ABP- bzw. OT-Konzentrationen in gesundem und BPH-krankem Prostatagewebe interessant.

Die Behandlung von BPH wird in naher Zukunft ein wichtiger Forschungsgegenstand in der Urologie bleiben.

9. Literatur- und Quellenverzeichnis

Ang HL, Ivell R, Walther N, Nicholson HD, Ungefroren H, Millar M, Carter D, Murphy D. 1994.

Over-expression of oxytocin in the testes of a transgenic mouse model.
Journal of Endocrinology. 1994;140:53-62.

Anthony CT, Danzo BJ, Orgebin-Christ MC. 1984a.

Investigations on the relationship between sperm fertilizing ability and the androgen binding protein in the hypophysectomized, pregnenolone injected rat.
Endocrinology. 1984;114:1419-1425.

Anthony CT, Danzo BJ, Orgebin-Christ MC. 1984b.

Investigations on the relationship between sperm fertilizing ability and the androgen binding protein in the restricted rat.
Endocrinology. 1984;114:1413-1418.

Aronica SM, Kraus WL, Katzenellenbogen BS. 1994.

Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription.
Proc. Nat. Acad. Sci. 1994;91:8517-8521.

Avvakumov GV, Matveentsera IV, Akhrem LV, Strel'chyonok OA, Akhrem AA. 1983.

Study of the Carbohydrate moiety of human serum sex hormone-binding globulin.
Biochem. Biophys. Acta. 1983;760:104.

Bale TL, Dorsa DM. 1995.

Regulation of oxytocin receptor messenger ribonucleic acid in the ventromedial hypothalamus by testosterone and its metabolites.
Endocrinology. 1995;136:135-138.

Bathgate RAD, Sernia C. 1994.

Characterization and localization of oxytocin receptors in the rat testis.

Journal of Endocrinology. 1994;141:343-352.

Bathgate RAD, Sernia C, Gemmell RT. 1993.

Arginine vasopressin- and oxytocin-like peptides in the testis two Australian marsupials.

Peptides. 1993;14:701-705.

Becchis M, Sullivan PM, Ordronneau P, Petrusz P, Joseph DR. 1996.

Distribution of immunoreactive androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin in tissues of the fetal rat.

Steroids 1996; 61:392-400.

Berry SJ, Coffey DS, Walsh PC, Ewing LL. 1984.

The development of human benign prostatic hyperplasia with age.

Journal of Urology. 1984;132:474-479.

Berube D, Seralini GE, Gagne R, Hammond GL. 1990.

Localization of the human sex hormone-binding globulin gene (SHBG) to the short arm of chromosome 17 (17p12-p13).

Cytogenet. Cell. Genet. 1990;54:65.

Bocchinfuso WP, Ma KL, Lee WM, Warmel-Rodenhiser S, Hammond GL. 1992.

Selective removal of glycosylation sites from sex hormone-binding globulin by site-directed mutagenesis.

Endocrinology. 1990;131:2331.

Bocchinfuso WP, Hammond GL. 1995.

Steroid-binding and dimerization domains of human sex hormone binding globulin partially overlap: steroids and Ca²⁺ stabilize dimer formation.

Biochemistry. 1995;34:3231.

Brodanszky M, Sharaf H, Roy J.B, Sais SI. 1992.

Contractile activity of vasotocin, oxytocin and vasopressin on mammalian prostate.

European Journal of Pharmacology. 1992;216:311-313.

Brown CT, Nuttal MC. 2002.

Duta steride: a new 5- α reductase inhibitor for men with lower urinary tract symptoms secondary to benign prostate hyperplasia.

Int J Chin Pract. 2002 Oct;57(8):705-9.Review.

Caine M, Raz S, Ziegler M. 1975.

Adrenergic and cholinergic receptors in the human prostate, prostatic capsula and bladder neck.

British Journal of Urology. 1975;47:193-202.

Caldwell JD, Song Y, Englof I, Hofle S, Key M, Morris M. 2003.

5 α -Reduced androgens block estradiol-BSA-stimulated release of oxytocin.

Brain Res. 2003 Jun 27;976(2):259-61.

Carmichael MS, Humbert R, Dixen J, Palmisano G, Greenleaf W, Davidson JM. 1987.

Plasma oxytocin increases in the human sexual response.

J Clin Endocrinol Metab. 1987 Jan;64(1):27-31.

Caster WO, Poncelet J, Simon AB, Armstrong WD. 1956.

Tissue weights of the rat; I. Normal values determined by dissection and chemical methods.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1956;91:122-126.

Chen Y, Ye S, Huang Y, Zheng W. 2000.

Stage-dependent expression of androgen binding protein mRNA in sertoli cell of rat testis.

Zhongguo Yi Xue Yuan Xue Bao. 2000 Jun;22(3):287-9.

Clermont Y, Messier B. 1959.

Durée du cycle de l'épithélium séminal du rat.

Arch Anat. Microsc. Morphol. Exp. 1959;48:37-56.

Cousin P, De Chaud H, Grenot C, Lejeune H, Pugeat M. 1998.

Human variant sex hormone-binding globulin (SHBG) with an additional carbohydrate chain has a reduced clearance rate in rabbit.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 1998;83:235.

Danzo BJ, Cooper TG, Orgebin-Crist MC. 1977.

Androgen binding protein (ABP) in fluids collected from the rete testis and cauda epididymidis of sexually mature and immature rabbits and observations on morphological changes in the epididymis following ligation of ductuli efferentes.

Biol. Reprod. 1977;17:64-77.

Danzo BJ, Bell BW, Black JH. 1989.

Human testosterone-binding globulin as dimer composed of two identical protomers that are differentially glycosylated.

Endocrinology. 1989;107:1169.

Danzo BJ, Black JH. 1990.

Structure of asparagines-linked oligosaccharide on human and rabbit testosterone-binding globulin.

Biol. Reprod. 1990;42:472.

Danzo BJ, Black JH, Bell BW. 1991.

Analysis of the oligosaccharides on androgen-binding proteins: implications concerning their role in structure/function relationships.

J Biochem. Mol. Biol. 1991;40: 821-31.

Debackere M, Peeters G, Tuytens N. 1961.

Reflex release of an oxytocin hormone by stimulation of genital organs in male and female sheep studied by a cross circulation technique.

Journal of Endocrinology. 1961;22:321-334.

Ding VDH, Moller DE, Feeney WP, Didolkar V, Nakhla AM, Rhodes L, Rosner W, Smith RG. 1998.

Sex hormone-binding globulin mediates prostate androgen receptor action via a novel signaling pathway.

Endocrinology. 1998;139:213.

Dorrington JH, Fritz IB. 1975.

Androgen synthesis and metabolism by preparations from the seminiferous tubule of the rat testis.

Curr Top Mol Endocrinol.1975;2:37-52.

von Eggeling F, Davies H, Lomas L, Fiedler W, Junker K, Claussen U, Ernst G. 2000.

Tissue-Specific Microdissection Coupled with proteinChip® Array Technologies: Application in Cancer Research.

Bio Techniques 2000;29:1066-70.

Einspanier A, Ivell R, Rune G, Hodges JK. 1994.

Oxytocin gene expression and oxytocin immunoactivity in the ovary of the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*).

Biol Reprod. 1994;50(6):1216-22.

Einspanier A, Ivell R. 1997.

Oxytocin and oxytocin receptor expression in reproductive tissues of the male marmoset monkey.

Biology of Reproduction 1997;56:416-422.

El-Badawi A, Schenke EA. 1967.

The distribution of cholinergic and adrenergic nerves in the mammalian epididymis. A comparative histological study.

American Journal of Anatomy 1967;112:1-14.

Feldmann M, Lea OA, Petrusz P, Tres LL, Kierszenbaum AL, French FS.1981.

Androgen binding protein. Purification from rat epididymis, characterization, and immunocytochemical localization.

J Biol Chem. 1981 May;256(10):5170-5.

Felden F, Leheup B, Fremont S, Bouguerne R, Egloff M, Nicolas JP, Grignon G, Gueant JL. 1992.

The plasma membrane of epididymal epithelial cells has a specific receptor which binds to androgen-binding protein and sex steroid-binding protein.

J. Steroid Biochem Mol Biol. 1992;42:279-285.

Filippi S, Vignozzi L, Vannelli GB, Ledda F, Forti G, Maggi M. 2003.

Role of oxytocin in the ejaculatory process.

J Endocrinol Invest. 2003;26(3 Suppl):82-6.

Fissore F, Fortunati N, Comba A, Fazzari A, Gaidano G, Berta L, Frairia R. 1994.

The receptor-mediated action of sex steroid binding protein (SBP, SHBG): accumulation of cAMP in MCF-7 cells under SBP and estradiol treatment.

Steroids 1994;59:661-667.

Foo NC, Carter D, Murphy D, Ivell R. 1991.

Vasopressin and oxytocin gene expression in rat testis.

Endocrinology. 1991;128:2118-2128.

Fortunati N, Fissore F, Fazzari A, Berta L, Benedusi-Pagliano E, Frairia R. 1993.

Biological relevance of the interaction between sex steroid-binding protein and its receptor of MCF-7 cells: effect on the estradiol-induced cell proliferation.

J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 1993;45:435.

Fortunati N, Fissore F, Comba A, Becchis M, Catalano MG, Fazzari A, Berta L, Fraira R. 1996a.

Sex steroid binding protein (SBP) and its membrane receptor in estrogen dependent breast cancer: biological and pathophysiological impact.

Horm. Res. 1996a;45:202.

Fortunati N, Catalano MG. 1996b.

Azione differenziale del tamoxifene e dei nuovi antiestrogeni sul controllo della produzione di fattori estrogeno-regolati negli epatociti.

In: Mancuso S. e Isola G. (Eds.), Farmacologia della Nuova Generazione di Anti-Estrogeni. 1996b;p. 181.

Fortunati N, Fissore F, Fazzari A, Becchis M, Comba A, Catalano MG, Berta L, Fraira R. 1996.

Sex steroid-binding protein (SBP, SHBG) exerts a negative control on estradiol action in MCF-7 cells (human breast cancer) through cAMP and PKA. Effekt on estradiol-induced cell proliferation.

Endocrinology 1996;137:686.

Frayne J, Townsend D, Nicholson HD. 1996.

Effects of oxytocin on sperm transport in the pubertal rat.

Journal of Reproduction and Fertility 1996;107:299-306.

Frayne J, Nicholson HD. 1998.

Localisation of oxytocin receptors in the human and macaque monkey male reproductive tracts: evidence for a physiological role of oxytocin in the male.

Molecular Human Reproduction. 1998;4:527-532.

Frayne J, Nicholson HD. 1994.

Regulation of oxytocin production by purified adult rat Leydig cells in vitro: effects of LH, testosterone and lipoproteins.

J.Endocrinol. 1994;143:325-332.

French FS, Ritzen EM. 1973.

A high-affinity androgen-binding protein (ABP) in rat testis: evidence for secretion into efferent duct fluid and absorption by epididymis.

Endocrinology. 1973;93:88-95.

Gao G, Herbert Z, Kong J, Gabrielson N, Mautz A, Wu D, Jirikowski GF, Caldwell JD 2003.

Steroid Control of Estradiol Binding Proteins in the Medial Preoptic Area, Medial Hypothalamus and Pituitary.

Neuroendocrinology 2003;78:61-71.

Gerard A, Khanfri J, Gueant JL, Fermont S, Nicolas JP, Grignon G, Gerard H. 1988.

Electron microscope radioautographic evidence of in vivo androgen-binding protein internalization in the rat epididymis principal cells.

Endocrinology 1988;122:1297-1307.

Gershagen S, Fernluna P, Lundwall A. 1987.

A cDNA coding for human sex hormone-binding globulin. Homology to vitamin K-dependent protein S.

FEBS Lett. 1987;220:129.

Gershagen S, Lundwall A, Fernlund P. 1989.

Characterization of the human sex hormone-binding globulin (SHBG) gene and demonstration of two transcripts in both liver and testis.

Nucleic Acids Res. 1989;17:9245.

Gonzalez Enquita C, Vela, Navarrete R, Salcedo de Diego A, Perez Martinez F, Ramirez Perez del Yerro M, Cancho Gil MJ, Crespi Martinez F Bravo Fernandez, Cabrera Perez J. 2003.

Categorization of adrenergic alpha 1 receptors in detrusor of patients with obstructive BPH. Initial study on experimental animal model

Actas Urol Esp. 2003 Oct;27(9):684-91.

Gottesmann MM, Fleischmann RD. 1986.

The role of cAMP in regulating tumor cell growth.

Cancer Surv. 1986;5:291.

Gronemeyer H. 1993.

Transcription activation by nuclear receptors.

J. Recept. Res. 1993;13:667-691.

Guldenaar SEF, Pickering BT. 1985.

Immunocytochemical evidence for the presence of oxytocin in rat testis.

Cell tissue Research. 1985;240:485-487.

Hagenäs L, Ritzen EM, Ploen L, Hansson V, French FS, Nayfeh SN. 1975.

Sertoli cell origin of testicular androgen-binding protein (ABP).

Mol. Cell Endocrinol. 1975;2:339-350.

Hammond GL, Underhill DA, Smith CL, Goping IS, Harley MJ, Musto NA, Chen CY, Bardin CW. 1987.

The cDNA-deduced primary structure of human sex hormone-binding globulin and location of its steroid binding domain.

FEBS Lett. 1987;215:100.

Hammond GL, Underhill DA, Rykse HM, Smith CL. 1989.

The human sex hormone-binding globulin gene contains exons for androgen-binding protein and two other testicular messenger RNAs.

Mol Endocrinol. 1989;3:1869-1876.

Hammond GL. 1990.

Molecular properties of corticosteroid binding globulin and the sex steroid binding proteins.

Endocr Rev. 1990;11:65-79.

Hammond GL, Bocchinfuso WP. 1996.

Sex hormone-binding globulin: gene organization and structure/function analyses.

Horm Res. 1996;45:197-201.

Hardy DO, Carino C, Catterall JF, Larrea F. 1995.

Molecular characterization of a genetic variant of the steroid hormone-binding globulin gene in heterozygous subjects.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 1995;80:1253.

Harris GC, Frayne J, Nicholson HD. 1996.

Epididymal oxytocin in the rat: its origin and regulation.

Int J. Androl. 1996 Oct;19(5):278-86.

Harris G, Nicholson HD. 1995.

Stage related differences of rat seminiferous tubule contractility in vitro and their response to oxytocin.

Journal of Reproduction and Fertility. 1995;15:54.

Herbert Z, Jirikowski GF, Petrusz P, Englöf I, Caldwell JD 2003.

Distribution of androgen binding protein in the rat hypothalamo-hypophyseal system, co-localization with oxytocin.

Brain Res. In press.

Hildebrand C, Bocchinfuso WP, Dales D, Hammond GL. 1995.

Resolution of the steroid-binding dimerization domains of human sex hormone-binding globulin by expression in Escherichia Coli.

Biochemistry. 1995;34: 3231.

Höfer W. 1972.

Zur makroskopischen und mikroskopischen Anatomie des Genitaltrakts der männlichen Albinoratte (*Mus rattus norvegicus albinos*).

Inaug.-Diss. Tierarztl. Fakultät. München. 1972.

Horwitz KB, Jackson TA, Bain DL, Richer JK, Takimoto GS, Tung L. 1996.

Nuclear receptor coactivators and corepressors.

Mol Endocrinol. 1996;10:1167-1177.

Hristic M, Plecas B, Martinovic JH, Jovovic D, Popovic A. 1985.

Adenohypophysial gonadotropic activity of oxytocin treated intact and orchidectomised rats.

Lugoslav Physiol. Pharmacol. Acta. 1985;21:343-352.

Hryb DJ, Kahn MS, Rosner W. 1985.

Testosterone-estradiol-binding globulin binds to human prostatic cell membranes.

Biochem. Biophys. Res Commun. 1985;128:432-440.

Hryb DJ, Kahn MS, Romas NA, Rosner W. 1986.

Specific binding of human corticosteroid-binding globulin to cell membranes.
Proc. Natl. Acad Sci. USA. 1986;83:3253-3256.

Ivanisesevic, Dlelmi J, Bukovic D. 2001.

Review on prostaglandin and oxytocin activity in preterm labor.
Coll Antropol.2001 Dec;25(2):687-94.

Ivell R, Brackett KH, Fields MJ, Richter D. 1985.

Ovulation triggers oxytocin gene expression in the bovine ovary. FEBS
Lett.1985;190(2):263-7.

Ivell R, Russell JA. 1996.

Oxytocin: cellular and molecular approaches in medicine and research.
Rev. Reprod. 1996;1(1):13-8.Review.

Ivell R, Balvers M, Rust W, Bathgate R, Einspanier A. 1997.

Oxytocin and male reproductive function.
Adv Exp Med Biol.1997; 424:253-64.

Janne M, Deol HK, Power SGA, Yee SP, Hammond GL. 1998.

Human sex hormone-binding globulin gene expression in transgenic mice.
Mol. Endocrinol. 1998;12:123.

Jenkin J, Nicholson HD. 1994.

The effect of testosterone on prostatic oxytocin in the rat.
Journal of Endocrinology 1994;143 (Supl.):43.

Jenkin L, Nicholson HD. 1999.

Evidence for the regulation of prostatic oxytocin by gonadal steroids in the rat.
J. Androl. 1999;20:80-87.

Jeyaray DA, Grossman G, Petrusz P. 2003.

Dynamics of testicular germ cell apoptosis in normal mice and transgenic mice
overexpressing rat androgen-binding protein.

Reprod Biol Endocrinol. 2003;1:48.

Jirikowski GF, Calswell JD, Pedersen CA, Stumpf WE. 1988.

Estradiol influences oxytocin-immunoreactive brain systems.

Neuroscience 1988;25(1):237-48.

Jirikowski GF, Ramhalo-Ortigao JF, Lindl T, Seliger H. 1989.

Immunocytochemistry of 5-bromo-2'deoxyuridine labelled oligonucleotide probes. A novel technique for insitu hybridization.

Histochemistry. 1989;91;51-53.

Jirikowski GF, Caldwell JD, Stumpf WE, Pedersen CA 1990a.

Topography of oxytocinergic estradiol target neurons in the mouse hypothalamus.

Folia Histochem. Cytobiol. 1990;28(1-2):3-9

Jirikowski GF, Ramalho-Ortigao JF, Kesse KW, Boom FE. 1990b.

Insitu hybridisation of semithin Epon sections with BrdU labelled oligonucleotide probes.

Histochemistry. 1990;94(2):187-90.

Jirikowski GF. 1991.

Oxytocin nasal spray: Possible use in impotent men.

Med. Asp. Hum. Sex. 1991;7,35.

Joseph DR, Hall SH, French FS. 1987.

Rat androgen-binding protein: evidence for identical subunits and amino acid sequence homology with human sex hormone-binding globuline.

Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1987;84:339.

Joseph DR, Hall SH, Conti M, French FS. 1988.

The gene structure of rat androgen-binding protein: Identification of potential regulatory deoxyribonucleic acid elements of a follicle-stimulating hormone-regulated protein.

Mol. Endocrinol. 1988;2:3-13.

Joseph DR. 1994.

Structure, function, and regulation of androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin.

Vitam. Horm. 1994;49:197-280.

Joseph DR, O'Brien DA, Sullivan PM, Becchis M, Tsuruta JK, Petrusz P. 1997.

Overexpression of androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin in male transgenic mice: tissue distribution and phenotypic disorders. Biol Reprod.1997;56:21-32.

Junqueira LC, Caneiro J. 1996.

Histologie,

4. Auflage. Berlin Heidelberg New York. Springer-Verlag Editor: Schiebler T.H. 1996;pp 620-642.

Katzenellenbogen BS. 1996.

Estrogen receptors: Bioactivities and interactions with cell signaling pathways.

Biol. Reprod. 1996;54:287-293.

Katzenellenbogen JA, O'Malley BW, Katzenellenbogen BS. 1996.

Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: interaction with multiple effector sites as a basis for the cell- and promoter-specific action of these hormones

Mol. Endocrinol. 1996;7:743.

Kahn MS, Knowles BB, Aden DP, Rosner W. 1981.

Secretion of testosterone-estradiol-binding globulin by a human hepatoma-derived cell line.

J.Clin. Endocrinol. Metab. 1981;53:448.

Kahn MS, Hryb DJ, Hashim GA, Romas NA, Rosner W. 1990.

Delineation and synthesis of the membrane receptor-binding domain of sex hormone-binding globulin.

J. Biol. Chem. 1990;265:18362.

Khastgir J, Arya M, Shergill IS, Kalsi JS, Minhas S, Mundy AR. 2002.

Current concepts in the pharmacotherapy of benign prostatic hyperplasia.

Expert Opin Pharmacother. 2002 Dec;3(12):1727-37.

Khan-Dawood FS, Marut EL, Dawood MY. 1984.

Oxytocin in the corpus luteum of the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*).

Endocrinology. 1984;115(2):570-4.

Kihlstrom JE, Agmo A. 1974.

Some effects of vasopressin on sexual behaviour and seminal characteristics in intact and castrated rabbits.

Journal of Endocrinology. 1974;60:445-453.

Knickerbocker JJ, Sawyer HR, Amann RP, Tekpete FR, Niswender GD. 1988.

Evidence for the presence of oxytocin in the ovine epididymis.

Biology of Reproduction. 1988;39:391-397.

Knight TW. 1974.

A qualitative study of factors affecting the contractions of the epididymis and ductus deferens of the ram.

Journal of Reproduction and Fertility. 1974;40:19-29.

Knight TW, Lindsay DR. 1970.

Short- and long-term effects of oxytocin on quality and quantity of semen from rams.

Journal of Reproduction and Fertility 1970;21:523-529.

Kormano M. 1967.

An angiographic study of the testicular vasculature in the postnatal rat.

Z. Anat. Entwicklungsgesch. 1967;126:138-153.

Kuhn RW. 1988.

Corticosteroid-binding globulin interactions with target cells and plasma membranes.

Ann NY Acad Sci. 1988;538:146-158.

Lacy D, Rotblatt J. 1960.

Study of normal and irradiated boundary tissue of the seminiferous tubules of the rat. Exp. Cell Res. 1960;21:49.

Larrea F, Diaz L, Carino C, Larriva-Sahd J, Carillo L, Orozco H. Ulloah-Aguirre A. 1993.

Evidence that human placenta is a site of sex hormone-binding globulin gene expression.

J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 1993;46:497.

Larriva-Sahd J, Orozco H, Hernandez-Pando R, Oliart RM, Musto NA, Larrea F 1991.

Immunohistochemical demonstration of androgen-binding protein in the rat prostatic gland.

Biol Reprod. 1991;45(3):417-23.

Leeson CR, Leeson TS. 1964.

The postnatal development of the ductus epididymis in the rat.

Anat. Anz. 1964;114:159-167.

Löffler G, Petrides PE. 1998.

Biochemie und Pathobiochemie.

6. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York. Springer-Verlag. 1998.

Maggi M, Malozowski S, Kassis S, Guardabasso V, Rodbard D. 1987.

Identification and characterization of two classes of receptors for oxytocin and vasopressin in porcine tunica albuginea, epididymis and vas deferens.

Endocrinology. 1987;120:986-994.

McConnell JD, Roehrborn CG, Bautista OM, Andriole GL Jr, Dixon CM, Kusek JW, Lepor H, McVary KT, Nyberg LM Jr, Clarke HS, Crawford ED, Diokno A, Foley JP, Foster HE, Jacobs SC, Kaplan SA, Kreder KJ, Lieber MM, Lucia MS, Miller GJ, Menon M, Milam DF, Ramsdell JW, Schenkman NS, Slawin KM, Smith JA. 2003.

The long-term effect of doxazosin, finasteride, and combination therapy on the clinical progression of benign prostatic hyperplasia.

N Engl J Med. 2003 Dec 18;349(25):2387-98.

Mendel CM. 1992.

The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model.

Endocr. Rev. 1992;10:232.

Mercier C, Alfzen A, Baulieu EE. 1966.

Testosterone binding globulin in human Plasma.

Int. Congr. Ser. Excerpta Med. 1966;101:212 (abstract).

Miller FD, Chibbar R, Mitchell BF. 1993.

Synthesis of oxytocin in amnion, chorion and decidua: a potential paracrine role for oxytocin in the onset of human parturition.

Regul Pept. 1993;45(1-2):247-51.

Milovanov VK, Bereznev AP, Gorohov LN. 1962.

The effect of oxytocin on the reproductive system of male livestock.

Vest. Sel'.khoz Nauki, Moska 1962;7:99 (As cited in Animal Breeding Abstracts (1964) 32: 101 (Abstract 683)).

Misao R, Itoh N, Mori H, Fujimoto J, Tamaya T. 1994.

Sex hormone-binding globulin mRNA levels in human uterine endometrium.

Eur. J. Endocrinol. 1994;131:623.

Misao R, Nakanishi Y, Fujimoto J, Hori M, Ichigo S, Tamaya T. 1995a.

Expression of sex hormone-binding globulin mRNA in ovarian cancers.

Eur. J. Endocrinol. 1995;133:327.

Misao R, Nakanishi Y, Ichigo S, Hori M, Fujimoto J, Tamaya T. 1995b.

Expression of sex hormone-binding globulin mRNA in human endometrial cancers.

J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 1995;52:517.

Moore KT, Bertram KA, Gomez RR, Styner MJ, Matey LA. 1996.

Sex hormone-binding globulin mRNA in human breast cancer: detection in cell lines and tumor samples.

J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 1996;59:297.

Murakami M. 1966.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen am intersitiellen Gewebe des Rattenhodens, unter besonderer Berücksichtigung der Leydig'schen Zwischenzellen. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 1966;72:139-156.

Murphy BEP. 1968.

Binding of testosterone and estradiol in plasma.

Can. J. Biochem. 1968;46:299.

Musto N, Gunsalus GL, Bardin CW 1980.

Purification and characterization of androgen binding protein from the rat epididymis. Biochemistry. 1980;19(13):2853-60.

Nakhla AM, Kahn MS, Rosner W. 1990.

Biologically active steroids activate receptor-bound human sex hormone-binding globulin to cause LnCaP cells to accumulate adenosine 3',5'-monophosphate.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 1990;71:398-404.

Nakhla AM, Kahn MS, Romas NP, Rosner W. 1994.

Estradiol causes the rapid accumulation of cAMP in human prostate.

Proc. Nat. Acad Sci. USA. 1994;91:5402-5405.

Nakhla AM, Ding VDH, Kahn MS, Romas NA, Rhodes L, Smith RG, Rosner W. 1995.

5 α -androstane-3 α ,17 β -diol is a hormone: stimulation cAMP accumulation in human and dog prostate.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 1995;80:2259.

Nakhla AM, Romas NA, Rosner W. 1997.

Estradiol activates the prostate androgen receptor and prostate-specific antigen secretion through the intermediacy of sex hormone-binding globulin.

J. Biol. Chem. 1997;272: 6838-6841.

Neville MC, McFadden TB, Forsyth J. 2002.

Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion.

J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2002 Jan;7(1):49-66.Review.

Nicholson HD, Peeling WB, Pickering BT. 1985.

Oxytocin in the prostate and semen?

Journal of Endocrinology. 1985;104(Suppl.):127.

Nicholson HD, Worley RTS, Charlton HM, Pickering BT. 1986.

LH and testosterone cause the development of seminiferous tubule contractile activity and the appearance of testicular oxytocin in the hypogonadal mouse.

Journal of Endocrinology 1986;110:159-167.

Nicholson HD, Worley RTS, Guldenaar SEF, Pickering BT. 1987.

Ethan-1,2-dimethanesulphonate reduces testicular oxytocin content and seminiferous tubule movements in the rat.

Journal of Endocrinology. 1987;112: 311-316.

Nicholson HD, Guldenaar SEF, Boer GJ, Pickering BT. 1991.

Testicular oxytocin: effects of intratesticular oxytocin in the rat.

Journal of Endocrinology. 1991;130:231-238.

Nicholson HD, Hardy MP. 1992.

Luteinizing hormone differentially regulates the secretion of testicular oxytocin and testosterone by purified adult rat Leydig cells in vitro.

Endocrinology. 1992;130:671-677.

Nicholson HD, Greenfield HM, Frayne J. 1994.

The effect of germ cell complement on the presence of oxytocin in the interstitial and seminiferous tubule fluid of the rat testis.

J Endocrinol.1994 Dec;143(3):471-8.

Nicholson HD, Jenkin L. 1994.

Oxytocin increases 5- α reductase activity in the rat testis.

In: Function of Somatic cells in the Testis pp 278-285. Editor: A. Bartke. Springer-Verlag. USA.

Nicholson HD, Fownsend D. 1995.

Oxytocin increases the testicular transport of sperm in the pubertal rat.

Journal of Reproduction and Fertility. 1995;15:53.

Nicholson HD, Jenkin L. 1995.

Oxytocin and prostatic function.

In: Oxytocin pp 529-538. Editors; Ivell R., Russel J. Plenum Press. New York.

Nicholson HD. 1996.

Oxytocin: a paracrine regulator of prostatic function.

Rev Reprod.1996;1:69-72.

Nicholson HD, Parkinson TJ, Lapwood KR. 1999.

Effekts of oxytocin and vasopressin on sperm transport from the cauda epididymis in sheep.

Journal of Reproduction and Fertility. 1999;117:299-305.

Niemi M, Kormano M. 1965.

Contractility of the seminiferous tubule of the postnatal rat testis and ist responser to oxytocin.

Annales Medicinae Experimentalis et Biologiae Fenniae 1965;43:40-42.

Niemi M. 1965.

The fine structure and histochemistry of epithelial cells of the rat vas deferens.

Acta Anat. 1965;60: 207-209.

Oke BO, Suarez-Quian CA. 1993.

Localization of secretory, membrane associated and cytoskeletal proteins in rat testis using an improved immunocytochemical protocol that employs polyester wax.

Biol Reprod. 1993 Mar; 48(3):621-31.

Pagano F, Zattoni F, Vianello F. 1992.

Benign prostatic hypertrophy: the therapeutic options

Recenti Prog Med. 1992 Dec;83(12):696-700. Review.

Paris F, Weinbauer GF, Blum V, Nieschlag E. 1994.

The effect of androgens and antiandrogens on the immunohistochemical localization of the androgen receptor in accessory reproductive organs of male rats. J Steroid

Biochem Mol Biol. 1994 Jan;48(1):129-37.

Parker MG. 1993.

Steroid and related receptors.

Curr Opin Cell Biol. 1993;5: 499-504.

Partin AW, Oesterling JE, Epstein JL, Horton R, Walsh PC. 1991.

Influence of age and endocrine factors on the volume of benign prostatic hyperplasia.

Journal of Urology. 1991;145:188-191.

Pearlman WH, Crpy O, Murphy M. 1967.

Testosterone-binding levels in the serum of women during normal menstrual cycle, pregnancy and the post-partum period.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 1967;27:1012.

Pedersen CA, Prange AJ Jr. 1985.

Oxytocin and mothering behaviour in the rat.

Pharmacol Ther. 1985;28(3):287-302.

Pedersen CA, Caldwell JD, Johnson MF, Fort SA, Prange AJ Jr. 1985.

Oxytocin antiserum delays onset of ovarian steroid induced maternal behaviour.

Neuropeptides. 1985;6(2):175-82.

Pelliniemi CJ, Dym M, Gunsalus GL, Musto NA, Bardin CW, Fawcett DW 1981.

Immunocytochemical localization of androgen-binding protein in the male rat reproductive tract.

Endocrinology. 1981;108(3):925-31.

Pickering BT, Ayad VJ, Birkett SD, Gilbert CL, Guldenaar SEF, Nicholson HD, Worley RTS, Wathes DC 1990.

Neurohypophyseal peptides in the gonads: are they real and do they have a function?

Reproduction, Fertility and development 2:1990;245-262.

Plecas B, Popovic A, Jovovic D, Hristic M. 1992.

Mitotic activity and cell deletion in ventral prostate epithelium of intact and castrated oxytocin-treated rats.

J Endocrinol Invest. 1992 Apr;15(4):249-53.

Popovic A, Jovovic D, Hristic M, Martinovic J. 1982.

The effect of oxytocin on anterior pituitary gonadotropic function in male rats.

Lugoslav Physiol. Pharmacol. Acta. 1982;18:95-106.

Popovic A, Plecas B, Milicevic Z, Hristic M, Jovovic D. 1990.

Stereologic analysis of central prostate of oxytocin treated rats.

Archives of Andrology. 1990;24:247-253.

Power SGA, Bocchinfuso WP, Pallesen M, Warmel-Rodenhiser S, van Baelen H, Hammond GL. 1992.

Molecular analysis of a human sex hormone-binding globulin variant. Evidence for an additional carbohydrate chain.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 1992;75:1066.

Pschyrembel. 2002. klinisches Wörterbuch.

259. Auflage. Berlin, New York:

de Gruyter-Verlag, p 585/1537.

Que BG, Petra PH. 1987.

Characterization of a cDNA coding for sex steroid-binding protein of human plasma. FEBS Lett. 1987;219:405.

Rehbein M, Hillers M, Mohr E, Ivell R, Moriey S, Schmale H, Richter D. 1986.

The neurohypophyseal hormones vasopressin and oxytocin: Precursor structure, synthesis and regulation.

Biological Chemistry Hoppe Seyler. 1986;367:695-704.

Reid BL, Cleland KW. 1957.

The structure and function of the epididymis; I. The histology of the rat epididymis.

Aust. J. Zool. 1957;5:223-248.

Ricker DD, Chang TSK. 1996.

Neuronal input from the inferior mesenteric ganglion affects sperm transport within the rat epididymis.

International Journal of Andropology. 1996;19:371-376.

Rolshoven E. 1937.

Die funktionellen Strukturen des Hodenbindegewebes.

Morphol. Jahrbuch. 1937;79: 237-274.

Roosen-Runge EC. 1958.

Der primitive Bauplan der männlichen Keimdrüsen der Säugetiere.

Anat. Anz. 1958;104:248-250.

Rosner (Rosenbaum) W, Christy NP, Kelly WG. 1966.

Electrophoretic evidence for the presence of an estrogen-binding- β -globulin in human plasma.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 1966;26:1399.

Rosner W. 1990.

The functions of corticosteroid-binding globulin: recent advances.

Endocr. Rev. 1990;11:80-91.

Rosner W. 1991.

Plasma Steroid-Binding Proteins.

In: Strauss J.F. 1991;697-720.

Rosner W, Hryb DJ, Kahn MS, Nakhla AM, Romas NA. 1999.

Sex hormone-binding globulin mediates steroid hormone signal transduction at the plasma membrane.

J Steroid Biochem Mol Biol. 1999 Apr-Jun;69(1-6):481-5.Review.

Rosner W, Hryb DJ, Kahn MS, Nakhla AM, Romas NA. 1999.

Androgen and estrogen signaling at the cell membrane via G-proteins and cyclic adenosine monophosphate.

Steroids. 1999 Jan-Feb;64(1-2):100-6. Review.

Santemma V, Rosati P, Guerzoni C, Mariani S, Beligotti F, Magnanti M, Garufi G, Galoni T, Fabbrini A. 1992.

Human Sertoli cells in vitro: morphological features and androgen-binding protein secretion.

J Steroid Biochem Mol Biol.1992;43:423-9.

Seguchi K, Tvetnitsky V, Hodgert, Jury H, Hammond GL. 1998.

Sex hormone-binding globulin gene (SHBG) expression in human cancer cells.

In: Xth International Congress on Hormonal Steroids

Abstract Book, 1998;208B (abstract).

Selva DM, Hogeveen KN, Seguchi K, Teketey F, Hammond GL. 2002.

A human sex hormone binding globulin isoform accumulates in the acrosome during spermatogenesis.

J. Biol Chem. 2002;277(47): 45291-8.

Siiteri PK, Murai JT, Hammond GL, Nisker JA, Raymoure WJ, Kuhn RW. 1982.

The serum transport of steroid hormones.

Recent Progr. Horm. Res. 1982;38:457.

Steeno O, Heyns W, van Baelen H, DeMoor P. 1968.

Testosterone binding in human plasma.

Ann. Endocrinol. 1968;29:141.

Strel' chyonok OA, Avvakumov GV, Survilo LI. 1984.

A recognition system for sex-hormone-binding protein-estradiol complex in human decidual endometrium plasma membranes.

Biochem. Biophys. Acta. 1984 802:459-466.

Soloff MS, Beauregard G, Potier M. 1988.

Determination of the functional size of oxytocin receptors in plasma membranes from mammary gland and uterine myometrium of the rat by radiation inactivation.

Endocrinology. 1988 May;122(5):1769-72.

Sullivan PM, Wang Y, Joseph DR. 1993.

Identification of an alternate promoter in the rat androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin gene that regulates synthesis of a messenger RNA encoding a protein with altered function.

Mol. Endocrinol. 1993;7:702.

Suzuki Y, Sinohara H. 1984.

Subunit structure of sex-steroid binding plasma proteins from man, cattle, dog, and rabbit.

J. Biochem. 1984;96:751.

Truss M, Beato M. 1993.

Steroid and related receptors.

Curr Opin Cell. Biol. 1993;5:499-504.

Tsai M-J, O'Malley BW. 1994.

Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid repressor superfamily members.

Annu Rev Biochem. 1994;63:451-486.

Van Baelen H, Convents R, Cailleau J, Heyns W. 1992.

Genetic variation of human sex hormone-binding globulin: evidence for a worldwide bi-allelic gene.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 1992;75:135.

Vermeulen A, Verdonck L. 1968.

Studies on the binding of testosterone to human plasma.

Steroids. 1968;11:609.

Voglmayr JK. 1975.

Output of spermatozoa and fluid by the testis of the ram and its response to oxytocin.

Journal of Reproduction and Fertility. 1975;43:119-122.

Walsh KA, Itani K, Takio K, Kumar S, Hayes R, Petra PH. 1986.

Amino acid sequence of the sex steroid-binding protein of human blood plasma.

Biochemistry. 1986;25:7584.

Wang Y, Sullivan PM, Petrusz P, Yarbrough W, Joseph DR. 1989.

The androgen-binding protein gene is expressed in CD1 mouse testis.

Mol. Cell. Endocrinol. 1989;63:85.

Wang Y, Bayliss DA, Milhorn D.E, Petrusz P, Joseph DR. 1990.

The androgen-binding protein gene is expressed in male and female rat brain.

Endocrinology. 1990;127:3124.

Westphal U. 1986.

Steroid-Protein Interactions II.

Monographs on Endocrinology. Berlin. Springer-Verlag. 1986; 1986;198-301.

Yeung WS, Guldenaar SE, Worley RT, Humphrys J, Pickering BT. 1988.

Oxytocin in Leydig cells: an immunocytochemical study of Precoll-prified cells from rat testes.

Cell Tissue Res. 1988 Aug;253(2):463-8.

You L, Sar M. 1998.

Androgen receptor expression in the testes and epididymides of prenatal and postnatal Sprague-Dawley rats.

Endocrine. 1998 Dec;9(3):253-61.

10. Anhang

10.1. Lebenslauf



Persönliche Angaben

Name	Sebastian Weigel
Geburtsdatum	02.04.1981
Geburtsort	Rudolstadt
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbesuche

September 1987 bis Juli 2000	POS, später IGS „Grete Unrein“, Jena
Abitur (2000)	Abschlussnote „gut“ (1,6)

Zivildienst

September 2000 bis Juli 2001	Chirurgische Intensivstation der Universitätsklinik Jena
------------------------------	---

Studium

Ab Wintersemester 2001/02	Medizin (Staatsexamen) an der FSU Jena
Physikum (2003)	Abschlussnote „befriedigend“ (2,7)

Beschäftigungsverhältnisse

Seit Oktober 2002	Doktorand am Anatomischen Institut der Friedrich- Schiller Universität Jena
Seit Januar 2004	studentische Hilfskraft im Kurs für Histologie

Stipendien

Juni 2000	Buchpreis des Fonds der chemischen Industrie
April 2004	Kurzzeitstipendium der Boehringer- Ingelheim-Foundation

Publikationen

Zsofia Herbert, Sebastian Weigel, Ami Marshall, Jack D. Caldwell, Peter Petrusz,
Christiane Peuckert, Gustav F. Jirikowski (2003)
Coexpression of androgen-binding protein ABP and oxytocin in the male reproductive
tract. (in press)

Unterschrift

10.2. Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gustav Jirikowski für die Überlassung des Themas für diese Arbeit bedanken. Er unterstützte mich mit zahlreichen Anregungen und Hinweisen. Des Weiteren gilt ein außerordentlicher Dank Frau Dr. Zsotia Herbert. Sie war Urheber des Themas, half mit nützlichen Tipps, stand mir bei vielen Experimenten zur Seite und führte mich oft mit kritischen Diskussionen auf den richtigen Weg. Mein Dank richtet sich außerdem an die MTA Elke Schönfeld, welche inzwischen den verdienten Ruhestand genießt. Sie bettete die Gewebe in aufwendiger Arbeit ein und fertigte die Schnitte an.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Ferdinand von Eggeling dafür, dass ich die SELDI-TOF MS verwenden durfte und bei Frau Christine Peuckert des zoologischen Instituts Jena für ihre Mithilfe bei der in situ Hybridisierung.

Ich bedanke mich sehr bei Torsten Reubekeul, Maria Schlecht, Maria Puschbeck und Ulrike Kautzner für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bei meiner Großmutter Irmgard Weigel bedanke ich mich für die Bereitstellung des nützlichen PCs zur Erstellung dieser Arbeit und bei meinen Eltern für ihren emotionalen Beistand.

Ein großer Dank gilt der Boehringer-Ingelheim-Foundation für ihre finanzielle Unterstützung eines Forschungspraktikums an der Columbia University in New York. Zuletzt bedanke ich mich bei meiner Freundin Maria Puschbeck für ihre unendliche Geduld und ihre Unterstützung in Studium und Freizeit. Sie hilft mir vorwärts zu kommen und steht mir bei der Erfüllung meiner Ziele immer zur Seite.

10.3. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. habil. G. F. Jirikowski und Dr. Zsofia Herbert,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers