

Aus dem Institut für Tierzucht und Tierverhalten Mariensee

Nežika Petric

**Pränatale Regulation der sexuellen Differenzierung von
Luteinisierungshormon und Wachstumshormon :
Genexpression und Sekretion beim Schwein**

Manuskript, zu finden in www.fal.de

Published as: Landbauforschung Völkenrode Sonderheft 230

**Braunschweig
Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL)
2001**

Sonderheft 230
Special Issue



Landbauforschung
Völknerode
FAL Agricultural Research

**Pränatale Regulation der sexuellen Differenzierung
von Luteinisierungshormon und Wachstumshormon
Genexpression und Sekretion beim Schwein**

Nežika Petrič

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1	Einleitung 1
2	Literaturübersicht 2
2.1	Geschlechtsdifferenzierung..... 2
2.1.1	Genetische, gonadale und somatische Geschlechtsdifferenzierung..... 2
2.1.2	Neuroendokrine Geschlechtsdifferenzierung..... 4
2.2	Funktion und Regulation von LH und GH im pränatalen und postnatalen männlichen und weiblichen Organismus 6
2.2.1	Sexueller Dimorphismus der gonadotropen Achse..... 6
2.2.1.1	Funktion von LH im Organismus..... 6
2.2.1.2	Geschlechtsspezifische Regulation der LH-Sekretion..... 7
2.2.1.3	Geschlechtsspezifische Regulation der LH β -Genexpression 8
2.2.1.4	Geschlechtsspezifischer Pubertätseintritt 8
2.2.2	Sexueller Dimorphismus der somatotropen Achse 9
2.2.2.1	Funktion von GH im Organismus 9
2.2.2.2	Geschlechtsspezifische Regulation der GH-Sekretion 10
2.2.2.3	Geschlechtsspezifische Regulation der GH-Genexpression 12
2.2.2.4	Geschlechtsspezifisches Wachstum..... 13
2.3	Mechanismen der sexuellen Differenzierung neuroendokriner Funktionen..... 13
2.3.1	Sexuelle Differenzierung der gonadotropen Achse..... 13
2.3.1.1	Wirkung fötaler testikulärer Androgene auf das positive Östrogen-Feedback..... 13
2.3.1.2	Wirkung fötaler testikulärer Androgene auf die tonische LH-Sekretion..... 14
2.3.1.3	Wirkung fötaler testikulärer Androgene auf die GnRH-Sekretion..... 15
2.3.1.4	Mechanismen organisatorischer Androgeneffekte auf die gonadotrope Achse..... 16
	Zeitpunkt und Dauer der Exposition gegenüber Androgenen..... 16
	Einfluss der Testosterondosis 16
	Androgenmetaboliten..... 17
2.3.2	Sexuelle Differenzierung der somatotropen Achse..... 17
2.3.2.1	Wirkung fötaler testikulärer Androgene auf das Wachstum 17
2.3.2.2	Wirkung fötaler testikulärer Androgene auf die GH- und IGF-I-Sekretion..... 18
2.3.2.3	Wirkung fötaler testikulärer Androgene auf die GH-Genexpression..... 19
2.3.2.4	Mechanismen organisatorischer Androgeneffekte auf die somatotrope Achse 20
3	Eigene Untersuchungen..... 22
3.1	Zielsetzung..... 22
3.2	Material und Methoden 22
3.2.1	Versuchsaufbau 22
3.2.1.1	Wirkung einer pränatalen Behandlung mit Testosteronpropionat auf die postnatale Steuerung von Wachstum und Reproduktion 22
	Behandlung der Muttertiere..... 22
	Erhebungen an der Nachzucht..... 23
3.2.1.2	Wirkung einer pränatalen Behandlung mit Testosteronpropionat auf den Fötus am Tag 80 p.c..... 24
3.2.2	Operative Eingriffe 25

3.2.2.1	<i>Katheterisierung</i>	25
3.2.2.2	<i>Gewinnung fötaler und postnataler Adenohypophysen</i>	25
3.2.3	<i>Labortechniken</i>	25
3.2.3.1	<i>Bestimmung von porcinem GH und LH durch Enzym Immuno Assay (EIA)</i>	25
3.2.3.2	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	26
	<i>Extraktion der Gesamt-RNA</i>	26
	<i>Gelelektrophorese</i>	27
	<i>Northern Blot</i>	28
	<i>Hybridisierungssonden</i>	28
	<i>Markierung der Sonden</i>	28
	<i>Hybridisierungsverfahren</i>	28
	<i>Rehybridisierung</i>	29
	<i>Phosphor Imaging</i>	30
	<i>Densitometrie</i>	31
3.2.4	<i>Qualitätskriterien der LHβ- und GH- Genexpressionsbestimmung</i>	31
3.2.5	<i>Statistische Auswertung</i>	32
3.3	<i>Ergebnisse</i>	32
3.3.1	<i>Wirkung einer pränatalen Behandlung mit Testosteronpropionat auf die postnatale Steuerung von Wachstum und Reproduktion</i>	32
3.3.1.1	<i>Geschlechtsbestimmung und Grad der phänotypischen Maskulinisierung</i>	32
3.3.1.2	<i>Die Gewichtsentwicklung</i>	33
3.3.1.3	<i>LH-Sekretion</i>	35
3.3.1.4	<i>GH-Sekretion</i>	37
3.3.1.5	<i>LHβ-Genexpression</i>	38
3.3.1.6	<i>GH-Genexpression</i>	40
3.3.2	<i>Wirkung einer pränatalen Behandlung mit Testosteronpropionat auf den Fötus am Tag 80 p.c.</i>	41
3.3.2.1	<i>Geschlechtsbestimmung und Grad der phänotypischen Maskulinisierung</i>	41
3.3.2.2	<i>Körper- und Adenohypophysengewichte</i>	42
3.3.2.3	<i>LHβ-Genexpression</i>	43
3.3.2.4	<i>GH-Genexpression</i>	45
3.4	<i>Diskussion</i>	47
3.4.1	<i>Einfluss der pränatalen TP-Behandlung auf die phänotypische Maskulinisierung</i>	47
3.4.2	<i>Einfluss der pränatalen TP-Behandlung auf die LH-Sekretion und LHβ-Genexpression</i>	47
3.4.3	<i>Einfluss der pränatalen TP-Behandlung auf die Gewichtsentwicklung</i>	50
3.4.4	<i>Einfluss der pränatalen TP-Behandlung auf die GH-Sekretion und GH-Genexpression</i>	52
4	Zusammenfassung	55
5	Summary	57
6	Literaturverzeichnis	59
7	Verzeichnis der Abkürzungen	66
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	67

1 Einleitung

Die Regulationsmechanismen der Reproduktion und des Wachstums landwirtschaftlicher Nutztiere sind geschlechtsspezifisch.

Beim Schwein existiert im Luteinisierungshormon (LH)-System bereits pränatal ein sexueller Dimorphismus. Weibliche Föten weisen konstant höhere Plasma-LH- und LHB mRNA-Konzentrationen auf als gleichaltrige männliche Föten. Außerdem besteht in der präpuberalen Phase ein Geschlechtsunterschied im Verlauf der gleichförmigen, tonischen LH-Sekretion sowie in der Fähigkeit zur durch Östrogene induzierbaren zyklischen LH-Sekretion. Männliche Schweine weisen ein stärkeres Körperwachstum auf als weibliche Schweine und zeigen bereits pränatal höhere Plasma-Wachstumshormon (GH)- und GH mRNA-Konzentrationen. Auch das Muster der adulten GH-Sekretion ist geschlechtsspezifisch.

Diese Geschlechtsunterschiede sind vermutlich zumindest teilweise durch die organisatorisch-prägende Wirkung männlicher Sexualhormone (Androgene) aus den Hoden in der frühen Fötalentwicklung bedingt. Beim weiblichen Schwein wird die Potenz zur zyklischen LH-Sekretion durch im ersten Drittel der Trächtigkeit appliziertes

Testosteron unterdrückt. Beim Schaf konnte eine Prägung der zyklischen LH-Sekretion und eine zeitliche Steuerung des Pubertätsbeginns durch pränatal verabreichte Androgene festgestellt werden. Die Beeinflussung der somatotropen Achse durch pränatales Testosteron führt beim Rind und beim Schaf zur einer eindeutigen Verbesserung der Mastleistung und einer Steigerung der täglichen Zunahmen.

Beim Schwein ist nicht bekannt, ob fötale Androgene aus den Hoden auch die Genexpression von LHB und GH prägen und für den sexuellen Dimorphismus im Wachstum und in der Regulation der GH-Sekretion mitverantwortlich sind. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zum besseren Verständnis der diesbezüglichen Bedeutung pränataler Androgene beim Schwein leisten. Sauen wurden im ersten Drittel der Trächtigkeit mit Testosteronpropionat behandelt, und an den dadurch maskulinisierten Föten wurden die Veränderungen der LHB- und GH- Genexpression untersucht. Im postnatalen Leben wurde eine mögliche bleibende (organisatorisch-prägende) Wirkung des pränatalen Testosterons auf die LHB und GH- mRNA-Niveaus und Plasma-LH- und GH-Konzentrationen sowie die Gewichtsentwicklung bei präpuberalen weiblichen und kastrierten männlichen Schweinen erfasst.

2 Literaturübersicht

2.1 Geschlechtsdifferenzierung

2.1.1 Genetische, gonadale und somatische Geschlechtsdifferenzierung

Die Geschlechtsdifferenzierung oder auch sexuelle Differenzierung ist der Prozess, in dem es zur Entwicklung des männlichen oder des weiblichen Individuums kommt. Grundsätzlich ist zwischen genetischer, gonadaler, somatischer bzw. phänotypischer und endokriner Differenzierung zu unterscheiden. Die genannten Differenzierungsarten entwickeln sich in einer genau aufeinander abgestimmter Reihenfolge. Die An- bzw. Abwesenheit bestimmter Hormone in sensiblen Entwicklungsphasen ist für die morphologische sowie funktionelle Sexualdifferenzierung erforderlich. Die Zeiträume, in denen die gonadale, somatische oder endokrine Differenzierung erfolgt, werden als „kritische Phasen“ der sexuellen Differenzierung bezeichnet.

Die **genetische Differenzierung** bedeutet die Determinierung eines entstehenden Organismus durch die zufällige Geschlechtschromosomenkombination bei der Befruchtung. In jedem Säugetierfötus sind jedoch zunächst beide Geschlechtsanlagen, die Wolffschen und Müllerschen Gänge, vorhanden. Jeder Organismus hat durch diese bipotenten Anlagen die Möglichkeit zur Entwicklung sowohl des männlichen als auch des weiblichen Reproduktionssystems. Die normale sexuelle Differenzierung fördert die Entwicklung des einen Systems und hemmt die des anderen. Im Fall des genetisch männlichen Geschlechtes, mit der Chromosomenkombination XY, entwickeln sich aus bipotenten Gonadenanlagen unter dem Einfluss des Testis-Determinationsfaktors SRY (WULF, 1998) die fötalen Testis und beim genetisch weiblichen Geschlecht, mit der Chromosomenkombination XX, entwickeln sich konstitutiv die Ovarien. Die Entwicklung von Testis und Ovarien ist durch den Begriff **gonadale Differenzierung** definiert. Im männlichen Fötus produzieren die Leydig-Zellen der fötalen Testis Androgene, vor allem Testosteron. Unter seinem Einfluss entwickeln sich die Wolffschen Gänge zu Nebenhoden, Samenleiter und Penis. Die Sertoli-Zellen des fötalen Testis bilden den Müllerian Inhibiting Factor (MIF), der die Weiterbildung der Müllerschen Gänge blockiert. Beim weiblichen Fötus sind Testosteron und MIF nicht präsent. Die Wolffschen Gänge degradieren daher in Abwesenheit von Testosteron. Die Müllerschen Gänge entwickeln sich konstitutiv zum weiblichen Genitaltrakt: Eileiter,

Uterus, Vagina. Die Entwicklung der männlichen und weiblichen Geschlechtsorgane ohne Keimdrüsen (Testis und Ovarien) wird als **somatische oder phänotypische Differenzierung** bezeichnet (zur Übersicht: BYSKOV und HOYER, 1994).

Die folgenden Untersuchungen an Schweineföten zeigen den zeitlichen Verlauf der sexuellen Differenzierung beim Schwein. Das auf dem Y-Chromosom liegende Geschlechtsdeterminationsgen SRY (sex-determining region Y gene) determiniert die Differenzierung der indifferenten Gonadenanlagen zu Testis und ist damit auch indirekt für die Ausprägung des männlichen Phänotyps verantwortlich. Die porcine SRY-Genexpression in den Zellen der Keimdrüsenleiste des männlichen Schweinefötus beginnt zwischen Tag 21 und 23 post coitum (p.c.). Zu diesem Zeitpunkt sind die Gonadenanlagen noch bipotent. Am Tag 31 p.c. wurde keine SRY-Genexpression mehr gefunden; zu diesem Zeitpunkt ist der SRY-Faktor offensichtlich für die weitere Entwicklung der Testis nicht mehr notwendig (DANEAU et al., 1996 und PARMA et al., 1999). PELLINIEMI (1975) konnte im Schweinefötus das gonadale Geschlecht anhand einer deutlichen Differenzierung von testikulärem Gewebe schon ab Tag 26 p.c. bestimmen. Die Leydig-Zellen der fötalen Testis produzieren vor allem Testosteron. Sie sind im Schweinefötus zwischen den Trächtigkeitstagen 28 p.c. und 30 p.c. erstmals nachweisbar (PELLINIEMI, 1985; INOMATA et al., 1993). Ab Tag 30 p.c. wurden erhöhte Testosteronwerte in der Amnionflüssigkeit (GOXE et al., 1993), im Testis (REASIDE und SIGMAN, 1975) und im fötalen Blut (FORD et al., 1980) mit einem Maximum am Tag 35 p.c. (GOXE et al., 1993; FORD et al., 1980) gemessen. Ebenfalls am Tag 30 p.c. konnte die Expression des Enzyms 17 α -Hydroxylase, das die Synthese von Testosteron katalysiert, nachgewiesen werden; diese war positiv zur Testosteron-Produktion korreliert (KAMINSKI et al., 1999). Die Differenzierung der Sertoli-Zellen beginnt vor dem Tag 30 p.c., VAN VORSTENBOSCH et al. (1986) wiesen am Tag 28 p.c. gut entwickelte Sertoli-Zellen nach.

Dass die somatische Differenzierung hormonell gesteuert wird bzw. dass sich die Wolffschen Gänge durch den Einfluss von Androgenen entwickeln, konnte durch Experimente, in denen während der Phase der Differenzierung eine Androgen-Behandlung erfolgte, gezeigt werden. Durch die Behandlung weiblicher Föten mit Androgenen - sei es intrafötal oder durch intramuskuläre (i.m.) Behandlung der tragenden Muttertiere - wird die Differenzierung der Gonaden (Ovarien) sowie die Anlage der inneren weiblichen Geschlechtsorgane

(Eileiter, Uterus, Vagina) zwar nicht beeinflusst. Zusätzlich wird jedoch auch das männliche innere Gangsystem weiter entwickelt. Das heißt, dass sich aus den Wolffschen Gängen dieser weiblichen Organismen Nebenhoden, Samenleiter und Samenblase entwickeln. Aus dem Sinus urogenitalis entsteht eine männliche Prostata, die vaginalentwicklung ist hingegen gehemmt. Das äußere Genitale ist männlich, einschließlich der Entwicklung eines Penis. Bei dieser Form der Intersexualität, die daraus resultiert, dass Androgene in der Phase der sexuellen Differenzierung im weiblichen Fötus wirksam werden, liegt ein kompletter männlicher Genitaltrakt vor. Diese Tiere besitzen jedoch ebenfalls noch ein inneres weibliches Genitale. Man spricht bei dieser Form weiblicher Intersexualität von **Maskulinisierung oder Vermännlichung**. Die Rolle der Androgene für die männliche Sexualdifferenzierung wurde erstmals durch die Kastrationsversuche von JOST (1947) beschrieben. Nach der intrauterinen Kastration von Kaninchenföten erfolgte eine vollständige weibliche Differenzierung, unabhängig vom genetischen Geschlecht. Durch eine pränatale Kastration und Androgensubstitution der Kaninchenföten kam es bei männlichen Kastraten zu einer unvollständigen männlichen Entwicklung. Daraus wurde gefolgert, dass die Hormone aus den männlichen fötalen Gonaden die somatische Geschlechtsdifferenzierung steuern, Ovarien haben keinen Einfluss auf die Geschlechtsdifferenzierung (das Prinzip der primären Weiblichkeit).

Beim Schwein lässt sich eine derartige phänotypische Maskulinisierung sowohl durch eine intrafötale Behandlung als auch durch eine Behandlung tragender Sauen mit Testosteronpropionat (TP) erreichen. Schweineföten wurden im Alter von 30 oder 40 Tagen p.c. direkt transuterin mit Testosteron behandelt (ELSAESSER et al., 1978). Bei den am Tag 30 p.c. behandelten weiblichen Ferkeln kam es zu einer vollständigen Maskulinisierung der äußeren Geschlechtsorgane (leerer Skrotalsack, Penis). Die Behandlung am Tag 40 p.c. führte hingegen nur noch zu einer Hypertrophie der Klitoris. In einer weiteren Untersuchung wurden bei weiblichen Föten durch die TP-Behandlung der tragenden Muttersauen je nach Behandlungszeitpunkt unterschiedliche phänotypische Veränderungen der äußeren Geschlechtsorgane ausgelöst (ELSAESSER und PARVIZI, 1979). Die ano-genitale Distanz (AGD) der weiblichen Nachkommen, die am Tag 30 p.c. durch das Muttertier mit TP behandelt worden waren, war bei der Geburt und blieb auch am 160. und 250. Lebensstag vergrößert. An der Vulva einiger

am Tag 50 oder 70 p.c. behandelte Ferkel wurde nekrotisches Gewebe zur Zeit der Geburt beobachtet, das aber später ausheilte. Die TP-Behandlung am Tag 90 und 106 der Trächtigkeit bewirkte keine morphologische Veränderung der äußeren Geschlechtsorgane. Eine ebenfalls nur partielle phänotypische Maskulinisierung beschrieben FORD und CHRISTENSON (1987) nach TP-Behandlung tragender Sauen ab Tag 29 p.c., ab Tag 39 p.c. derart behandelte weibliche Nachkommen zeigten ebenfalls nur eine vergrößerte Klitoris. Aus den genannten Untersuchungen kann abgeleitet werden, dass die somatische Differenzierung beim Schwein zwischen Tag 30 und 40 p.c. erfolgt. Die schematische Darstellung in der Abb. 2-1 gibt einen chronologischen Überblick über die sexuelle Differenzierung beim Schwein.

In Experimenten an Embryonen verschiedener Spezies wurde untersucht, welche Wirkung androgene Metabolite auf ihre Zielzellen und deren somatische Differenzierung ausüben. Nach dem Grundmodell (siehe Abb.2-2) diffundiert Testosteron passiv in die Zielzellen. In einigen Zielzellen wird Testosteron durch 5 α -Reduktase zu 5 α -Dihydrotestosteron (DHT) reduziert. Im Zytoplasma binden Testosteron bzw. DHT an spezifische, zunächst inaktive Rezeptoren. Dabei trennen sich bestimmte an die Rezeptoren gebundenen Proteine („heat shock proteins“) ab und unterstützen damit die Aktivierung und den Transport der Hormon-Rezeptor-Komplexe in den Zellkern. Dort werden jeweils aus zwei Androgen-Rezeptor-Komplexen Homodimere gebildet, und diese binden an spezifische, palindromische DNA-Sequenzen in der Promoter-Region der Zielgene. Im Zusammenwirken mit anderen, noch nicht vollständig bekannten Transkriptionsfaktoren wird - je nach entsprechender biologischer Zielsetzung der Zelle - entweder eine Stimulation oder Hemmung der Gentranskription ausgelöst (HIORT und HOLTERHUS, 2000).

Die unterschiedliche Rolle von Testosteron und DHT bei der männlichen Differenzierung wurde anhand verschiedener Studien zum Androgen-Metabolismus in Embryonen postuliert. 5 α -Reduktase wurde im urogenitalen Sinus und Tuberkel von Föten der Spezies Ratte, Kaninchen, Meerschweinchen und Mensch vor dem Beginn der sexuellen Differenzierung nachgewiesen, nicht jedoch in den Wolffschen Gängen. Daraus wurde abgeleitet und an Patienten mit 5 α -Reduktase-Mangel bestätigt, dass Testosteron die Maskulinisierung der Wolffschen Gänge beeinflusst und DHT die Entwicklung von Prostata, männlicher Urethra und männlichen äußeren Genitalien fördert (GEORGE und WILSON, 1994).

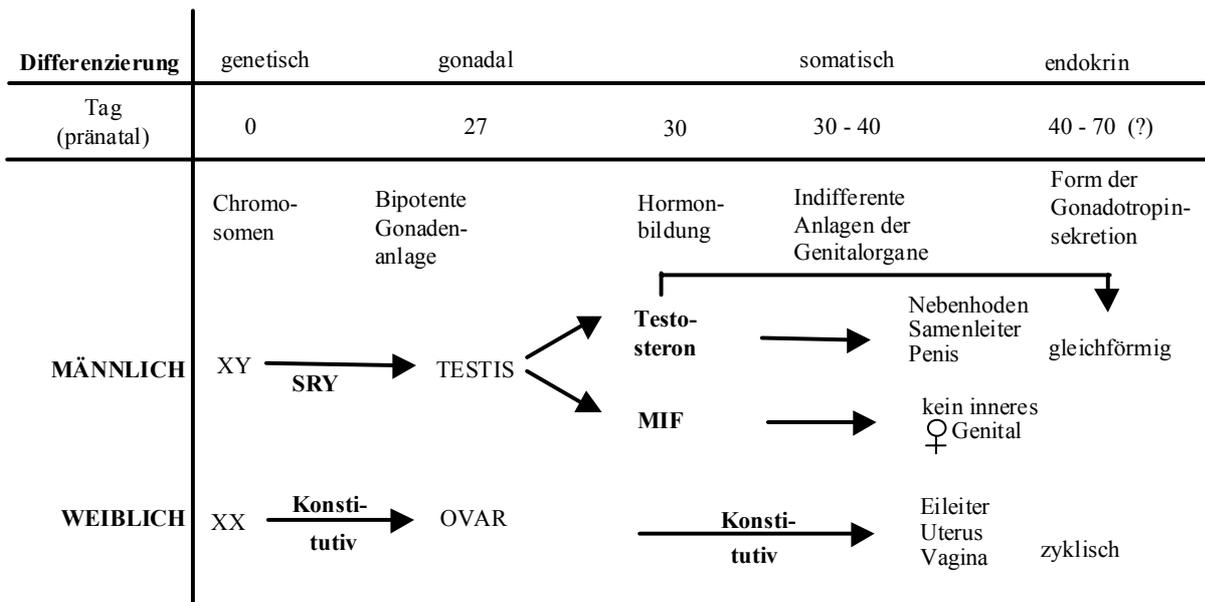


Abb. 2-1: Schematische Darstellung der sexuellen Differenzierung beim Schwein (modifiziert nach ELSAESSER und SMIDT, 1985)

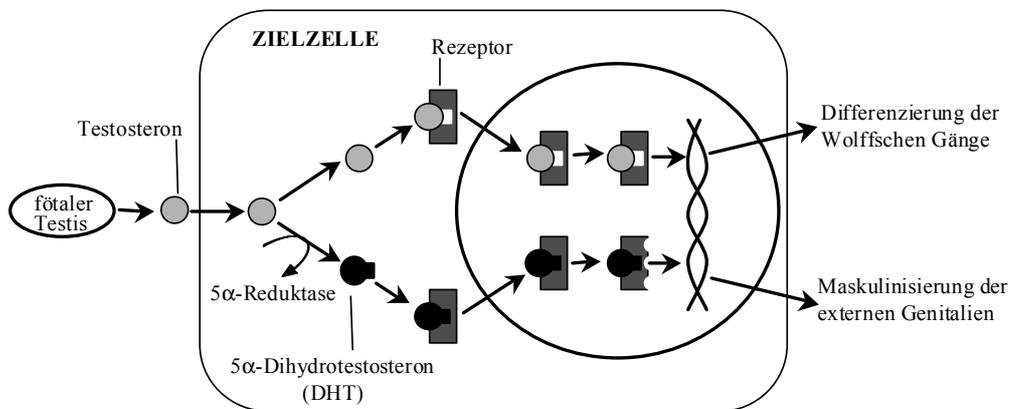


Abb. 2-2: Schematische Darstellung der androgenen Wirkung auf die somatische Differenzierung (modifiziert nach GEORGE und WILSON, 1994 und HIORT und HOLTERHUS, 2000)

2.1.2 Neuroendokrine Geschlechtsdifferenzierung

Weibliche und männliche Organismen unterscheiden sich nicht nur im genetischen, gonadalen und somatischen Geschlecht, sondern auch in der endokrinen Regulation der Fortpflanzung und des Wachstums. Die pränatale Prägung oder

Determinierung bestimmter neuraler Zentren des endokrinen Systems, die im Erwachsenenalter bestimmte Funktionen geschlechtsspezifisch steuern, wird als **neuroendokrine Differenzierung** bezeichnet. In allen Spezies, so weit sie untersucht wurden, ist das Zentralnervensystem (ZNS) nicht während der gesamten Entwicklungsphase des frühen Lebens gleich sensibel gegenüber der Wirkung von

Gonadenhormonen. Der Zeitraum, in dem die Gonadenhormone bleibende organisatorische (prägende) Effekte auf geschlechtsspezifische neuroendokrine Regulationsmechanismen ausüben, wird als „kritische Phase“ der neuroendokrinen sexuellen Differenzierung bezeichnet (MACLUSKY und NAFTOLIN, 1981). Ein Beispiel für den stark ausgeprägten Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Hirnfunktionen ist an der Gonadotropinfreisetzung aus der Adenohypophyse abzulesen.

Aus Untersuchungen an der Ratte, aber auch an landwirtschaftlichen Nutztieren geht hervor, dass Luteinisierungshormon (LH) nur dann zyklisch sezerniert werden kann, wenn keine männliche Prägung durch Androgene erfolgt ist. Die zyklische LH-Sekretion ist jedoch die Voraussetzung dafür, dass eine Ovulation ausgelöst wird. Ob eine weibliche Differenzierung zum zyklischen LH-Sekretionstyp oder eine männliche zum azyklischen (gleichförmigen) erfolgt, hängt davon ab, ob Androgene in einer bestimmten Phase der Entwicklung („kritischen Phase“) wirksam werden oder nicht. Der Zeitpunkt dieser „kritischen Phase“ ist speziesabhängig und findet sich bei Tierarten mit einer längeren Trächtigkeitsperiode (z.B. Schaf, Rind, Schwein) in der ersten Hälfte der Trächtigkeit, während er bei den in relativ unreifem Zustand geborenen Säugetieren (z.B. Maus, Ratte) in der späten pränatalen oder frühen postnatalen Phase liegt. Wenn weibliche Föten oder Neugeborene in dieser „kritischen Phase“ der Wirkung von Androgenen ausgesetzt werden, dann resultiert daraus später im geschlechtsreifen Tier eine Unfähigkeit zur zyklischen LH-Sekretion.

Schon im Jahr 1936 zeigte PFEIFFER mit einem Experiment an der Ratte, dass das maskuline Muster der Gonadotropinsekretion der adulten Tiere vom Vorhandensein bestimmter aus den Testis stammenden Faktoren in der frühen postnatalen Phase abhängig ist. Weibliche neonatal ovariectomierte Ratten, denen kurz nach der Geburt Testis verpflanzt wurden, entwickelten ein männliches Gonadotropinsekretionsmuster. Neonatal kastrierte männliche Ratten bildeten in transplantiertem Ovargewebe Gelbkörper aus. GORSKI (1973) stellte in einer Serie von Versuchen mittels TP-Behandlung weiblicher Ratten fest, dass testikuläre Hormone unmittelbar nach der Geburt die sexuelle Differenzierung der Ratte beeinflussen. CORBIER (1985) konnte bei weiblichen und männlichen Ratten durch neonatale Gonadektomie und nach einer einmaligen Östradiolbenzoat-Stimulation am Tag 28 post partum (p.p.) nur bei weiblichen Ratten einen zyklischen LH-Anstieg feststellen. Eine mehrtägige

Östradiolbenzoat-Substitution in der präpuberalen Phase sowie eine darauf folgende Östradiolbenzoat-Stimulation induzierte einen LH-Gipfel bei ovariectomierten weiblichen und kastrierten männlichen Ratten. Bei intakten männlichen Ratten blieb diese Reaktion hingegen aus. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass die Präsenz gonadaler Androgene bei der männlichen Ratte zur Hemmung des positiven Östrogen-Feedbacks und damit statt zur zyklischen zu einer gleichförmigen LH-Sekretion führt.

Auch am Schwein wurde diese Fähigkeit zur zyklischen Gonadotropinsekretion untersucht (ELSAESSER und PARVIZI, 1979). Während es bei präpuberalen weiblichen Schweinen 48 Stunden nach Östradiolbenzoat-Stimulation zur Auslösung eines präovulatorischen LH-Anstiegs kam, konnte bei präpuberalen männlichen Kastraten durch Östradiolbenzoat kein dem präovulatorischen LH-Anstieg vergleichbarer LH-Gipfel ausgelöst werden. In der gleichen Studie wurden auch pränatal maskulinisierte weibliche präpuberale Schweine mit Östradiolbenzoat behandelt. Bei den Tieren, die am Tag 30, 50 oder 70 p.c. durch das Muttertier mit Testosteron behandelt worden waren, kam es zu einer signifikanten Unterdrückung des normalerweise durch Östradiolbenzoat induzierbaren LH-Anstiegs. Tiere hingegen, die pränatal am Tag 90 oder 106 p.c. mit Testosteronpropionat behandelt worden waren, zeigten 48 Stunden nach der Östradiolbenzoat-Behandlung einen normalen LH-Anstieg. Aus dieser Untersuchung kann geschlossen werden, dass beim weiblichen Schwein eine pränatale Exposition gegenüber Testosteron die Potenz zum präovulatorischen LH-Anstieg unterdrücken kann und dass beim männlichen Tier die Prägung der gleichförmigen LH-Sekretion durch pränatales testikuläres Testosteron erfolgt, und zwar zwischen dem Tag 30 und 70 p.c.

An der Ratte wurden die Wirkungen androgener Metabolite auf das endokrine System untersucht. Testosteron wird in den Zielzellen in aktive Metabolite überführt, die unterschiedliche, geschlechtsspezifische Funktionen haben. Es bestehen zwei potenzielle Wege: einerseits wird Testosteron durch 5 α -Reduktase zu 5 α -DHT metabolisiert, andererseits durch das Enzym Aromatase zu 17 β -Östradiol hydroxiliert (Abb. 2-3).

Auf diese Weise werden aktive Steroide mit deutlich unterschiedlichen Funktionen produziert. So konnte an der Ratte gezeigt werden, dass DHT weniger effektiv als Testosteron oder Östradiol bei der Induktion der Defeminisierung des neonatalen Gehirns war. Weiter konnte der Effekt von neonatal injiziertem Testosteron bei weiblichen Ratten durch

einen Östrogenantagonisten blockiert werden. Die Experimente weisen darauf hin, dass das durch die Aromatisierung von Testosteron entstehende Östradiol das aktive Steroidhormon bei der sexuellen Differenzierung des Gehirns der Ratte ist (zur Übersicht: MACLUSKY und NAFTOLIN, 1981). Beim Meerschweinchen wurde der organisatorische Effekt der Testosteronmetabolite auf die Entwicklung des positiven Östrogen-Feedback-Mechanismus untersucht (RESKO und ROSELLI, 1997). Eine pränatale Behandlung mit 5 α -Reduktase- bzw. Aromataseinhibitoren veränderte die geschlechtsspezifische Art der LH-Sekretion nach Östrogen-Stimulus (LH-Gipfel bei weiblichen, tonische LH-Sekretion bei männlichen Tieren) weder bei weiblichen noch bei männlichen adulten Meerschweinchen. Daraus wurde abgeleitet, dass weder DHT noch Östrogen, sondern Testosteron selbst das wirksame Androgen für die Maskulinisierung des LH-Gipfel-Mechanismus beim Meerschweinchen ist.

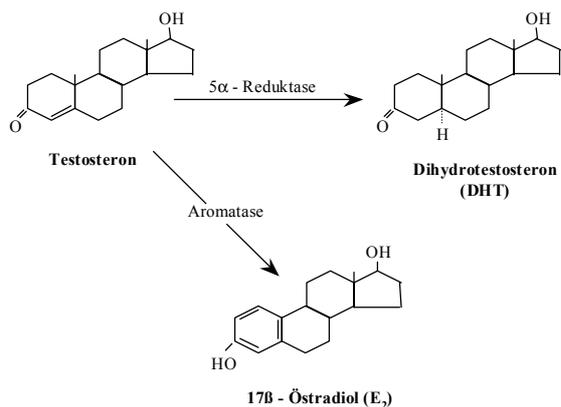


Abb. 2-3: Mögliche Wege des Testosteron-Metabolismus im Gehirn in der Phase der Differenzierung (modifiziert nach RESKO und ROSELLI, 1997)

2.2 Funktion und Regulation von LH und GH im pränatalen und postnatalen männlichen und weiblichen Organismus

2.2.1 Sexueller Dimorphismus der gonadotropen Achse

2.2.1.1 Funktion von LH im Organismus

Das hypophysäre Gonadotropin LH wirkt auf männliche und weibliche Keimdrüsen. Im geschlechtsreifen männlichen Organismus stimuliert LH die Proliferation und Differenzierung der interstitiellen Leydig-Zellen des Hodens und fördert die Produktion und Freisetzung von Androgenen und Östrogenen. Im weiblichen Organismus stimuliert LH in den Theca-interna-Zellen des Ovars und in den Granulosazellen des präovulatorischen Follikels die Biosynthese und Sekretion von Östrogenen. LH wirkt zusammen mit dem zweiten hypophysären Gonadotropin Follikelstimulierendes Hormon (FSH) auf die Follikelreifung. Durch den präovulatorischen LH-Gipfel ist LH für die Ovulation der reifen Follikel verantwortlich. LH ist auch an der Bildung, Erhaltung und Progesteronsekretion des Corpus luteum beteiligt (zur Übersicht: DÖCKE, 1994).

Im pränatalen Leben sind Gonadotropine für die Differenzierung und funktionelle Entwicklung der Gonaden entscheidend. Bei fehlenden hypophysären Hormonen (Dekapitierung am 42. Trächtigkeitstag) wurde die normale Hodenentwicklung nach dem 60. Trächtigkeitstag bei männlichen Schweineföten gestört. Das Hodengewicht war im Vergleich zu dem der Kontrolltiere deutlich niedriger, die morphologische Entwicklung der Samenkanälchen war gestört und die Leydig-Zellen waren fast vollständig verschwunden. Die Entwicklung der Keimzellen blieb dabei jedoch unverändert (COLENBRANDER et al., 1979). Der gleiche Versuchsansatz mit weiblichen Schweineföten führte hingegen zu keinerlei morphologischen Veränderungen an den fötalen Ovarien (COLENBRANDER et al., 1983). Daraus folgt, dass in bestimmten Entwicklungsstadien offensichtlich die Gonadenentwicklung im männlichen Geschlecht gonadotropinabhängig ist, während die Entwicklung der weiblichen Gonaden durch fehlende Gonadotropine nicht gestört wird.

2.2.1.2 Geschlechtsspezifische Regulation der LH-Sekretion

Sekretion und Freisetzung von LH sind das Ergebnis sehr komplexer Interaktionen und des abgestimmten Zusammenwirkens von Zentralnervensystem (ZNS) mit Hypothalamus, Adenohypophyse und Gonaden.

Durch seine pulsatile Sekretion wirkt das Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) aus dem Hypothalamus stimulierend auf Synthese und Freisetzung des adenohypophysären LH (LÜKING-JAYES et al., 1997; DÖCKE, 1994). Die GnRH-Sekretion wird ihrerseits durch verschiedene Neuropeptide und Neurotransmitter des ZNS kontrolliert (EVANS, 1999).

Beim adulten, männlichen Tieren wird LH nach einem tonischen Muster sezerniert. Durch das Prinzip des negativen Feedback-Mechanismus wirken Androgene hemmend auf die LH-Sekretion, und zwar indirekt über die Verminderung der GnRH-Pulsfrequenz. Östrogene üben eine hemmende Wirkung auf die LH-Sekretion direkt über ihre Wirkung auf die gonadotropen Zellen der Adenohypophyse oder indirekt durch eine verminderte GnRH-Freisetzung im Hypothalamus aus. Der durch Androgene erzielte negative Feedback-Mechanismus führt beim männlichen Geschlecht zu einer tonisch pulsatilem LH-Sekretion. Bei adulten intakten weiblichen Tieren wird zusätzlich von einem ovulationsauslösenden oder positiven Feedback gesprochen. Durch einen präovulatorischen Östradiolanstieg, der einen bestimmten Schwellenwert und eine bestimmte Dauer (beim Schwein 48 Stunden) erreichen muss, wird ein Anstieg in der LH-Sekretion, der sogenannte präovulatorische LH-Gipfel, stimuliert, der die Ovulation auslöst. Die Dauer des LH-Anstiegs beim Schwein beträgt ca. 20 Stunden. Durch dieses Zusammenwirken von Hypothalamus, Adenohypophyse und den Organen des Genitaltraktes sowie der von ihnen gebildeten Hormone kommt es beim weiblichen Schwein zum 21 Tage dauernden Sexualzyklus (zur Übersicht: ELSAESSER, 1982; PRUNIER et al., 1987; COX und BRITT, 1986; DÖCKE, 1994).

Beim fötalen Schwein ist LH im Blutplasma ab dem zweiten Drittel der Trächtigkeit messbar. Am Trächtigkeitstag 55 p.c. konnte noch kein LH im Blutplasma nachgewiesen werden (COLENBRANDER et al., 1982), aber schon am Tag 60 p.c. war LH in beiden Geschlechtern im fötalen Blutplasma nachweisbar (ELSAESSER et al., 1988). Die LH-Konzentration stieg mit zunehmendem Fötalalter in beiden Geschlechtern an, wobei die

Konzentration bei weiblichen Föten auf höherem Niveau lag als bei männlichen (ELSAESSER et al., 1988; GOXE et al., 1993).

Zur Untersuchung der pränatalen Entwicklung der LH-Regulation wurden Stimulierungsversuche mit GnRH durchgeführt. COLENBRANDER et al. (1982) untersuchten männliche und weibliche Föten vom 55. bis 113. Trächtigkeitstag. Erst ab Tag 70 p.c. reagierten die ersten Föten auf die GnRH-Stimulation. Mit zunehmendem Alter reagierten immer mehr Föten auf den GnRH-Stimulus mit einem verstärkten LH-Anstieg. Es wurde kein Geschlechtsunterschied gefunden.

Ähnliche Ergebnisse ergaben Experimente mit Zellkulturen fötaler Adenohypophysen von Tag 60, 80 und 105 p.c. In der jüngsten Altersgruppe reagierten zuerst die weiblichen Hypophysenzellen auf eine hohe GnRH-Dosis mit einer LH-Ausschüttung. Mit zunehmendem Alter nahm die Ansprechbarkeit der Hypophysenzellen dosisabhängig zu, und zwar reagierten weibliche Zellen mit einem höheren LH-Anstieg als männliche (ELSAESSER et al., 1988). Diese Ergebnisse deuten auf den Beginn des Zusammenwirkens von Hypothalamus und Adenohypophyse im fötalen Alter hin und darauf, dass die LH-Ausschüttung durch einen GnRH-Stimulus aus dem Hypothalamus beeinflusst werden kann.

Im frühen postnatalen Stadium im Alter von 4 und 8 Tagen p.p. konnte eine Erhöhung der Plasma-LH-Konzentration an chronisch katheterisierten weiblichen und männlichen Schweinen gemessen werden, die signifikant im Vergleich zu den pränatalen Stadien (Tag 80, 99 und 109 p.c.) war. Es wurde sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Ferkeln eine Erhöhung der Pulsfrequenz gefunden, bei den weiblichen zusätzlich noch eine Erhöhung der Pulsamplitude (PONZILIUS et al., 1986).

Die Ergebnisse von PONZILIUS et al. (1986) deuten darauf hin, dass die LH-Sekretion bei fötalen und neonatalen Schweinen noch nicht durch Gonadensterioide beeinflusst wird. Die Autoren gonadektomierten weibliche und männliche fötale (Tag 105 p.c.) und neonatale (Tag 4 p.p.) Schweine. Vier Tage nach der Gonadektomie wurden weder bei weiblichen noch bei männlichen Föten bzw. Ferkeln Veränderungen im LH-Sekretionsmuster (LH-Mittelwerte, LH-Pulsfrequenz und -Pulsamplitude) gefunden. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch COLENBRANDER et al. (1987). Die Gonadektomie eine Woche alter weiblicher und männlicher Ferkel hatte keinen Einfluss auf die LH-Konzentration innerhalb von zwei Tagen nach dem Eingriff. Bei männlichen Ferkeln wurden erst 42 Tage nach der Kastration erhöhte Plasma-LH-Werte gemessen, bei

weiblichen Ferkeln kam es innerhalb dieses Zeitraums zu keiner Veränderung in der Plasma-LH-Konzentration. Aus diesen Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass sich die negative Feedback-Regulation im weiblichen Geschlecht später entwickelt als im männlichen Geschlecht.

Im Gegensatz dazu ist bei der Ratte eine funktionsfähige testikuläre Regulation der LH-Sekretion schon ab Tag 19,5 p.c. (Trächtigkeitsdauer 21- 23 Tage) vorhanden (PAKARINEN et al., 1994).

In den Hypophysenzellen weiblicher postnataler Schweine (Tag 60, 160 und 250 p.p.) wurde im Vergleich zu denen männlicher Altersgenossen nicht nur eine höhere basale LH-Konzentration, sondern auch ein höherer LH-Anstieg nach Stimulation mit GnRH gemessen (ELSAESSER et al., 1988).

2.2.1.3 *Geschlechtsspezifische Regulation der LH β -Genexpression*

Die ersten LH β mRNA-Signale ließen sich beim fötalen Schwein ab Tag 50 p.c. in der Adenohypophyse mittels in situ-Hybridisierungstechnik in Gewebeschnitten nachweisen. Es wurden verschiedene Alterstadien von Tag 20 bis 105 p.c. untersucht. Die Signale verstärkten sich mit zunehmendem Fötalalter und am Tag 105 p.c. verringerten sie sich wieder (MA, 1991; MA et al., 1996). GRANZ (1994) und GRANZ et al. (1997) untersuchten in einer ontogenetischen Studie die LH β mRNA-Konzentration beim Schwein mittels Northern Blot-Hybridisierung an männlichen und weiblichen Adenohypophysen in fünf fötalen Alterstadien von Tag 50 p.c. bis 110 p.c. und postnatal am Tag 6 p.p. LH β mRNA (messenger Ribonukleinsäure) war bei weiblichen Föten ab Tag 50 p.c., bei männlichen erst ab Tag 65 p.c. nachweisbar. Die Signale nahmen mit zunehmendem Alter in beiden Geschlechtern deutlich zu. Weibliche Föten exprimierten immer mehr LH β mRNA als männliche mit einem signifikanten Unterschied am Tag 110 p.c. Auch im frühen postnatalen Stadium (Tag 6 p.p.) waren die LH β -Signale stark ausgeprägt.

Die Regulation der LH β -Genexpression ist am besten im Tiermodell Ratte untersucht. Die Regulation der adenohypophysären LH β mRNA-Expression wird einerseits durch den pulsatilen GnRH-Stimulus aus dem Hypothalamus reguliert und andererseits über die Gonadensteroid, die indirekt über GnRH oder direkt über die Adenohypophyse auf die Genexpression der Gonadotropin-Untereinheiten wirken.

Ein deutlicher sexueller Dimorphismus bei der Regulation der LH β mRNA-Expression durch gonadale Hormone wurde bei neonatalen weiblichen

und männlichen Ratten gefunden. Nach neonataler Gonadektomie erhöhte sich das LH β mRNA-Niveau bei männlichen kastrierten Ratten nach 4 Tagen, bei weiblichen jedoch erst nach 8 Tagen, ebenso reagierten die gonadektomierten weiblichen Tiere auf eine Steroidsubstitution später als die männlichen Kastraten. Daraus wurde geschlussfolgert, dass die negative Feedback-Regulation der Gonadotropin-Synthese bei männlichen Ratten früher einsetzt als bei weiblichen (PAKARINEN und HUHTANIEMI, 1989).

Nach Gonadektomie adulter Ratten beiderlei Geschlechts wurde eine geschlechtsspezifisch unterschiedlich schnelle und starke Erhöhung der α - und LH β mRNA-Konzentration beschrieben. Bei den männlichen Ratten wurde eine 4 bis 7fache und bei den weiblichen eine 6 bis 14fache Konzentrationszunahme von α und LH β mRNA im Vergleich zu intakten Tieren gemessen (PAPAVASILIOU et al., 1986; GHARIB et al., 1986). Diese Reaktion von Hypophyse/Hypothalamus auf den Wegfall des hemmenden Einflusses der Gonadensteroid erfolgte bei den männlichen Kastraten schneller als bei den weiblichen Tieren, wobei der Anstieg der α -Untereinheit bei den männlichen Kastraten zusätzlich schneller war als der der LH β mRNA (PAPAVASILIOU et al., 1986). Durch Testosteron-Substitution der männlichen kastrierten Ratten sowie Östradiolsubstitution der weiblichen Ratten ließ sich das erhöhte α - und LH β mRNA-Niveau wieder reduzieren. Damit wurde die negative Regulation der LH-Synthese durch gonadale Hormone für beide Geschlechter im adulten Alter bestätigt (ABBOT et al., 1988 und 1988a; WIERMAN et al., 1988 und 1990).

DALKIN et al. (1992) konnten keine geschlechtsspezifische Regulation der α und LH β mRNA durch Gonadensteroid über das hypothalamische GnRH finden. In beiden Geschlechtern unterdrückt Testosteron die α und LH β mRNA-Konzentration durch die Reduktion der GnRH-Sekretion. Auch Östrogene regulieren in beiden Geschlechtern die α und LH β mRNA-Konzentration primär durch eine hemmende Wirkung auf die GnRH-Sekretion.

2.2.1.4 *Geschlechtsspezifischer Pubertätseintritt*

Die sexuelle Reifung ist ein komplexer Prozess, der alle Ebenen der ZNS-Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse umfasst. Auf dieses System der Reifung wirken zusätzlich andere Faktoren, wie z.B. Fotoperiodik, Kontakt zum anderen Geschlecht, Stressfaktoren, veränderte Haltungsbedingungen und Ernährung.

Die Pubertät wird in beiden Geschlechtern der meisten Spezies durch einen Anstieg der hypophysären Gonadotropinsekretion ausgelöst. Ein weiteres endokrines Zeichen für die Pubertät ist die erhöhte Produktion von Testosteron im männlichen Geschlecht und von Östrogen im weiblichen Geschlecht. Die weibliche und männliche sexuelle Entwicklung wird durch zwei zentrale Mechanismen kontrolliert: 1/ zunächst durch eine zentralnerval bedingte Hemmung der GnRH- und Gonadotropinsekretion in der frühen postnatalen Phase, die mit dem Beginn der sexuellen Reifungsphase nachläßt, 2/ durch die Desensibilisierung des Hypothalamus-Hypophysensystems gegenüber der negativen Feedback-Wirkung der gonadalen Steroidhormone mit beginnender Pubertät. Dies ermöglicht, dass der für die Ausreifung der Keimdrüsenhormone notwendige Anstieg der Gonadotropinsekretion (besonders LH) weiterläuft, obwohl sich gleichzeitig die Sekretion der Gonadenhormone zunehmend erhöht. Eine altersabhängige Entwicklung des negativen Steroid-Feedbacks wurde für männliche und weibliche Schweine festgestellt (ELSAESSER et al., 1978a). Bei weiblichen Organismen ist die erste Ovulation das wesentliche Zeichen der Pubertät. Die dafür notwendige Entwicklung des positiven Östrogen-Feedbacks beim Schwein wurde von ELSAESSER und FOXCROFT (1978) sowie FOXCROFT et al. (1984) beschrieben. Ausführliche Übersichten zur Kontrolle dieser Mechanismen finden sich bei ELSAESSER (1982) und ELSAESSER et al. (1992).

Der Zeitpunkt des Pubertätseintritts ist geschlechtsspezifisch unterschiedlich. Beim Schaf untersuchten CLAYPOOL und FOSTER (1990) Unterschiede in der Östrogen-abhängigen Regulation der tonischen LH-Sekretion während der Geschlechtsreifung (5. bis 35. Lebenswoche). Bei gonadektomierten und danach mit Östradiol substituierten männlichen Schafen wurde eine abnehmende Reaktion der Hypothalamus-Hypophysen-Achse gegenüber der Östradiol-Inhibition mit zunehmender mittlerer LH-Konzentration und Frequenz zwischen 8. und 11. Lebenswoche festgestellt, während dies bei weiblichen Schafen erst zwischen der 26. und 29. Lebenswoche der Fall war. Bei fehlendem Östradiol nahm die LH-Pulsfrequenz in beiden Geschlechtern zu, sie war jedoch höher bei männlichen als bei weiblichen Schafen zwischen der 5. und 35. Woche.

Beim Schwein ist der sexuelle Dimorphismus des präpuberalen tonischen LH-Anstiegs nicht so deutlich ausgeprägt wie beim Schaf. Insbesondere beim männlichen Schwein wird der präpuberale LH-

Anstieg unterschiedlich diskutiert. Während ELSAESSER et al. (1978a) beim Göttinger Miniaturschwein trotz erhöhter Testosteron-Konzentration bis zur 12. Lebenswoche und ALLRICH et al. (1982) bei Kreuzungsebern (Landrasse x Duroc) in der mittleren Plasma-LH-Konzentration bis zur 36. Lebenswoche keine signifikante Veränderung in der LH-Sekretion feststellen konnten, fanden andere Autoren den erwarteten präpuberalen tonischen LH-Anstieg sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Schweinen.

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, dass der Beginn des tonischen LH-Anstiegs bei Ebern zwischen der 10. und 12. Lebenswoche mit einem Maximum zwischen der 14. und 16. Woche liegt (FLOR CRUZ und LAPWOOD, 1978; SCHINCKEL et al., 1984; TRUDEAU et al., 1992) und danach bis zum adulten Alter wieder absinkt. Bei weiblichen Schweinen setzt der Anstieg unwesentlich später, zwischen der 12. und 14. Woche mit einem Maximum zwischen der 16. und 17. Woche, ein (CAMOUS et al., 1985; DIEKMAN et al., 1983). Beim weiblichen Schwein kommt es einige Wochen später, kurz vor der ersten Ovulation (3 bis 5 Tage), noch zu einem zweiten LH-Anstieg (LUTZ et al., 1984). Auch die LH-Pulsfrequenz erhöhte sich parallel zur LH-Konzentration, die LH-Pulsamplitude sank in den letzten Tagen vor der Ovulation signifikant. Der LH-Anstieg wurde von einem Östrogen-Anstieg begleitet.

Zusammenfassend kann man für den Beginn der Geschlechtsreifung beim Schwein sagen, dass sich die Erhöhung des Plasma-LH-Spiegels in der Phase der sexuellen Reifung nicht als konstanter Anstieg zeigt, sondern als ein Gipfel mit anschließendem Abfall.

2.2.2 Sexueller Dimorphismus der somatotropen Achse

2.2.2.1 Funktion von GH im Organismus

Das Wachstum eines Organismus ist ein sehr komplexer Prozess. Neben den genetischen Kontrollmechanismen spielen endokrine Regelsysteme und die Verfügbarkeit von Nährstoffen eine entscheidende Rolle für das postnatale Wachstum. In die Regulation des Wachstums sind verschiedene Hormonsysteme wie Insulin, Wachstumshormon (GH), Schilddrüsenhormone, Catecholamine, Sexualhormone und Glukokortikoide mit spezifischen Wirkungen einbezogen. Unter diesen hat das in den somatotropen Zellen der Adenohypophyse gebildete GH eine zentrale Bedeutung. Mit seiner somatogenen Wirkung steuert

GH die Konzentration von Insulin-like growth factor-I (IGF-1) und IGF-Bindungsproteinen sowie die Konzentration der eigenen Rezeptoren. GH übt einen katabolen Einfluss auf den Fettstoffwechsel aus und eine direkte anabole Wirkung auf die Leber und das Muskel- und Skelettwachstum. Eine indirekte anabole Wirkung hat GH über die Wachstumsfaktoren vor allem durch die Stimulation der IGF-I-Synthese in der Leber (zur Übersicht: KARG, 1994). Entgegen den Ergebnissen früherer Untersuchungen (Ausschalten von GH durch Dekapitation oder Hypophysektomie), aus denen geschlossen wurde, dass GH trotz hoher Konzentrationen im fötalen Blut keine entscheidende Bedeutung für das fötale Wachstum hat (STRYKER und DZUIK, 1975; RANDALL, 1989), weisen jüngste Untersuchungen am Wachstumshormonrezeptor in der Skelettmuskulatur auf eine physiologische Bedeutung des GH für das fötale Muskelwachstum und das Wachstum der Organe hin (SCHNOEBELEN-COMBES et al., 1996; PANTALEON et al., 1997; BATCHELOR et al., 1998; PHORNPHTUKUL et al., 2000).

2.2.2.2 *Geschlechtsspezifische Regulation der GH-Sekretion*

Das pulsatile Sekretionsmuster des Wachstumshormons wird durch zahlreiche äußere (z.B. Photoperiode, Ernährung) und innere (z.B. Alter, Geschlecht) Faktoren kontrolliert. Vom komplexen neuroendokrinen Kontrollsystem des ZNS sind vor allem zwei hypothalamische Hormone, Growth hormone releasing factor (GRF) mit stimulierender Wirkung und Somatotropin releasing inhibiting factor (SRIF) mit überwiegend inhibierender Wirkung auf die GH-Sekretion, herauszuheben. Diese beiden Neurohormone werden durch mehrere Neurotransmitter und Neuropeptide reguliert und sind die Endvermittler der metabolischen, endokrinen und neuralen Einflüsse auf die GH-Sekretion. Einfluss auf die GH-Sekretion haben auch andere periphere Hormone wie Glukokortikoide, Gonadensteroid, Thyroidhormone und andere Faktoren (Glukose, Aminosäuren, freie Fettsäuren und Leptin). Weiter wird die GH-Sekretion durch lange, kurze und ultrakurze Feedbackmechanismen beeinflusst (zur Übersicht: MÜLLER et al., 1999; TUGGLE und TRENKLE, 1996; BERTHERAT et al., 1995; FROHMAN et al., 1992).

Die geschlechtsspezifische GH-Sekretion und -Regulation sind an der Ratte umfassend untersucht worden (zur Übersicht: JANSSON et al., 1985 und WEHRENBURG und GIUSTINA, 1992). Sowohl in der präpuberalen als auch in der adulten Phase charakterisieren hohe GH-Pulsamplituden und

niedrige Interpuls-GH-Konzentrationen das männliche GH-Sekretionsmuster, während weibliche Ratten niedrigere GH-Pulsamplituden, höhere GH-Pulsfrequenzen und höhere GH-Konzentrationen zwischen den Pulsen aufweisen. Ein deutlicher Unterschied in der GH-Sekretion zeigt sich erst nach der Pubertät (EDÉN, 1979), und vermutlich spielen Gonadenhormone sowohl im neonatalen Stadium als auch während der Reifungsphase und im adulten Alter eine wichtige Rolle bei der Auslösung dieser Unterschiede. Die GH-Sekretion ließ sich auch durch Veränderungen der Sekretion der Gonadensteroid beeinflussen (JANSSON et al., 1984; 1985a und 1987). Die präpuberale Kastration männlicher Ratten erhöhte die basale GH-Sekretion, hatte aber keinen Effekt auf die GH-Pulsamplitude. Diese Veränderung konnte durch eine Testosteron-Substitution umgekehrt werden (JANSSON et al., 1987). Die Behandlung adulter weiblicher Ratten mit Androgenen erhöhte die GH-Pulsamplitude (JANSSON et al., 1984 und 1987a). Daraus ist zu folgern, dass die Testosteron-Sekretion im adulten Alter wichtig für das niedrige basale GH-Niveau der männlichen Ratte ist und möglicherweise eine Rolle bei der Erhöhung der GH-Pulsamplitude spielt.

Welche prägende Funktion neonatales, testikuläres Testosteron bei der Ratte bzw. pränatales, testikuläres Testosteron bei landwirtschaftlichen Nutztieren für die GH-Sekretion im adulten Alter spielt, wird im Kap. 2.3.2.2. beschrieben.

Gonadensteroid wirken teilweise indirekt über die Modulation des GRF- und SRIF-Systems auf die Plasma-GH-Konzentration. Mit Testosteron behandelte gonadektomierte weibliche und männliche Ratten zeigten eine verstärkte GH-Freisetzung nach GRF-Stimulation, während eine Östradiolbehandlung keine entsprechende Wirkung hatte. Erwachsene männliche Ratten zeigten eine stärkere GH-Freisetzung nach GRF-Stimulation als weibliche Ratten, bei präpuberalen Ratten fand sich dieser Geschlechtsunterschied auf den Stimulus jedoch nicht (WEHRENBURG et al., 1985).

SRIF und GRF haben eine geschlechtsspezifische Wirkung auf die Modulation der GH-Sekretion bei adulten Ratten. Während SRIF unterdrückend auf die basale GH-Sekretion in beiden Geschlechtern und nur bei weiblichen Tieren auch auf die GH-Pulsamplitude wirkte, wurde für GRF eine stimulierende Wirkung auf die GH-Pulsamplitude beider Geschlechter, jedoch nicht auf die basale GH-Sekretion bei männlichen Ratten festgestellt (PAINSON und TANNENBAUM, 1991).

Im weiteren wird das geschlechtsspezifische GH-Sekretionsmuster und seine Regulation beim Schwein und bei anderen Nutztierarten beschrieben. Eine sehr

hohe Plasma-GH-Konzentration während der fötalen Entwicklung ist nicht nur für das Schwein (BAUER und PARVIZI, 1996), sondern auch für andere Tierarten wie z.B. Rind (REYNOLDS et al., 1990) bekannt. Die GH-Spiegel im Blutplasma des Fötus waren im Vergleich zum Neugeborenen, zum adulten Tier oder zum Muttertier bis zu 10 bis 20 mal erhöht. GH ist beim Schwein schon ab Tag 40 p.c. im fötalen Plasma messbar, seine Konzentration erhöhte sich bis zum Tag 80 p.c. (KLINDT und STONE, 1984). Eine pulsatile GH-Sekretion ist nicht nur in der postnatalen Phase beschrieben worden, sie konnte auch für das fötale Stadium nachgewiesen werden. BAUER und PARVIZI (1996) fanden bei chronisch katheterisierten Schweineföten im Alter von Tag 94 bis 98 p.c. einen Geschlechtsunterschied. Männlichen Föten zeigten höhere GH- und IGF-I-Konzentrationen als weibliche Föten und sie hatten auch eine signifikant höhere GH-Pulsamplitude. Kurz vor der Geburt sanken die Plasma-GH-Werte in beiden Geschlechtern (BAUER und PARVIZI, 1996). Bezüglich der Regulationsmechanismen der GH-Sekretion muss pränatal von einem noch unreifen inhibitorischen System ausgegangen werden, wohingegen das stimulatorische System bereits ab Tag 80 p.c. funktionsfähig ist (TORRONTERAS et al., 1997).

KLINDT (1986) berichtete von einem weiteren Absinken der Plasma-GH-Werte in den ersten Tagen nach der Geburt. Einem steilen Abfall von der Geburt bis zur 2. Lebenswoche folgte eine deutliche Erhöhung der Plasma-GH-Konzentration zwischen der 3. und 5. Lebenswoche, dabei wiesen männliche Schweine ein höheres GH-Niveau auf als weibliche (BUONOMO und KLINDT, 1993). In der präpuberalen Phase (50 kg) wurden bei intakten männlichen Schweinen einerseits deutlich höhere GH-Pulsamplituden und mittlere Plasma-GH-Spiegel gefunden als bei weiblichen Schweinen (ARBONA et al., 1988), dagegen fanden OWENS et al. (1991) und LOUVEAU et al., (1991) keinen Geschlechtsunterschied in der Plasma-GH-Konzentration bei wachsenden Schweinen (35 kg bzw. 10 Wochen alt). Die Plasma-GH-Spiegel in der präpuberalen Phase zwischen der 7. und 23. Lebenswoche waren nicht signifikant unterschiedlich zwischen weiblichen Schweinen und Kastraten. In beiden Geschlechtern sanken die GH-Werte mit zunehmendem Alter (DUBREUIL et al., 1987). Die durch GRF-Stimulation induzierte GH-Freisetzung nahm ebenfalls mit zunehmendem Alter ab, was für eine veränderte Sensitivität der somatotropen Zellen gegenüber GRF und/oder SRIF spricht. Intakte weibliche Schweine hatten tendenziell eine stärkere GH-Ausschüttung nach einer GRF-Stimulation als

männliche Kastraten. Bei 20 Wochen alten Schweinen fanden DUBREUIL et al. (1988) höhere GH-Werte bei weiblichen Schweinen im Vergleich zu Kastraten. Möglicherweise wird in diesem Altersabschnitt die Ansprechbarkeit der somatotropen Zellen gegenüber GRF beeinflusst, vielleicht durch schon vorhandene Gonadenhormone. Weiter konnte bei männlichen Kastraten in der 9., 15. und 21. Lebenswoche eine niedrigere mittlere Plasma-GH-Konzentration als bei intakten männlichen Schweinen gemessen werden (DUBREUIL et al., 1989). Eine Testosteron-Substitution hatte auf die mittlere Plasma-GH-Konzentration keinen Einfluss, sie erhöhte aber die GH-Pulsamplitude der TP-behandelten Schweine. Die GRF-Stimulation führte zu allen gemessenen Zeitpunkten bei den intakten Tieren im Vergleich zu den Kastraten zu einer höheren GH-Ausschüttung; exogenes Testosteron hatte keine zusätzliche Wirkung.

Bei anderen landwirtschaftlichen Nutztieren sind neben einem altersabhängigen Absinken der GH-Sekretion ebenfalls Geschlechtsunterschiede vorhanden. Beim Schaf wurde der Geschlechtsunterschied in den Plasma-GH-Spiegeln schon in der präpuberalen Phase gemessen. Böcke hatten höhere Plasma-GH-Werte im Blut als weibliche Schafe (GATFORD et al., 1996 und 1997). Intakte männliche Rinder hatten in einen Zeitraum zwischen dem 5. und 15. Lebensmonat höhere GH-Sekretionswerte als Färsen (PLOUZEK und TRENKLE, 1991). Ebenso wiesen beim ausgewachsenen Pferd Hengste die höchsten GH-Werte auf (THOMPSON et al., 1994). Bei allen drei beschriebenen Tierarten hatte die Kastration männlicher Tiere einen verringerten Effekt auf deren GH-Sekretion. Ihre GH-Werte lagen generell zwischen denen der intakten männlichen und weiblichen Tiere (GATFORD et al., 1996; PLOUZEK und TRENKLE, 1991; THOMPSON et al., 1994). Die Ovariectomie weiblicher Rinder hatte jedoch kein Effekt auf die Plasma-GH-Konzentration (PLOUZEK und TRENKLE, 1991).

In einigen der oben genannten Untersuchungen wurden neben der GH-Sekretion auch andere Wachstumsfaktoren, die an der Regulation des Wachstums beteiligt sind, gemessen. Beim Schwein (BUONOMO und KLINDT, 1993) wurde nach der Geburt eine hohe IGF-I-Konzentration ohne Geschlechtsunterschied festgestellt. Ab der 12. Lebenswoche (LAMBERSON et al., 1995; OWENS et al., 1999) zeigten sich deutlich höhere IGF-I-Konzentrationen bei Ebern im Vergleich zu weiblichen Schweinen, die wiederum die gleiche Konzentration wie Börgen hatten (OWENS et al., 1999). Das Wachstum war mit der IGF-I-Konzentration positiv korreliert. Bei der adulten Ratte

wurde eine stimulierende Wirkung der Androgene und eine unterdrückende Wirkung der Östrogene auf die IGF-I-Konzentration festgestellt (BORSKI et al., 1996).

2.2.2.3 *Geschlechtsspezifische Regulation der GH-Genexpression*

Bisherige Untersuchungen zeigen, dass die GH-Genexpression mit dem Alter und zwischen den Geschlechtern variiert (JANSSON et al., 1985; HU et al., 1993; MA et al., 1996; GRANZ et al., 1997; GATFORD et al., 1997; GONZÁLEZ-PARRA et al., 1998).

Bei Schweineföten zeigten Messungen der GH-Genexpression in Gehirnschnitten mittels in situ-Hybridisierung eine Aktivierung der GH-Synthese in der Adenohypophyse vor dem Tag 50 p.c. an (MA, 1991; MA et al., 1996). In einer ontogenetischen Studie der GH-Genexpression mit Northern Blot-Hybridisierung in weiblichen und männlichen Adenohypophysen konnten GRANZ (1994) und GRANZ et al. (1997) während der gesamten Fötalentwicklung Geschlechtsunterschiede mit höheren Werten beim männlichen Geschlecht nachweisen. Mit fortschreitender Fötalentwicklung nahm das GH mRNA-Niveau kontinuierlich zu und erreichte vor der Geburt sein Maximum. Eine signifikante Erhöhung des GH mRNA-Levels wurde zwischen Tag 95 und 112 p.c. gemessen. Bei 6 Tage alten Ferkeln wurden in beiden Geschlechtern etwas niedrigere GH mRNA-Werte gemessen als im fötalen Stadium.

Parallel zur Senkung der GH-Konzentration im Blut von der Geburt bis zum Alter von 4 Wochen wurde ein Absinken der GH mRNA-Konzentration von MATTERI und CARROLL (1997) beschrieben. Sie stellten jedoch keine Geschlechtsunterschiede fest.

Für ältere Altersstadien sind keine Untersuchungen zum Geschlechtsunterschied der GH-Genexpression beim Schwein bekannt. Bei adulten Ratten wurde in männlichen Hypophysen ein höherer Anteil an GH-produzierenden Zellen (somatotropen Zellen) gefunden als in weiblichen Hypophysen (IBRAHIM et al., 1986). Das GH mRNA-Niveau ist bei männlichen Ratten ca. 2 bis 6 mal höher als bei weiblichen Ratten (NOGAMI et al., 1989). GONZÁLEZ-PARRA et al. (1998 und 2000) konnten mittels in situ-Hybridisierung neben einem höheren GH mRNA-Niveau eine größere Zahl von GH-Zellen in adulten männlichen Ratten im Vergleich zu weiblichen Ratten nachweisen. Bei adulten weiblichen Ratten zeigte sich auch eine vom Zyklusstadium abhängige Genexpression: weibliche Ratten exprimierten im Metöstrus, Diöstrus und

Östrus weniger GH mRNA als männliche intakte Ratten, im Proöstrus wurde jedoch ein „männliches“ GH mRNA-Niveau erreicht (CHILDS et al., 2000).

Gonadensteroiden beeinflussen sowohl die Anzahl an somatotropen Zellen als auch deren GH-Genexpression geschlechtsspezifisch. Bei weiblichen Ratten erhöhte sich einen Monat nach Ovariectomie der Anteil an GH produzierenden Zellen, drei oder sechs Monate nach dem Eingriff hatte sich deren Zahl jedoch wieder auf das Niveau der Kontrolltiere verringert. Bei männlichen Ratten war keine Zellvermehrung zu verzeichnen, sondern der Anteil an GH-Zellen fiel drei bis sechs Monate nach Kastration unter das Niveau der männlichen Kontrollratten (IBRAHIM et al., 1986). GONZÁLEZ-PARRA et al. (1998) konnten bei männlichen Ratten nach Kastration im adulten Alter zwar keinen Effekt auf die Anzahl der somatotropen Zellen zeigen, aber das GH mRNA-Niveau, gemessen zwei Wochen nach dem Eingriff, verringert sich. Eine im adulten Alter durchgeführte Testosteron-Substitution neonatal kastrierter Ratten führte zu einer geringfügigen Erhöhung der Anzahl somatotroper Zellen und des GH mRNA-Niveaus. Bei weiblichen intakten Ratten veränderte die Testosteron-Behandlung im adulten Alter zwar nicht die Anzahl der GH-Zellen, erhöhte jedoch ebenfalls das GH mRNA-Niveau (GONZÁLEZ-PARRA et al., 2000).

Daraus wird geschlossen, dass das adulte gonadale Testosteron eine wichtige Rolle bei der Adenohypophysären Hormonsynthese spielt.

Ob die Gonadensteroiden ihre Wirkung direkt auf die somatotropen Zellen ausüben oder indirekt über hypothalamische Neurone, ist noch nicht eindeutig geklärt. Östrogen unterdrückt das GRF-Rezeptor mRNA-Niveau in der Hypophyse (LAM et al., 1996), was sich dann möglicherweise inhibierend auf die GH-Genexpression auswirkt. Auf hypothalamischer Ebene resultiert die neonatale und adulte Testosteron-Behandlung weiblicher Ratten in einem Anstieg von GRF mRNA auf männliches Niveau (ZEITLER et al., 1990; CHOWEN et al., 1993).

GATFORD et al. (1997) führten Untersuchungen zum sexuellen Dimorphismus an präpuberalen Schafen durch. Sie untersuchten den GH- und GH mRNA-Gehalt in der Hypophyse und die Plasma-GH-Konzentration. Im Alter von 110 Tagen unterschieden sich weibliche und männliche Schafe im GH mRNA-Gehalt nicht, jedoch war der Plasma-GH-Spiegel bei männlichen Schafen höher. Später, im Alter von 200 Tagen hatten männliche Schafe zwar höhere GH mRNA-Werte als weibliche, dies wirkte sich jedoch nicht in einem ebenfalls höheren Plasma-GH-Spiegel aus. In der gleichen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass männliche Schafe mehr GRF und SRIF

in der Eminentia Mediana aufwiesen, während es im hypophysären Portalsystem – im Vergleich zu weiblichen Tieren - keinen Unterschied in der SRIF-Konzentration gab. Daraus wurde geschlossen, dass die Unterschiede auf hypothalamischer Ebene (GRF, SRIF) möglicherweise verantwortlich sind für die unterschiedlichen GH-Sekretionsmuster. Weiter wurde auf Grund der fehlenden Geschlechtsunterschiede der SRIF-Konzentration im Blut des hypophysären Portalsystems vermutet, dass die Unterschiede in dem Plasma-GH-Spiegel möglicherweise entweder durch eine unterschiedliche Synthese von GRF im Hypothalamus und/oder durch eine unterschiedliche hypophysäre Sensibilität gegenüber GRF und SRIF bedingt sind.

2.2.2.4 Geschlechtsspezifisches Wachstum

Das postnatale Körpergewicht und die Körperzusammensetzung ist bei vielen Spezies zwischen den Geschlechtern unterschiedlich. Adulte männliche Organismen sind generell schwerer und haben weniger Fettgewebe als adulte weibliche Organismen. Eine Gonadektomie beeinflusst die Gewichtsentwicklung ebenfalls. Die Ontogenese dieser Unterschiede ist speziesspezifisch, und bei vielen Spezies kommt es zu den genannten Geschlechtsunterschieden erst in der Pubertät (zur Übersicht: GATFORD et al., 1998).

WALSTRA (1980) untersuchte das Körpergewicht männlicher und weiblicher intakter Schweine sowie männlicher Kastraten von der Geburt bis zum erwachsenen Stadium. Geschlechtsunterschiede zeigten sich bei ad libitum-Fütterungsregime erst nach der Pubertät. Eber hatten generell die höchsten Körpergewichte. Die Kastration bewirkte eine verringerte Zunahme des Körpergewichts, und zwar blieben Kastraten leichter als Eber, aber schwerer als Sauen. WHITE et al. (1995) ermittelten erst am 170. Tag höhere Schlachtkörpergewichte bei männlichen kastrierten Schweinen im Vergleich zu weiblichen Schweinen. Zwischen der 15. und 24. Lebenswoche wuchsen Eber schneller als weibliche Schweine und Börgen, während diese innerhalb der untersuchten Periode ein ähnliches Gewicht erreichten (OWENS et al., 1999). PRUNIER und LOUVEAU (1997) fanden keine Unterschiede für die Parameter Wachstumskurve, Körpergewicht und tägliche Zunahme zwischen weiblichen intakten und ovariectomierten Schweinen vom 70. bis 230. Lebenstag.

Beim Schaf liegen ähnliche Untersuchungen zum Wachstumsverlauf vor. Zum Zeitpunkt des Absetzens (ca. 70 Tage) waren alle drei Gruppen - weibliche und männliche intakte Schafe sowie Hammel – noch

gleich schwer. Bis zum Alter von 180 Tagen veränderte sich die Wachstumsrate, und zwar wuchsen Böcke schneller als Hammel und weibliche Schafe. Böcke hatten die größten Endgewichte, Hammel wurden schwerer als weibliche Schafe mit den niedrigsten Körpergewichten (GATFORD et al., 1996). Beim Rind fanden PLOUZEK und TRENKLE (1991), dass zwischen dem 10. und 12. Monat die tägliche Zunahme bei Färsen im Vergleich zu Bullen und Ochsen am niedrigsten war. Diese Unterschiede verstärkten sich noch in der Periode bis zum 15. Lebensmonat (nach der Pubertät).

Aus diesen Beispielen geht hervor, dass sowohl beim Schwein als auch bei Schaf und Rind deutliche Geschlechtsunterschiede in der Entwicklung des Körpergewichts erst mit der Pubertät auftreten. Offensichtlich spielen Androgene dabei eine entscheidende Rolle.

2.3 Mechanismen der sexuellen Differenzierung neuroendokriner Funktionen

2.3.1 Sexuelle Differenzierung der gonadotropen Achse

2.3.1.1 Wirkung fötaler testikulärer Androgene auf das positive Östrogen-Feedback

Dass testikuläre Androgene bei der sexuellen Differenzierung neuroendokriner Funktionen in der „kritischen Phase“ des fötalen (z. B. bei landwirtschaftlichen Nutztieren) oder neonatalen (z. B. Ratte, Maus) Lebens mitwirken, wurde an unterschiedlichen Spezies untersucht. In welchem Zeitraum testikuläres Testosteron auf die Geschlechtsentwicklung wirkt, differiert bei unterschiedlichen Spezies und ist möglicherweise von verschiedenen hormonellen und physiologischen Faktoren sowie Umwelteinflüssen abhängig.

Bei erwachsenen weiblichen Säugetieren induziert ein Östradiolanstieg den zyklischen LH-Anstieg, den sogenannten präovulatorischen LH-Gipfel. Die Folge des zyklischen LH-Anstiegs ist die Veränderung des präovulatorischen Follikels mit dem Resultat einer Ovulation und Formierung des Gelbkörpers (zur Übersicht: DÖCKE, 1994).

Den präovulatorischen LH-Anstieg kann man bei weiblichen Tieren mit exogenem Östrogen auslösen. Bei männlichen Tieren ist das hormonelle Regulationssystem für die Auslösung des LH-Peaks weder vorhanden noch induzierbar. Die Unfähigkeit der männlichen Tiere zur Auslösung eines dem präovulatorischen LH-Gipfel vergleichbaren LH-

Anstiegs als Antwort auf einen Östrogen-Stimulus ist auf die Wirkung testikulärer Androgene auf das ZNS in der „kritischen Phase“ der Differenzierung zurückzuführen (MACLUSKY und NAFTOLIN, 1981, GORSKI, 1985). Die im folgenden beschriebenen Untersuchungen unterstützen die Hypothese, dass bei männlichen Tieren die zyklische LH-Sekretion durch die Wirkung der testikulären Androgene in der „kritischen Phase“ der neuroendokrinen Differenzierung permanent unwirksam gehalten wird (prägende Wirkung).

Die Geschlechtsdifferenzierung des Verhaltens und der Gonadotropinfreisetzung bei Säugetieren mit kurzer Trächtigkeit (z. B. Ratte) ist durch die perinatale Wirkung testikulären Testosterons bedingt. Bei weiblichen Ratten hat eine pränatale Testosteron-Behandlung keinen Einfluss auf die postnatale zyklische LH-Aktivität (RHEES et al., 1997). Eine einmalige neonatale TP-Behandlung bis zum Tag 9 p.p. zeigte jedoch, dass bei den derart behandelten weiblichen Ratten der präovulatorische LH-Gipfel nicht mehr induzierbar war (DIAZ et al., 1995). Untersuchungen zur zyklischen LH-Sekretion an Beuteltieren (Tamar wallabies) zeigten, dass bei dieser Tierart die sexuelle Differenzierung der Potenz zur zyklischen LH-Sekretion über die testikuläre Aktivität im präpuberalen Stadium (zwischen dem 26. Lebenstag und 14. Monat) vermittelt wird (RUDD et al., 1999).

Die Differenzierung der Gonadotropinsekretion bei den Säugetieren mit einer längeren Trächtigkeit ist von pränatalen Androgenen abhängig. Beim Meerschweinchen führte eine pränatale TP-Behandlung zwischen Tag 30 und 55 p.c. (Trächtigkeitsdauer 66 bis 73 Tage) bei TP-behandelten weiblichen Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren im adulten Alter zu einem niedrigeren LH-Anstieg nach Ovariectomie. Zwischen männlichen Kontrolltieren und männlichen TP-behandelten Tieren wurden keine Unterschiede gefunden. Nach Östradiolbenzoat-Stimulation reagierten weibliche Kontrolltiere mit einem LH-Anstieg, während dieser bei den pränatal maskulinisierten weiblichen Tieren ausblieb (CONNOLLY und RESKO, 1994).

PUTNEY et al. (1984) berichteten von einer Unterdrückung des positiven Östrogen-Feedbacks bei pränatal androgenisierten Färsen. HAMERNIK et al. (1987) konnten in einem ähnlichen Versuch bei pränatal maskulinisierten Färsen präpuberal hingegen keinen inhibitorischen Effekt auf die Induzierbarkeit des präovulatorischen LH-Gipfels auslösen, möglicherweise war ein falsch gewählter Behandlungszeitraum (Tag 40 und 60 p.c.) und eine zu niedrigere TP-Dosierung der Grund dafür.

Die Wirkung pränataler testikulärer Androgene

auf die Auslösbarkeit des präovulatorischen LH-Gipfels ist beim Schaf vielfach untersucht worden. Über erste Befunde der sexuellen Differenzierung der LH-Sekretion beim Schaf berichteten KARSCH und FOSTER (1975). Erste Maskulinisierungsversuche am Schaf wurden von CLARKE et al. (1976) durchgeführt. Pränatal androgenisierte weibliche und männliche Schafe wiesen in den ersten sieben Monaten des postnatalen Lebens im Vergleich zu weiblichen und männlichen Kontrolltieren niedrigere Plasma-LH-Werte auf (WILSON und TARTELLINI, 1978). Die inhibierende Wirkung pränataler Androgene auf die Induzierbarkeit des präovulatorischen LH-Anstiegs beim Schaf untersuchten unter anderem CLARKE und SCARAMUZZI (1978). Nach einer einmaligen Östradiolbenzoat-Injektion wurden bei maskulinisierten weiblichen Schafen signifikant niedrigere LH-Gipfel gemessen als bei weiblichen Kontrollschafen. Eine Defeminisierung des adulten weiblichen LH-Sekretionsmusters konnten auch FABRE-NYS und VENIER (1991) und WOOD et al. (1995) bei pränatal TP-behandelten Schafen erzielen. Durch die pränatale Behandlung mit dem Testosteron-Metaboliten DHT wurde der präovulatorische LH-Anstieg hingegen nicht beeinflusst (MASEK et al., 1999). Anhand dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass die Aromatisierung von Testosteron zu Östrogen zur Defeminisierung des präovulatorischen LH-Gipfels führt, so wie bei der Ratte ebenfalls dargestellt (MACLUSKY und NAFTOLIN, 1981).

Auch beim weiblichen Schwein ist in der präpuberalen Phase – im Gegensatz zum Eber – der präovulatorische LH-Gipfel mit einer einmaligen Östradiolbenzoat-Injektion induzierbar. Weibliche Schweine, die pränatal zwischen Tag 30 und 70 p.c. mit TP behandelt worden waren, zeigten nach Östradiolbenzoat-Stimulation signifikant reduzierte LH-Gipfel im Vergleich zu weiblichen Kontrolltieren. Eine spätere Testosteron-Behandlung (Tag 90 oder 106 p.c.) hatte keinen Effekt mehr auf die Induzierbarkeit des positiven Feedback durch Östradiolbenzoat (ELSAESSER und PARVIZI, 1979).

2.3.1.2 Wirkung fötaler testikulärer Androgene auf die tonische LH-Sekretion

Männliche Schafe erreichen die sexuelle Reife früher als weibliche. Ein Zeichen dafür ist der frühere Anstieg der tonischen LH-Sekretion beim männlichen Schaf in der präpuberalen Phase. Dieser beginnt bei männlichen Schafen zwischen der 8. und 10. Lebenswoche und bei den weiblichen zwischen der 26. und 29. Lebenswoche (CLAYPOOL und

FOSTER, 1990). Die Hypothese, dass pränatale Androgene den tonischen LH-Anstieg bei männlichen Organismen vorverlegen, wurde in einer Untersuchung an pränatal maskulinisierten Schafföten (Testosteron-Behandlung von Tag 30 - 90 p.c.) im Vergleich zu nicht behandelten weiblichen und männlichen Schafen getestet (WOOD et al., 1991 und 1995; KOSUT et al., 1997). Der tonische LH-Sekretionsanstieg erfolgte bei männlichen Kontrolltieren in der 7. bzw. 10. und bei weiblichen erst in der 27. Lebenswoche. Bei maskulinisierten weiblichen Schafen wurde eine Vorverlegung des LH-Anstiegs in die 10. bzw. 14. Lebenswoche und bei männlichen TP-behandelten Tieren sogar in die 5. Lebenswoche beobachtet. Auch die Pulsfrequenz der tonischen LH-Sekretion erhöhte sich bei den maskulinisierten weiblichen Tieren in der 20. Lebenswoche und war damit ähnlich wie bei den männlichen Kontrolltieren. Bei den unbehandelten weiblichen Tieren wurde eine erhöhte tonische LH-Pulsfrequenz erst in der 32. Lebenswoche gemessen. Eine Vorverlegung des präovulatorischen LH-Anstiegs wurde auch durch eine pränatale Behandlung mit DHT erzielt (MASEK et al., 1999).

Vergleichbare Untersuchungen zum präpuberalen tonischen LH-Anstieg sind für das Schwein oder andere Tierarten nicht bekannt.

Daraus wurde geschlossen, dass nicht aromatisierte fötale Androgene testikulären Ursprungs das Gonadotropin-Sekretionsmuster maskulinisieren und somit die reproduktive neuroendokrine Reifung nach der Geburt durch Androgene im fötalen Alter programmiert wird.

2.3.1.3 Wirkung fötaler testikulärer Androgene auf die GnRH-Sekretion

Ob der im Kapitel 2.3.1.1. beschriebene sexuelle Dimorphismus zur Auslösung des zyklischen LH-Gipfels auch auf einen Geschlechtsunterschied im GnRH-Sekretionsmuster zurückzuführen ist und ob pränatale Androgene einen prägenden Einfluss auf das GnRH-Sekretionsmuster haben, untersuchten HERBOSA et al. (1996). Bei weiblichen Schafen wurde nach Östradiolstimulation ein eindeutiger GnRH-Anstieg gemessen, gefolgt von einem LH-Gipfel. Bei männlichen und pränatal maskulinisierten weiblichen Schafen fehlten GnRH- und LH-Gipfel. Aus diesen Ergebnissen wurde abgeleitet, dass die hypothalamischen Mechanismen, die den LH-Gipfel durch GnRH stimulieren, bei männlichen Tieren nicht funktionell sind und dass diese Mechanismen pränatal durch Testosteron organisiert werden. Zur Klärung dieser Vermutung wurde in einer anderen Arbeit der Einfluss pränataler Androgene auf die GnRH-

Produktion aus den Neuronen zum Zeitpunkt der Östradiolstimulation untersucht (WOOD et al., 1996). Im Gehirn adulter Schafe wurden keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in Anzahl und Lokalisation der GnRH-Neurone gefunden. Die Aktivierbarkeit der GnRH-Neurone wurde mittels c-Fos-Genexpression (c-Fos als Marker für die Aktivität der GnRH-Neurone) überprüft. Nach östradiolinduziertem LH-Peak wurde c-Fos in Zweidrittel der GnRH-Neurone der weiblichen Kontrolltiere exprimiert, während bei männlichen und maskulinisierten weiblichen Tieren c-Fos nur in einer sehr geringen Anzahl der GnRH-Neurone (1,7 %) exprimiert wurde. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die geschlechtsunterschiedliche Aktivierung der GnRH-Neurone als Antwort auf Östradiolstimulation pränatal durch Testosteron determiniert wird.

Auch beim Schwein ist die Unfähigkeit zum Östradiol-induzierten LH-Gipfel der männlichen Tiere auf eine sexuelle Differenzierung der Gehirnzentren durch pränatale testikuläre Androgene zurückzuführen (ELSAESSER und PARVIZI, 1979). Um die endokrinen Regulatoren des positiven Feedbacks auf der hypothalamisch-hypophysären Ebene besser zu verstehen, wurden Untersuchungen an adulten weiblichen und männlichen gonadektomierten Schweinen durchgeführt (STICKAN et al., 1999). In den genannten Gruppen konnte durch Östradiolbenzoat-Stimulation kein LH-Gipfel ausgelöst werden. Diese Unfähigkeit ist bei den gonadektomierten weiblichen Tieren vermutlich die Folge fehlender Östrogen-Sekretion aus den Ovarien und damit einer fehlenden Reifung des positiven Östrogen-Feedback-Mechanismus. Bei den männlichen Kastraten ist diese Unfähigkeit auf die Maskulinisierung der Kontrollzentren des ZNS durch pränatale testikuläre Androgene und nicht auf einen Mangel an postnatalem Östrogen zurückzuführen. Durch eine Metallibur-Behandlung, die die endogene GnRH-Ausschüttung inhibierte, blieb der Plasma-LH-Gipfel nach Östradiolbenzoat-Stimulation ebenfalls unterdrückt. Eine zusätzliche Behandlung mit einem GnRH-Agonisten, die die native GnRH-Sekretion simulierte, führte sowohl bei weiblichen als auch bei männlichen gonadektomierten Schweinen zu einem Östradiolbenzoat-stimulierten LH-Gipfel. Bei keinem der männlichen Kastraten, die anstelle von Östradiolbenzoat mit Sesamöl behandelt worden waren, wurde während der Behandlung mit Metallibur und GnRH-Agonist ein LH-Anstieg gemessen. Daraus wurde abgeleitet, dass das fehlende positive Östrogen-Feedback nicht das Resultat eines zu geringen LH-Pools in den Hypophysen der untersuchten Tiere war, da ja die mit GnRH-Agonist behandelten Schweine (sowohl weibliche als auch

männliche gonadektomierte Tiere) nach Östradiolbenzoat-Stimulation mit einem LH-Gipfel reagierten, sondern dass bei den männlichen Schweinen die Fähigkeit zur Freisetzung von GnRH aus dem Hypothalamus fehlte. Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse, dass die Unfähigkeit zur Induktion eines LH-Gipfels nach Östrogen-Stimulation beim männlich Schwein dadurch verursacht wird, dass Östrogen nicht in der Lage ist, eine GnRH-Freisetzung aus dem Hypothalamus zu aktivieren. Diese Nichtansprechbarkeit des männlichen Hypothalamus gegenüber Östrogen wird möglicherweise durch pränatale testikuläre Androgene vermittelt.

2.3.1.4 Mechanismen organisatorischer Androgen-effekte auf die gonadotrope Achse

Zeitpunkt und Dauer der Exposition gegenüber Androgenen

Wird ein weiblicher Organismus zu unterschiedlichen Zeitpunkten seiner Entwicklung Androgenen ausgesetzt, führt dies zu einem unterschiedlichen Typ und Grad der Maskulinisierung. Beim weiblichen Schaf wirkt eine Testosteron-Behandlung über längere Zeit (von Tag 30 bis 86 p.c.) wie auch eine TP-Behandlung in der frühen Phase (von Tag 30 bis 50 p.c.) auf die phänotypische Ausprägung der äußeren Geschlechtsorgane (Ausbildung von Penis und leerem Scrotum), eine spätere Behandlung (von Tag 65 - 86 p.c.) lässt die Entwicklung der äußeren Genitalien unbeeinflusst (WOOD et al., 1995). Im Fall sowohl der frühen als auch der späten Testosteron-Behandlung konnte der präpuberale Anstieg der tonischen LH-Sekretion bei den TP-behandelten weiblichen Tieren vorverlegt werden, die Fähigkeit zum präovulatorischen LH-Peak nach Östradiolbenzoat-Behandlung blieb jedoch erhalten. Die über die längere Periode behandelten weiblichen Tiere zeigten ein ähnliches Muster des tonischen LH-Anstiegs wie die männlichen Kontrolltiere, zusätzlich konnte bei diesen Tieren auch der präovulatorische LH-Gipfel unterdrückt werden.

Aus Untersuchungen an intrauterin behandelten Schweineföten geht hervor, dass Testosteron nur in der frühen Differenzierungsphase eine phänotypische Maskulinisierung genetisch weiblicher Tiere bewirkt. Durch eine Behandlung am Tag 30 p.c. wurde eine komplette Maskulinisierung der externen Genitalien erreicht, während eine spätere Behandlung am Tag 40 p.c. nur noch eine partielle Maskulinisierung mit einer Vergrößerung der Klitoris bewirkte (ELSAESSER et al., 1978; FORD und CHRISTENSON, 1987). Der

Einfluss des Zeitpunktes der Behandlung mit Testosteron auf das positive Östrogen-Feedback zeigte sich bei weiblichen Schweinen, die zwischen Tag 30 und 70 p.c. behandelt worden waren. Bei diesen Tieren ließ sich durch Östradiolbenzoat-Stimulation der präovulatorische LH-Anstieg nicht auslösen. Eine spätere Behandlung mit TP zwischen Tag 90 oder 106 p.c. hatte hingegen keine derartige Wirkung (ELSAESSER et al., 1978).

Bei der Ratte hatte eine pränatale Testosteron-Behandlung (von Tag 16 bis 22 p.c.) schon Auswirkungen auf die phänotypischen Merkmale und das Verhalten (RHEES et al., 1997), jedoch nur die frühe postnatale Testosteron-Behandlung von Tag 3 bis 9 p.p. hatte einen Effekt auf das LH-Sekretionsmuster (DIAZ et al., 1995).

Einfluss der Testosterondosis

Eine systematische Studie zur Dosisabhängigkeit der Wirkung von pränatal appliziertem Testosteron wurde am Schaf durchgeführt (KOSUT et al., 1997). Mit drei verschiedenen Testosteron-Dosierungen (hoch: 200 mg/Behandlung, mittel: 82 mg/Behandlung und niedrig: 32 mg/Behandlung) wurden tragende Schafe von Tag 30 bis 90 p.c. behandelt. Nach der Geburt zeigte sich, dass die hohe Dosierung eine komplette (Penis und leeres Scrotum), die mittlere eine partielle (penisähnliche Gewebsausbildung mit uretralem Ausgang zwischen den leeren Scroti) und die niedrige Dosierung eine minimale (leicht veränderte Vulva) phänotypische Maskulinisierung der äußeren Genitalien verursachte. Die Regulationsmechanismen des präovulatorischen LH-Gipfels reagierten sensibler auf die unterschiedlichen Testosteron-Dosierungen als die der tonischen LH-Sekretion. Der Anstieg der tonischen LH-Sekretion begann bei weiblichen maskulinisierten Tieren nach der höchsten TP-Dosis in der 10. Lebenswoche, ähnlich wie bei männlichen Kontrolltieren. Die mittlere Dosierung verschob den tonischen LH-Anstieg um einige Wochen nach vorn (16. Woche). Die niedrige Dosierung hatte kaum Einfluss auf den tonischen LH-Anstieg, der erst in der 25. Woche einsetzte, bei weiblichen Kontrolltieren in der 27. Woche. Bei den weiblichen Tieren, die pränatal mit hoher und mittlerer Testosteronmenge behandelt wurden, konnte nach Östradiolbenzoat-Behandlung kein präovulatorischer LH-Anstieg ausgelöst werden und bei der Gruppe mit niedriger Dosierung ließ sich der LH-Anstieg nur bei zwei von sechs Tieren auslösen.

FORD und CHRISTENSON (1987) berichteten, dass erst eine hohe Testosteron-Dosierung signifikante Veränderung des Genitaltraktes bei

Schweineföten bewirkte. Am Tag 36 p.c. wurden Schweineföten, die via Muttersau zwischen Tag 29 und 35 p.c. viermal mit TP in unterschiedlichen Dosierungen (5, 10 oder 20 mg TP/kg Körpergewicht) behandelt worden waren, per Laparotomie entnommen und die weiblichen Föten auf Veränderungen der äußeren Genitalien untersucht. Erst eine Dosierung von 20 mg TP/kg KG war ausreichend für eine signifikante Migration des genitalen Tuberkels.

Androgenmetaboliten

Testikuläres Testosteron wird im ZNS durch das Enzym Aromatase zu Östradiol aromatisiert oder durch 5 α -Reduktase zu 5 α -Dihydrotestosteron (DHT) reduziert. Aus Untersuchungen an der Ratte geht hervor, dass für die Defeminisierung des präovulatorischen LH-Peak-Mechanismus die Aromatisierung von Testosteron notwendig ist. Die Behandlung von Ratten mit Östrogen in der „kritischen Phase“ der sexuellen Differenzierung resultierte in einer anovulatorischen Sterilität bei adulten weiblichen Tieren, ähnlich wie nach der Behandlung mit Testosteron (MACLUSKY und NAFTOLIN, 1981).

Wie wichtig die Aromatisierung von Testosteron für die tonische und die zyklische Form der LH-Sekretion ist, wurde am Schaf untersucht (MASEK et al., 1999). Tragende Schafe wurden mit DHT, das nicht zu Östradiol metabolisiert werden kann, behandelt. Die Untersuchung zeigte, dass bei pränatal mit DHT behandelten Schafen die tonische LH-Sekretion im Sinne einer Vorverlegung des präpuberalen tonischen LH-Anstiegs beeinflusst wird. DHT hatte jedoch keine Wirkung auf die Auslösbarkeit des präovulatorischen LH-Gipfels. Bei DHT-behandelten Tieren konnte nach Östradiolbenzoat-Stimulation ein präovulatorischer LH-Gipfel ausgelöst werden, ebenso wie bei nicht behandelten weiblichen Schafen. Zusätzlich war bei den DHT-behandelten weiblichen Schafen auch eine Maskulinisierung der äußeren Genitalien feststellbar. Daraus kann geschlossen werden, dass Östradiol der Mediator der Maskulinisierung der zyklischen LH-Sekretion bei männlichen Schafen ist, und dass DHT für die Ausprägung der tonischen LH-Sekretion und der phänotypischen Merkmale verantwortlich ist.

2.3.2 *Sexuelle Differenzierung der somatotropen Achse*

2.3.2.1 *Wirkung fötaler testikulärer Androgene auf das Wachstum*

Erwachsene männliche intakte Tiere zeichnen sich im Vergleich zu weiblichen Tieren oder Kastraten durch eine andere Fettverteilung im Körper und eine höhere Muskelmasse aus. Sie wachsen schneller, sie setzen das Futter effizienter um, und ihr Schlachtkörper besteht aus weniger Fett (SEIDEMAN et al., 1982; UNRUH, 1986). Dieser Geschlechtsunterschied könnte möglicherweise neben der anabolfunktionellen Wirkung von Testosteron auch auf die Wirkung der neonatalen (z.B. bei der Ratte und Maus) bzw. der pränatalen (z.B. bei Rind, Schaf, Schwein) testikulären Testosteron-Sekretion zurückzuführen sein und wurde neben der Ratte an mehreren landwirtschaftlichen Nutztieren untersucht.

Von einem positiven Effekt der neonatalen Testosteron-Sekretion auf das Körperwachstum der Ratte berichteten JANSSON et al. (1985a). Die neonatale Gonadektomie männlicher Ratten verringerte deren Körpergewicht und Längenwachstum der Knochen im erwachsenen Alter. Eine Testosteron-Behandlung im Anschluß an die neonatale Gonadektomie kehrte diesen Effekt um. Ein höheres Körpergewicht und verändertes Knochenwachstum im adulten Alter zeigten auch neonatal ovariectomierte und neonatal mit Testosteron behandelte weibliche Ratten. Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass bei der Ratte neonatale testikuläre Androgene das Körperwachstum prägen. Der gleiche positive Effekt durch Maskulinisierung wurde auch in einer anderen Untersuchung gefunden. Neonatal mit Testosteron behandelte und hypophysektomierte männliche und weibliche Ratten wiesen höhere Körpergewichte auf als nicht maskulinisierte Tiere (KLINDT et al., 1990).

Pränatale Androgenisierung durch eine TP-Implantation bei tragenden Kühen hatte - im Vergleich zu den Kontrollkälbern - weder bei weiblichen noch bei männlichen Nachkommen einen Einfluss auf das Geburtsgewicht (ALDRICH et al., 1996) oder das Geburtsgewicht TP-behandelter Kälber beider Geschlechter war tendenziell niedriger (DE HAAN et al., 1988 und 1990). Zum Zeitpunkt des Absetzens (5 Monate) ließen sich keine Gewichtsunterschiede zwischen behandelten und nicht behandelten Tieren ermitteln (ALDRICH et al., 1996). Bei etwas späterem Absetzen (7 Monate) waren TP-behandelte Färsen schwerer als Kontrollfärsen, wobei sich dieser Unterschied deutlicher zwischen dem 12. und 14. Monat, dass

heißt nach dem Pubertätseintritt, mit einer um 19,5% höheren täglichen Zunahme der TP-behandelten Färsen zeigte. Bei männlichen Rindern gab es keinen Gewichtsunterschied (DE HAAN et al., 1988). Um die mögliche zusätzliche Rolle postnataler Gonadensteroidoide zu untersuchen, wurden pränatal TP-behandelte und nicht behandelte Färsen und Ochsen beim Absetzen zusätzlich mit Testosteron- bzw. Östradiol-Implantaten versehen. Im Alter von 15 Monaten hatten weibliche, nur pränatal TP-behandelte Färsen um 10,4% und die zusätzlich postnatal TP-implantierten Färsen um 16,4% höhere tägliche Zunahmen. Auch die zusätzlich mit Östradiol behandelten Ochsen wiesen ein verbessertes Wachstum auf (DE HAAN et al., 1990). Pränatal TP-behandelte trächtige Färsen hatten ebenfalls höhere tägliche Zunahmen (22,5%) als nicht behandelte trächtige Färsen (REILING et al., 1995). Im Gegensatz zu den beschriebenen Beobachtungen bei postpuberalen Färsen konnten ALDRICH et al. (1996) bis zum Alter von 12 Monaten keine Verbesserung des Wachstums durch eine zusätzliche Steroid-Behandlung erzielen. Die verbesserte Wachstumsleistung der pränatal TP-behandelten Rinder tritt offensichtlich erst mit der Pubertät und beginnender zyklischer Ovaraktivität in Erscheinung.

Bei trächtigen Schafen erhöhte eine einmalige TP-Injektion die Geburtsgewichte der Nachkommen (GILL und HOSKING, 1995). Eine negative Wirkung von Testosteron auf die Geburtsgewichte wurde dagegen bei den Tieren festgestellt, die den Steroiden längere Zeit ausgesetzt waren, sei es über das Muttertier durch TP-Implantate (DE HAAN et al., 1987 und HANSEN et al., 1995) oder über längere Behandlungsperioden der Muttertiere mit TP-Injektionen (JENKINS et al., 1988). Hierdurch wurde möglicherweise die plazentäre Versorgung der Föten beeinflusst, was bei der Ratte ebenfalls nachgewiesen wurde (SLOB et al., 1975). Ein möglicher Faktor für die Reduktion der Geburtsgewichte könnte dabei in der Metabolisierung von Testosteron zu Östrogen in der Plazenta bestehen. Östrogen ist zumindest bei der Ratte (VENNIER und RAYNAUD, 1975) in der Lage, das fötale Wachstum zu verlangsamen. Durch die einmalige TP-Injektion in der oben genannten Studie (GILL und HOSKING, 1995) ließ sich dieser Effekt beim Schaf möglicherweise vermeiden. Beim Absetzen wurden höhere tägliche Zunahmen bei TP-behandelten weiblichen und männlichen Schafe nachgewiesen (JENKINS et al., 1988; GILL und HOSKING, 1995), und nach dem Absetzen hatten TP-behandelte weibliche Tiere ebenfalls höhere tägliche Zunahmen im Vergleich zu nicht behandelten weiblichen Schafen (DE HAAN et al., 1987; KLINDT et al., 1987; JENKINS et al., 1988 und

HANSEN et al., 1995).

Beim Schwein gibt es nur wenige Berichte zum Maskulinisierungseffekt auf das Wachstum. Durch eine viermalige pränatale Testosteron-Behandlung von Tag 29 bis 35 p.c. bzw. von Tag 39 bis 45 p.c. wurde das Körpergewicht bei der Geburt und beim Absetzen nicht beeinflusst (FORD und CHRISTENSON, 1987). ELSAESSER und PARVIZI (1979) berichteten hingegen, dass am Tag 30 p.c. TP-behandelte weibliche Schweine höhere Körpergewichte bei der Geburt sowie im Alter von 160 und 250 Tagen im Vergleich zu weiblichen Kontrolltieren aufwiesen. Später in der „kritischen Phase“ der sexuellen Differenzierung behandelte weibliche Schweine (Tag 50, 70, 90 oder 109 p.c.) zeigten keinen Gewichtsunterschied im Vergleich zu weiblichen Kontrolltieren.

Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen die wichtige Rolle der pränatalen Androgene für Geschlechtsunterschiede im Körpergewicht und in der täglichen Zunahme. Darüber hinaus ist aber auch die zusätzliche funktionelle Rolle der Gonadenhormone auf das Wachstumsvermögen im postnatalen Stadium zu berücksichtigen.

2.3.2.2 *Wirkung fötaler testikulärer Androgene auf die GH- und IGF-I-Sekretion*

Die physiologischen Mechanismen, mittels derer die pränatalen testikulären Androgene die Wachstumsleistung verbessern, sind noch nicht ausreichend geklärt. Die Frage, ob das in Kap. 2.3.2.1 beschriebene verbesserte Wachstum maskulinisierter weiblicher Tiere durch eine prägende Wirkung von pränatalem Testosteron auf die Regulation der GH-Sekretion ausgelöst wird, wurde in verschiedenen Experimenten untersucht.

Das geschlechtsspezifische GH-Sekretionsmuster ist bei der Ratte sehr gut untersucht. In wie weit die neonatale Testosteron-Sekretion bei der Ratte das geschlechtsspezifische GH-Sekretionsmuster im adulten Alter beeinflusst (prägende Wirkung), zeigen die im folgenden beschriebenen Versuche. Neonatal kastrierte männliche Ratten wiesen im adulten Alter ein weibliches GH-Sekretionsmuster auf mit niedrigerer GH-Pulsamplitude und höherer basaler GH-Werten (JANSSON et al., 1984, 1985a und JANSSON und FROHMAN, 1987). Durch neonatale TP-Substitution erhöhte sich bei neonatal gonadektomierten männlichen und weiblichen Ratten die GH-Pulsamplitude im adulten Alter. Die basalen GH-Werte ließen sich bei neonatal kastrierten männlichen Ratten durch neonatale Testosteron-Substitution nicht zurücksetzen (JANSSON et al., 1985a), erst mit zusätzlicher Testosteron-Behandlung

im adulten Alter wurden basale GH-Werte auf das Niveau der intakten männlichen Tiere zurückversetzt (JANSSON und FROHMAN, 1987). Daraus schlossen die Autoren, dass neonatale testikuläre Androgene die Höhe der GH-Pulsamplitude bei der adulten männlichen Ratte prägen, und dass für ein komplettes männliches GH-Sekretionsmuster die Anwesenheit von Testosteron sowohl im neonatalen und als auch im adulten Alter notwendig ist. Bei der weiblichen Ratte wird das GH-Sekretionsmuster durch eine neonatale TP-Behandlung nur bei neonatal ovariektomierten Ratten maskulinisiert, nicht jedoch bei intakten (JANSSON und FROHMAN, 1987a). Durch Untersuchung der Östradiol-Konzentration zeigte sich, dass die Präsenz der Ovarien den stimulatorischen Effekt von neonatalen Androgenen auf die GH-Sekretion bei der adulten weiblichen Ratte blockieren kann, vermutlich durch antagonistische Wirkung des Östrogens aus den Ovarien auf die Wirkung des neonatalen Testosterons.

Ein indirekter Einfluss von neonatalem Testosteron auf die GH-Sekretion wurde durch seine Wirkung auf die GRF-Neurone nachgewiesen (CHOWEN et al., 1993 und 1996). Neonatale Kastration männlicher Ratten reduzierte die Anzahl der GRF-Neurone und ihre Genexpression. Eine zusätzliche neonatale TP-Behandlung erhöhte die Anzahl der GRF-Neurone wieder, das GRF mRNA-Niveau pro Zelle blieb jedoch gleich. Bei intakten neonatal mit Testosteron behandelten weiblichen Ratten wurde der gleiche Effekt erreicht. Die Anzahl der SRIF-Neurone im Hypothalamus wurde durch eine neonatale TP-Behandlung weder bei weiblichen intakten noch bei männlichen neonatal gonadektomierten Ratten beeinflusst, aber die SRIF-Synthese, ausgedrückt als SRIF mRNA-Niveau pro Zelle, erhöhte sich. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass neonatales Testosteron eine prägende Wirkung auf Anzahl und Genexpression der hypothalamischen GRF- und SRIF-Neurone in der adulten männlichen Ratte hat und somit indirekt deren GH-Sekretion reguliert.

Zur Bedeutung pränataler testikulärer Androgene für die Regulation der GH-Sekretion bei landwirtschaftlichen Nutztieren gibt es nur wenige Untersuchungen. Bei trächtigen Mutterkühen wurde durch eine pränatale TP-Behandlung ab Tag 80 p.c zwar keine Veränderung der Plasma-GH-Konzentration, jedoch eine Erhöhung der IGF-I-Konzentration bei weiblichen Nachkommen im Alter von 6 bis 12 Monaten (präpuberal) erzielt (ALDRICH et al., 1996). Eine Erhöhung der GH-Konzentration im Blut erfolgte erst durch eine zusätzliche postnatale Östrogen- oder Östrogen-Testosteron-Behandlung. Beim Schaf war nach TP-Behandlung der trächtigen

Muttertiere von Tag 28 bis 84 p.c. bei den präpuberalen weiblichen Nachkommen (85. bzw. 135. Lebensstag) kein Unterschied in dem GH-Sekretionsmuster (mittlere und basale Plasma-GH-Konzentration, GH-Pulsamplitude und GH-Pulsfrequenz) im Vergleich zu den nicht behandelten weiblichen Schafen feststellbar (KLINDT et al., 1987). Die Ovariectomie im Alter von 58 Tagen hatte keinen Einfluss auf die Plasma-GH-Konzentration der beschriebenen Tiere.

Sowohl bei pränatal maskulinisierten weiblichen Rindern (ALDRICH et al., 1996) als auch bei pränatal maskulinisierten weiblichen Schafen (DE HAAN et al., 1990a) konnte eine erhöhte IGF-I-Konzentration nachgewiesen werden. Experimente zum Einfluss pränataler Androgene auf die GH-Sekretion beim Schwein sind nicht bekannt.

Anhand dieser Untersuchungen kann vermutet werden, dass die pränatalen Androgene testikulären Ursprungs zumindest teilweise für die höhere Plasma-GH-Konzentration bei männlichen Tieren verantwortlich sind und erst im Zusammenspiel mit den Gonadensteroiden in der Pubertät wirksam werden. Möglich ist auch, dass pränatal appliziertes Testosteron nicht nur über seine Wirkung auf die GH-Sekretion sondern auch über einen anderen Weg die verbesserte Wachstumsleistung (KLINDT et al., 1987; GILL und HOSKING, 1995; DE HAAN et al., 1990) vermittelt, vielleicht durch die Wirkung auf Wachstumsfaktoren z.B. IGF-I (DE HAAN et al., 1990a; ALDRICH et al., 1996) oder Insulin (GILL und HOSKING, 1995).

2.3.2.3 Wirkung fötaler testikulärer Androgene auf die GH-Genexpression

Sowohl neonatale als auch adulte Gonadensteroiden beeinflussen das GH mRNA-Niveau. Welche Bedeutung das neonatale testikuläre Testosteron für den sexuellen Dimorphismus der somatotropen Achse hierbei hat, wurde auf zellulärer Basis mittels in situ-Hybridisierung untersucht (GONZÁLEZ-PARRA et al., 1998 und 2000).

Eine neonatale Kastration unterdrückte das GH mRNA-Niveau bei adulten männlichen Ratten. Eine direkt nachfolgende Testosteron-Behandlung erhöhte dessen Niveau wieder. Eine zusätzliche adulte Testosteron-Behandlung hatte einen additiven Effekt auf die GH mRNA-Konzentration. Die Anzahl der somatotropen Zellen im adulten Alter wurde durch die neonatale Kastration verringert, die adulte Kastration beeinflusste die Zellzahl hingegen nicht. Waren neonatal kastrierte männliche Ratten direkt neonatal mit Testosteron behandelt worden, erhöhte sich die Anzahl der GH-produzierenden Zellen. Die

Kombination von neonatalem und adultem Testosteron hatte eine additive Wirkung auf die Anzahl der somatotropen Zellen (GONZÁLEZ-PARRA et al., 1998).

Adulte weibliche Ratten, die neonatal mit Testosteron behandelt worden waren, zeigten eine erhöhte Anzahl von somatotropen Zellen. Auch das GH mRNA-Niveau war erhöht, es konnte aber kein Effekt des Testosterons auf das GH mRNA-Niveau pro somatotrope Zelle gefunden werden. Durch zusätzliche Testosteron-Behandlung im Erwachsenenalter wurde die Anzahl der GH mRNA-produzierenden Zellen nicht weiter erhöht, es zeigte sich aber ein additiver Effekt auf das GH mRNA-Niveau (GONZÁLEZ-PARRA et al., 2000).

Diese Ergebnisse zeigen, dass bei männlichen Ratten neonatales Testosteron eine prägende Wirkung auf die somatotrope Achse mit einer Erhöhung der somatotropen Zellen ausüben kann (positive prägende Wirkung) und dass erst die Anwesenheit von Testosteron im postnatalen Leben das GH mRNA-Niveau auf dem Niveau der intakten männlichen Tiere halten kann.

Aus oben beschriebenen Experimenten konnte nicht geklärt werden, ob der beobachtete Einfluss von neonatalem Testosteron direkt auf die Hypophyse oder über den Hypothalamus wirkte. Hypothalamische Faktoren sind für die Entwicklung der Adenohypophyse wichtig (CELLA et al., 1994; DEAN und PORTER, 1999). Bekannt ist, dass durch neonatales und adultes Testosteron die GRF-Genexpression erhöht wird (CHOWEN et al., 1993; ZEITLER et al., 1990). Daher könnte das hohe GRF-Niveau bei männlichen Tieren (JANSSON et al., 1985; ARGENTE et al., 1991) die Entwicklung der Anzahl somatotroper Zellen induzieren. Beides, neonatales und adultes Testosteron, erhöhte die GH mRNA-Expression bei männlichen und bei weiblichen adulten Tieren, aber möglicherweise durch unterschiedliche Mechanismen. Bei adulten Tieren ist der Effekt von Testosteron auf das GH mRNA-Niveau pro Zelle wahrscheinlich auf die Modulation von GRF und SRIF zurückzuführen (ARGENTE et al., 1990; ZEITLER et al., 1990), daher wird die GH mRNA-Expression nicht direkt durch dieses Steroid moduliert (GONZÁLEZ-PARRA et al., 1996; CHOWEN et al., 1998).

2.3.2.4 *Mechanismen organisatorischer Androgeneffekte auf die somatotrope Achse*

Der organisatorische Effekt von Testosteron hängt vom Zeitpunkt, der Dauer und der Art der Exposition sowie der Dosis in der „kritischen Phase“ der Geschlechtsdifferenzierung ab.

Sowohl beim Schaf (DE HAAN et al., 1987; JENKINS et al., 1988) als auch beim Rind (DE HAAN et al., 1988 und 1990) führte eine längere TP-Behandlung durch Implantation oder eine längere chronische Behandlung durch mehrmalige TP-Injektionen der trächtigen Muttertiere zu verringerten Geburtsgewichten der Nachkommen und zur phänotypischen Veränderung der äußeren Geschlechtsorgane der weiblichen Tiere.

Eine einmalige TP-Injektion (akute Behandlung) zu unterschiedlichen Zeitpunkten hatte beim Schaf entweder keinen Einfluss auf das Geburtsgewicht (Tag 40 p.c.) oder führte zu einer Erhöhung der Geburtsgewichte (Tag 30, 50 und 60 p.c.). Außerdem traten phänotypische Veränderungen an äußeren Geschlechtsorganen nur nach einer frühen Behandlung (Tag 30 oder 40 p.c.) auf. Höhere tägliche Zunahme beim Absetzen bzw. bis zur Pubertät wiesen sowohl weibliche Schafe, die sehr früh (Tag 30 p.c.) oder spät (Tag 60 p.c.) in der „kritischen Phase“ der sexuellen Differenzierung behandelt worden waren, auf (GILL und HOSKING, 1995). Diese Tiere hatten ähnlich wie die durch TP-Implantate der Muttertiere maskulinisierte Tiere um 10 bis 22% höhere tägliche Zunahmen (DE HAAN et al., 1987).

Beim Rind wurde durch TP-Implantation trächtiger Kühe in unterschiedlichen Zeiträumen gezeigt, dass nur in der frühen Phase (Tag 40 bis 60 p.c.) eine Vergrößerung der ano-genitalen Distanz der weiblichen Nachkommen verursacht werden konnte (DE HAAN et al., 1990). Die positive Wirkung von Testosteron auf die Wachstumsleistung war nach früher (ab Tag 40 oder 64 p.c.) oder später (Tag 105 p.c.) Behandlung effektiver als die TP-Behandlung ab Tag 84 p.c. (DE HAAN et al., 1988 und 1990). Da es kein gleichgerichtetes Muster der Wachstumsverbesserung gab, wurde daraus geschlossen, dass beim Rind die „kritische Periode“ für die sexuelle Differenzierung der Wachstumsleistung durch pränatales Testosteron relativ breit ist und vor dem Tag 105 des fötalen Lebens liegt.

Beim Schwein führte eine TP-Behandlung in der frühen Phase der Geschlechtsdifferenzierung (Tag 30 p.c.) zu einer Erhöhung der Körpergewichte bei adulten weiblichen Tieren und zu einer phänotypischen Veränderung der äußeren Geschlechtsorgane (ELSAESSER und PARVIZI, 1979).

Die oben beschriebenen Ergebnisse lassen sowohl für das Schaf als auch für das Rind erkennen, dass die pränatale Maskulinisierung der Geschlechtsorgane nur in einer kurzen, frühen Phase der sexuellen Differenzierung stattfindet und nicht zeitgleich mit der Maskulinisierung der somatotropen Achse, die

offensichtlich über einen längeren Zeitraum sexuell geprägt werden kann.

Für die Praxis bedeuten diese Ergebnisse, dass beim Schaf eine Behandlung durch Einsetzen von Testosteron-Implantaten oder eine mehrmalige chronische Testosteron-Behandlung nicht notwendig ist, sondern schon eine einmalige akute Testosteron-

Behandlung zum richtigen Zeitpunkt für eine erfolgreiche Ausschöpfung des Wachstumspotenzials ausreicht. Dadurch könnte auch das bisherige ethische Problem der Verbesserung der Wachstumsleistung durch die TP-Behandlung unter Inkaufnahme einer Deformation der Geschlechtsorgane umgangen werden.

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Zielsetzung

Androgene testikulären Ursprungs sind während einer sogenannten „kritischen Periode“ in der frühen Fötalentwicklung der Auslöser für den sexuellen Dimorphismus im Phänotyp und in der Regulation der LH-Sekretion. Es besteht die Hypothese, dass diese organisatorisch-prägende Wirkung der Androgene auch für die Geschlechtsunterschiede in der somatotropen Achse mitverantwortlich ist.

Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen besteht darin, die Bedeutung pränataler Androgene für den sexuellen Dimorphismus der gonadotropen und somatotropen Achse und die Körperentwicklung beim fötalen und beim präpuberalen Schwein zu definieren.

Die Arbeit gliedert sich in zwei Teile, in denen die folgenden Punkte bearbeitet wurden:

Versuch 1: Wirkung einer pränatalen Behandlung mit Testosteronpropionat auf die postnatale Steuerung von Wachstum und Reproduktion

Dabei wurden

- der Grad der phänotypischen Maskulinisierung und die Gewichtsentwicklung von der Geburt bis zum Alter von 180 Tagen post partum (p.p.) erfasst
- die LH und GH-Konzentrationen im Blutplasma im Alter von 180 Tagen p.p. gemessen
- sowie das LH β mRNA- und GH mRNA-Niveau im Alter von 180 Tagen p.p. untersucht.

Versuch 2: Wirkung einer pränatalen Behandlung mit Testosteronpropionat auf den Fötus am Tag 80 p.c.

Nach der TP-Behandlung der tragenden Muttersauen während der „kritischen Phase“ der sexuellen Differenzierung

- wurden am Tag 80 post coitum (p.c.) Föten per Laparotomie entnommen
- der Grad der phänotypischen Maskulinisierung weiblicher Föten festgestellt
- die Gewichtsunterschiede zwischen weiblichen und männlichen Föten der Behandlungs- und der Kontrollgruppen erfasst
- das LH β mRNA- und GH mRNA-Niveau bestimmt.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Versuchsaufbau

3.2.1.1 Wirkung einer pränatalen Behandlung mit Testosteronpropionat auf die postnatale Steuerung von Wachstum und Reproduktion

Behandlung der Muttertiere

Im Versuch standen 10 tragende Jungsauen der Deutschen Landrasse aus dem Versuchsbetrieb Mecklenhorst des Instituts für Tierzucht und Tierversuchen Mariensee (FAL), die zu bestimmten Trächtigkeitszeitpunkten (siehe Abb. 3-1) mit Testosteronpropionat (4-Androsten-17 β -ol-3-one 17-propionate, Sigma, Deisenhofen), im weiteren TP genannt, oder Sesamöl (BUFA, Uitgeest, Holland) in den linken und in den rechten Ohrgrund intramuskulär (i.m.) behandelt wurden. Testosteronpropionat wurde im Sesamöl suspendiert in der Konzentration 0,1 g TP/ml Sesamöl.

Die TP-Dosierung beruht auf der Arbeit von ELSAESSER und PARVIZI (1979) bzw. den Ergebnissen eines Vorversuchs. In diesem Vorversuch wurden die Muttersauen wie folgt behandelt: 6 mal 25 mg TP/kg Körpergewicht (KG) im Abstand von 2 Tagen von Tag 30 bis 44 p.c. (7 Sauen) oder 3 mal 25 mg TP/kg KG von Tag 30 bis 34 p.c. und zusätzlich 3 weitere Behandlungen mit 15 mg TP/kg KG am Tag 40 bis 44 p.c. (4 Sauen). Sämtliche Sauen abortierten einige Tage nach der Behandlung (zwischen dem Tag 50 und 60 der Trächtigkeit). Aus diesen Ergebnissen wurde der Zeitraum der TP-Behandlung und die Dosierung für die folgende Versuche neu definiert.

Fünf Sauen wurden am Trächtigkeitstag 30, 32 und 34 mit Testosteronpropionat (TP30-Gruppe) behandelt. Jeder Sau wurde die Hälfte der 25 ml TP-Suspension pro Behandlung in den linken und die andere Hälfte in den rechten Ohrgrund i.m. injiziert. Die Dosierung entsprach 2,5 g TP/Behandlung. Zwei Sauen dieser Gruppe wurden zusätzlich noch am Trächtigkeitstag 40, 42 und 44 mit der gleichen Dosierung wie in der ersten Periode behandelt (TP3040-Gruppe). Den fünf Kontrollsaunen (KON-Gruppe) wurde am gleichen Trächtigkeitstag wie den TP30-Sauen 25 ml reines Sesamöl/Behandlung i.m. injiziert (Abb. 3-1).

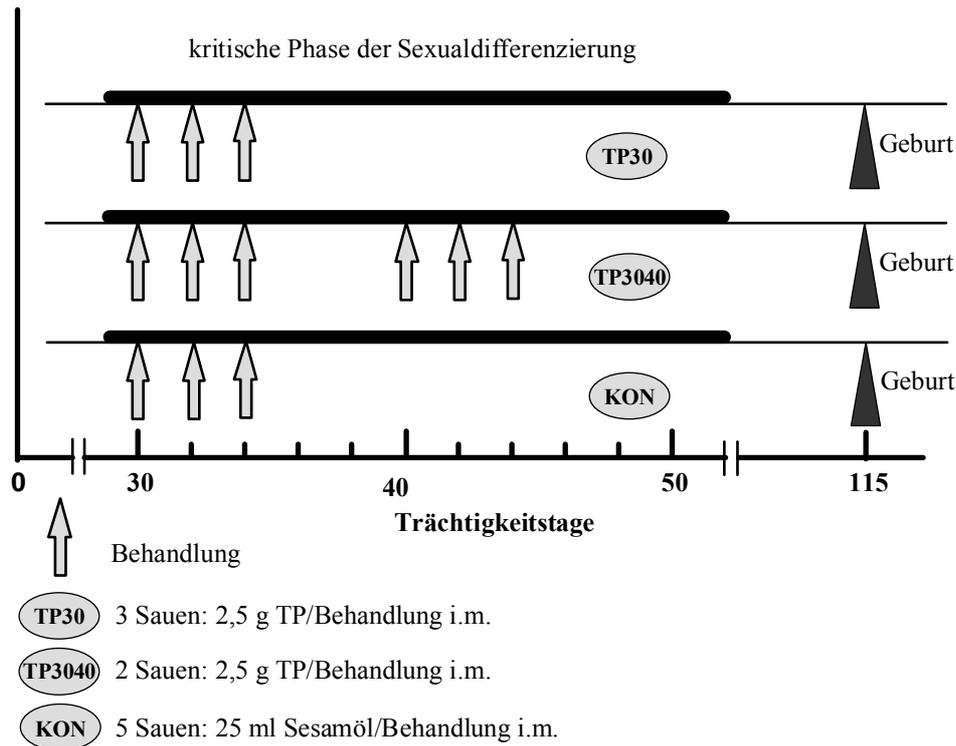


Abb. 3-1: Behandlungsschema der Sauen mit Testosteronpropionat (TP) oder Sesamöl zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Trächtigkeit

Zum Zeitpunkt der Besamung waren die Sauen 7 bis 8 Monate alt mit einem Gewicht von 110 bis 120 kg. Für jeden der fünf Versuchsdurchgänge wurden jeweils zwei Sauen mit gleichem Deckdatum ausgesucht, die dann jeweils der Kontroll- und Versuchsgruppe zugeordnet wurden. Die Jungsaunen ferkelten in Abferkelbuchten in Mecklenhorst ab.

Erhebungen an der Nachzucht

Nach der Geburt der Ferkel wurde ihr Geschlecht bestimmt und bei den weiblichen Ferkeln der TP-behandelten Sauen auch die ano-genitale Distanz (AGD), d.h. der Abstand zwischen Anus und Vulva bzw. dem Ende der penisähnlichen Gewebebildung, mit einem Messband gemessen (Abb. 3-2).

Im Alter von 25 ± 1 Tagen wurden alle männlichen Ferkel kastriert, am Tag 34 ± 1 alle Würfe abgesetzt und in Gruppen zu je 10 Tieren bis zum Alter von 6 Monaten aufgestellt.

Die Ferkel wurden mit einer Ferkelaufzucht Mischung ad libitum bis zum Gewicht von 40 kg und danach bis zum Alter von 6 Monaten zweimal täglich mit Kraftfuttermischung für Mastschweine (jeweils 2 kg pro Tier und Tag) gefüttert.

Bei allen Tieren wurde nach der Geburt, beim

Absetzen sowie im Alter von 4 und 6 Monaten das Gewicht erfasst.

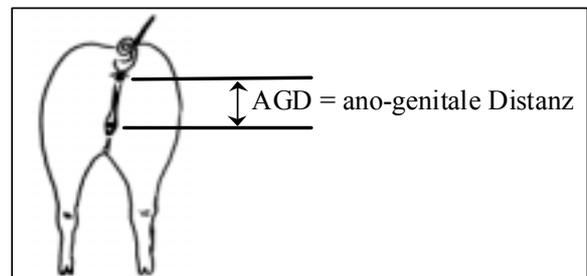


Abb. 3-2: Messung der ano-genitalen Distanz (AGD)

Einige Tage vor der Katheterisierung wurden insgesamt 8 bis 9 Nachkommen beider Geschlechter von je einer TP-behandelten und einer Kontrollsau mit einem Durchschnittsalter von 172 ± 2 Tagen nach Mariensee geholt und in fünf Durchgängen 43 Tiere in Einzelboxen für die Blutentnahme aufgestellt.

Drei bis vier Tage nach der Katheterisierung (im Alter von 181 ± 1 Tage) fand eine 8stündige Blutentnahme in 15minütigen Intervallen von 8 bis 16 Uhr statt. Für jede Probe wurde 2,5 ml Blut gezogen und in Röhrchen mit Heparin in Eiswasser kühl

gehalten. Etwa einmal pro Stunde wurde das Blut zentrifugiert bei 1500 g/min, 20 min bei 4°C (Heraeus Zentrifuge-Megafuge 1,0 R, Osterode), das Plasma abpipettiert und bei -20°C im Gefrierschrank bis zur Analyse von LH und GH gelagert.

Drei bis vier Tage nach der Blutentnahmeperiode wurden die Tiere im Versuchsschlachthaus mit CO₂ betäubt und danach geschlachtet. Die Adenohypophysen wurden, wie im Kap. 3.2.2.2 beschrieben, entnommen und bis zum Zeitpunkt der molekularbiologischen Analysen bei -80°C gelagert.

3.2.1.2 Wirkung einer pränatalen Behandlung mit Testosteronpropionat auf den Fötus am Tag 80 p.c.

Um die „kritische Phase“ der sexuellen Differenzierung zeitlich weiter einzugrenzen, wurden Föten am Tag 30 bis 34 p.c. oder am Tag 40 bis 44 p.c. über TP-Behandlung der Muttersau maskulinisiert und am Tag 80 p.c. zur Analyse entnommen.

Für die Versuche standen 11 tragende Jungsauen

der Deutschen Landrasse aus dem Versuchsbetrieb Mecklenhorst des Instituts für Tierzucht und Tierverhalten Mariensee zur Verfügung. Die Sauen wurden in drei Gruppen aufgeteilt. In der ersten Gruppe wurden drei Sauen am Tag 30, 32 und 34 p.c. mit 1,5 g TP/Behandlung i.m. hinter dem Ohrgrund behandelt (TP30-Gruppe). Mit gleicher Dosierung wurden die Sauen der zweiten Gruppe behandelt, allerdings später in der Trächtigkeit am Tag 40, 42 und 44 p.c. (TP40-Gruppe). Den fünf Sauen der Kontrollgruppe (KON-Gruppe) wurde am Trächtigkeitstag 30, 32 und 34 Sesamöl (10 ml/Behandlung) i.m. appliziert (siehe Abb. 3-3).

Die Sauen waren im Alter zwischen 7 und 8 Monaten und einem Gewicht von 110 bis 120 kg belegt worden. Bis einige Tage vor dem berechneten Trächtigkeitstag 80 p.c. wurden die Sauen in Mecklenhorst gehalten, danach nach Mariensee geholt. Das Deckdatum galt als Tag 0. Am Tag 80 ± 1 p.c. wurden per Kaiserschnitt die Föten entnommen und ihre Hypophysen herauspräpariert und bis zur Analyse bei -80°C gelagert (siehe Kap. 3.2.2.2).

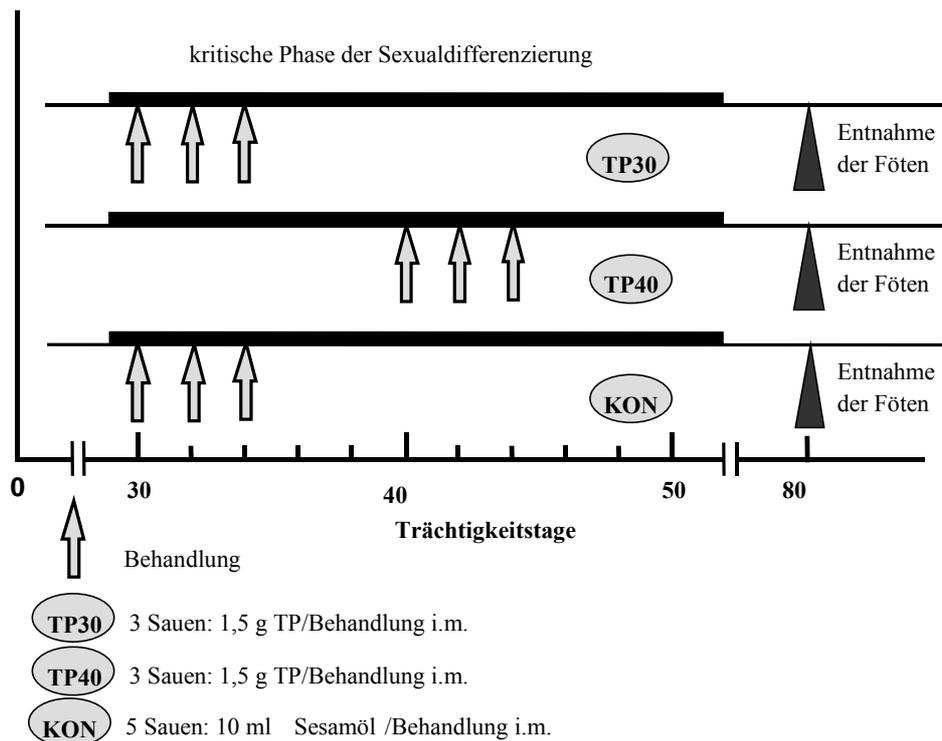


Abb. 3-3: Behandlungsschema der Sauen mit Testosteronpropionat (TP) oder Sesamöl zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Trächtigkeit

3.2.2 Operative Eingriffe

3.2.2.1 Katheterisierung

Damit die Blutentnahme möglichst stressfrei und ungestört verlief und die Hormonwerte im Plasma möglichst unbeeinflusst blieben, wurde den Tieren ein intravenöser Dauerkatheter gelegt. Die Sedation der Tiere erfolgte durch eine i.m. Injektion mit 2 mg Stresnil/kg Körpergewicht (Wirkstoff: Azaperon, Janssen-Cilag, Neuss). Die Narkose wurde über die Ohrvene mit 10-12 ml Ketamin (Wirkstoff: Ketaminhydrochlorid, Atarost, Twistring) intravenös (i.v.) eingeleitet. Während der Operation wurde nach Bedarf Ketamin nachinjiziert.

Die Katheterisierung der Vena jugularis externa erfolgte nach einer modifizierten Methode von ELLENDORFF et al. (1977). Nach der Katheterisierung wurde in die Wundhöhle 3-4 ml Tardomyocel Suspension instilliert. Für die Versorgung der Operationswunde und die Austrittsstelle des Katheters im Nackenbereich kam ein Penicillin-Sulfonamid Puder WDT zur Anwendung. Während der Narkose wurde der Katheter mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllt und mit einem Kunststoffstopfen verschlossen. Nach der Operation erfolgte die Katheterpflege durch Spülung des Katheters mit einer NaCl/Heparin-Lösung jeden zweiten Tag bis zum Versuchsbeginn.

3.2.2.2 Gewinnung fötaler und postnataler Adenohypophysen

Die Adenohypophysenentnahme von postnatalen Versuchstieren fand im Versuchsschlachthaus des Instituts für Tierzucht und Tierverhalten in Mariensee statt. Nach CO₂-Betäubung wurden die Tiere geschlachtet und unmittelbar nach dem Tod die Hypophysen entnommen. Alle nachfolgenden Arbeitsschritte erfolgten möglichst schnell, um eine RNA-Degradierung zu vermeiden.

Die Schädeldecke wurde mit einer Kreissäge geöffnet, die Dura mater mit einem Messer durchschnitten und das Gehirn herausgehoben. Die Hypophyse wurde mit einem Spatel aus der Sella turcica herausgenommen und in sterile, eisgekühlte physiologische Kochsalzlösung gelegt.

Zur operativen Entnahme der Föten (Laparotomie) wurden die tragenden Sauen durchschnittlich am Tag 80 ± 1 p.c. mit 2 mg Stresnil/kg Körpergewicht i.m. ruhig gestellt und eine halbe Stunde später mit 10-12 ml Ketamin i.v. durch die Ohrvene in Narkose gelegt. Während der Operation wurde über einen Katheter in die Vena jugularis die Narkose mit Ketamin aufrechterhalten.

Die Föten, durch die Narkose des Muttertieres ebenfalls anästhesiert, wurden nach Entnahme aus der Sau gewogen, und ihr Geschlecht und die ano-genitale Distanz (AGD) bestimmt. Danach wurden die Föten dekapitiert, die Kopfhaut eingeschnitten und diese mit einer Zangenpinzette entfernt. Schädeldecke und Dura mater wurden mit einer Schere entfernt und das Gehirn mit einem Spatel herausgehoben. Die Hypophyse blieb meistens in der Sella turcica liegen und konnte mit einem kleineren Spatel herausgenommen und in sterile eisgekühlte physiologische Kochsalzlösung gelegt werden.

Die Adenohypophysen konnten mit Hilfe von zwei Irispinzetten vom Hypophysenstiel und der Neurohypophyse getrennt werden. Die Adenohypophysen wurden schnell und vorsichtig mit einem sauberen Tuch trockengetupft, in ein steriles, vorher gewogenes 1,5 ml-Reaktionsgefäß gelegt und in Trockeneis bei -80°C eingefroren und nach Abschluss der Operation gewogen. Danach wurden Adenohypophysen bis zur Extraktion der Gesamt-RNA bei -80°C gelagert.

Die Sauen wurden nach der Operation mit gesättigter KCl-Lösung intravenös eingeschläfert.

3.2.3 Labortechniken

3.2.3.1 Bestimmung von porcine GH und LH durch Enzym Immuno Assay (EIA)

Bei dem Enzym Immuno Assay (EIA)-Test handelt es sich um eine Methode, bei der die zu bestimmenden, nicht markierten Plasmahormone (Antigene) mit biotinmarkierten Hormonen (Tracer) um die Bindungsstellen komplementärer Antikörpermoleküle konkurrieren. Bei der anschließenden Zugabe von Streptavidinperoxidase bindet sich das Enzym an den biotinmarkierten Tracer. Wasserstoffperoxid-Harnstoff dient als Enzymsubstrat. Beim Substratumsatz, der mit einem Farbumschlag einhergeht, wird die Menge an gebundenem Tracer über die Farbreaktion photometrisch meßbar. Die Antikörpermoleküle sind polyklonal und wurden durch Hyperimmunisierung erzeugt. Um eine Trennung von freien und gebundenen Reaktanten nach Ablauf der Immunreaktion zu gewährleisten, wurden die Antikörper mit Hilfe eines Anti-Antikörpers an die Mikrotiterplatte gebunden (Immobilisierung des spezifischen Antikörpers). Bei dem Anti-Antikörper handelt es sich um Anti-Kaninchen-IgG vom Schaf, welches über seine beiden Bindungsstellen in der Lage ist, den hormonspezifischen Antikörper (Kaninchen-IgG) zu binden. Der Anti-Antikörper selbst ist adsorptiv an die Plastikoberfläche der

Mikrotiterplatten gebunden.

Zur Bestimmung der Plasma-GH-Spiegel wurde ein modifizierter Enzym Immuno Assay nach SERPEK et al. (1993) verwendet. Der Test basiert auf Affen pGH-Antiserum (Dr. Parlow), Biotinyl-pGH als Tracer und Streptavidin-Horseradisch Peroxidase. Der Test zeigte < 1 % Kreuzreaktivität mit porcinem Prolaktin, FSH und LH. Die Intraassay-Variationskoeffizienten für Proben mit Konzentration von 4 und 11 ng/ml wurde mit 5,7 und 3,9 % angegeben. Die Interassay-Variationskoeffizienten für Proben mit einer Konzentration von 1,2 bzw. 4,4 ng/ml wurden mit 8,6 % bzw. 4,3 % angegeben (SERPEK et al., 1993).

Plasma-LH-Konzentrationen wurden ebenfalls mit dem EIA bestimmt und zwar ähnlich wie für GH beschrieben (SERPEK et al., 1993), aber mit folgenden Modifikationen: anstatt pGH-Assaypuffer

wurde EDTA Phosphat-Puffer (0,02 M Na₂HPO₄; 0,01 M EDTA; 0,12 M NaCl; 0,1 % Gelatine; 0,005 % Chlorhexidin-Diglukonat (20 %); 0,05 % Tween 20) verwendet, die Inkubation wurde von 48 Stunden bei 4°C auf 24 Stunden bei Raumtemperatur reduziert, als Standard für die Biotinilierung wurde pLH (USDA) und als Antikörper das Kaninchen-anti-pLH-Serum (A528/R1H von Biogenis, UK) 1:500 000 verdünnt, verwendet. Die Kreuzreaktivität des pLH-Antikörpers betrug: pFSH 2,7 %, pLH α 1,1 %, pTSH 0,5 %, pTSH α , pTSH β oder LH β \leq 0,1 %. Die Intra- und Interassay-Variationskoeffizienten betrugen 10,3 % bzw. 12,1 % (ELSAESSER, 2001).

3.2.3.2 Molekularbiologische Methoden

Einen Überblick über den Ablauf der verwendeten molekularbiologischen Methoden zeigt Abb. 3-4.

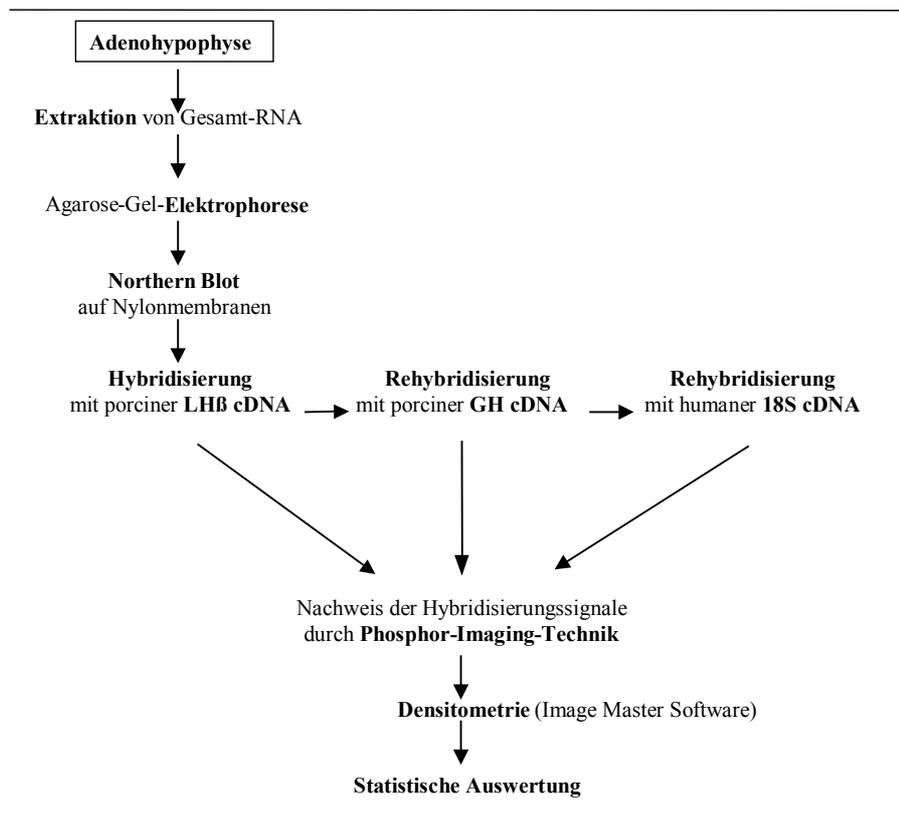


Abb. 3-4: Methodischer Ablauf des Genexpressionsnachweises

Extraktion der Gesamt-RNA

Die Gesamt-RNA aus dem Zytoplasma der Adenohypophysenzellen wurde in einem Extraktionsvorgang nach einem modifizierten

Standardprotokoll von SAMBROOK et al. (1989) gewonnen.

Nach Zugabe von Lysispuffer, der zur Auflösung der Zellmembranen führt, wurde das Gewebe mit einem Homogenisator zerkleinert und auf Eis

inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren der Zellkerne und Zelltrümmer wurden die im Zytoplasma enthaltenen Proteine mit Proteinase K „verdaut“ und durch Phenol/Chloroform-Extraktion von der RNA-Fraktion getrennt. Die RNA wurde mit Isopropanol und Natriumazetat über Nacht bei -20°C gefällt und durch Zentrifugieren pelletiert (Heraeus Zentrifuge-Biofuge fresco, Osterode). Die Pellets wurden zweimal mit Äthanol/Na-Azetat gewaschen, um organische Reste und Salzreste abzutrennen. Die RNA-Pellets wurden anschließend in autoklavierten und deionisierten Wasser resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. In einem Extraktionsvorgang wurden 14 bis 17 Proben bearbeitet.

Das Gesamt-RNA-Pellet aus fötalen Adenohypophysen wurde in 15 bis 20µl Wasser/Probe und das Gesamt-RNA-Pellet aus Adenohypophysen der 180 Tage alten Tiere in 100µl Wasser/Probe gelöst. Die RNA-Konzentration jeder einzelnen extrahierten Probe wurde mit einem UV-Spektrophotometer (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Cambridge, England) anhand der Adsorption eines Aliquots von 1 µl bei einer Wellenlänge von λ260 nm gemessen.

Für die Erstellung einer fötalen Referenzprobe wurden die Adenohypophysen weiblicher und männlicher 80 Tage alter Föten einer unbehandelten Sau extrahiert. Nach der Extraktion wurden diese Einzelproben zusammenpipettiert, danach wurde die Konzentration der Gesamt-RNA gemessen. Die

Referenzprobe für die Altersgruppe 180 Tage p.p. wurde aus Aliquoten von weiblichen und männlichen Kontroll-Proben erstellt.

Gelelektrophorese

Die Gesamt-RNA wurde gelelektrophoretisch nach Molekülgröße aufgetrennt. Dafür wurde ein modifiziertes Protokoll von SAMBROOK et al. (1989) verwendet.

Um die Sekundärstruktur der RNA-Einzelstränge aufzubrechen, wurde eine Glyoxal/DMSO-Denaturierung der Proben vor dem Gel-Lauf vorgenommen. Es wurde eine horizontale Elektrophoresekammer mit der Gelgröße 20 x 20 cm benutzt. Das 1%ige Agarose-Gel wurde in zwei Bereichen jeweils mit 22 Geltaschen versehen, später wurde das Gel mit einer Skalpellklinge durchgeschnitten.

Von den fötalen Proben wurden von jeder Probe jeweils 5 µg Gesamt-RNA aufgetragen. Auf jedem der fünf Gele wurde die gleiche Anzahl der Proben, jeweils beider Geschlechter und jeder Behandlungsgruppe, aufgetragen. Die Anordnung der Proben war bei den verschiedenen Gelen zufällig verteilt. In die äußeren Taschen oder auch mittig eines jeden Gels wurde ein Fötenpool als Referenzprobe in drei unterschiedlichen Konzentrationen (2,5 µg, 5 µg und 10 µg) aufgetragen (siehe Abb. 3-5), von denen die beiden 5 µg-Referenzproben als Doppelbestimmung dienen.

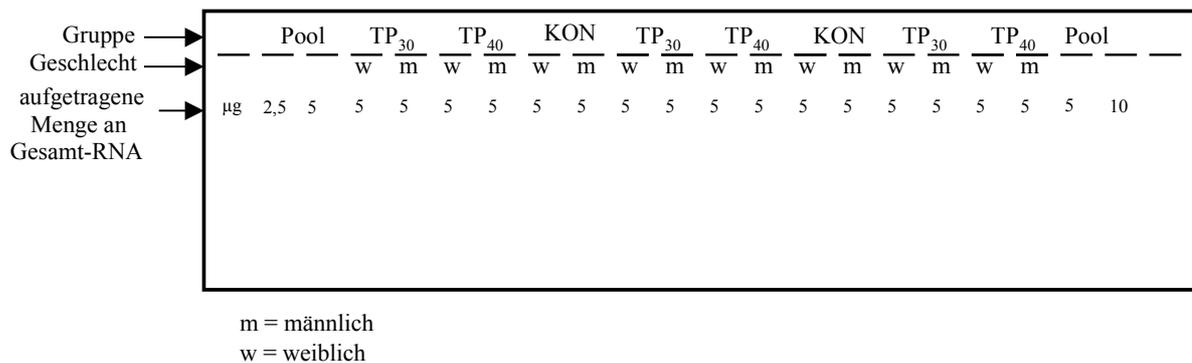


Abb. 3-5: Beispiel eines Gels aus dem Versuch mit fötalen Proben

Von 180 Tage alten Schweinen wurde jede Einzelprobe in zwei unterschiedlichen Konzentrationen aufgetragen (2,5 µg und 5 µg Gesamt-RNA). Auch hier wurde auf eine zufällige und gleichmäßige Probenverteilung geachtet. Die Referenzprobe wurde entweder in den Randtaschen

oder mittig im Gel in einer Konzentration von 2,5 µg und 5 µg aufgetragen.

Die RNA wurde bei einer Laufzeit von 3,5 Stunden mit 50 V und 65 mA in einem 10 mM Na-Phosphat-Puffer aufgetrennt. Nach der Gelelektrophorese wurde jedes Gel mit Ethidium

Bromid (EtBr) angefärbt. EtBr setzt sich zwischen die Basen der Nukleinsäuren und läßt sich mit einer UV-Lichtquelle sichtbar machen. Da die ribosomalen RNA-Untereinheiten (28S und 18S) den größten Anteil an der Gesamt-RNA ausmachen, sind sie mit einer UV-Lichtquelle (UV-Transilluminator, Biometra, Göttingen) nach der Gelelektrophorese als deutliche Banden erkennbar. Die EtBr-Signale der so angefärbten Gele wurden mit einer hochauflösenden CCD-Videocamera (CF 8/1 FMC, Kappa, Gleichen) mit zugehöriger Software (Movie Machine II, Fast Multimedia, München) dokumentiert.

Northern Blot

Zum Transfer der RNA aus dem Agarose-Gel auf Nylonmembranen (Hybond-N, Amersham Pharmacia, Braunschweig) wurde das Northern Blot-Verfahren gewählt – modifiziert nach SAMBROOK et al. (1989). Die Nukleinsäuren wurden mit 20 x SSC-Puffer per Kapillarkraft über Nacht auf die Nylonmembran übertragen. Anschließend wurden die Membranen kurz über UV-Licht gelegt, um die Position der 18S- und 28S rRNA-Banden auf der Membran zu markieren, was später zu einer besseren Zuordnung der spezifischen Hybridisierungssignale diente.

Um die RNA auf der Nylonmembran kovalent zu binden, wurden die Membranen mit 1200µJ für 30 Sekunden (Autocrosslinking) im UV Stratalinker exponiert (UV Stratalinker 2400, Stratagene, La Jolla, Canada). Zusätzlich wurden die Membranen eine Stunde bei 80°C erhitzt, um das Glyoxal, das zur RNA-Denaturierung verwendet worden war, abzuspalten und damit als Störfaktor bei der Hybridisierung auszuschalten. Die so behandelten Membranen wurden zwischen zwei Filterpapiere gelegt und bis zur Hybridisierung aufbewahrt.

Hybridisierungssonden

Für den GH mRNA- und LHβ mRNA-Nachweis wurden porcine cDNA-Sonden für GH (760 bp) und LHβ-Subunit (542 bp) verwendet. Sie wurden von der japanischen Arbeitsgruppe Y.Kato, Gunma University, kloniert und sequenziert (KATO et al., 1990; KATO und HIRAI, 1989) und dem Institut für Tierzucht und Tierverhalten in Mariensee zur Verfügung gestellt und auf die Spezifität geprüft (GRANZ, 1994).

Beide Sonden sind in die EcoRI-Schnittstelle des Plasmids pBluscript (2746 bp) kloniert und werden in E.ColiXL-1 Blue MRF (Kan Supercomplement Cells, Stratagene, La Jolla, USA) in Dauerkultur gehalten.

Zur Präparation der Sonden wurden die Plasmide

mit einem Plasmidpräparationskit (Qia prep Spin Mini prep Kit, Qiagen, Hilden) isoliert. Die cDNA wurden mit einem Restriktionsenzym (Restriktionsendonuklease EcoRI-1, Boehringer, Mannheim) ausgeschnitten und gelelektrophoretisch vom Restplasmid getrennt. Die Elution der Sonden aus dem Agarose-Gel erfolgte mit dem Genclean Kit (Genclean II Kit, Bio 101 inc., Dianova, Hamburg), dessen Prinzip auf der Bindung der DNA-Stränge an Glasmilchpartikel basiert.

Die Kontrolle der Restriktion und die Größenbestimmung beider Sonden wurde mit Größenmarkern (pUC Mix Marker und ØX 174 DNA/BsuRI Marker, MBI Fermentas, Litauen) in einer gelelektrophoretischen Trennung durchgeführt.

Um Unterschiede in der Menge an Gesamt-RNA, die aufgetragen wurde, auszugleichen, wurden die Membranen zum Nachweis von 18S rRNA rehybridisiert. Als Sonde wurde ein Oligonukleotid spezifisch für humane 18S rRNA (pTRI RNA 18S Antisense Control Template, 80 bp, Accession #M10098, Ambion, Austin, Texas-USA) benutzt.

Markierung der Sonden

Die cDNA-Inserts wurden mit [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mM, Amersham, Braunschweig) markiert. Die verwendete Methode der "random primed" DNA-Markierung wurde ursprünglich von FEINBERG und VOGELSTEIN (1983 und 1984) beschrieben. Die Markierung wurde mit Hilfe eines Markierungskits (High Prime DNA Labeling Kit, Boehringer, Mannheim) durchgeführt.

Das Prinzip der Methode basiert auf der Hybridisierung von hexameren Oligonukleotiden aller möglichen Sequenzkombinationen an die zu markierende cDNA, die zunächst durch Hitzedenaturierung in Einzelstränge zerlegt wird. Der komplementäre DNA-Strang wird von Klenow-Polymerase unter Verwendung der 3'-OH-Enden der Hexanukleotide als Primer synthetisiert. Markierte (dCTP mit ³²P markiert) und unmarkierte (dATP, dGTP, dTTP) Desoxyribonukleosid-Triphosphat werden in den neu synthetisierten DNA-Strang mit eingebaut.

Nach der Markierung wurden nicht gebundene Nukleotide über eine Sephadex G50-Säule (Nick Columns, Pharmacia, Freiburg) abgetrennt.

Hybridisierungsverfahren

Das Prinzip der Hybridisierung besteht darin, dass die markierte, spezifische, einzelsträngige cDNA an die ihr komplementäre, auf Membranen gebundene mRNA möglichst spezifisch bindet. Es entstehen

RNA-DNA-Hybride. Die unspezifischen Bindungen werden mit nachfolgenden Waschschrinen abgewaschen. Die Waschstringenz wird durch Temperatur und Kationen-Konzentration des Waschpuffers reguliert (je höher die Temperatur, je niedriger die Na^+ -Konzentration, desto stringenter). Die Hybridisierungssignale, die aus den RNA-DNA-Hybriden resultieren, können anschließend mit einer Phosphor-Imaging-Technik oder mittels Autoradiographie nachgewiesen werden.

Der technische Ablauf der Hybridisierung war folgender: Die Prähybridisierung und die Hybridisierung erfolgten in Glasflaschen, die im Hybridisierungssofen (GFL Hybridisierungssofen, Burgwedel) rotieren. Pro Flasche wurde eine Membran in 15 ml Puffer gelegt. Um die unspezifische Hintergrundfärbung zu vermindern, wurden die Nylonmembranen zuerst mit Hybridisierungspuffer (5 % SDS, 1 mM EDTA, 50 mM Na-Phosphat, 100 mM NaCl, 50 mM Pipes) ohne die markierte Gensonde im Hybridisierungssofen inkubiert (1 h, 65°C, Hybridisierungsflasche). Die Hybridisierungsreaktion erfolgte mit ^{32}P -markierter einzelsträngiger (hitzedenaturierter) cDNA im Überschuß im Hybridisierungspuffer. Die Nylonmembranen wurden über Nacht (16 bis 18 h) bei einer Temperatur von 65°C in 15 ml Hybridisierungspuffer mit einer spezifischen Aktivität der Gensonde von 1×10^6 cpm/ml inkubiert. Um

unspezifische Bindungen zu eliminieren, wurden die Membranen nach Beendigung der Reaktion dreimal gewaschen. Die Stringenz des Waschens wurde mit der Kationenkonzentration des Waschpuffers (5 % SDS/1xSSC) und durch die Temperatur der drei Waschschrine (1mal 15 min bei Raumtemperatur (RT) und zweimal 15 bzw. 10 min bei 65°C) reguliert. Nach dem Waschen wurden die Membranen bei RT getrocknet und in Plastikfolie eingelegt.

Rehybridisierung

Nachdem die erste Hybridisierung mit der LHB-Sonde und anschließender Signaldetektion abgeschlossen war, wurden alle Membranen nach zwei Wochen gestriipt (10 min in 50 mM EDTA kochen). Mit diesem Vorgang wurden die spezifischen RNA-DNA-Hybride, die bei den folgenden Rehybridisierungen ein Störfaktor sein könnten, getrennt und die ^{32}P -markierte LHB cDNA-Sonde abgewaschen. Die Membranen konnten erneut mit einer neuen radioaktiv markierten Sonde rehybridisiert werden. Es folgten zwei Rehybridisierungen, einmal mit porciner GH cDNA und einmal mit humaner 18S rRNA Sonde.

Das Hybridisierungsverfahren ist in der Tabelle 3-1 dargestellt.

Tabelle 3-1: Verwendete Hybridisierungsverfahren

Verfahren	Parameter
Northern Blot:	
Membran:	Nylon (Hybond)
RNA-Fixierung:	80°C, 1h, UV-Crosslinking
Markierung der DNA-Sonden:	
Sonden:	Insert (spezifische Sequenz) pLH β – 550 bp pGH – 760 bp h18S – 80 bp
Markierung:	Random Priming [α - ³² P]dCTP
DNA-Menge/Hybridisierung:	15x10 ⁶ cpm/Hybridisierung
Hybridisierung:	
Prähybridisierung:	60 min, 65°C
Hybridisierung:	16 – 18h, 65°C
Puffer:	5 % SDS, 1mM EDTA, 50 mM Na-Phosphat, 50 mM Pipes 100 mM NaCl
Waschstringenz:	1xSSC / 5 % SDS 1x15 min, RT 1x15 min, 65°C 1x10 min, 65°C
Nachweis der Hybridisierungssignale:	
Expositionszeiten:	Phosphor Imager: „Imaging Screen“ fötal adult
GH:	10 min 45 min
LH β :	21 h 6 h
18S:	90 min 90 min

Phosphor Imaging

Phosphor Imaging ist ein Geldokumentationssystem, das biologische Signale zu digitalen Daten, die auf dem Computermonitor als zweidimensionale (2-D) Formen erscheinen, konvertiert. Die β -Strahlen der mit der jeweiligen ³²P-markierten Sonde hybridisierten Membran werden zuerst auf einer speziellen Platte (Imaging Screen-BI, BIO RAD Laboratories, Herkules, USA) aufgefangen und von dort mit der Molecular Imager Software (Image Analysis System, Ver.1.5, Bio-Rad, Hercules, USA) digitalisiert.

Die Intensität der unterschiedlichen Signale ist direkt proportional zur Intensität der Graustufen auf dem Monitor (je stärker das Signal, desto dunkler das Bild). Die 2-D-Darstellung reflektiert nicht alle Informationen, die als digitale Daten gespeichert sind. In einer 3-D-Darstellung werden die Signale als „Berge“ dargestellt. Die Stärke bzw. Intensität der

Signale ist im Volumen der „Berge“ repräsentiert. Die digitalisierten Daten spiegeln drei wichtige Teile der Informationen wider. Die „x“- und „y“-Koordinaten (in Millimeter) stellen die genaue Lokalität des Signals und die „z“-Koordinate die Intensität oder optische Dichte (Optical Density = O.D.) des Signals dar. Jedes Signal auf dem Monitor besteht aus tausenden Pixeln, wobei jedes Pixel eine eigene Position hat. Die 2-D- und 3-D-Darstellung eines Signals auf dem Monitor zeigt die Abb. 3-6.

Damit ein Signal als solches sichtbar wird, muss die Anzahl und die Intensität der Pixel höher als die des Hintergrundes sein. Die optische Dichte einer Bande ist als Summe der individuellen Intensität aller Pixel definiert.

Um die optimale Signalintensität zu erreichen, wurden die Membranen in Abstimmung auf das jeweilige Hormon und Altersstadium im Phosphor Imager unterschiedlich lange exponiert (siehe Tabelle 3-1).

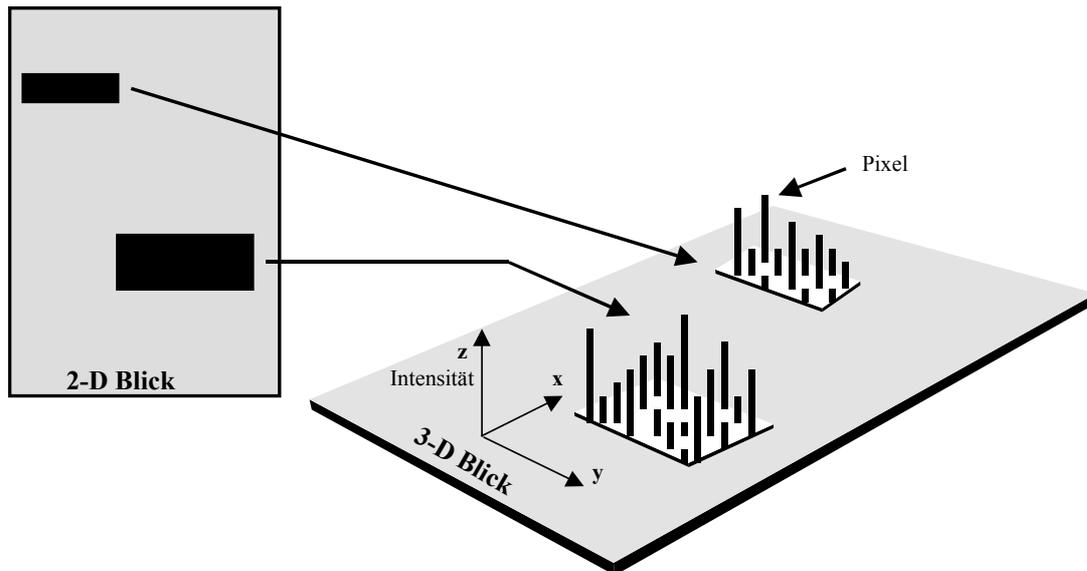


Abb. 3-6: Spezifische Bande als digitales Signal

Densitometrie

Die optische Dichte der Hybridisierungssignale ist ein relatives Maß zum Nachweis der Menge an spezifischer mRNA in der Probe und wurde mit dem Computerprogramm Image Master (Image Master 1D Elite, ver. 3.00, Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg) ausgewertet.

Das gemessene Volumen der Bande ist die Summe der Pixelintensität in der Bande. Bei der Berechnung des Volumens wurde die Hintergrundschwärzung unter jeder Bande automatisch abgezogen.

Alle Proben und Blots wurden durch die methodischen Abläufe möglichst gleich behandelt, um den methodischen Fehler zu minimieren. Um die Proben auf mehreren Membranen miteinander vergleichen zu können, wurde auf jede Membran eine Referenzprobe aufgetragen und deren Expression nach der Hybridisierung statistisch miteinander verglichen.

Durch die Rehybridisierung der Proben mit einer Sonde für humane 18S rRNA wurde geprüft, ob die aufgetragene Menge an Gesamt-RNA für jede Probe übereinstimmt. Die 18S rRNA wurde als interner Standard gewählt, weil diese RNA-Art als ein wesentlicher Bestandteil der Ribosomen in jeder Zelle in relativ konstanter Konzentration vorliegt und das Verhältnis der verschiedenen RNA-Fractionen, die die Gesamt-RNA bilden (75-80 % rRNA, 5-10 % mRNA, Rest tRNA; nach KNIPPERS, 1985), unverändert bleibt. Aus den 18S

rRNA-Signalen für jede einzelne Probe wurden Korrekturfaktoren gebildet, indem aus allen 18S rRNA-Signalen einer Membran (ohne Referenzproben) zunächst ein Mittelwert gebildet wurde und dann die einzelnen 18S-Signale durch diesen Mittelwert dividiert wurden. Die jeweiligen Hormon-Signale (LH β und GH) wurden mit dem für diese Probe spezifischen Korrekturfaktor multipliziert, hieraus ergab sich das korrigierte Volumen bzw. die relative optische Dichte.

3.2.4 Qualitätskriterien der LH β - und GH-Genexpressionsbestimmung

Im Alter von 180 Tagen wurde die LH β - und GH-Genexpression an den KON- und TP30-Tieren untersucht. Die adenohipophysären Gesamt-RNA-Proben zum mRNA-Nachweis wurden auf mehrere Gele bzw. Membranen verteilt. Eine Referenzprobe, auf alle sechs Membranen aufgetragen, diente dazu, die Signalintensität der unterschiedlichen Membranen miteinander zu vergleichen. Die Varianzanalyse der 18S rRNA-Signale für die Referenzprobe ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Membranen ($p = 0,42$) mit einem Variationskoeffizienten (CV) von 8,2 %. Auch für GH mRNA (CV = 17,6 %; $p = 0,14$) und LH β mRNA (CV = 23,0 %, $p = 0,14$) wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede gefunden.

Der Variationskoeffizient der Referenzproben aus den fünf Membranen der fötalen Proben betrug für 18S rRNA 11,3 %. Die Varianzanalyse ergab

keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Membranen ($p = 0,33$). Auch GH mRNA ($CV = 17,3\%$; $p = 0,16$) und LH β mRNA ($CV = 23,2\%$; $p = 0,16$) Signale waren nicht statistisch signifikant voneinander verschieden.

Nach dieser Berechnung konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Hybridisierungsbedingungen für alle fünf Membranen gleich waren – jeweils für die spezifischen Signale der GH-, LH β mRNA und 18S rRNA und somit die Signale der auf ihnen verteilten Proben miteinander verglichen werden konnten.

3.2.5 Statistische Auswertung

Der Einfluss der TP-Behandlung und des Geschlechts auf die Parameter GH mRNA- und LH β mRNA-Niveau, GH- und LH-Konzentration im Blutplasma sowie Körper- und Adenohypophysengewichte wurde in beiden Versuchen statistisch getestet.

Die Analyse erfolgte mittels Procedur GLM (General Linear Model) des SAS-Programmpakets (SAS, Version 6.12, SAS Institute, Carry, North Carolina, USA). Im Modell wurden Geschlecht, Behandlung, Muttersau innerhalb Behandlung, Interaktion zwischen Geschlecht und Behandlung als fixe Effekte berücksichtigt:

$$Y_{ijkl} = \mu + G_i + B_j + M_{jk} + GB_{ij} + e_{ijkl}$$

- Y_{ijkl} = Beobachtungswert
 μ = Gesamtmittelwert des l-ten Einzeltieres
 G_i = Einfluss des i-ten Geschlechts
 (i = weiblich, männlich bzw. Kastraten)
 B_j = Einfluss der j-ten Behandlungsgruppe
 (j = 1-2 (KON, TP30) bzw. 1-3 (KON, TP30, TP40))
 M_{jk} = Einfluss der k-ten Muttersau innerhalb der j-ten Behandlung
 GB_{ij} = Einfluss der Interaktion zwischen Geschlecht und Behandlung
 e_{ijkl} = Restfehler

Multiple Mittelwertvergleiche wurden mit dem Tukey-Kramer Test durchgeführt. Dieser Test berücksichtigt die ungleiche Anzahl der Beobachtungen in den Gruppen. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 5 % ($p \leq 0,05$) wurden die Unterschiede in den Mittelwerten als signifikant eingestuft.

Alle Ergebnisse der statistischen Auswertung werden im Ergebnisteil der Arbeit in den Grafiken als Mittelwert (MW) und Standardfehler des Mittels (SEM) für jede Gruppe dargestellt.

Mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (Kruskal-Wallis 1-way ANOVA, Sigma Stat, Version 2.03, Jandel Scientific, Jandel, CA) wurde getestet, ob die Signalintensität der Referenzproben für 18S rRNA, GH und LH β mRNA Signale auf allen Membranen gleich war (Effekt: Membran).

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Wirkung einer pränatalen Behandlung mit Testosteronpropionat auf die postnatale Steuerung von Wachstum und Reproduktion

3.3.1.1 Geschlechtsbestimmung und Grad der phänotypischen Maskulinisierung

Von 5 Kontrollsaugen (KON) wurden 30 männliche und 22 weibliche Ferkel geboren. Die Wurfgröße betrug $10,4 \pm 1,2$ Ferkel und die durchschnittliche Trächtigkeitsdauer 115 Tage. 11 männliche und 15 weibliche Ferkel der TP30-Gruppe (TP-Behandlung im Abstand von 2 Tagen dreimal ab Tag 30 p.c.) stammten von 3 Saugen. Die TP30-Saugen hatten im Durchschnitt $8,7 \pm 1,2$ Ferkel und eine Trächtigkeitsdauer von 115 Tagen. Es trat eine phänotypische Maskulinisierung der weiblichen Ferkel auf, die unterschiedlich stark ausgeprägt war. Bei einigen Ferkeln waren die äußeren Genitalien kaum verändert. Bei anderen wurde eine anogenitale Distanz (AGD) bis zu 15 mm gemessen und die Vulva war zu einer penisähnlichen Bildung verändert. Im Durchschnitt betrug die gemessene AGD bei den weiblichen TP30-Ferkeln 12 mm und bei den Kontrollferkeln 3 bis 4 mm (Abb. 3-7).

Zwei Saugen, die mit der gleichen TP-Dosierung pro Injektion und über einen längeren Zeitraum behandelt worden waren (TP3040-Gruppe), hatten 9 männliche und 11 weibliche Ferkel. Die Distanz zwischen Vulva bzw. penisähnlichen Bildungen und Anus war sehr variabel. Bei 5 von 11 Tieren kam es durch die TP-Behandlung zu einer Missbildung der Vulva. Sie waren afterlos und es war kein Harnabfluss möglich. Sie waren daher lebensunfähig und wurden gleich nach der Geburt getötet.

In allen drei Gruppen ovulierten einige weibliche Tiere bereits vor dem Tag 180 p.p. und wurden deshalb in den Untersuchungen auf LH β -Genexpression und Plasma-LH-Konzentration aus der Berechnung herausgenommen. Es sollten nur Tiere im präpuberalen Stadium untersucht werden. Damit blieben in der TP3040-Gruppe nur zwei weibliche Tiere übrig. Wegen der sehr geringen Gruppengröße wurden die weiblichen und

männlichen Tiere der TP3040-Gruppe in der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt. Die

Anzahl der Tiere für die statistische Auswertung ist aus der Tabelle 3-2 zu entnehmen.

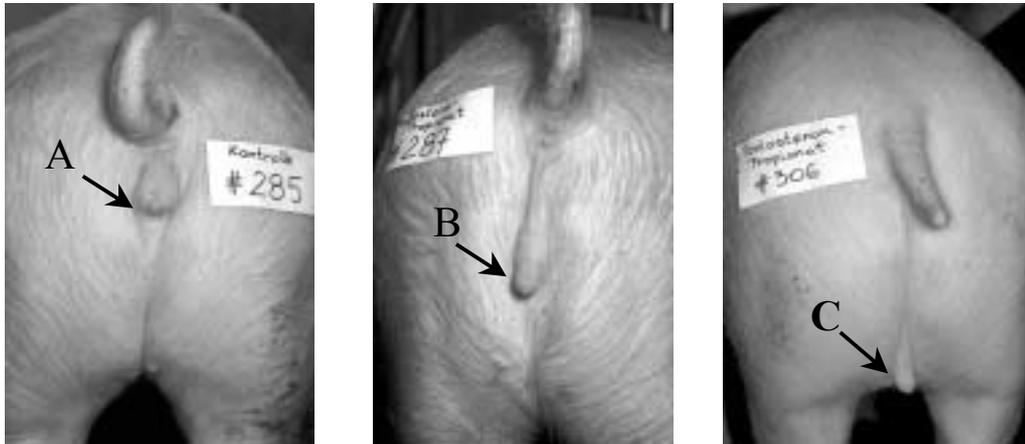


Abb. 3-7: Äußeres Genitale im Alter von 180 Tagen: A: Kontrollsau; B, C: unterschiedlich stark vergrößerte ano-genitale Distanz (AGD). Die Sauen waren durch das Muttertier dreimal im Abstand von 2 Tagen ab Tag 30 p.c. mit Testosteronpropionat behandelt worden.

Tabelle 3-2: Anzahl der Tiere in den Versuchsgruppen

Versuchsgruppe	GH-Nachweis	LH-Nachweis
KON-weiblich	9	6
KON-Kastraten	10	10
TP30-weiblich	9	7
TP30-Kastraten	6	6

3.3.1.2 Die Gewichtsentwicklung

Es bestand kein Geschlechtsunterschied bei allen lebend geborenen Ferkel im Geburtsgewicht ($p = 0,59$), aber ein Behandlungseffekt ($p = 0,045$); die TP30-Ferkel waren bei der Geburt leichter als die KON-Ferkel (Abb. 3-8). Innerhalb Geschlecht bestand kein signifikanter Behandlungseffekt. Zwischen den Geschlechtern gab es keinen

Gewichtsunterschied.

Für die Hormonanalyse am Tag 180 p.p. wurden aus jedem Wurf von jeder Behandlung und von jedem Geschlecht zwei bis drei Tiere zufällig ausgewählt. Die Abb. 3-9 zeigt den Verlauf der Gewichtsentwicklung der ausgesuchten Tiere.

Die Tiere entwickelten sich gleichmäßig bis zum Alter von 6 Monaten. Weder das Geschlecht der Tiere noch die TP-Behandlung der Mütter hatten zu keinem der beobachteten Zeitpunkte einen Einfluss auf die Gewichtsentwicklung.

Zwischen dem 4. und 6. Lebensmonat betrug die Gewichtszunahme der weiblichen Kontrolltiere im Durchschnitt $25,7 \pm 3,3$ kg und der weiblichen TP30-Tiere $29,2 \pm 0,1$ kg. Das bedeutet, dass weibliche TP30-Tiere um 13,6 % mehr zugewachsen waren. Die Gewichtszunahme der männlichen Tiere beider Gruppen war nicht unterschiedlich (KON-Kastraten: $27,8 \pm 1,8$ kg und TP30-Kastraten: $28,3 \pm 3,3$).

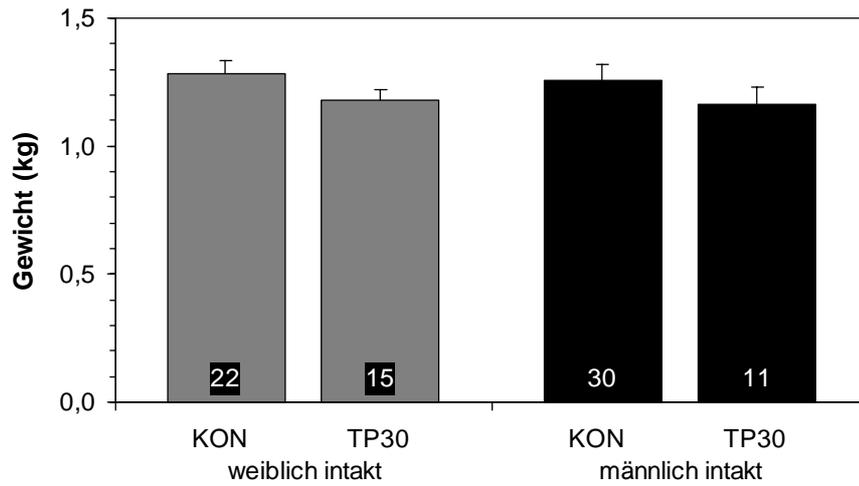


Abb. 3-8: Geburtsgewichte aller lebend geborenen Kontrollferkel (KON) und der Ferkel, die im Abstand von 2 Tagen dreimal ab Tag 30 p.c. über das Muttertier mit Testosteronpropionat (TP30) behandelt worden waren (Behandlung: $p < 0,05$).

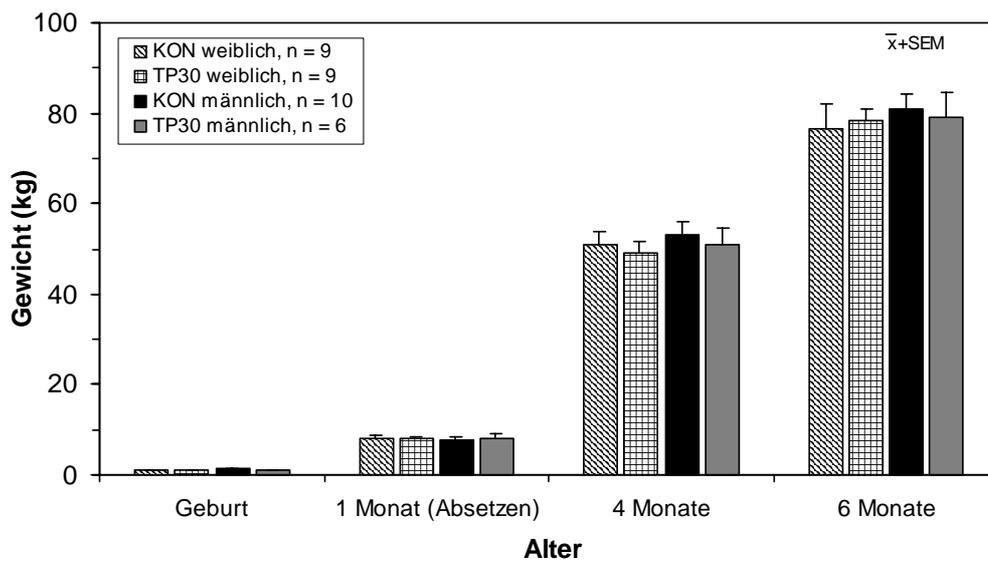


Abb. 3-9: Gewichtsentwicklung der Kontrollschweine (KON) und der Schweine, die im Abstand von 2 Tagen dreimal ab Tag 30 p.c. über das Muttertier mit Testosteronpropionat (TP30) behandelt worden waren.

3.3.1.3 LH-Sekretion

Die Abb. 3-10 zeigt das 8stündige LH-Sekretionsmuster repräsentativer Tiere aus jeder Behandlungsgruppe. Die Beobachtung der einzelnen LH-Sekretionsprofile zeigt, dass bei weiblichen Kontrolltieren die LH-Pulse innerhalb von 8 Stunden bis zu dreimal vorkamen und bei den weiblichen TP30-Tieren ein bis viermal. Eine unterschiedliche Pulsamplitude war aus der Betrachtung nicht zu ersehen, auch die Basalwerte lagen etwa auf gleichem Niveau.

Sowohl die Kastraten der KON-Gruppe als auch die Kastraten der TP30-Gruppe hatten im Vergleich zu weiblichen Schweinen höhere LH-Sekretionswerte. Die LH-Pulse traten in beiden Kastraten-Gruppen viel häufiger auf als bei den weiblichen Schweinen mit dem Unterschied, dass die Amplitude nicht so hoch

war. In der Abb. 3-11 sind die Mittelwerte des 8stündigen LH-Sekretionsprofils für alle Tiere der vier Behandlungsgruppen zusammengefasst. Da LH-Pulse zu unterschiedlichen Zeiten in den einzelnen Profilen auftraten, unterlagen die Mittelwerte starken Schwankungen.

Bei den Kastraten verlief die tonische LH-Sekretion über einen Zeitraum von 8 Stunden auf höherem Niveau als bei den weiblichen Tieren (Abb. 3-12).

Es fand sich ein deutlicher Unterschied in der Plasma-LH-Konzentration zwischen männlichen Kastraten und weiblichen Tieren ($p < 0,001$). Die pränatale Maskulinisierung hatte hingegen keinen gesicherten Einfluss auf die Plasma-LH-Mittelwerte ($p = 0,26$), ebenso wurde keine Interaktion festgestellt. Gleichermäßen ergab sich innerhalb des Geschlechts kein Behandlungseffekt.

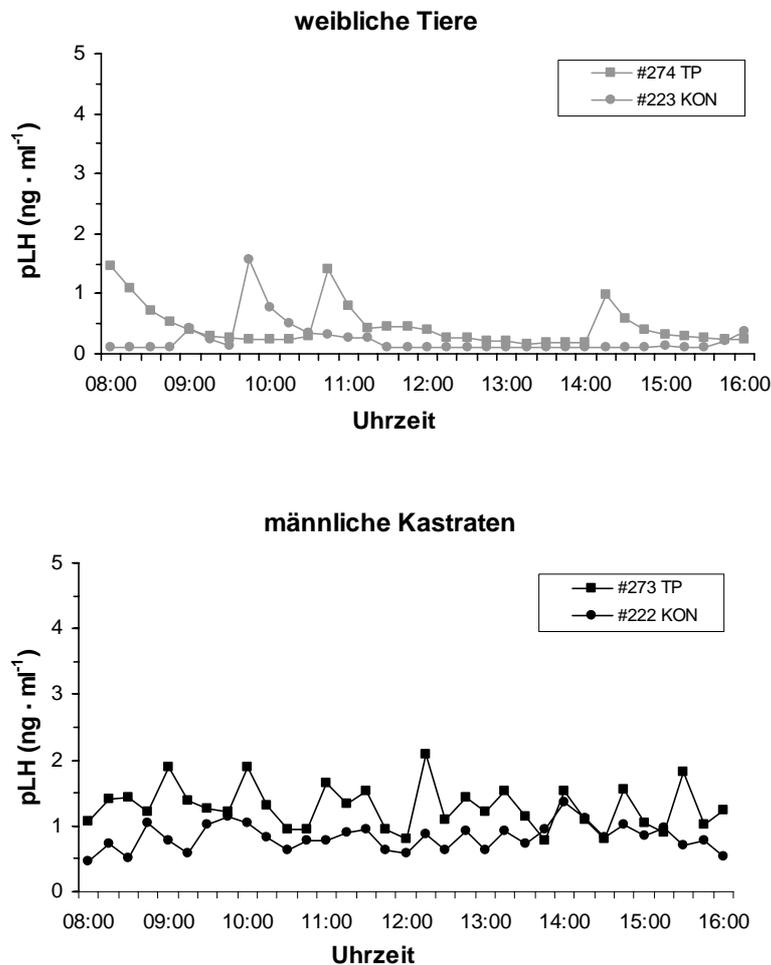


Abb. 3-10: Individuelle Plasma-LH 8-Stunden-Profile der 180 Tage alten Kontrolltiere (KON) und der Schweine, die im Abstand von 2 Tagen dreimal ab Tag 30 p.c. über das Muttertier mit Testosteronpropionat (TP30) behandelt worden waren (# = Tiernummer).

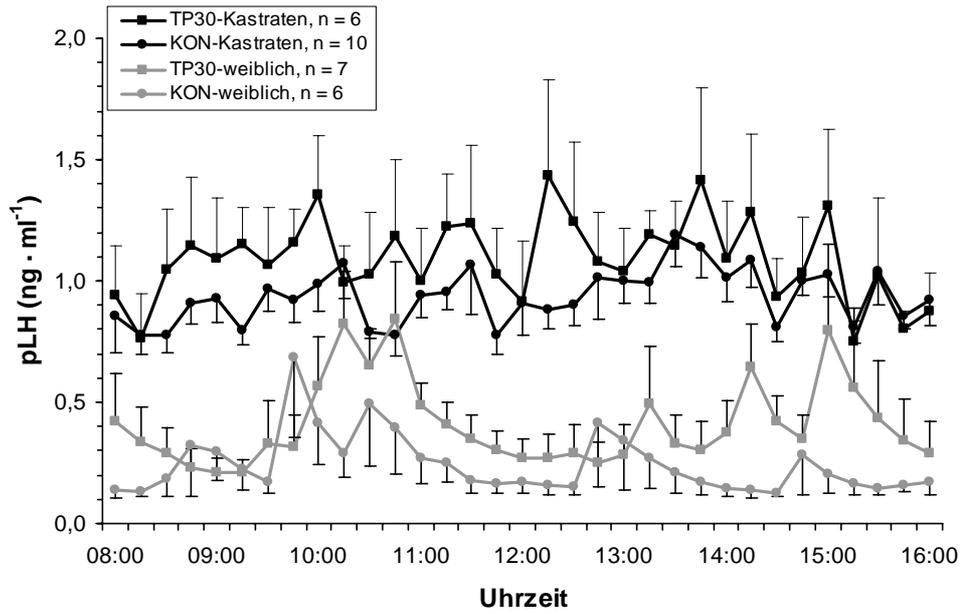


Abb. 3-11: Plasma-LH-Mittelwerte ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) der 8-Stunden-Profile der Kontrolltiere (KON) und der Schweine, die im Abstand von 2 Tagen dreimal ab Tag 30 p.c. über das Muttertier mit Testosteronpropionat (TP30) behandelt worden waren (Geschlecht bzw. Kastration: $p < 0,001$).

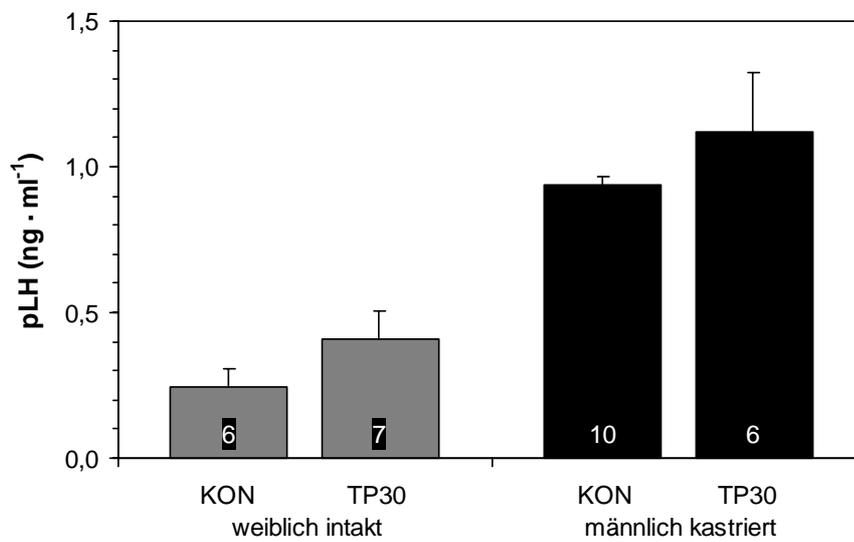


Abb. 3-12: Plasma-LH-Mittelwerte ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) der 8-Stunden-Profile der 180 Tage alten Kontrolltiere (KON) und der Schweine, die im Abstand von 2 Tagen dreimal ab Tag 30 p.c. über das Muttertier mit Testosteronpropionat (TP30) behandelt worden waren (Geschlecht bzw. Kastration: $p < 0,001$).

3.3.1.4 GH-Sekretion

GH wird sowohl von Kontrolltieren als auch von pränatal maskulinisierten Tieren unregelmäßig pulsatil ausgeschüttet. Die Betrachtung der einzelnen GH-Profile zeigte, dass innerhalb von 8 Stunden ein bis drei GH-Pulse auftreten. Die Plasma-GH-Konzentrationen der 8 Stunden-Profile repräsentativer Tiere aus jeder Gruppe sind in der Abb. 3-13 dargestellt.

Aus allen Werten eines 8-Stunden-Profils wurden für jedes einzelne Tier Mittelwerte gebildet und diese dann für die Behandlungsgruppen gemittelt. Diese Mittelwerte sind der Abb. 3-14 zu entnehmen. Der Plasma-GH-Mittelwert der weiblichen Tiere

unterscheidet sich unabhängig von der Behandlung nicht vom Mittelwert der Kastraten ($p = 0,79$).

Der statistische Vergleich der KON- und TP30-Gruppen unabhängig vom Geschlecht weist auf tendenzielle Unterschiede der Plasma-GH-Mittelwerte der behandelten Gruppen hin ($p = 0,084$). Es wurde auch eine Interaktion gefunden ($p = 0,018$). Während es innerhalb der weiblichen Tiere einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der TP30- und KON-Gruppe gibt ($p = 0,021$) – die Plasma-GH-Konzentration ist bei den weiblichen TP30-Tieren mehr als doppelt so hoch als bei den KON-Tieren – findet sich bei den Kastraten in den Plasma-GH-Konzentrationen kein Unterschied.

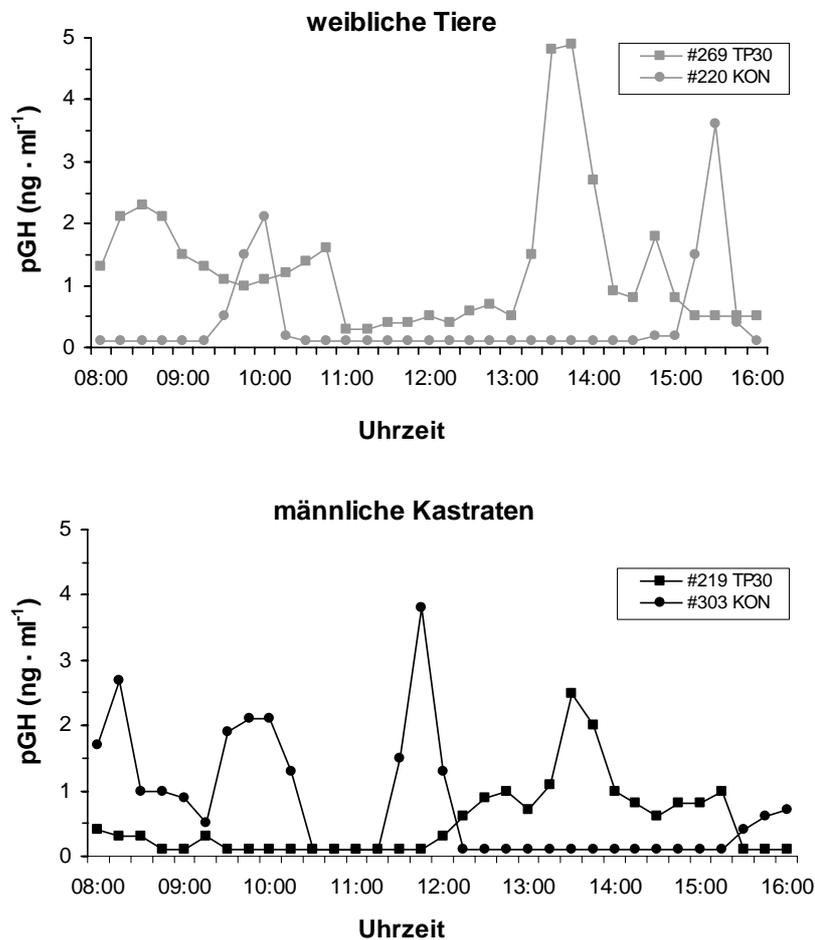


Abb. 3-13: Individuelle Plasma-GH 8-Stunden-Profile der 180 Tage alten Kontrolltiere (KON) und der Schweine, die im Abstand von 2 Tagen dreimal ab Tag 30 p.c. über das Muttertier mit Testosteronpropionat (TP30) behandelt worden waren (# = Tiernummer).

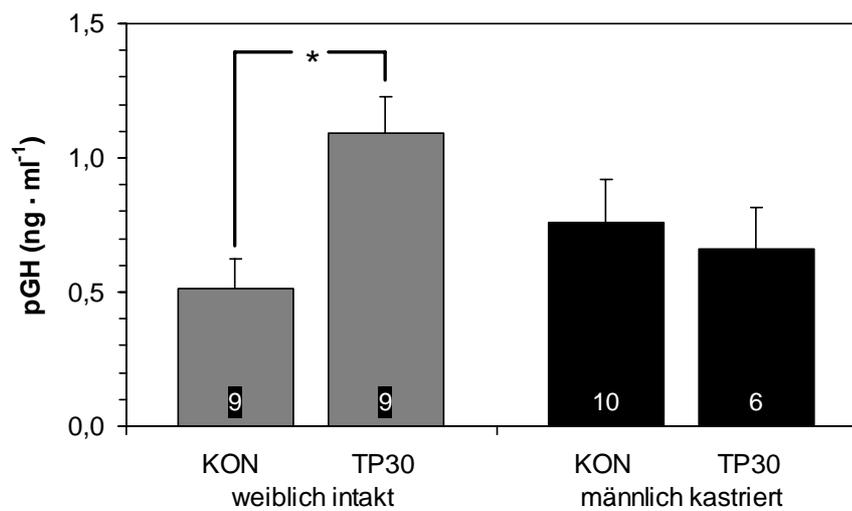


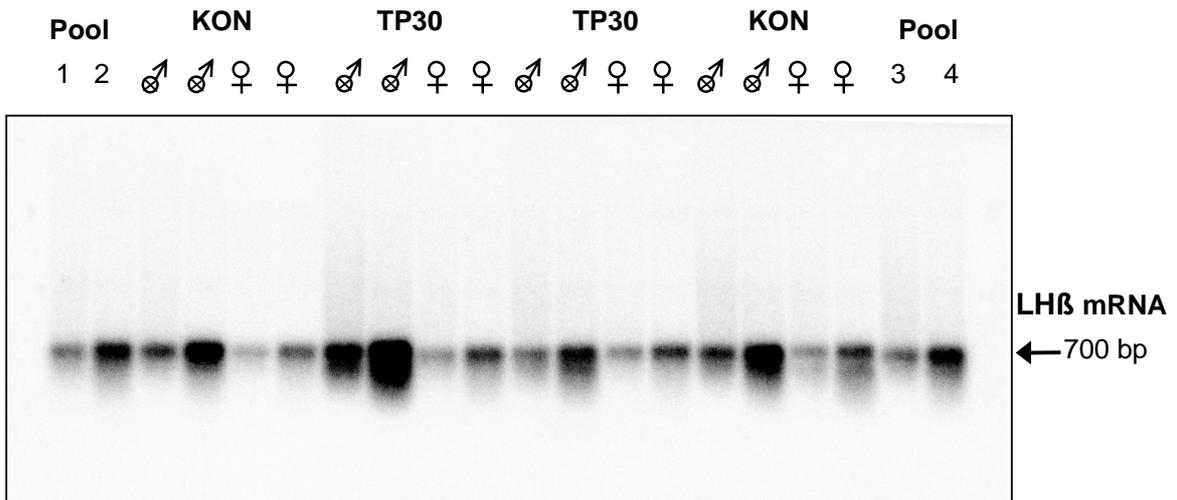
Abb. 3-14: Plasma-GH-Mittelwerte ($\bar{X} + \text{SEM}$) der 8-Stunden-Profile der 180 Tage alten Kontrolltiere (KON) und der Schweine, die im Abstand von 2 Tagen dreimal ab Tag 30 p.c. über das Muttertier mit Testosteronpropionat (TP30) behandelt worden waren (* : $p < 0,05$).

3.3.1.5 *LH β -Genexpression*

Die Abb. 3-15 zeigt die repräsentative Northern Blot Analyse einer Membran. Die Mittelwerte der Proben aus sechs Membranen sind in der Abb. 3-16 dargestellt.

Für die LH β mRNA wiesen männliche Kastraten ein deutlich höheres Niveau auf als weibliche intakte Tiere ($p < 0,001$). Ein Behandlungseffekt oder eine Interaktion zwischen Geschlecht bzw. Kastration und Behandlung wurden nicht festgestellt.

A:



B:

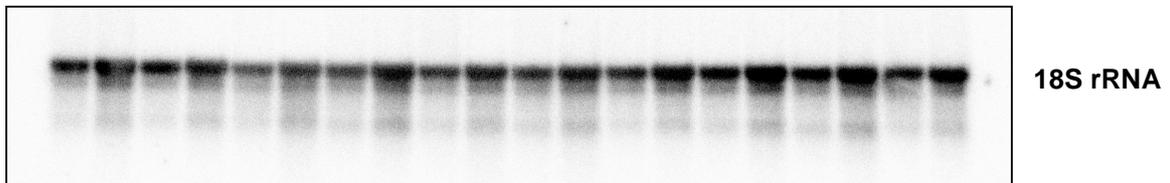


Abb. 3-15: A: Repräsentative Northern Blot Analyse für LHβ mRNA aus der Adenohypophyse der 180 Tage alten Kontrolltiere (KON) und der Schweine, die im Abstand von 2 Tagen dreimal ab Tag 30 p.c. über das Muttertier mit Testosteronpropionat (TP30) behandelt worden waren. Von jeder Probe eines Tieres wurden 2,5 und 5,0 µg adenohypophysärer Gesamt-RNA aufgetragen. Pool 1, 2, 3, 4: Referenzproben mit 2,5 bzw. 5,0 µg Gesamt-RNA. Nylonmembranen wurden mit [α-³²P] dCTP-markierter porciner LHβ cDNA hybridisiert und die Signale wurden mit Phosphor Imager detektiert (Expositionszeit: 6 Stunden). B: Northern Blot Analyse des gleichen Blots mit humaner 18S rRNA rehybridisiert (Expositionszeit: 90 Minuten).

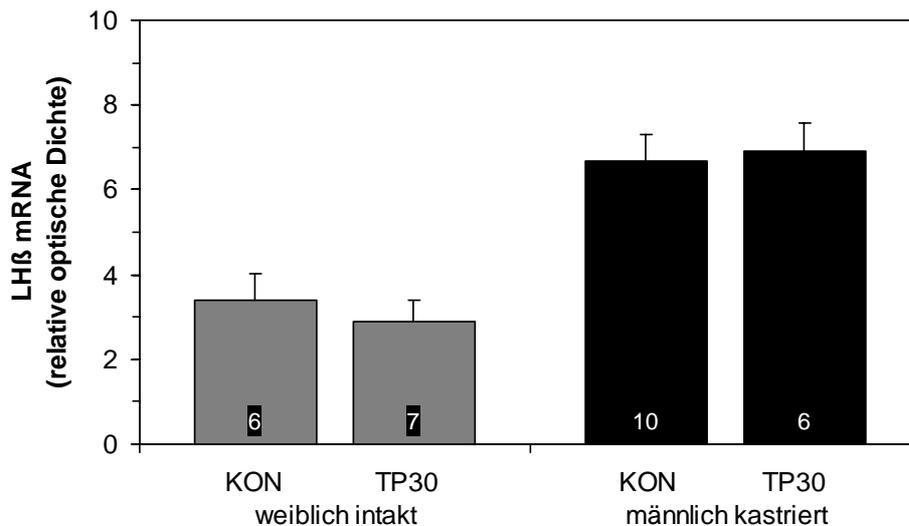


Abb. 3-16: LHβ mRNA-Niveau (relative optische Dichte, \bar{x} + SEM) in der Adenohypophyse der 180 Tage alten Kontrolltiere (KON) und der Schweine, die im Abstand von 2 Tagen dreimal ab Tag 30 p.c. über das Muttertier mit Testosteronpropionat (TP30) behandelt worden waren (Geschlecht bzw. Kastration: $p < 0,001$).

3.3.1.6 GH-Genexpression

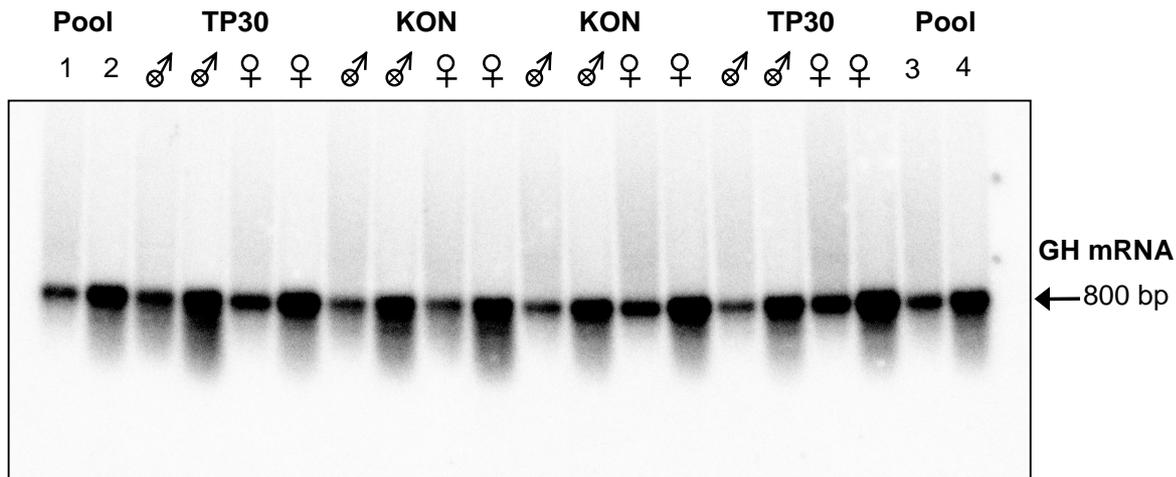
Die Abb. 3-17 zeigt einen repräsentativen Northern Blot für GH mRNA und 18S rRNA von 180 Tage alten Schweinen.

Wie aus der Abb. 3-17 und der Abb. 3-18 hervorgeht, konnten weder zwischen weiblichen intakten und männlichen kastrierten Schweinen noch für die Behandlung statistisch signifikante

Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden. Die in Abb. 3-17 erkennbaren deutlichen Unterschiede in der Signalintensität sind auf die beiden unterschiedlichen Konzentrationen der Gesamt-RNA für jede Probe zurückzuführen.

Sowohl die weibliche als auch die männliche TP30-Gruppe zeigen in der Tendenz etwas niedrigere GH mRNA-Mittelwerte ($p = 0,083$).

A:



B:

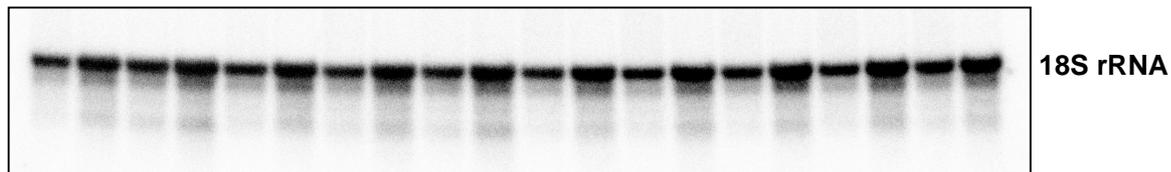


Abb. 3-17: A: Repräsentative Northern Blot Analyse für GH mRNA aus der Adenohypophyse der 180 Tage alten Kontrolltiere (KON) und der Schweine, die im Abstand von 2 Tagen dreimal ab Tag 30 p.c. über das Muttertier mit Testosteronpropionat (TP30) behandelt worden waren. Von jeder Probe eines Tieres wurden 2,5 und 5,0 μg adenohypophysärer Gesamt-RNA aufgetragen. Pool 1, 2, 3, 4: Referenzproben mit 2,5 bzw. 5,0 μg Gesamt-RNA. Nylonmembranen wurden mit [α - ^{32}P] dCTP-markierter porciner LH β cDNA hybridisiert und die Signale wurden mit Phosphor Imager detektiert (Expositionszeit: 45 Minuten). B: Northern Blot Analyse des gleichen Blots mit humaner 18S rRNA rehybridisiert (Expositionszeit: 90 Minuten).

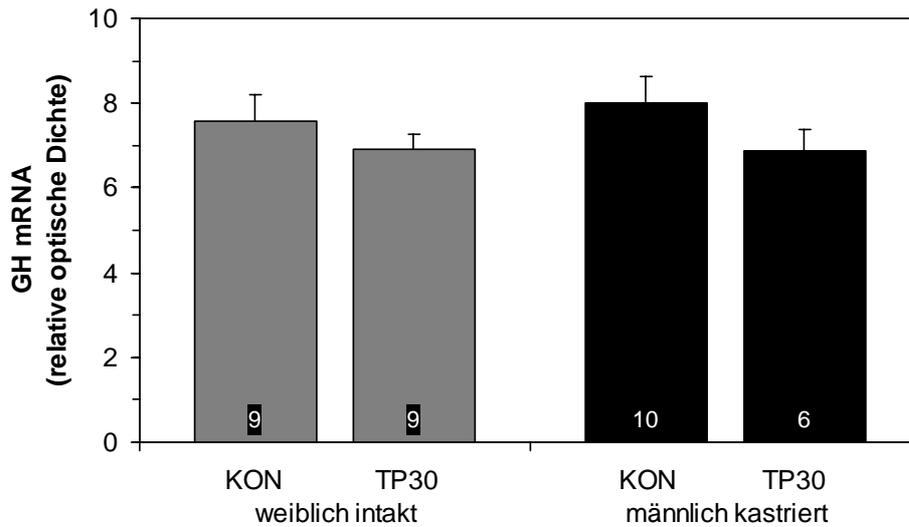


Abb. 3-18: GH mRNA-Niveau (relative optische Dichte, $\bar{x} \pm \text{SEM}$) in der Adenohypophyse der 180 Tage alten Kontrolltiere (KON) und der Schweine, die im Abstand von 2 Tagen dreimal ab Tag 30 p.c. über das Muttertier mit Testosteronpropionat (TP30) behandelt worden waren.

3.3.2 Wirkung einer pränatalen Behandlung mit Testosteronpropionat auf den Fötus am Tag 80 p.c.

3.3.2.1 Geschlechtsbestimmung und Grad der phänotypischen Maskulinisierung

Bei der Laparotomie am Tag 80 p.c. wurden Wurfgröße und Geschlecht der Föten bestimmt. Die Wurfgröße der Kontrollsauern betrug durchschnittlich $7,8 \pm 0,5$ Föten mit 15 männlichen und 24 weiblichen Föten. In der TP30-Gruppe wurden von 3 Sauen 15 männliche und 13 weibliche Föten entnommen, durchschnittlich $9,3 \pm 0,9$ Föten pro Sau. Die 3 Sauen aus der TP40-Gruppe hatten durchschnittlich $7,3 \pm 0,9$ Föten (insgesamt 11 männliche und 11 weibliche).

An den TP behandelten weiblichen Tieren wurde zum Teil eine starke phänotypische Maskulinisierung festgestellt. Der Grad der phänotypischen

Maskulinisierung der weiblichen Föten wurde durch Messung der ano-genitalen Distanz (AGD) erfasst. In Abb. 3-19 sind die externen Genitalien der weiblichen KON-Föten und der TP30- und TP40-Föten schematisch dargestellt.

In der Kontrollgruppe betrug die AGD 2 mm. Dreimalige i.m. TP-Behandlung der Muttertiere mit insgesamt 4,5 g TP beginnend am Tag 30 p.c. verursachte eine partielle Maskulinisierung der weiblichen Föten (TP30) mit einer penisähnlichen Ausbildung der Vulva und Vergrößerung der AGD. Die durchschnittlich gemessene AGD dieser Föten betrug $8,0 \pm 3$ mm, wobei die AGD bei verschiedenen Föten sehr stark variierte – zwischen 3,0 und 18,0 mm. An den weiblichen Föten, deren Mütter später in der Trächtigkeit behandelt worden waren (TP40), konnte keine sichtbare Maskulinisierung des äußeren Genitals festgestellt werden.

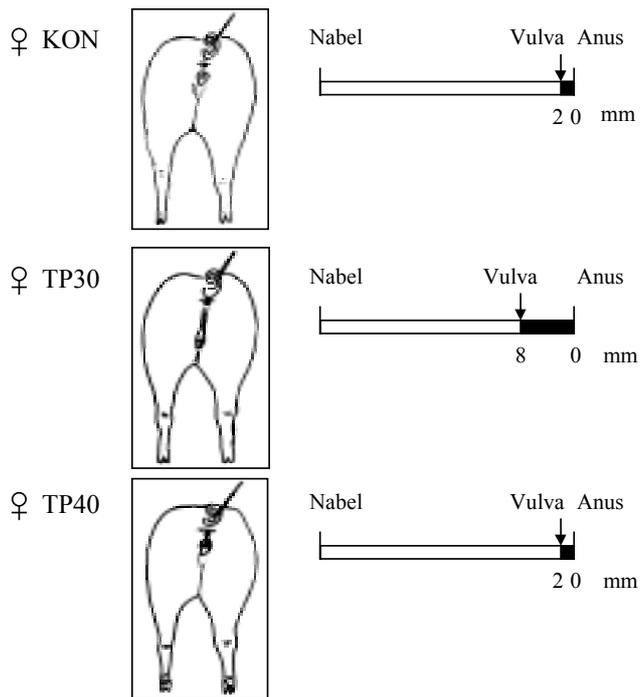


Abb. 3-19: Schematische Darstellung der phänotypischen Maskulinisierung der 80 Tage alten Kontrollföten (KON) und der Föten, die im Abstand von 2 Tagen dreimal ab Tag 30 p.c. (TP30) oder dreimal ab Tag 40 p.c. (TP40) über das Muttertier mit Testosteronpropionat behandelt worden waren.

3.3.2.2 Körper- und Adenohypophysengewichte

Tabelle 3-3 gibt einen Überblick über die Körper- und Adenohypophysen-Gewichte sowie auch über die gewonnene Gesamt-RNA aus den Adenohypophysen der untersuchten Föten.

Im Durchschnitt wogen die Föten im Alter von 80 Tage 412 ± 9 g. Für das Körpergewicht zeigte sich kein Effekt des Geschlechtes, jedoch der Behandlung ($p = 0,017$). Die TP30-Föten waren im Durchschnitt leichter als KON-Föten ($p = 0,023$). Die TP40-Föten unterschieden sich dagegen nicht von den KON-Föten. Leicht höhere Gewichte der TP40-Föten im Vergleich zu den TP30-Föten zeigten sich nur in der Tendenz ($p = 0,056$). Es wurde keine Interaktion zwischen Geschlecht und Behandlung gefunden.

In den Adenohypophysengewichten wurden keine Unterschiede gefunden, es gab weder Behandlungs- noch Geschlechtseffekte. Zwischen diesen beiden

Effekten wurde auch keine Interaktion festgestellt. Die Varianzanalyse des Parameters „Ausbeute an Gesamt-RNA pro Adenohypophyse“ ergab keinen Geschlechtsunterschied. Es zeigte sich jedoch ein Behandlungseffekt ($p < 0,001$). Aus den Adenohypophysen der TP30-Föten wurde mehr Gesamt-RNA gewonnen als aus den Adenohypophysen der KON-Föten ($p = 0,05$). Auch aus den Adenohypophysen der TP40-Föten wurde mehr Gesamt-RNA isoliert als aus den Adenohypophysen der TP30-Föten ($p = 0,021$) und KON-Föten ($p < 0,001$).

Getrennt nach Geschlecht zeigte sich, dass die weiblichen KON-Föten im Vergleich zu den weiblichen TP40-Föten eine niedrigere Gesamt-RNA Ausbeute haben ($p = 0,02$). Bei männlichen KON-Föten war die Gesamt-RNA Ausbeute niedriger als bei TP40-Föten ($p = 0,021$).

Tabelle 3-3: Körper- und Adenohypophysengewichte sowie Gesamt-RNA-Menge der 80 Tage alten Kontrollföten (KON) und der Föten, die im Abstand von 2 Tagen dreimal ab Tag 30 p.c. (TP30) oder dreimal ab Tag 40 p.c. (TP40) über das Muttertier mit Testosteronpropionat behandelt worden waren.

Gruppe / Geschlecht	Föten-anzahl	Körpergewicht (g)		Adenohypophysen-Gewicht (mg)		Gesamt-RNA (µg)		Gesamt-RNA/mg Adenohypophyse (µg/mg)	
		MW	± SEM	MW	± SEM	MW	± SEM	MW	± SEM
KON / weiblich	17	431	19	8,5	0,3	13,2	0,6	1,6	0,09
TP30 / weiblich	13	377	21	8,4	0,5	14,8	0,1	1,8	0,07
TP40 / weiblich	11	400	17	8,3	0,6	15,9	1,4	1,9	0,10
KON / männlich	11	410	27	8,6	0,5	13,8	0,9	1,6	0,08
TP30 / männlich	12	414	21	9,3	0,4	16,9	0,9	1,8	0,07
TP40 / männlich	11	438	23	9,7	0,7	18,3	1,6	1,9	0,11

3.3.2.3 LHB-Genexpression

Ein Beispiel für eine Northern Blot Analyse für LHB mRNA und 18S rRNA zeigt die Abb. 3-20.

Das Niveau der um die 18S rRNA-Signaldichte korrigierten LHB mRNA-Signale für jede Behandlungsgruppe ist im Säulendiagramm der Abb. 3-21 veranschaulicht.

In der Konzentration der LHB-Subunit wurde über alle Gruppen ein Geschlechtsunterschied festgestellt ($p < 0,001$). Das LHB mRNA-Niveau der weiblichen Föten ist höher als das der männlichen Föten.

Es ergab sich ein Behandlungseffekt für das LHB mRNA-Niveau ($p = 0,017$). Die TP40-Föten wiesen von KON-Föten signifikant unterschiedliche Werte

auf ($p = 0,04$). Für die TP30-Föten konnte kein Behandlungseffekt im Vergleich zu KON-Föten festgestellt werden ($p = 0,89$). Die TP30-Föten wiesen jedoch signifikant höhere LHB mRNA-Werte auf als TP40-Föten ($p = 0,016$).

Die weiblichen TP30-Föten hatten das höchste LHB mRNA-Niveau, das im Vergleich zu den weiblichen TP40-Föten signifikant höher war ($p = 0,04$). Eine signifikant höhere LHB mRNA-Konzentration hatten weiblichen TP30-Föten auch im Vergleich zu den männlichen KON-Föten ($p = 0,003$), männlichen TP30-Föten ($p < 0,001$) und männlichen TP40-Föten ($p < 0,001$). Die weiblichen TP40-Föten hatten ähnlich niedriges LHB mRNA-Niveau wie die männlichen Föten.

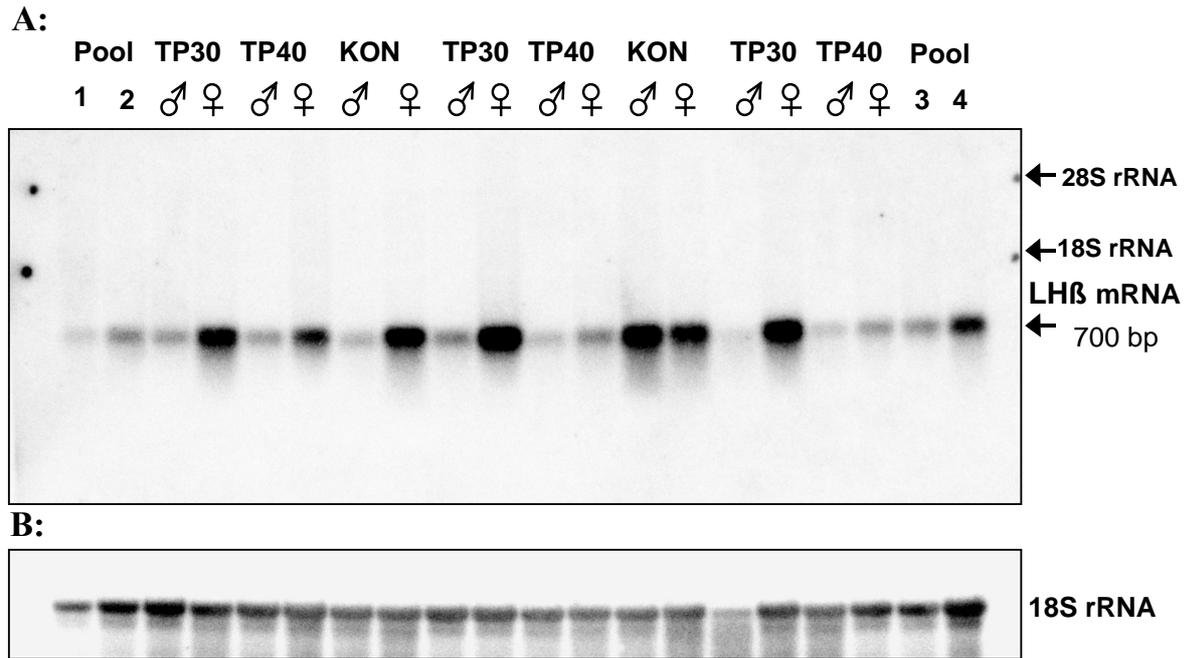


Abb. 3-20: A: Repräsentative Northern Blot Analyse für LH β mRNA aus der Adenohypophyse der 80 Tage alten Kontrollföten (KON) und der Föten, die im Abstand von 2 Tagen dreimal ab Tag 30 p.c. (TP30) oder dreimal ab Tag 40 p.c. (TP40) über das Muttertier mit Testosteronpropionat behandelt worden waren. Von jeder Probe eines Tieres wurden 5,0 μ g adenohypophysärer Gesamt-RNA aufgetragen. Pool 1, 2, 3, 4: Referenzproben mit 2,5, 5,0 bzw. 10,0 μ g Gesamt-RNA. Nylonmembranen wurden mit [α - 32 P] dCTP-markierter porciner LH β cDNA hybridisiert und die Signale wurden mit Phosphor Imager detektiert (Expositionszeit: 21 Stunden). B: Northern Blot Analyse des gleichen Blots mit humaner 18S rRNA rehybridisiert (Expositionszeit: 90 Minuten).

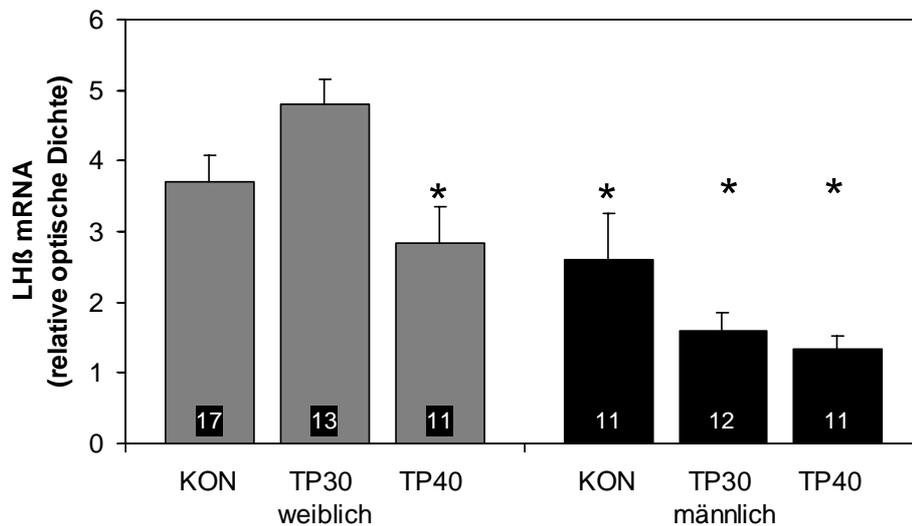


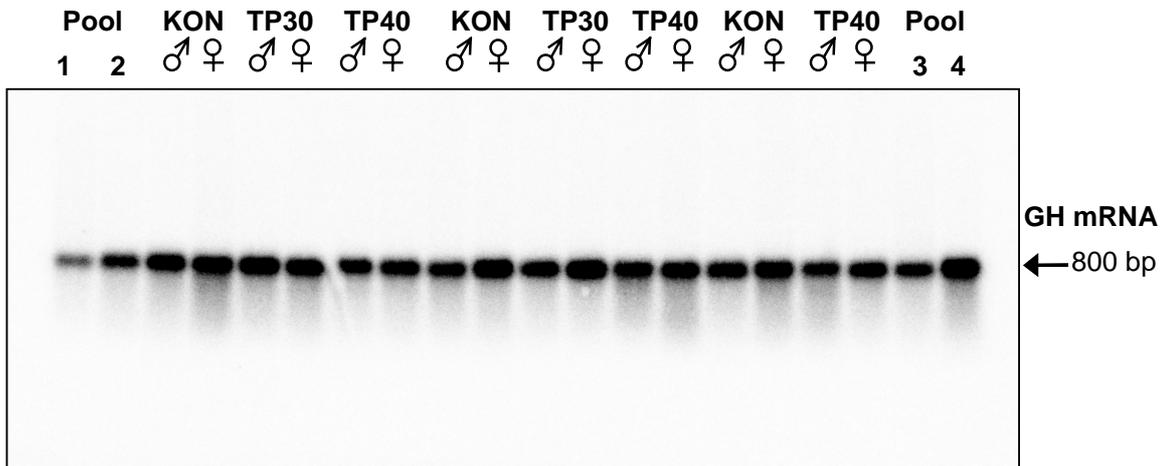
Abb. 3-21: LH β mRNA-Niveau (relative optische Dichte, \bar{X} +SEM) in der Adenohypophyse der 80 Tage alten Kontrollföten (KON) und der Föten, die im Abstand von 2 Tagen dreimal ab Tag 30 p.c. (TP30) oder dreimal ab Tag 40 p.c. (TP40) über das Muttertier mit Testosteronpropionat behandelt worden waren (Geschlecht: p < 0,001; * signifikant von TP30-weiblich, p < 0,05).

3.3.2.4 GH-Genexpression

Die Abb. 3-22 zeigt exemplarisch einen Blot für eine GH mRNA- und 18S rRNA-Analyse am 80. Tag der Fötalentwicklung. In diesem Fötalstadium konnte kein statistisch signifikanter Geschlechtsunterschied

der GH mRNA-Konzentration gefunden werden ($p = 0,13$) (Abb. 3-23). Sowohl die TP-Behandlung am Tag 30 p.c. wie auch am Tag 40 p.c. hatte keinen Effekt auf die GH mRNA-Signalintensität der verschiedenen Behandlungsgruppen.

A:



B:

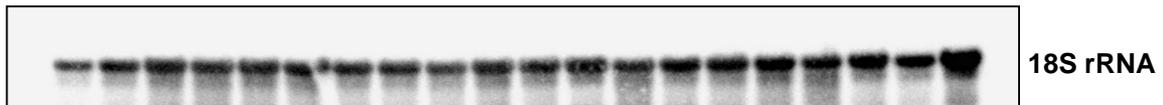


Abb. 3-22: A: Repräsentative Northern Blot Analyse für GH mRNA aus der Adenohypophyse der 80 Tage alten Kontrollföten (KON) und der Föten, die im Abstand von 2 Tagen dreimal ab Tag 30 p.c. (TP30) oder dreimal ab Tag 40 p.c. (TP40) über das Muttertier mit Testosteronpropionat behandelt worden waren. Von jeder Probe eines Tieres wurden 5,0 μg adenohypophysärer Gesamt-RNA aufgetragen. Pool 1, 2, 3, 4: Referenzproben mit 2,5, 5,0 bzw. 10,0 μg Gesamt-RNA. Nylonmembranen wurden mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP-markierter porciner GH cDNA hybridisiert und die Signale wurden mit Phosphor Imager detektiert (Expositionszeit: 10 Minuten). B: Northern Blot Analyse des gleichen Blots mit humaner 18S rRNA rehybridisiert (Expositionszeit: 90 Minuten).

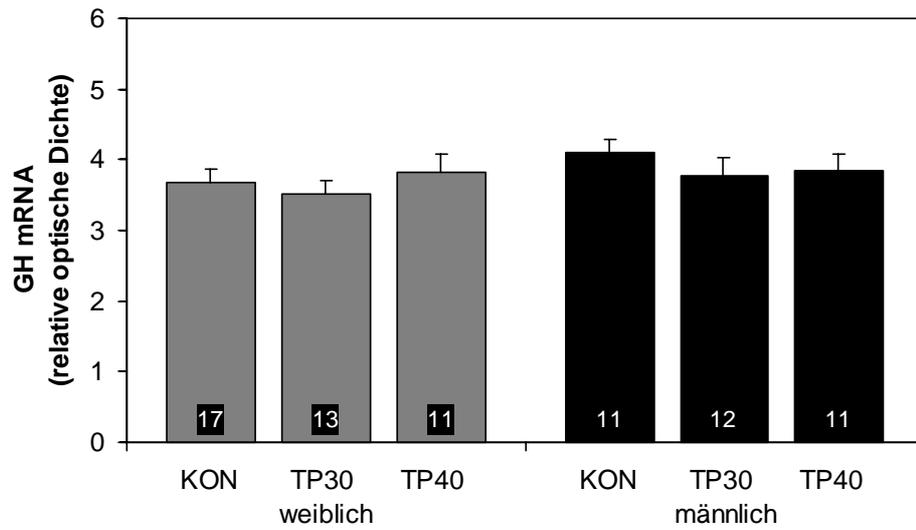


Abb. 3-23: GH mRNA-Niveau (relative optische Dichte, $\bar{X} + \text{SEM}$) in der Adenohypophyse der 80 Tage alten Kontrollföten (KON) und der Föten, die im Abstand von 2 Tagen dreimal ab Tag 30 p.c. (TP30) oder dreimal ab Tag 40 p.c. (TP40) über das Muttertier mit Testosteronpropionat behandelt worden waren.

3.4 Diskussion

3.4.1 Einfluss der pränatalen TP-Behandlung auf die phänotypische Maskulinisierung

Pränatal injiziertes Testosteron führt zu Veränderungen der phänotypischen Ausprägung der äußeren Geschlechtsorgane weiblicher Tiere, wenn es in der „kritischen Phase“ der Geschlechtsdifferenzierung appliziert wird.

Bei den in der vorliegenden Arbeit dargestellten Untersuchungen wurde durch die TP-Behandlung von Muttersauen zwischen dem 30. und 34. Trächtigkeitstag eine unterschiedlich starke Vergrößerung der ano-genitalen Distanz (AGD) ihrer weiblichen Nachkommen erzielt: von einer nur wenig vergrößerten AGD bis hin zur Veränderung der Vulva zu einer penisähnlichen Ausbildung. Diese Veränderungen waren sowohl bei Föten im Alter von 80 Tagen p.c. als auch bei neugeborenen Ferkeln und Schweinen am 180. Lebenstag zu erkennen. ELSAESSER et al. (1978) beschrieben eine vollständige phänotypische Maskulinisierung (leerer Skrotalsack, Penis) weiblicher Schweine nach direkter transuteriner TP-Behandlung der Föten am Tag 30 p.c. Eine partielle Maskulinisierung der äußeren Geschlechtsorgane (vergrößerte AGD) beobachteten ELSAESSER und PARVIZI (1979) sowie FORD und CHRISTENSON (1987) bei weiblichen Nachkommen, die ab Tag 30 p.c. über das Muttertier mit TP behandelt worden waren.

Obwohl allen Sauen innerhalb eines Versuchs die gleiche Testosteronmenge während der gleichen Behandlungsperiode injiziert wurde, ließen sich bei den weiblichen Nachkommen große individuelle Unterschiede in der Ausprägung der phänotypischen Maskulinisierung beobachten. Eine ähnliche Variabilität der Veränderung der äußeren Geschlechtsorgane bei gleicher Behandlung der Muttertiere mit Testosteron wurde von WOOD et al. (1991) auch für das weibliche Schaf beschrieben. Dieser Effekt lässt sich möglicherweise auf individuelle Unterschiede des Aufnahmevermögens oder des Metabolismus von Testosteron bei den Föten zurückführen.

Die weiblichen Nachkommen, deren Muttersauen über einen längeren Zeitraum (zwischen Tag 30 und 44 p.c.) mit TP behandelt wurden, zeigten ähnliche Veränderungen an den äußeren Genitalien wie die Tiere, deren Mütter nur zwischen 30. und 34. Trächtigkeitstag behandelt worden waren. Bei einigen weiblichen Ferkeln kam es jedoch zu einer afterlosen Missbildung der Vulva. Beim weiblichen Schaf führten sowohl eine TP-Behandlung in der frühen Phase der

Geschlechtsdifferenzierung als auch eine TP-Behandlung über eine längere Periode ebenfalls zu vergleichbaren Veränderungen der phänotypischen Ausprägung der äußeren Genitalien. Eine TP-Behandlung in der späten Phase der Geschlechtsdifferenzierung hatte keinen Effekt mehr auf die phänotypische Ausbildung der äußeren Geschlechtsorgane (WOOD et al., 1995).

Dies wurde in der vorliegenden Arbeit für das Schwein durch einen weiteren Versuch ebenfalls belegt. Weibliche Föten, die ab Trächtigkeitstag 40 p.c. über das Muttertier mit TP behandelt worden waren, zeigten keine phänotypischen Veränderungen der externen Geschlechtsorgane. FORD und CHRISTENSON (1987) konnten bei ab Tag 39 p.c. behandelten weiblichen Ferkeln nur eine etwas vergrößerte Klitoris beobachten. Auch die von ELSAESSER et al. (1978) durchgeführte Untersuchung unterstützt diese Vermutung. Weibliche Ferkel, die am Tag 40 p.c. transuterin mit Testosteron behandelt wurden, bildeten nur eine Hypertrophie der Klitoris aus. Dies ist vermutlich ein Zeichen dafür, dass beim Schwein am Tag 40 des pränatalen Lebens die „kritische Periode“ der phänotypischen Differenzierung weitgehend abgeschlossen ist.

3.4.2 Einfluss der pränatalen TP-Behandlung auf die LH-Sekretion und LH β -Genexpression

In der vorliegenden Arbeit hatte eine pränatale TP-Behandlung der tragenden Sauen zwischen dem Trächtigkeitstag 30 und 34 p.c. bei den weiblichen Nachkommen im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen Einfluss auf die Mittelwerte der Plasma-LH-Spiegel, bezogen auf das 8stündige Blutentnahmeprofil im Alter von 180 Tagen (= 26 Wochen). Es deuteten sich in der Tendenz eher höhere LH-Mittelwerte der TP-behandelten Sauen an. Ob dieser Befund darauf hinweist, dass bei den weiblichen TP-behandelten Schweinen der präpuberale Anstieg der tonischen LH-Sekretion ebenfalls, wie bei TP-behandelten Schafen (WOOD et al., 1991 und 1995; KOSUT et al., 1997; WOOD und FOSTER, 1998), vorverlegt wurde, kann durch den gewählten Versuchsaufbau jedoch nicht geklärt werden. Der Plasma-LH-Spiegel wurde nur in einem Altersstadium (26. Lebenswoche) und nicht über eine längere Reifungsperiode verfolgt. Die sexuelle Reifung beginnt beim Schwein früher als im Alter von 180 Tagen, außerdem ist beim Schwein der präpuberale tonische LH-Anstieg, als Zeichen der beginnenden Pubertät, nicht so eindeutig geschlechtsspezifisch ausgeprägt wie beim Schaf.

Beim männlichen Schaf tritt der tonische LH-Anstieg viel früher ein (zwischen 8. und 11. Lebenswoche) als bei weiblichen Schafen (zwischen 26. und 29. Lebenswoche) (CLAYPOOL und FOSTER, 1990). Während ALLRICH et al. (1982) keinen präpuberalen Anstieg der tonischen LH-Sekretion bei männlichen Schweinen nachweisen konnten, berichteten andererseits FLOR CRUZ und LAPWOOD (1978), SCHINKEL et al. (1984) und TRUDEAU et al. (1992) von einem tonischen LH-Anstieg, der etwa zwischen der 10. und 12. Lebenswoche beginnt und sein Maximum im Alter zwischen der 14. und 16. Woche erreicht hat. Für weibliche Schweine beschrieben DIEKMAN et al. (1983) und CAMOUS et al. (1985) einen LH-Anstieg zwischen der 12. und 14. Woche, ebenfalls mit einem Maximum etwa 20 Tage später.

Die leicht erhöhten Mittelwerte der LH-Konzentration der weiblichen TP-behandelten Schweine in der vorliegenden Untersuchung könnten möglicherweise trotzdem auf einen Einfluss des injizierten Testosterons auf die LH-Sekretion hinweisen, da bei diesen Tieren auch die LH-Pulsfrequenz im Vergleich zu weiblichen Kontrollschweinen im 8stündigen Blutentnahmeprofil erhöht war. WOOD et al. (1995) fanden bei präpuberalen TP-behandelten weiblichen Schafen ebenfalls eine höhere Pulsfrequenz als bei nicht behandelten weiblichen Schafen.

Andererseits könnte die beschriebene Pulsatilität des Plasma-LH-Spiegels jedoch auch auf einen beginnenden ersten Östruszyklus bei den TP-behandelten weiblichen Schweinen zurückzuführen sein. Einige Tage vor der ersten Ovulation beobachteten DIEKMAN et al. (1983) und LUTZ et al. (1984) einen Anstieg der tonischen LH-Sekretion, dabei erhöhte sich auch die Zahl der LH-Pulse. Der erste Östruszyklus ist rasseabhängig und findet je nach Rasse zwischen dem 175. und 230. Lebenstag statt (DIEKMAN et al., 1983; LUTZ et al., 1984; KINGSBURY und RAWLINGS, 1993). Bei der im Institut für Tierzucht und Tierverhalten, Mariensee, gehaltenen Linie der deutschen Landrasse wurde der erste Östrus zwischen dem 190. und 210. Tag beobachtet (ELSAESSER et al., 1998).

In der vorliegenden Untersuchung wurde nach Transport vom Aufzucht- in den Experimentalstall sowohl an 2 von 9 TP-behandelten weiblichen Schweinen als auch an 3 von 9 weiblichen Kontrollschweinen eine Ovulation mittels Progesteron-Test im Blutplasma bzw. durch eine Untersuchung der Ovarien nach dem Schlachten der Tiere festgestellt. Da nur präpuberale Jungsaugen untersucht werden sollten, wurden die Tiere, die bereits ovuliert hatten, in die Berechnung der LH-

Konzentration sowie der LHB-Genexpression nicht einbezogen. Für die mögliche frühere Auslösung des ersten Östrus bei den weiblichen Tieren des vorliegenden Versuchs könnte daher auch der Transport der Tiere einige Tage vor der Blutentnahme verantwortlich sein. Der stimulierende Einfluss des Transportes auf die Auslösung der Ovulation bei präpuberalen weiblichen Schweinen ist aus der Literatur bekannt (ZIMMERMAN et al., 1976).

Im vorliegenden Versuch wurde durch die Kastration der männlichen Schweine in der 4. Lebenswoche die funktionelle Wirkung von Testosteron im postnatalen Leben ausgeschaltet. Die individuellen LH-Sekretionsprofile der Kastraten zeigten eine höhere Pulsfrequenz im Vergleich zu weiblichen Tieren. Wie zu erwarten, führte die Kastration der männlichen Schweine zu einer Erhöhung der LH-Konzentration im Alter von 180 Tagen (FLOR CRUZ und LAPWOOD, 1978; ALLRICH et al., 1982; KITTOK et al., 1984).

Der Vergleich der Plasma-LH-Werte im Alter von 180 Tagen zwischen TP-behandelten und nicht behandelten kastrierten männlichen Schweinen zeigte keinen Effekt des pränatal injizierten Testosterons. Da durch die Kastration die funktionelle Wirkung des Testosterons ausgeschaltet worden war, hätte eine Differenz zwischen LH-Konzentration bei Kontrollkastraten und TP-behandelten Kastraten die potenziell prägende Wirkung des pränatalen Testosterons verdeutlichen können. Es gab jedoch keine statistisch gesicherten Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen. Der angedeutete Unterschied der LH-Mittelwerte zwischen diesen zwei Gruppen kann auf Grund sehr hoher Streuung der einzelnen gemessenen Werte innerhalb einer Gruppe nicht als physiologische Wirkung berücksichtigt werden.

Bei weiblichen präpuberalen Schweinen, die ab Tag 30 p.c. mit TP behandelt worden waren, fanden ELSAESSER und PARVIZI (1979) eine Unterdrückung des präovulatorischen LH-Gipfels nach Östradiolbenzoat-Stimulation, wodurch gezeigt werden konnte, dass die fötale TP-Behandlung die postnatale zyklische LH-Sekretion beeinflusste. Wie aus der vorliegenden Untersuchung hervorgeht, hat die fötale TP-Behandlung (ab Tag 30 p.c.) auf die tonische LH-Sekretion beim weiblichen Schwein im Alter von 180 Tage keine gesicherte Wirkung, ebenso nicht beim männlichen kastrierten Schwein.

Sowohl die TP-behandelten Kastraten als auch die Kontrollkastraten hatten ein deutlich höheres LHB mRNA-Niveau im Vergleich zu den weiblichen Schweinen. Offensichtlich führte die Kastration durch fehlendes negatives Testosteron-

Feedback - wie schon oben für die tonische LH-Sekretion beschrieben - zu einer Erhöhung des LH β mRNA-Niveaus. Vergleichbare andere Untersuchungen sind für das Schwein nicht vorhanden. Bekannt ist, dass die Kastration männlicher neonataler (PAKARINEN und HUHTANIEMI, 1989) und adulter (ABBOT et al., 1985; DALGIN et al., 1992) Ratten zu einer deutlichen Erhöhung des LH β mRNA-Niveaus führt. Dass diese Erhöhung eine durch fehlendes Testosteron ausgelöste Reaktion ist, zeigten Substitutionsversuche mit Testosteron nach Kastration männlicher Ratten. Die durch die Kastration verursachte Erhöhung der LH β mRNA konnte durch Testosteron wieder zurückgenommen werden (ABBOT et al., 1988; CLAYTON; 1993).

Bei den weiblichen Schweinen hatte die TP-Behandlung zwischen Tag 30 und 34 p.c. – im Vergleich zu den weiblichen Kontrollschweinen – auf adenohipophysärer Ebene, gemessen am LH β mRNA-Niveau, im Alter von 180 Tagen keinen erkennbaren Effekt. Möglicherweise sind zum genannten Zeitpunkt der TP-Behandlung die Zentren, die die LH β mRNA-Expression regulieren, noch nicht sensibel für eine prägende Testosteron-Wirkung.

Ebenso wurden in der vorliegenden Arbeit zwischen den pränatal mit TP-behandelten männlichen Kastraten und Kontrollkastraten im Alter von 180 Tagen keine Unterschiede im LH β mRNA-Niveau gefunden. Dass die pränatale TP-Behandlung, zusätzlich zum endogen vorhandenen testikulären Testosteron, einen additiven prägenden Effekt auf die LH β mRNA-Konzentration männlicher postnataler Schweine hat, ist auf Grund dieses Befundes eher unwahrscheinlich. Zumindest hatte diese Behandlung keinen prägenden Einfluss auf den negativen Feedbackmechanismus für LH β mRNA, da dies sich durch eine Differenz im LH β mRNA-Niveau zwischen den TP-behandelten und unbehandelten männlichen Kastraten hätte zeigen müssen.

Daraus muss geschlossen werden, dass die pränatale TP-Behandlung von Tag 30 bis 34 p.c. mit einer Dosierung von 2,5 g TP/Behandlung keine erkennbare prägende Wirkung auf das LH β mRNA-Niveau bei weiblichen intakten und männlichen kastrierten Schweinen zum untersuchten Zeitpunkt ausübte.

In der vorliegenden Arbeit wurde die LH β -Genexpression auch an fötalen Schweinen am Tag 80 p.c. untersucht. Zunächst wurde ein Geschlechtsunterschied über alle Gruppen für die LH β mRNA-Konzentration gefunden. Der Vergleich der weiblichen und männlichen Kontrollgruppen

zeigte tendenziell höhere LH β mRNA-Werte bei weiblichen Föten, was mit dem Ergebnis einer ontogenetischen Studie von GRANZ et al. (1997) über die Entwicklung der LH β mRNA-Konzentration im fötalen Schwein übereinstimmt.

Weiterhin wurde die Hypothese getestet, dass der beobachtete Geschlechtsunterschied durch pränatales testikuläres Testosteron bedingt ist. Aus Untersuchungen von RAESIDE und SIGMAN (1975) und FORD et al. (1980) geht hervor, dass im männlichen Schweinefötus ab Tag 30 p.c. die Testosteron-Konzentration in Testis und Plasma ansteigt und zwischen Tag 34 und 39 ein Maximum erreicht. Es ist wahrscheinlich, dass diese hohe endogene Testosteron-Konzentration zwischen Tag 30 und 40 p.c. beim männlichen fötalen Schwein die LH β mRNA niedrig hält und auch die spätere postnatale maskuline LH-Freisetzung prägt. Bei der männlichen und weiblichen Ratte lässt sich durch eine neonatale Testosteron-Behandlung das LH β mRNA-Niveau unterdrücken (PAKARINEN und HUHTANIEMI, 1989).

Zur Eingrenzung der „kritischen Periode“, in der Androgene prägend auf die LH β -Expression wirken, wurden Sauen entweder zwischen den Trächtigkeitstagen 30 und 34 p.c. oder zwischen den Trächtigkeitstagen 40 und 44 p.c. behandelt. Bei den 80 Tage alten weiblichen Föten, die ab Tag 30 p.c. behandelt worden waren, war das LH β mRNA-Niveau in der Tendenz höher als bei den weiblichen Kontrollföten. Der mögliche Effekt der TP-Behandlung ab Tag 30 p.c. auf die LH β mRNA-Synthese und/oder die gonadotropen Zellen lässt sich bei den weiblichen präpuberalen TP-behandelten Schweinen (siehe Versuch oben) nicht wiederfinden. Der angedeutete Anstieg des LH β mRNA-Niveaus bei 80 Tage alten weiblichen Föten scheint deshalb kein bleibender Effekt zu sein. Daraus lässt sich schließen, dass zu diesem Behandlungszeitpunkt die Zentren für die mögliche Prägung der LH β -Expression nicht dauerhaft beeinflusst werden; zumindest hatte eine intrafötale Behandlung mit TP am Tag 30 p.c. auch noch keinen Einfluss auf die Potenz zur zyklischen LH-Sekretion (ELSAESSER et al., 1978).

Ab Tag 40 p.c. behandelte weibliche Föten zeigten ein signifikant niedrigeres LH β mRNA-Niveau als die ab Tag 30 p.c. behandelten weiblichen Föten und ein tendenziell niedrigeres Niveau als die Kontrollföten. Die TP-Behandlung zu diesem Zeitpunkt (ab Tag 40 p.c.) hat offensichtlich eine unterdrückende Wirkung auf das LH β mRNA-Niveau weiblicher 80 Tage alter Föten; ihre LH β mRNA-Konzentration war ähnlich niedrig wie die der männlichen Föten. Das über die Muttersau am

Tag 40 p.c. applizierte TP könnte bei weiblichen Föten die gleiche hemmende Wirkung auf die LH β mRNA-Expression gehabt haben, wie es die hohe Konzentration von endogenem testikulären Testosteron vermutlich bei männlichen Föten gleichen Alters hat (COLENBRANDER et al., 1978; FORD et al., 1980; GOXE et al., 1993). Der beschriebene Effekt der TP-Behandlung ab Tag 40 p.c. auf das LH β mRNA-Niveau könnte sich möglicherweise später in der postnatalen Phase auch in einer Unterdrückung der zyklischen LH-Sekretion und in der Ausprägung eines „männlichen“ LH β -Genexpressionsmusters auswirken. ELSAESSER et al. (1978) wiesen nach, dass ab Tag 40 p.c. intrafötal appliziertes Testosteron die Zentren für die Prägung der zyklischen LH-Sekretion maskulinisiert.

Aus dem oben Diskutierten kann abgeleitet werden, dass das Vorhandensein von fötalen Androgenen testikulären Ursprungs die sexuelle Differenzierung der gonadotropen Achse beim Schwein zu unterschiedlichen Zeitpunkten prägt. Die Anwesenheit von Testosteron am Tag 40 p.c. führte beim weiblichen Schwein zur Unterdrückung der zyklischen LH-Sekretion (ELSAESSER et al., 1978), hatte jedoch keine gesicherte Wirkung auf die tonische LH-Sekretion im Alter von 180 Tagen.

Die Präsenz von Testosteron ab Tag 30 p.c. hatte keinen prägenden Einfluss auf das LH β mRNA-Niveau bei weiblichen 180 Tage alten Schweinen oder auf die Fähigkeit zur zyklischen LH-Sekretion (ELSAESSER et al., 1978). Sie bewirkte in der Tendenz eine Erhöhung des LH β mRNA-Niveaus 80 Tage alter Föten, während die Anwesenheit von Testosteron ab Tag 40 p.c. eine Unterdrückung des LH β mRNA-Niveaus bei 80 Tage alten weiblichen Föten verursachte.

Zusätzlich zum endogen produzierten Testosteron hatte appliziertes Testosteron zu den oben genannten Zeitpunkten des pränatalen Lebens keine gesicherte Wirkung auf die Plasma-LH-Konzentration und das LH β mRNA-Niveau bei männlichen kastrierten Schweinen sowie keinen Einfluss auf das LH β mRNA-Niveau bei 80 Tage alten männlichen Schweineföten.

3.4.3 Einfluss der pränatalen TP-Behandlung auf die Gewichtsentwicklung

Die Körpergewichte der männlichen Föten im Alter von 80 Tagen unterschieden sich nicht von den Körpergewichten der weiblichen Föten. Die gleiche Beobachtung ist von GRANZ et al. (1997) für die gleiche Altersgruppe beschrieben worden. Auch WISE und CHRISTENSON (1992) konnten keinen Gewichtsunterschied zwischen männlichen und

weiblichen Föten im Alter von 70 und 104 Tagen p.c. feststellen. Das Geburtsgewicht der männlichen und weiblichen Kontrollferkel (DL) des vorliegenden Versuchs war ebenfalls gleich. Gleiche Geburtsgewichte männlicher und weiblicher Ferkel ermittelten OWENS et al. (1999) für Large White Schweine, WALSTRA (1980) für die Holländische Landrasse, WHITE et al. (1995) für Yorkshire Schweine und GRANZ et al. (1997) für 6 Tage alte Ferkel der Deutschen Landrasse.

Die weiblichen Schweine und männlichen Kastraten der Kontrollgruppen aus der vorliegenden Untersuchung unterschieden sich von der Geburt bis zum 6. Lebensmonat nicht im Körpergewicht; dieser Befund stimmt mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen überein. WHITE et al. (1995) fanden keinen Gewichtsunterschied bis zur 18. Lebenswoche zwischen weiblichen intakten und männlichen kastrierten Schweinen. OWENS et al. (1999) fanden keinen Gewichtsunterschied zwischen männlichen intakten, männlichen kastrierten und weiblichen intakten Schweinen bis zur 15. Lebenswoche. Auch im Alter von 24 Wochen unterschieden sich männliche Kastraten und weibliche intakte Large White Schweine nicht im Gewicht, während die intakten männlichen Schweine schon um 10 % schwerer waren als die Tiere der beiden anderen Gruppen (OWENS et al., 1999). Andererseits wurde ein Gewichtsunterschied zwischen weiblichen und männlichen kastrierten Schweinen in der 25. Lebenswoche von WHITE et al. (1995) beschrieben. WALSTRA (1980) ermittelte erst im adulten Alter ein höheres Gewicht bei intakten männlichen Schweinen.

Aufgrund der Gewichtsunterschiede zwischen intakten männlichen und weiblichen Tieren bzw. Kastraten wird für das Schwein (ARBONA et al., 1988) sowie für Schaf (JENKINS et al., 1988; ARNOLD et al., 1996) und Rind (PLOUZEK und TRENKLE, 1991) als sicher angenommen, dass im männlichen Geschlecht die anabole Wirkung des Testosterons eine entscheidende Rolle für das höhere Gewicht spielt und dass Testosteron möglicherweise auch durch seine Wirkung in der „kritischen Phase“ der Geschlechtsdifferenzierung Einfluss nimmt. Zumindest bei der Ratte (JANSSON et al., 1985a; KLINDT et al., 1990) und beim Schaf (DE HAAN et al., 1987; KLINDT et al., 1987; JENKINS et al., 1988; HANSEN et al., 1995; GILL und HOSKING, 1995) zeigte sich eindeutig eine verbesserte Wachstumsleistung nach neonataler bzw. pränataler TP-Behandlung. Im hier dargestellten Versuch hatte die pränatale TP-Behandlung einen unterschiedlichen Einfluss auf die Gewichtsentwicklung der Schweine.

Die Föten beiderlei Geschlechts im Alter von 80 Tagen, die ab Tag 30 p.c. über das Muttertier mit TP behandelt wurden, waren leichter als die Kontrollföten gleichen Alters. Die mittleren Körpergewichte der ab Tag 40 p.c. behandelten Föten waren etwas höher als die der ab Tag 30 p.c. behandelten Föten, von den Kontrollföten unterschieden sie sich jedoch nicht. Zum Zeitpunkt der Geburt waren die Ferkel, die über die TP-Behandlung der Muttertiere ab Tag 30 p.c. behandelt worden waren, ebenfalls leichter als die Kontrollferkel, es zeigte sich also ein Behandlungseffekt. Entgegen der Beobachtung aus dem dargestellten Experiment beeinflusste in anderen Untersuchungen weder eine TP-Behandlung am Tag 30 p.c. noch eine spätere Behandlung (ab Tag 50, 70, 90 oder 106 p.c.) die Geburtsgewichte der weiblichen Ferkel (ELSAESSER und PARVIZI, 1979; FORD und CHRISTENSON, 1987).

Bei Schaf und Rind ist der Einfluss des Testosterons auf die Geburtsgewichte der über das Muttertier behandelten Nachkommen gegensätzlich dargestellt worden. Auf der einen Seite berichteten GILL und HOSKING (1995) sowie WOOD et al. (1991) von einer Erhöhung der Geburtsgewichte weiblicher und männlicher Lämmer durch pränatale TP-Behandlung, und auf der anderen Seite beschrieben DE HAAN et al. (1987) und JENKINS et al. (1988) niedrigere Geburtsgewichte bei pränatal mit Testosteron behandelten Schafen beider Geschlechter. Tendenziell oder signifikant niedrigere Geburtsgewichte wurden auch bei weiblichen und männlichen pränatal über das Muttertier mit Testosteron behandelten Rindern festgestellt (HAMERNIK et al., 1987; DE HAAN et al., 1988 und 1990), ALDRICH et al. (1996) konnten jedoch keinen Einfluss pränataler Testosteron-Behandlung auf die Geburtsgewichte bei Rindern feststellen. Möglicherweise spielen für diese unterschiedlichen Ergebnisse die Art, die Dauer und der Zeitpunkt der Behandlung eine entscheidende Rolle (Testosteron-Implantate: DE HAAN et al., 1987 und ALDRICH et al., 1996; chronische Behandlung: JENKINS et al., 1988 oder akute Behandlung: GILL und HOSKING, 1995; Zeitpunkt: GILL und HOSKING, 1995). Nicht ausgeschlossen ist auch eine indirekte Wirkung des Testosterons bzw. seines Metaboliten Östrogen auf die Reaktion der Plazenta. Bei der Ratte verlangsamt sich das fötale Wachstum durch eine TP-Behandlung (VENNIER und RAYNAUD, 1975).

In den meisten der oben genannten Versuche an Rind und Schaf konnten die Autoren auch zum Zeitpunkt des Absetzens keine Gewichtsunterschiede zwischen TP-behandelten Tieren und

Kontrolltieren feststellen. Untersuchungen zum postnatalen Wachstum von pränatal behandelten weiblichen Schweinen ergaben keinen Gewichtsunterschied zum Zeitpunkt des Absetzens (FORD und CHRISTENSON, 1987), am Tag 30 p.c. mit TP-behandelte Sauen hatten jedoch am 250. Lebenstag ein höheres Gewicht (ELSAESSER und PARVIZI, 1979). In der vorliegenden Arbeit wurden die Gewichte beim Absetzen und im Alter von 4 und 6 Monaten gemessen. Für die genannten Altersstadien wurden keine Geschlechts- und Behandlungsunterschiede gefunden. Allerdings wuchsen weibliche Schweine, die pränatal durch das Muttertier mit TP behandelt wurden, zwischen dem 4. und 6. Monat um 13,6 % schneller als weibliche Kontrolltiere, was auch auf ein erhöhtes Körpergewicht im späteren, adulten Altersabschnitt hinweisen könnte. Eine größere Wachstumsintensität von der Geburt bis zum Absetzen wurde für TP-behandelte weibliche Schafe beschrieben (GILL und HOSKING, 1995). In einer Phase von ca. 100 Tagen nach dem Absetzen konnten JENKINS et al. (1988), DE HAAN et al. (1987), und HANSEN et al. (1995) höhere tägliche Zunahmen bei pränatal TP-behandelten weiblichen Schafen im Vergleich zu nicht behandelten Schafen feststellen, das gleiche bestätigten KLINDT et al. (1987) für den Zeitraum von der Geburt bis zur 28. Lebenswoche. Beim weiblichen Rind war kein Effekt des pränatalen Testosterons auf Körpergewicht und tägliche Zunahme zwischen dem 6. und 12. Monat zu vermerken (ALDRICH et al., 1996). Ein positiver Einfluss des Testosterons auf die genannten Parameter ließ sich beim Rind erst während der postpuberalen Periode verzeichnen (DE HAAN et al., 1988 und 1990).

Die physiologischen Mechanismen des Testosteroneinflusses sind noch nicht vollständig geklärt. Eine mögliche Einflussgröße könnte das durch pränatales Testosteron beeinflusste GH-Sekretionsprofil (KLINDT et al., 1987) und dessen Wirkungen auf das Körpergewicht bzw. die tägliche Zunahme sein. Als weiterer Faktor kommt auch die durch die pränatale TP-Behandlung erhöhte Konzentration von Wachstumsfaktoren, z.B. IGF-I, in Betracht (ALDRICH et al., 1996). In der postpuberalen Phase tragen vermutlich zusätzlich die gonadalen Hormone zur Wachstumsverbesserung pränatal maskulinisierter weiblicher Tiere bei (DE HAAN et al., 1990; ALDRICH et al., 1996).

Die männlichen kastrierten Schweine der vorliegenden Arbeit wiesen bezüglich ihres Körpergewichts an keinem der Messzeitpunkte einen Behandlungseffekt auf. DE HAAN et al.

(1990) fanden bei pränatal TP-behandelten Ochsen bis zum Absetzen im Alter von 203 Tagen ebenfalls keine Verbesserung der Wachstumsleistung. Eine einmalige Testosteron-Behandlung tragender Schafe am Tag 40 p.c. hatte hingegen einen positiven Einfluss auf die Körpergewichte und die tägliche Zunahme bei männlichen kastrierten Nachkommen bis zum Absetzen mit 78 Tagen (GILL und HOSKING, 1995). Andererseits verbesserte die pränatale Testosteron-Behandlung weder bei kastrierten noch bei intakten männlichen Schafen im Alter von 165 Tagen (JENKINS et al., 1988) noch bei den Bocklämmern im Alter von 180 Tagen (DE HAAN et al., 1987) die Wachstumsleistung.

Die Bedeutung des fötalen Testosterons testikulären Ursprungs für die präpuberale Gewichtsentwicklung beim Schwein bleibt unklar. Möglicherweise beeinflussen fötale Androgene die Gewichtsentwicklung erst im Zusammenspiel mit der Präsenz peri/postpuberaler Gonadenhormone.

3.4.4 *Einfluss der pränatalen TP-Behandlung auf die GH-Sekretion und GH-Genexpression*

GH wird als zentraler Regulator des Wachstums und der Reifung betrachtet. Seine Sekretion ist von mehreren Faktoren abhängig. Als einer dieser Faktoren wird der Einfluss von Androgenen auf die Sekretion der Hormone der somatotropen Achse diskutiert.

Die vorliegende Untersuchung zeigte, dass sich die mittleren Plasma-GH-Werte zwischen weiblichen Kontrollschweinen und männlichen Kontrollkastrierten im Alter von 180 Tagen nicht unterscheiden. Diese Ergebnisse stimmen mit der Untersuchung von DUBREUIL et al. (1987) überein. Sie fanden in den Plasma-GH-Spiegeln keinen Unterschied zwischen weiblichen und kastrierten männlichen Schweinen im Alter zwischen der 7. und 23. Lebenswoche, was auch mit früheren Untersuchungen an weiblichen und kastrierten männlichen Schweinen im Alter bis zur 21. Lebenswoche übereinstimmt (SIERS und SWINGER, 1971). Dagegen fanden DUBREUIL et al. (1988) in einer anderen Untersuchung bei 20 Wochen alten weiblichen Schweinen nach einem 60stündigen Blutentnahmeprofil höhere GH-Plasmakonzentrationen als bei den Kastrierten.

Einerseits stellten ARBONA et al. (1988) einen Geschlechtsunterschied in den Plasma-GH-Konzentrationen zwischen präpuberalen (50 kg) intakten weiblichen und männlichen Schweinen fest, andererseits fanden OWENS et al. (1991) keine Unterschiede in den Plasma-GH-Spiegeln

wachsender (bis 35 kg) intakter männlicher und weiblicher Schweine. Auch LOUVEAU et al. (1991) konnten für weibliche und männliche Schweine von der 2. bis zur 20. Lebenswoche keine Unterschiede feststellen, allerdings hatten in der 20. Woche männliche Kastrierten niedrigere Plasma-GH-Konzentrationen als intakte männliche und weibliche Schweine. Ebenfalls niedrigere GH-Mittelwerte wurden bei männlichen Kastrierten im Vergleich zu intakten männlichen Schweinen im untersuchten Alter von 9, 15 und 21 Wochen (DUBREUIL et al., 1989) ermittelt. Höhere GH-Werte ließen sich auch für männliche Schafe (GATFORD et al., 1996 und 1997) und Rinder (PLOUZEK und TRENKLE, 1991) im Vergleich zu weiblichen Tieren nachweisen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung unterstützen die Hypothese, dass pränatale Androgene auch zum Geschlechtsunterschied in der GH-Sekretion beitragen. Die TP-Behandlung der trächtigen Sauen am Tag 30 p.c. führte bei weiblichen Nachkommen im Alter von 180 Tagen zu signifikant höheren Plasma-GH-Mittelwerten im Vergleich zu weiblichen Kontrollschweinen. Auf die GH-Konzentration im Blutplasma der männlichen Kastrierten hatte das pränatal injizierte TP hingegen keine Wirkung. Für das Schwein sind keine weiteren vergleichbaren Untersuchungen bekannt. Bei anderen landwirtschaftlichen Nutztieren wurde folgendes nachgewiesen: Durch eine pränatale Testosteron-Behandlung wurden die Plasma-GH-Konzentrationen bei präpuberalen Färsen im Alter bis zu einem Jahr nicht signifikant erhöht. Erst in Verbindung mit einer postnatalen Steroid-Behandlung, die die ovarielle Hormonaktivität simulierte, konnten erhöhte Plasma-GH-Werte erzielt werden (ALDRICH et al., 1996). Beim präpuberalen weiblichen Schaf ließ sich durch pränatale Maskulinisierung keine höhere Plasma-GH-Konzentration auslösen (KLINDT et al., 1987).

Bei der männlichen Ratte wurde nachgewiesen, dass höhere Mittelwerte der Plasma-GH-Konzentration und Pulsamplitude im adulten Alter durch neonatales testikuläres Testosteron geprägt sind (JANSSON et al., 1985a). Erst beides zusammen, das neonatale Testosteron und die Anwesenheit der Androgene im adulten Alter, können alle Parameter der GH-Sekretion (Pulsamplitude, Pulsfrequenz, basale GH-Werte im Blutplasma) „maskulinisieren“ (JANSSON et al., 1987).

Neonatal gonadektomierte und mit Testosteron behandelte weibliche Ratten hatten im adulten Alter erhöhte Plasma-GH-Werte (JANSSON et al., 1985a). Es ist zu vermuten, dass in der vorliegenden

Untersuchung die Erhöhung der Plasma-GH-Konzentration bei den pränatal TP-behandelten weiblichen Schweinen im Alter von 180 Tagen auf die Wirkung des pränatal applizierten Testosterons zurückzuführen ist. Möglich wäre auch, dass die pränatale „Maskulinisierung“ darüber hinaus die Ovarien dahingehend geprägt hat, dass diese früher in der präpuberalen Phase aktiv geworden sind und dass damit die Gonadensteroiden zu der Erhöhung der GH-Konzentration zusätzlich beigetragen haben.

Nach dem deutlichen TP-Behandlungseffekt auf die GH-Sekretion der weiblichen Schweine im Alter von 180 Tagen - pränatal injiziertes TP vermännlichte (erhöhte) die Plasma-GH-Konzentration - konnten beim GH mRNA-Niveau mittels Northern Blot-Hybridisierung wider Erwarten keine Unterschiede zwischen den oben genannten Behandlungsgruppen nachgewiesen werden. Vergleichbare Untersuchungen für das Schwein bzw. andere Nutztiere liegen nicht vor. Aus einer Untersuchung an neonatal mit Testosteron behandelten adulten weiblichen Ratten (GONZÁLES-PARRA et al., 2000) ist bekannt, dass zwar die Zahl der GH produzierenden Zellen erhöht wurde, dass jedoch kein Effekt auf das GH mRNA-Niveau festzustellen war. Erst die zusätzliche Testosteron-Behandlung im adulten Alter erhöhte die GH mRNA-Konzentration in den somatotropen Zellen. Die Kombination von neonataler und adulter Testosteron-Behandlung führte zu einem GH mRNA-Niveau, das sich nicht mehr von männlichen intakten Ratten unterschied, die generell ein höheres GH mRNA-Niveau aufweisen als adulte weibliche Ratten. Mit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methodik – untersucht wurde der Anteil der GH mRNA an der Gesamt-RNA aus Adenohypophysengewebe zu einem gegebenen Zeitpunkt („steady state level“) - ließ sich keine Aussage darüber treffen, ob es auch hier durch die TP-Behandlung zu einer möglichen Veränderung (Erhöhung) der Anzahl somatotroper Zellen und damit zu einer veränderten (verringerten) GH mRNA-Konzentration pro Zelle gekommen ist.

Die oben beschriebene höhere Plasma-GH-Konzentration, die nicht mit einer ebenfalls erhöhtem GH mRNA-Niveau der TP-behandelten weiblichen Schweine einhergeht, könnte durch verschiedene andere Faktoren wie veränderte Translationseffektivität, mRNA-Stabilität oder Freisetzung der gespeicherten Hormone verursacht worden sein (THEILL und KARIN, 1993; TUGGLE und TRENKLE, 1996). Ob eine pränatale TP-Behandlung auf einen dieser Faktoren ebenfalls eine prägende Wirkung ausübt, kann nur vermutet werden.

Von der Ratte ist bekannt, dass neonatales Testosteron die Anzahl der GRF-Neurone erhöht, jedoch keine Wirkung auf die Anzahl der SRIF-Neurone hat (CHOWEN et al., 1993; ARGENTE und CHOWEN, 1993). Bei präpuberalen Schafen fanden GATFORD et al. (1997) einen Geschlechtsunterschied in der GH-Sekretion, nicht jedoch im GH mRNA-Gehalt. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit ein Geschlechtsunterschied in der Eminentia mediana gefunden, mit höheren GRF- und SRIF-Gehalten bei präpuberalen männlichen Schafen, was vermutlich der Grund für die höheren Plasma-GH-Konzentrationen bei Böcken im Vergleich zu weiblichen Schafen war. Wegen des fehlenden Geschlechtsunterschieds bei puberalen Schafen im Sekretionsmuster von SRIF im hypothalamischen portalen Blutplasma wird ein möglicher Unterschied in der hypothalamischen GRF-Sekretion und/oder hypophysären Sensibilität gegenüber SRIF und GRF diskutiert, und des Weiteren wird vermutet, dass dieser Unterschied das dimorphe GH-Sekretionsmuster bewirkt.

Auch bei den Kastraten gab es keinen signifikanten Unterschied in der GH mRNA-Konzentration zwischen TP-behandelten und nicht behandelten Tieren. Wie im vorigen Absatz für die weiblichen Schweine beschrieben, lassen sich die hier aufgeführten Ergebnisse ebenfalls nur wieder mit dem Tiermodell Ratte vergleichen. Durch neonatale Kastration männlicher Ratten wurde sowohl die Zahl der GH produzierenden Zellen als auch das GH mRNA-Niveau reduziert. Eine neonatale Testosteron-Substitutionsbehandlung erhöhte die Werte der beiden Parametern im Erwachsenenalter, aber erst eine zusätzliche Testosteron-Behandlung im Erwachsenenalter erhöhte den Prozentsatz der GH produzierenden Zellen und den GH mRNA-Level auf das Niveau intakter männlicher Ratten (GONZÁLES-PARRA et al., 1998). Möglicherweise hatte bei den kastrierten männlichen Schweinen der vorliegenden Untersuchung die pränatale TP-Behandlung deshalb keine Auswirkung bzw. tendierte das GH mRNA-Niveau dazu, niedriger zu bleiben, weil durch die Kastration das postnatale Testosteron fehlte, und die alleinige pränatale TP-Behandlung nicht ausreichend für eine Erhöhung der GH mRNA-Konzentration war.

Es wurden auch keine Unterschiede in dem GH mRNA-Niveau zwischen weiblichen intakten und männlichen kastrierten 180 Tage alten Kontrollschweinen gefunden. Ähnlich wie für die Plasma-GH-Konzentration diskutiert, wird angenommen, dass die Kastration einen Einfluss auf die GH-Genexpression ausübt. Nach neonataler

Kastration männlicher Ratten wurden niedrigere GH mRNA-Werte im adulten Alter gemessen, intakte männliche Ratten hatten ein höheres GH mRNA-Niveau als weibliche Ratten (GONZÁLES-PARRA et al., 1998 und 2000). Es ist zu vermuten, dass durch die Kastration bei den Börgen das GH mRNA-Niveau im Vergleich zu intakten männlichen Schweinen niedriger ist und es sich deshalb nicht vom GH mRNA-Niveau weiblicher Schweine unterscheidet. Zur Überprüfung dieser These müssten entsprechende Experimente mit intakten weiblichen und männlichen Schweinen sowie Kastraten durchgeführt werden.

Der angedeutete Unterschied des GH mRNA-Niveaus zwischen weiblichen und männlichen Kontrollföten im Alter von 80 Tagen aus der dargestellten Untersuchung weist auf ein tendenziell höheres GH mRNA-Niveau bei männlichen Föten hin. Dieses Ergebnis deckt sich nicht mit dem Ergebnis der ontogenetischen Studie von GRANZ et al. (1997), in der für männliche Föten im Vergleich zu weiblichen Föten zwischen Tag 50 und 110 p.c. ein konstant höheres GH mRNA-Niveau gefunden wurde. Dass in der vorliegenden Untersuchung zwischen männlichen und weiblichen Föten im Alter von 80 Tagen kein statistisch signifikanter Unterschied im GH mRNA-Niveau ermittelt wurde, lässt sich zunächst nicht zufriedenstellend erklären, da weder geringere Sensitivität der verwendeten Analysentechnik noch versuchstechnische Unterschiede (z.B. Berücksichtigung möglicher Wurfefekte in der statistischen Berechnung) als Erklärungsansatz in Frage kommen.

In der vorliegenden Arbeit unterschied sich die GH mRNA-Konzentration weder bei den weiblichen noch bei den männlichen 80 Tage alten Föten, die über das Muttertier mit TP ab Tag 30 p.c. oder ab Tag 40 p.c. behandelt worden waren, im Vergleich

zu den jeweils nicht behandelten Föten. Dass in diesem fötalen Alter noch kein TP-Effekt auf die GH mRNA-Konzentration bei weiblichen und männlichen Schweineföten nachgewiesen werden konnte, lag möglicherweise am gewählten Alterstadium. Es könnte sein, dass sich der TP-Einfluss, wie oben diskutiert, erst später in der Kombination mit Gonadensteroiden deutlich zeigt, wie für die weiblichen Ratte beschrieben (GONZÁLES-PARRA et al., 2000). Bei der adulten Ratte wird nach neonataler TP-Behandlung eine erhöhte Zahl von GRF-Neuronen, aber kein erhöhtes GRF mRNA-Niveau beschrieben (CHOWEN et al., 1993).

Aus dem Diskutierten geht hervor, dass die pränatale Maskulinisierung eine positive Wirkung auf die Plasma-GH-Spiegel bei weiblichen Schweinen im Alter von 180 Tagen ausübte, möglicherweise im Zusammenspiel mit postnatalen Gonadensteroiden. Daraus kann geschlossen werden, dass die höhere GH-Konzentration der „maskulinisierten“ weiblichen Schweine auch der Grund für die beobachtete Erhöhung der täglichen Zunahmen zwischen dem 4. und 6. Monat sein könnte.

Eine Wirkung des pränatalen Testosterons auf das fötale (Tag 80 p.c.) bzw. präpuberale (Tag 180 p.p.) GH mRNA-Niveau konnte in dieser Untersuchung nicht nachgewiesen werden. Der in der vorliegenden Arbeit erhobene Befund, dass fötale Androgene testikulären Ursprungs beim Schwein offenbar die Regulation der GH-Sekretion prägen, nicht jedoch die GH-Genexpression, spricht für eine prägende Wirkung der Androgene auf hypothalamische Regelzentren der GH-Sekretion, ähnlich wie für die Ratte postuliert (CHOWEN et al., 1993).

4 Zusammenfassung

Bei Säugern, landwirtschaftliche Nutztiere eingeschlossen, besteht ein Geschlechtsunterschied in der Regulation der Fortpflanzung und in der Regulation des Wachstums.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Bedeutung pränataler Androgene testikulären Ursprungs für den sexuellen Dimorphismus in der Luteinisierungshormon (LH)- und Wachstumshormon (GH)-Sekretion und -Genexpression zu erkennen sowie den Einfluss einer pränatalen Maskulinisierung auf das Körperwachstum beim Schwein zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurden tragende Sauen der Deutschen Landrasse dreimalig i.m. mit Testosteronpropionat (TP) in zweitägigem Abstand ab Trächtigkeitstag 30 behandelt (Dosierung: 25 mg TP/kg Körpergewicht und Behandlung). Kontrollsaue erhielten nach dem gleichen Schema Sesamöl. Nach der Geburt wurde bei den weiblichen Ferkeln die ano-genitale Distanz (AGD) gemessen. Bei der Geburt, im Alter von einem, vier und sechs Monaten wurden die Körpergewichte aller Nachkommen erfasst. Männliche Ferkel wurden im Alter von 4 Wochen kastriert. Nach dem Absetzen wurden sämtliche Tiere in Gruppenhaltung aufgezogen und mit einer Kraftfuttermischung für Mastschweine gefüttert. Im Alter von 6 Monaten wurden über einen intravenösen Dauerkatheter Blutproben über 8 Stunden in 15minütigen Intervallen gewonnen. Im Plasma wurden LH und GH bestimmt. In den Adenohypophysen der gleichen Tiere wurde das LHB mRNA- und GH mRNA-Niveau bestimmt.

Um die „kritischen Perioden“ der sexuellen Differenzierung weiter einzugrenzen, wurden in einem weiteren Versuchsansatz tragende Sauen ab Tag 30 p.c. oder ab Tag 40 p.c. ebenfalls dreimalig i.m. mit TP behandelt (Dosierung: 15 mg TP/kg Körpergewicht und Behandlung). Kontrollsaue erhielten Sesamöl. Im Alter von 80 Tagen wurden alle Föten per Laparotomie entnommen, gewogen und bei den weiblichen Föten die AGD gemessen. Danach wurden alle Föten dekapitiert und ihre Adenohypophysen für den LHB mRNA- und GH mRNA-Nachweis entnommen und eingefroren.

Die LH- und GH-Konzentration im Blutplasma wurde mittels Enzym Immuno Assay (EIA) bestimmt. Aus den Einzelwerten des Blutentnahmeprofils wurden für jedes Tier LH- und GH-Mittelwerte berechnet und statistisch ausgewertet. Zum Nachweis der LHB- und GH-Genexpression wurde eine Northern Blot-Hybridisierung durchgeführt. Dazu wurde aus den

Adenohypophysen Gesamt-RNA extrahiert, im Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Kapillartransfer (Northern Blot) auf Nylonmembranen übertragen. Die jeweilige mRNA wurden durch Hybridisierung mit spezifischen porcinen LHB und GH cDNA-Sonden, die mittels Random Priming Verfahren mit [α - 32 P] radioaktiv markiert worden waren, nachgewiesen. Die Signale der mRNA-cDNA-Hybriden wurden mit Hilfe der Phosphor Imaging Technik digitalisiert, mit „Image Master“ Densitometrie Software ausgewertet und statistisch analysiert. Durch 18S rRNA-Rehybridisierung wurden alle Proben auf gleiche Gesamt-RNA-Mengen korrigiert.

Die chronische TP-Behandlung der Muttersauen zwischen Tag 30 und 34 der Trächtigkeit verursachte bei den weiblichen Nachkommen eine phänotypische Veränderung der äußeren Genitalien mit einer Vergrößerung der AGD. Die gleiche TP-Behandlung zwischen Tag 40 und 44 der Trächtigkeit hatte keinen Einfluss auf die Ausprägung der äußeren Genitalien bei den weiblichen Nachkommen.

Die TP-Behandlung ab Tag 30 p.c. hatte bei weiblichen Schweinen im Alter von 180 Tagen keinen Effekt auf die mittlere Plasma-LH-Konzentration und das LHB mRNA-Niveau, ebenso gab es keinen Unterschied zwischen TP-behandelten und nicht behandelten Kastraten. Deren LH-Sekretion und LHB mRNA-Konzentration war auf Grund der Kastration im frühen postnatalen Stadium im Vergleich zu weiblichen Schweinen wesentlich höher ($p < 0,001$). Im Alter von 80 Tagen exprimierten weibliche Föten mehr LHB mRNA als männliche Föten ($p < 0,001$). Das LHB mRNA-Niveau weiblicher Föten wurde durch die TP-Behandlung ab Tag 30 p.c. nicht beeinflusst. Dagegen unterdrückte die TP-Behandlung ab Tag 40 p.c. das LHB mRNA-Niveau weiblicher Föten auf das Niveau männlicher Föten, so dass kein signifikanter Geschlechtsunterschied mehr bestand ($p = 0,93$). Bei männlichen Föten hatte die TP-Behandlung keine gesicherte Wirkung.

Ab Tag 30 p.c. mit TP behandelte Föten beider Geschlechter waren am Tag 80 p.c. im Durchschnitt leichter als Kontrollföten ($p < 0,02$), die ab Tag 40 p.c. mit TP behandelten Föten unterschieden sich hingegen im Körpergewicht nicht von den Kontrollföten. Weibliche und männliche Föten unterschieden sich im Alter von 80 Tagen p.c. nicht im Körpergewicht. TP-Behandlung ab Tag 30 p.c. verringerte auch die Geburtsgewichte weiblicher sowie männlicher Ferkel ($p < 0,05$). Ein Geschlechtsunterschied wurde nicht gefunden. Beim Absetzen waren alle Ferkelgruppen im Durchschnitt

gleich schwer. Auch im Alter von 4 und 6 Monaten wurden keine Unterschiede im Körpergewicht zwischen den untersuchten Gruppen gefunden, allerdings hatten TP-behandelte weibliche Schweine zwischen dem 4. und 6. Monat in der Tendenz eine höhere tägliche Zunahme als weibliche Kontrollschweine.

Die pränatale TP-Behandlung wirkte sich im Alter von 180 Tagen bei weiblichen Schweinen im Vergleich zu den weiblichen Kontrollschweinen in einer Erhöhung der mittleren GH-Plasmakonzentration aus ($p < 0,05$), bei kastrierten männlichen Schweinen bestand kein TP-Effekt. Die mittleren Plasma-GH-Werte weiblicher Kontrollschweine unterschieden sich nicht von denen der Kastraten. Mit dem verwendeten Hybridisierungsnachweis konnte kein Einfluss der TP-Behandlung ab Tag 30 p.c. auf das GH mRNA-Niveau im Alter von 180 Tagen - weder bei Sauen noch bei Kastraten - gefunden werden. Im GH mRNA-Niveau bestand auch kein Unterschied zwischen Sauen und männlichen Kastraten. Auch am Tag 80 p.c. war das GH mRNA-Niveau unabhängig von Geschlecht und Behandlung.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass unterschiedliche „kritische Phasen“ der sexuellen Differenzierung bestehen. Die somatische Differenzierung bzw. sexuelle Differenzierung des Phänotyps durch fötale Androgene testikulären Ursprungs ist offenbar beim Schwein vor Tag 40 des

fötalen Lebens weitgehend abgeschlossen. Die Prägung der LH β -Genexpression im fötalen Leben zum männlichen Typ (niedrigeres Niveau im männlichen Geschlecht) und die Prägung des LH-Sekretionsmodus (positives Östrogen-Feedback im männlichen Schwein nicht auslösbar) schließt sich um den Tag 40 p.c. an die phänotypische Differenzierung an. Die Hypothese, dass fötale Androgene testikulären Ursprungs zwischen Tag 30 p.c. und 40 p.c. die tonische LH-Sekretion prägen (präpuberaler Anstieg der Plasma-LH-Spiegel im männlichen Geschlecht früher bzw. höher als im weiblichen Geschlecht), konnte experimentell nicht schlüssig belegt werden. Auf die Regulation der GH-Sekretion scheinen fötale Androgene ab Tag 30 p.c. einen organisatorischen Effekt auszuüben (im männlichen Geschlecht höhere postnatale Plasma-GH-Spiegel als im weiblichen Geschlecht), ohne dass das GH mRNA-Niveau im fötalen oder postnatalen Leben beeinflusst wird. Die Bedeutung organisatorischer Androgeneffekte für die postnatale Gewichtsentwicklung bleibt unklar. Möglicherweise beeinflussen fötale Androgene die Gewichtsentwicklung und die Plasma-GH-Spiegel erst im Zusammenspiel mit der peri/postpuberalen Präsenz von Gonadenhormonen.

(Diese Arbeit wurde durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt, DFG El 46/12-1, 2, 3)

5 Summary

Regulation of reproduction and growth is sexually differentiated in mammals, including farm animals.

The aim of the present study was to examine the role of prenatal androgens of testicular origin for the sexual dimorphism in the control of luteinizing hormone (LH) and growth hormone (GH) gene expression and secretion in the pig. The influence of prenatal masculinization on body weight was investigated as well.

Starting on day 30 of gestation pregnant German Landrace sows were treated i.m. with testosterone propionate (TP) three times at two days intervals (25 mg TP/kg body weight and treatment). Control sows received vehicle (sesame oil). At birth the anogenital distance (AGD) of the female offspring was determined. Body weight of the offspring was measured at birth and at the age of one, four and six months. Male piglets were castrated at the age of four weeks. After weaning all animals were reared in group housing and were fed a standard pig chow. At the age of six months blood samples were collected via chronic vein catheters at 15 minutes intervals for a period of eight hours for measurement of plasma LH and GH concentrations. Subsequently animals were slaughtered, anterior pituitaries were taken, and LH β mRNA and GH mRNA levels were determined.

To determine critical periods of sexual differentiation, in an additional experiment pregnant sows were treated i.m. with TP three times at 2 day intervals (15 mg TP/kg body weight and treatment) starting either on day 30, or on day 40 of gestation. Control sows received vehicle (sesame oil). All fetuses were collected at day 80 postcoitus (p.c.) by laparotomy and their body weight was determined. AGD was measured in female fetuses. Subsequently fetuses were decapitated, anterior pituitaries were collected and frozen for analysis of LH β mRNA and GH mRNA.

Concentrations of plasma LH and GH were determined by enzyme immunoassay. LH β and GH gene expression was determined by northern blot hybridization. Total cytoplasmic RNA was isolated from anterior pituitaries, separated electrophoretically by molecular size in agarose gel and blotted onto a nylon membrane by an overnight capillary transfer. LH β and GH mRNA were measured by hybridization with specific porcine LH β and GH cDNA probes, which were labelled with [α -³²P] using a Random Primed DNA Labeling Kit. Specific mRNA-cDNA signals were transformed to digital values by phosphor imaging,

evaluated with 'Image Master Densitometry' software and analysed statistically. 18S rRNA rehybridization was used to correct all samples for the same amount of total cytoplasmic RNA.

In female offspring chronic treatment of pregnant sows from day 30 to day 34 of gestation with TP caused phenotypic changes with an enlargement of the anogenital distance. Identical TP treatment from day 40 to day 44 of gestation had no effect on the female external genital. TP given starting at day 30 of gestation had no influence on the average plasma LH concentrations and LH β mRNA levels of females or male castrates at 180 days of age. Plasma LH and LH β mRNA concentrations were significantly higher in castrated males than in intact females most probably because of gonadectomy in the early postnatal period ($p < 0.001$). Gene expression of LH β was higher in female fetuses than in their male littermates at day 80 p.c. ($p < 0.001$). LH β mRNA levels in female fetuses were not affected by TP treatment starting at day 30 of gestation. Prenatal TP treatment starting at day 40 of gestation tended to suppress LH β mRNA levels of female fetuses to the level of male fetuses ($p < 0.93$). TP treatment had no influence in male fetuses.

At 80 days p.c. both male and female fetuses treated with TP starting at day 30 of gestation on average weighed less than control fetuses ($p < 0.02$). Fetuses treated with TP starting at day 40 of gestation did not differ in their body weight from control fetuses. There was no sex difference in fetal body weight at 80 days p.c. Prenatal TP treatment starting at day 30 of gestation reduced the body weight in female and male piglets at birth ($p < 0.05$) without any sex difference at this age. At weaning and the age of 4 and 6 months there was no difference in body weight between treatments. However, TP treated females showed a tendency for higher daily weight gain than control females between the fourth to the sixth month.

Prenatal TP treatment starting on day 30 of gestation increased ($p < 0.05$ compared to control) average plasma GH concentrations in the female pig at 180 days of age, however TP had no effect in gonadectomized male pigs. Average plasma GH concentrations did not differ between female control pigs and male castrates. Neither in sows nor in male castrates TP treatment starting at day 30 of gestation affected GH mRNA levels at the age of 180 days. No sex difference in GH mRNA levels was apparent at day 80 p.c. and GH gene expression was independent of TP treatment.

It is concluded that during fetal life there are different critical periods for sexual differentiation in

the pig. Phenotypic sexual differentiation by fetal androgens of testicular origin seems to be completed before day 40 p.c. Differentiation of LH β gene expression towards the male type (lower level in male sex) and differentiation of the surge mode of LH secretion (positive oestrogen feedback not inducible in the male) succeed phenotypic differentiation. The hypothesis that between day 30 and 40 of gestation fetal androgens of testicular origin organize the tonic mode of LH secretion (prepuberal rise of plasma LH levels in the male earlier than in the female) is not supported by the present findings. After day 30 of gestation fetal

androgens might have an organizational effect on the regulation of GH secretion (in the male higher postnatal plasma GH concentrations than in the female), but androgens seem to have no effect on GH mRNA levels in fetal or postnatal life. The significance of fetal androgens for the postnatal development of body weight remains unclear. Possibly fetal androgens affect body weight development and plasma GH levels in conjunction with peri/postpubertal sexual hormones.

(Supported by the German Research Foundation, DFG El 46/12 - 1, 2, 3)

6 Literaturverzeichnis

- ABBOT, S.D., Docherty, K., Roberts, J.L., Tepper, M.A., Chin, W.W., Clayton, R.N. (1985): Castration increases luteinizing hormone subunit messenger RNA levels in male rat pituitaries. *J Endocrinology*, 107: R1-R4.
- ABBOT, S.D., Docherty, K., Clayton, R.N. (1988): Regulation of LH subunit mRNA levels by gonadal hormones in female rats. *J Mol Endocrinology*, 1: 49-60.
- ABBOT, S.D., Docherty, K., Clayton, R.N. (1988a): Gonadal regulation of pituitary hormone mRNA levels in male rats. *J Mol Endocrinology*, 1: 61-68.
- ALDRICH, S.L., Berger, L.L., Kesler, D.J., Nash, T.G., McCusker, R.H. (1996): Effects of prenatal androgenization and postnatal steroid treatment on growth hormone, insulin-like growth factor I and II, insulin, thyroxine, and triiodothyronine concentrations in beef heifers. *J Anim Sci*, 75: 420-428.
- ALLRICH, R.D., Christenson, R.K., Ford, J.J., Zimmerman, D.R. (1982): Pubertal development of the boar: Testosterone, estradiol-17 β , cortisol and LH concentrations before and after castration various ages. *J Anim Sci*, 55: 1139-1146.
- ARBONA, J.R., Marple, D.N., Russell, R.W., Rahe, C.H., Mulvaney, R.W., Sartin, J.L. (1988): Secretory patterns and metabolic clearance rate of porcine growth hormone in swine selected for growth. *J Anim Sci*, 66: 3068-3072.
- ARGENTE, J., Chowen-Breed, J.A., Steiner, R.A., Clifton, D.K. (1990): Somatostatin messenger RNA in hypothalamic neurons is increased by testosterone through activation of androgen receptors and not by aromatization to estradiol. *Neuroendocrinology*, 52: 342-349.
- ARGENTE, J., Chowen, J.A., Zeitler, P., Clifton, D.K., Steiner, R.A. (1991): Sexual dimorphism of the growth hormone and somatostatin gene expression in the hypothalamus of the rat during development. *Endocrinology*, 128: 2369-2375.
- ARGENTE, J., Chowen, J.A. (1993): Control of the transcription of the growth hormone-releasing hormone and somatostatin genes by sex steroids. *Horm Res*, 40: 48-53.
- ARNOLD, A.M., Peralta, J.K., Thonney, M.L. (1996): Ontogeny of growth hormone, insulin-like growth factor-I, estradiol and cortisol in growing lamb: effect of testosterone. *J Endocrinology*, 150: 391-399.
- BATCHELOR, D.C., Lewis, R.M., Breier, B.H., Gluckman, P.D., Skinner, S.J. (1998): Fetal rat lung epithelium has a functional growth hormone receptor coupled to tyrosine kinase activity and insulin-like growth factor binding protein-2 production. *J Mol Endocrinol*, 21: 73-84.
- BAUER, M., Parvizi, N. (1996): Pulsatile and diurnal secretion of GH and IGF-I in the chronically catheterized pig fetus. *J Endocrinology*, 149: 125-133.
- BERTHERAT, J., Bluet-Pajot, M.T., Epelbaum, J. (1995): Neuroendocrine regulation of growth hormone. *European J Endocrinology*, 132: 12-24.
- BORSKI, R.J., Tsai, W., DeMott-Friberg, R., Barkan, A.L. (1996): Regulation of somatic growth and the somatotrophic axis by gonadal steroids: primary effect on insulin-like growth factor I gene expression and secretion. *Endocrinology*, 137: 3253-3259.
- BUONOMO, F.C., Klindt, J. (1993): Ontogeny of growth hormone (GH), insulin-like growth factors (IGF-I and IGF-II) and IGF binding protein-2 (IGFBP-2) in genetically lean and obese swine. *Dom Anim Endocrinology*, 10: 257-265.
- BYSKOV, A.G., Hoyer, P.E. (1994): Embryology of mammalian gonads and ducts.: Knobil, E., Neill, J.D. (Ed.): *The Physiology of Reproduction*. Raven Verlag, New York, 1994, 2. Aufl.: 487-540.
- CAMOUS, S., Prunier, A., Pelletier, J. (1985): Plasma prolactin, LH, FSH and estrogen excretion patterns in gilts during sexual development. *J Anim Sci*, 60: 1308-1317.
- CELLA, S.G., Locatelli, V., Broccia, M.L., Menegola, E., Giavini, E., De Gennaro Colonna, V., Torsello, A., Wehrenberg, W.B., Muller, E.E. (1994): Long-term changes of somatotrophic function induced by deprivation of growth hormone-releasing hormone during the fetal life of the rat. *J Endocrinol*, 140: 111-114.
- CHILDS, G.V., Unabia, G., Wu, P. (2000): Differential expression of growth hormone messenger ribonucleic acid by somatotropes and gonadotropes in male and cycling female rats. *Endocrinology*, 141: 1560-1570.
- CHOWEN, J.A., Argente, J., González-Parra, S., García-Segura, L.M. (1993): Differential effects of the neonatal and adult sex steroid environments on the organization and activation of hypothalamic growth hormone-releasing hormone and somatostatin neurons. *Endocrinology*, 133: 2792-2802.
- CHOWEN, J.A., García-Segura, L.M., González-Parra, S., Argente, J. (1996): Sex steroid Effects on the development and functioning of the growth hormone axis. *Cell Mol Neurobiology*, 16: 297-310.
- CHOWEN, J.A., González-Parra, S., Garcia-Segura, L.M., Argente, J. (1998): Sexually dimorphic interaction of insulin-like growth factor (IGF)-I and sex steroids in lactotrophs. *J Neuroendocrinology*, 10: 493-502.
- CLARKE, I.J., Scaramuzzi, R.J., Short, R.V. (1976): Effects of testosterone implants in pregnant ewes on their female offspring. *J Embryol Exp Morphol*, 36: 87-99.
- CLARKE, I.J., Scaramuzzi, R.J. (1978): Sexual behaviour and LH secretion in spayed androgenized ewes after a single injection of testosterone or oestradiol-17 β . *J Reprod Fertil*, 52: 313-320.
- CLAYPOOL, L.E., Foster, D.L. (1990): Sexual differentiation of the mechanism controlling pulsatile secretion of luteinizing hormone contributes to sexual differences in the timing of puberty in sheep. *Endocrinology*, 126: 1206-1215.
- CLAYTON, R.N. (1993): Regulation of gonadotropin subunit gene expression. *Hum Reprod*, 8: 29-36.
- COLENBRANDER, B., de Jong, F.H., Wensing, C.J.G. (1978): Changes in serum testosterone concentrations in the male pig during development. *J Reprod Fertil*, 53: 377-380.
- COLENBRANDER, B., van Rossum-Kok, C.M.J.E., van Straaten, H.W.M., Wensing, C.J.G. (1979): The effect of

- fetal decapitation on the testis and other endocrine organs in the pig. *Biol Reprod*, 20: 198-204.
- COLENBRANDER, B., MacDonald, A.A., Elsaesser, F., Parvizi, N., van de Wiel, D.F.M. (1982): Response of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone to luteinizing hormone releasing hormone in the fetal pig. *Biol Reprod*, 27: 556-561.
- COLENBRANDER, B., van Rossum-Kok, C.M.J.E., Oxender, W.D., Wensing, C.J.G. (1983): Ovarian development in control and decapitated pig fetuses. *Biol Reprod*, 29: 217-223.
- COLENBRANDER, B., Meijer, J.C., MacDonald, A.A., van de Wiel, D.F.M., Engel, B., DeJong, F.H. (1987): Feedback regulation of gonadotropic hormone secretion in neonatal pigs. *Biology of Reproduction*, 36: 871-877.
- CONNOLLY, P.B., Resko, J.A. (1994): Prenatal testosterone differentiates brain regions controlling gonadotropin release in guinea pigs. *Biology of Reproduction*, 51: 125-130.
- CORBIER, P. (1985): Sexual differentiation of positive feedback: effect of hour of castration at birth on estradiol-induced luteinizing hormone secretion in immature male rats. *Endocrinology*, 116: 142-147.
- COX, N.M., Britt, J.H. (1986): Pulsatile secretion of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone and their relationship to secretion of estradiol and onset of estrus in weaned sows. *Anim Reprod Sci*, 12: 201-211.
- DALKIN, A.C., Paul, S.J., Haisenleder, D.J., Ortolano, G.A., Yasin, M., Marshall, J.C. (1992): Gonadal steroids effect similar regulation of gonadotrophin subunit mRNA expression in both male and female rats. *J Endocrinology*, 132: 39-45.
- DANEAU, I., Ethier, J.-F., Lussier, J.G., Silversides, D.W. (1996): Porcine SRY gene locus and genital ridge expression. *Biology of Reproduction*, 55: 47-53.
- DE HAAN, K.C., Berger, L.L., Kesler, D.J., McKeith, F.K., Thomas, D.L., Nash, T.G. (1987): Effect of prenatal androgenization on lamb performance, carcass composition and reproductive function. *J Anim Sci*, 65: 1465-1470.
- DE HAAN, K.C., Berger, L.L., Kesler, D.J., McKeith, F.K., Faulkner, D.B., Cmarik, G.F. (1988): Effect of prenatal androgenization on growth performance and carcass characteristics of steers and heifers. *J Anim Sci*, 66: 1864-1870.
- DE HAAN, K.C., Berger, L.L., Kesler, D.J., McKeith, F.K., Faulkner, D.B., Cmarik, G.F., Favero, R.J. (1990): Effects of prenatal testosterone treatment and postnatal steroid implantation on growth performance and carcass traits of heifers and steers. *J Anim Sci*, 68: 2198-2207.
- DE HAAN, K.C., Berger, L.L., Bechtel, P.J., Kesler, D.J., McKeith, F.K., Thomas, D.L. (1990a): Effect of prenatal testosterone treatment on nitrogen utilization and endocrine status of ewe lambs. *J Anim Sci*, 68: 4100-4108.
- DEAN, C.E., Porter, T.E. (1999): Regulation of somatotroph differentiation and growth hormone (GH) secretion by corticosterone and GH-releasing hormone during embryonic development. *Endocrinology*, 140: 1104-1110.
- DIAZ, D.R., Fleming, D.E., Rhees, R.W. (1995): The hormone-sensitive early postnatal periods for sexual differentiation of female behaviour and luteinizing hormone secretion in male and female rats. *Dev Brain Res*, 86: 227-232.
- DIEKMANN, M.A., Trout, W.E., Anderson, L.L. (1983): Serum profiles of LH, FSH and prolactin from 10 weeks of age until puberty in gilts. *J Anim Sci*, 56: 139-145.
- DÖCKE, F. (1994): Keimdrüsen. In: Döcke, F. (Ed.): *Veterinärmedizinische Endokrinologie*. Gustav Fischer Verlag, Jena, 1994, 3. Aufl.: 399-508.
- DUBREUIL, P., Pelletier, G., Petitclerc, D., Lapierre, H., Couture, Y., Brazeau, P., Gaudreau, P., Morisset, J. (1987): Influence of age and sex on basal secretion of growth hormone (GH) and on GH-induced release by porcine GH-releasing factor pGRF(1-29NH₂) in growing pigs. *Dom Anim Endocrinology*, 4: 299-307.
- DUBREUIL, P., Lapierre, H., Pelletier, G., Petitclerc, D., Couture, Y., Gaudreau, P., Morisset, J., Brazeau, P. (1988): Serum growth hormone release during a 60-hour period in growing pigs. *Dom Anim Endocrinology*, 5: 157-164.
- DUBREUIL, P., Pelletier, G., Couture, Y., Lapierre, H., Petitclerc, D., Morisset, J., Gaudreau, P., Brazeau, P. (1989): Castration and testosterone effects on endogenous and somatotrophin-induced growth hormone release in intact and castrated male pigs. *Dom Anim Endocrinology*, 6: 15-24.
- EDÉN, S. (1979): Age- and sex-related differences in episodic growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology*, 105: 555-560.
- ELLENDORFF, F., Parvizi, N., Elsaesser, F., Smidt, D. (1977): The miniature pig as a model in endocrine and neuroendocrine studies of reproduction. *Lab Anim Sci*, 27: 822-830.
- ELSAESSER, F., Parvizi, N., Ellendorff, F. (1978): Effect of prenatal testosterone on the stimulatory estrogen feedback on LH release in the pig. In: Dörner, G. und Kawakami M. (Ed.): *Hormones and Brain Development*. Elsevier, North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1978: 61-68.
- ELSAESSER, F., Parvizi, N., Ellendorff, F. (1978a): Steroid Feedback on luteinizing hormone secretion during sexual maturation in the pig. *Journal of Endocrinology*, 78: 329-342.
- ELSAESSER, F., Foxcroft, G.R. (1978b): Maturation changes in the characteristics of oestrogen-induced surges of luteinizing hormone in immature domestic gilts. *J Endocrinol*, 78: 455-456.
- ELSAESSER, F., Parvizi, N. (1979): Estrogen feedback in the pig: sexual differentiation and the effect of prenatal testosterone treatment. *Biology of Reproduction*, 20: 1187-1193.
- ELSAESSER, F. (1982): Endocrine control of sexual maturation in the female pig and sexual differentiation of the stimulatory oestrogen feedback mechanism. In: Cole, D.J.A. und Foxcroft, G.R. (Eds.): *Control of pig production*. Butterworths, London, 1982, 93-116.
- ELSAESSER, F., Smidt, D. (1985): Endokrine Aspekte der Steuerung von Sexualentwicklung und Pubertät beim Schwein. *Landbauforschung Völknerode*, 35 (2): 75-81.

- ELSAESSER, F., Bruhn, T.O., Parvizi, N. (1988): Ontogeny of pituitary gonadotrophin secretion in the fetal and post-natal pig in response to LHRH in vitro. *J Reprod Fert*, 82: 71-80.
- ELSAESSER, F., Parvizi, N., Foxcroft, G.R. (1992): Control of the LH surge mechanism in the female pig. *J Physiol Pharmacol*, 43 (Suppl 1): 69-78.
- ELSAESSER, F., Parvizi, N., Foxcroft, G. (1998): Ovarian modulation of the oestradiol-induced LH surge in prepubertal and sexually mature gilts. *J Reprod Fertil*, 113: 1-8.
- ELSAESSER, F. (2001): Failure to prove auto/paracrine regulation of porcine pituitary LH release by galanin. im Druck.
- EVANS, J.J. (1999): Modulation of gonadotropin levels by peptides acting at the anterior pituitary gland. *Endocr Rev*, 20: 46-67.
- FABRE-NYS, C., Venier, G (1991): Sexual differentiation of sexual behaviour and preovulatory LH surge in ewes. *Psychoneuroendocrinology*, 16: 383-396.
- FEINBERG, A.P., Vogelstein, B. (1983): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry*, 132: 6-13.
- FEINBERG, A.P., Vogelstein, B. (1984): Addendum: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry*, 137: 266-307.
- FLOR CRUZ, S.V., Lapwood, K.R. (1978): A longitudinal study of pubertal development in boars. *International Journal of Andrology*, 1: 317-330.
- FORD, J.J., Christenson R.K., Maurer, R.R. (1980): Serum testosterone concentrations in embryonic and fetal pigs during sexual differentiation. *Biology of Reproduction*, 23: 583-587.
- FORD, J.J., Christenson, R.K. (1987): Influences of pre- and postnatal testosterone treatment on defeminization of sexual receptivity in pigs. *Biology of Reproduction*, 36: 581-587.
- FOXCROFT G.R., Elsaesser, F., Stickney, K., Haynes, N.B., Back, H.L. (1984): Ovarian oestrogen-dependent maturation of the LH/FSH surge mechanism during prepubertal development in the gilt. *J Endocrinology*, 101: 371-380.
- FROHMAN, L.A., Downs, T.R., Chomczynski, P. (1992): Regulation of growth hormone secretion. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 13: 344-405.
- GATFORD, K.L., Fletcher, T.P., Clarke, I.J., Owens, P.C., Quinn, K.J., Walton, P.E., Grant, P.A., Hosking, B.J., Egan, A.R., Ponnampalam, E.N. (1996): Sexual dimorphism of circulating somatotropin, insulin-like growth factor I and II, insulin-like growth factor binding proteins, and insulin: Relationships to growth rate and carcass characteristics in growing lambs. *J Anim Sci*, 74: 1314-1325.
- GATFORD, K.L., Fletcher, T.P., Rao, A., Egan, A.R., Hosking, B.J. (1997): GH, GH-releasing factor and somatostatin in the growing lamb: sex differences and mechanisms for sex differences. *J Endocrinology*, 152: 19-27.
- GATFORD, K.L., Egan, A.R., Clarke, I.J., Owens, P.C. (1998): Sexual dimorphism of the somatotrophic axis. *J Endocrinology*, 157: 373-389.
- GEORGE, F.W., Wilson, J.D. (1994): Sex determination and differentiation. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Ed.): *The Physiology of reproduction*. Raven Verlag, New York, 1994, 2. Aufl.: 3-28.
- GHARIB, S.D., Bowers, S.M., Need, L.R., Chin, W.W. (1986): Regulation of rat luteinizing hormone subunit messenger ribonucleic acids by gonadal steroid hormones. *J Clin Invest*, 77: 582-589.
- GILL, J.W., Hosking, B.J. (1995): Acute prenatal androgen treatment increases birth weights and growth rates in lambs. *J Anim Sci*, 73: 2600-2608.
- GONZÁLEZ-PARRA, S., Chowen, J.A., Garcia-Segura, L.M., Argente, J. (1996): In vivo and in vitro regulation of pituitary transcription factor-1 (Pit-1) by changes in the hormone environment.
- GONZÁLEZ-PARRA, S., Argente, J., García-Segura, L.M., Chowen, J.A. (1998): Cellular composition of the adult rat anterior pituitary is influenced by the neonatal sex steroid environment. *Neuroendocrinology*, 68: 152-162.
- GONZÁLEZ-PARRA, S., Argente, J., García-Segura, L.M., Chowen, J.A. (2000): Effect of neonatal and adult testosterone treatment on the cellular composition of the adult female rat anterior pituitary. *J Endocrinology*, 164: 265-276.
- GORSKI, R.A. (1973): Perinatal effects of sex steroids on brain development and function. *Progress in Brain Research*, 39: 149-163.
- GORSKI, R.A. (1985): Sexual dimorphisms of the brain. *J Anim Sci*, 61 (Suppl 3):38-61.
- GOXE, B., Prunier, A., Remy, J.-J., Salesse, R. (1993): Ontogeny of gonadal luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptors in the fetal pig and related changes in gonadotropin and testosterone secretion. *Biology of Reproduction*, 49: 609-616.
- GRANZ, S. (1994): Fötale und neonatale Entwicklung der mRNA-Konzentrationen von Wachstumshormon und Gonadotropinen beim Schwein. Dissertation Göttingen, Landbauforschung Völknerode, Sonderheft 10.
- GRANZ, S., Ellendorff, F., Grossmann, R., Kato, Y., Mühlbauer, E., Elsaesser, F. (1997): Ontogeny of growth hormone and LHB-, FSHB- and α -Subunit mRNA levels in the porcine fetal and neonatal anterior pituitary. *Journal of Neuroendocrinology*, 9: 439-449.
- HAMERNIK, D.L., McFarland, S.Y., de Avila, D., Becker, S.R., Reeves, J.J. (1987): Endocrine and body growth traits in heifers exposed to testosterone-propionate during early fetal development. *J Anim Sci*, 64: 1858-1866.
- HANSEN, L.R., Drackley, J.K., Berger, L.L., Grum, D.E. (1995): Prenatal androgenization of lambs: I. Alterations of growth, carcass characteristics, and metabolites in blood. *J Anim Sci*, 73: 1694-1700.
- HERBOSA, C.G., Dahl, G.E., Evans, N.P., Pelt, J., Wood, R.I., Foster, D.L. (1996): Sexual differentiation of the surge mode of gonadotropin secretion: prenatal androgens abolish the

- gonadotropin-releasing hormone surge in the sheep. *J Neuroendocrinology*, 8: 627-633.
- HIORT, O., Holterhus, P.M. (2000): The molecular basis of male sexual differentiation. *European J Endocrinology*, 142: 101-110.
- HU, Z., Friberg, R.D., Barkan, A.L. (1993): Ontogeny of GH mRNA and GH secretion in male and female rats: regulation by GH-releasing hormone. *Am J Physiol*; 265: E236-E242.
- IBRAHIM, S.N., Moussa, S.M., Childs, G.V. (1986): Morphometric studies of rat anterior pituitary cells after gonadectomy: correlation of changes in gonadotropes with the serum levels of gonadotropins. *Endocrinology*: 119: 629-637.
- INOMATA, T., Inoue, S., Sugawara, H., Kajihara, H., Shinomiya, T., Wagai, I., Ninomiya, H., Oshida, T., Shirai, M., Hashimoto, Y. (1993): Developmental changes in paramesonephric and mesonephric duct and the external genitalia in swine fetuses during sexual differentiation. *J Vet Med Sci*, 55: 371-378.
- JANSSON, J.O., Ekberg, S., Isaksson, O.G.P., Edén, S. (1984): Influence of gonadal steroids on age- and sex-related secretory patterns of growth hormone in the rat. *Endocrinology*, 114: 1287-1294.
- JANSSON, J.-O., Edén, S., Isaksson, O. (1985): Sexual dimorphism in the control of growth hormone secretion. *Endocrine Reviews*, 6: 128-150.
- JANSSON, J.-O., Ekberg, S., Isaksson, O., Mode, A., Gustafsson, J.-Å. (1985a): Imprinting of growth hormone secretion, body growth, and hepatic steroid metabolism by neonatal testosterone. *Endocrinology*, 117: 1881-1889.
- JANSSON, J.-O., Frohman, L.A. (1987): Differential effects of neonatal and adult androgen exposure on the growth hormone secretory pattern in male rats. *Endocrinology*, 120: 1551-1557.
- JANSSON, J.-O., Frohman, L.A. (1987a): Inhibitory effect of the ovaries on neonatal androgen inhibiting of growth hormone secretion in female rats. *Endocrinology*, 121: 1417-1423.
- JENKINS, T.G., Ford, J.J., Klindt, J. (1988): Postweaning growth, feed efficiency and chemical composition of sheep as affected by prenatal and postnatal testosterone. *J Anim Sci*, 66: 1179-1185.
- JOST, A. (1947): Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de Lapin. I. Introduction et embryologie génitale normale. II. Action des androgènes de synthèse sur l'histogénèse génitale. III. Rôle des gonades fœtales dans la différenciation sexuelle somatique. *Arch. Anat. Micr. Morph. Exp.* 36:151, 242 und 271, zit. nach NEUMANN, F. (1976): Endokrinologische Aspekte der Geschlechtsdifferenzierung. *Gynäkologe*, 9: 16-29.
- KAMINSKI, M.A., Corbin, C.J., Conley, A.J. (1999): Development and differentiation of the interstitial and tubular compartments of fetal porcine testes. *Biology of Reproduction*, 60: 119-127.
- KARG, H. (1994): Hormonale Regulation des Wachstums. In: Döcke, F. (Ed.): *Veterinärmedizinische Endokrinologie*. Gustav Fischer Verlag, Jena, 1994, 3. Aufl.: 176-211.
- KARSCH, F.J., Foster, D.L. (1975): Sexual differentiation of the mechanism controlling the preovulatory discharge of luteinizing hormone in sheep. *Endocrinology*, 97: 373-379.
- KATO, Y., Hirai, T. (1989): Cloning and DNA sequence analysis of the cDNA for the precursor of porcine luteinizing hormone (LH) beta subunit. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 62: 47-53.
- KATO, Y., Shimokawa, N., Kato, T., Hirai, T., Yoshihama, K., Kawai, H., Hattori, M., Ezashi, T., Shimogori, Y., Wakabayashi, K. (1990): Porcine growth hormone: Molecular cloning of cDNA and expression in bacterial and mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1048: 290-293.
- KINGSBURY, D.L., Rawlings, N.C. (1993): Effect of exposure to a boar on circulating concentrations of LH, FSH, cortisol and oestradiol in prepubertal gilts. *J Reprod Fertil*, 98: 245-250.
- KITTOK, R.J., Kinder, J.E., Johnson, R.K. (1984): Effect of castration on plasma luteinizing hormone concentrations in prepubertal boars. *J Anim Sci*, 58: 1271-1277.
- KLINDT, J., Stone, R.T. (1984): Porcine growth hormone and prolactin: Concentrations in the fetus and secretory patterns in the growing pigs. *Growth*. 48: 1-15.
- KLINDT, J. (1986): Porcine growth hormone and prolactin secretion: the first month of postnatal life. *Growth*, 50: 516-525.
- KLINDT, J., Jenkins, T.G., Ford, J.J. (1987): Prenatal androgen exposure and growth and secretion of growth hormone and prolactin in ewes postweaning. *Proc Soc Exp Biol Med*, 185: 201-205.
- KLINDT, J., Ford, J.J., Macdonald, G.J. (1990): Synergism of testosterone propionate with growth hormone in promoting growth of hypophysectomized rats: effect of sexual differentiation. *J Endocrinology*, 127: 249-256.
- KNIPPERS, R. (1985): *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 4. Aufl.
- KOSUT, S.S., Wood, R.L., Herbosa-Enkarnación, C., Foster, D.L. (1997): Prenatal androgens time neuroendocrine puberty in sheep: effect of testosterone dose. *Endocrinology*, 138: 1072-1077.
- LAM, K.S., Lee, M.F., Tam, S.P., Srivastava, G. (1996): Gene expression of the receptor for GRF is physiologically regulated by glucocorticoids and estrogen. *Neuroendocrinology*, 63: 475-480.
- LAMBERSON, W.R., Safranski, T.J., Bates, R.O., Keisler, D.H., Matteri, R.L. (1995): Relationships of serum insulin-like growth factor I concentrations to growth, composition, and reproductive traits of swine. *J Anim Sci*, 73: 3241-3245.
- LOUVEAU, I., Bonneau, M., Salter, D.N. (1991): Age-related changes in plasma porcine growth hormone (GH) profiles and insulin-like growth factor-I (IGF-I) concentrations in large white and meishan pigs. *Reprod Nutr Dev*, 31: 205-216.
- LÜKING-JAYES, F.C., Britt, J.H., Esbendshade, K.I. (1997): Role of gonadotropin-releasing hormone pulse frequency in

- differential regulation of gonadotropins in the gilt. *Biology of Reproduction*, 56: 1012-1019.
- LUTZ, J.B., Rampacek, G.B., Kraeling, R.R., Pinkert, C.A. (1984): Serum luteinizing hormone and estrogen profiles before puberty in the gilt. *J Anim Sci*, 58: 686-691.
- MA, E. (1991): Genexpression adenohipophysärer Hormone während der Fötogeneze beim Schwein. Dissertation Göttingen, Landbauforschung Völkenrode, Sonderheft 120.
- MA, E. Klempt, N., Grossmann, R., Ivell, R., Kato, Y., Ellendorff, F. (1996): Expression of GH, TSH β , LH β and FSH β genes during fetal pituitary development in the pig. *Exp Clin Endocr Diab*, 104: 464-472.
- MACLUSKY, N.J., Naftolin, F. (1981): Sexual Differentiation of the central nervous System. *Science*, 211: 1294-1303.
- MASEK, K.S., Wood, R.I., Foster, D.L. (1999): Prenatal dihydrotestosterone differentially masculinizes tonic and surge modes of luteinizing hormone secretion in sheep. *Endocrinology*, 140: 3459-3466.
- MATTERI, R.L., Carroll, J.A. (1997): Somatotroph function in the neonatal pig. *Dom Anim Endocrinology*, 14: 241-249.
- MOLECULAR-ANALYST / PC – Instructional Manual, Version 1.5, Molecular Bioscience Group, Hercules, Canada.
- MÜLLER, E.E., Locatelli, V., Cocchi, D. (1999): Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiological Reviews*, 79: 511-607.
- NEUMANN, F. (1976): Endokrinologische Aspekte der Geschlechtsdifferenzierung. *Gynäkologe*, 9: 16-29.
- NOGAMI, H., Takeuchi, T., Suzuki, K., Okuma, S., Ishikawa, H. (1989): Studies on prolactin and growth hormone gene expression in the pituitary gland of spontaneous dwarf rats. *Endocrinology*, 125: 964-970.
- OWENS, P.C., Conlon, M.A., Campbell, R.G., Johnson, R.J., King, R. (1991): Developmental changes in growth hormone, insulin-like growth factors (IGF-I and IGF-II) and IGF-binding proteins in plasma of young growing pigs. *J Endocrinology*, 128: 439-447.
- OWENS, P.C., Gafford, K.L., Walton, P.E., Morley, W., Campbell, R.G. (1999): The relationship between endogenous insulin-like growth factors and growth in pigs. *J Anim Sci*, 77: 2098-2103.
- PAINSON, J.-C., Tannenbaum, G.S. (1991): Sexual dimorphism of somatostatin and growth hormone-releasing factor signaling in the control of pulsatile growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology*, 128: 2858-2866.
- PAKARINEN, P., Huhtaniemi, I. (1989): Gonadal and sex steroid feedback regulation of gonadotropin mRNA levels and secretion in neonatal male and female rats. *J Mol Endocrinology*, 3: 139-144.
- PAKARINEN, P., Proshlyakova, E., Huhtaniemi, I. (1994): Pituitary-gonadal interactions in perinatal rats: relationships of plasma luteinizing hormone and testosterone concentrations, and pituitary levels of LH subunit mRNAs. *Neuroendocrinology*, 60: 42-49.
- PANTALEON, M., Whiteside, E.J., Hervey, M.B., Barnard, R.T., Waters, M.J., Keye, P.L. (1997): Functional growth hormone (GH) receptors and GH are expressed by preimplantation mouse embryos: A role for GH in early embryogenesis? *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 5125-5130.
- PAPAVASILIOU, S.S., Zmeili, S., Herbon, S., Duncan-Weldon, J., Marshall, J.C., Landefeld, T.D. (1986): α and luteinizing hormone β messenger ribonucleic acid (RNA) of male and female rats after castration: quantitation using an optimized RNA dot blot hybridisation assay. *Endocrinology*, 119: 691-698.
- PARMA, P., Pailhoux, E., Cotinot, C. (1999): Reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of genes involved in gonadal differentiation in pigs. *Biology of Reproduction*, 61: 741-748.
- PELLINIEMI, L.J. (1975): Ultrastructure of the early ovary and testis in pig embryos. *Am J Anat*, 144: 89-111.
- PELLINIEMI, L.J. (1985): Sexual differentiation of the pig gonad. *Arch Anat Micr Morphol Exper*, 74: 76-80.
- PFEIFFER, C.A. (1936): *Amer J Anat*, 58:195, zit. nach MACLUSKY, N.J., Naftolin, F. (1981): Sexual differentiation of the central nervous System. *Science*, 211: 1294-1303.
- PHORNPHUTKUL, C., Frick, G.P., Goodman, H.M., Berry, S.A., Gruppuso, P.A. (2000): Hepatic growth hormone signaling in the late gestation fetal rat. *Endocrinology*, 141: 3527-3533.
- PLOUZEK, C.A., Trenkle, A. (1991): Growth hormone parameters at four ages in intact and castrated male and female cattle. *Dom Anim Endocrinology*, 8: 63-72.
- PONZILIUS, K.-H., Parvizi, N., Elsaesser, F., Ellendorff, F. (1986): Ontogeny of secretory patterns of LH release and effect of gonadectomy in the chronically catheterized pig fetus and neonate. *Biology of Reproduction*, 34: 602-612.
- PRUNIER, A.F., Martinat-Botté, F., Ravault, J.P., Camous, S. (1987): Perioestrus patterns of circulating LH, FSH, prolactin and oestradiol-17 β in the gilt. *Anim Reprod Sci*, 14: 201-218.
- PRUNIER, A., Louveau, I. (1997): Influence of ovariectomy on metabolic and endocrine parameters during sexual development in the female pigs. *J Endocrinology*, 154: 423-429.
- PUTNEY, D.J., Beal, W.E., Good, G.A. (1984): Effects of prenatal androgen exposure on sexual development and estrus cycles in female calves. *J Anim Sci*, 59 (Suppl.1): 339 (Abstr.)
- RAESIDE, J.I., Sigman, D.M. (1975): Testosterone levels in early fetal testes of domestic pigs. *Biology of Reproduction*, 13: 318-312.
- RANDALL, G.C.B. (1989): Effect of hypophysectomy on body and organ weights and subsequent development in the fetal pig. *Can J Anim Sci*, 69: 655-661.
- REILING, B.A., Berger, L.L., Faulkner, D.B., McKeith, F.K., Nash, T.G. (1995): Effect of prenatal androgenization on performance, lactation, carcass, and sensory traits of heifers in a single-calf heifer system. *J Anim Sci*, 73: 986-992.
- RESKO, J.A., Roselli, C.E. (1997): Prenatal hormones organize sex differences of the neuroendocrine reproductive system:

- observations on guinea pigs and nonhuman primates. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 17: 627-648.
- REYNOLDS, L.P., Ferrell, C.L., Robertson, D.A., Klindt, J. (1990): Growth hormone, insulin and glucose concentrations in bovine fetal and maternal plasmas at several stages of gestation. *J Anim Sci*, 68: 725-733.
- RHEES, R.W., Kirk, B.A., Sephton, S., Lemphart, E.D. (1997): Effects of prenatal testosterone on sexual behaviour, reproductive morphology and LH secretion in the female rat. *Dev Neurosci*, 19: 430-437.
- RUDD, C.D., Short, R.V., McFarlane, J.R., Renfree, M.B. (1999): Sexual differentiation of oestradiol-LH positive feedback in a marsupial. *J Reprod Fertil*, 115: 269-274.
- SAMBROOK, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989): *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 2. Aufl.
- SCHINCKEL, A.P., Johnson, R.K., Kittok, R.J. (1984): Testicular development and endocrine characteristics of boars selected for either high or low testis size. *J Anim Sci*, 58: 675-685.
- SCHNOEBELEN-COMBES, S., Louveau, I., Postel-Vinay, M.C., Bonneau, M. (1996): Ontogeny of GH receptor and GH-binding protein in the pig. *J Endocrinology*, 148: 249-255.
- SEIDEMAN, S.C., Cross, H.R., Oltjen, R.R., Schanbacher, B.D. (1982): Utilization of the intact male for red meat production: A review. *J Anim Sci*, 55: 826-840.
- SERPEK, B., Elsaesser, F., Meyer, H.H.D. (1993): Development of an enzyme immunoassay for the determination of porcine growth hormone in plasma. *Analytica Chimica Acta*, 275: 183-187.
- SIERS, D.G., Swinger, L.A. (1971): Influence of live weight, age and sex on circulating growth hormone levels in swine. *J Anim Sci*, 32: 1229-1232.
- SLOB, A.K., van der Werff ten Bosch, J.J. (1975): Sex differences in body growth in the rat. *Physiol Behav*, 14: 353.
- STICKAN, F., Parvizi, N., Elsaesser, F. (1999): Compensation by pulsatile GnRH infusions for incompetence for oestradiol-induced LH surges in long-term ovariectomized gilts and castrated male pigs. *J Reprod Fertil*, 115: 333-339.
- STRYKER, J.L., Dzuik, P.J. (1975): Effect of fetal decapitation on fetal development, parturition and lactation in the pig. *J Anim Sci*, 10: 282-287.
- THEILL, L.E., KARIN, M. (1993): Transcriptional control of GH Expression and anterior pituitary development. *Endocrine Reviews*, 14: 670-689.
- THOMPSON, D.L., DePew, C.L., Ortiz, A., Sticker, L.S., Rahmanian, M.S. (1994): Growth hormone and prolactin concentrations in plasma of horses: sex differences and the effects of acute exercise and administration of growth hormone-releasing hormone. *J Anim Sci*, 72: 2911-2918.
- TORRONTERAS, R., Gracia-Navarro, F., Elsaesser, F. (1997): Control of growth hormone secretion from porcine fetal and neonatal pituitary tissue in vitro by growth hormone-releasing hormone, somatostatin, and insulin like growth factor. *Neuroendocrinology*, 65: 117-128.
- TRUDEAU, V.L., Meijer, J.C., Erkens, J.H., van de Wiel, D.F., Wensing, C.J. (1992): Pubertal development in the male pig: effects of treatment with a long-acting gonadotropin-releasing hormone agonist on plasma luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and testosterone. *Can J Vet Res*, 56: 102-109.
- TUGGLE, C.K., Trenkle, A. (1996): Control of growth hormone synthesis. *Dom Anim Endocrinology*, 13:1-33.
- UNRUH, J.A. (1986): Effects of endogenous and exogenous growth-promoting compounds on carcass composition, meat quality and meat nutritional value. *J Anim Sci*, 62: 1441-1448.
- VAN VORSTENBOSCH, C.J.A.H.V., van Rossum-Kok, C.M.J.E., Colenbrander, B., Wensing, C.J.G. (1986): Some histochemical and ultrastructural observations on the early foetal pig testis. *J Embriol Exp Morph*, 95: 261-277.
- VENNIER, B., Raynaud, J.P. (1975): Effect of estrogen plasma binding on sexual differentiation of the rat fetus. *Mol Cell Endocrinol*, 3: 323.
- WALSTRA, P. (1980): Growth and carcass composition from birth to maturity in relation to feeding level and sex in Dutch Landrace pigs. H. Veenman und Zonen B.V., Wageningen.
- WEHRENBURG, W.B., Baird, A., Ying, S-Y., Ling, N. (1985): The effects of testosterone and estrogen on the pituitary growth hormone response to growth hormone-releasing factor. *Biol Reprod*, 32: 369-375.
- WEHRENBURG, W.B., Giustina, A. (1992): Basic counterpoint: Mechanisms and pathways of gonadal steroid modulation of growth hormone. *Endocrine Reviews*, 13: 299-308.
- WHITE, B.R., Lan, Y.H., McKeith, F.K., Novakofski, J., Wheeler, M.B., McLaren, D.G. (1995): Growth and body composition of Meishan and Yorkshire barrows and gilts. *J Anim Sci*, 73: 738-749.
- WIEMAN ME., Gharib, S.D., LaRovere, J.M., Badger, T.M., Chin, W.W. (1988): Selective failure of androgens to regulate follicle stimulating hormone beta messenger ribonucleic acid levels in the male rat. *Mol Endocrinol*, 2: 492-498.
- WIEMAN, M.E., Gharib, S.D., Wang, C., LaRovere, J.M., Badger, T.M., Chin, W.W. (1990): Divergent regulation of gonadotropin subunit mRNA levels by androgens in the female rat. *Biol Reprod*, 43: 191-195.
- WILSON, P.R., Tartellin, M.F. (1978): Studies of sexual differentiation of sheep. *Acta Endocrinologica*, 89: 182-189.
- WISE, T.H., Christenson, R.K. (1992): Relationship of fetal position within the uterus to fetal weight, placental weight, testosterone, estrogens, and thymosin β_4 concentrations at 70 and 104 days of gestation in swine. *J Anim Sci*, 70: 2787-2793.
- WOOD, R.I., Ebling, F.J.P., I'Anson, H., Bucholtz, D.C., Yellon, S.M., Foster, D.L. (1991): Prenatal androgens time neuroendocrine sexual maturation. *Endocrinology*, 128: 2457-2468.
- WOOD, R.I., Mehta, V., Herbosa, C.G., Foster, D.L. (1995): Prenatal testosterone differentially masculinizes tonic and

- surge modes of luteinizing hormone secretion in the developing sheep. *Neuroendocrinology*, 62: 238-247.
- WOOD, R.I., Kim, S.J., Foster, D.L. (1996): Prenatal androgens defeminize activation of GnRH neurons in response to estradiol stimulation. *J Neuroendocrinology*, 8: 617-625.
- WOOD, R.I., Foster, D.L. (1998): Sexual differentiation of reproductive neuroendocrine function in sheep. *Reviews of Reproduction* 3: 130-140.
- WULF, U. (1998): The serologically detected H-Y antigen revisited. *Cytogenet Cell Genet*, 80: 232-235.
- ZEITLER, P., Argente, J., Chowen-Breed, J., Clifton, D.K., Steiner, J. (1990): Growth hormone-releasing hormone messenger ribonucleic acid in the hypothalamus of the adult male rat is increased by testosterone. *Endocrinology*, 127: 1362-1368.
- ZIMMERMAN, D.R., Bourn, P., Donovan, D. (1976): Effect of "transport phenomenon" stimuli and boar exposure on puberty in gilts. *J Anim Sci*, 42: 1362 (Abstract).

7 Verzeichnis der Abkürzungen

μg	Mikrogramm	KON	Kontrolle
μl	Mikroliter	LH	Luteinisierendes Hormon
^{32}P	Phosphor Isotop	mA	Milli-Ampere
AGD	anogenitale Distanz	mg	Milligramm
bp	Basenpaar (base pair)	MIF	Müllerian Inhibiting Factor
cDNA	complementäre Desoxyribonukleinsäure	min	Minute
Ci	Curie	ml	Milliliter
cpm	counts per minute	mm	Millimeter
CTP	Cytidintriphosphat	mM	Millimol
CV	Variationskoeffizient	mRNA	messenger Ribonukleinsäure
dCTP	Desoxyribose-CTP	MW	Mittelwert
DES	Diethylstilboestrol	NaCl	Natrium Chlorid
DHT	Dihydrotestosteron	ng	Nanogramm
DL	Deutsche Landrasse	nm	Nanometer
DMSO	Dimethylsulfoxid	p	porcin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz -Dihydrat	p.c.	post coitum
EM	Eminentia mediana	p.p.	post partum
EIA	Enzym Immuno Assay	rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
EtBr	Ethidium Bromid	RT	Raumtemperatur
ETOH	Äthanol	SDS	Sodiumdodecylsulfate
FSH	Folikelstimulierendes Hormon	SEM	Standardfehler des Mittels
g	Gramm	SRIF	Somatotropinreleasing inhibiting factor
GH	Wachstumshormon (Growth hormone)	SRY	Sex-determining region Y gene
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone	SSC	Saline-sodium citrate buffer
GRF	Growth hormone releasing factor	TP	Testosteronpropionat
h	human	TP30	dreimalige Testosteronpropionat Behandlung zwischen dem Tag 30 und 34 p.c.
h	Stunde	TP3040	sechsmalige Testosteronpropionat Behandlung zwischen dem Tag 30 und 44 p.c.
i.m.	intramuskulär	TP40	dreimalige Testosteronpropionat Behandlung zwischen dem Tag 40 und 44 p.c.
i.v.	intravenös	UV	Licht im ultravioletten Bereich
IGF	Insulin like growth factor	V	Volt
IgG	Immunoglobulin G	ZNS	Zentralnervensystem
kg	Kilogramm		
KG	Körpergewicht		

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

	Seite
Abb. 2-1: Schematische Darstellung der sexuellen Differenzierung beim Schwein (modifiziert nach ELSAESSER und SMIDT, 1985)	4
Abb. 2-2: Schematische Darstellung der androgenen Wirkung auf die somatische Differenzierung (modifiziert nach GEORGE und WILSON, 1994 und HIORT und HOLTERHUS, 2000)	4
Abb. 2-3: Mögliche Wege des Testosteron-Metabolismus im Gehirn in der Phase der Differenzierung (modifiziert nach RESKO und ROSELLI, 1997)	6
Abb. 3-1: Behandlungsschema der Sauen mit Testosteronpropionat (TP) oder Sesamöl zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Trächtigkeit	23
Abb. 3-2: Messung der ano-genitalen Distanz (AGD)	23
Abb. 3-3: Behandlungsschema der Sauen mit Testosteronpropionat (TP) oder Sesamöl zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Trächtigkeit	24
Abb. 3-4: Methodischer Ablauf des Genexpressionsnachweises	26
Abb. 3-5: Beispiel eines Gels aus dem Versuch mit fötalen Proben	27
Abb. 3-6: Spezifische Bande als digitales Signal	31
Abb. 3-7: Äußeres Genitale im Alter von 180 Tagen: A: Kontrollsau; B, C: unterschiedlich stark vergrößerte ano-genitale Distanz (AGD). Die Sauen waren durch das Muttertier dreimal im Abstand von 2 Tagen ab Tag 30 p.c. mit Testosteronpropionat behandelt worden.	33
Abb. 3-8: Geburtsgewichte aller lebend geborenen Kontrollferkel (KON) und der Ferkel, die im Abstand von 2 Tagen dreimal ab Tag 30 p.c. über das Muttertier mit Testosteronpropionat (TP30) behandelt worden waren (Behandlung: $p < 0,05$).	34
Abb. 3-9: Gewichtsentwicklung der Kontrollschweine (KON) und der Schweine, die im Abstand von 2 Tagen dreimal ab Tag 30 p.c. über das Muttertier mit Testosteronpropionat (TP30) behandelt worden waren.	34
Abb. 3-10: Individuelle Plasma-LH 8-Stunden-Profile der 180 Tage alten Kontrolltiere (KON) und der Schweine, die im Abstand von 2 Tagen dreimal ab Tag 30 p.c. über das Muttertier mit Testosteronpropionat (TP30) behandelt worden waren (# = Tiernummer).	35
Abb. 3-11: Plasma-LH-Mittelwerte ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) der 8-Stunden-Profile der Kontrolltiere (KON) und der Schweine, die im Abstand von 2 Tagen dreimal ab Tag 30 p.c. über das Muttertier mit Testosteronpropionat (TP30) behandelt worden waren (Geschlecht bzw. Kastration: $p < 0,001$).	36
Abb. 3-12: Plasma-LH-Mittelwerte ($\bar{X} + \text{SEM}$) der 8-Stunden-Profile der 180 Tage alten Kontrolltiere (KON) und der Schweine, die im Abstand von 2 Tagen dreimal ab Tag 30 p.c. über das Muttertier mit Testosteronpropionat (TP30) behandelt worden waren (Geschlecht bzw. Kastration: $p < 0,001$).	36
Abb. 3-13: Individuelle Plasma-GH 8-Stunden-Profile der 180 Tage alten Kontrolltiere (KON) und der Schweine, die im Abstand von 2 Tagen dreimal ab Tag 30 p.c. über das Muttertier mit Testosteronpropionat (TP30) behandelt worden waren (# = Tiernummer).	37
Abb. 3-14: Plasma-GH-Mittelwerte ($\bar{X} + \text{SEM}$) der 8-Stunden-Profile der 180 Tage alten Kontrolltiere (KON) und der Schweine, die im Abstand von 2 Tagen dreimal ab Tag 30 p.c. über das Muttertier mit Testosteronpropionat (TP30) behandelt worden waren (* : $p < 0,05$).	38
Abb. 3-15: A: Repräsentative Northern Blot Analyse für LH β mRNA aus der Adenohypophyse der 180 Tage alten Kontrolltiere (KON) und der Schweine, die im Abstand von 2 Tagen dreimal ab Tag 30 p.c. über das Muttertier mit Testosteronpropionat (TP30) behandelt worden waren. Von jeder Probe eines Tieres wurden 2,5 und 5,0 μg adenohypophysärer Gesamt-RNA aufgetragen. Pool 1, 2, 3, 4: Referenzproben mit 2,5 bzw. 5,0 μg Gesamt-RNA. Nylonmembranen wurden mit [α - ^{32}P] dCTP-markierter porciner LH β cDNA hybridisiert und die Signale wurden mit Phosphor Imager detektiert (Expositionszeit: 6 Stunden). B: Northern Blot Analyse des gleichen Blots mit humaner 18S rRNA rehybridisiert (Expositionszeit: 90 Minuten).	39

- Abb. 3-16: LHB mRNA-Niveau (relative optische Dichte, \bar{X} +SEM) in der Adenohypophyse der 180 Tage alten Kontrolltiere (KON) und der Schweine, die im Abstand von 2 Tagen dreimal ab Tag 30 p.c. über das Muttertier mit Testosteronpropionat (TP30) behandelt worden waren (Geschlecht bzw. Kastration: $p < 0,001$). 39
- Abb. 3-17: A: Repräsentative Northern Blot Analyse für GH mRNA aus der Adenohypophyse der 180 Tage alten Kontrolltiere (KON) und der Schweine, die im Abstand von 2 Tagen dreimal ab Tag 30 p.c. über das Muttertier mit Testosteronpropionat (TP30) behandelt worden waren. Von jeder Probe eines Tieres wurden 2,5 und 5,0 μg adenohypophysärer Gesamt-RNA aufgetragen. Pool 1, 2, 3, 4: Referenzproben mit 2,5 bzw. 5,0 μg Gesamt-RNA. Nylonmembranen wurden mit [α - ^{32}P] dCTP-markierter porciner LHB cDNA hybridisiert und die Signale wurden mit Phosphor Imager detektiert (Expositionszeit: 45 Minuten). B: Northern Blot Analyse des gleichen Blots mit humaner 18S rRNA rehybridisiert (Expositionszeit: 90 Minuten). 40
- Abb. 3-18: GH mRNA-Niveau (relative optische Dichte, \bar{X} +SEM) in der Adenohypophyse der 180 Tage alten Kontrolltiere (KON) und der Schweine, die im Abstand von 2 Tagen dreimal ab Tag 30 p.c. über das Muttertier mit Testosteronpropionat (TP30) behandelt worden waren. 41
- Abb. 3-19: Schematische Darstellung der phänotypischen Maskulinisierung der 80 Tage alten Kontrollföten (KON) und der Föten, die im Abstand von 2 Tagen dreimal ab Tag 30 p.c. (TP30) oder dreimal ab Tag 40 p.c. (TP40) über das Muttertier mit Testosteronpropionat behandelt worden waren. 42
- Abb. 3-20: A: Repräsentative Northern Blot Analyse für LHB mRNA aus der Adenohypophyse der 80 Tage alten Kontrollföten (KON) und der Föten, die im Abstand von 2 Tagen dreimal ab Tag 30 p.c. (TP30) oder dreimal ab Tag 40 p.c. (TP40) über das Muttertier mit Testosteronpropionat behandelt worden waren. Von jeder Probe eines Tieres wurden 5,0 μg adenohypophysärer Gesamt-RNA aufgetragen. Pool 1, 2, 3, 4: Referenzproben mit 2,5, 5,0 bzw. 10,0 μg Gesamt-RNA. Nylonmembranen wurden mit [α - ^{32}P] dCTP-markierter porciner LHB cDNA hybridisiert und die Signale wurden mit Phosphor Imager detektiert (Expositionszeit: 21 Stunden). B: Northern Blot Analyse des gleichen Blots mit humaner 18S rRNA rehybridisiert (Expositionszeit: 90 Minuten). 44
- Abb. 3-21: LHB mRNA-Niveau (relative optische Dichte, \bar{X} +SEM) in der Adenohypophyse der 80 Tage alten Kontrollföten (KON) und der Föten, die im Abstand von 2 Tagen dreimal ab Tag 30 p.c. (TP30) oder dreimal ab Tag 40 p.c. (TP40) über das Muttertier mit Testosteronpropionat behandelt worden waren (Geschlecht: $p < 0,001$; * signifikant von TP30-weiblich, $p < 0,05$). 44
- Abb. 3-22: A: Repräsentative Northern Blot Analyse für GH mRNA aus der Adenohypophyse der 80 Tage alten Kontrollföten (KON) und der Föten, die im Abstand von 2 Tagen dreimal ab Tag 30 p.c. (TP30) oder dreimal ab Tag 40 p.c. (TP40) über das Muttertier mit Testosteronpropionat behandelt worden waren. Von jeder Probe eines Tieres wurden 5,0 μg adenohypophysärer Gesamt-RNA aufgetragen. Pool 1, 2, 3, 4: Referenzproben mit 2,5, 5,0 bzw. 10,0 μg Gesamt-RNA. Nylonmembranen wurden mit [α - ^{32}P] dCTP-markierter porciner GH cDNA hybridisiert und die Signale wurden mit Phosphor Imager detektiert (Expositionszeit: 10 Minuten). B: Northern Blot Analyse des gleichen Blots mit humaner 18S rRNA rehybridisiert (Expositionszeit: 90 Minuten). 45
- Abb. 3-23: GH mRNA-Niveau (relative optische Dichte, \bar{X} +SEM) in der Adenohypophyse der 80 Tage alten Kontrollföten (KON) und der Föten, die im Abstand von 2 Tagen dreimal ab Tag 30 p.c. (TP30) oder dreimal ab Tag 40 p.c. (TP40) über das Muttertier mit Testosteronpropionat behandelt worden waren. 46
- Tabelle 3-1: Verwendete Hybridisierungsverfahren 30
- Tabelle 3-2: Anzahl der Tiere in den Versuchsgruppen 33
- Tabelle 3-3: Körper- und Adenohypophysengewichte sowie Gesamt-RNA-Menge der 80 Tage alten Kontrollföten (KON) und der Föten, die im Abstand von 2 Tagen dreimal ab Tag 30 p.c. (TP30) oder dreimal ab Tag 40 p.c. (TP40) über das Muttertier mit Testosteronpropionat behandelt worden waren. 43

Lieferbare Sonderhefte/

Following special issues are available:

- 208/2000 Ingo Hagel
Differenzierung und Charakterisierung von Weizen verschiedener Anbausysteme und Sorten durch Proteinfractionierung (7,00 €)
- 210/2000 Ursula Pultke
Freilanduntersuchungen zum Schwefelhaushalt eines Agrarökosystems mittels Analyse stabiler S-Isotope (7,00 €)
- 212/2000 Franz Ellendorff und Hartmut Stützel (Herausgeber)
Workshop "Nachhaltige Landwirtschaft" vom 31.05. - 02.06.1999
- Tagungsband - (10,00 €)
- 213/2000 Ulrich Dämmgen (Herausgeber)
Versauernde und eutrophierende Luftverschmutzung in Nordost-Brandenburg (7,00 €)
- 214/2000 Ulf Prüsse
Entwicklung, Charakterisierung und Einsatz von Edelmetallkatalysatoren zur Nitratreduktion mit Wasserstoff und Ameisensäure sowie des Strahlschneider-Verfahrens zur Herstellung Polyvinylalkohol-verkapselter Katalysatoren (10,00 €)
- 215/2000 Torsten Hemme
Ein Konzept zur international vergleichenden Analyse von Politik- und Technikfolgen in der Landwirtschaft (15,00 €)
- 216/2000 Sven Dänicke und Elisabeth Oldenburg (Herausgeber)
Risikofaktoren für die Fusariumtoxinbildung in Futtermitteln und Vermeidungsstrategien bei der Futtermittelerzeugung und Fütterung (7,00 €)
- 218/2000 Luit J. de Kok, Dieter Grill, Malcom J. Hawkesford, Ewald Schnug and Ineke Stulen (Editors)
Plant Sulfur Research in Europe
Cost Action 829
Fundamental, Agronomical and Environmental Aspects of Sulfur Nutrition and Assimilation in Plants (7,00 €)
- 219/2000 Carsten in der Wiesche
Untersuchungen zur Sanierung PAK-kontaminierter Böden mit Weißfäulepilzen (7,00 €)
- 220/2000 Ingo Hagel
Auswirkungen einer Schwefeldüngung auf Ertrag und Qualität von Weizen schwefelmangelgefährdeter Standorte des Ökologischen Landbaus (7,00 €)
- 221/2000 Franz-Josef Bockisch (Herausgeber)
Beurteilung der raumklimatischen Wirkungen von Dämmstoffen aus nachwachsenden Rohstoffen (7,00 €)
- 222/2001 Magret Lahmann
Prognose der Nachfrage nach Milch und Milcherzeugnissen in Deutschland und Frankreich bis zum Jahre 2005 (12,00 €)
- 223/2001 Josef Kamphues und Gerhard Flachowsky (Herausgeber)
Reihe: Nachhaltige Tierproduktion
Expo 2000 Workshop
Tierernährung - Ressourcen und neue Aufgaben (Tagungsband) (17,00 €)
- 230/2001 Nežika Petrič
Pränatale Regulation der sexuellen Differenzierung von Luteinisierungshormon und Wachstumshormon Genexpression und Sekretion beim Schwein (7,00 €)
- 231/2001 Bernhard Osterburg und Hiltrud Nieberg (Herausgeber)
Agrarumweltprogramme - Konzepte, Entwicklungen, künftige Ausgestaltung (7 €)