

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung..... 10

2. Literaturübersicht..... 12

2.1 Einleitung der Literaturübersicht.....12

2.2 Spermatogenese..... 15

2.2.1 Ort der Spermatogenese: Anatomische und endokrinologische Grundlagen..... 15

2.2.2 Keimzellendifferenzierung und Spermatogenesestadien..... 17

2.2.3 Kinetik der Spermatogenese..... 19

2.2.4 Hormonelle Regulation der Spermatogenese beim Pferd..... 21

2.2.5 Pubertät und Spermatogenese beim Pferd..... 22

2.2.6 Saisonale Beeinflussung der reproduktiven Vorgänge beim Hengst..... 23

2.3 Kryptorchismus..... 24

2.4 Kernproteine (Zellkernproteine)..... 25

2.5 Transitionsproteine..... 26

2.5.1 Zusammensetzung..... 28

2.5.1.1 Transitionsprotein 1..... 28

2.5.1.2 Transitionsprotein 2..... 28

2.5.1.3 Weitere Transitionsproteine..... 29

2.5.2 Funktionen und Interaktionen der Transitionsproteine..... 30

2.5.2.1 Transitionsprotein 1..... 30

2.5.2.2 Transitionsprotein 2..... 31

2.5.2.3 Transitionsprotein 3 und Transitionsprotein 4..... 32

2.5.3 Austausch der Histone gegen die Transitionsproteine 33

2.6 Protamine..... 35

2.6.1 Historie..... 35

2.6.2 Zusammensetzung..... 37

2.6.2.1 Protamin 1 (Prm1) und seine Struktur..... 37

2.6.2.2 Protamin 2 (Prm2) und seine Struktur.....	38
2.6.3 Interaktionen der Protamine.....	39
2.6.3.1 Interaktionen zwischen DNA und Protaminen.....	39
2.6.3.2 Intermolekulare Interaktionen der Protamine.....	45
2.6.3.3 Tertiärstruktur und räumliche Anordnung der Protamin-DNA-Komplexe im Spermienzellkern.....	48
2.6.4 Funktion und Bedeutung der Protamine für das Spermium.....	56
2.7 Stadienspezifische Transkription und Expression von Protaminen und Transitionsproteinen.....	60
2.8 Homologien.....	62
2.8.1 Transitionsprotein 1.....	62
2.8.2 Transitionsprotein 2.....	62
2.8.3 Protamin 1.....	62
2.8.4 Protamin 2.....	63
3. Material und Methoden.....	64
3.1 Materialgewinnung.....	64
3.2 Fixierung des Hodengewebes.....	64
3.3 Einbettung und Schnittherstellung.....	65
3.3.1 Einbettung in Paraffin.....	65
3.3.2 Beschichtung der Objektträger.....	65
3.3.3 Herstellung der Paraffinschnitte.....	66
3.4 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung.....	66
3.4.1 Durchführung.....	66
3.4.2 Kriterien für die Bewertung der HE-Färbung.....	67
3.4.2.1 Lichtmikroskopische Kriterien für die Zuordnung zu Gruppe 1.....	68
3.4.2.2 Lichtmikroskopische Kriterien für die Zuordnung zu Gruppe 2.....	68
3.4.2.3 Lichtmikroskopische Kriterien für die Zuordnung zu Gruppe 3.....	68
3.4.2.4 Lichtmikroskopische Kriterien für die Zuordnung zu Gruppe 4.....	69
3.5 Reverse Transkription (RT) Polymerase Chain Reaction (PCR).....	70
3.5.1 Extraktion von RNA aus Kryomaterial.....	70

3.5.2 Erste-Strang-Synthese (cDNA).....	72
3.5.3 PCR.....	73
3.5.4 Agarose-Gel-Elektrophorese.....	74
3.6 In-Situ-Hybridisierung (ISH).....	76
3.6.1 Protokoll.....	76
3.6.2 Kriterien für die Bewertung der ISH.....	81
4. Ergebnisse	82
4.1 Übersicht über das untersuchte Hodenmaterial.....	82
4.1.1 Altersverteilung der Hengste.....	82
4.1.2 Anamnestiche Einteilung des untersuchten Hodenmaterials	82
4.2 Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung.....	83
4.2.1 Auswertung der Hamatoxylin-Eosin-Färbung.....	83
4.2.2 Dokumentation der HE-Färbungen.....	85
4.3 RT-PCR.....	89
4.4 In-Situ-Hybridisierung.....	90
4.4.1 Auswertung für Transitionprotein 1-mRNA (Tp1-mRNA).....	90
4.4.1.1 Tp1-mRNA-Expression in juvenilem Hodengewebe (Gruppe 1).....	90
4.4.1.2 Tp1-mRNA-Expression in Hodengewebe mit normaler Spermatogenese (Gruppe 2).....	90
4.4.1.2.1 Dokumentation der Tp1-mRNA-Expression in normalem Hodengewebe.....	90
4.4.1.2.2 Zusammenfassung der Tp1-mRNA-Expression in normalem Hodengeweb.....	94
4.4.1.3 Tp1-mRNA-Expression in Hodengewebe mit unvollständiger Spermatogenese (Gruppe 3).....	95
4.4.1.4 Tp1-mRNA-Expression in Hodengewebe ohne Spermatogenese (Gruppe 4).....	95
4.4.2 Auswertung für Transitionsprotein 2-mRNA.....	95
4.4.3 Auswertung für Protamin1-mRNA (Pr1-mRNA).....	96
4.4.3.1 Pr1-mRNA-Expression in juvenilem Hodengewebe (Gruppe 1).....	96
4.4.3.2 Pr1-mRNA-Expression in Hodengewebe mit normaler Spermatogenese (Gruppe 2).....	96
4.4.3.2.1 Dokumentation der Pr1-mRNA-Expression innerhalb einer normalen	

Spermatogenese.....	96
4.4.3.2.2. Zusammenfassung der Pr1-mRNA-Expression innerhalb einer normalen Spermatogenese.....	100
4.4.3.3 Pr1-mRNA-Expression in Hodengewebe mit unvollständiger Spermatogenese (Gruppe 3).....	100
4.4.3.4 Pr1-mRNA-Expression in Hodengewebe ohne Spermatogenese (Gruppe 4).....	101
4.4.4 Auswertung für Protamin2-mRNA (Pr2-m-RNA).....	101
4.4.4.1 Pr2-mRNA-Expression in juvenilem Hodengewebe (Gruppe 1).....	101
4.4.4.2 Pr2-mRNA-Expression in Hodengewebe mit normaler Spermatogenese (Gruppe 2).....	101
4.4.4.2.1 Dokumentation der Pr2-mRNA-Expression innerhalb einer normalen Spermatogenese.....	102
4.4.4.2.2 Zusammenfassung der Pr2-mRNA-Expression innerhalb einer normalen Spermatogenese.....	105
4.4.4.3 Pr2-mRNA-Expression in Hodengewebe mit unvollständiger Spermatogenese (Gruppe 3).....	105
4.4.4.4 Pr2-mRNA-Expression in Hodengewebe ohne Spermatogenese (Gruppe 4).....	106
4.4.4.5 Besonderheiten der Tp1-mRNA-Expression innerhalb verschiedener Altersgruppen.....	107
4.4.4.6 Vergleich der stadienspezifischen mRNA-Expression von Pr1 und Pr2.....	108
4.4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der ISH.....	110
5. Diskussion.....	111
5.1 Histologischen Beurteilung.....	111
5.2 RT-PCR.....	112
5.3 In-Situ-Hybridisierung.....	112
5.3.1 Übersicht.....	112
5.3.2 Transitionsproteine.....	112
5.3.3 Protamine.....	115
5.3.4 Diskussion der Methode der ISH.....	117
5.4 Regulation der stadienspezifischen Expression der Kernproteine.....	117

6. Zusammenfassung.....	119
7. Summary.....	121
8. Literaturverzeichnis.....	123
9. Bezugquellen.....	151
9.1 Stoffe, Reagenzien, Arbeitsmaterialien.....	151
9.2 Sonden und Primer.....	153
9.3 Geräte und Zubehör.....	153
9.4 Stamm-, Puffer- und andere herzustellende Lösungen.....	154
10. Verzeichnis der Abkürzungen.....	158
11. Danksagung.....	161
12. Erklärung.....	163