

Aus dem Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung
Eingereicht über den Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

**Synthese, Metabolismus und Rezeption
von Sexualsteroiden in ausgewählten reproduktiven
Organen und Geweben von Feliden**

Habilitationsschrift
Zur Erlangung der Lehrbefähigung
am Fachbereich Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Eingereicht von
Dr. rer. nat. Beate Braun

Berlin 2019

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	3
1. Forschungsziel und Aufbau der Habilitationsschrift.....	5
2. Einleitung.....	6
2.1. Reproduktive Organe der Katze	6
2.2. Sexualsteroiden	9
2.3. Sexualsteroidbiogenese und -metabolismus.....	10
2.4. Rezeptoren für Sexualsteroiden	12
3. Männlicher Genitaltrakt.....	13
3.1. Fetale Testes.....	13
3.2. Postnatale Entwicklung der Testes und Spermatogenese.....	16
3.3. Andere männliche Reproduktionsorgane.....	20
4. Weiblicher Genitaltrakt.....	21
4.1. Das fetale Ovar	21
4.2. Das adulte Ovar und Gelbkörper	23
4.3. Plazenta	28
5. Übergreifende Diskussion und Ausblick.....	31
5.1. Metabolismus von Steroiden – bei Katzenartigen ein bislang noch weit- gehend unbekanntes Terrain	31
5.2. Die „jungen“ Faktoren PGRMC1 und PGRMC2 – noch vieles unerforscht	32
5.3. Kontrazeption von Männchen – neue Ansätze möglich?	33
5.4. Saisonalität und Testisentwicklung – Gemeinsamkeiten bei der Regulation der Spermatogenese?	35
5.5. Modelltier Katze – für alle Fragestellungen gleich gut geeignet?	36
6. Zusammenfassung.....	39
7. Literaturverzeichnis.....	40
8. Publikationen, die Bestandteil der Habilitationsschrift sind	48

8.1.	Übersicht	48
8.2.	Darstellung des eigenen Anteils an den Publikationen	49
Anhang		53
Im Kapitel 8 aufgeführte Arbeiten im Original		53
	Publikation 1	54
	Publikation 2	63
	Publikation 3	73
	Publikation 4	84
	Publikation 5	95
	Publikation 6	116
	Publikation 7	129
	Publikation 8	137
Danksagung		153

Abkürzungsverzeichnis

17OH-	17-Hydroxy
AKR1C	Aldo-keto-reductase family 1C member
AR	Androgenrezeptor
CL	<i>Corpus luteum</i> , Gelbkörper
CYP11A1	Cholesterin-Monooxygenase, P-450 cholesterol side-chain cleavage enzyme, P450ssc, Cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1
CYP17A1	Steroid-17 α -Hydroxylase, Cytochrome P-450 steroid 17 α -monooxygenase, cytochrome P450 family 17 subfamily A member 1
CYP19A1	Aromatase, Cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHT	Dihydrotestosteron
ESR1	Östrogenrezeptor alpha, Östrogenrezeptor 1
ESR2	Östrogenrezeptor beta, Östrogenrezeptor 2
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GnRH	Gonadoliberin, Gonadotropin-Releasing-Hormon
GPER	G-Protein-gekoppelter Östrogenrezeptor
HRE	Hormone Response Element, hormonempfindlicher Bereich
HSD17B1	17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1
HSD17B2	17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2
HSD17B3	17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 3
HSD3B1	3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/ Δ 5 \rightarrow Δ 4-Isomerase Typ 1
IZW	Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung
LH	Luteotropin, Luteinisierendes Hormon
mRNA	messenger RNA
PGF2-alpha	Prostaglandin F2 alpha
PGR	Progesteronrezeptor
PGRMC1	Progesterone receptor membrane component 1
PGRMC2	Progesterone receptor membrane component 1
PTR	Pseudoträchtigkeit
SRD5A1	Steroid-5- α -Reduktase Typ 1
SRD5A2	Steroid-5- α -Reduktase Typ 2
StAR	Steroidogenic acute regulatory protein

STS	Steroidsulfatase
SULT1E1	Östrogensulfotransferase
SULT2A1	Hydroxysteroid-Sulfotransferase
TR	Trächtigkeit
ZP	<i>Zona pellucida</i>

1. Forschungsziel und Aufbau der Habilitationsschrift

Sexualsteroiden sind essentiell für eine erfolgreiche Fortpflanzung. Sie beeinflussen die Gametogenese, die Ausprägung der sekundären Geschlechtsmerkmale, Trächtigkeiten und vieles mehr. Obwohl prinzipiell diese Funktionen für alle Säugetiere identisch sind, gibt es Artunterschiede, die sich unter anderem bei ihrer Synthese als auch Rezeption widerspiegeln. Die Katzenartigen (*Felidae*) gehören zu den am stärksten bedrohten Tierarten, deshalb ist die Erforschung der Reproduktion und insbesondere der hormonellen Synthese und Regulation eine essentielle Voraussetzung für die Entwicklung von Verfahren der assistierten Reproduktion, wie beispielsweise Zyklus- und Trächtigkeitsmonitoring, Ovulationsinduktion, künstliche Besamung, Embryotransfer und Populationskontrolle. Die Hauskatze dient als Modell, bei dem grundlegende, also auch molekulare Untersuchungen durchgeführt werden können. Die gewonnenen Erkenntnisse können vergleichend an anderen *Felidae* validiert werden, bei denen in der Regel ein limitierter Zugang zu Proben besteht. Das Ziel der dieser Habilitationsschrift zugrunde liegenden Forschungsarbeiten war es daher, ausgewählte reproduktive Organe und Gewebe der Hauskatze hinsichtlich ihrer Kapazität zur Synthese und Rezeption von Sexualsteroiden näher zu charakterisieren. Vergleichend konnten Untersuchungen an Gelbkörpern von Luchsen durchgeführt werden.

Die Habilitationsschrift besteht aus zwei Teilen. Im ersten Teil wird zuerst in die Thematik eingeführt (Kapitel 2). Bei der Vorstellung der einzelnen Organe und Gewebe in Kapitel 2.1 werden die jeweiligen Zielsetzungen der Forschungsarbeiten detaillierter beschrieben. Die Ergebnisse eigener Studien werden nachfolgend in den Kapiteln 3 und 4 vorgestellt und im Vergleich zu Daten anderer Spezies kurz diskutiert. Eine vertiefte Diskussion zu ausgewählten Punkten erfolgt im Kapitel 5 „Übergreifende Diskussion und Ausblick“.

Im zweiten Teil (ab Kapitel 8) sind die in „peer reviewed journals“ veröffentlichten Arbeiten aufgeführt, welche die Grundlage dieser Habilitationsschrift bilden. Diese Publikationen sind, wenn Sie als Zitate in den Kapiteln 2 bis 5 erwähnt werden, zur besseren Erkennung fett markiert hervorgehoben. Der Anhang beinhaltet die Sonderdrucke der Veröffentlichungen. In diesen sind die Studien ausführlich beschrieben und umfassend diskutiert worden.

2. Einleitung

2.1. Reproduktive Organe der Katze

Neben den Gonaden Ovar (Eierstock) und Testis (Hoden), zählen auch akzessorische Geschlechtsdrüsen (bei der Katze: Ampulle, Prostata, Bulbourethraldrüse), Epididymis (Nebenhoden), Ductus deferens (Samenleiter) und Penis (männliche Seite) sowie Ovidukt (Eileiter), Uterus (Gebärmutter), Plazenta, Zervix (Gebärmutterhals) und Vagina (weibliche Seite) zu den reproduktiven Organen. In der vorliegenden Arbeit werden eigene Studien präsentiert, die ihren Fokus auf der Untersuchung von Plazenta, Gelbkörper (*Corpus luteum*), Ovar und Testis hatten, daher werden diese Organe/Gewebe nachfolgend ausführlicher vorgestellt.

Ovar und Testis unterscheiden sich hinsichtlich des Entwicklungsgrades ihrer Keimzellen zum Zeitpunkt der Geburt. Im Ovar von Säugetieren sind alle Keimzellen spätestens kurz nach der Geburt bereits vorhanden, so ist bei der Katze die Mitose der Oogonien ca. 37 Tage nach der Geburt vollendet (McGeady et al. 2006). Das Oogonium tritt in die Prophase der Meiose I ein und wird zur primären Oozyte. Sie verbleibt während einer Ruhephase in diesem Entwicklungsstadium, welche erst zu Beginn der präovulatorischen Follikelreifung beendet wird (Schnorr and Kressin 2011). Primäre Oozyten werden von Epithelzellen umschlossen und bilden sogenannte Primordialfollikel. Die weitere Follikelentwicklung einzelner Primordialfollikel über Primärfollikel, Sekundärfollikel und Antralfollikel bis hin zum Graafschen Follikel, welcher letztendlich ovuliert, findet überwiegend erst ab der Pubertät statt (McGeady et al. 2006, Palma et al. 2012). Erwachsene Katzen sind saisonal polyöstrisch. Die sexuell inaktive Phase (der Anöstrus) dauert 3 bis 4 Monate an. Der Proöstrus hat eine Dauer von 1 bis 4 Tagen, der Östrus von 3 bis 10 Tagen und der Interöstrus von 6 bis 16 Tagen (Intervet 2010). Katzen können sowohl spontan (Pelican et al. 2005, Gudermuth et al. 1997) als auch induziert (Wildt et al. 1981) ovulieren. Erfolgt keine Ovulation, atresieren die angebildeten Follikel. Nach einer Paarung ohne erfolgreiche Konzeption oder auch bei einer künstlichen Stimulation der Ovulation entwickelt sich eine Scheinträchtigkeit; diese dauert durchschnittlich 45 Tage. Die Trächtigkeit einer Katze besteht hingegen ca. 63 Tage (Intervet 2010). Der sich entwickelnde Embryo erreicht den Uterus ca. 6 bis 7 Tage nach Ovulation und nistet sich ungefähr ab dem 13. Tag ein (McGeady et al. 2006). Das Geschlecht des Fetus kann bei der Katze per Ultraschall frühestens ab Tag 38 festgestellt werden (Zambelli and Prati 2006). Es wurde bereits für ver-

schiedene Spezies gezeigt, dass ihre fetale Gonaden Steroide synthetisieren können, z.B. für Schaf (Quirke et al. 2001) und Maus (Dutta et al. 2014, Borday et al. 2013). Fetal gebildete Sexualsteroiden sind für die weitere Entwicklung des Fetus inklusive seiner reproduktiven Organe von Bedeutung (Kucinkas and Just 2005). Die Zielsetzung einer der später in dieser Habilitationsschrift genauer vorgestellten Studien (**Braun and Jewgenow 2017**) war es, nicht nur die Synthese, sondern auch die Rezeptoren von Sexualsteroiden in fetalen Gonaden der Hauskatze zu untersuchen, um den potentiellen auto-, para- und/oder endokrinen Einfluss von fetalen und maternalen Sexualsteroiden auf die gonadale Entwicklung der Hauskatze beurteilen zu können.

Im Ovar entsteht aus einem ovulierten Follikel durch Umbildungsprozesse ein sogenannter Gelbkörper. Gelbkörper sind transiente endokrine Drüsen. Sie dienen vornehmlich der Progesteronproduktion, welche zum Erhalt von Trächtigkeiten beiträgt (Stocco et al. 2007). Je nach Spezies wird die luteale Progesteronproduktion die gesamte Trächtigkeit über benötigt (z.B. bei Kaninchen und Schwein) oder aber die Progesteronproduktion wird in dem Maße von der Plazenta übernommen, dass schon während der Trächtigkeit Entnahmen von Ovarien nicht zum Abort führen, wie beim Schaf oder Mensch (McGeedy et al. 2006). Es gibt bei verschiedenen Spezies auch besondere Gelbkörper. So werden beim Elefanten neben den ovulatorischen Gelbkörpern auch akzessorische Gelbkörper gebildet (Lueders et al. 2012, Lueders et al. 2010). Bei Pferden gibt es zusätzlich zu den primären Gelbkörpern noch sekundäre (Allen 2001). Eine weitere Besonderheit stellen die persistierenden Gelbkörper bei den vier Luchsspezies dar. Es wurde mittels Ultraschalluntersuchungen und Hormonanalysen durch Kollegen vom Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung (IZW) festgestellt, dass Gelbkörper von Luchsen, im Gegensatz zu denen der Hauskatze und der meisten anderen Säugetiere, persistieren. Das bedeutet, dass sie auch noch nach Trächtigkeit und Laktation weiterhin aktiv im Ovar vorliegen und sich nicht vollständig zurückbilden (Goritz et al. 2009, Painer et al. 2014b). Persistierende Gelbkörper sind noch mindestens bei den nächsten zwei Zyklen präsent. Für die drei monoöstrischen Luchsarten (Iberischer, Eurasischer und Kanadischer Luchs) wird angenommen, dass die persistierenden Gelbkörper den Monoöstrus mit sichern könnten (Painer et al. 2014b). Da das IZW schon seit vielen Jahren erfolgreich mit dem Erhaltungszuchtprogramm für den Iberischen Luchs (*Iberian lynx ex-situ conservation breeding program*) in Spanien/Portugal im Bereich der Reproduktion zusammenarbeitet, war und ist die Suche nach den biologischen Grundlagen für dieses Phänomen seit mehreren Jahren For-

schungsgegenstand am IZW (siehe unter anderem: **Amelkina et al. 2016, Amelkina et al. 2015b**, Goritz et al. 2009, Painer et al. 2014b, **Zschockelt et al. 2015, Zschockelt et al. 2016**). Parallel zu der Charakterisierung der persistierenden Gelbkörper von Luchsen, wurden/werden auch die Gelbkörper von Katzen intensiver am IZW untersucht (**Amelkina et al. 2015a, Amelkina et al. 2015b, Amelkina et al. 2016, Zschockelt et al. 2014, Zschockelt et al. 2016**), denn zu Beginn unserer Studien war auch der Gelbkörperzyklus der Katze noch nicht sehr gut charakterisiert. Die Untersuchung der Steroidbiogenese und -rezeption sowie der Hormongehalte von felineen Gelbkörpern im Rahmen der breiteren Charakterisierung von felineen Gelbkörpern war Aufgabe und Inhalt einiger der später in dieser Habilitationsschrift näher vorgestellten und diskutierten Arbeiten (**Amelkina et al. 2015a, Amelkina et al. 2015b, Amelkina et al. 2016, Zschockelt et al. 2015, Zschockelt et al. 2014**).

Die Plazenta der Katze, wie auch die von Hund und anderen Raubtieren ist eine Gürtelplazenta (*Placenta zonaria*). Durch das einwachsende Chorion wird das uterine Epithel zerstört, auf maternaler Seite ist nur noch Endothel vorhanden (= Plazenta vom endothelio-chorialen Typ). Als zweite maternale Bindegewebsschicht entsteht eine Drüsendeckschicht. Oberhalb dieser Schicht erweitern sich die Drüsen zu Drüsenkammern. Daran angrenzend befindet sich das plazentare Lamellensystem, gebildet aus chorialen und endometrialen Lamellen. Nach der Geburt wird alles Gewebe oberhalb der Drüsendeckschicht als Dezidua abgestoßen (Schnorr and Kressin 2011). Die Zielstellung unserer Studie an der Katzenplazenta (**Braun et al. 2012b**) war es, herauszufinden, ob die Katzenplazenta Steroide produzieren kann und somit zum Erhalt der Trächtigkeit nach Ovariectomien beitragen könnte.

Hoden dienen zur Spermienproduktion und sind darüber hinaus eine bedeutende Steroidquelle. Die Keimzellen in fetalen Testes sind bei den meisten Säugetieren bis zum Stadium der (Prä-)Spermatogonien entwickelt. Die weitere Spermatogenese über Spermatozyten und Spermatiden bis hin zu reifen Spermien erfolgt erst ab der Pubertät. Spermien, welche den Hoden verlassen haben, werden sowohl während der Nebenhodendepassage, als auch durch den Kontakt mit Seminalplasma und ebenfalls im weiblichen Genitaltrakt weiter modifiziert. Diese Prozesse dienen der Verbesserung der Befruchtungskompetenz (Caballero et al. 2010). Die Untersuchung der Steroidsynthese und -rezeption während der postnatalen Testisentwicklung ist bisher nur an sehr wenigen Säugetierspezies erfolgt. Die Studien fanden meist nur entweder im Rahmen breiter ange-

legter Studien zur postnatalen Entwicklung von Gonaden statt, wie beispielsweise der Ziege (Faucette et al. 2014), oder bezogen sich auf ausgewählte Faktoren, wie dem Androgenrezeptor beim Menschen (Boukari et al. 2009). Dabei bieten solcherart Untersuchungen unter anderem die Möglichkeit herauszufinden, welche Sexualsteroiden bei welchen Schritten der Spermatogenese einen Einfluss haben könnten. Dass Steroide mit der Spermatogenese in Zusammenhang stehen könnten, zeigen auch frühere Studien an der Katze. Es wurde beispielsweise festgestellt, dass bei Katzen, die eine Teratospermie aufweisen, der Serumtestosteronspiegel niedriger ist als in normospermen Katzen (Howard et al. 1990) und auch der intratestikuläre Testosteronspiegel tendiert dazu, bei Teratokatzen niedriger zu sein (Neubauer et al. 2004). Die Zielsetzung einer in dieser Habilitationsschrift später genauer vorgestellten Studie (**Braun et al. 2012b**) war es, die Steroidsynthese und -rezeption sowie teilweise auch die Enzyme für den Steroidmetabolismus in verschiedenen Entwicklungsstadien von Hoden der Hauskatze genauer zu untersuchen sowie die intratestikulären Hormonspiegel zu bestimmen. Anhand der Ergebnisse sollte ein Verständnis dafür entwickelt werden, in welchen Testis-Entwicklungsstufen der Katze welche Sexualsteroiden gebildet werden können, aber auch bei welchen testikulären Prozessen (z.B. Steroidproduktion, Spermatogenese) Sexualsteroiden eine regulatorische Rolle spielen könnten.

2.2. Sexualsteroiden

Bei den Sexualsteroiden werden drei große Gruppen unterschieden, die sich neben ihrem Wirkungsfeld auch in der Anzahl ihrer Kohlenstoffatome (C) unterscheiden: Gestagene (C21), Androgene (C19) und Östrogene (C18). Steroide entstehen aus Cholesterol und haben ein Grundgerüst, welches aus drei sechsgliedrigen Ringen (A, B und C) und einem fünfgliedrigen Ring (D) besteht (Berg et al. 2013). Ihre Bildung in den Gonaden wird durch sogenannte Gonadotropine, das heißt durch Follikelstimulierendes Hormon (FSH) und Luteinisierendes Hormon (LH), reguliert, welche durch das im Hypothalamus gebildete Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) zur Freisetzung in der Hypophyse angeregt werden. Die Sexualsteroiden selbst können Einfluss durch positive oder negative Rückkopplung auf die sogenannte Hypothalamus-Hypophyse-Gonaden-Achse und damit auf ihre Synthese nehmen (Intervet 2010).

Gestagene, mit ihrem wichtigsten Vertreter dem Progesteron, sind, wie schon der Name assoziiert, stark in die Regulation von Trächtigkeiten involviert. So bereiten sie den Uterus für die Trächtigkeit vor (Bazer 2011). Aber auch auf andere reproduktive Organe, wie das Ovar inklusive der dort stattfindenden Oozytenentwicklung, hat Progesteron einen Einfluss (Fair 2012). Gestagene dienen nicht nur als Vorstufe für Androgene und Östrogene, sondern sind auch die Vorstufe für andere Steroidklassen (Mineral- und Glucocorticoide). Androgene werden oft als männliche Hormone bezeichnet, werden aber durchaus auch im weiblichen Körper gebildet. So wird beispielsweise auch für Androgene eine Rolle in der frühen Follikelentwicklung im Ovar diskutiert (Gervasio 2014).

Östrogene sind die sogenannten weiblichen Sexualhormone. Trotzdem werden sie auch in männlichen Organen und Geweben gebildet und üben im männlichen Genitaltrakt unterschiedlichste Funktionen aus (Hess 2003).

2.3. Sexualsteroidbiogenese und -metabolismus

In die Synthese von Sexualsteroiden ist eine Vielzahl von Enzymen involviert. Je nach Gewebe und/oder Spezies können bestimmte Synthesewege bevorzugt und verschiedene Untertypen von Enzymen für enzymatische Reaktionen verantwortlich sein. Nur für wenige Spezies liegen umfangreiche Untersuchungen vor. Abbildung 1 gibt einen Überblick über die an der Steroidsynthese und auch am Steroidmetabolismus beteiligten Enzyme. Auf Untertypenbezeichnungen wurde hier verzichtet, um einen möglichst allgemeingültigen Überblick zu geben. Im ersten Schritt der *de novo*-Steroidbiosynthese muss Cholesterin von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran transportiert werden. Hierfür verantwortlich ist das Transportprotein Steroidogenic acute regulatory protein (StAR). Cholesterin wird dann durch die Cholesterin-Monooxygenase (CYP11A1) in Pregnenolon umgewandelt. Die 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/ $\Delta^5 \rightarrow \Delta^4$ -Isomerase (HSD3B; Typ 1 oder 2) ist an einer Vielzahl von Syntheseschritten beteiligt, so unter anderem auch an der Umwandlung von Pregnenolon zu Progesteron und von Androstendiol zu Testosteron. Die Steroid- 17α -Hydroxylase (CYP17A1) katalysiert die 17OH -Hydroxylierung von Pregnenolon und Progesteron sowie, durch seine $17,20$ -Lyaseaktivität, nachfolgend auch die weitere Umwandlung der entsprechenden Produkte zu Dehydroepiandrosteron (DHEA) bzw. Androstendion. Verschiedene Typen von 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (HSD17B) sind beispielsweise für die Konvertierung von DHEA zu

Androstendiol, von Androstendion zu Testosteron und von Östron zu Östradiol verantwortlich bzw. katalysieren die Umkehrreaktionen. Sie haben also verschiedene Substratpräferenzen, können Oxidations- oder Reduktionsreaktionen bevorzugen und der Ort ihrer Expression kann unterschiedlich sein. Der zytosolisch vorliegende Typ 1 wird ausschließlich als Östrogen-bildend beschrieben. Der in Mikrosomen vorkommende Typ 3 ist hingegen für die Synthese von Androgenen verantwortlich (Miller 2008). Die Aromatisierung von Androgenen zu Östrogenen erfolgt durch die Aromatase (CYP19A1); diese Reaktion ist irreversibel.

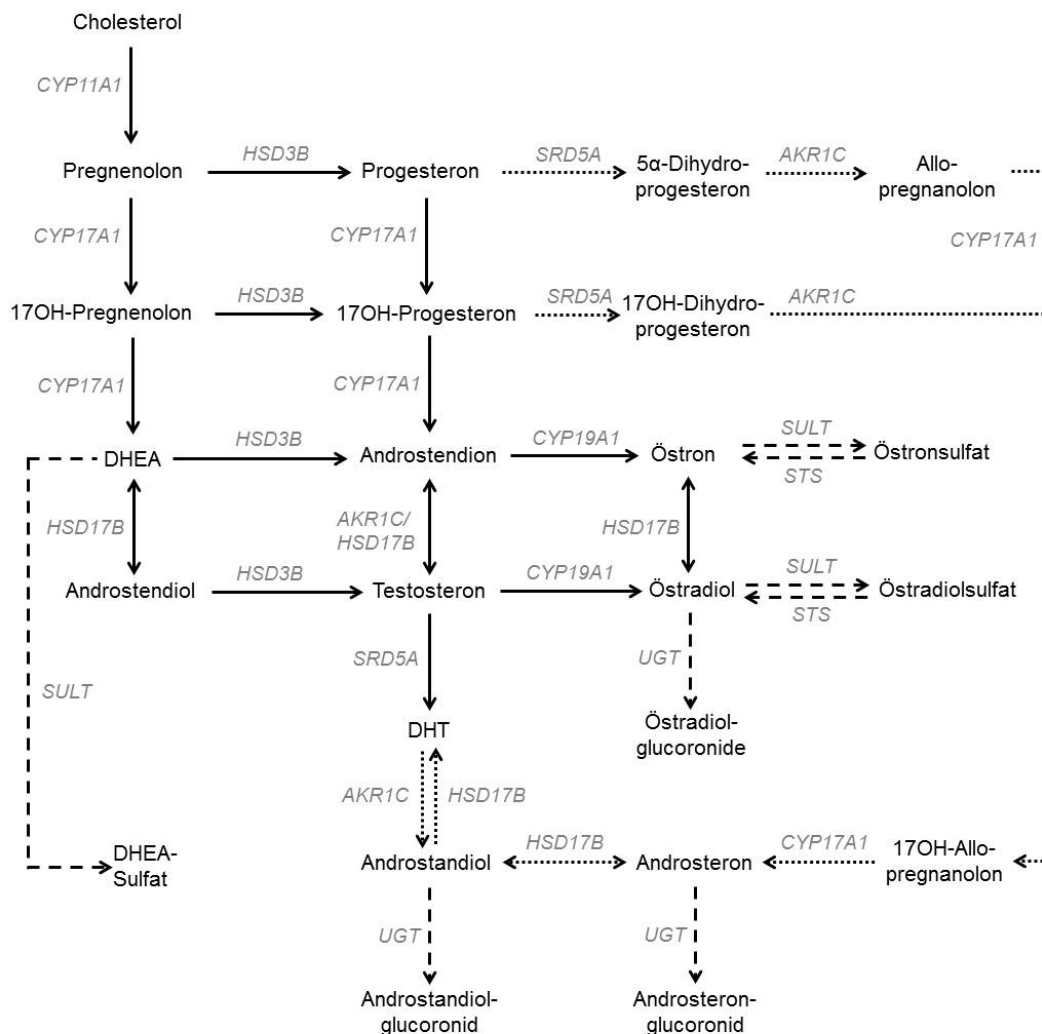


Abbildung 1. Übersicht über die an der Synthese und dem Metabolismus von Sexualsteroiden beteiligten Enzyme. AKR1C3: Aldo-Keto-Reduktase-Familie 1-Mitglied; CYP11A1: Cholesterin-Monooxygenase; CYP17A1: Steroid-17 α -Hydroxylase; CYP19A1: Aromatase; HSD17B: 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase; DHEA: Dehydroepiandrosteron; DHT: Dihydrotestosteron; HSD3B: 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/Isomerase; SRD5A: Steroid-5 α -Reduktase; STS: Steroidsulfatase; SULT: Sulfotransferase; UGT: UDP-Glucuronosyltransferase

Steroid-5-alpha-Reduktasen (SRD5A) sind in den Steroidmetabolismus involviert, beispielsweise wird Testosteron durch diese zu Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt und auch eine Beteiligung am sogenannten „Backdoorpathway“ für die Synthese von DHT ist beschrieben worden (Fukami et al. 2013). Mitglieder der Aldo-Keto-Reduktase Familie 1C (AKR1C) spielen ebenfalls im Sexualsteroid-Metabolismus an verschiedenen Stellen eine große Rolle. Beispielsweise kann Dihydrotestosteron (DHT) durch sie reduziert werden (Penning et al. 2003).

Sulfatierung und Glucuronidierung führen zur besseren Löslichkeit von Steroiden und dadurch zu deren verbessertem Abtransport über Körperflüssigkeiten zu anderen Wirkungsorten oder zu Orten, an denen ihr weiterer Abbau erfolgt und in deren Folge sie ausgeschieden werden (Alnouti and Klaassen 2006, Rane and Ekstrom 2012). Östrogene werden durch die Östrogensulfotransferase (SULT1E1) und DHEA oft durch die Hydroxysteroid-Sulfotransferase (SULT2A1) sulfatiert (Alnouti and Klaassen 2006), während die Desulfatierung von verschiedenen sulfatierten Steroiden durch die Steroidsulfatase (STS) katalysiert wird. Die Glucuronidierung von Sexualsteroiden und ihrer Metaboliten findet durch Mitglieder der UGT2B-Familie statt (Beaulieu et al. 1996).

2.4. Rezeptoren für Sexualsteroid

Die bekanntesten Rezeptoren für Sexualsteroid sind ihre Kernrezeptoren. Für Androgene ist dies der Androgenrezeptor AR (Bennett et al. 2010). Progesteron bindet an den Progesteronrezeptor PGR (Scarpin et al. 2009) und Östrogene können an zwei verschiedene Kernrezeptoren binden, den Östrogenrezeptor 1 oder auch alpha (ESR1) und den Östrogenrezeptor 2 bzw. beta (ESR2) (Bondesson et al. 2015). Der Komplex aus Steroid und Rezeptor bindet im Kern an hormonempfindliche Bereiche der DNA, sogenannte hormone response elements (HRE), wodurch die Expression von Genen aktiviert oder reprimiert wird. Neben Kernrezeptoren gibt es membranständige oder zytoplasmatisch lokalisierte Rezeptoren, die nichtgenomische Effekte induzieren (Bondesson et al. 2015, Levin 2011). Selbst für die Kernrezeptoren sind solche nichtgenomischen Wirkungen beschrieben worden (z.B. bei Levin and Pietras 2008). Im Fokus von einigen unserer in dieser Habilitationsschrift später näher vorgestellten Studien (**Amelkina et al. 2016, Braun and Jewgenow 2017, Braun et al. 2018**) standen, neben den oben erwähnten Kernrezeptoren, auch der G-Protein-gekoppelte Östrogenrezeptor (GPER) und die sogenannten progesterone receptor membrane components 1 und 2 (PGRMC1 und PGRMC2).

3. Männlicher Genitaltrakt

3.1. Fetale Testes

In fetalen Gonaden der Katze untersuchten wir die mRNA-Expression von sowohl steroidogenen Enzymen als auch von Sexualsteroidrezeptoren. Einen Überblick dazu gibt Tabelle 1. HSD3B1 und PGRMC1 wurden auch immunhistochemisch untersucht (**Braun and Jewgenow 2017**). Für fetale Gonaden verschiedener Säugetierspezies ist bekannt, dass sie Steroide produzieren können. Diesbezüglich gibt es aber deutliche Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Gonaden in Zeitpunkt und Umfang (Houmard et al. 2009, Quirke et al. 2001). Bei der Katze konnten wir den geschlechtsspezifischen Unterschied bezüglich der Kapazität zur Steroidproduktion bestätigen. Die meisten der von uns untersuchten steroidogenen Enzyme (CYP11A1, CYP17A1, HSD3B1, HSD17B3) und StAR wiesen in den männlichen Proben eine vielfach höhere Expression auf mRNA-Ebene auf als in den weiblichen fetalen Gonaden gleichen Alters. Eine Ausnahme waren lediglich die Aromatase (CYP19A1) und HSD17B2, welche in den weiblichen fetalen Gonaden nahezu ausschließlich exprimiert wurden und HSD17B1, welches in Gonaden beider Geschlechter vergleichbar exprimiert wurde (**Braun and Jewgenow 2017**).

Bei den fetalen Testesproben zeigten die untersuchten Enzyme, bezogen auf den untersuchten Zeitraum (Tag 34 bis Tag 48 der Trächtigkeit), unterschiedliche Expressionsprofile. Die für die Progesteron- und Androgenproduktion erforderlichen Enzyme, d.h. CYP11A1, HSD3B1, CYP17A1 und HSD17B3, sowie StAR wurden im gesamten Untersuchungszeitraum exprimiert (**Braun and Jewgenow 2017**), d.h. die Kapazität zur Genese dieser Steroide ist in fetalen Katzentestes spätestens ab Tag 34 vorhanden. Die geringen N-Zahlen der Proben lassen keine statistischen Aussagen zu. Allerdings vermuten wir, dass die Testosteronproduktion, durch die abnehmende Expression von HSD17B3 zum 2. Trimester hin, ebenfalls abnehmen könnte (**Braun and Jewgenow 2017**). Aufgrund der geringen Probenmengen konnten keine Hormonextraktionen und -bestimmungen durchgeführt werden. Dadurch bedingt konnte auch nicht aufgeklärt werden, welches der Enzyme wirklich den regulatorischen Schritt der Androgensynthese bestimmen könnte.

Bei den Untersuchungen an fetalen Gonaden des Schafes wurde festgestellt, dass HSD3B1 schon exprimiert wird, bevor die morphologische sexuelle Differenzierung beginnt. Die Expression von StAR, CYP11A1 und CYP17A1 wird allerdings erst ab dieser nachgewiesen. Mit Beginn der morphologisch sichtbaren sexuellen Differenzierung auch verbunden,

steigt beim Schaf die fetale intratestikuläre Testosteronkonzentration zwischen Tag 35 und Tag 55 der ca. 150 Tage dauernden Trächtigkeit deutlich an, während an Tag 30 so gut wie noch kein Testosteron nachweisbar ist (Quirke et al. 2001). Trotz fehlender Hormondaten bei unserer Studie ist, basierend auf den Expressionsdaten der Enzyme, auch beim Kater davon auszugehen, dass im Untersuchungszeitraum Androgene bereits in großem Maßstab in fetalen Testes gebildet werden (**Braun and Jewgenow 2017**). Wenn man Studien zu anderen Spezies betrachtet, wird den testikulär gebildeten Androgenen vor allem eine endokrine Bedeutung in dem Sinne zugeschrieben, dass sie wesentlich zur geschlechtsspezifischen Entwicklung beitragen, z.B. neben der der Geschlechtsorgane (Fluck and Pandey 2014) auch zu der des Gehirns (Nugent et al. 2012). Wir konnten in fetalen Katzenhoden die mRNA-Expression vom Androgenrezeptor (AR) nachweisen. Auto-/parakrine Funktionen von testikulär gebildeten Androgenen wären dementsprechend möglich (**Braun and Jewgenow 2017**). Für andere Spezies ist die Expression von AR in fetalen Testes ebenfalls beschrieben worden (siehe Übersichtsartikel: Rey et al. 2009).

Das für den letzten Schritt der Progesteronsynthese verantwortliche Enzym HSD3B wurde vorrangig im Interstitium von fetalen Katzentestes lokalisiert (**Braun and Jewgenow 2017**). Auch im fetalen Schafshoden (Tag 75) gab es die stärksten HSD3B-Proteinsignale im Interstitium, schwächere hingegen in den Tubuli. In fetalen Testes des Schafes konnte Progesteron im gesamten Untersuchungszeitraum (Tag 30 bis 75) nachgewiesen werden (Quirke et al. 2001). Für fetale Hoden der Katze vermuten wir, dass ebenfalls ein gewisser Anteil an Progesteron nicht weiter z.B. in Androgene umgewandelt wird, sondern auto-/parakrine Funktionen ausübt. Dafür spricht die Präsenz von Progesteronrezeptoren in fetalen Hoden (**Braun and Jewgenow 2017**). Natürlich ist nicht auszuschließen, dass auch maternales Progesteron einen Einfluss auf den Fetus ausübt. In fetalen Katzentestes wird PGR kaum auf mRNA-Ebene exprimiert, PGRMC1 und PGRMC2 hingegen eindeutig. PGRMC1 wurde auch immunhistochemisch nachgewiesen; die intensivsten Proteinsignale waren im Interstitium sichtbar. Wir vermuten, dass diese Lokalisation einen autokrinen Einfluss auf die Regulation der Steroidproduktion durch Progesteron haben könnte (**Braun and Jewgenow 2017**). Es gibt laut aktueller Literaturrecherche bisher nur eine einzige Studie, bei der die PGRMC1-Expression im Zusammenhang mit der Steroidproduktion in Hoden untersucht wurde. In dieser Studie war bei erwachsenen Schweinen die PGRMC1-Expression in Schweinen mit hohem Androgengehalt erhöht (Grindflek et al. 2010).

Tabelle 1. mRNA- und Proteinexpression von steroidogenen Enzymen und Steroidrezeptoren sowie von StAR in Testes verschiedener Entwicklungsstadien. Die Übersicht beruht auf den publizierten Daten in (**Braun and Jewgenow 2017, Braun et al. 2018**).

Faktor	Genexpression in verschiedenen Entwicklungsstadien				eindeutige Proteinsignale in der Postpubertät		
	fetal	Pre-pubertät	Pubertät	Post-pubertät	Interstitium	Sertolizellen	Keimzellen
StAR	+	+	+	+	ng	ng	ng
CYP11A1	+	+	+	+	ja	nein	ja
HSD3B1	+	+	+	+	ja	ja	nein
CYP17A1	+	+	+	+	ja	nein	ja
CYP19A1*	-	(+)	+	+	nein	nein	ja
HSD17B1	+	+	+	+	ng	ng	ng
HSD17B2	-	-	-	-	ng	ng	ng
HSD17B3*	+	+	+	+	ng	ng	ng
SRD5A1*	ng	+	+	+	ng	ng	ng
AKR1C3*	ng	+	+	+	ng	ng	ng
SULT1E1*	ng	+	+	+	ja	nein	ja
STS	ng	+	+	+	ng	ng	ng
PGR*	(+)	+	+	+	nein	nein	ja
PGRMC1*	+	+	+	+	ja	ja	nein
PGRMC2*	+	+	+	+	ja	nein	nein
AR	+	+	+	+	ja	ja	ja
ESR1*	+	+	+	+	nein	nein	ja
ESR2*	(+)	(+)	(+)	(+)	ng	ng	ng
GPER*	+	+	+	+	ng	ng	ng

*: Statistische Abweichung der Genexpression über die postnatale Entwicklung

+: mRNA-Expression vorhanden

(+): mRNA-Expression sehr gering

-: keine mRNA-Expression

ng: nicht getestet

Des Weiteren werden die untersuchten Östrogenrezeptoren ESR1, ESR2 und GPER in fetalen Katzenhoden exprimiert (**Braun and Jewgenow 2017**). Hier nehmen wir an, dass die maternalen Östrogene eine regulatorische Funktion im Fetus ausüben, denn im Gegensatz zu fetalen Testes anderer Spezies, wie Mensch (Boukari et al. 2007) und Schwein (Haeussler et al. 2007), können im fetalen Hoden der Katze keine Östrogene produziert

werden, da die dafür notwendige Aromatase nicht exprimiert wird (**Braun and Jewgenow 2017**). Die Lokalisierung der Östrogenrezeptoren wurde nicht von uns bestimmt. Demzufolge ist eine Aussage zur potentiellen Funktion rein spekulativ. Von anderen Spezies ist bekannt, dass ESR1 und ESR2 sowohl in Leydig-Zellen als auch in tubulären Zellen exprimiert werden können, wobei letzteres für ESR1 umstritten ist. Basierend auf der Lokalisation wird beispielsweise ein starker Einfluss von Östrogen auf die Differenzierung und Reifung der sich entwickelnden Nagetier-Testes angenommen (Rochira et al. 2000).

3.2. Postnatale Entwicklung der Testes und Spermatogenese

Postnatale Hoden wurde von uns bezüglich der Anzahl untersuchter Enzyme und Rezeptoren, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene, sehr intensiv untersucht (**Braun et al. 2018**). Eine Übersicht der untersuchten Faktoren sowie der Ergebnisse ist in Tabelle 1 dargestellt. Darüber hinaus haben wir in der gleichen Studie ebenfalls den intratestikulären Hormongehalt für Progesteron, Testosteron und Östradiol bestimmt (**Braun et al. 2018**). Die Untersuchung von verschiedenen Entwicklungsstadien des Katzenhodens bot den Vorteil, dass nicht nur die entwicklungsabhängige Kapazität zur Steroidsynthese analysiert werden konnte, sondern es waren auch dadurch, dass verschiedene Entwicklungsstadien mit der An- bzw. Abwesenheit von bestimmten Keimzelltypen verbunden sind, Schlussfolgerungen für durch Sexualsteroid regulierte Prozesse in bestimmten Abschnitten der Spermatogenese möglich.

Von den untersuchten Enzymen wurden alle, bis auf HSD17B2, im Hoden exprimiert. Für die steroidogenen Enzyme CYP11A1, CYP17A1, HSD3B1 und HSD17B1 sowie StAR konnte keine unterschiedliche Expression während der unterschiedlichen Entwicklungsstadien festgestellt werden. Die mRNA-Expression von HSD17B3, einem Enzym, welches für einen der letzten Schritte der Testosteronsynthese verantwortlich ist, war auch schon in der Prepubertät deutlich messbar, stieg aber zur Pubertät hin an und blieb dann konstant. Die Kapazität zur Produktion von Progesteron und Androgenen ist demnach bereits vor der Pubertät vorhanden; unsere Studien zu fetalen Testes (siehe Kapitel 3.1 und **Braun and Jewgenow 2017**) ließen das auch vermuten. Die für die Synthese von Östrogenen erforderliche Aromatase konnte in Testes der Katze sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene erst ab der Pubertät nachgewiesen werden. Östrogene werden also in

Katzentestes frühestens ab der Pubertät gebildet. Die mRNA-Expression der Aromatase nahm zur Postpubertät hin und auch innerhalb dieser weiter zu (**Braun et al. 2018**). Interessant war auch das mRNA-Expressionsverhalten der von uns untersuchten metabolisierenden Enzyme SRD5A1, AKR1C3 und SULT1E1. Alle drei wiesen einen Anstieg über die Testesentwicklung auf. Dieser war nicht nur für die Entwicklung von der Prepubertät hin zur Postpubertät messbar, sondern auch zwischen den zwei Postpubertäts-Gruppen (**Braun et al. 2018**). Bezüglich der Postpubertät wurde in unserer Studie deutlich, dass selbst die als adult definierten Testes noch eine Entwicklungsphase vollführen, bei der mit Zunahme des Gewichts sowohl die mRNA-Expression vor allem von Steroid-metabolisierenden Enzymen als auch der Anteil an haploiden zu diploiden Zellen ansteigt. Hingegen nahm der testikuläre Testosterongehalt (pro mg Testis) mit zunehmendem Gewicht in der Postpubertät ab (**Braun et al. 2018**). Hierfür verantwortlich ist unserer Meinung nach die verstärkte Expression von SRD5A1 und AKR1C3 und die damit verbundene Metabolisierung von Testosteron über DHT zu Androstendiol (**Braun et al. 2018**). Ein starker Anstieg von intratestikulärem Östradiol, der aufgrund der ansteigenden Aromatase-Expression innerhalb der postpubertären Phase zu erwarten gewesen wäre, wurde vermutlich durch die ebenfalls ansteigende SULT1E1-Expression und damit verbundene Sulfatierung von Östradiol verhindert (**Braun et al. 2018**). Aufgrund unserer Studien halten wir die Metabolisierung von Steroiden für eine Möglichkeit, die Steroidkonzentration im Hoden und damit auch im Körper zu justieren. Unseres Wissens nach ist unsere Studie (**Braun et al. 2018**) die erste, welche Zusammenhänge sowohl zwischen Testisgewicht und Ploidieverhältnis der Zellen als auch dieser beiden Parameter zur Expression einiger untersuchter Faktoren, insbesondere der von metabolisierenden Enzymen, aufgedeckt hat.

Neben dem Nachweis der Steroidproduktion, konnten wir auch die Rezeptivität von Katzentestes gegenüber allen drei Sexualsteroidgruppen anhand der Präsenz ihrer Rezeptoren aufzeigen. Aufgrund der immunhistochemischen Untersuchung waren wir in der Lage, teilweise auch ihre Lokalisation zu bestimmen (**Braun et al. 2018**). Bereits bei unserer Untersuchung der fetalen Katzentestes wurde deutlich, dass PGRMC1 nicht nur im Interstitium lokalisiert ist, sondern auch in den Tubuli (Braun and Jewgenow 2017). In unserer Studie zur postnatalen Hodenentwicklung stellten wir fest, dass die Intensität der zytoplasmatischen Anfärbung der Sertolizellen mit zunehmender Testisentwicklung abnimmt (**Braun et al. 2018**). Speziell für die prepubertäre Phase wäre ein über PGRMC1

vermittelter Effekt auf die Sertolizellreifung vorstellbar, für spätere Stadien dann auch auf die Spermatogonienvervielfältigung und/oder den Beginn der Meiose. PGRMC1 und PGRMC2 waren bisher noch nicht Untersuchungsgegenstand in Testes anderer Spezies, daher sind Vergleiche mit diesen nicht möglich. PGRMC2 wurde mit dem verwendeten Antikörper ab der Pubertät in manchen, aber nicht allen Leydigzell-Zellkernen lokalisiert (**Braun et al. 2018**). Die Lokalisierung spricht für eine Beeinflussung der Steroidbiogenese. Den klassischen Progesteronrezeptor konnten wir eindeutig ab der Pubertät in Keimzellen ab einem späteren Spermatozytenstadium nachweisen, wodurch ein eindeutiger Hinweis auf die Beteiligung an regulatorischen Prozessen der Spermatogenese gegeben ist. Beim Vergleich unserer Ergebnisse mit anderen Studien fiel auf, dass die PGR-Lokalisation durchaus speziesabhängig ist (**Braun et al. 2018**). Zu beachten ist, dass bei unserer Untersuchung nicht zwischen den potentiell vorhandenen Rezeptorisoformen unterschieden wurde. Für PGR sind beim Menschen zusätzlich zu den oben erwähnten Formen PGR-A und PGR-B noch weitere Isoformen bekannt (Hirata et al. 2003). Die meisten dieser Isoformen haben eine vollständige Liganden-bindende Domäne (Cork et al. 2008). Sowohl die von uns verwendeten Primer (bezogen auf die entsprechende Gensequenz) als auch der verwendete Antikörper bindet in dieser Region. Das bedeutet, dass eine Unterscheidung der meisten potentiellen PGR-Isoformen mit den von uns gewählten Methoden nicht möglich war. Hingegen gibt es eine Studie zum humanen Hoden, in der die Anfärbung von testikulären Zellen zwischen Antikörpern, welche nur die B-Isoform bzw. die A- und B-Isoformen erkannten, verglichen wurde. Die Anfärbung der Keimzellen unterschied sich leicht, sowohl was die kern- bzw. zytoplasmatische Anfärbung betraf, als auch, welches Keimzellstadium und welches Zyklusstadium betrachtet wurde (Shah et al. 2005). Spezifischere Untersuchungen bezüglich der Isoformen bei der Katze aber auch bei anderen Spezies könnten auch hier eine unterschiedliche Verteilung von Isoformen aufdecken und möglicherweise würden sich dann auch manche der vorher festgestellten Speziesunterschiede relativieren.

Auch für andere Steroidrezeptoren sind Isoformen bekannt. So ist für ESR1 sogar die Expression mehrerer Isoformen in Testes der Katze beschrieben worden, unter anderem gibt es Isoformen, die eine Deletion von Exon 6 (Δ Exon6) enthalten (Schoen et al. 2012). Die Lage der Primer für die in unserer Studie durchgeführte quantitative PCR schloss den Nachweis von Δ Exon6-enthaltenden Varianten aus. Wir konnten ESR1 auf Proteinebene vor allem in Spermatozyten und runden Spermatisiden ab der Pubertät nachweisen. Diese

Zellen sind auch diejenigen, die im Katzenhoden Aromatase exprimierten (**Braun et al. 2018**). Daher ist eine auto- und/oder parakrine Wirkung von Östrogenen über diesen Rezeptor auf einige Abschnitte der Meiose und auf die frühe Spermiogenese wahrscheinlich. Zusätzlich konnte ESR1, genau wie auch AR, an den Mittelstücken von Spermien in den Tubuli nachgewiesen werden (**Braun et al. 2018**). Katzenspermien scheinen daher auch nach dem Verlassen der Testes bei weiteren Reifungsprozessen durch Androgene und Östrogenen reguliert zu werden. Sowohl Androgene als auch Östrogene sind bei anderen Spezies in den Prozess der Spermienfreisetzung involviert. So konnten bei der Ratte hormonempfindliche Bereiche (HRE) für die Gene der an diesem Prozess beteiligten Proteine nachgewiesen werden (Kumar et al. 2017). ESR2 sowie GPER konnten aufgrund fehlender Antikörper im Katzenhoden nur auf mRNA-Ebene untersucht werden. ESR2 hat die niedrigste Expression in der Pubertät. Der stetige Anstieg der GPER-Expression über die testikuläre Entwicklung deutet auf eine Beteiligung an Entwicklungs-/Wachstumsprozessen der Testes selber und/oder auf eine Steuerung der Spermatogenese hin (**Braun et al. 2018**). Im humanen Hoden wurden die drei auch von uns untersuchten Östrogenrezeptoren mittels *in-situ* Hybridisierung und/oder Immunhistochemie lokalisiert. ESR1 wurde in Keimzellen und einzelnen interstitiellen Zellen nachgewiesen und ESR2 in Keimzellen und Sertolizellen detektiert. Die stärksten GPER-Signale gab es hingegen in interstitiellen Zellen (Fietz et al. 2014).

Androgene spielen bei der Katze ebenfalls eine große Rolle bei intratestikulären Prozessen. Der Rezeptor konnte in Testes der Katze in einer Vielzahl von Zellen nachgewiesen werden (**Braun et al. 2018**). Die Expression in Sertolizellen schon ab der Prepubertät spricht für eine entscheidende Mitwirkung an der Sertolizellreifung und/oder Unterstützung der Spermatogenese. Auch beim Pferd konnte AR schon in prepubertalen Sertolizellen nachgewiesen werden (Pearl et al. 2011). Beim Menschen war der Nachweis in einem Hoden eines 8-jährigen Jungen ebenfalls möglich, aber nicht in einer humanen Testisprobe, welche 3 Monate nach Geburt gewonnen wurde (Rey et al. 2009). Die AR-Expression in peritubulären Myoidzellen von Katzenhoden zeigt einen Einfluss von Androgenen auf die Stabilität und die Kontraktilität der Tubuli an. Die Lokalisation in interstitiellen Zellen weist auf eine Beteiligung an der Steroidsynthese hin (**Braun et al. 2018**). Da auch in anderen Spezies die zuvor benannten Testiszelltypen den Androgenrezeptor enthalten (Li et al. 2015, Rey et al. 2009, Zhou et al. 2002), scheint diese sehr breite Präsenz des AR für Säugetiere spezieübergreifend zu sein.

3.3. Andere männliche Reproduktionsorgane

Unsere Forschungsarbeiten zum männlichen Reproduktionstrakt haben sich bezüglich der Untersuchung der Steroidsynthese, -metabolismus und -rezeption bisher auf den Hoden beschränkt. Ein weiteres Organ, welches für seine Steroidproduktion und -rezeption bekannt ist, ist die Prostata (Ferraldeschi et al. 2013). Auch wenn Katzenartige nicht alle akzessorischen Geschlechtsdrüsen besitzen, gehört die Prostata zu einer der vorhandenen Drüsen. Für manche Spezies ist beschrieben worden, dass auch in der Epididymis Steroide gebildet werden und Steroidrezeptoren vorliegen können (Oliveira et al. 2012, Joseph et al. 2011, Bilinska et al. 2006). Die Präsenz der von uns auf Spermien gezeigten Rezeptoren ESR1 und AR spricht für eine Regulation der posttestikulären Spermienreifung durch Steroide in der Epididymis und/oder auf weiteren Etappen auf dem Wege bis zur Fertilisation von Eizellen. Die Untersuchungen der Epididymis von Katzenartigen aber auch von akzessorischen Geschlechtsdrüsen, deren Sekrete einen wichtigen Beitrag zur Seminalplasmazusammensetzung liefern, könnten also weitere Hinweise auf die posttestikuläre Spermienreifung von Katzenartigen geben. Im Vergleich zu Studien an anderen Tierfamilien könnten Gemeinsamkeiten und Unterschiede bei der Regulation der Spermienreifung aufgedeckt werden.

4. Weiblicher Genitaltrakt

4.1. Das fetale Ovar

In fetalen Ovarien der Katze untersuchten wir im Vergleich zu fetalen Katzentestes (siehe Kapitel 3.1) die mRNA-Expression von steroidogenen Enzymen und Sexualsteroidrezeptoren (Braun and Jewgenow 2017). Tabelle 2 gibt bezüglich der mRNA-Expression in weiblichen Organen/Geweben der Katze einen Überblick zu den von uns untersuchten Faktoren und Ergebnissen. HSD3B1 und PGRMC1 wurden in den fetalen Ovarien auch immunhistochemisch untersucht (**Braun and Jewgenow 2017**).

In den fetalen Ovarien der Katze wurde im Untersuchungszeitraum (Tag 34 bis Tag 48 der Trächtigkeit) deutlich weniger vom Transportprotein StAR und von den steroidogenen Enzymen CYP11A1, CYP17A1 und HSD3B1 exprimiert als in den fetalen Testes. Die fetalen Katzenovarien exprimierten kein HSD17B3 (**Braun and Jewgenow 2017**), was die Bildung von Testosteron in diesen nahezu ausschließt, es sei denn, entsprechende Syntheseschritte werden in diesem Organ von anderen HSD17B-Typen übernommen. In humanen fetalen Ovarien konnte hingegen HSD17B3 nachgewiesen werden (Fowler et al. 2011). Die Expression von HSD17B1 in den fetalen Gonaden der Katze erfolgte bei beiden Geschlechtern in gleicher Größenordnung. HSD17B2 wie auch die Aromatase wurden nahezu ausschließlich in den weiblichen fetalen Gonaden exprimiert (**Braun and Jewgenow 2017**). Wir gehen davon aus, dass hier sowohl Progesteron als auch Androgene als Vorstufen von Östrogenen gebildet werden. Ob sie aber komplett in Östrogene umgewandelt werden oder nicht bleibt offen. Die Aromatase-Expression nahm insbesondere von Tag 34 zu Tag 39 deutlich ab; aufgrund unserer geringen Probenanzahl ist dies aber nicht statistisch belegbar (**Braun and Jewgenow 2017**). Trotzdem könnte infolge einer verringerten Aromataseexpression auch die Östrogenproduktion abnehmen. Unser Untersuchungszeitraum beginnt mit Tag 34 kurz nachdem an Tag 32 der Trächtigkeit in den fetalen Ovarien der Katze die Auflösung der Keimstränge sowie die damit verbundene Primordialfollikelbildung startet, welche erst an Tag 37 nach der Geburt abgeschlossen ist (McGeady et al. 2006). Je nach Spezies kann die Follikelbildung durch unterschiedliche Hormone reguliert sein (Dutta et al. 2014). In der Maus inhibieren beispielsweise Progesteron und Östradiol die Auflösung der Oozytennester (Chen et al. 2007). Möglicherweise wirken Östrogene auch bei der Katze in gewissem Maße hemmend auf die Primordialfollikelbildung und

durch die potentiell verringerte Synthese von Östrogen nach Tag 34 wird die Primordialfollikelbildung unterstützt.

Tabelle 2. mRNA-Expression von steroidogenen Enzymen und Steroidrezeptoren sowie von StAR in verschiedenen weiblichen Reproduktionsorganen/-geweben der Hauskatze sowie in Gelbkörpern vom Iberischen Luchs. Die Übersicht beruht auf den publizierten Daten in (Amelkina et al. 2016, Braun and Jewgenow 2017, Braun et al. 2012b, Zschockelt et al. 2015, Zschockelt et al. 2014).

Faktor	Ovar, fetal, Katze	CL Pseudo-trächtigkeit, Katze	CL Trächtigkeit, Katze	CL, Iberischer Luchs	Plazenta, Katze
StAR	+	+*	+	+ [#]	ng
CYP11A1	+	+	+	+ [#]	+
HSD3B1	+	+*	+	+ [#]	+
CYP17A1	+	+	+	+	+
CYP19A1	+	+*	+	+ [#]	+
HSD17B1	+	+	+	+	+
HSD17B2	+	(+)	(+)	(+)	ng
HSD17B3	-	ng	ng	ng	ng
HSD17B7	ng	+*	+	+ [#]	ng
SRD5A1	ng	+*	+	+ [#]	ng
SULT1E1	ng	+*	+	ng	ng
STS	ng	+	+	ng	ng
PGR	+	+*	+	+	ng
PGRMC1	+	+*	+	+ [#]	ng
PGRMC2	+	+	+	+ [#]	ng
AR	+	+*	+	+ [#]	ng
ESR1	+	+*	+	+ [#]	ng
ESR2	+	+	+	+ [#]	ng
GPER	+	+	+	+ [#]	ng

*: Statistische Abweichung der Genexpression zwischen den Stadien der Pseudoträchtigkeit

[#]: Statistische Abweichung zwischen frischen und persistierenden Gelbkörpern von mindestens einem der zwei Iberischen Luchse

+: mRNA-Expression vorhanden

(+): mRNA-Expression sehr gering

-: keine mRNA-Expression

ng: nicht getestet

Alle der getesteten Rezeptoren wurden auf mRNA-Ebene in den fetalen Katzenovarien exprimiert (siehe Tabelle 2). Das bedeutet, dass fetale Ovarien der Katze gegenüber Progesteron, Androgenen und Östrogenen rezeptiv zu sein scheinen. Interessanterweise war die Expression des AR gegenüber der in fetalen Testes sogar erhöht (**Braun and Jewgenow 2017**). Bei Studien an fetalen Ovarien vom Schaf wurden ESR1, ESR2 und AR, aber nicht PGR, im Untersuchungszeitraum nachgewiesen (Juengel et al. 2006). Beim Menschen waren alle vier Rezeptoren nachweisbar (Fowler et al. 2011). ESR2 scheint in fetalen Gonaden der Katze eine Tendenz zu erhöhter Expression im Ovar im Vergleich zum Hoden zu haben (**Braun and Jewgenow 2017**). Interessanterweise zeigten in unserer Studie ESR2, PGR, PGRMC1 und PGRMC2 ein ähnliches Expressionsprofil über den Untersuchungszeitraum in den untersuchten fetalen Katzenovarien wie CYP19A1. Möglicherweise erfolgt hier die Regulation der Expression der benannten Gene über ähnliche Mechanismen und/oder Faktoren.

Besonders interessant scheint bei den fetalen Katzenovarien, wie bereits bei den fetalen Testes, auch die Expression von PGRMC1 zu sein. Dessen Lokalisation um Oozytennester und Follikel herum, deutet auf eine Beteiligung an der Oogenese und/oder der Follikelbildung hin (**Braun and Jewgenow 2017**). Dafür sprechen möglicherweise auch Ergebnisse von Studien an anderen Spezies. Einen guten Überblick über den Einfluss von PGRMC1 auf das ovarielle Follikelwachstum, vor allem durch den Einfluss auf die Granulosazellproliferation und -apoptose geben Peluso et al. (Peluso 2013). In Rattenovarien konnte PGRMC2 in einer Vielzahl ovariellen Zellen detektiert werden. Ebenfalls wurde auch für PGRMC2 gezeigt, dass es die Mitose von Granulosazellen beeinflusst (Griffin et al. 2014).

4.2. Das adulte Ovar und Gelbkörper

Ein adultes Ovar ist – speziesunabhängig und durch den Östruszyklus und Follikelwachstum bedingt – ständigen Veränderungen unterworfen. Als steroidproduzierende Zellen sind vor allem die Granulosa- und Thekazellen der Follikel sowie die aus ihnen nach der Ovulation entstehenden Lutealzellen des Gelbkörpers bekannt. Der Fokus unserer Arbeit am adulten Katzenovar galt, aufgrund der im Kapitel 2.1 bereits vorgestellten Thematik der persistierenden Gelbkörper bei Luchsen, der Analyse des intralutealen Hormongehalts sowie der Steroidbiosynthese und -rezeption in Gelbkörpern von Luchsen und im Vergleich dazu in denen der Hauskatze (**Amelkina et al. 2015a, Amelkina et al. 2015b, Amelkina et al. 2016, Zschockelt et al. 2015, Zschockelt et al. 2014**).

In Gelbkörpern von Luchs und Katze haben wir sowohl die mRNA-Expression von StAR, steroidogenen und metabolisierenden Enzymen sowie von Steroidrezeptoren untersucht (**Amelkina et al. 2016, Zschockelt et al. 2015, Zschockelt et al. 2014**). Einen Überblick dazu gibt auch Tabelle 2. Auf Proteinebene konnten HSD3B, CYP11A1, CYP17A1, CYP19A1, ESR1, PGR und PGRMC1 analysiert werden (**Amelkina et al. 2016, Zschockelt et al. 2015, Zschockelt et al. 2014**). Außerdem wurden die intralutealen Hormonkonzentrationen bestimmt (**Amelkina et al. 2015a, Amelkina et al. 2015b, Zschockelt et al. 2015, Zschockelt et al. 2014**). Für unsere Studien wurden Proben aus der Trächtigkeit und Pseudoträchtigkeit der Hauskatze (**Amelkina et al. 2015a**) und Luchs-CL-Proben (**Amelkina et al. 2015b**) nach histomorphologischen Gesichtspunkten folgenden verschiedenen Lebensphasen zugeordnet: Bildung, Entwicklung/Aufrechterhaltung, frühe Rückbildung, späte Rückbildung und *Corpus albicans*. Ein großer Nachteil der Hauskatzenproben war, dass wir zu den Pseudoträchtigkeitproben (PTR) keine Altersangaben hatten. Daher konnten wir auch keine Aussage treffen, nach wie vielen Tagen nach dem Eisprung welches Gelbkörperstadium vorlag. Aufgrund der Bestimmung des ungefähren Alters der Föten, war eine Alterszuordnung bei den Proben der Trächtigkeit (TR) hingegen möglich (**Amelkina et al. 2015a**). Bis auf HSD17B2 wurden alle der getesteten Enzyme (sowie auch StAR) auf mRNA-Ebene in Gelbkörpern der Hauskatze und des Luchses nachgewiesen (siehe Tabelle 2 und **Zschockelt et al. 2015, Zschockelt et al. 2014**). Die auffälligsten Expressions-Profile bezüglich der Steroidsynthese in Gelbkörpern der Hauskatze gab es für StAR (höchste Expression im Entwicklungs-/Aufrechterhaltungsstadium), HSD3B und CYP19A1 (in der Anbildungsphase am höchsten, im Entwicklungs-/Aufrechterhaltungsstadium ähnlich oder etwas weniger hoch, in den Regressionsstadien deutlich geringer) und für die metabolisierenden Enzyme SRD5A1 und SULT1E1 (beide Anstieg der Expression über die Lebensspanne) (**Zschockelt et al. 2014**). Interessanterweise spiegelte sich das Expressionsprofil auf mRNA-Ebene nicht im intralutealen Progesteron Gehalt wieder, denn dieser war im Entwicklungs-/Aufrechterhaltungsstadium leicht höher als in der Anbildungsphase (**Amelkina et al. 2015a, Zschockelt et al. 2014**). Für HSD3B1 wurde aber auch die Proteinexpression untersucht (**Zschockelt et al. 2014**), die eher dem Hormonprofil entspricht (**Amelkina et al. 2015a, Zschockelt et al. 2014**). Der intraluteale Östradiolgehalt war in der Anbildung am höchsten (**Amelkina et al. 2015a, Zschockelt et al. 2014**), was zur mRNA-Expression von CYP19A1 passt (**Zschockelt et al. 2014**), auch scheint der Gehalt durch die Expression von SULT1E1 mit reguliert zu werden

(**Zschockelt et al. 2014**). In Gelbkörpern der Katze konnte ebenfalls Testosteron gemessen werden (**Zschockelt et al. 2014**). Östradiol und Testosteron waren im ein- bis vierstelligen ng/g-Bereich nachweisbar, Progesteron hingegen im ein- bis dreistelligen µg/g-Bereich (**Zschockelt et al. 2014, Amelkina et al. 2015a**).

Bezüglich der Studien am Luchs stand uns nur limitiertes Probenmaterial zur Verfügung. Wir erhielten Gelbkörperproben von fünf Eurasischen Luchsen, die in Skandinavien kurz vor der Paarungszeit geschossen wurden. Bei diesen Gelbkörperproben handelte es sich also um persistierende Gelbkörper. Basierend auf einer histomorphologischen Beurteilung, wurden sie in das frühe Regressionsstadium eingeordnet (**Amelkina et al. 2015b**). Zusätzlich standen uns von zwei Iberischen Luchsen, welche aus gesundheitlichen Gründen ovariohysterektomiert wurden (Jewgenow et al. 2013), Proben von frischen und persistierenden Gelbkörpern von sieben Tage nach Verpaarung zur Verfügung. Diese persistierenden Gelbkörper wurden dem histomorphologisch definierten Stadium der Entwicklung/Aufrechterhaltung zugeordnet, die frischen hingegen der Anbildungsphase (**Amelkina et al. 2015b**). Es fragt sich, ob die unterschiedlichen Stadien der persistierenden Gelbkörper einen Unterschied zwischen den Schwesternspezies darstellt oder ob persistierende CL während der Trächtigkeit vom Stadium der frühen Regression in ein aktiveres Stadium zurücküberführt werden können. Bei letzterem wäre vorstellbar, dass die frisch gebildeten Gelbkörper die persistierenden Gelbkörper diesbezüglich positiv beeinflussen.

Interessanterweise war die mRNA-Expression mehrerer steroidogener Enzyme (CYP11A1, HSD17B7, CYP19A1 und SRD5A1) sowie die von StAR in den persistierenden Gelbkörperproben der Iberischen Luchse höher als die in den frischen CLs der gleichen Tiere. Umgekehrt war lediglich die HSD3B1-Expression in den frischen CLs deutlich erhöht (sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene) (**Zschockelt et al. 2015**). Letzteres hatte aber merkwürdigerweise kaum einen Effekt auf den intralutealen Progesterongehalt, welcher sich nur geringfügig zwischen den Probengruppen unterschied (**Amelkina et al. 2015b, Zschockelt et al. 2015**). Vielmehr war der Östradiolgehalt in frischen CLs gegenüber dem von persistierenden CLs im Mittel rund 30-fach erhöht (**Amelkina et al. 2015b, Zschockelt et al. 2015**), was anhand des umgekehrten mRNA-Expressionsverhaltens von Aromatase (**Zschockelt et al. 2015**) nicht unbedingt zu erwarten gewesen wäre. Der Östradiolgehalt in den frischen Gelbkörpern vom Iberischen Luchs (**Zschockelt et al. 2015, Amelkina et al. 2015b**) war auch nochmals deutlich höher als in den frisch gebildeten Gelbkörpern der

Hauskatze (**Zschockelt et al. 2014**). Die Östrogenproduktion in Gelbkörpern scheint generell speziesabhängig zu sein. Die Präsenz von sowohl CYP17A1 als auch Aromatase neben der von HSD3B1 und CYP11A1 in Gelbkörpern von Primaten lässt darauf schließen, dass neben Progesteron auch Androgene und Östrogene gebildet werden. Die Intensität der Aromatase-Anfärbung lässt im alternden Primaten-CL nach und die Autoren glauben an eine Verschiebung der Lutealfunktion mit fortschreitendem Alter (Sanders and Stouffer 1997). Wiederkäuer haben im Gegensatz zu Primaten und auch zu Katze und Luchs scheinbar keine Kapazität, Östrogene luteal zu bilden (Wiltbank et al. 2012).

Alle getesteten Rezeptoren wurden auf mRNA-Ebene in CLs der Hauskatze und der Luchse exprimiert (siehe Tabelle 2 und **Amelkina et al. 2016**). In den CL-Proben der Pseudoträchtigkeit der Hauskatze nahm die Expression von AR zur Regression hin deutlich zu. Die ESR1-Expression stieg über die ganze Lebensspanne an. Die Proben der Trächtigkeit wiesen eine ähnliche Tendenz auf. Die interessantesten Profile bei den Trächtigkeitproben der Hauskatze zeigten PGR und PGRMC1; beide wurden in der Preimplantationsphase (= Anbildung) stärker exprimiert als danach. Die Expression von PGRMC1 in den Iberischen Luchsproben verhält sich hingegen anders. Dort sind deutlich höhere Werte in den persistierenden als in den frischen CLs messbar. Ein gleiches mRNA-Expressionsverhalten wurde in den Luchsproben für PGRMC2 festgestellt, ebenso wie für ESR1, GPER und AR. Bei letzteren war es aber nur für einen Luchs statistisch signifikant, das andere Tier zeigte lediglich die gleiche Tendenz. Der einzige Rezeptor, der auf mRNA-Ebene in den frischen Luchs-Gelbkörperproben höher als in persistierenden CLs exprimiert wurde, war ESR2. Einen so klaren Unterschied zwischen den Lebensphasen gab es für ESR2 in den Katzenproben nicht. Insgesamt wurde offensichtlich, dass feline Gelbkörper gegenüber Sexsteroiden rezeptiv sind. Es gibt teilweise Unterschiede zwischen Gelbkörpern der Katze (dort sogar zwischen Trächtigkeit und Pseudoträchtigkeit) und denen vom Luchs, was auf eine partiell unterschiedliche Regulation der Gelbkörper durch Sexualsteroiden hinweisen könnte (**Amelkina et al. 2016**).

Bei einigen Spezies ist ein positiver Effekt von Östradiol auf die Gelbkörperfunktionalität beschrieben worden, so für Primaten (Tripathy et al. 2016) aber auch für Ratte, Kaninchen und Schwein (Übersichtsartikel: Niswender et al. 2000). Zumindest für Gelbkörper des Luchses und eventuell auch für die der Katze, können wir uns ebenfalls einen luteotropen Effekt von Östradiol vorstellen, denn die erhöhte Östradiolproduktion in der frühen Gelbkörperphase kann natürlich auch positive para-/autokrine Auswirkungen auf den

CL selbst haben. Eventuell wirken beim Luchs die Östrogene auch positiv auf die vorhandenen persistierenden Gelbkörper ein und bewirken deren weiter vorne beschriebene potentielle Wandlung von dem Stadium der frühen Regression zum Stadium der Entwicklung/Aufrechterhaltung. Ob Sexualsteroiden tatsächlich auch mit zur unterschiedlichen Regulation von Gelbkörpern der Trächtigkeit versus Pseudoträchtigkeit beitragen, bleibt derzeit noch offen. Da die Synthese von potentiell luteolytischem PGF₂-alpha bei der Katze im Gelbkörper nur sehr eingeschränkt, wenn überhaupt möglich ist, wird angenommen, dass es – ähnlich wie beim Hund – keinen Einfluss auf die luteale Regression hat (Zschockelt et al. 2016). Bei trächtigen Hauskatzen könnte endometrial gebildetes PGF₂-alpha als luteolytisches Signal dienen (Siemieniuch et al. 2014). Ein solches Signal fehlt aber bei nichtträchtigen Katzen, daher muss die Luteolyse der entsprechenden CLs anders reguliert sein.

Das Verständnis vom Östruszyklus, zu dem die Lutealphase auch mitzählt, ist wichtig für Techniken der assistierten Reproduktion. Nur wenn man weiß, wie man beispielsweise die persistierenden Gelbkörper vom Luchs vorübergehend in ihrer Aktivität so regulieren kann, dass ein neuer Östrus induziert werden kann, könnte man eine neue Verpaarung oder auch eine künstliche Befruchtung initiieren, wenn der erste Paarungsversuch im regulären natürlichen Zyklus fehlgeschlagen ist. Versuche, dies beim Luchs durch ein PGF₂-alpha-Analogon zu erreichen, führten zwar zu einer vorübergehenden funktionellen Regression der persistierenden Gelbkörper, ein neuer Östrus wurde aber nicht bewirkt (Painer et al. 2014a). Weitere Forschung ist also notwendig, um das Rätsel der persistierenden Gelbkörper beim Luchs aufzuklären.

Die Steroidbiogenese und -rezeption in Follikeln des Katzenovars wurde bisher von uns und anderen noch nicht genauer erforscht. Bezüglich der Steroidbiogenese und -rezeption in Follikeln des Katzenovars ist daher vorerst davon auszugehen, dass bestimmte bei anderen Säugetieren nachgewiesene Mechanismen auch in der Katze ähnlich ablaufen. So stellen Thekazellen in den meisten Säugetieren unter dem Einfluss von LH Androgene bereit, die dann durch die Aromatase in den Granulosazellen unter dem Einfluss von FSH und teilweise auch von LH zu Östrogenen umgewandelt werden (Young and McNeilly 2010, Jamnongjit and Hammes 2006, Andersen and Ezcurra 2014). Allerdings können sich die Synthesewege zum Östrogen zwischen Spezies unterscheiden. So erfolgt beim Rind die Synthese über Pregnenolon, 17OH-Pregnenolon und DHEA (Lacroix et al. 1974), beim Schwein hingegen über Progesteron, 17OH-Progesteron und Androstendion

(Bjersing and Carstensen 1967). Die ovarielle Aktivität der Steroidproduktion wird auch bei Katzenartigen meist nur indirekt über die Messung von Hormonen/Hormonmetaboliten im Blut, Kot oder Urin erfasst; so beispielsweise im Rahmen von Östrusstatusbestimmungen (Brown 2006). Für isolierte Follikel der Katze konnte aber auch direkt eine Östrogen- und Testosteronproduktion nachgewiesen werden (YoungLai et al. 1976).

Sexualsteroid des Ovars werden nicht nur sekretiert, sondern erfüllen in Ovarien selbst auch unterschiedliche Funktionen. So ist Progesteron im Ovar wahrscheinlich am Follikelsprung und der Eizellreifung beteiligt, letztere wird eventuell auch durch Androgene und Östrogene beeinflusst. Androgene hingegen erhöhen die Sensitivität gegenüber FSH und tragen zum Follikelwachstum bei und Östradiol ist wichtig für das Granulosazellwachstum, die Modulation der FSH-Wirkung und für die Ovulation (Jamnongjit and Hammes 2006).

4.3. Plazenta

Mittels der mRNA-Expressions-Analyse der steroidogenen Enzyme CYP11A1, HSD3B1, CYP17A1, HSD17B1 und CYP19A1 (siehe auch Tabelle 2) wurden Plazentaprobe der Hauskatze von uns auf ihre Kapazität zur Steroidsynthese untersucht. Des Weiteren haben wir auch die plazentaren Konzentrationen von Östradiol und Progesteron bestimmt (**Braun et al. 2012b**). Wir wollten dadurch unter anderem abklären, ob eine plazentare Steroidbiosynthese zu den bekannten Serum-Hormonprofilen von Progesteron und Östradiol von trächtigen Katzen (Verhage et al. 1976) beitragen könnte. Der Serumprogesterongehalt von trächtigen (TR) und pseudoträchtigen (PTR) Katzen nimmt laut Verhage et al. ab ca. Tag 4 nach Verpaarung stark zu, hat seinen Peak um Tag 21 bei Werten um 35 (TR) bzw. 25 (PTR) ng/ml und nimmt danach wieder ab. Der Verlauf dieser Abnahme unterscheidet sich deutlich zwischen Trächtigkeit und Pseudoträchtigkeit. Geringe Werte von 2–4 ng/ml sind bei der Pseudoträchtigkeit schon zwischen Tag 40 und 50 erreicht, bei der Trächtigkeit sinken die Werte viel langsamer ab, auf ca. 13 ng/ml an Tag 50 bis zu 4–5 ng/ml kurz vor der Geburt. Serumöstradiol zeigt ein anderes Profil. Von sehr hohen Werten (60 pg/ml) kommend, sinkt es in den ersten fünf Tagen auf 8–12 ng/ml in der Trächtigkeit ab, bleibt auf diesem Wert bis ca. Tag 58–62, wonach es nochmals zu einem Anstieg kommt. Das Profil der Pseudoträchtigkeit ist in den ersten 40 Tagen äh-

lich (nur mit leicht niedrigeren Werten), danach unterscheiden sich die Profile der untersuchten Tiere. Es kam aber bei allen untersuchten Tieren früher oder später zu einem erneuten Östradiolpeak (Verhage et al. 1976).

Wir haben Plazentaprobe der Hauskatze von Tag 21 bis Tag 55 der Trächtigkeit in unserer Studie untersucht. Die mRNA-Expressionen von CYP11A1, CYP17A1 und HSD17B1 stiegen über den Untersuchungszeitraum an. Für HSD3B1 und die Aromatase gab es einen deutlichen Anstieg der mRNA-Expression nach Tag 35, die Werte blieben bis Tag 55 deutlich gegenüber den Tagen 21 bis 35 erhöht. Die intraplazentaren Hormonkonzentrationen von Progesteron und Östradiol folgten den Profilen annähernd, mit der Ausnahme, dass die Konzentrationen schon nach Tag 32 anstiegen und zum Tag 55 bereits wieder abnahmen (**Braun et al. 2012b**). Wir schlussfolgerten aus unseren Profilen im Vergleich zu den Serumwerten von Verhage et al., wo die höchsten Hormonwerte weit vor unseren intraplazentaren Peaks gemessen wurden (Verhage et al. 1976), dass die intraplazentare Steroidproduktion nicht sichtbar zum Serumprofil von Östradiol und Progesteron beiträgt (**Braun et al. 2012b**). Vergleichsmessungen mit Gelbkörpern stellten außerdem in diesen wesentlich höhere Progesteron- und teilweise auch Östradiolwerte fest (**Braun et al. 2012b**).

Nichtsdestotrotz scheinen intraplazentär gebildete Steroide zumindest eine auto-/parakrine Rolle für die Trächtigkeit bei der Katze zu spielen. Nach Ovariectomien sank die Anzahl der Aborte von 100 % an Tag 35, über 80 % an Tag 40 auf 30 % (Tag 45) bzw. 60 % (Tag 50) (Tsutsui et al. 2009). Nach heutigen Erkenntnissen zur intralutealen Hormonproduktion wissen wir, dass einhergehend mit der lutealen Regression, welche ab ungefähr Tag 38 der Trächtigkeit beginnt, auch die luteale Progesteronproduktion abnimmt (**Zschockelt et al. 2014**). Es verwundert daher nicht, dass eine vor Beginn der lutealen Regression durchgeführte Ovariectomie zu einer 100%igen Abort-Rate führte (Tsutsui et al. 2009). Interessant ist aber, dass kurz vor Beginn der lutealen Regression die Kapazität zur Steroidproduktion der Plazenta erhöht wird und auch ein Anstieg der placentaren Progesteronsynthese nachweisbar ist (**Braun et al. 2012b**). Möglicherweise spielen daher ab Mitte der Trächtigkeit die placentar gebildeten Steroide gemeinsam mit den noch weiterhin im Gelbkörper gebildeten Steroiden zusammen eine Rolle für den Erhalt der Trächtigkeit der Hauskatze. Die Plazenta kann scheinbar auch den durch Ovariectomien bedingten Verlust der Gelbkörper in manchen Fällen kompensieren. Auch wenn die intraplazentare Progesteronproduktion pro g Gewebe mit rund 8 ng/g Gewebe in der

hochproduktiven Phase (**Braun et al. 2012b**) deutlich niedriger ist als die von Gelbkörpern, die selbst noch an Tag 48 bei 22 µg/g lag (**Zschockelt et al. 2014**), ist doch der mengenmäßige Anteil der Plazenta im Vergleich zu dem der Gelbkörpern deutlich größer und nimmt über die Trächtigkeit auch weiter zu. Die Erkenntnis, dass die Katzenplazenta aufgrund der Expression von StAR und HSD3B1 eine zusätzliche Quelle für Progesteron während der Trächtigkeit sein könnte, haben ebenfalls Siemieniuch et al. gewonnen (Siemieniuch et al. 2012). Wie bereits in Kapitel 2.1. erwähnt, unterscheidet sich die Abhängigkeit von lutealer und plazentarer Progesteronproduktion zwischen den Spezies. Auch beim Schaf führten Ovariectomien mit zunehmender Trächtigkeitsdauer zu geringeren Abortraten. An Tag 70 der ca. 145 Tage dauernden Trächtigkeit kam es schließlich zu keinem Abort mehr. Trotzdem reduzierte sich der Plasma-Progesteronspiegel auch hier durch die Ektomie von $6,05 \pm 0,52$ auf $1,67 \pm 0,11$ ng/ml. Beim Eingriff an Tag 50, bei dem es dadurch zum Abort bei allen vier Schafen kam, sank der Gehalt von $4,87 \pm 0,85$ auf $0,42 \pm 0,06$ ng/ml (Al-Gubory et al. 1999). Es wird deutlich, dass der Plasmaprogesterongehalt vor der Ektomie im Vergleich zu nach der Ektomie zu den zwei Zeitpunkten (d50 bzw. d70) gar nicht so unterschiedlich war. Vielmehr sank die Progesteronkonzentration an Tag 70 nicht mehr so stark ab wie noch an Tag 50 (Al-Gubory et al. 1999). Dies könnte auf der Plazentaproduktion von Progesteron beruhen, die beim Schaf wohl zwischen Tag 50 und 70 deutlich ansteigt (Ricketts and Flint 1980). Im Gegensatz zu Schaf und Katze ist beim Hund in trächtigen Tieren der Gelbkörper die einzige Progesteronquelle (Concannon 2009).

Bisher wurde von uns noch nicht die Expression von Steroidrezeptoren in der Plazenta untersucht. Zukünftige Arbeiten würden sicherlich dazu beitragen können, regulatorische Mechanismen von Steroiden in diesem Organ besser zu verstehen. Gleiches gilt für metabolisierende Enzyme. Diese könnten vor allem auch eine Rolle für den maternalen Umgang mit fetalen Hormonen spielen.

5. Übergreifende Diskussion und Ausblick

5.1. Metabolismus von Steroiden – bei Katzenartigen ein bislang noch weitgehend unbekanntes Terrain

Abgesehen von Steroidmetaboliten, die in Zusammenhang mit nichtinvasivem Hormonmonitoring zur Trächtigkeitsdiagnose oder zum Östrusstatusmonitoring in vielen feline Spezies bestimmt werden (z.B. Dehnhard et al. 2008, Brown et al. 2001), ist der Metabolismus von Sexualsteroiden in Katzenartigen bisher wenig untersucht. Unsere Studien sind unseres Wissens nach die ersten, bei denen die Expression metabolisierender Enzyme in Teilen untersucht wurde (**Braun et al. 2018, Zschockelt et al. 2015, Zschockelt et al. 2014**). Wenn man Steroid-metabolisierende Enzyme zwischen Spezies vergleicht, fällt auf, dass diese sich in der Mitgliederanzahl einzelner Enzymfamilien stark unterscheiden können. Für die AKR1C-Familie gibt es beispielweise beim Menschen vier Mitglieder, die für den Steroidmetabolismus eine Rolle spielen. Je nach Mitglied habe sie eine Präferenz für die Reduktion von 3-Keto-, 17-Keto- und/oder 20-Ketosteroiden. Zusätzlich ist AKR1D1 im Menschen die alleinige Δ^4 -3-Ketosteroid-5 β -Reduktase (Rizner and Penning 2014). In Ratten gibt es in der AKR1C-Familie noch AKR1C9, welches als 3-alpha-Hydroxysteroiddehydrogenase fungiert (Penning et al. 2003) und für Mäuse sind neun AKR1C-Mitglieder aufgeführt, wobei nicht für alle die Substrate bisher bekannt sind (Pratt-Hyatt et al. 2013). Eine Studie zu Enzymen des Schweins stellte fest, dass sich in den meisten Fällen paraloge AKR1C-Enzyme innerhalb einer Spezies ähnlicher sind als homologe zwischen Spezies (Nonneman et al. 2006). Daher verwundert es vielleicht auch nicht, dass für die Katze bisher nur ein AKR1C-Enzym (AKR1C3) identifiziert wurde und als vorhergesagte Nukleotidsequenz in PubMed (PubMed Nucleotide database; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) zu finden ist. Wir gehen aufgrund unserer Studien bislang davon aus, dass dieses Enzym in der Katze auch die Funktionen übernehmen könnte, die durch andere Familienmitglieder in anderen Spezies katalysiert werden (**Braun et al. 2018**).

Ähnliches vermuten wir auch für die Steroidsulfatasen. Für SULT2A1 ist bisher keine Nukleotidsequenz für die Katze vorhergesagt (siehe PubMed Nucleotide database; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). Erste Versuche, feline SULT2A1-Gensequenzen mithilfe von Primern zu amplifizieren, welche von konservierten Sequenzbereichen anderer Spezies abgeleitet wurden, führten nicht zu einem Amplifikat (unveröffentlichte Ergebnisse). Auch für andere Raubtiere, wie Bär oder Hund gibt es keine bekannte Sequenz

(siehe PubMed Nucleotide database; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). Dieses Enzym sulfatiert üblicherweise Hydroxysteroiden wie DHEA (Wang et al. 2014). Für SULT1E1, obwohl eigentlich für die Sulfatierung von Östrogenen bekannt, konnte für die humane Version ebenfalls die Bindung an DHEA und Pregnenolon nachgewiesen werden (Qian and Song 1999). Wir haben daher in einer unserer Studien die Hypothese aufgestellt, dass SULT1E1 in den Leydig-Zellen des Katzenhodens ebenfalls DHEA sulfatieren könnte (Braun et al. 2018). Da wir in diesen Zellen keine Aromatase nachweisen konnten und daher Östrogene nicht gebildet werden können, muss SULT1E1 dort andere Substrate als die Östrogene haben. Alternativ könnten Substrate dorthin transportiert werden, was aber aufgrund der Tatsache, dass Leydig-Zellen die Hauptquelle der Steroidproduktion in den Testes sind, eher unwahrscheinlich erscheint. Möglicherweise muss man davon ausgehen, dass bei Katzenartigen und eventuell sogar bei Raubtieren insgesamt, teilweise eine nicht so starke Enzymvielfalt innerhalb von Familien metabolisierender Enzyme existiert, wie bei anderen Tierfamilien/-ordnungen. Daher müssen die Enzyme einer Familie bei Katzenartigen/Raubtieren universeller bezüglich ihrer Substrate agieren. Diese Theorie sollten wir zukünftig detaillierter untersuchen. Auch die genauere Untersuchung von Metaboliten selbst könnte zum Verständnis von Prozessen beitragen. So sei hier auf einen aktuellen Übersichtsartikel verwiesen, in dem der potentielle Einfluss von Östrogenmetaboliten auf die Physiologie von humanen Gelbkörpern vorgestellt wird (Devoto et al. 2017).

5.2. Die „jungen“ Faktoren PGRMC1 und PGRMC2 – noch vieles unerforscht

Die Klonierung von humanem PGRMC1 und PGRMC2 wurden erstmalig 1998 beschrieben, damals noch unter den Bezeichnungen HPR6.6 und DG6 (Gerdes et al. 1998). Sie gehören zu den nicht-klassischen Progesteronrezeptoren der sogenannten membran-assoziierten Progesteronrezeptor-Familie (MAPR). Diesen werden pleiotrope Funktionen zugeschrieben (Ryu et al. 2017). Neben der vorgeschlagenen Beteiligung an Progesteron-induzierten Signalwegen, spielt PGRMC1 u.a. bei der Steroidbiogenese und bei Krebs eine Rolle (Rohe et al. 2009). Ihr Wirkungsort beschränkt sich also keineswegs nur auf reproduktive Gewebe.

Umstritten ist, ob sie tatsächlich direkt mit Steroiden interagieren. Die Gruppe von Peluso et al. konnte eine Interaktion mit Progesteron für teilaufgereinigtes Protein zeigen (Ergebnisse zusammengefasst in Peluso and Pru 2014), aber eine Studie von Thomas et al. schlägt vor, dass PGRMC1 zusammen mit den Membran-Progesteronrezeptor α (mPR α) einen Komplex bildet und schließt auch Interaktionen mit anderen Rezeptoren, wie dem ESR2 nicht aus (Thomas et al. 2014). Trotz der Kontroversen ist unstrittig, dass PGRMC1 zumindest an der Bildung von Progesteronbindungsstellen mitwirkt (Gellersen et al. 2009). Für PGRMC1 werden auch Interaktionen mit anderen Proteinen, wie dem SERBP1 (sterol regulatory element-binding protein) vorgeschlagen (Mittelman-Smith et al. 2017). Die Struktur von PGRMC1 wurde 2016 veröffentlicht. Es wurde in der Studie auch gezeigt, dass eine Häm-abhängige Dimerisierung stattfinden kann und diese erforderlich ist, um mit dem Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) und auch Mitgliedern der Cytochrome P450-Familie zu interagieren (Kabe et al. 2016). Eine andere neue Studie zeigte auf, dass die Aktivität von PGRMC1 über Phosphorylierung reguliert werden kann (Cahill et al. 2016). Diese Beispiele zeigen, dass Forschung zu PGRMCs hochaktuell durchgeführt wird und sicherlich noch nicht all ihre Funktionen und Wirkungsweisen aufgeklärt sind. PGRMC2 ist beispielsweise noch viel weniger untersucht als PGRMC1 und eine funktionelle Rolle muss hierfür noch aufgeklärt werden (Mittelman-Smith et al. 2017). Wie in vorhergehenden Kapiteln bereits geschrieben, ist insbesondere die Expression von PGRMCs in männlichen Reproduktionsorganen bisher kaum erforscht. Unsere Studien zeigen aber auf, dass beide auch dort exprimiert werden und weitere Studien zu ihnen sind sicherlich auch von spezieübergreifendem Interesse. Bezüglich ihrer Funktion im weiblichen Reproduktionstrakt gibt es wesentlich mehr Studien (siehe Übersichtsartikel: Kowalik et al. 2013, Gellersen et al. 2009, Peluso and Pru 2014). Aber auch hier können durch weitere Studien sicherlich noch interessante neue Erkenntnisse gefunden werden.

5.3. Kontrazeption von Männchen – neue Ansätze möglich?

Die Kontrazeption von Katzenartigen ist vor allem bei der Haltung in Zoos von besonderem Interesse. Aber auch bezüglich der weltweiten Problematik von verwilderten Hauskatzen sind einfache Kontrazeptionsansätze gefragt. Der Ansatz, bei Männchen die Fortpflanzungsfähigkeit zu unterbinden, ist insofern interessant, als dass ein Männchen mehrere Weibchen befruchten kann. Die Auswirkungen auf die Population, abhängig vom

Paarungstyp, könnten also durchaus deutlicher sein, als wenn man Kontrazeption nur bei Weibchen durchführt.

Das Reproduktionsmanagementcenter der Gesellschaft amerikanischer Zoos (AZA Reproductive Management Center = RMC), angesiedelt am Saint Louis Zoo, evaluiert die Kontrazeptionsmethoden in Zoos und spricht Empfehlungen aus. Für Katzenartige werden GnRH Agonisten sowohl für Männchen und Weibchen bzw. Ovariohysterektomie/Ovarieektomie für Weibchen empfohlen (https://www.stlzoo.org/animals/science_research/reproductivemanagementcenter/contraceptionrecommendatio/contraception_methods/felidae/). Durch GnRH-Agonisten bzw. auch durch Vakzinierung gegen GnRH greift man schon in die Steroidbildung an sich ein; der ganze Körper ist betroffen. Neben dem gewünschten Effekt der Reduktion der Fertilität, führt dies leider auch oft zum Verlust von sekundären Geschlechtsmerkmalen, beim Löwen, wie auch durch Kastration induziert, beispielsweise zum Verlust der charakteristischen Mähne (siehe auch Hinweise zum GnRH-Agonisten *Suprelorin*[®] unter: <https://www.stlzoo.org/animals/scienceresearch/reproductivemanagementcenter/contraceptionrecommendatio/contraceptionmethods/suprelorin-deslorelin/>). Es wäre zu überlegen, ob nicht eine spezifische und idealerweise lokale Hemmung von Hormonrezeptoren eine Alternative wäre. Anbieten würden sich bei der männlichen Katze und möglicherweise auch bei anderen Katzenarten PGR und ESR1. Da beide Rezeptoren in den Hoden der Katze vornehmlich in Keimzellen nachweisbar sind, wäre durch ihre Hemmung ein direkter Effekt auf die Spermatogenese zu erwarten. Für beide müssten allerdings Liganden gefunden werden, die möglichst dauerhaft an die Rezeptoren binden oder zumindest mit einer viel höheren Affinität als die natürlichen Liganden. In beiden Fällen sollte die Bindung nicht zu einer positiven Signalweiterleitung führen. Potentielle Liganden sollten idealerweise auch nur eine geringe Affinität zu anderen Rezeptoren mit ähnlichem Ligandenspektrum aufweisen, um negative Effekte auf diese zu limitieren. Bezüglich der Suche nach neuen Liganden könnte man die vielfältigen Untersuchungen zu Effekten von endogenen Disruptoren eingehender studieren. Nicht wenige dieser endogenen Disruptoren wirken über die Bindung an Rezeptoren, einige mit antagonistischer Wirkung, wie es z.B. beim Androgenrezeptor für Linuron und Vinclozolin beschrieben wurde (Übersichtsartikel: Svechnikov et al. 2010). Eine zweite Möglichkeit wäre es, eine Vakzinierung gegen Rezeptoren durchzuführen. Eine Vakzinierung hätte den Vorteil, dass Substanzen nicht regelmäßig verabreicht werden müssen. Sowohl die Gabe von Rezeptorenhemmern, solange nicht lokal möglich, als auch die Vakzinierung gegen

Rezeptoren betreffen aber ebenfalls den gesamten Organismus. Daher wären auf jeden Fall speziesspezifische Studien nötig, denn gewünschte Effekte sowie Nebenwirkungen können aufgrund speziesspezifischer Lokalisation und Funktion von Rezeptoren sehr unterschiedlich sein. Für die PGR-Knockout-Maus wurde beispielsweise eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Spermienproduktion beschrieben (Lue et al. 2013). Eine solche Auswirkung würde nicht dem von uns erwarteten Effekt einer Hemmung der Spermatogenese durch die Blockierung von PGR entsprechen. Die Hemmung einzelner Rezeptoren, auch wenn sie nicht lokal erfolgen kann, sollte trotzdem theoretisch weniger Nebenwirkungen als GnRH-Agonisten und -Antagonisten haben, welche gleich die Bildung mehrerer Hormone aus dem natürlichen Gleichgewicht bringt.

Generell sind aber wahrscheinlich für Kontrazeptiva, die in die Hormonachse eingreifen, wozu auch die Hemmung/Zerstörung von Hormonrezeptoren zählen würde, potentiell mehr Nebenwirkungen zu erwarten, als für Kontrazeptiva, die beispielweise spezifisch zur Blockade/Eliminierung von Gameten an sich beitragen oder einzelne für die Befruchtung relevante Moleküle negativ beeinflussen. Zu letzteren zählen beispielweise das inzwischen weitverbreitete Vakzin gegen *Zona pellucida* (ZP) Protein der Eizelhülle. Allerdings führt eine Studie zu Effekten von porcinem ZP-Immunokontrazeptiva an Weibchen verschiedener Katzenarten in Zoos einige unerwünschte Effekte auf. Die Effektivität wurde nicht speziell untersucht, es kam aber bei zwei von drei mit Männchen gehaltenen Weibchen zu Trächtigkeiten (Harrenstien et al. 2004). Ein Übersichtsartikel zur Verwendung von Vakzinen zur Kontrazeption bei Katzen listet unterschiedlich erfolgreiche Studien bezüglich der Verwendung von Vakzinen gegen ZP auf (Levy 2011). Die Suche nach dem idealen Kontrazeptivum für Katzen hält also weiter an.

5.4. Saisonalität und Testisentwicklung – Gemeinsamkeiten bei der Regulation der Spermatogenese?

Studien zur Steroidsynthese und -rezeption helfen ebenfalls, saisonale Effekte zu verstehen. So wurde beim Waschbären festgestellt, dass die saisonabhängige Testosteronproduktion an die saisonal unterschiedliche HSD3B-Expression gekoppelt zu sein scheint. Interessanterweise gab es aber auch Tiere, die trotz geringer Testosteronproduktion außerhalb der Paarungszeit Spermien produzieren konnten. Diese Tiere unterschieden sich von den nichtspermienproduzierenden Tieren durch die höhere Expression von Aromata-

se und AR. Sowohl die Produktion von Östrogenen als auch die Rezeptivität gegenüber Androgen spielt in dieser Spezies also eine entscheidende Rolle für die Spermatogenese (Okuyama et al. 2014). Beim Vergleich der Expression steroidogener Enzyme beim Schwarzbär in der Paarungssaison (Juni) zur Nichtpaarungssaison (Oktober) wurden ebenfalls Unterschiede deutlich (Tsubota et al. 1997). CYP11A1 und CYP17A1 waren hier in der Paarungssaison in Leydig-Zellen und Spermatisden, im Oktober jedoch nur noch in Leydig-Zellen nachweisbar. Die Lokalisierung der Aromatase änderte sich noch deutlicher. In zurückgebildeten Hoden im Oktober war sie zwischenzeitlich gar nicht mehr nachweisbar. Mit Beginn der Rekrudescenz in Januar kamen Signale in Sertolizellen, peritubuläre Myoidzellen und runde Spermatisden hinzu und im Juni schließlich zudem welche in elongierten Spermatisden (Tsubota et al. 1997). Auch in dieser Spezies scheint also insbesondere die Expression von Östrogenen einen starken Einfluss auf die Spermatogenese zu haben. Viele, vor allem größere Katzenarten, reproduzieren sich nur einmal im Jahr, dazu zählt auch der Eurasische Luchs. Saisonale Veränderungen sind dort nicht nur auf Weibchen beschränkt. Bei den Männchen sind beispielsweise sowohl der fäkale Testosterongehalt als auch das Ejakulatsvolumen, die totale Anzahl von Spermien und der Anteil motiler sowie intakter Spermien saisonabhängig (Goritz et al. 2006). Interessant wäre, zukünftig auch saisonale Katzen zu analysieren, also die Frage zu klären, ob sich die Expression von Enzymen und Rezeptoren, die wir aufgrund des Studiums an Entwicklungsstufen des Hodens der Hauskatze als potentiell bedeutsam für die Spermatogenese identifiziert haben, auch bei der saisonal beobachteten Veränderung der Spermatogeneseaktivität in Katzenartigen verändert oder ob in die saisonale Regulation nur wenige ausgewählte Faktoren involviert sind.

5.5. Modelltier Katze – für alle Fragestellungen gleich gut geeignet?

Ein Übersichtsartikel zur vergleichenden Endokrinologie von Katzenartigen stellte fest, dass es leichte bis deutliche Unterschiede bei den Reproduktionsmechanismen gibt (Brown 2006). Ferner wurde festgehalten, dass das bessere Verständnis der Reproduktionsphysiologie Züchtungs-, Management- und Erhaltungszuchtmaßnahmen verbessern kann (Brown 2006). Studien an der Hauskatze, zu der der Probenzugang oft besser ist als zu Wildtierarten, können sicherlich dazu beitragen, bestimmte Mechanismen besser zu verstehen und damit effektivere Maßnahmen zu etablieren.

Für das Erhaltungszuchtprogramm des Iberischen Luchses ist es sehr wichtig, eine verlässliche Trächtigkeitsdiagnose zu haben. Progesteronmetabolitmessungen sind beim Luchs aufgrund der persistierenden Gelbkörper ungeeignet, denn Werte außerhalb der Trächtigkeit sind nicht zweifelsfrei von Werten der Trächtigkeit unterscheidbar (Dehnhard et al. 2008). Wir konnten die Kollegen trotzdem erfolgreich unterstützen. Es gab eine Veröffentlichung, die zeigte, dass das Proteohormon Relaxin im Urin zur Trächtigkeitsdiagnose im Schnelltest bei der Katze benutzt werden kann (van Dorsser et al. 2007). So haben wir diese Methode erfolgreich auf die Anwendung zur Trächtigkeitsdiagnose beim Luchs angepasst (Braun et al. 2009). Eine andere Gruppe war bei anderen Katzenarten nur teilweise erfolgreich (Harris et al. 2008). Wir denken, dass der Urin bei ihren Versuchen möglicherweise nicht stark genug aufkonzentriert wurde. Im Test wird ein Antikörper verwendet, der gegen Relaxin vom Hund gerichtet ist. Somit könnten sich auch Abweichungen der Aminosäuresequenz von Relaxin zwischen den Spezies auf die Empfindlichkeit des Tests ausgewirkt haben. Später konnten wir für die Hauskatze zeigen, dass das bekannte Serumprofil von Relaxin (Stewart and Stabenfeldt 1985) auf der Relaxinexpression in der Plazenta beruht und außerdem, dass auch die Plazenta vom Iberischen Luchs Relaxin exprimiert (Braun et al. 2012a).

Aber nicht nur die Hauskatze kann als Modelltier dienen. Zuerst wurde für den Iberischen Luchs gezeigt, dass ein Metabolit von PGF₂-alpha als Trächtigkeitmarker dienen kann (Finkenwirth et al. 2010) und später wurde die Anwendbarkeit für andere Katzenarten bestätigt (Dehnhard et al. 2012).

Unsere Studien am Gelbkörper zeigen aber auch auf, dass nicht alle bei Studien an der Katze gewonnenen Erkenntnisse unkritisch auf andere Katzenarten übertragen werden sollten. Luchse weisen einen ganz anders gearteten Gelbkörperlebenszyklus und damit verbunden auch andere Hormonprofile auf, als die Hauskatze (Jewgenow et al. 2014). Trotzdem waren und sind die vergleichenden Untersuchungen zwischen Luchsen und Katzen auch gerade für diese Fragestellung sehr hilfreich, denn abweichende Ergebnisse zwischen den Spezies deuten auf potentielle Faktoren hin, die in den Erhalt der Persistenz der Gelbkörper bei Luchsen involviert sein könnten.

Auch für weitere aktuelle und zukünftige Forschungsthemen dient die Katze als Modelltier. Für viele Untersuchungen von Exoten ist es beispielsweise notwendig, Gewebe im Feld oder anderweitig auswärts zu sichern, um dann erst später mit den gesicherten Proben im Labor unter optimalen Bedingungen Versuche durchführen zu können. So arbeiten

wir derzeit beispielweise bei der Gelbkörperthematik an funktionellen Versuchen mit Lutealzellen. Bevor aber Studien auch an Lutealzellen des Luchses erfolgen können, muss erst anhand von Gelbkörpergewebe der Hauskatze evaluiert werden, wie man Gelbkörpergewebe so einfriert, dass nach dem Auftauen möglichst viele lebensfähige und kultivierbare Zellen erhalten sind.

Es wird insgesamt ersichtlich, dass die Katze als gutes Modelltier für andere Katzenartige dienen kann, aber für die jeweils aktuelle Fragestellung die Übertragbarkeit der Erkenntnisse immer noch überprüft werden muss.

6. Zusammenfassung

Die in dieser Arbeit vorgestellten Arbeiten zeigen, dass die untersuchten Reproduktionsorgane/-gewebe der Katze in der Lage sind, Steroide zu synthetisieren. Die Organe/Gewebe, bei denen auch die Expression von Steroidrezeptoren untersucht wurde, besitzen eine Rezeptivität für Progesteron, Androgene und Östrogene. Sowohl bezüglich der Steroidsynthese als auch der -rezeption gibt es Unterschiede zwischen den Organen/Geweben aber auch innerhalb der Entwicklung/Lebensspanne einzelner Organe/Gewebe, wie es in den Publikationen aber auch hier anhand der Übersichtstabellen (Tabelle 1 und Tabelle 2) zu sehen ist.

So hat der fetale Hoden eine viel höhere Kapazität als das fetale Ovar, Sexualsteroid zu produzieren. Allerdings können fetale Katzenhoden noch keine Östrogene bilden. Dies ist in postnatalen Testes erst ab der Pubertät möglich. Der fetale Hoden weist aber trotzdem schon Rezeptoren für Östrogene, aber auch für Progesteron und Androgene auf. Die meisten der getesteten Rezeptoren haben eine veränderte Expression über die postnatale Testisentwicklung. Eines der interessantesten Erkenntnisse war sicherlich, dass metabolisierende Enzyme auch noch während der Postpubertät einen regulatorischen Einfluss auf den intratestikulären Hormongehalt zu haben scheinen.

Auf der weiblichen Seite halfen die Studien am Gelbkörper beim Vergleich Katze/Luchs, erste Faktoren zu identifizieren, die zur Persistenz der Gelbkörper beim Luchs beitragen könnten. Auch konnte generell der Lebenszyklus von Gelbkörpern von Katzen besser charakterisiert werden. Durch die Studien an der Plazenta der Hauskatze wurde deutlich, dass ihre Sexualsteroidproduktion zwar nicht in erheblichem Umfang zu den Serumprofilen beiträgt, aber ihre Progesteron- und Östradiolproduktion ab kurz nach Mitte der Trächtigkeit deutlich ansteigt. Diese erhöhte Hormonproduktion der Plazenta scheint somit sehr wichtig für den Erhalt der Trächtigkeit zu sein, denn ungefähr zur gleichen Zeit treten Gelbkörper der Trächtigkeit in die Regressionsphase ein.

Unsere Studien an der Hauskatze zeigten in einigen Fällen Unterschiede zu anderen Spezies auf. Dies macht deutlich, dass Erkenntnisse einer Spezies nicht unbesehen auf andere Spezies übertragen werden können. Nichtsdestotrotz kann die Hauskatze in vielen Fällen als Modell für andere Katzenartige dienen, die in der Regel noch viel weniger studiert sind, auch wenn die Eignung als Modell im Einzelfall überprüft werden muss. Unsere Studien legen des Weiteren die Basis für weiterführende Untersuchungen zu Steroiden, ihrem Metabolismus und ihrer Wirkungsweise in Katzenartigen.

7. Literaturverzeichnis

- Al-Gubory K. H.; Solari A.; Mirman B., 1999: Effects of luteectomy on the maintenance of pregnancy, circulating progesterone concentrations and lambing performance in sheep. *Reprod Fertil Dev*, *11* 317-322.
- Allen W. R., 2001: Luteal deficiency and embryo mortality in the mare. *Reprod Domest Anim*, *36* 121-131.
- Alnouti Y.; Klaassen C. D., 2006: Tissue distribution and ontogeny of sulfotransferase enzymes in mice. *Toxicol Sci*, *93* 242-255.
- Amelkina O.; Braun B. C.; Dehnhard M.; Jewgenow K., 2015a: The corpus luteum of the domestic cat: histologic classification and intraluteal hormone profile. *Theriogenology*, *83* 711-720.
- Amelkina O.; Zschockelt L.; Painer J.; Serra R.; Villaespesa F.; Braun B. C.; Jewgenow K., 2015b: Apoptosis-Related Factors in the Luteal Phase of the Domestic Cat and Their Involvement in the Persistence of Corpora Lutea in Lynx. *PLoS One*, *10* e0143414.
- Amelkina O.; Zschockelt L.; Painer J.; Serra R.; Villaespesa F.; Krause E.; Jewgenow K.; Braun B. C., 2016: Progesterone, estrogen, and androgen receptors in the corpus luteum of the domestic cat, Iberian lynx (*Lynx pardinus*) and Eurasian lynx (*Lynx lynx*). *Theriogenology*, *86* 2107-2118.
- Andersen C. Y.; Ezcurra D., 2014: Human steroidogenesis: implications for controlled ovarian stimulation with exogenous gonadotropins. *Reprod Biol Endocrinol*, *12* 128.
- Beaulieu M.; Levesque E.; Hum D. W.; Belanger A., 1996: Isolation and characterization of a novel cDNA encoding a human UDP-glucuronosyltransferase active on C19 steroids. *J Biol Chem*, *271* 22855-22862.
- Bennett N. C.; Gardiner R. A.; Hooper J. D.; Johnson D. W.; Gobe G. C., 2010: Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *Int J Biochem Cell Biol*, *42* 813-827.
- Berg J. M.; Tymoczko J. L.; Stryer L., 2013: *Stryer Biochemie*. 7 edn. Springer Spektrum.
- Bilinska B.; Wiszniewska B.; Kosiniak-Kamysz K.; Kotula-Balak M.; Gancarczyk M.; Hejmej A.; Sadowska J.; Marchlewicz M.; Kolasa A.; Wenda-Rozewicka L., 2006: Hormonal status of male reproductive system: androgens and estrogens in the testis and epididymis. In vivo and in vitro approaches. *Reprod Biol*, *6 Suppl 1* 43-58.
- Bjersing L.; Carstensen H., 1967: Biosynthesis of steroids by granulosa cells of the porcine ovary in vitro. *J Reprod Fertil*, *14* 101-111.
- Bondesson M.; Hao R.; Lin C. Y.; Williams C.; Gustafsson J. A., 2015: Estrogen receptor signaling during vertebrate development. *Biochim Biophys Acta*, *1849* 142-151.
- Borday C.; Merlet J.; Racine C.; Habert R., 2013: Expression and localization of aromatase during fetal mouse testis development. *Basic Clin Androl*, *23* 12.
- Boukari K.; Ciampi M. L.; Guiochon-Mantel A.; Young J.; Lombes M.; Meduri G., 2007: Human fetal testis: source of estrogen and target of estrogen action. *Hum Reprod*, *22* 1885-1892.
- Boukari K.; Meduri G.; Brailly-Tabard S.; Guibourdenche J.; Ciampi M. L.; Massin N.; Martinerie L.; Picard J. Y.; Rey R.; Lombes M.; Young J., 2009: Lack of androgen receptor expression in Sertoli cells accounts for the absence of anti-Mullerian hormone repression during early human testis development. *J Clin Endocrinol Metab*, *94* 1818-1825.

- Braun B. C.; Frank A.; Dehnhard M.; Voigt C. C.; Vargas A.; Goritz F.; Jewgenow K., 2009: Pregnancy diagnosis in urine of Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Theriogenology*, *71* 754-761.
- Braun B. C.; Vargas A.; Jewgenow K., 2012a: The molecular detection of relaxin and its receptor RXFP1 in reproductive tissue of *Felis catus* and *Lynx pardinus* during pregnancy. *Reproduction*, *143* 399-410.
- Braun B. C.; Zschockelt L.; Dehnhard M.; Jewgenow K., 2012b: Progesterone and estradiol in cat placenta--biosynthesis and tissue concentration. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *132* 295-302.
- Braun B. C.; Jewgenow K., 2017: Expression of steroidogenic enzymes and steroid receptors in foetal gonads of domestic cat-Sex similarities and differences. *Reprod Domest Anim*, *52 Suppl 2* 130-136.
- Braun B. C.; Okuyama M. W.; Muller K.; Dehnhard M.; Jewgenow K., 2018: Steroidogenic enzymes, their products and sex steroid receptors during testis development and spermatogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *J Steroid Biochem Mol Biol*, *178* 135-149.
- Brown J. L., 2006: Comparative endocrinology of domestic and nondomestic felids. *Theriogenology*, *66* 25-36.
- Brown J. L.; Graham L. H.; Wielebnowski N.; Swanson W. F.; Wildt D. E.; Howard J. G., 2001: Understanding the basic reproductive biology of wild felids by monitoring of faecal steroids. *J Reprod Fertil Suppl*, *57* 71-82.
- Caballero J.; Frenette G.; Sullivan R., 2010: Post testicular sperm maturational changes in the bull: important role of the epididymosomes and prostasomes. *Vet Med Int*, *2011* 757194.
- Cahill M. A.; Jazayeri J. A.; Kovacevic Z.; Richardson D. R., 2016: PGRMC1 regulation by phosphorylation: potential new insights in controlling biological activity. *Oncotarget*, *7* 50822-50827.
- Chen Y.; Jefferson W. N.; Newbold R. R.; Padilla-Banks E.; Pepling M. E., 2007: Estradiol, progesterone, and genistein inhibit oocyte nest breakdown and primordial follicle assembly in the neonatal mouse ovary in vitro and in vivo. *Endocrinology*, *148* 3580-3590.
- Concannon P. W., 2009: Endocrinologic control of normal canine ovarian function. *Reprod Domest Anim*, *44 Suppl 2* 3-15.
- Cork D. M.; Lennard T. W.; Tyson-Capper A. J., 2008: Alternative splicing and the progesterone receptor in breast cancer. *Breast Cancer Res*, *10* 207.
- Dehnhard M.; Naidenko S.; Frank A.; Braun B.; Goritz F.; Jewgenow K., 2008: Non-invasive monitoring of hormones: a tool to improve reproduction in captive breeding of the Eurasian lynx. *Reprod Domest Anim*, *43 Suppl 2* 74-82.
- Dehnhard M.; Finkenwirth C.; Crosier A.; Penfold L.; Ringleb J.; Jewgenow K., 2012: Using PGFM (13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F2 alpha) as a non-invasive pregnancy marker for felids. *Theriogenology*, *77* 1088-1099.
- Devoto L.; Henriquez S.; Kohen P.; Strauss J. F., 3rd, 2017: The significance of estradiol metabolites in human corpus luteum physiology. *Steroids*, *123* 50-54.
- Dutta S.; Mark-Kappeler C. J.; Hoyer P. B.; Pepling M. E., 2014: The steroid hormone environment during primordial follicle formation in perinatal mouse ovaries. *Biol Reprod*, *91* 68.
- Faucette A. N.; Maher V. A.; Gutierrez M. A.; Jucker J. M.; Yates D. C.; Welsh T. H., Jr.; Amstalden M.; Newton G. R.; Nuti L. C.; Forrest D. W.; Ing N. H., 2014: Temporal

- changes in histomorphology and gene expression in goat testes during postnatal development. *J Anim Sci*, *92* 4440-4448.
- Ferraldeschi R.; Sharifi N.; Auchus R. J.; Attard G., 2013: Molecular Pathways: Inhibiting Steroid Biosynthesis in Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*, *19* 3353-3359.
- Fietz D.; Ratzenbock C.; Hartmann K.; Raabe O.; Kliesch S.; Weidner W.; Klug J.; Bergmann M., 2014: Expression pattern of estrogen receptors alpha and beta and G-protein-coupled estrogen receptor 1 in the human testis. *Histochem Cell Biol*, *142* 421-432.
- Finkenwirth C.; Jewgenow K.; Meyer H. H. D.; Vargas A.; Dehnhard M., 2010: PGFM (13,14-dihydro-15-keto-PGF(2 alpha)) in pregnant and pseudo-pregnant Iberian lynx: A new noninvasive pregnancy marker for felid species. *Theriogenology*, *73* 530-540.
- Fluck C. E.; Pandey A. V., 2014: Steroidogenesis of the testis -- new genes and pathways. *Ann Endocrinol (Paris)*, *75* 40-47.
- Fowler P. A.; Anderson R. A.; Saunders P. T.; Kinnell H.; Mason J. I.; Evans D. B.; Bhattacharya S.; Flannigan S.; Franks S.; Monteiro A.; O'Shaughnessy P. J., 2011: Development of steroid signaling pathways during primordial follicle formation in the human fetal ovary. *J Clin Endocrinol Metab*, *96* 1754-1762.
- Fukami M.; Homma K.; Hasegawa T.; Ogata T., 2013: Backdoor pathway for dihydrotestosterone biosynthesis: implications for normal and abnormal human sex development. *Dev Dyn*, *242* 320-329.
- Gellersen B.; Fernandes M. S.; Brosens J. J., 2009: Non-genomic progesterone actions in female reproduction. *Hum Reprod Update*, *15* 119-138.
- Gerdes D.; Wehling M.; Leube B.; Falkenstein E., 1998: Cloning and tissue expression of two putative steroid membrane receptors. *Biol Chem*, *379* 907-911.
- Goritz F.; Neubauer K.; Naidenko S. V.; Fickel J.; Jewgenow K., 2006: Investigations on reproductive physiology in the male Eurasian lynx (*Lynx lynx*). *Theriogenology*, *66* 1751-1754.
- Goritz F.; Dehnhard M.; Hildebrandt T. B.; Naidenko S. V.; Vargas A.; Martinez F.; Lopez-Bao J. V.; Palomares F.; Jewgenow K., 2009: Non cat-like ovarian cycle in the Eurasian and the Iberian lynx - ultrasonographical and endocrinological analysis. *Reprod Domest Anim*, *44 Suppl 2* 87-91.
- Griffin D.; Liu X.; Pru C.; Pru J. K.; Peluso J. J., 2014: Expression of progesterone receptor membrane component-2 within the immature rat ovary and its role in regulating mitosis and apoptosis of spontaneously immortalized granulosa cells. *Biol Reprod*, *91* 36.
- Grindflek E.; Berget I.; Moe M.; Oeth P.; Lien S., 2010: Transcript profiling of candidate genes in testis of pigs exhibiting large differences in androstenone levels. *BMC Genet*, *11* 4.
- Gudermuth D. F.; Newton L.; Daels P.; Concannon P., 1997: Incidence of spontaneous ovulation in young, group-housed cats based on serum and faecal concentrations of progesterone. *J Reprod Fertil Suppl*, *51* 177-184.
- Haeussler S.; Wagner A.; Welter H.; Claus R., 2007: Changes of testicular aromatase expression during fetal development in male pigs (*Sus scrofa*). *Reproduction*, *133* 323-330.
- Harrenstien L. A.; Munson L.; Chassy L. M.; Liu I. K.; Kirkpatrick J. F., 2004: Effects of porcine zona pellucida immunocontraceptives in zoo felids. *J Zoo Wildl Med*, *35* 271-279.

- Harris L. A.; Steinetz B. G.; Bond J. B.; Lasano S.; Swanson W. F., 2008: Refinement of a commercial bench-top relaxin assay for pregnancy diagnosis using urine from domestic and nondomestic felids. *J Zoo Wildlife Med*, *39* 170-179.
- Hess R. A., 2003: Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reprod Biol Endocrinol*, *1* 52.
- Hirata S.; Shoda T.; Kato J.; Hoshi K., 2003: Isoform/variant mRNAs for sex steroid hormone receptors in humans. *Trends Endocrinol Metab*, *14* 124-129.
- Houmard B.; Small C.; Yang L.; Naluai-Cecchini T.; Cheng E.; Hassold T.; Griswold M., 2009: Global gene expression in the human fetal testis and ovary. *Biol Reprod*, *81* 438-443.
- Howard J. G.; Brown J. L.; Bush M.; Wildt D. E., 1990: Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones, and improvement of spermatozoal motility and morphology after swim-up processing. *J Androl*, *11* 204-215.
- Intervet, 2010: Kompendium der Fortpflanzung : bei Nutz- und Haustieren / Intervet Intervet, Unterschleißheim.
- Jamnongjit M.; Hammes S. R., 2006: Ovarian steroids: the good, the bad, and the signals that raise them. *Cell Cycle*, *5* 1178-1183.
- Jewgenow K.; Mikołajewska N.; Canales R.; Gonçalves N.; F. G.; Rojo C.; Rivas A.; Serra R.; Bernadino R.; Acosta C.; Soler G.; Villaespesa F., 2013: Collection and vitrification of embryos in Iberian lynx (*Lynx pardinus*). 16th EVSSAR Congress, Toulouse, France.
- Jewgenow K.; Painer J.; Amelkina O.; Dehnhard M.; Goeritz F., 2014: Lynx reproduction--long-lasting life cycle of corpora lutea in a feline species. *Reprod Biol*, *14* 83-88.
- Joseph A.; Shur B. D.; Hess R. A., 2011: Estrogen, Efferent Ductules, and the Epididymis. *Biology of Reproduction*, *84* 207-217.
- Juengel J. L.; Heath D. A.; Quirke L. D.; McNatty K. P., 2006: Oestrogen receptor alpha and beta, androgen receptor and progesterone receptor mRNA and protein localisation within the developing ovary and in small growing follicles of sheep. *Reproduction*, *131* 81-92.
- Kabe Y.; Nakane T.; Koike I.; Yamamoto T.; Sugiura Y.; Harada E.; Sugase K.; Shimamura T.; Ohmura M.; Muraoka K.; Yamamoto A.; Uchida T.; Iwata S.; Yamaguchi Y.; Krayukhina E.; Noda M.; Handa H.; Ishimori K.; Uchiyama S.; Kobayashi T.; Suematsu M., 2016: Haem-dependent dimerization of PGRMC1/Sigma-2 receptor facilitates cancer proliferation and chemoresistance. *Nat Commun*, *7* 11030.
- Kowalik M. K.; Rekawiecki R.; Kotwica J., 2013: The putative roles of nuclear and membrane-bound progesterone receptors in the female reproductive tract. *Reprod Biol*, *13* 279-289.
- Kucinkas L.; Just W., 2005: Human male sex determination and sexual differentiation: pathways, molecular interactions and genetic disorders. *Medicina (Kaunas)*, *41* 633-640.
- Kumar A.; Dumasia K.; Deshpande S.; Balasinor N. H., 2017: Direct regulation of genes involved in sperm release by estrogen and androgen through their receptors and coregulators. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *171* 66-74.
- Lacroix E.; Echaute W.; Leusen I., 1974: The biosynthesis of estrogens by cow follicles. *Steroids*, *23* 337-356.
- Levin E. R.; Pietras R. J., 2008: Estrogen receptors outside the nucleus in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, *108* 351-361.

- Levin E. R., 2011: Minireview: Extranuclear steroid receptors: roles in modulation of cell functions. *Mol Endocrinol*, *25* 377-384.
- Levy J. K., 2011: Contraceptive vaccines for the humane control of community cat populations. *Am J Reprod Immunol*, *66* 63-70.
- Li Q.; Zhang F.; Zhang S.; Sheng X.; Han X.; Weng Q.; Yuan Z., 2015: Seasonal expression of androgen receptor, aromatase, and estrogen receptor alpha and beta in the testis of the wild ground squirrel (*Citellus dauricus* Brandt). *Eur J Histochem*, *59* 2456.
- Lue Y.; Wang C.; Lydon J. P.; Leung A.; Li J.; Swerdloff R. S., 2013: Functional role of progestin and the progesterone receptor in the suppression of spermatogenesis in rodents. *Andrology*, *1* 308-317.
- Lueders I.; Niemuller C.; Gray C.; Rich P.; Hildebrandt T. B., 2010: Luteogenesis during the estrous cycle in Asian elephants (*Elephas maximus*). *Reproduction*, *140* 777-786.
- Lueders I.; Niemuller C.; Rich P.; Gray C.; Hermes R.; Goeritz F.; Hildebrandt T. B., 2012: Gestating for 22 months: luteal development and pregnancy maintenance in elephants. *Proc Biol Sci*, *279* 3687-3696.
- McGeedy T. A.; Quinn P. J.; FitzPatrick E. S.; Ryan M. T., 2006: *Veterinary Embryology*. 1 edn. Blackwell Publishing.
- Miller W. L., 2008: Steroidogenic enzymes. *Endocr Dev*, *13* 1-18.
- Mittelman-Smith M. A.; Rudolph L. M.; Mohr M. A.; Micevych P. E., 2017: Rodent Models of Non-classical Progesterone Action Regulating Ovulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *8* 165.
- Neubauer K.; Jewgenow K.; Blottner S.; Wildt D. E.; Pukazhenti B. S., 2004: Quantity rather than quality in teratospermic males: A histomorphometric and flow cytometric evaluation of spermatogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Biology of Reproduction*, *71* 1517-1524.
- Niswender G. D.; Juengel J. L.; Silva P. J.; Rollyson M. K.; McIntush E. W., 2000: Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev*, *80* 1-29.
- Nonneman D. J.; Wise T. H.; Ford J. J.; Kuehn L. A.; Rohrer G. A., 2006: Characterization of the aldo-keto reductase 1C gene cluster on pig chromosome 10: possible associations with reproductive traits. *BMC Vet Res*, *2* 28.
- Nugent B. M.; Tobet S. A.; Lara H. E.; Lucion A. B.; Wilson M. E.; Recabarren S. E.; Paredes A. H., 2012: Hormonal programming across the lifespan. *Horm Metab Res*, *44* 577-586.
- Okuyama M. W.; Shimozuru M.; Yanagawa Y.; Tsubota T., 2014: Changes in the immunolocalization of steroidogenic enzymes and the androgen receptor in raccoon (*Procyon lotor*) testes in association with the seasons and spermatogenesis. *J Reprod Dev*, *60* 155-161.
- Oliveira R. L.; Nogueira J. C.; Mahecha G. A. B.; Oliveira C. A., 2012: Seasonal variation in estrogen receptor ER alpha, but not ER beta, androgen receptor and aromatase, in the efferent ductules and epididymis of the big fruit-eating bat *Artibeus lituratus*. *Gen Comp Endocr*, *179* 1-13.
- Painer J.; Goeritz F.; Dehnhard M.; Hildebrandt T. B.; Naidenko S. V.; Sanchez I.; Munoz M. A. Q.; Jewgenow K., 2014a: Hormone-induced luteolysis on physiologically persisting corpora lutea in Eurasian and Iberian lynx (*Lynx lynx* and *Lynx pardinus*). *Theriogenology*, *82* 557-562.
- Painer J.; Jewgenow K.; Dehnhard M.; Arnemo J. M.; Linnell J. D.; Odden J.; Hildebrandt T. B.; Goeritz F., 2014b: Physiologically persistent Corpora lutea in Eurasian lynx

- (Lynx lynx) - longitudinal ultrasound and endocrine examinations intra-vitam. *PLoS One*, 9 e90469.
- Palma G. A.; Arganaraz M. E.; Barrera A. D.; Rodler D.; Mutto A. A.; Sinowatz F., 2012: Biology and biotechnology of follicle development. *ScientificWorldJournal*, 2012 938138.
- Pearl C. A.; Mason H.; Roser J. F., 2011: Immunolocalization of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta and androgen receptor in the pre-, peri- and post-pubertal stallion testis. *Anim Reprod Sci*, 125 103-111.
- Pelican K. M.; Brown J. L.; Wildt D. E.; Ottinger M. A.; Howard J. G., 2005: Short term suppression of follicular recruitment and spontaneous ovulation in the cat using levonorgestrel versus a GnRH antagonist. *Gen Comp Endocrinol*, 144 110-121.
- Peluso J. J., 2013: Progesterone receptor membrane component 1 and its role in ovarian follicle growth. *Front Neurosci*, 7 99.
- Peluso J. J.; Pru J. K., 2014: Non-canonical progesterone signaling in granulosa cell function. *Reproduction*, 147 R169-178.
- Penning T. M.; Jin Y.; Heredia V. V.; Lewis M., 2003: Structure-function relationships in 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenases: a comparison of the rat and human isoforms. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 85 247-255.
- Pratt-Hyatt M.; Lickteig A. J.; Klaassen C. D., 2013: Tissue Distribution, Ontogeny, and Chemical Induction of Aldo-Keto Reductases in Mice. *Drug Metab Dispos*, 41 1480-1487.
- Qian Y. M.; Song W. C., 1999: Correlation between PAP-dependent steroid binding activity and substrate specificity of mouse and human estrogen sulfotransferases. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 71 123-131.
- Quirke L. D.; Juengel J. L.; Tisdall D. J.; Lun S.; Heath D. A.; McNatty K. P., 2001: Ontogeny of steroidogenesis in the fetal sheep gonad. *Biol Reprod*, 65 216-228.
- Rane A.; Ekstrom L., 2012: Androgens and doping tests: genetic variation and pit-falls. *Br J Clin Pharmacol*, 74 3-15.
- Rey R. A.; Musse M.; Venara M.; Chemes H. E., 2009: Ontogeny of the androgen receptor expression in the fetal and postnatal testis: its relevance on Sertoli cell maturation and the onset of adult spermatogenesis. *Microsc Res Tech*, 72 787-795.
- Ricketts A. P.; Flint A. P., 1980: Onset of synthesis of progesterone by ovine placenta. *J Endocrinol*, 86 337-347.
- Rizner T. L.; Penning T. M., 2014: Role of aldo-keto reductase family 1 (AKR1) enzymes in human steroid metabolism. *Steroids*, 79 49-63.
- Rochira V.; Madeo B.; Diazzi C.; Zirilli L.; Daniele S.; Carani C., 2000: Estrogens and male reproduction. In: L. J. De Groot; G. Chrousos; K. Dungan; K. R. Feingold; A. Grossman; J. M. Hershman; C. Koch; M. Korbonits; R. McLachlan; M. New; J. Purnell; R. Rebar; F. Singer; A. Vinik, (eds), *Endotext*. South Dartmouth (MA).
- Rohe H. J.; Ahmed I. S.; Twist K. E.; Craven R. J., 2009: PGRMC1 (progesterone receptor membrane component 1): a targetable protein with multiple functions in steroid signaling, P450 activation and drug binding. *Pharmacol Ther*, 121 14-19.
- Ryu C. S.; Klein K.; Zanger U. M., 2017: Membrane Associated Progesterone Receptors: Promiscuous Proteins with Pleiotropic Functions - Focus on Interactions with Cytochromes P450. *Front Pharmacol*, 8 159.
- Sanders S. L.; Stouffer R. L., 1997: Localization of steroidogenic enzymes in macaque luteal tissue during the menstrual cycle and simulated early pregnancy: immunohistochemical evidence supporting the two-cell model for estrogen production in the primate corpus luteum. *Biol Reprod*, 56 1077-1087.

- Scarpin K. M.; Graham J. D.; Mote P. A.; Clarke C. L., 2009: Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression. *Nucl Recept Signal*, 7 e009.
- Schnorr B.; Kressin M., 2011: *Embryologie der Haustiere*. 6 edn. Enke Verlag.
- Schoen J.; Sharbati S.; Ritter J.; Jewgenow K., 2012: Feline gonads exhibit tissue specific alternative splicing of oestrogen receptor alpha (ESR1). *Reprod Domest Anim*, 47 *Suppl 6* 30-34.
- Shah C.; Modi D.; Sachdeva G.; Gadkar S.; Puri C., 2005: Coexistence of intracellular and membrane-bound progesterone receptors in human testis. *J Clin Endocrinol Metab*, 90 474-483.
- Siemieniuch M. J.; Jursza E.; Szostek A. Z.; Skarzynski D. J.; Boos A.; Kowalewski M. P., 2012: Steroidogenic capacity of the placenta as a supplemental source of progesterone during pregnancy in domestic cats. *Reprod Biol Endocrinol*, 10 89.
- Siemieniuch M. J.; Jursza E.; Szostek A. Z.; Zschockelt L.; Boos A.; Kowalewski M. P., 2014: Placental origin of prostaglandin F2alpha in the domestic cat. *Mediators Inflamm*, 2014 364787.
- Stewart D. R.; Stabenfeldt G. H., 1985: Relaxin activity in the pregnant cat. *Biol Reprod*, 32 848-854.
- Stocco C.; Telleria C.; Gibori G., 2007: The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr Rev*, 28 117-149.
- Svechnikov K.; Izzo G.; Landreh L.; Weisser J.; Soder O., 2010: Endocrine disruptors and Leydig cell function. *J Biomed Biotechnol*, 2010.
- Thomas P.; Pang Y.; Dong J., 2014: Enhancement of cell surface expression and receptor functions of membrane progesterin receptor alpha (mPRalpha) by progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1): evidence for a role of PGRMC1 as an adaptor protein for steroid receptors. *Endocrinology*, 155 1107-1119.
- Tripathy S.; Asaithambi K.; Jayaram P.; Medhamurthy R., 2016: Analysis of 17beta-estradiol (E2) role in the regulation of corpus luteum function in pregnant rats: Involvement of IGFBP5 in the E2-mediated actions. *Reprod Biol Endocrinol*, 14 19.
- Tsubota T.; Howell-Skalla L.; Nitta H.; Osawa Y.; Mason J. I.; Meiers P. G.; Nelson R. A.; Bahr J. M., 1997: Seasonal changes in spermatogenesis and testicular steroidogenesis in the male black bear *Ursus americanus*. *J Reprod Fertil*, 109 21-27.
- Tsutsui T.; Suzuki Y.; Toyonaga M.; Oba H.; Mizutani T.; Hori T., 2009: The role of the ovary for the maintenance of pregnancy in cats. *Reprod Domest Anim*, 44 *Suppl 2* 120-124.
- van Dorsser F. J. D.; Lasano S.; Steinetz B. G., 2007: Pregnancy diagnosis in cats using a rapid, bench-top kit to detect relaxin in urine. *Reproduction in Domestic Animals*, 42 111-112.
- Verhage H. G.; Beamer N. B.; Brenner R. M., 1976: Plasma levels of estradiol and progesterone in the cat during polyestrus, pregnancy and pseudopregnancy. *Biol Reprod*, 14 579-585.
- Wang T.; Cook I.; Falany C. N.; Leyh T. S., 2014: Paradigms of sulfotransferase catalysis: the mechanism of SULT2A1. *J Biol Chem*, 289 26474-26480.
- Wildt D. E.; Chan S. Y.; Seager S. W.; Chakraborty P. K., 1981: Ovarian activity, circulating hormones, and sexual behavior in the cat. I. Relationships during the coitus-induced luteal phase and the estrous period without mating. *Biol Reprod*, 25 15-28.

- Wiltbank M. C.; Salih S. M.; Atli M. O.; Luo W.; Bormann C. L.; Ottobre J. S.; Vezina C. M.; Mehta V.; Diaz F. J.; Tsai S. J.; Sartori R., 2012: Comparison of endocrine and cellular mechanisms regulating the corpus luteum of primates and ruminants. *Anim Reprod*, *9* 242-259.
- Young J. M.; McNeilly A. S., 2010: Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction*, *140* 489-504.
- YoungLai E. V.; Belbeck L. W.; Dimond P.; Singh P., 1976: Testosterone production by ovarian follicles of the domestic cat (*Felis catus*). *Horm Res*, *7* 91-98.
- Zambelli D.; Prati F., 2006: Ultrasonography for pregnancy diagnosis and evaluation in queens. *Theriogenology*, *66* 135-144.
- Zhou Q.; Nie R.; Prins G. S.; Saunders P. T.; Katzenellenbogen B. S.; Hess R. A., 2002: Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *J Androl*, *23* 870-881.
- Zschockelt L.; Amelkina O.; Siemieniuch M. J.; Koster S.; Jewgenow K.; Braun B. C., 2014: Corpora lutea of pregnant and pseudopregnant domestic cats reveal similar steroidogenic capacities during the luteal life span. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *144 Pt B* 373-381.
- Zschockelt L.; Amelkina O.; Koster S.; Painer J.; Okuyama M. W.; Serra R.; Vargas A.; Jewgenow K.; Braun B. C., 2015: Comparative analysis of intraluteal steroidogenic enzymes emphasises the functionality of fresh and persistent corpora lutea during pro--and metoestrus in the lynx. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *154* 75-84.
- Zschockelt L.; Amelkina O.; Siemieniuch M. J.; Kowalewski M. P.; Dehnhard M.; Jewgenow K.; Braun B. C., 2016: Synthesis and reception of prostaglandins in corpora lutea of domestic cat and lynx. *Reproduction*, *152* 111-126.

8. Publikationen, die Bestandteil der Habilitationsschrift sind

8.1. Übersicht

- 1) Progesterone and Estradiol in cat placenta--biosynthesis and tissue concentration. **Braun BC**, Zschockelt L, Dehnhard M, Jewgenow K. J Steroid Biochem Mol Biol. 2012 Nov;132(3-5):295-302. doi: 10.1016/j.jsbmb.2012.07.005. Epub 2012 Jul 31.
- 2) Corpora lutea of pregnant and pseudopregnant domestic cats reveal similar steroidogenic capacities during the luteal life span. Zschockelt L, Amelkina O, Siemieniuch MJ, Koster S, Jewgenow K, **Braun BC**. J Steroid Biochem Mol Biol. 2014 Oct;144 Pt B:373-81. doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.08.010. Epub 2014 Aug 17.
- 3) The corpus luteum of the domestic cat: histologic classification and intraluteal hormone profile. Amelkina O, **Braun BC**, Dehnhard M, Jewgenow K. Theriogenology. 2015 Mar 1;83(4):711-20. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.11.008. Epub 2014 Nov 10.
- 4) Comparative analysis of intraluteal steroidogenic enzymes emphasises the functionality of fresh and persistent corpora lutea during pro- and metoestrus in the lynx. Zschockelt L, Amelkina O, Koster S, Painer J, Okuyama MW, Serra R, Vargas A, Jewgenow K, **Braun BC**. J Steroid Biochem Mol Biol. 2015 Nov;154:75-84. doi: 10.1016/j.jsbmb.2015.07.001. Epub 2015 Jul 10.
- 5) Apoptosis-Related Factors in the Luteal Phase of the Domestic Cat and Their Involvement in the Persistence of Corpora Lutea in Lynx. Amelkina O, Zschockelt L, Painer J, Serra R, Villaespesa F, **Braun BC**, Jewgenow K. PLoS One. 2015 Nov 24;10(11):e0143414. doi: 10.1371/journal.pone.0143414. eCollection 2015.
- 6) Progesterone, Estrogen, and androgen receptors in the corpus luteum of the domestic cat, Iberian lynx (*Lynx pardinus*) and Eurasian lynx (*Lynx lynx*). Amelkina O, Zschockelt L, Painer J, Serra R, Villaespesa F, Krause E, Jewgenow K, **Braun BC**. Theriogenology. 2016 Dec;86(9):2107-2118. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.06.026. Epub 2016 Jul 5.

- 7) Expression of steroidogenic enzymes and steroid receptors in foetal gonads of domestic cat-Sex similarities and differences. **Braun BC**, Jewgenow K. *Reprod Domest Anim.* 2017 Apr;52 Suppl 2:130-136. doi: 10.1111/rda.12829. Epub 2016 Nov 15.
- 8) Expression of steroidogenic enzymes and steroid receptors in testis of domestic cat (*Felis catus*). **Braun BC**, Okuyama MW, Dehnhard M, Müller K, Jewgenow K. *J J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018 Apr;178:135-149. doi: 10.1016/j.jsbmb.2017.11.013. Epub 2017 Nov 28.

8.2. Darstellung des eigenen Anteils an den Publikationen

Der Anteil der beteiligten Autorinnen und Autoren an den im Anhang aufgeführten Publikationen wird nach folgenden Kriterien dargestellt:

1. Idee
2. Versuchsplanung
3. Versuchsdurchführung
4. Auswertung der Ergebnisse
5. Erstellung des Manuskripts

Die Reihenfolge der Autoren entspricht der Autorenfolge im Manuskript.

1) **Braun BC**, Zschockelt L, Dehnhard M, Jewgenow K. 2012

Progesterone and Estradiol in cat placenta--biosynthesis and tissue concentration.

1. Idee: Braun, Jewgenow
2. Versuchsplanung: Braun
3. Versuchsdurchführung: Braun, Zschockelt, Dehnhard
4. Auswertung der Ergebnisse: Braun, Zschockelt, Dehnhard
5. Erstellung des Manuskripts: Braun, Jewgenow

2.) Zschockelt L, Amelkina O, Siemieniuch MJ, Koster S, Jewgenow K, **Braun BC**. 2014

Corpora lutea of pregnant and pseudopregnant domestic cats reveal similar steroidogenic capacities during the luteal life span.

1. Idee: Jewgenow, Braun

2. Versuchsplanung: Zschockelt, Jewgenow, Braun

3. Versuchsdurchführung: Zschockelt, Amelkina, Koster, Siemieniuch

4. Auswertung der Ergebnisse: Zschockelt, Koster, Jewgenow, Braun

5. Erstellung des Manuskripts: Zschockelt, Jewgenow, Braun

3.) Amelkina O, **Braun BC**, Dehnhard M, Jewgenow K. 2015

The corpus luteum of the domestic cat: histologic classification and intraluteal hormone profile.

1. Idee: Braun, Jewgenow

2. Versuchsplanung: Amelkina, Braun, Jewgenow

3. Versuchsdurchführung: Amelkina

4. Auswertung der Ergebnisse: Amelkina, Braun, Jewgenow

5. Erstellung des Manuskripts: Amelkina, Braun, Jewgenow

4.) Zschockelt L, Amelkina O, Koster S, Painer J, Okuyama MW, Serra R, Vargas A, Jewgenow K, **Braun BC**. 2015

Comparative analysis of intraluteal steroidogenic enzymes emphasises the functionality of fresh and persistent corpora lutea during pro- and metoestrus in the lynx.

1. Idee: Jewgenow, Braun

2. Versuchsplanung: Zschockelt, Jewgenow, Braun

3. Versuchsdurchführung: Zschockelt, Amelkina, Koster, Painer

4. Auswertung der Ergebnisse: Zschockelt, Koster, Jewgenow, Braun

5. Erstellung des Manuskripts: Zschockelt, Jewgenow, Braun

5.) Amelkina O, Zschockelt L, Painer J, Serra R, Villaespesa F, **Braun BC**, Jewgenow K. 2015.
Apoptosis-Related Factors in the Luteal Phase of the Domestic Cat and Their Involvement
in the Persistence of Corpora Lutea in Lynx.

1. Idee: Braun, Jewgenow
2. Versuchsplanung: Amelkina, Braun, Jewgenow
3. Versuchsdurchführung: Amelkina, Zschockelt, Painer, Braun
4. Auswertung der Ergebnisse: Amelkina, Braun, Jewgenow
5. Erstellung des Manuskripts: Amelkina, Braun, Jewgenow

6.) Amelkina O, Zschockelt L, Painer J, Serra R, Villaespesa F, Krause E, Jewgenow K, **Braun BC**. 2016

Progesterone, Estrogen, and androgen receptors in the corpus luteum of the domestic
cat, Iberian lynx (*Lynx pardinus*) and Eurasian lynx (*Lynx lynx*).

1. Idee: Jewgenow, Braun
2. Versuchsplanung: Amelkina, Braun
3. Versuchsdurchführung: Amelkina, Zschockelt, Painer, Krause, Braun
4. Auswertung der Ergebnisse: Amelkina, Krause, Jewgenow, Braun
5. Erstellung des Manuskripts: Amelkina, Jewgenow, Braun

7.) **Braun BC**, Jewgenow K. 2017

Expression of steroidogenic enzymes and steroid receptors in foetal gonads of domestic
cat -Sex similarities and differences.

1. Idee: Braun, Jewgenow
2. Versuchsplanung: Braun
3. Versuchsdurchführung: Braun, Jewgenow
4. Auswertung der Ergebnisse: Braun
5. Erstellung des Manuskripts: Braun, Jewgenow

8.) **Braun BC**, Okuyama MW, Dehnhard M, Müller K, Jewgenow K. 2018

Expression of steroidogenic enzymes and steroid receptors in testis of domestic cat (*Felis catus*).

1. Idee: Braun, Müller, Jewgenow

2. Versuchsplanung: Braun

3. Versuchsdurchführung: Braun, Okuyama, Dehnhard

4. Auswertung der Ergebnisse: Braun, Dehnhard, Müller, Jewgenow

5. Erstellung des Manuskripts: Braun, Müller, Jewgenow

Anhang

Im Kapitel 8 aufgeführte Arbeiten im Original

Publikation 1

Progesterone and Estradiol in cat placenta--biosynthesis and tissue concentration. **Braun BC**, Zschockelt L, Dehnhard M, Jewgenow K. J Steroid Biochem Mol Biol. 2012 Nov;132(3-5):295-302. doi: 10.1016/j.jsbmb.2012.07.005. Epub 2012 Jul 31.

<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2012.07.005>

Publikation 2

Corpora lutea of pregnant and pseudopregnant domestic cats reveal similar steroidogenic capacities during the luteal life span. Zschockelt L, Amelkina O, Siemieniuch MJ, Koster S, Jewgenow K, **Braun BC**. J Steroid Biochem Mol Biol. 2014 Oct;144 Pt B:373-81. doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.08.010. Epub 2014 Aug 17.

<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.08.010>

Publikation 3

The corpus luteum of the domestic cat: histologic classification and intraluteal hormone profile. Amelkina O, **Braun BC**, Dehnhard M, Jewgenow K. Theriogenology. 2015 Mar 1;83(4):711-20. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.11.008. Epub 2014 Nov 10.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.11.008>

Publikation 4

Comparative analysis of intraluteal steroidogenic enzymes emphasises the functionality of fresh and persistent corpora lutea during pro- and metoestrus in the lynx. Zschockelt L, Amelkina O, Koster S, Painer J, Okuyama MW, Serra R, Vargas A, Jewgenow K, **Braun BC**. J Steroid Biochem Mol Biol. 2015 Nov;154:75-84. doi: 10.1016/j.jsbmb.2015.07.001. Epub 2015 Jul 10.

<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.07.001>

Publikation 5

Apoptosis-Related Factors in the Luteal Phase of the Domestic Cat and Their Involvement in the Persistence of Corpora Lutea in Lynx. Amelkina O, Zschockelt L, Painer J, Serra R, Villaespesa F, **Braun BC**, Jewgenow K. PLoS One. 2015 Nov 24;10(11):e0143414. doi: 10.1371/journal.pone.0143414. eCollection 2015.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143414>

RESEARCH ARTICLE

Apoptosis-Related Factors in the Luteal Phase of the Domestic Cat and Their Involvement in the Persistence of *Corpora Lutea* in Lynx

Olga Amelkina^{1*}, Lina Zschockelt¹, Johanna Painer¹, Rodrigo Serra², Francisco Villaespesa³, Beate C. Braun¹, Katarina Jewgenow¹

1 Department of Reproduction Biology, Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research, Berlin, Germany, **2** Iberian lynx captive breeding program, Centro Nacional de Reprodução de Lince Ibérico, Silves, Portugal, **3** Iberian lynx captive breeding program, Centro de Cría de Lince Ibérico El Acebuche, Parque Nacional de Doñana, Huelva, Spain

* olga.amelkina@gmail.com



OPEN ACCESS

Citation: Amelkina O, Zschockelt L, Painer J, Serra R, Villaespesa F, Braun BC, et al. (2015) Apoptosis-Related Factors in the Luteal Phase of the Domestic Cat and Their Involvement in the Persistence of *Corpora Lutea* in Lynx. PLoS ONE 10(11): e0143414. doi:10.1371/journal.pone.0143414

Editor: Christine Wrenzycki, Justus-Liebig-Universität, GERMANY

Received: April 30, 2015

Accepted: November 4, 2015

Published: November 24, 2015

Copyright: © 2015 Amelkina et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All obtained sequences are available from the GenBank database (accession numbers KP826765, KP862666, KP294340, KP670850, KP670852, KP670853, KP670854, KP670851).

Funding: The work was supported by the German Research Foundation (DFG; Je 163/11-1; URL <http://www.dfg.de/en/>) and German Academic Exchange Service (DAAD; A/10/86242; <https://www.daad.de/en/>). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

The *corpus luteum* (CL) is a transient gland formed in the ovary after ovulation and is the major source of progesterone. In the Iberian and Eurasian lynx, CL physiologically persist after parturition and retain their capacity to produce progesterone, thus suppressing the ovarian activity. This unique reproductive characteristic has a big impact on the success of assisted reproduction techniques in the endangered Iberian lynx. The mechanisms behind CL persistence are not yet understood and require extensive studies on potential luteotropic and luteolytic factors in felids. Because the apoptosis system has been shown to be involved in structural regression of CL in many species, we aimed to investigate the capacity of perCL to undergo apoptosis. In addition, we performed initial studies on the apoptosis system in the luteal phase of the domestic cat. No previous research on this system has been made in this species. Our factors of interest included agents of the intrinsic apoptosis pathway, *i.e.*, pro-survival B-cell CLL/lymphoma 2 (BCL2) and pro-apoptotic BCL2-associated X protein (BAX), the executioner caspase-3 (CASP3), as well as of the extrinsic pathway, *i.e.*, pro-apoptotic receptor FAS, and tumor necrosis factor (TNF) and its receptors (pro-apoptotic TNFRSF1A and pro-survival TNFRSF1B). We analyzed the relative mRNA levels of these factors, as well as protein localization of CASP3 and TNF during stages of pregnancy and the non-pregnant luteal phase in CL of domestic cats. The same factors were investigated in freshly ovulated CL (frCL) and perCL of Iberian and Eurasian lynx, which were histologically analyzed. All factors were present in the CL tissue of both domestic cat and lynx throughout all analyzed stages. The presence of pro-apoptotic factors BAX, CASP3, FAS and TNFRSF1A in perCL of the Eurasian and Iberian lynx might indicate the potential sensitivity of perCL to apoptotic signals. The expression of pro-survival factors BCL2 and TNFRSF1B was significantly higher in perCL compared to frCL of studied Iberian lynx, suggesting the potential involvement of these factors in the structural integrity of perCL. In both Iberian lynx and pregnant and non-pregnant domestic cats, the expression of TNFRSF1A was significantly higher in forming CL compared to other stages, suggesting the conserved involvement of this factor in the tissue reorganization during formation of the

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

feline CL. The mRNA levels of *CASP3* and *TNFRSF1B* were highest during regression stages of domestic cat CL. The current study provides initial results on the possible involvement of the apoptosis system in the structure and function of the feline CL and in its physiological persistence.

Introduction

The *Lynx* genus includes four species that inhabit different parts of the world: the Eurasian lynx (*Lynx lynx*) in the broad range of Europe and Asia, the Canada lynx (*Lynx canadensis*) and the bobcat (*Lynx rufus*) in North America, and the Iberian lynx (*Lynx pardinus*) in the Iberian Peninsula. Eurasian, Canada and Iberian lynx are monoestrous, *i.e.*, mate only once in a year, with breeding seasons in January–April, February–April and January–February, respectively [1–4]. The bobcat is seasonally polyestrous and may ovulate up to three times during the breeding season [5].

All three monoestrous lynx species exhibit a unique reproductive characteristic associated with the *corpus luteum* (CL), a transient gland that forms in the ovary after ovulation and supports pregnancy *via* its production of progesterone [6]. It has been widely shown among different species that, in the event of a non-pregnant cycle or at the end of pregnancy, the CL regresses from the ovarian tissue and a new cycle is initiated [7, 8]. However, the situation is markedly different for the lynx. Studies on the lynx ovarian cycle revealed the presence of CL outside the reproductive season in Iberian and Eurasian lynx [9]. More recent findings indicate that CL of the Eurasian lynx morphologically persist in the ovary for at least two years [10]. Furthermore, such persistent CL (perCL) continue to produce progesterone and thus exhibit functional persistence, leading to a stage called prolonged diestrus between cycles [10, 11]. Studies on the Canada lynx also suggest a similar luteal pattern, based on constant fecal progesterone concentrations [1]. The bobcat seems to exhibit morphological persistence of CL, however, their functional condition still needs to be investigated [12, 13]. To summarize, CL persist morphologically and functionally after parturition and weaning in all three monoestrous lynx species: Iberian, Eurasian and Canada lynx.

There is as yet no certainty about the role of perCL in lynx reproduction, nor are there any reports so far on the possible molecular mechanisms involved. It has been hypothesized that perCL may be advantageous in lynx species by supporting subsequent pregnancies as additional sources of progesterone [14] and/or by securing a monoestrous cycle *via* progesterone suppression of ovarian activity [15]. Such suppression of any late ovulations would ensure the birth and weaning of cubs during the most favorable time of the year [10]. It is unclear how the monoestrous lynx enters a new ovarian cycle every year despite the constant presence of active perCL and, therefore, it is not possible to design any protocols of ovulation induction for these species. An attempt to overcome the CL persistence by administering a commonly luteolytic prostaglandin $F_{2\alpha}$ led to a temporary decrease in progesterone concentration, but structurally perCL remained in the ovary [16]. The lynx unique reproductive characteristic, therefore, makes standard protocols for assisted reproduction inapplicable in monoestrous lynx and may critically lower the success of breeding programs for these species. This greatly affects the Iberian lynx, which until recently had been listed as critically endangered by the International Union for Conservation of Nature [17] and for which extensive genetic studies revealed a high extinction risk of the two remaining populations [18, 19]. To support and restore wild populations of the Iberian lynx, a captive breeding program has been initiated in the centers of Spain

and Portugal with ongoing breeding and reintroduction of animals [20]. Unraveling the function and regulation of perCL, and particularly the mechanisms of its regression, could enhance the performance of captive breeding programs and offer more opportunities for the Iberian lynx survival.

The research on the lynx or any other wild felid is complicated by the limited access to these species. The sampling of reproductive tissue is rare and depends heavily on a chance, be it *post-mortem* sampling after legal hunting or natural/accidental death of an animal, or an ovariohysterectomy of captive lynx for medical and management reasons. Because of this, the more accessible felid, domestic cat (*Felis catus*), becomes an irreplaceable model species. The domestic cat is seasonally polyestrous, and after ovulation queens can either enter a period of pregnancy (approximately 65 days [21]) or a non-pregnant luteal phase (approximately 40 days [22]). In both scenarios, elevated serum and intraluteal progesterone concentrations decrease towards the end of the luteal phase, allowing initiation of a subsequent ovarian cycle [23, 24]. Molecular studies on the domestic cat CL have been limited to the investigation of enzymes of the luteal steroidogenesis system [25]. To contribute to the knowledge on the mechanisms behind formation, maintenance and regression of the feline CL, we initiated a detailed molecular study on potential luteotropic and luteolytic factors in the domestic cat [26] and lynx [27]. In the present work, we focus on the mechanisms of structural regression of the CL in the domestic cat and in two species of lynx, Iberian and Eurasian.

Luteal regression (luteolysis) is commonly required for the initiation of a new follicular cycle. The literature distinguishes between two aspects of luteolysis, functional and structural, with the first condition usually preceding the latter one [8]. Both aspects of luteolysis are governed by species-specific luteal factors, however, structural luteal regression *via* apoptosis-related factors is common to most of the species studied to date [7, 28–30]. Apoptosis, or programmed cell death, can be divided into intrinsic and extrinsic pathways. The intrinsic signaling cascade is generally activated by apoptotic stimuli within a cell. Members of the B-cell CLL/lymphoma 2 (Bcl-2) family transduce the signal within the cell by alterations in the mitochondrial outer membrane (MOM): *e.g.*, the pro-apoptotic factor BCL2-associated X protein (BAX) resides in the cytosol or on MOM itself and, once activated by the BH3-only proteins and oligomerized, creates permeability of the MOM [31, 32]. This permeability leads to release of cytochrome c from the inner mitochondrial membrane and thus causes activation of caspase-3 (CASP3) which, through cleavage of essential proteins, executes the final step of cell death [33]. The pro-survival factor BCL2 can inhibit the death signal *via* translocation of BAX from MOM, or by sequestering BH3-only proteins and preventing them from activating BAX, or by binding to activated BAX and preventing its oligomerization [31]. All the mentioned factors were shown to be involved in luteolysis in rodents, cattle and primates [34–39].

The extrinsic signaling cascade is activated by extracellular signals *via* cytokines, which include members of the tumor necrosis factor (TNF) super family, *e.g.*, TNF (also known as TNF superfamily, member 2 and TNF-alpha) and Fas ligand, and their cell surface receptors, *e.g.*, TNF receptor superfamily, member 1A (TNFRSF1A; previously known as TNFR1), TNFRSF1B (previously known as TNFR2) and Fas cell surface death receptor (FAS; also known as CD95) [40]. The FAS/Fas ligand system is known to transduce the death signal *via* protease cascade and was shown to be required for luteolysis in many species [41–44]. Another cytokine, TNF, exhibits pleiotropic signals in the CL tissue and its action might be dependent on its concentration, the local environment, the stage of the cycle and the type of receptor it binds to [43, 45–47]. While TNFRSF1A contains the death domain and can transduce the death signal, in contrast, TNFRSF1B does not possess the death domain and can act as a pro-survival factor [40, 48, 49]. Presented list of factors was found to play an important role throughout the luteal phase of many species, including representatives of rodents, cattle and

primates [42, 48–53]. Both intrinsic and extrinsic pathways lead to activation of the caspase family, *i.e.*, caspase-9 and -8 respectively, and subsequently the final executioners caspase-3, -6 and -7 [54]. Short description of each factor can be found in Table 1.

We had three hypotheses that might explain the prolonged structural integrity of perCL in lynx: (i) either CL persist due to their limited capacity to undergo apoptosis; or (ii) there is no luteolytic signal and, therefore, no activation of the apoptotic cascade; or (iii) the transducing luteolytic signal is blocked on the downstream of the apoptotic cascade. To study these potential mechanisms, we aimed to first investigate the capacity of perCL to undergo apoptosis. As a necessary basis, we studied the involvement of selected apoptosis-related factors, *i.e.*, *BCL2*, *BAX*, *CASP3*, *FAS*, *TNFRSF1A*, *TNFRSF1B* and *TNF*, in the luteal phase of the domestic cat. Then, we analyzed the presence of these factors in perCL of Iberian and Eurasian lynx and compared the capacity of freshly ovulated (fr) CL and perCL to express them in the Iberian lynx.

Materials and Methods

All chemicals in the study were purchased from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany), unless stated otherwise and were of the highest purity available.

2.1 Ethics statement

The methods applied, and the study-design, were approved by the Internal Committee for Ethics and Animal Welfare of the Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research in Berlin, Germany (Permit numbers: 2010-10-01 and 2011-01-01). The Norwegian Experimental Animal Ethics Committee approved the collection of the ovarian tissue from hunted animals (Permit number: 2010/161554). The tissue from late pregnancy castration of domestic cats were obtained from the Institute of Animal Reproduction and Food Research of the Polish Academy of Sciences, Olsztyn, Poland, and all procedures were approved by the Local Animal Care and Use Committee in Olsztyn, Poland (No. 41/2007/N and 61/2010/DTN).

2.2 Animals and tissue collection

Ovaries of domestic cats were obtained from local animal shelters and clinics after ovariohysterectomy for the purpose of permanent contraception. The reasons to perform ovariohysterectomy were not related to the study. Samples were transported in MEM-HEPES medium, supplemented with 3 mg/mL BSA (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) and 1x Antibiotic Antimycotic Solution. Transportation was at 4°C, and ovaries were processed immediately after arrival at the laboratory (2–4 hours after surgery). The isolation process and consequent staging of CL is described in Amelkina *et al.* [24]. In brief, CL from each cat were either fixed in Bouin's solution for histologic analysis or plunged into liquid nitrogen for RNA isolation. In the case of pregnancy, the day was assessed by the diameter of the gestation chamber [55], the crown-rump length of a foetus [56] or by the stage of a pre-implantation embryo [57]. The pre-implantation period (n = 6) included samples from days 2 to 6 and day 10 *post-coitum*; the post-implantation period (n = 11) included samples from days 14 to 36 *post-coitum*; finally, the CL regression stage (n = 5) was represented by samples from days 38, 39, 48 and week 9 *post-coitum*. The absence of embryos in the oviducts or uteri indicated a non-pregnant luteal phase. In such cases, based on their histologic appearance, each CL was classified as the stage of: formation (n = 9), development/maintenance (n = 13), early regression (n = 14), late regression (10) or *corpus albicans* (CA; n = 4). The histologic classification is described in detail in Amelkina *et al.* [24] and includes parameters of: cell shape, type and degree of vacuolation, nucleus

Table 1. List of analyzed factors, sequences of PCR primers used for sequence analysis and expression studies, annealing temperatures, and product sizes. bp, base pair; fw, forward; rv, reverse; T_A, annealing temperature; a, used for sequence analysis; b, used for gene expression studies. Intrinsic/extrinsic pathway refers to the apoptosis pathways

Factor	Short description	GenBank ID	Species	Primer sequence 5'–3'	T _A (°C)	Product size (bp)	Use
<i>BCL2</i>	Bcl-2 family, intrinsic pathway	DQ926871.1 KP826765*	<i>Felis catus</i> / <i>Lynx pardinus</i>	<i>BCL2</i> Fw: GAG ATG TCC AGC CAG CTGB <i>BCL2</i> Rv: TAG GCA CCC AGG GTG ATG	53	365	a
	pro-survival function			<i>BCL2</i> qFw: GGA GGA TTG TGG CCT TCT <i>BCL2</i> qRv: GGT TCA GGT ACT CAG TCA TCC AC	54.5	143	b
<i>BAX</i>	Bcl-2 family, intrinsic pathway	DQ926869.1 KP862666*	<i>Felis catus</i> / <i>Lynx pardinus</i>	<i>BAX</i> Fw: CAG CTC TGA GCA GAT CAT GBAX Rv: TGG TGG CCT CAG CCC ATC T	53	595	a
	pro-apoptotic function			<i>BAX</i> qFw: CCG ATG GCA ACT TCA ACT GGGBAX qRv: GAT GGT CAC TGT CTG CCA CGT C	63	244	b
<i>CASP3</i>	protease, intrinsic pathway	NM_001009338.1 KP294340*	<i>Felis catus</i> / <i>Lynx pardinus</i>	<i>CASP3</i> Fw: GTG TGC GTT AGA AGT ACCCASP3 Rv: GTT CTT TTG TGA GCA TAG ACA	53	836	a
	executioner function			<i>CASP3</i> qFw: ACC GGC AAA CCC AAA CTCCASP3 qRv: CTG ACA GGC GAT GTC ATC C	60.5	91	b
<i>FAS</i>	cytokine receptor, extrinsic pathway	NM_001009314.1 KP670850*	<i>Felis catus</i> / <i>Lynx pardinus</i>	<i>FAS</i> Fw: CCG TTG GCT GAT ACT TAC CFAS Rv: CGT GTT TGC AGT TTC CAT TC	53	952	a
	generally pro-apoptotic function			<i>FAS</i> qFw: GAA CGC TAC CGA AGG GGAFAS qRv: GTC GGC AGC TTT TCG TGT	59.5	100	b
<i>TNFRSF1A</i>	cytokine receptor, extrinsic pathway	NM_001009361.1 KP670852*	<i>Felis catus</i> / <i>Lynx pardinus</i>	<i>TNFRSF1A</i> Fw: GCA GGA AGA ACC AGT ACC GGT <i>TNFRSF1A</i> Rv: CCG TTC TGC AGC TCC AGC C	53	846	a
	pro-apoptotic function			<i>TNFRSF1A</i> qFw: AGA GTG TAC GAA GTT GTG CGT <i>TNFRSF1A</i> qRv: AGC TTG GAC TTC CGC CGT T	60.5	159	b
<i>TNFRSF1B</i>	cytokine receptor, extrinsic pathway	KP670853* KP670854*	<i>Felis catus</i> / <i>Lynx pardinus</i>	<i>TNFRSF1B</i> Fw: CGC CCG GGC TTC GGC GTT <i>TNFRSF1B</i> Rv: CTT GGA GAA GGG GAC CTG CT	53	799	a
	pro-survival function			<i>TNFRSF1B</i> qFw: AGC AGC TCC CTG GAG AGC <i>TNFRSF1B</i> qRv: GTG ACA TTG ACC TGG GTC C	60.5	168	b
<i>TNF</i>	cytokine, extrinsic pathway	NM_001009835.1 KP670851*	<i>Felis catus</i> / <i>Lynx pardinus</i>	<i>TNF</i> Fw: CAT GAG CAC TGA AAG CAT GATNF Rv: TCA CAG GGC AAT GAT CCC A	53	703	a
	pleiotropic effects			<i>TNF</i> qFw: AGA GCT CCC ACA TGG CCT <i>TNF</i> qRv: GGC TCA GCC ACT GGA GTT	59.5	137	b

* GenBank sequences were obtained in this study

doi:10.1371/journal.pone.0143414.t001

condition, and the ratio of non-steroidogenic to luteal cells. Listed n-values represent the number of animals per analyzed stage; each animal is represented by one CL.

Ovaries of Iberian lynx were collected in the scope of the Iberian lynx captive breeding program at the Centro de Cría de Lince Ibérico El Acebuche, Parque Nacional de Doñana, Huelva, Spain and Centro Nacional de Reprodução do Lince Ibérico, Silves, Portugal. Two animals were ovariectomized for permanent contraception seven days after ovulation was

induced by natural mating in February, 2013. Ovariohysterectomy was initiated due to the medical conditions of animals (repeated caesarean sections and mammary tumor risk) and was not related to the study. In one animal (Iberian lynx 1, nine years old), embryos were flushed from the uterus, indicating the pre-implantation stage of pregnancy. Unfertilized oocytes were flushed from the second animal (Iberian lynx 2, eleven years old), thus indicating a non-pregnant luteal phase. The CL were isolated immediately after surgery and their morphological appearance was noted. The presence of ovulation scars allowed distinguishing CL of fresh ovulation (frCL) from CL of previous cycle/s (perCL), supplemented later by histologic analysis of both types (see [Results](#)). Each CL was dissected and pieces were fixed in Bouin's solution (for histologic analysis) or placed in RNA-later solution (RNA isolation; Qiagen GmbH, Hilden, Germany) or liquid nitrogen (hormone analysis).

Ovaries of free-ranging Eurasian lynx were collected freshly *post-mortem* from animals hunted legally during the national hunting quota for management purposes in Norway (n = 5 animals). The period of collection was the beginning of the breeding season prior to mating (February, 2011; the breeding season for Eurasian lynx in Norway is February to early April [2]). After dissection, samples were immediately fixed in Bouin's solution (for histologic analysis) or placed in RNA-later (RNA isolation) or Allprotect Tissue Reagent (hormone analysis; Qiagen GmbH, Hilden, Germany) solutions. Based on the pre-breeding period of collection and the absence of frCL, embryos and placental scars of a recent pregnancy, all isolated CL were classified as perCL from previous cycle/s.

To demonstrate the steroidogenic activity of the isolated CL, intraluteal concentrations of progesterone and estrogens were determined for Iberian and Eurasian lynx by enzyme immunoassay per wet weight of CL, as described and validated previously [11, 24].

2.3 RNA isolation and cDNA synthesis

Up to 26 mg of CL tissue was homogenized in homogenization tubes (100 μ l RNA lysis buffer, 1.4/2.8 mm ceramic beads) at 5000 rpm for 2 x 25 sec (Precellys 24 homogenizer, Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France). Total RNA was extracted using the innuSPEED Tissue RNA/innuPREP DNase I Digest Kit (Analytik Jena AG, Jena, Germany). The NanoDrop ND-1000 (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) was used to assess the concentration and purity of isolated RNA. Additional control of RNA quality and integrity was performed *via* microfluidic analysis using the Bioanalyzer (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Boeblingen, Germany); RNA integrity number (RIN) values were above 7.0 for cat samples and above 6.1 for Iberian and Eurasian lynx samples. From 1 to 2.5 μ g of isolated RNA was reverse transcribed into single-stranded (ss) cDNA using the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA). No reverse transcriptase was added to the negative control to verify the absence of genomic DNA contamination.

2.4 Sequencing

Primers for the polymerase chain reaction (PCR) were purchased from BioTeZ Berlin Buch GmbH (Berlin, Germany) and were designed based on *Felis catus* gene sequences listed in NCBI database (see accession numbers in [Table 1](#)). The NCBI-sequence for *TNFRSF1B* was only predicted by automated computational analysis (XM_003989583.2) and thus it was analyzed in this study too. Primer information is listed in [Table 1](#). Based on feline ss cDNA templates of luteal, ovarian or placental origin, partial cat and lynx cDNA sequences were amplified using the Expand High FidelityPLUS PCR system (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Germany), as described by Braun *et al.* [58]. For both cat and lynx, the PCR conditions were: 94°C for 2 min; followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 45 sec,

annealing at 53°C for 45 sec, elongation at 72°C for 80 sec; and final elongation at 72°C for 7 min. Purified PCR products were ligated to the pJET 1.2 vector (Thermo Fisher Scientific) and transfected in JM109 cells (Promega GmbH, Mannheim, Germany) for cat *CASP3*, *FAS* and *TNF* or ligated to the pCR4-TOPO TA vector and transfected in TOP10 cells (both Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) for lynx *CASP3*, *FAS*, *TNF* and cat/lynx *TNFRSF1A* and *TNFRSF1B*. Positive clones or purified PCR products (*BCL2* and *BAX*) were sequenced by the Services in Molecular Biology GmbH (Dr M. Meixner, Brandenburg, Germany).

2.5 Quantitative real-time PCR

Primers for quantitative real-time PCR (qPCR) were based on cat and lynx sequences identified in this study (Table 1). The qPCR was performed using the CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany), as published by Braun *et al.* [59]. In brief, diluted ss cDNA (4 µl, corresponding to 2 or 10 ng of total RNA for genes of interest, or 4 ng for reference genes) were analyzed in a 10 µl reaction volume including SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad Laboratories GmbH). The qPCR conditions were: 98°C for 2 min and 40 cycles of 8 sec at 98°C and 8 sec at different annealing temperatures (Table 1). Quantification of qPCR products was performed using the CFX Manager Software 1.6 (Bio-Rad Laboratories GmbH). Serial dilutions of plasmid DNA were used for calibration. Glutaminase (*GLS*; for domestic cat, JQ424891), TATA box binding protein (*TBP*; for domestic cat, JQ424890; for lynx, JX993351), β-actin (*BACT*; for domestic cat, AB051104; for lynx, KM458620), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*; for lynx, KM458621) and ribosomal protein S7 (*RPS7*; for lynx, JX993349) were validated as optimal reference genes in feline CL with the qbasePLUS software (Biogazelle, Zwijnaarde, Belgium; [60]) and were used for normalization. A multiple normalization factor was calculated for individual CL referring to Vandesompele *et al.* [61].

2.6 Histologic analysis of CL and protein localization

Tissues fixed in Bouin's solution were dehydrated, embedded in paraffin following standard procedures and sectioned at 3 µm. Subsequent histologic evaluation was performed under a light microscope fitted with a digital camera (Jenoptik ProgRes C3, Jena, Germany).

To determine the histomorphological state of CL, samples from Iberian and Eurasian lynx were routinely stained with haematoxylin and eosin. The histomorphological analysis of cat samples was performed in our previous study [24].

The localization of CASP3 protein in luteal tissue was assessed by an affinity-purified rabbit anti-human/mouse CASP3 reactive antibody (Cat. AF 835; R&D Systems, Wiesbaden, Germany), used in a previous study on the domestic cat [62]. According to the manufacturer, this antibody recognizes an active form of CASP3. Localization of TNF protein was assessed by a goat polyclonal anti-human TNF antibody (Cat. No. sc-1350; Santa Cruz Biotechnology, Dallas TX, USA). Immunohistochemistry was performed as described in Braun *et al.* [58]. In brief, sectioned CL tissue mounted on microscope slides (Superfrost Plus, Thermo Scientific, Braunschweig, Germany) was deparaffinized in Roti-Histol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) and rehydrated in decreasing concentrations of ethanol. Slides were subsequently incubated in boiling citrate buffer (11 mM, pH 6.0) for 15 min and in 3% H₂O₂/methanol solution for 10 min. Then, sections were blocked with 5% BSA in PBS for 1 h at 37°C. Antibody against CASP3 was diluted in PBS 1:500; antibody against TNF was diluted in 1% BSA in PBS 1:200. Sections were subsequently washed with PBS-Tween 0.1%, incubated with either peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse EnVisionC reagent (ready to use solution; Dako Agilent Technologies, Glostrup, Denmark) for 1 h at 23°C and colour-detected with diaminobenzidine

(DAB) substrate chromogen solution (Dako Agilent Technologies). Finally, sections were counterstained with hematoxylin, dehydrated in increasing concentrations of ethanol, and covered with mounting medium and coverslips.

2.7 Statistical analysis

Statistical analysis was performed with the R software package (R: A language and environment for statistical computing, version 3.0.0, Vienna, Austria). For the domestic cat, the Kruskal-Wallis rank sum test was used to determine changes in relative mRNA levels throughout pregnant and non-pregnant luteal phases. The Wilcoxon rank sum test was used for *post-hoc* pairwise comparison of stages (P-value adjustment: Benjamini-Hochberg). Each animal was represented by one CL. Numbers of animals per stage can be found above in 2.2. The stage of CA was not included in the statistical analysis, because its origin (pregnant or non-pregnant luteal phase) in the ovary was unknown. For Iberian lynx, the Mann-Whitney U-test was used to determine changes in relative mRNA levels between frCL and perCL in each animal. Sample size for Iberian lynx was the following: Iberian lynx 1, $n = 3$ for frCL and $n = 8$ for perCL; Iberian lynx 2, $n = 5$ for frCL and $n = 6$ for perCL. Probability (P) values less than 0.05 were considered statistically significant. SigmaPlot 10.0 (Systat Software Inc., San Jose CA, USA) was used to visualize the statistical results *via* boxplots.

Results

In this study, we obtained partial feline gene sequences for the analyzed factors ([Table 1](#)).

3.1. Domestic cat

3.1.1 Pregnancy. Throughout the pregnant luteal phase, no significant changes were observed in mRNA levels of *BCL2*, *BAX*, *CASP3* and *TNF* ([Fig 1A–1C/1G](#)). Relative *FAS* mRNA levels were higher during CL regression compared to the post-implantation period ($P = 0.026$; [Fig 1D](#)). Gene expression of TNF receptors changed significantly during pregnancy: *TNFRSF1A* ([Fig 1E](#)) relative mRNA levels were higher during the pre-implantation period compared to post-implantation ($P = 0.0019$) and CL regression ($P = 0.013$); *TNFRSF1B* ([Fig 1F](#)) relative mRNA levels were higher during CL regression compared to post-implantation ($P = 0.055$).

3.1.2 Non-pregnant luteal phase. Throughout the non-pregnant luteal phase, relative mRNA levels of *BCL2*, *CASP3*, *TNFRSF1A* and *TNFRSF1B* changed significantly, while no significant changes were observed for *BAX*, *FAS* and *TNF* ([Fig 1](#)). For *BCL2* ([Fig 1A](#)), relative levels of mRNA changed throughout the luteal phase ($P = 0.017$), but no significance was found in the *post-hoc* comparison. For *CASP3* ([Fig 1C](#)), relative mRNA levels during CL formation were lower compared to early regression ($P = 0.0014$) and late regression ($P = 0.0038$). Relative mRNA levels of *TNFRSF1A* ([Fig 1E](#)) were higher during CL formation compared to development/maintenance ($P = 0.00023$), early regression ($P = 0.0013$) and late regression ($P = 0.00023$). Finally, relative mRNA levels of *TNFRSF1B* ([Fig 1F](#)) during CL early regression were higher than during development/maintenance ($P = 0.028$).

The immunohistochemistry assay localized active *CASP3* in luteal cells. The pattern differed individually for each animal and overall the expression of *CASP3* protein could be found in at least one sample of every stage analyzed ([Fig 2A–2D](#)), except for CA ([Fig 2E](#)). Non-steroidogenic cells, presumably macrophages, were the only cells stained for TNF antibody in the CL ([Fig 2F](#)). The staining was rare and consistent with the results on mRNA level.

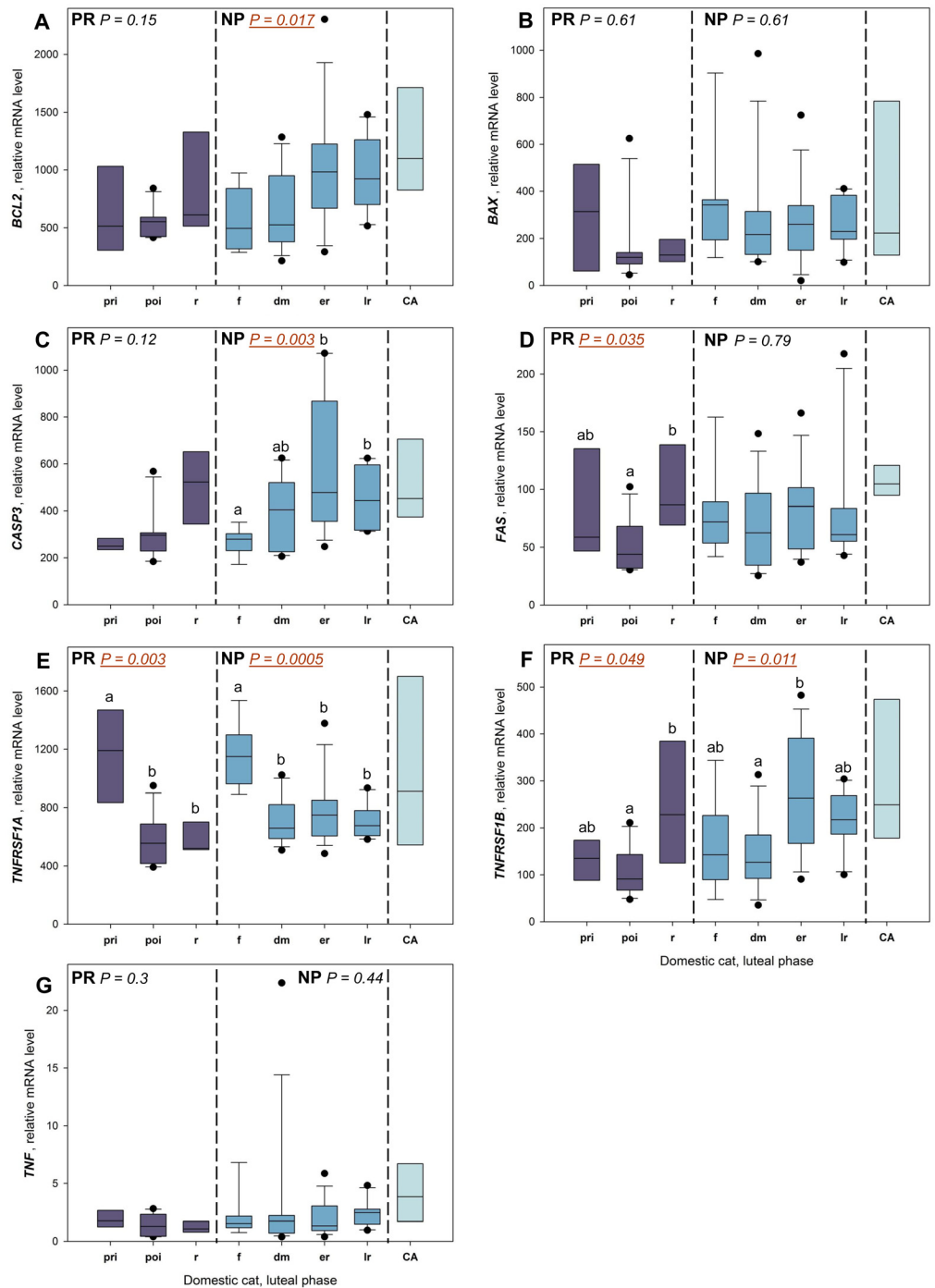


Fig 1. Intraluteal relative mRNA levels during pregnant and non-pregnant luteal phases in the domestic cat. Box plots depict the distribution of data; whiskers indicate maximum and minimum values; black dots indicate outliers; horizontal lines indicate the median; P-values are calculated from the Kruskal-Wallis rank sum test; letters (a, b) identify significant differences between stages and are calculated from *post-hoc* pairwise comparisons (P-value adjustment: Benjamini-Hochberg). PR: pregnancy; NP: non-pregnant luteal phase; pri: pre-implantation period; poi: post-implantation period; r: regression; f: formation; d/m: development/maintenance; er: early regression; lr: late regression; CA: *corpus albicans*.

doi:10.1371/journal.pone.0143414.g001

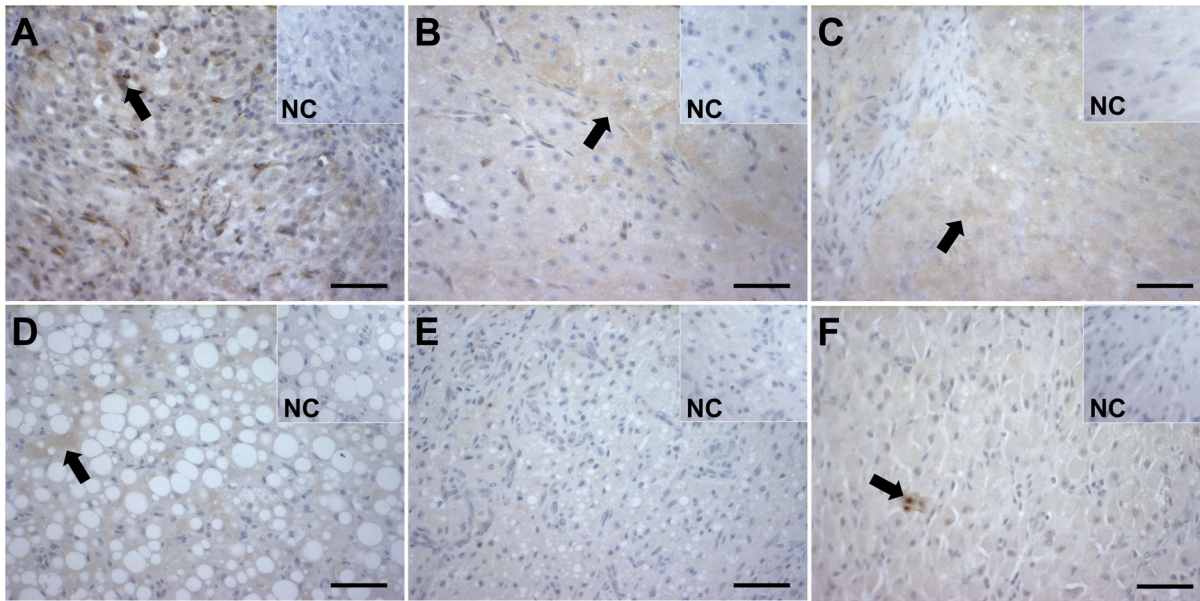


Fig 2. Immunohistochemical localization of CASP3 and TNF proteins in CL of the domestic cat. Active CASP3 was localized in luteal cells at the stages of: CL formation (A), development/maintenance (B), early regression (C) and late regression (D). The protein expression was consistently present throughout the CL life span, except for CA (E). TNF protein expression was identified in non-steroidogenic cells, presumably macrophages, but not in luteal cells (F). Arrows indicate positive staining. NC: negative control. Scale bar– 50 μm.

doi:10.1371/journal.pone.0143414.g002

3.2. Lynx

3.2.1 Iberian lynx, frCL vs. perCL post-mating. During dissection of ovaries, two types of CL could be clearly distinguished: frCL from a current ovulation and perCL from previous cycle/s (Fig 3). Fresh CL were paler and bigger than perCL and had an ovulation scar on their surface; perCL were smaller, darker and partly located inside of the ovary. Subsequent histologic analysis of these CL revealed a stage of formation for frCL and a stage of development/maintenance for perCL (Fig 4A and 4B). The formation stage of frCL exhibited processes of tissue reorganization, where predominantly small luteinizing cells varied in shape and size. The

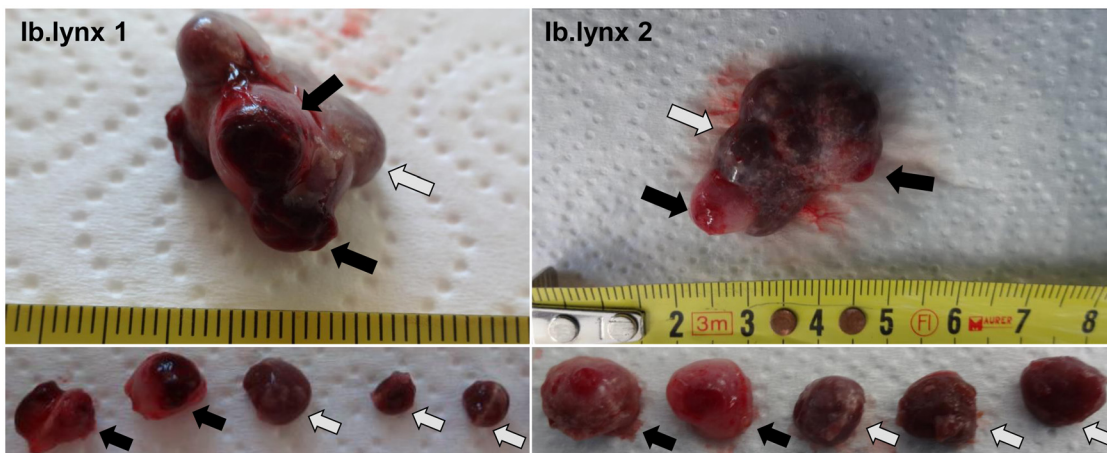


Fig 3. Morphological appearance of the Iberian lynx ovary. Ovaries of the Iberian lynx 1 and 2 (Ib.lynx 1 and Ib.lynx 2, respectively), containing frCL and perCL. Black arrows indicate frCL with ovulation scars, gray arrows indicate perCL from previous cycle/s. Scale–mm.

doi:10.1371/journal.pone.0143414.g003

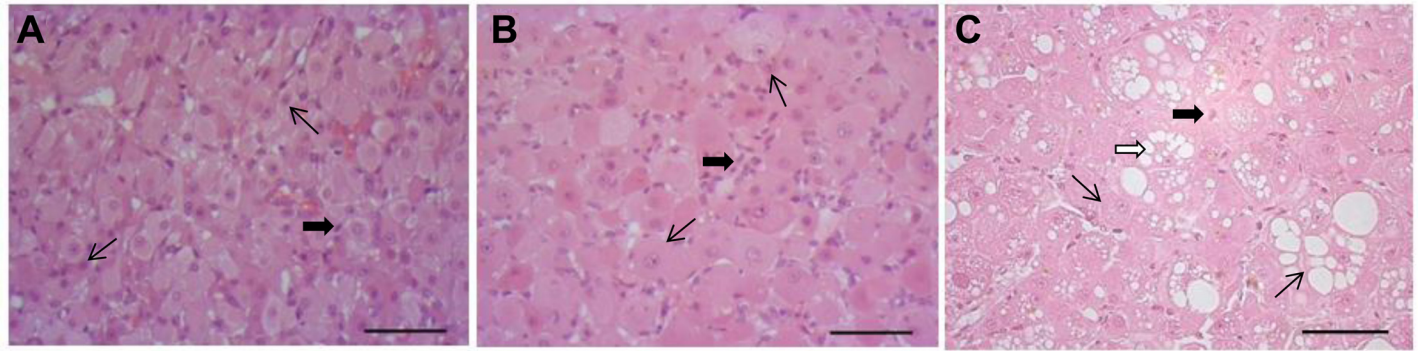


Fig 4. Haematoxylin and eosin stained sections of CL of Iberian and Eurasian lynx. A. Formation of the CL in Iberian lynx: frCL, seven days after natural mating. B. Maintenance of the CL in Iberian lynx: perCL of previous cycle/s after mating. C. Signs of regression in the CL of pre-mating Eurasian lynx: perCL of previous cycle/s during breeding season. Thin arrows indicate luteal cells. Thick black arrows indicate non-steroidogenic cells. White arrows indicate coarse vacuolation. Scale bar—50 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0143414.g004

development/maintenance stage of perCL showed no signs of tissue regression; luteal cells were large and polyhedral, exhibiting fine vacuolation. The histomorphological analysis was done with reference to the established histologic staging on the domestic cat [24]. Hormone analysis revealed very high concentrations of estrogens in frCL of Iberian lynx and maintained concentrations of progesterone in perCL (Table 2).

All the factors examined were expressed in frCL and perCL of Iberian lynx. Relative mRNA levels of *BCL2* ($P = 0.012$, Iberian lynx 1; $P = 0.0043$, Iberian lynx 2; Fig 5A), *FAS* ($P = 0.048$, Iberian lynx 1; $P = 0.0086$, Iberian lynx 2; Fig 5D), *TNFRSF1B* ($P = 0.01$, Iberian lynx 1; Fig 5D) and *TNF* ($P = 0.02$, Iberian lynx 1; Fig 5G) were all higher in perCL compared to frCL (Fig 5). Relative mRNA levels of *TNFRSF1A* were higher in frCL compared to perCL ($P = 0.01$, Iberian lynx 1; $P = 0.004$, Iberian lynx 2; Fig 5E). In both animals, no significant changes in relative mRNA levels of *BAX* and *CASP3* were observed (Fig 5B/5C).

Active *CASP3* protein could not be localized in the analyzed CL tissue (example of negative staining in Fig 6A). Staining for *TNF* protein was observed in non-steroidogenic cells, presumably macrophages, in both types of CL, but also in some transforming cells of frCL (Fig 6B and 6C).

3.2.2 Eurasian lynx, perCL in breeding season before mating. Histomorphological analysis of perCL in Eurasian lynx revealed signs of luteal regression: coarse vacuolation could be observed across the luteal tissue (Fig 4D). This state was comparable to the histologic stage of early regression in domestic cat [24]. No CA stage of CL was observed. Concentrations of progesterone and estrogens were present in the luteal tissue (Table 2). All the factors examined were expressed in perCL of Eurasian lynx, including *BCL2* (relative mRNA level

Table 2. Intraluteal concentrations of estrogens and progesterone in Iberian and Eurasian lynx. Intraluteal concentrations of estrogens and progesterone in the domestic cat can be found in Amelkina et al [24]

Animal	Type of CL (n)	Estrogens, ng/gmean \pm SD	Progesterone, μ g/gmean \pm SD
Iberian lynx 1	frCL (2)	6267.1, 5688.9	38.9, 31.8
	perCL (4)	241 \pm 35	19.6 \pm 5
Iberian lynx 2	frCL (3)	6517.6 \pm 3795.3	20 \pm 8.4 5
	perCL (4)	211.3 \pm 201	16.3 \pm 1.4
Eurasian lynx, n = 5	perCL (8)	10.1 \pm 10.1	9.9 \pm 5.8

doi:10.1371/journal.pone.0143414.t002

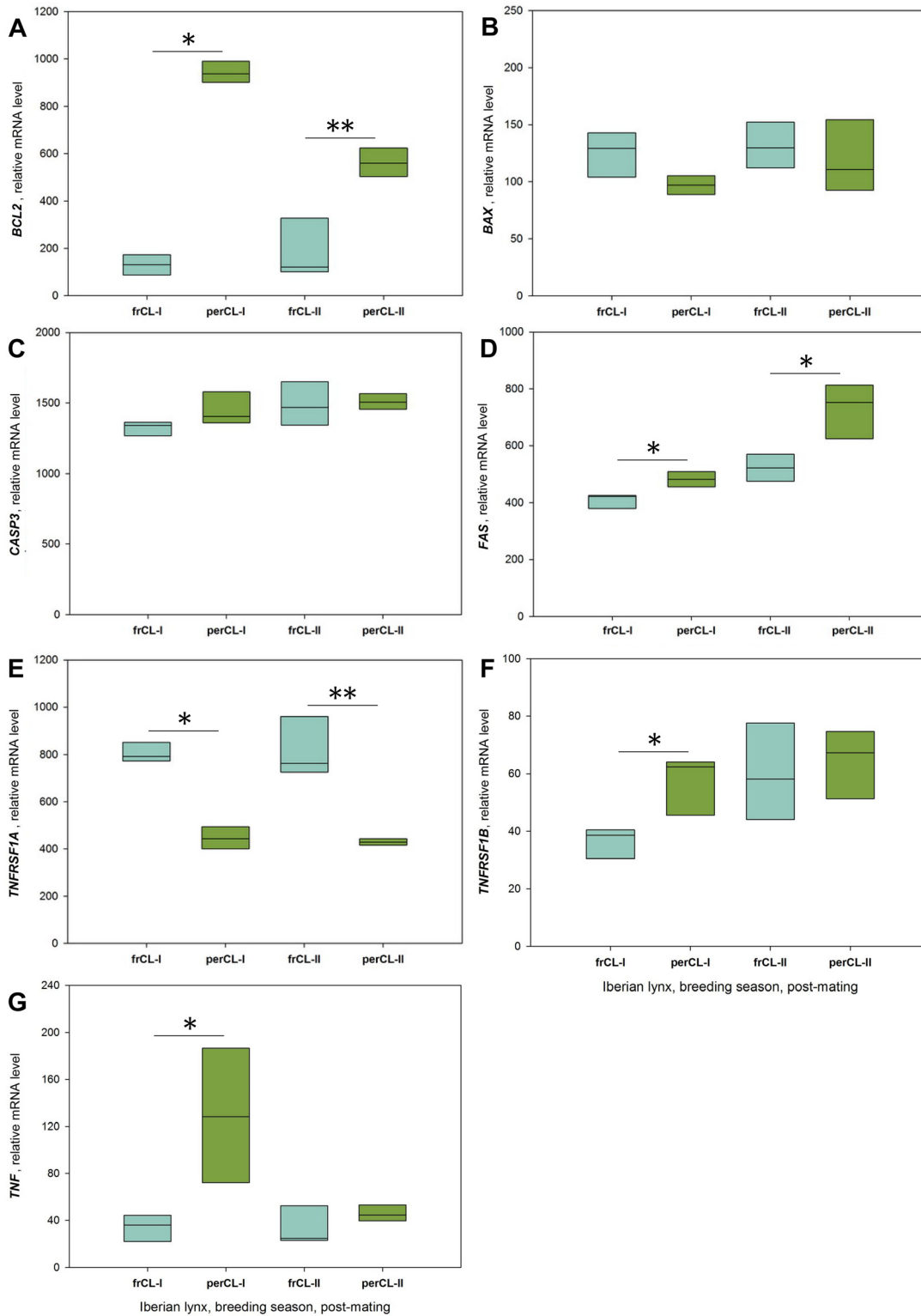


Fig 5. Intraluteal relative mRNA levels during the breeding season in post-mating Iberian lynx. Box plots depict the distribution of data; horizontal lines indicate the median. frCL-I/II: frCL from Iberian lynx 1/2; perCL-I/II: perCL from Iberian lynx 1/2 * P < 0.05, ** P < 0.005; Mann-Whitney U-test.

doi:10.1371/journal.pone.0143414.g005

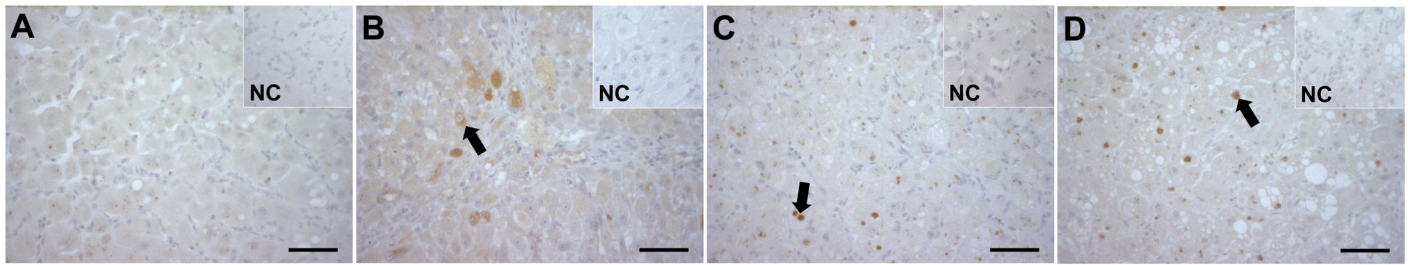


Fig 6. Immunohistochemical localization of CASP3 and TNF proteins in CL of Iberian and Eurasian lynx. A. Negative staining for active CASP3 in lynx CL tissue. B. frCL of Iberian lynx; strong staining for TNF protein in transforming cells (arrows). C. perCL of Iberian lynx; staining for TNF protein in non-steroidogenic cells, presumably macrophages (arrows). D. perCL of Eurasian lynx; staining for TNF protein in non-steroidogenic cells, presumably macrophages (arrows). Staining of droplets within the cells is unspecific. NC: negative control. Scale bar– 50 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0143414.g006

726.4 \pm 365.8), *BAX* (relative mRNA level 132.0 \pm 46.9), *CASP3* (relative mRNA level 1092.3 \pm 109.4), *FAS* (relative mRNA level 562.9 \pm 193.7), *TNFRSF1A* (relative mRNA level 458.2 \pm 115.2), *TNFRSF1B* (relative mRNA level 62.9 \pm 33.1) and *TNF* (relative mRNA level 44.1 \pm 19.0). Active CASP3 protein could not be localized in the analyzed CL tissue (example of negative staining in Fig 6A). Strong staining for TNF protein was identified in non-steroidogenic cells, presumably macrophages (Fig 6D).

Discussion

Apoptosis has been shown to be highly involved in tissue remodeling during development and regression of the CL in a variety of species [8, 63], but no research has been done in the feline luteal phase. In our study, the mRNA of all factors analyzed was present in the CL tissue of domestic cat and lynx throughout all stages. We showed a significant change in the expression of *BCL2*, *CASP3*, *TNFRSF1B* and *FAS* throughout luteal stages in the domestic cat, what might indicate their potential involvement in the regulation of the feline luteal phase. The significantly elevated mRNA level of *TNFRSF1A* in both the domestic cat and the Iberian lynx during CL formation may suggest a possible conserved involvement of this factor in tissue reorganization and luteinization after ovulation. In contrast, the CL capacity to express *TNF* differed considerably between domestic cat and both Iberian and Eurasian lynx. The presence of mRNA of pro-apoptotic factors *BAX*, *CASP3*, *TNFRSF1A* and *FAS* in perCL of Iberian and Eurasian lynx suggests potential capacity of perCL to undergo apoptosis. Significantly higher expression of pro-survival factors *BCL2* and *TNFRSF1B* in perCL compared to frCL of Iberian lynx may be part of the mechanism to secure the structural integrity of perCL. Histologic analysis revealed a different structural state of perCL in Iberian and Eurasian lynx during the pre- and post-mating periods, respectively.

Gene expression of pro-apoptotic factors *BAX* and *CASP3* was found in CL throughout the whole luteal phase of the domestic cat. From the mRNA levels of *BAX* and *CASP3* analyzed in this study, it is not clear whether the protein product is activated; therefore, the data cannot indicate whether the apoptotic signal has been implemented. However, active CASP3 protein was detected in domestic cat luteal tissue by immunohistochemistry, showing local apoptotic processes in reorganization (early stages) and regression (late stages) of feline CL. Likewise, CL of other species express *BAX* and *CASP3* at various stages [35, 36, 38, 47, 64–66]. Fas ligand could not be identified in the tissues studied and therefore was not included in the gene analysis. However, its receptor, *FAS*, was present in domestic cat CL and was constantly expressed throughout the non-pregnant luteal phase. In pregnancy, the regressing CL of the domestic cat showed higher expression of *FAS* compared to its previous stage, indicating a possible

involvement of the FAS/Fas ligand system in regulating feline luteolysis during pregnancy. Likewise, the increase in FAS and Fas ligand expression with regression of the CL has been shown in many species, including rodents and cattle [7, 42, 67].

In this study, luteal cells of the domestic cat, while presenting high receptivity to TNF *via* expression of *TNFRSF1A* and *TNFRSF1B*, were not identified as a source of this cytokine, in contrast to other species [43, 53, 68]. The feline TNF may be derived from other sources, such as immune and endothelial cells [43]. In both rat and bovine CL, *TNFRSF1A* has been associated with the processes of luteolysis [48, 51]. In our study, the relative mRNA level of *TNFRSF1A* was significantly higher during the CL formation stage in both the pregnant and non-pregnant luteal phases of the domestic cat. Moreover, such increased expression was also noted in the forming frCL of the Iberian lynx. We hypothesize that this receptor is involved in processes of CL formation and may be conserved for both domestic cat and Iberian lynx. The involvement of *TNFRSF1A* in CL formation can be as an apoptotic mediator of the tissue reorganization processes.

For the domestic cat, the process of luteolysis and differences in it between pregnancy and the non-pregnant luteal phase are not yet known. The CL of infertile cycles could regress in response to active luteolytic signals, like in sheep and rat [8, 63], or undergo a passive regression, like in dogs [69]. Based on our results, we hypothesize that the life span of CL of pregnancy is supported by luteotropic factors. The CL of non-pregnant luteal phases, therefore, may passively regress due to the absence of such support. These CL may still produce receptors potent for survival like in pregnancy (*TNFRSF1B* expression), but either lack the activation of the survival cascade by ligands or have the luteotropic signal blocked on the downstream level. This may also explain high variations in reported functional life spans of CL in non-pregnant luteal phases in domestic cats, *e.g.*, from 26 to 62 days as evidenced by serum progesterone levels [22, 23].

The histomorphology of Iberian lynx CL is described for the first time in this study. Due to the histomorphological similarity of Iberian lynx CL to the domestic cat, it was possible to distinguish between frCL undergoing formation and structurally maintained perCL by histologic analysis. Interestingly, perCL of Eurasian lynx before mating exhibited structural regression signs, while perCL of Iberian lynx after mating showed no signs of regression. Moreover, all of the perCL analyzed showed functional activity, as evidenced by intraluteal progesterone and estrogen concentrations. Histologic observations allow us to hypothesize that the state of perCL changes under the influence of new ovulations, returning it to the state of maintenance from regression. This is supported by reports on the bobcat, in which structurally persistent CL were responsive to gonadotropin treatment, *i.e.*, exhibited elevation in progesterone secretion [14].

In our study, we could only collect samples from two Iberian lynx, due to the critically endangered status of these species. The observations are, therefore, limited to the system in two animals; however, they allow us to partly answer introduced questions and establish the direction of further studies. The detection of pro-apoptotic factors *BAX*, *CASP3*, *TNFRSF1A* and *FAS* at the mRNA level in all CL analyzed suggests that perCL, although structurally persistent, have the capacity to undergo apoptosis. The next question would therefore be whether CL persist due to the absence of luteolytic signal or because such luteolytic signal is further blocked, supposedly *via* involvement of luteotropic factors. Based on our results, we suggest the second mechanism. Here, the candidate for the rescue factor is *BCL2*, which in higher concentrations would outcompete *BAX* for BH3-domain binding and thus either prevent *BAX* from activating or, if already activated, from proceeding to MOM permeabilization [70]. Additionally, *TNFRSF1B* may compete for the ligand binding with *TNFRSF1A*, resulting in the activation of pro-survival rather than pro-apoptotic pathways. Both these pro-survival factors, *BCL2* and

TNFRSF1B, were present at the mRNA level in perCL of Eurasian lynx and significantly higher expressed in perCL compared to frCL in analyzed Iberian lynx.

The phenomenon of physiological CL persistence is not common among mammalian species. So far, Eurasian, Iberian and Canada lynx are the only species where both structural and functional persistence of CL has been reported. In cows, the persistence of such functional CL is viewed as a pathology, because it prevents the initiation of a new ovarian cycle [71]. The unique physiological persistence of CL in lynx offers opportunity to learn more on the mechanisms of CL rescue. For instance, many human clinical studies are focused on a search for rescue factors to prevent premature regression of the CL. Physiologically, such rescue occurs during pregnancy, e.g., in humans by chorionic gonadotropin [72, 73], or *post-partum* in lactating rats [74, 75]. In baboons, the administration of human chorionic gonadotropin or gonadotropin releasing hormone prolonged the life of CL even during the early follicular stage [76]. In all cases, rescue of the CL is accompanied by increased progesterone concentrations. Telleria suggests that regression of the CL can be interrupted and even reversed, either by rescuing its capacity to produce progesterone or by interfering with apoptosis [77]. As shown by previous studies [27] and by intraluteal hormone concentrations in our study, perCL of both Iberian and Eurasian lynx retain the capacity to produce progesterone. This characteristic could be the basis for the structural integrity of perCL and may involve potential luteal factors to ensure functional persistence. The elevation of pro-survival factors, such as *BCL2* and *TNFRSF1B*, could be a mechanism to prevent transduction of the apoptotic signal and rescue perCL from its structural demise. Interestingly, it is hypothesized that *BCL2* is involved in prolongation of CL lifespan during pregnancy in humans [78]. Moreover, progesterone has been shown to promote *BCL2* expression and decrease *BAX* to *BCL2* ratio in bovine luteal cells [79]. It might be possible that the same mechanisms that rescue CL of the domestic cat during pregnancy, as discussed above, are involved in the physiological persistence of lynx CL. If this assumption is true, research on the luteotropic and luteolytic systems in the domestic cat becomes essential for understanding the unique reproduction of monoestrous lynx.

Interestingly, gene expression of the pro-apoptotic receptor *FAS* was significantly higher in maintained perCL compared to frCL of Iberian lynx. This observation leads to two possible scenarios: (i) either the elevated *FAS* indicates the increased susceptibility of perCL to apoptosis and with this the existence of a survival system to block the *FAS*-induced apoptotic signal, including the possible involvement of a soluble form of *FAS* [80]; or (ii) elevated *FAS* points to the pro-survival action of *FAS* itself. The latter is not unrealistic, because with the growing number of recent studies it is becoming clear that *FAS* can also exhibit diverse non-apoptotic actions depending on the tissue and conditions [81]. Consistent with this, elevated expression of *FAS* was found in early stage bovine CL compared to later stages [82]. In the second scenario, *FAS* might be one of the factors involved in the persistence of lynx CL and hence also one of the lynx reproductive characteristics divergent from those of the domestic cat. Another distinct characteristic of the lynx luteal system that was observed involves *TNF* gene expression. While mRNA levels of *TNF* were close to zero in the domestic cat CL, indicating an extra-ovarian source of this cytokine, in both Iberian and Eurasian lynx this factor was regularly expressed. Because the increased expression of *TNF* in perCL tissue coincided with a similar increase in *TNFRSF1B*, we suggest a local autocrine regulation of the perCL *via* this non-apoptotic receptor.

In summary, as in other species studied, apoptosis-related factors are expressed during different stages of luteal development and regression in the domestic cat CL. It appears that *TNFRSF1A* might play an important role during the formation of feline CL. In Iberian and Eurasian lynx, structurally intact perCL exhibited the potential capacity to undergo apoptosis. Of the factors studied here, we hypothesize that *BCL2* and *TNFRSF1B* might play a luteotropic

role and be involved in the protection of perCL from complete structural regression. Mechanisms by which apoptosis-related factors are involved in the feline luteal phase are uncertain. Our current work presents a basis for further research on apoptosis system in the feline luteal phase and indicates potential factors involved in the regression and persistence of feline CL.

Acknowledgments

We thank Sigrid Holz for her essential assistance in preparation of histologic slides, Katrin Paschmionka for her help in hormone analysis, Stefanie Koster for her contribution to immunohistochemical analysis and Dr Marta J Siemieniuch (Institute of Animal Reproduction and Food Research of the Polish Academy of Sciences, Olsztyn, Poland) for kindly providing week 9 samples from pregnant cats. Iberian lynx samples were kindly provided by the Environmental Council of the Government of Andalusia and Iberian lynx conservation breeding program. We thank the Statens Naturoppsyn (Norway) and Dr. Johan Schulze for his help to access the Norwegian Eurasian lynx samples. We are grateful to Prof. Dr. Barry Bavister for English proof-reading of the article.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: OA BCB KJ. Performed the experiments: OA LZ. Analyzed the data: OA. Contributed reagents/materials/analysis tools: JP RS FV. Wrote the paper: OA. Contributed to the discussion of the results: OA BCB KJ. Performed critical revision of the manuscript: LZ JP RS FV BCB KJ.

References

1. Fanson KV, Wielebnowski NC, Shenk TM, Vashon JH, Squires JR, Lucas JR. Patterns of ovarian and luteal activity in captive and wild Canada lynx (*Lynx canadensis*). *General and comparative endocrinology*. 2010; 169(3):217–24. doi: [10.1016/j.yggen.2010.09.003](https://doi.org/10.1016/j.yggen.2010.09.003) PMID: [20850438](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20850438/).
2. Kvam T. Reproduction in the European Lynx, *Lynx-Lynx*. *Z Säugetierkd*. 1991; 56(3):146–58. WOS: A1991FU06600003.
3. Palomares F, Revilla E, Calzada J, Fernandez N, Delibes M. Reproduction and pre-dispersal survival of Iberian lynx in a subpopulation of the Donana National Park. *Biol Conserv*. 2005; 122(1):53–9. doi: [10.1016/j.biocon.2004.06.020](https://doi.org/10.1016/j.biocon.2004.06.020) WOS:000225522100006.
4. Poole KG. A review of the Canada lynx, *Lynx canadensis*, in Canada. *Can Field Nat*. 2003; 117(3):360–76. WOS:000222886500003.
5. Jewgenow K, Painer J, Amelkina O, Dehnhard M, Goritz F. Lynx reproduction—Long-lasting life cycle of corpora lutea in a feline species. *Reproductive Biology*. 2014; 14:83–8. doi: [10.1016/j.repbio.2014.03.002](https://doi.org/10.1016/j.repbio.2014.03.002) PMID: [24856466](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24856466/)
6. Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological reviews*. 2000; 80(1):1–29. PMID: [10617764](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10617764/).
7. Sugino N, Okuda K. Species-related differences in the mechanism of apoptosis during structural luteolysis. *The Journal of reproduction and development*. 2007; 53(5):977–86. PMID: [17984567](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17984567/).
8. McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiological reviews*. 1999; 79(2):263–323. PMID: [10221982](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10221982/).
9. Goritz F, Dehnhard M, Hildebrandt TB, Naidenko SV, Vargas A, Martinez F, et al. Non cat-like ovarian cycle in the Eurasian and the Iberian lynx—ultrasonographical and endocrinological analysis. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*. 2009; 44 Suppl 2:87–91. doi: [10.1111/j.1439-0531.2009.01380.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01380.x) PMID: [19754543](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19754543/).
10. Painer J, Jewgenow K, Dehnhard M, Arnemo JM, Linnell JD, Odden J, et al. Physiologically Persistent Corpora lutea in Eurasian Lynx (*Lynx lynx*)—Longitudinal Ultrasound and Endocrine Examinations Intra-Vitam. *PloS one*. 2014; 9(3):e90469. doi: [10.1371/journal.pone.0090469](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090469) PMID: [24599348](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24599348/); PubMed Central PMCID: PMC3943960.
11. Carnaby K, Painer J, Soderberg A, Gavier-Widen D, Goritz F, Dehnhard M, et al. Histological and endocrine characterisation of the annual luteal activity in Eurasian lynx (*Lynx lynx*). *Reproduction*. 2012; 144(4):477–84. doi: [10.1530/REP-12-0166](https://doi.org/10.1530/REP-12-0166) PMID: [22829688](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22829688/).

12. Duke KL. Some notes on the histology of the ovary of the bobcat with special reference to the corpora lutea. *The Anatomical record*. 1949; 103(1):111–31. PMID: [18108869](#).
13. Crowe DM. Aspects of aging, growth, and reproduction of bobcats from Wyoming. *J Mammal*. 1975; Feb; 56(1):177–98. PubMed Central PMCID: PMC1113039. PMID: [1113039](#)
14. Woshner VM, Miller DL, Waldhalm SJ, Cox NM, Jacobson HA, Leopold BD. Progesterone in Luteal Bodies of Bobcats. *Proc Annu Conf Southeast Assoc Fish and Wildl Agencies*. 2001; 55:427–35.
15. Stewart RA, Pelican KM, Brown JL, Wildt DE, Ottinger MA, Howard JG. Oral progestin induces rapid, reversible suppression of ovarian activity in the cat. *General and comparative endocrinology*. 2010; 166(2):409–16. doi: [10.1016/j.ygcen.2009.12.016](#) PMID: [20051246](#); PubMed Central PMCID: PMC2840999.
16. Painer J, Goeritz F, Dehnhard M, Hildebrandt TB, Naidenko SV, Sanchez I, et al. Hormone-induced luteolysis on physiologically persisting corpora lutea in Eurasian and Iberian lynx (*Lynx lynx* and *Lynx pardinus*). *Theriogenology*. 2014; 82(4):557–62. doi: [10.1016/j.theriogenology.2014.05.004](#) PMID: [24974257](#).
17. IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. <http://www.iucnredlist.org>. 2015; Version 3.1 Downloaded in July 2015.
18. Casas-Marce M, Soriano L, Lopez-Bao JV, Godoy JA. Genetics at the verge of extinction: insights from the Iberian lynx. *Mol Ecol*. 2013; 22(22):5503–15. doi: [10.1111/mec.12498](#) PMID: [24128177](#).
19. Palomares F, Godoy JA, Lopez-Bao JV, Rodriguez A, Roques S, Casas-Marce M, et al. Possible extinction vortex for a population of Iberian lynx on the verge of extirpation. *Conservation biology: the journal of the Society for Conservation Biology*. 2012; 26(4):689–97. doi: [10.1111/j.1523-1739.2012.01870.x](#) PMID: [22731698](#).
20. Simón MA, al. e. Ten years conserving the Iberian lynx. Seville.: Consejería de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente. Junta de Andalucía.; 2012.
21. Tsutsui T, Stabenfeldt GH. Biology of ovarian cycles, pregnancy and pseudopregnancy in the domestic cat. *Journal of reproduction and fertility Supplement*. 1993; 47:29–35. PMID: [8229938](#).
22. Wildt DE, Chan SY, Seager SW, Chakraborty PK. Ovarian activity, circulating hormones, and sexual behavior in the cat. I. Relationships during the coitus-induced luteal phase and the estrous period without mating. *Biology of reproduction*. 1981; 25(1):15–28. PMID: [7197173](#).
23. Verhage HG, Beamer NB, Brenner RM. Plasma levels of estradiol and progesterone in the cat during polyestrus, pregnancy and pseudopregnancy. *Biology of reproduction*. 1976; 14(5):579–85. PMID: [1276322](#).
24. Amelkina O, Braun BC, Dehnhard M, Jewgenow K. The corpus luteum of the domestic cat: Histologic classification and intraluteal hormone profile. *Theriogenology*. 2015; 83(4):711–20. doi: [10.1016/j.theriogenology.2014.11.008](#) PMID: [25483868](#).
25. Siemieniuch MJ, Jursza E, Szostek AZ, Skarzynski DJ, Boos A, Kowalewski MP. Steroidogenic capacity of the placenta as a supplemental source of progesterone during pregnancy in domestic cats. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*. 2012; 10:89. doi: [10.1186/1477-7827-10-89](#) PMID: [23110691](#); PubMed Central PMCID: PMC3522032.
26. Zschockelt L, Amelkina O, Siemieniuch MJ, Koster S, Jewgenow K, Braun BC. Corpora lutea of pregnant and pseudopregnant domestic cats reveal similar steroidogenic capacities during the luteal life span. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014; 144 Pt B:373–81. doi: [10.1016/j.jsbmb.2014.08.010](#) PMID: [25138635](#).
27. Zschockelt L, Amelkina O, Koster S, Painer J, Okuyama MW, Serra R, et al. Comparative analysis of intraluteal steroidogenic enzymes emphasises the functionality of fresh and persistent corpora lutea during pro- and metoestrus in the lynx. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2015; in press. doi: [10.1016/j.jsbmb.2015.07.001](#)
28. Juengel JL, Garverick HA, Johnson AL, Youngquist RS, Smith MF. Apoptosis during luteal regression in cattle. *Endocrinology*. 1993; 132(1):249–54. doi: [10.1210/endo.132.1.8419126](#) PMID: [8419126](#).
29. McCormack JT, Friederichs MG, Limback SD, Greenwald GS. Apoptosis during spontaneous luteolysis in the cyclic golden hamster: biochemical and morphological evidence. *Biology of reproduction*. 1998; 58(1):255–60. PMID: [9472949](#).
30. Davis JS, Rueda BR. The corpus luteum: an ovarian structure with maternal instincts and suicidal tendencies. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 2002; 7:d1949–78. PMID: [12161347](#).
31. Westphal D, Kluck RM, Dewson G. Building blocks of the apoptotic pore: how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis. *Cell death and differentiation*. 2014; 21(2):196–205. doi: [10.1038/cdd.2013.139](#) PMID: [24162660](#); PubMed Central PMCID: PMC3890949.
32. Gillies LA, Kuwana T. Apoptosis regulation at the mitochondrial outer membrane. *Journal of cellular biochemistry*. 2014; 115(4):632–40. doi: [10.1002/jcb.24709](#) PMID: [24453042](#).

33. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends in biochemical sciences*. 1997; 22(8):299–306. PMID: [9270303](#).
34. Korsmeyer SJ. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer research*. 1999; 59(7 Suppl):1693s–700s. PMID: [10197582](#).
35. Carambula SF, Matikainen T, Lynch MP, Flavell RA, Goncalves PB, Tilly JL, et al. Caspase-3 is a pivotal mediator of apoptosis during regression of the ovarian corpus luteum. *Endocrinology*. 2002; 143(4):1495–501. doi: [10.1210/endo.143.4.8726](#) PMID: [11897708](#).
36. Ferreira-Dias G, Mateus L, Costa AS, Sola S, Ramalho RM, Castro RE, et al. Progesterone and caspase-3 activation in equine cyclic corpora lutea. Reproduction in domestic animals = *Zuchthygiene*. 2007; 42(4):380–6. doi: [10.1111/j.1439-0531.2006.00795.x](#) PMID: [17635775](#).
37. Peluffo MC, Stouffer RL, Tesone M. Activity and expression of different members of the caspase family in the rat corpus luteum during pregnancy and postpartum. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2007; 293(5):E1215–23. doi: [10.1152/ajpendo.00261.2007](#) PMID: [17726144](#).
38. Zorrilla LM, D'Annibale MA, Swing SE, Gadsby JE. Expression of genes associated with apoptosis in the porcine corpus luteum during the oestrous cycle. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*. 2013; 48(5):755–61. doi: [10.1111/rda.12156](#) PMID: [23521207](#).
39. Peluffo MC, Young KA, Stouffer RL. Dynamic expression of caspase-2, -3, -8, and -9 proteins and enzyme activity, but not messenger ribonucleic acid, in the monkey corpus luteum during the menstrual cycle. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005; 90(4):2327–35. doi: [10.1210/jc.2004-2214](#) PMID: [15671090](#).
40. Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annual review of immunology*. 1999; 17:331–67. doi: [10.1146/annurev.immunol.17.1.331](#) PMID: [10358762](#).
41. Kuranaga E, Kanuka H, Furuhashi Y, Yonezawa T, Suzuki M, Nishihara M, et al. Requirement of the Fas ligand-expressing luteal immune cells for regression of corpus luteum. *FEBS letters*. 2000; 472(1):137–42. PMID: [10781821](#).
42. Galvao AM, Ramilo DW, Skarzynski DJ, Lukasik K, Tramontano A, Mollo A, et al. Is FAS/Fas ligand system involved in equine corpus luteum functional regression? *Biology of reproduction*. 2010; 83(6):901–8. doi: [10.1095/biolreprod.110.084699](#) PMID: [20720169](#).
43. Okuda K, Sakumoto R. Multiple roles of TNF super family members in corpus luteum function. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*. 2003; 1:95. doi: [10.1186/1477-7827-1-95](#) PMID: [14613529](#); PubMed Central PMCID: PMC280732.
44. Nagata S. Fas ligand-induced apoptosis. *Annual review of genetics*. 1999; 33:29–55. doi: [10.1146/annurev.genet.33.1.29](#) PMID: [10690403](#).
45. Galvao AM, Ferreira-Dias G, Skarzynski DJ. Cytokines and angiogenesis in the corpus luteum. *Mediators of inflammation*. 2013; 2013:420186. doi: [10.1155/2013/420186](#) PMID: [23840095](#); PubMed Central PMCID: PMC3693155.
46. Terranova PF. Potential roles of tumor necrosis factor-alpha in follicular development, ovulation, and the life span of the corpus luteum. *Domestic animal endocrinology*. 1997; 14(1):1–15. PMID: [8985665](#).
47. Skarzynski DJ, Piotrowska-Tomala KK, Lukasik K, Galvao A, Farberov S, Zalman Y, et al. Growth and regression in bovine corpora lutea: regulation by local survival and death pathways. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*. 2013; 48 Suppl 1:25–37. doi: [10.1111/rda.12203](#) PMID: [23962212](#).
48. Hojo T, Oda A, Lee SH, Acosta TJ, Okuda K. Effects of tumor necrosis factor alpha and Interferon gamma on the viability and mRNA expression of TNF receptor type I in endothelial cells from the bovine corpus luteum. *The Journal of reproduction and development*. 2010; 56(5):515–9. PMID: [20562522](#).
49. Korzekwa A, Murakami S, Woclawek-Potocka I, Bah MM, Okuda K, Skarzynski DJ. The influence of tumor necrosis factor alpha (TNF) on the secretory function of bovine corpus luteum: TNF and its receptors expression during the estrous cycle. *Reprod Biol*. 2008; 8(3):245–62. PMID: [19092986](#).
50. Pate JL, Johnson-Larson CJ, Ottobre JS. Life or death decisions in the corpus luteum. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*. 2012; 47 Suppl 4:297–303. doi: [10.1111/j.1439-0531.2012.02089.x](#) PMID: [22827384](#).
51. Abdo M, Hisheh S, Arfuso F, Dharmarajan A. The expression of tumor necrosis factor-alpha, its receptors and steroidogenic acute regulatory protein during corpus luteum regression. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*. 2008; 6:50. doi: [10.1186/1477-7827-6-50](#) PMID: [18990246](#); PubMed Central PMCID: PMC2584631.
52. Kuranaga E, Kanuka H, Bannai M, Suzuki M, Nishihara M, Takahashi M. Fas/Fas ligand system in prolactin-induced apoptosis in rat corpus luteum: possible role of luteal immune cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999; 260(1):167–73. doi: [10.1006/bbrc.1999.0858](#) PMID: [10381361](#).

53. Peluffo MC, Young KA, Hennebold JD, Stouffer RL. Expression and regulation of tumor necrosis factor (TNF) and TNF-receptor family members in the macaque corpus luteum during the menstrual cycle. *Molecular reproduction and development*. 2009; 76(4):367–78. doi: [10.1002/mrd.20970](https://doi.org/10.1002/mrd.20970) PMID: [18932199](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18932199/); PubMed Central PMCID: PMC2649985.
54. Cryns V, Yuan J. Proteases to die for. *Genes & development*. 1998; 12(11):1551–70. PMID: [9620844](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9620844/).
55. Zambelli D, Prati F. Ultrasonography for pregnancy diagnosis and evaluation in queens. *Theriogenology*. 2006; 66(1):135–44. doi: [10.1016/j.theriogenology.2006.04.004](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.04.004) PMID: [16716385](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16716385/).
56. Schnorr B KM. *Embryologie der Haustiere: Ein Kurzlehrbuch*. 5th ed: Stuttgart: Enke Verlag.; 2006.
57. Knospe C. Periods and stages of the prenatal development of the domestic cat. *Anatomia, histologia, embryologia*. 2002; 31(1):37–51. PMID: [11841356](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11841356/).
58. Braun BC, Vargas A, Jewgenow K. The molecular detection of relaxin and its receptor RXFP1 in reproductive tissue of *Felis catus* and *Lynx pardinus* during pregnancy. *Reproduction*. 2012; 143(3):399–410. doi: [10.1530/REP-11-0316](https://doi.org/10.1530/REP-11-0316) PMID: [22187673](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22187673/).
59. Braun BC, Zschockelt L, Dehnhard M, Jewgenow K. Progesterone and estradiol in cat placenta—biosynthesis and tissue concentration. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2012; 132(3–5):295–302. doi: [10.1016/j.jsbmb.2012.07.005](https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2012.07.005) PMID: [22874432](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22874432/).
60. Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome biology*. 2007; 8(2):R19. doi: [10.1186/gb-2007-8-2-r19](https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-2-r19) PMID: [17291332](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17291332/); PubMed Central PMCID: PMC1852402.
61. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*. 2002; 3(7):RESEARCH0034. PMID: [12184808](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12184808/); PubMed Central PMCID: PMC126239.
62. Jewgenow K, Neubauer K, Blottner S, Schon J, Wildt DE, Pukazhenthil BS. Reduced germ cell apoptosis during spermatogenesis in the teratospermic domestic cat. *Journal of andrology*. 2009; 30(4):460–8. doi: [10.2164/jandrol.108.006726](https://doi.org/10.2164/jandrol.108.006726) PMID: [19201698](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19201698/).
63. Stocco C, Telleria C, Gibori G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocrine reviews*. 2007; 28(1):117–49. doi: [10.1210/er.2006-0022](https://doi.org/10.1210/er.2006-0022) PMID: [17077191](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17077191/).
64. Sugino N, Suzuki T, Kashida S, Karube A, Takiguchi S, Kato H. Expression of Bcl-2 and Bax in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy: regulation by human chorionic gonadotropin. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2000; 85(11):4379–86. doi: [10.1210/jcem.85.11.6944](https://doi.org/10.1210/jcem.85.11.6944) PMID: [11095483](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11095483/).
65. Peluffo MC, Bussmann L, Stouffer RL, Tesone M. Expression of caspase-2, -3, -8 and -9 proteins and enzyme activity in the corpus luteum of the rat at different stages during the natural estrous cycle. *Reproduction*. 2006; 132(3):465–75. doi: [10.1530/rep.1.00910](https://doi.org/10.1530/rep.1.00910) PMID: [16940287](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16940287/).
66. Slot KA, Voorendt M, de Boer-Brouwer M, van Vugt HH, Teerds KJ. Estrous cycle dependent changes in expression and distribution of Fas, Fas ligand, Bcl-2, Bax, and pro- and active caspase-3 in the rat ovary. *The Journal of endocrinology*. 2006; 188(2):179–92. doi: [10.1677/joe.1.06165](https://doi.org/10.1677/joe.1.06165) PMID: [16461545](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16461545/).
67. Taniguchi H, Yokomizo Y, Okuda K. Fas-Fas ligand system mediates luteal cell death in bovine corpus luteum. *Biology of reproduction*. 2002; 66(3):754–9. PMID: [11870083](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11870083/).
68. Suzuki C, Yoshioka K, Yamada M, Miyamoto T, Manabe N. Expressions of tumor necrosis factor- α , its receptor I, II and receptor-associated factor 2 in the porcine corpus luteum during the estrous cycle and early pregnancy. *Veterinary research communications*. 2014; 38(1):1–10. doi: [10.1007/s11259-013-9575-9](https://doi.org/10.1007/s11259-013-9575-9) PMID: [24057858](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24057858/).
69. Kowalewski MP. Luteal regression vs. prepartum luteolysis: regulatory mechanisms governing canine corpus luteum function. *Reprod Biol*. 2014; 14(2):89–102. doi: [10.1016/j.repbio.2013.11.004](https://doi.org/10.1016/j.repbio.2013.11.004) PMID: [24856467](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24856467/).
70. Volkmann N, Marassi FM, Newmeyer DD, Hanein D. The rheostat in the membrane: BCL-2 family proteins and apoptosis. *Cell death and differentiation*. 2014; 21(2):206–15. doi: [10.1038/cdd.2013.153](https://doi.org/10.1038/cdd.2013.153) PMID: [24162659](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24162659/); PubMed Central PMCID: PMC3890954.
71. Magata F, Shirasuna K, Struve K, Herzog K, Shimizu T, Bollwein H, et al. Gene expressions in the persistent corpus luteum of postpartum dairy cows: distinct profiles from the corpora lutea of the estrous cycle and pregnancy. *The Journal of reproduction and development*. 2012; 58(4):445–52. PMID: [22522231](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22522231/).
72. Duncan WC. The human corpus luteum: remodelling during luteolysis and maternal recognition of pregnancy. *Reviews of reproduction*. 2000; 5(1):12–7. PMID: [10711731](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10711731/).
73. Baird DD, Weinberg CR, McConaughy DR, Wilcox AJ. Rescue of the corpus luteum in human pregnancy. *Biology of reproduction*. 2003; 68(2):448–56. PMID: [12533407](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12533407/).

74. Goyeneche AA, Deis RP, Gibori G, Telleria CM. Progesterone promotes survival of the rat corpus luteum in the absence of cognate receptors. *Biology of reproduction*. 2003; 68(1):151–8. PMID: [12493707](#).
75. Goyeneche AA, Martinez IL, Deis RP, Gibori G, Telleria CM. In vivo hormonal environment leads to differential susceptibility of the corpus luteum to apoptosis in vitro. *Biology of reproduction*. 2003; 68(6):2322–30. doi: [10.1095/biolreprod.102.013540](#) PMID: [12606365](#).
76. Castracane VD, Stevens V, Knickerbocker J, Powell J, Randolph M, Gimpel T. Late luteal rescue in the baboon (*Papio cynocephalus*). *Human reproduction update*. 1998; 4(4):383–8. PMID: [9825853](#).
77. Telleria CM. Can luteal regression be reversed? *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*. 2006; 4:53. doi: [10.1186/1477-7827-4-53](#) PMID: [17074090](#); PubMed Central PMCID: PMC1637134.
78. Rodger FE, Fraser HM, Duncan WC, Illingworth PJ. Immunolocalization of bcl-2 in the human corpus luteum. *Human reproduction*. 1995; 10(6):1566–70. PMID: [7593540](#).
79. Liszewska E, Rekawiecki R, Kotwica J. Effect of progesterone on the expression of bax and bcl-2 and on caspase activity in bovine luteal cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2005; 78(1–4):67–81. doi: [10.1016/j.prostaglandins.2005.03.003](#) PMID: [16303606](#).
80. Komatsu K, Manabe N, Kiso M, Shimabe M, Miyamoto H. Soluble Fas (FasB) regulates luteal cell apoptosis during luteolysis in murine ovaries. *Molecular reproduction and development*. 2003; 65(4):345–52. doi: [10.1002/mrd.10312](#) PMID: [12840807](#).
81. Peter ME, Budd RC, Desbarats J, Hedrick SM, Hueber AO, Newell MK, et al. The CD95 receptor: apoptosis revisited. *Cell*. 2007; 129(3):447–50. doi: [10.1016/j.cell.2007.04.031](#) PMID: [17482535](#).
82. Duncan A, Forcina J, Birt A, Townson D. Estrous cycle-dependent changes of Fas expression in the bovine corpus luteum: influence of keratin 8/18 intermediate filaments and cytokines. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*. 2012; 10:90. doi: [10.1186/1477-7827-10-90](#) PMID: [23113883](#); PubMed Central PMCID: PMC3567950.

Publikation 6

Progesterone, Estrogen, and androgen receptors in the corpus luteum of the domestic cat, Iberian lynx (*Lynx pardinus*) and Eurasian lynx (*Lynx lynx*). Amelkina O, Zschockelt L, Painer J, Serra R, Villaespesa F, Krause E, Jewgenow K, **Braun BC**. Theriogenology. 2016 Dec;86(9):2107-2118. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.06.026. Epub 2016 Jul 5.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.06.026>

Publikation 7

Expression of steroidogenic enzymes and steroid receptors in foetal gonads of domestic cat-Sex similarities and differences. **Braun BC**, Jewgenow K. *Reprod Domest Anim.* 2017 Apr;52 Suppl 2:130-136. doi: 10.1111/rda.12829. Epub 2016 Nov 15.

<https://doi.org/10.1111/rda.12829>

Publikation 8

Expression of steroidogenic enzymes and steroid receptors in testis of domestic cat (*Felis catus*). **Braun BC**, Okuyama MW, Dehnhard M, Müller K, Jewgenow K. J Steroid Biochem Mol Biol. 2018 Apr;178:135-149. doi: 10.1016/j.jsbmb.2017.11.013. Epub 2017 Nov 28.

<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.11.013>

Danksagung

Mein erster Dank gilt all jenen Kollegen, die zum Entstehen der dieser Arbeit zugrunde liegenden Publikationen beigetragen haben, also den Koautoren, Labormitarbeiterinnen und -mitarbeitern sowie den Kooperationspartnern, die bei der Probensammlung mitgewirkt haben oder Reagenzien bereitgestellt haben. Auch herzlichen Dank an die Kooperationspartner meiner anderen Projekte.

Ein ganz spezieller Dank geht an Frau Prof. Katarina Jewgenow. Sie ist ein großes Vorbild für mich und hat mich in all den Jahren, die ich nun schon am Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung (IZW) arbeite, maßgeblich unterstützt und motiviert.

Danken möchte ich auch den anderen Kolleginnen und Kollegen am IZW. Vor allem danke ich den aktuellen und ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung Reproduktionsbiologie für das sehr angenehme Arbeitsklima und insbesondere Katarina, Karin, Jenny, Ulrike und Martin auch für die fachlichen Diskussionen und Anregungen. Ein besonderer Dank gilt auch den Doktorandinnen und Doktoranden sowie anderen Studentinnen und Studenten, die ich in den letzten Jahren betreut habe und meinen technischen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern. Sie alle haben wesentlich meine Projekte durch ihre Arbeit unterstützt.

Prof. Einspanier begleitet mich seit 2011 als Mentor. Er hat mir zudem ermöglicht, an der Freien Universität Berlin zu lehren und dort auch die Habilitation zu beantragen. Vielen Dank für alles!

Asja und Gunnar möchte ich für das kritische Lesen der Habilitationsschrift danken. Ihre Anmerkungen halfen mir, diese noch zu verbessern.

Zu guter Letzt danke ich meiner kleinen Familie, also Gunnar und unserem Sohn Marty. Meine Arbeit bedeutet mir sehr viel und macht mir Freude. Die Tatsache, dass ich mich auf eure Unterstützung meiner beruflichen Aktivitäten immer verlassen kann und dass ihr generell mein privater Rückhalt seid, tragen mit dazu bei.