

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie
am Fachbereich Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Gynäkomastie beim Beagle Hund
nach Applikation von steroidalem Androgen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin

- Doctor medicinae veterinariae -

(Dr. med. vet.)

an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Oliver Martin Lüttke-Handjery

Tierarzt

aus Berlin

Berlin 2008

Journal-Nr.: 3259

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg
Erster Gutachter: PD Dr. Jakob Walter
Zweiter Gutachter: PD Dr. Anja Sterner-Kock
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Karl Heinz Lahrmann

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

dogs, dog diseases, male genital diseases, mammary glands, estrogens,
androgens, hormones, growth factors, steroids, biochemical receptors, aromatase
(MeSH)

Tag der Promotion: 18. März 2009

**Die Anfertigung dieser Arbeit wurde durch ein Promotionsstipendium
der Schering AG ermöglicht.**

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-561-5

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2008

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written
authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mensch und buch verlag 2009

choriner str. 85 - 10119 berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

*Meinen Eltern,
Geschwistern,*

Meiner geliebten Franziska

Inhalt	3
1 Einleitung	7
2 Literaturübersicht	9
2.1 <i>Gynäkomastie- Vorkommen und Histologie</i>	9
2.1.1 Physiologische Gynäkomastie beim Mann	10
2.1.2 Rolle der Aromatase bei der Gynäkomastie	11
2.1.3 Androgen- und Estrogenproduktion beim Mann	11
2.1.4 Pathologische Gynäkomastie beim Mann	12
2.1.4.1 Erhöhte Estrogenserumkonzentration	13
2.1.4.2 Reduzierte Androgenserumkonzentration	14
2.1.4.3 Medikamenteninduzierte Gynäkomastie	15
2.2 <i>Gynäkomastie bei Säugetieren</i>	18
2.2.1 Ziegenbock	18
2.2.2 Hund	18
2.2.3 Medikamenteninduzierte Gynäkomastie	19
2.2.4 Weitere Ursachen für eine Gynäkomastie	20
2.3 <i>Allgemeines zur Milchdrüse (Glandula mammaria, Mamma)</i>	21
2.3.1 Anatomie	21
2.3.2 Histologie	22
2.3.3 Ontogenese der caninen Mamma	23
2.3.4 Postnatale Entwicklung der caninen Mamma	23
2.3.5 Zyklische Veränderungen des Mammaparenchyms bei der Hündin	24
2.4 <i>Hormonrezeptoren</i>	26
2.4.1 Einleitung	26
2.4.2 Steroidhormone/ Steroidhormonrezeptoren (Rezeptoren für hydrophobe Ringmoleküle)	26
2.4.3 Growth-Hormon (GH), Growth- Hormon- Rezeptor (GHR)	29
3 Material und Methoden	30
3.1 <i>Material</i>	30
3.1.1 Prüfsubstanz	31
3.1.2 Einbettung der Gewebeproben	31
3.1.3 Gefrierproben	31
3.1.4 Schnittherstellung	32
3.2 <i>Immunhistochemie (Protokolle s. Anhang)</i>	32
3.2.1 Antigendemaskierung	32
3.2.2 LSAB-Methode	33
3.2.3 Kontrollen	35
3.2.4 Auswertung der Histologie (HE-Färbungen) und der Immunhistochemie	36

3.3	<i>Molekularbiologische Präparationen (Protokolle s. Anhang)</i>	38
3.3.1	Allgemeine Maßnahmen	38
3.3.2	RNA-Isolierung und -Aufreinigung	39
3.3.3	Herstellung von cDNA mittels der reversen Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	39
3.3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	41
3.3.4.1	Primer	41
3.3.4.2	Temperaturprogramm	41
3.3.4.3	Gelelektrophorese	43
3.3.4.4	Sequenzierung der aufgereinigten cDNA	43
4	Ergebnisse	44
4.1	<i>Histologie (HE-Färbung) der Mamma</i>	44
4.1.1	4 Wochen Behandlung MENT (16 Beagle-Rüden)	45
4.1.1.1	Vehikelgruppe	45
4.1.1.2	Niedrige Dosisgruppe	45
4.1.1.3	Mittlere Dosisgruppe	46
4.1.1.4	Höchste Dosisgruppe	46
4.1.2	4 Wochen Behandlung Backup (16 Beagle-Rüden)	47
4.1.2.1	Vehikelgruppe	47
4.1.2.2	Niedrige Dosisgruppe	47
4.1.2.3	Mittlere Dosisgruppe	48
4.1.2.4	Höchste Dosisgruppe	48
4.1.3	39 Wochen Behandlung Backup (32 Beagle-Rüden)	49
4.1.3.1	Vehikelgruppe	49
4.1.3.2	Niedrige Dosisgruppe	49
4.1.3.3	Mittlere Dosisgruppe	50
4.1.3.4	Höchste Dosisgruppe	50
4.2	<i>Immunhistologie</i>	51
4.2.1	Androgenrezeptor (AR)	52
4.2.2	Progesteronrezeptor (PR)	53
4.2.3	Estrogenrezeptor (ER)	54
4.2.4	Growth-Hormonrezeptor (GHR)	55
4.2.5	Growth-Hormon (GH)	56
4.2.6	Aromatase	57
4.2.7	Growth-Hormon RNA-Nachweis in der Hypophyse und im Milchdrüsengewebe	58
4.2.8	Sequenzanalyse	59
4.2.8.1	Auswertung der Sequenzdaten	59

Inhalt	5
<hr/>	
5 Diskussion	61
5.1 Versuchsaufbau	61
5.2 Methode	61
5.3 Histologie/Immunhistochemie	62
5.4 Mechanismus zur Mammaproliferation	64
5.5 Schlussfolgerung	65
6 Zusammenfassung	66
7 Summary	67
8 Schrifttum	68
9 Anhang	79
9.1 Immunhistologie	79
9.1.1 Verdünnung der primären Antikörper	79
9.1.1.1 Gebrauchslösung des biotinylierten anti-Immunoglobulin-Konzentrats (Link) bzw. des Streptavidin-Peroxidase-Konzentrats (Label)	79
9.1.2 Protokoll der Immunhistologie (LSAB-Methode) für Paraffinschnitte	79
9.2 Molekularbiologische Protokolle	81
9.2.1 Protokoll zur reversen Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	81
9.2.2 Protokoll zur PCR	83
9.3 Bezugsquellen für Reagenzien und Einmalware	85
9.4 Bezugsquellen für Geräte	87
9.5 Lösungen und Puffer	88
9.5.1 Immunhistologie	88
9.6 Tabellen	89
9.6.1 Androgenrezeptor (AR) individuelles Grading	89
9.6.1.1 4 Wochen MENT	89
9.6.1.2 4 Wochen Backup	89
9.6.1.3 39 Wochen Backup	90
9.6.2 Progesteronrezeptor (PR) individuelles Grading	91
9.6.2.1 4 Wochen MENT	91
9.6.2.2 4 Wochen Backup	91
9.6.2.3 39 Wochen Backup	92
9.6.3 Estrogenrezeptor (ER) individuelles Grading	93
9.6.3.1 4 Wochen MENT	93
9.6.3.2 4 Wochen Backup	93

9.6.3.3	39 Wochen Backup	94
9.6.4	Growth-Hormonrezeptor (GHR) individuelles Grading	95
9.6.4.1	4 Wochen MENT	95
9.6.4.2	4 Wochen Backup	95
9.6.4.3	39 Wochen Backup	96
9.6.5	Growth-Hormon individuelles Grading	97
9.6.5.1	4 Wochen MENT	97
9.6.5.2	4 Wochen Backup	97
9.6.5.3	39 Wochen Backup	98
9.6.6	Aromatase individuelles Grading	99
9.6.6.1	4 Wochen MENT	99
9.6.6.2	4 Wochen Backup	99
9.6.6.3	39 Wochen Backup	100
9.7	<i>Lichtmikroskopische Abbildungen (Histologie/Immunhistologie)</i>	<i>101</i>
9.7.1	HE-Färbung	101
9.7.2	Androgenrezeptor	103
9.7.3	Progesteronrezeptor	104
9.7.4	Estrogenrezeptor	106
9.7.5	Growth-Hormonrezeptor	108
9.7.6	Growth-Hormon	109
9.7.7	Aromatase	111
9.8	<i>ABKÜRZUNGEN</i>	<i>112</i>

1 Einleitung

Bei der toxikologischen Prüfung eines dermal zu applizierenden steroidalen Androgens im Rahmen einer regulatorischen, präklinischen Prüfung an männlichen Beaglehunden (ICH Topic M 3 (R1) CPMP/ICH/286/95: Maintenance of the ICH Guideline on Non-Clinical Safety Studies for the conduct of Human Clinical Trials for Pharmaceuticals. <http://www.ich.org/cache/comp/276-254-1.html>), wurden nach 4 bzw. 39 Wochen täglicher Behandlung unter GLP-Bedingungen ("Good Laboratory Practise" gemäß den OECD Grundsätzen der Guten Laborpraxis (GLP; überarbeitete Fassung von 1997, ENV/MC/CHEM(98)17) deutlich vergrößerte Mammakomplexe, im Sinne einer Gynäkomastie, beobachtet. Ziel dieser Arbeit war es, den möglichen Mechanismus aufzuklären und somit einen Beitrag zur Risikoabschätzung für die Anwendung beim Menschen zu geben. Dabei sollten die Hypothesen, dass beim Rüden eine lokale Produktion von "*Growth-Hormon*" und/oder eine Aromataseaktivierung ursächlich bei der Entstehung der Gynäkomastie eine Rolle spielen, überprüft werden.

Gynäkomastie ist definiert als Vergrößerung der männlichen Brust aufgrund von Proliferation alveolärer und ductaler Strukturen. Sie wird beim Menschen in Abhängigkeit vom Alter zwar häufig (30-65 %) beobachtet, spielt aber insgesamt als Leiden wegen des meist nur temporären Auftretens keine Rolle (Stumpf, 2004; Braunstein, 1993; Bembo and Carlson, 2004). Die Ursachen, die zu einer Gynäkomastie beim Mann führen wie zum Beispiel eine erhöhte Aromataseaktivität unter anderem im Brustgewebe (Braunstein, 1999; Stratakis et al., 1998; Sasano et al., 1996) sind bekannt und ausführlich beschrieben (Mathur and Braunstein, 1997; Glass, 1994; Bembo and Carlson, 2004; Hershkovitz and Leiberman, 2002; Prisant and Chin, 2005; Wilson et al., 1980; Lazala and Saenger, 2002; LaFranchi et al., 1975). Spontane und induzierte Fälle sind in der Regel die Folge hormoneller Imbalancen im Androgen- und Estrogenhaushalt (Mathur and Braunstein, 1997; Mischke et al., 2002; Glass, 1994). In der Veterinärmedizin wird die Gynäkomastie im Vergleich zur Humanmedizin selten beobachtet. Lediglich einzelne Fallbeschreibungen vor allem beim Rüden und beim Ziegenbock sind zu finden. So tritt die Gynäkomastie beim Rüden bei hormonell aktiven Hodentumoren wie dem Sertolizelltumor oder dem Seminom auf (Köhler, 1950; Peters et al., 2000; Kim and Kim, 2005; Mischke et al., 2002). Beim Ziegenbock kann die Gynäkomastie physiologisch auftreten (al Jassim and Khamas, 1997), kommt aber auch als Folge von genetischen Defekten (Chromosomenaberration, Deletion des Y-Chromosoms) oder estrogenproduzierenden Tumoren vor (Wooldridge et al., 1999; Lofstedt et al., 1994; Rieck GW, 1975; Basrur and Yadav, 1990). Vereinzelt finden auch Fälle von Gynäkomastien der Ratte und dem Affen in der Literatur Erwähnung (Ringler and Abrams, 1972; Young, 1980; Ma et al., 2000).

Medikamenteninduzierte Gynäkomastie ist sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin beschrieben. Beispielsweise kann die Anwendung bzw. der Missbrauch von Androgen beim Mann, aber auch der Einsatz von Estrogenen und/oder Antiandrogenen bei der Behandlung von Prostatatumoren in seltenen Fällen zur Ausbildung einer Gynäkomastie führen (Maravelias et al., 2005; Prezioso et al., 2004; Evans, 1997). Bei der Applikation von Gestagenen bei Rüden und Katern wurde die Entwicklung einer Gynäkomastie beschrieben (Patricelli et al., 1999; Braun et al., 1984).

2 Literaturübersicht

2.1 Gynäkomastie- Vorkommen und Histologie

Gynäkomastie ist eine benigne Proliferation der männlichen Brustdrüse, bei der es aufgrund der Zunahme von Bindegewebe, Alveolen und Milchdrüsengängen zu einer Vergrößerung der Brust kommt. Weitere morphologische Veränderungen dabei sind Hypervaskularisierung des Stromas sowie Bindegewebsfibrosen und -hyalinisierung. Nicht selten werden auch periduktale Manschetten durch lockeres Bindegewebe gebildet, in denen mononukleäre Zellinfiltrate vorkommen können. Die Proliferation der Gangstrukturen ist durch Längenwachstum, Ramifikation, Pseudoläppchen- und Knospenbildung (buds) geprägt. Ein mehrschichtiges Epithel und die Ausbildung von intraluminalen Sprossen und Papillen sind ebenfalls für die Proliferation der Gänge charakteristisch. Dabei werden, von einigen wenigen Ausnahmen abgesehen, keine „echten“ azinösen Läppchen wie bei der weiblichen Brust entwickelt (Nicolis et al., 1971). Histologisch kann die Gynäkomastie in drei ineinander übergehende Stadien eingeteilt werden:

Einem frühen Stadium, in dem hyperplastische Drüsengänge mit proliferierendem Epithel, ödematöses Stroma und lockereres Bindegewebe auftreten, folgt ein intermediäres Stadium, das durch erhebliche Bindegewebszubildung sowie von einem periduktalem Ödem geprägt ist. Das späte Stadium weist dilatierte, teilweise zystische Gänge und ein fibrotisches, zum Teil auch hyalinisiertes Bindegewebe auf (Lazala and Saenger, 2002). Die Gynäkomastie muss differentialdiagnostisch von der *Pseudogynäkomastie* unterschieden werden, die ohne Beteiligung des Drüsenparenchyms über eine Proliferation des Bindegewebes oder durch Lipideinlagerung (Adipositas) zu einer vergrößerten Brustdrüse führt. Insbesondere bei unilateralem Brustwachstum muss das Vorliegen eines Mammakarzinoms differentialdiagnostisch in Betracht gezogen werden (Stumpf, 2004; Mathur and Braunstein, 1997).

2.1.1 Physiologische Gynäkomastie beim Mann

In Abhängigkeit vom Lebensalter können beim Mann drei Phasen einer physiologischen Gynäkomastie beobachtet werden (Wilson et al., 1980).

Etwa 60-90 % der männlichen Neugeborenen bilden innerhalb der ersten sechs Monate nach der Geburt eine transiente Gynäkomastie aus. Dabei wirken plazentale Estrogene pränatal auf das Brustgewebe ein. Diese Wirkung hält postnatal eine zeitlang an. Diese frühe Gynäkomastie ist selbstlimitierend und entwickelt sich nach einigen Wochen zurück (Wilson et al., 1980; Braunstein, 1993; Mathur and Braunstein, 1997; Hershkovitz and Leiberman, 2002).

In der Pubertät entwickelt sich bei etwa 4-65 % der Jungen zwischen dem 10. und 16. Lebensjahr eine temporäre Gynäkomastie (Braunstein, 1993; Wilson et al., 1980), die sich spontan innerhalb von zwei bis drei Jahren zurückbildet (Hershkovitz and Leiberman, 2002). Ursächlich ist daran ein im Vergleich zum Testosteron stark angestiegener Estrogenspiegel beteiligt: Während der Pubertät steigt der Estrogenspiegel um das dreifache und der Testosteronspiegel etwa um das 30-fache. Damit wird ein Estrogenlevel erreicht, der dem eines erwachsenen Mannes entspricht, der Testosteronlevel liegt zu dieser Zeit (12.-15. Lebensjahr) jedoch noch weit unter dem des Adulten (12-180 ng/dL vs. 300-1000 ng/dL). Somit bleibt die estrogenantagonisierende Wirkung des Testosterons aus (Moore et al., 1984; Veldhuis et al., 1987; Bidlingmaier and Knorr, 1973; Braunstein, 1999; Braunstein, 1999). Für den erhöhten Level an weiblichen Sexualhormonen ist das in der Nebennierenrinde synthetisierte Androstendion, ein androgenes 17-Ketosteroid, das vom Enzym Aromatase in Estrogen umgesetzt wird, verantwortlich. Daneben kann auch der Beginn der Estrogensekretion zeitlich vor der Testosteronsekretion stattfinden und auf das Milchdrüsenepithel wirken (Braunstein, 1999; Wilson et al., 1980). Der angestiegene Estrogenspiegel wird durch eine verminderte Bildung der in der Nebennierenrinde gebildeten androgenen Vorstufen Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEA-S) oder aber durch eine erhöhte Aromatisierung dieser Substrate erklärt (Moore et al., 1984). Zusätzlich kann bei einigen Patienten die erhöhte Sensibilität des Brustgewebes auf Estrogen zur Ausbildung der Gynäkomastie beitragen (Moore et al., 1984; Braunstein, 1993).

Bei 30-50 % aller Männer im Alter zwischen 50 und 85 Jahren kann eine Art Altersgynäkomastie beobachtet werden (Mathur and Braunstein, 1997). Ursache ist die altersbedingt verminderte Androgenbiosynthese und -sekretion, die zu einem Abfall des Serumtestosteronwerts führt. Der physiologische Serumestrogenspiegel bleibt dabei unverändert (Bembo and Carlson, 2004; Braunstein, 1993; Wilson et al., 1980). Darüber hinaus ist im Senium ein Ansteigen der Serumkonzentration des Sexhormon bindenden Globulins

(SHBG), ein Transportprotein, das eine erhöhte Bindungsaffinität zu Androgenen besitzt, zu beobachten. Dies und der mit zunehmendem Alter ansteigende Fettgewebsanteil, in dem die Aromatisierung von Testosteron (T) zu Estradiol (E₂) und dem von der Nebenniere ausgeschütteten Androstendion zu Estriol stattfindet, führt zu einer weiteren Reduktion des freien Testosterons. Damit wird das Verhältnis von Androgen zu Estrogen weiter zu Gunsten des Estrogens verschoben (Braunstein, 1999; Braunstein, 1993; Wilson et al., 1980; Ismail and Barth, 2001).

2.1.2 Rolle der Aromatase bei der Gynäkomastie

Die Aromatase (CYP450_{Arom}) ist ein Enzym der Cytochrom P450 Superfamilie, das die irreversible Synthese von Estrogen aus androgenen Steroidhormonen (Testosteron und Androstendion) katalysiert (Carreau et al., 2003; Conley and Hinshelwood, 2001). Cytochrom P450 liegt als Enzymkomplex vor, der aus der Aromatase P450_{Arom}, auch Estrogensynthetase genannt, und dem Flavoprotein NADPH-Cytochrom P450 Reduktase zusammengesetzt ist. Dieser Komplex ist im Endoplasmatischen Retikulum der Zellen lokalisiert, in denen er exprimiert wird (Conley and Hinshelwood, 2001; Simpson et al., 1997). Testikuläres Testosteron und das in der Nebennierenrinde gebildete Androstendion dienen als Substrate für die Synthese der Estrogen derivative Estradiol respektive Estron (Conley and Hinshelwood, 2001; Simpson et al., 1997). Bei der Aromatisierung bildet das Enzym einen Komplex mit dem Substrat und katalysiert die Reaktion, den A-Ring des Sterangerüsts der C₁₉Steroide in einen Phenolring zu überführen (Braunstein, 1999; Simpson et al., 1997). Cytochrom P450_{Arom} ist bei Säugetieren mit einer 50-90 %igen Übereinstimmung der Peptid-Sequenzen stark konserviert und wird auch bei anderen Vertebraten wie Reptilien, Vögeln, sowie Amphibien exprimiert. Aromataseaktivität konnte in der Plazenta, den Ovarien, den Testes (Sertoli- und Leydig-Zellen), dem Gehirn, den Adipozyten, in den Osteoblasten der Knochen, dem Stroma des Brustgewebes und in den Fibroblasten der Haut nachgewiesen werden. Bei Nagetieren scheint Aromatase nur im Gehirn und den Gonaden exprimiert (Simpson et al., 1997; Conley and Hinshelwood, 2001; Turner et al., 2002).

2.1.3 Androgen- und Estrogenproduktion beim Mann

Die Steroidhormonsynthese und -sekretion der Gonaden unterliegt einem Feedback gesteuerten Regelwerk, das seinen Ursprung im Hypothalamus hat.

Das vom Hypothalamus produzierte und pulsatil ausgeschüttete Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) gelangt über das hypophysäre Pfortadersystem in die Hypophyse. Im Hypophysenvorderlappen steuert es die Synthese, Speicherung und Sekretion der Gonadotropine: das luteotrope Hormon (LH) und das follikelstimulierende Hormon (FSH). LH wirkt auf die

Leydig-Zellen (syn. interstitielle Drüsenzellen) im Hoden und regt diese zur Testosteronbiosynthese an. Testosteron wirkt im Synergismus mit dem durch Aromatisierung aus Testosteron gebildeten Estradiol hemmend sowohl auf den Hypothalamus als auch auf den Hypophysenvorderlappen. Die Freisetzung von GnRH aus dem Hypothalamus wird reduziert und in der Hypophyse nimmt sowohl die Amplitude als auch die Sekretion von LH ab (Mathur and Braunstein, 1997; Rochira et al., 2006; Wilson et al., 1980; Hayes et al., 2000).

Im gesunden Mann werden täglich ungefähr 6 mg Testosteron synthetisiert und in das Blut abgegeben. Pro Tag werden dagegen nur 6-10 µg Estradiol und 2,5 µg Estron in den Hoden produziert, das entspricht 15 % respektive 5 % der Gesamtmenge der im Blut zirkulierenden Estrogene (Hershkovitz and Leiberman, 2002). 85 % des Estradiols und etwa 95 % des Estrons werden jedoch im extragonadalen Gewebe (Fettgewebe, Leberzellen, Muskelzellen) durch Aromatisierung von Testosteron respektive Androstendion gebildet (Mathur and Braunstein, 1997; Braunstein, 1993).

Der Großteil der oben genannten Steroidhormone wird im Blutkreislauf durch das SHBG, das eine höhere Bindungsaffinität zu Androgenen als zu Östrogenen besitzt, transportiert (Mathur and Braunstein, 1997; Rochefort and Garcia, 1983).

2.1.4 Pathologische Gynäkomastie beim Mann

Die Gynäkomastie gilt als pathologisch, wenn die Mechanismen, die zu einer Proliferation der männlichen Brustdrüse führen, nicht denen bei der physiologischen Gynäkomastie angeführten Ursachen angehören. Für die Verschiebung des Estrogen-Androgen-Verhältnisses, das zu einer estrogeninduzierten Gynäkomastie führt, sind neben erhöhter Estrogenproduktion, eine erhöhte Sensibilität des Brustgewebes auf Estrogene, eine verminderte Androgenbiosynthese sowie Nebenwirkungen von Medikamenten verantwortlich (Tabelle 2.1.4.3: 1) (Mathur and Braunstein, 1997; Braunstein, 1993; Bembo and Carlson, 2004; Wilson et al., 1980).

2.1.4.1 Erhöhte Estrogenserumkonzentration

Pathologisch erhöhte Estrogenlevel (>5 ng/dL) werden bei verschiedenen Veränderungen beobachtet:

Estrogenbildende Tumoren sind die häufigste Ursache erhöhter Estrogenspiegel. Dabei können prinzipiell alle gonadalen Proliferationen und Neoplasien aufgrund einer erhöhten testikulären Aromataseaktivität Estrogen im Überschuss bilden. Bekannt ist dies für Leydig-Zelltumore und -proliferationen, Sertoli-Zelltumoren und auch für Keimzelltumore (Seminome), zu denen v.a. kryptorchide Hoden neigen. Die Estrogenbiosynthese des Tumors erhöht den Serum-Estradiolspiegel und führt wegen der hemmenden Wirkung des Estradiols auf die Hypophyse (negativer Feedback) zu einem niedrigen Gonadotropin- und Testosteronlevel. Des Weiteren stimuliert Estrogen die Bildung von SHBG in der Leber, das bevorzugt Testosteron bindet und somit zur Absenkung des freien Testosterons führt (Bembo and Carlson, 2004; HersHKovitz and Leiberman, 2002; Mathur and Braunstein, 1997).

Auch Tumore der Nebennierenrinde können indirekt für einen erhöhten Estrogenspiegel verantwortlich sein, indem sie vermehrt Androstendion, DHEA und DHEA-S bilden, die dann zu Estradiol aromatisiert werden (HersHKovitz and Leiberman, 2002; Bembo and Carlson, 2004).

Ebenso können choriongonadotropinproduzierende Tumoren (Chorionkarzinome, Keimzelltumore, Lungentumore, Tumoren des Gastrointestinaltrakts) indirekt zu einer Estrogenvermehrung führen. Das humane Choriongonadotropin (hCG), ein während der Schwangerschaft in der Plazenta gebildetes Gonadotropin, das weitgehend identisch mit dem hypophysären Gonadotropin LH ist, stimuliert unter anderem die Aromataseaktivität in den Testikeln. HCG produzierende Tumoren führen zu einer erhöhten Produktion und Ausschüttung von Estradiol durch die Leydig-Zellen in den Testikeln (Bembo and Carlson, 2004; Ismail and Barth, 2001; HersHKovitz and Leiberman, 2002; Weinstein et al., 1974; Rieu et al., 1995).

Eine erhöhte Estradiolbiosynthese in den Hoden kann auch durch einen andauernden LH-Stimulus, ausgelöst durch eine verminderte Testosteronbiosynthese (z.B. beim Klinefelter Syndrom), verursacht werden. Die Zunahme der intratestikulären Estrogenkonzentration führt wiederum zu einer Hemmung der Testosteronbiosynthese und -sekretion (Ismail and Barth, 2001; Wilson et al., 1980).

Bei verschiedenen Lebererkrankungen wie Zirrhose (Gordon et al., 1975; Cavanaugh et al., 1990) oder Leberzellkarzinom (Kew et al., 1977; Agarwal et al., 1998) kommt es gelegentlich zu einer Gynäkomastie, jedoch ist der dafür verantwortliche Mechanismus nicht eindeutig geklärt. Bekannt ist, dass bei Leberzirrhose die Androstendionspiegel erhöht sind, die durch

Aromatisierung zu einem erhöhten Estrogenspiegel führen können (Gordon et al., 1975). Aufgrund der Aromataseaktivität im peripheren Fettgewebe besteht ein Zusammenhang zwischen Adipositas und Gynäkomastie (Ismail and Barth, 2001; Ismail and Barth, 2001; Stumpf, 2004).

2.1.4.2 Reduzierte Androgenserumkonzentration

Eine verminderte oder fehlende endokrine Aktivität der Geschlechtsdrüsen (Hypogonadismus) führt ebenfalls zu einer Gynäkomastie. Zu einem erniedrigten Androgenspiegel können das Klinefelter-Syndrom (47,XXY), traumatische oder entzündliche Schädigungen des Hodens führen (primären Hypogonadie). Ebenso kann eine Erniedrigung der Gonadotropine im Serum durch traumatische Veränderungen oder entzündliche Prozesse des Hypothalamus/Hypophysenvorderlappens zu einem erniedrigten Androgenspiegel führen (sekundäre Hypogonadie) (Mathur and Braunstein, 1997; Ismail and Barth, 2001; Guay et al., 1995; Silveira et al., 2002). Wilson *et al.* (1980) beschreibt, dass testikuläre Enzymdefekte der Testosteronbiosynthese (Umwandlung von Cholesterin zu Testosteron) zu einer Gynäkomastie führen können.

2.1.4.3 Medikamenteninduzierte Gynäkomastie

Etwa 20 bis 25 % der Gynäkomastien können als Nebenwirkungen bei Anwendung von Medikamenten beobachtet werden (Tabelle 2.1.4.3: 2).

Einige Substanzen besitzen eine Estrogenpartialwirkung wie zum Beispiel das Herzglykosid Digitoxin (Rifka et al., 1978). Andere Substanzen wie zum Beispiel die Antiandrogene Cyproteronacetat (Geller et al., 1968) und Flutamid (Caine et al., 1975) oder das Antihistaminikum Cimetidin (Hall, 1976; Garcia Rodriguez and Jick, 1994; Funder and Mercer, 1979) besitzen antiandrogene (Partial-) Wirkungen. Sie verdrängen Testosteron und Dihydrotestosteron aus ihrer Bindung am Androgenrezeptor. Dadurch kommt es zu einer herabgesetzten Androgenwirkung und einem damit verbunden verminderten Estrogen antagonistischen Effekt (Stumpf, 2004; Ismail and Barth, 2001; Bembo and Carlson, 2004; Wilson et al., 1980; Braunstein, 1999).

Die Verabreichung von Testosteron (z.B. als Hormonersatztherapie bei hypogonadalen Männern) in therapeutischer Dosis kann durch Aromatisierung zur Gynäkomastie führen, ebenso wie auch der Missbrauch von Testosteron bei Leistungssportlern (Bembo and Carlson, 2004; Rhoden and Morgentaler, 2004; Lukas, 1993; Evans, 1997; Maravelias et al., 2005). Auch die Behandlung des Prostatakarzinoms mit Estrogenen und/oder Antiandrogenen kann zu einer Gynäkomastie führen (Prezioso et al., 2004).

Das oral anwendbare Breitspektrumantimykotikum Ketokonazol (ein Imidazolderivat) führt in hohen Dosen zur Hemmung der in der Testosteronbiosynthese beteiligten Cytochrom P-450 Enzyme (17 α -Hydroxylase und 17,20-Lyase) in den Leydig-Zellen. In therapeutischen Dosen sinken die Testosteronlevel bis auf das bei Kastraten beobachtete Niveau ab (Mahler et al., 1993; Grosso et al., 1983; Pont et al., 1985). Ebenfalls häufig mit Gynäkomastie in Verbindung gebracht wird das Diuretikum Spironolacton. Es hemmt durch das Herabsetzen der Enzymaktivität von 17 α -Hydroxylase die Testosteronbiosynthese und verhindert die Rezeptorbindung von Testosteron und Dihydrotestosteron (Loriaux, 1976). Androgene sowie Estrogene sind physiologischerweise an das Sexhormonbindende Globulin (SHBG) gebunden, wobei Androgene eine höhere Bindungsaffinität aufweisen als Estrogene. Verschiedene Substanzen (z.B. Fluconazol, Spironolacton) verdrängen Steroidhormone aus ihrer inaktivierenden peripheren Transportbindung. Dabei werden aufgrund der geringeren Affinität die schwächer gebundenen Estrogene eher verdrängt und in ihre aktive Form überführt (Ismail and Barth, 2001; Stumpf, 2004; Thompson and Carter, 1993). Die Aufnahme von Estrogenen z.B. durch estrogenhaltige Haarpflegesubstanzen kann zu einer erhöhten Östrogenserumkonzentration führen und damit ursächlich für eine Gynäkomastie sein (Braunstein, 1993; Stumpf, 2004; Gottswinter et al., 1984).

Tabelle 2.1.4.3: 1: Formen und Ursachen der Gynäkomastie beim Mann (modifiziert nach (Hershkovitz and Leiberman, 2002; Mathur and Braunstein, 1997))

Physiologische Gynäkomastie

Neonatal → maternales Estrogen

Pubertät → temporäre Androgen- Estrogen- Imbalance

Senium → Adipositas, Testosteronbiosynthese↓

Pathologische Gynäkomastie

Erhöhtes Serumestrogen durch:

Aromataseaktivität ↑

Verdrängung von Estrogen aus der Bindung zum SHBG

Adipositas

Sertolizell-Tumor

Leydigzell-Tumor

Keimzellentumor

Negativer Feedback ($E2 \uparrow \rightarrow LH \downarrow \rightarrow T \downarrow$)

Nebennierentumore

hCG produzierende Tumore:

Chorionkarzinome, Lungentumore, Tumoren des Gastrointestinaltrakts

Verminderte Testosteronbiosynthese

Hypogonadismus

Primär:

Klinefelter- Syndrom, Hermaphroditismus, Hypogonadismus, Kongenitale Anorchie

Sekundär:

virale Orchitiden, Kastration, Trauma, Hypothalamisch/hypophysär

hCG= humanes Choriongonadotropin, LH= Luteinisierendes Hormon, E2= Estrogen, T= Testosteron, SHBG= sex hormone binding globulin (sexuahormonbindendes Globulin), ↑= Anstieg, ↓= Abfall

Bei der Mehrzahl der Substanzen ist der Pathomechanismus, der zur Induktion der Gynäkomastie führt, noch nicht geklärt, da die Proliferation des Brustdrüsengewebes auch durch nicht aromatisierbare Substanzen wie z.B. Dihydrotestosteron und Methyltestosteron ausgelöst werden kann (Stumpf, 2004; Wilson et al., 1980; Mathur and Braunstein, 1997; Bembo and Carlson, 2004).

Tabelle 2.1.4.3: 2: Mechanismen der medikamenteninduzierten Gynäkomastie (modifiziert nach (Hershkovitz and Leiberman, 2002))

Medikament	Mechanismus
Spironolacton, Fluconazol, Ketokonazol	Verdrängung des Estrogens aus der SHBG-Bindung
hCG, Androgene	Erhöhte Estrogenbiosynthese durch Aromatase
Ketokonazol, Liarozol, Fluconazol	Herabgesetzte Testosteronbiosynthese
Digitoxin, Isoniazid, Estrogenhaltige Substanzen	Estrogenpartialwirkung
Cyproteronacetat, Flutamid, Spironolacton, Cimetidin	Blocken des Androgenrezeptors

hCG= humanes Choriongonadotropin, SHBG= *sex hormone binding globulin* (sexualhormonbindendes Globulin)

2.2 Gynäkomastie bei Säugetieren

Gynäkomastien werden beim Tier nur sehr selten beobachtet und von manchen Autoren als Hypertrophie der Milchdrüse des männlichen Tieres als Folge endokriner Störungen (Sertoli-Zelltumor, Hodenhypoplasie, Kryptorchismus) beschrieben (Weiss and Käufer-Weiss, 1999). Wie auch beim Menschen, ist die Gynäkomastie von der *Pseudogynäkomastie* (Gynaekomastia falsa), die nur aus Binde- und Fettgewebe besteht zu unterscheiden (Schonbauer, 1981; Heidrich and Renk W., 1967). Gynäkomastien sind in der Literatur meist beim Ziegenbock und beim Rüden zu finden. Aber auch Fälle von Gynäkomastie beim Affen sind beschrieben (Ringler and Abrams, 1972; Young, 1980).

Einzelne Fälle von neonatalen Brustdrüsenentwicklungen sind bei Ziegen, Fohlen, Lämmern, Kälbern und Hundewelpen bekannt, dabei wird kurz nach der Geburt eine Schwellung der noch rudimentär entwickelten Mamma beschrieben (Heidrich and Renk W., 1967).

2.2.1 Ziegenbock

Die Ätiologie der Gynäkomastie der männlichen Ziege ist sehr unterschiedlich. Es können sowohl familiäre Dispositionen, Chromosomenanomalien, hormonelle Veränderungen oder die mechanische Reizung der Milchdrüse als Ursache in Frage kommen (Wooldridge et al., 1999).

In früheren Untersuchungen konnte bei einem fertilen, hornlosen und laktierenden Ziegenbock eine Chromosomenaberration mit einem chromosomalen Mosaik (XO/XY) und Deletion des Y-Chromosoms nachgewiesen werden, die als mögliche Ursache für die Gynäkomastie betrachtet wurde (Marx et al., 1975). Milchbildung- und Sekretion bei Ziegenböcken, die einen normalen männlichen Habitus, sowie gesunde Nachkommen hatten, sind ebenfalls beschrieben. Als Ursache für die Gynäkomastie wurden erhöhte Hormon- Serumwerte (Estrogen, Prolaktin, Growth-Hormon) und tumoröse Veränderungen (Mammakarzinom, Nebennierenrindenadenom) genannt (al Jassim and Khamas, 1997; Lofstedt et al., 1994; Wooldridge et al., 1999; Janett et al., 1996).

2.2.2 Hund

Gynäkomastie beim Hund wird meist im Zusammenhang mit gonadalen Tumoren beobachtet. Die Häufigkeit, dass alte Rüden (ca. >6 Jahre) an einem Hodentumor erkranken, liegt bei ca. 60 %, durch Kryptorchismus wird das Risiko der Entwicklung eines Hodentumors um das ca. 26-fache erhöht (Peters et al., 2000). Meist sind es Sertoli-Zelltumoren, die in etwa 25 % der Fälle estrogene Hormone produzieren (Heidbrink and Kaup, 1990). Sie werden häufig bei älteren Hunden und in dystopischen Hoden beobachtet und sind in Fall-

beschreibungen als Ursache für eine Gynäkomastie diagnostiziert worden (Heidbrink and Kaup, 1990; Khodakaram Tafti A and Ahmadi M R, 1998; Castro et al., 1999; Peters et al., 2000; Peters et al., 2003). Aber auch Seminome und Leydig-Zelltumore sind als Ursache eines Hyperestrogenismus beschrieben (Kim and Kim, 2005; Peters et al., 2001). So wurde schon 1950 von einem Hund (Dackelrüde, 9 Jahre alt) mit laktierender Mamma berichtet, der wegen eines Seminoms, ausgehend von einem kryptorchen Hoden, euthanasiert wurde. Die Histologie der Brustdrüse ergab eine Proliferation des Drüsengewebes, das dem Bild der Gynäkomastie entspricht (Köhler, 1950). Durch die erhöhte Sekretion von Estrogenen dieser Tumoren kommt es zu Feminisierungserscheinungen in Form von Gynäkomastie, Libidoverlust und Attraktivität für andere Rüden. Feminisierungserscheinungen kommen in 19 % der diagnostizierten Sertoli-Zelltumoren vor und nur zu 5 % bei Leydig-Zelltumoren (Peters et al., 2000). Bei Hodentumoren insbesondere beim Sertoli-Zelltumor sind Hautveränderungen wie zum Beispiel Alopezie, Akanthose und/oder Hyperpigmentierung ebenfalls eine Folge der estrogenen Wirkung (Peters et al., 2001). Zusätzlich kann es durch den Estrogenexzess zu einer irreversiblen Knochenmarksschädigung mit aplastischer Anämie (Panmyelophthise) und einer hämorrhagischen Diathese kommen. Bei Sertoli-Zelltumoren ist die Produktion von Estrogenen bekannt, jedoch ist der Mechanismus beim Leydig-Zelltumor sowie dem Seminom noch unklar. (Weiss and Käufer-Weiss, 1999; Heidbrink and Kaup, 1990; Peters et al., 2000).

2.2.3 Medikamenteninduzierte Gynäkomastie

Auch in der Veterinärmedizin sind Gynäkomastien nach Verabreichung von Medikamenten beschrieben worden:

Braun *et al.* berichtet von einer Gesäugeveränderung bei Rüden nach einer Gestagenbehandlung. Das klinische Bild war mit dem der bei der Hündin vorkommenden Lactatio falsa vergleichbar. Gestagene können eine Hyperplasie und Sekretion des Gesäuges sowie das Auftreten von Mammatumoren bei der Hündin verursachen (Braun et al., 1984). Bei einem Kater trat während der Behandlung mit Medroxyprogesteron ebenfalls eine transiente Gynäkomastie auf (Patricelli et al., 1999). Auch bei Rattenböcken ist eine medikamenteninduzierte (Moclobemide, Antidepressivum) Gynäkomastie beschrieben (Ma et al., 2000).

2.2.4 Weitere Ursachen für eine Gynäkomastie

Die Gynäkomastie bei Fällen von Hermaphroditismus verus ist selten, aber auch bei Ziege, Rind, Schaf sowie beim Hund und der Katze beschrieben. Sie lässt sich durch die Ovarialfunktion erklären und stellt keine echte Gynäkomastie im Sinne der Definition dar. Als weitere Ursache für die Ausbildung einer Gynäkomastie sind das testikuläre Feminisierungssyndrom, dessen Ursache ein genetischer Defekt des Androgenrezeptor-Proteins ist (Androgeninsensitivität), sowie die Hodenhypoplasie, ein dem Klinefelter-Syndrom des Menschen vergleichbare Krankheit, zu nennen (Weiss and Käufer-Weiss, 1999; Rieck GW, 1975).

2.3 Allgemeines zur Milchdrüse (Glandula mammaria, Mamma)

Die Milchdrüse (Mamma) differenziert sich aus der Epidermis, einem Abkömmling des Ektoderms und wird den Hautdrüsen zugeordnet (Sinowatz, 1990). Die Milchdrüse ist eine modifizierte Schweißdrüse und aufgrund ihres Aufbaus eine zusammengesetzte tubuläre Drüse mit verzweigten Endstücken (Habermehl, 1996). Im Gegensatz zu den meisten anderen Organen erreicht die Milchdrüse ihre volle Entfaltung bis zur Funktionsreife erst verhältnismäßig spät, nach der Pubertät, und zwar nur beim weiblichen Geschlecht und nur unter den besonderen Bedingungen der Gravidität bzw. der andersgearteten Zyklusbedingungen bei der Hündin mit der stark verlängerten Gelbkörperphase (Smollich and Michel, 1992; Sinowatz, 1990). Es werden zwar bei beiden Geschlechtern Mammakomplexe angelegt, jedoch kommen sie bei den männlichen Individuen aufgrund fehlender hormoneller Stimulation nicht zur Entwicklung. Hier bestehen sie lediglich so dass aus einer Zitze mit rudimentärer Drüsenanlage (Koch and Berg, 1993). Jedoch können diese durch hormonelle Stimulation (paradoxe Hormongaben, hormonproduzierende Tumoren) auch zum Wachstum angeregt werden (Braun et al., 1984; Peters et al., 2000).

2.3.1 Anatomie

Grundsätzlich setzt sich jede Milchdrüseneinheit (Mammakomplex) aus dem Drüsenkörper (Corpus Mammae) mit zugehöriger Zitze (Papilla mammae) zusammen. Der Drüsenkörper enthält das Drüsenparenchym (Glandula mammaria), sowie deren Ausführungsgangsysteme, die in einer Zitze münden und das interparenchymatöse Bindegewebe, dass die Leitungsbahnen führt. Als Milchdrüse wird die gesamte bei einer Tierart vorkommende Anzahl von Mammakomplexen bezeichnet. Der Hund besitzt meistens je 5 Mammakomplexe (gelegentlich 4 oder 6) beidseits der ventralen Medianlinie, die beim Fleischfresser als Gesäuge bezeichnet werden. Beim Hund stellt die Milchdrüse ein bilateral symmetrisches thorakoinguinal aufgehängtes Organ dar. Die Zitzen sind zur Hälfte links und rechts der Medianen gelegen (Budras et al., 1996; Nickel et al., 1984). Die Paare der Mammakomplexe werden entsprechend ihrer Lokalisation als thorakal cranial, thorakal caudal, abdominal cranial, abdominal caudal sowie inguinal bezeichnet. Die Haut des Gesäuges und die Zitzenbasis sind fein behaart, die Zitze selbst nicht (Koch and Berg, 1993; Budras et al., 1996).

2.3.2 Histologie

Die nachfolgend dargestellte histologische Beschreibung stellt die Milchdrüse nach ihrer vollen Entwicklung dar, also zu einem Zeitpunkt in dem sie strukturell ausdifferenziert ist und die volle Funktionsfähigkeit für die Laktation erreicht hat.

Die einheitliche Grundstruktur der tubuloalveolären Drüse besteht aus unterschiedlich vielen Drüsenläppchen, die wiederum aus Drüsenendstücken (Alveolen) bestehen, die sich in den Drüsenschläuchen (Ductus lactiferi) vereinigen und anschließend in die Milchzisternen (Sinus lactiferi) münden. Diese stellen beim Hund keine weitläufigen Milchsammelräume sondern schlauchartige Gebilde dar. Ein Teil dieser Zisternen befindet sich noch im Drüsenkörper (Pars glandularis), der sich anschließende Teil wird bereits in der Zitze geführt (Pars papillaris) und mündet über die Strichkanäle (Ductus papillaris) an der Oberfläche der Zitze. Die Drüsenläppchen werden durch interlobuläres Bindegewebe (Interstitium), in dem die Leitungsbahnen (Kapillaren, Arteriolen, Venolen, Lymphgefäße, Nervenfasern) liegen, voneinander getrennt.

Die Alveolen besitzen ein einschichtiges Drüsenepithel, dass sich jedoch je nach Ausbildungsgrad ändert: In sekretgefüllten Alveolen ist das Epithel niedrig, während der Phase der Sekretbildung ist der Epithelverband isoprismatisch, bei Sekretabgabe hochprismatisch. Die Kerne der Epithelzellen ändern sich entsprechend von abgeplattet über rund bis längsoval. Umgeben wird das Drüsenepithel von Myoepithelzellen (Korbzellen) und daran anschließend von einer Basalmembran. Myoepithelzellen sind modifizierte Derivate des ektodermalen Hautblattes, verfügen über Oxytocinrezeptoren und sorgen als motorisches Endglied des Milchausschüttungsreflexes für die Entleerung der Drüsenalveolen. Das Myoepithel besitzt breite Bahnen feiner Myofibrillen, die parallel zur basalen Zellmembran liegen und keine Querstreifung aufweisen. Die Milchgänge sind proximal mit einem einschichtigen und distal mit einem zweischichtigen iso- bis hochprismatischen Epithel ausgekleidet. Die proximalen Wandepithelien haben auch die Fähigkeit zur (Milch-)Sekretion. Das interstitielle Bindegewebe setzt sich vorwiegend aus kollagenen Faserbündeln zusammen. Im ruhenden Zustand sind in das lockere Bindegewebe eine tierartlich unterschiedliche Anzahl von Fettzellen eingelagert, zudem werden die Alveolen rückgebildet, das Lumen verengt sich und kann gänzlich verschwinden (Liebich H-G, 1999;Weyrauch and Smollich, 1998).

Eine physiologisch geringfügige Infiltration von Mastzellen, Lymphozyten und Plasmazellen findet sich, besonders während der Involution und des Metestrus, im interstitiellen Bindegewebe (Cameron and Faulkin, Jr., 1971;Liebich H-G, 1999;Wrobel et al., 1974).

2.3.3 Ontogenese der caninen Mamma

In der embryologischen Entwicklung ist die Milchlinie, ein verdickter kaum sichtbarer Epidermisstreifen am Rande der Extremitätenleiste des Embryos, der Vorläufer der Milchleiste (Habermehl 1996). Durch Epidermiswucherung und Verdichtung des Koriums proliferiert sie zur Milchleiste, die ab dem 25. Trächtigkeitstag sichtbar wird. In regelmäßigen Abständen treten auf ihr Epidermisverdickungen (Milchhügel) auf, die ab dem 30. Trächtigkeitstag zu sehen sind (Sinowatz, 1990; Christensen G.C., 1979). Der Rest der Milchleiste bildet sich zurück. Die Milchhügel bilden die Vorläufer der späteren Mammakomplexe und werden durch das Wachstum der seitlichen Körperwand ventral verlagert. In der weiteren Entwicklung proliferiert das Epithel des Milchhügels stark und wächst als zapfenförmiger, solider Sproß (Mammaknospe) in die Tiefe. Um ihn verdichtet sich das Mesenchym zum Areolargewebe. An der äußeren Oberfläche der Mammarknospe setzt eine Verhornung des Epithels ein, die zur Bildung eines für lange Zeit bestehenbleibenden Hornfropfes führt. Durch Schrumpfung dieses Hornfropfes entsteht eine leichte Eindellung der Oberfläche, die Zitzen- oder Mammatasche. Durch diese Entwicklung bildet sich die Zitze mit Hof, die beim Hund flach verbleibt und daher Eversionszitze genannt wird. Von hier aus wachsen Epithelstränge (Primärsprosse) in die Tiefe des Gewebes ein (aus diesen wachsen später die Sekundärsprosse und zur Zeit der Pubertät bzw. der Gravidität die Tertiärsprosse). Die Anzahl der Epithelstränge entspricht der Anzahl der späteren Milchgänge. Beim Hund sind dies 8-14 pro Zitze. Aus dem Primärspross wird später der Strichkanal, aus den Sekundärsprossen die Milchgänge (Ductus lactiferi) und aus den Tertiärsprossen das sezernierende Milchdrüsengewebe (Glandulae mammae). Der Primärspross bildet einen Hohlraum aus, der jedoch aufgrund eines Hornfropfs noch keine offene Verbindung zur Oberfläche hat. Bis zur Geschlechtsreife entwickelt sich die Milchdrüse kaum weiter und besteht nur aus dem verzweigten Gangsystem, welches in einem zellreichen Bindegewebskomplex eingebettet ist (Sinowatz, 1990; Habermehl, 1996).

2.3.4 Postnatale Entwicklung der caninen Mamma

Die Milchdrüse ist bei beiden Geschlechtern vorhanden. Sowohl die männliche als auch die weibliche Mamma ist von der Geburt bis zur Geschlechtsreife in gleicher Weise entwickelt. Juvenile Milchdrüsen bestehen größtenteils aus Binde- und Fettgewebe, die dem eigentlichen Drüsengewebe als „Platzhalter“ dienen. Im interstitium vom Fleischfresser kommen im Gegensatz zu Rind und Pferd nur wenige Fettzellen vor (Habermehl, 1996; Christensen G.C., 1979; Weiss and Käufer-Weiss, 1999; Weiss and Käufer-Weiss, 1999; Weiss and Käufer-Weiss, 1999; Sinowatz, 1990).

Mit dem Einsetzen der Geschlechtsreife der Hündin beginnt das rudimentäre Mammagewebe zu wachsen und sowohl die Drüsenstrukturen, als auch das Stroma verändern sich. Bei der Proliferation der Mamma der Hündin nehmen Estrogen und Progesteron eine zentrale Stellung ein (Marinelli et al., 2004). Die Aktivierung der Progesteron-(PR) und Estrogen-Rezeptoren (ER) in der Mamma hat eine lokale extrahypophysäre Ausschüttung von "*Growth- Hormon*" (GH) zur Folge und stimuliert zusammen mit dem im Hypophysenvorderlappen gebildeten GH die Produktion und Freisetzung des "*insulin-like-growth-faktor*" I und II aus der Leber. Somit wird ein proliferatives Milieu in der Mamma geschaffen (Mol et al., 1997; Selman et al., 1994). Bei der Hündin wird mit Beginn der Pubertät nicht nur das Wachstum des Gangsystems stimuliert, sondern schon sezernierende Alveolen ausgebildet. Beim Rüden bleibt der juvenile Zustand der Milchdrüse auch nach der Pubertät erhalten (Sinowatz, 1990).

2.3.5 Zyklische Veränderungen des Mammaparenchyms bei der Hündin

Die Hündin gehört zu den saisonalen monoöstrischen Tieren, eine Ovulation erfolgt nur ein oder zweimal im Jahr (Walter, 2003). Die Milchdrüse der Hündin unterliegt einer hormonellen Regulation. Sie steuert die initiale Entwicklung der Mamma beim Eintritt in die Pubertät und die Veränderungen des Mammaparenchyms während des Brunstzyklus, der Trächtigkeit mit anschließender Laktationsperiode. Bedingt durch den besonderen Brunstzyklus des weiblichen Hundes, der durch eine stark verlängerte Gelbkörperphase mit entsprechend hohem Progesteronspiegel gekennzeichnet ist, kommt es in jedem Zyklus zur Ausbildung sezernierender Alveolen. In jedem Brunstzyklus werden neue Strukturen gebildet, die bei Nicht-Belegung teilweise wieder zurückgebildet werden.

Die Morphologie der Mamma ändert sich funktionsabhängig während des Estruszyklus wie nachfolgend von NELSON und KELLY (1974) beschrieben:

Während des **Proestrus** proliferiert das Drüsenepithel und bildet vergrößerte und dilatierte Gangsysteme an der Basis der Zitze. Die Epithelzellen zeigen eine leichte Hyperchromatie mit großen Kernen. Die Veränderungen des Drüsenepithels sind auf die steigenden Estrogenkonzentrationen im Blut zurückzuführen (Nelson and Kelly, 1974). Im **späten Proestrus** kommt es durch den hohen Estrogenspiegel zur Freisetzung von LH (luteinisierendes Hormon) in Form einer starken Welle, die zur Ovulation führt. Der ovulierte estrogenproduzierende Follikel wird rasch zu einem progesteronproduzierenden Gelbkörper umgewandelt. Dies ist zugleich das Ende des Proestrus und der Beginn des **Estrus**, charakterisiert durch den weiteren Anstieg des Gelbkörperhormons Progesteron, das bis zum Abfall im späten Metestrus für die weitere Proliferation und Sekretion der Mamma

verantwortlich ist (Olson et al., 1982; Concannon et al., 1977). Die Entwicklung innerhalb des Drüsengewebes erfolgt nicht gleichmäßig, einige Läppchen zeigen weniger sekretorisches Material als andere. Des Weiteren ist eine leichte Proliferation des Gangsystems und des Stromas sichtbar. Die Entwicklung der Drüsenstrukturen ist nicht mehr nur auf die Region an der Basis der Zitze beschränkt, sondern sie reicht bis in die Subcutis. Die Gänge sind stärker differenziert und von einem ein- zuweilen auch zweischichtigen Epithel ausgekleidet. Das Stroma zeigt einen verstärkten Zellgehalt und ödematöses Bindegewebe. Der **frühe Metestrus** zeigt ein Bild, welches dem des Estrus entspricht. Jedoch wird hier eine moderate Proliferation der Alveolen sichtbar, die sich aus den Vorläuferstrukturen, den "Terminal End Budds" bilden. Diese „Ausknospungen“ der anfänglichen Gangsysteme entwickeln sich durch lokal gebildetes Growth-Hormon (Nelson and Kelly, 1974; van Garderen et al., 1997).

Während des **mittleren Metestrus**, 30-60 Tage nach dem Estrus, sind das Gangsystem und die Alveolen, die eosinophiles Sekret enthalten können, gut differenziert und das Stroma erscheint als reifes Bindegewebe. Zunehmende Involution, starke Sekretion der Alveolen und weniger prominentes Stroma bestimmen das Bild des **späten Metestrus**, der vom Tag 60 bis 90 nach dem Estrus besteht. Das Alveolar- sowie das Gangepithel zeigen verschiedene Stadien der Involution. Im **frühen Anestrus** (Tag 90 bis 120) finden eine minimale Sekretion, sowie eine mäßige Involution der Alveolen statt. Die Sekretion beschränkt sich auf dilatierte und rückgebildete Gänge. Während des **späten Anestrus**, der 120 bis 180 Tage nach dem Estrus beginnt, schreitet die Involution der Mamma weiter voran. Die Drüsenstrukturen bilden sich bis auf rudimentäre Reste zurück, das Bindegewebe ist fest und ausgereift und eine Vermehrung des subkutanen Fettgewebes findet statt. Die Regression ist bei jungen Hündinnen wesentlich stärker ausgeprägt als bei älteren Hündinnen (von Bomhard and Kappes, 1976; Nelson and Kelly, 1974).

2.4 Hormonrezeptoren

2.4.1 Einleitung

Hormone sind interzelluläre Signalstoffe (Botenstoffe), die in freier oder gebundener Form mit dem Blut an die hormonempfindlichen Zielzellen gelangen. Die Wirkung der Hormone in den Zielzellen wird über die dort vorhandenen Empfängerstrukturen, den Rezeptoren, vermittelt (Meyer, 1994). Um eine gezielte Wirkung zu erreichen, sind die Rezeptoren nur in den Zielzellen vorhanden. Die Hormone binden mit hoher Spezifität und Affinität an die funktionell zugeordneten Rezeptoren. Das Spektrum der Hormonreaktivität wird von jedem Zelltyp über dessen eigene Kombination an Hormonrezeptoren definiert (Nelson and Cox, 2001). Aufgrund der hohen Affinität der Wechselwirkung zwischen Hormon und Rezeptor können die Zielzellen schon auf sehr geringe Hormonkonzentrationen reagieren, jedoch ist auch die Menge der Rezeptoren der Zielzelle ein wesentlicher Bestandteil um die Antwort auf das Hormon zu regulieren. Je nach Hormontyp kann das Zusammentreffen von Hormon und dem funktionell zugeordneten Rezeptor extrazellulär, im Cytosol oder im Zellkern erfolgen (Nelson and Cox, 2001).

2.4.2 Steroidhormone/ Steroidhormonrezeptoren (Rezeptoren für hydrophobe Ringmoleküle)

Steroidhormone sind unpolare Moleküle, die Wachstum, Entwicklung, Differenzierung sowie die Funktion zahlreicher Gewebe regulieren. Aufgrund ihres lipophilen Charakters diffundieren Steroidhormone durch die Plasmamembran ihrer Zielzellen und binden mit hoher Affinität und Spezifität an ihren kernständigen Rezeptor (Nelson and Cox, 2001; Meyer, 1994; Yamashita, 1998; Jenster et al., 1997). Steroidhormone verändern die Transkription eines Genabschnitts durch Interaktion mit einer bestimmten Gensequenz der Zielzelle (Carson-Jurica et al., 1990).

Zu den Steroidhormonen gehören die Sexualhormone, die in den Gonaden synthetisiert werden und die Corticoide der Nebennierenrinde. Sexualhormone sind für die Entwicklung und Differenzierung des Geschlechtsapparates, die Virilisierung und die Feminisierung verantwortlich. Zu ihnen gehören das Gestagen Progesteron, die Androgene Dihydrotestosteron, Testosteron, Androstendion und Dehydroepiandrosteron, sowie die Estrogene Estradiol, Estron und Estriol (deren biologische Aktivität in der genannten Reihenfolge abnimmt). Zu den Corticosteroiden gehören Glucocorticoide, Mineralocorticoide und andere adrenale Steroide, die zu Sexualhormonen synthetisiert werden (Thun and Schwarz-Porsche, 1994; Meyer, 1994).

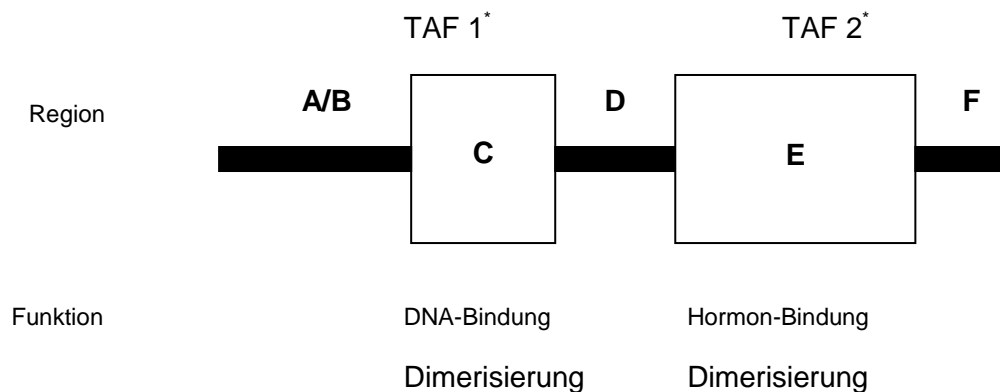
Steroidhormonrezeptoren, die zu der Superfamilie kernständiger Hormonrezeptoren "*nuclear hormone receptor*" (NHR) gehören, erfüllen drei wichtige Aufgaben: Liganden/Hormon-Bindung, DNA-Bindung und eine transkriptionsaktivierende Funktion. Die Steroidhormonrezeptoren lassen sich aufgrund der verschiedenen Aminosäuresequenzen, sowie wegen ihrer unterschiedlichen Bindungsstellen an der DNA in zwei Subfamilien (Gruppen) einteilen:

Die Estrogenrezeptor-Subfamilie, und die Glucocorticoidrezeptor-Subfamilie, zu der der Androgen- (AR), der Progesteron- (PR), sowie der Mineralokortikoid-Rezeptor (MR) gehören (Gronemeyer, 1992; Green and Chambon, 1988; Meyer, 1994; Kumar et al., 2006). Steroidhormonrezeptoren sind Transkriptionsfaktoren und besitzen einen einheitlichen Aufbau. Die stark konservierte DNA-Bindungsdomäne teilt den Steroidhormonrezeptor in eine in Länge und Sequenz variable Amino(N)-terminale Domäne und eine konservierte Carboxy(C)-Domäne. Die Länge und die Sequenz der N-terminalen Domäne ist sehr variabel. Der Rezeptor wird in sechs funktionelle Regionen/Domänen eingeteilt, die mit A bis F bezeichnet werden (s. Abb. 1).

Die Längen und Aminosäuresequenzen der Domäne A/B des N-terminalen Endes sind sehr variabel. Die Region C ist am stärksten konserviert und für die DNA-Bindung verantwortlich. Bei diesem Molekülbereich formen Aminosäurereste einen so genannten Zinkfinger, der für die Bindung des Hormon-Rezeptorkomplexes an der DNA verantwortlich ist. Die Anheftung des Liganden (Hormon) erfolgt in der ebenfalls hoch konservierten Hormonbindungsdomäne E. Zwei transkriptionsaktivierende Funktionen (TAF), deren Aktivität durch Bindung des Steroidhormons beeinflusst wird, sind sowohl an der A/B Domäne (TAF 1) sowie an der Hormonbindungsdomäne E (TAF 2) zu finden.

Nach der Bindung des Steroidhormons an den Rezeptor (Dimerisierung) wird die DNA-Bindungsfähigkeit durch die Dissoziation von Hitzeschockproteinen und einer Konformationsänderung vom Rezeptor erlangt (Rezeptoraktivierung). Das Rezeptordimer diffundiert anschließend in den Zellkern und bindet an spezifische DNA-Erkennungssequenzen "*hormon responsive or regulating elements*" (HRE) in der Nähe hormonabhängiger Gene. Durch die Rezeptoraktivierung wird das Genexpressionsmuster geändert und die mRNA-Synthese (Transkription) stimuliert. Die neu gebildete mRNA steuert die Bildung der hormonell induzierten spezifischen Proteine (z.B. Enzyme), die wiederum die Hormonwirkung in der Zielzelle vermitteln (Green et al., 1988; Green and Chambon, 1988; Gronemeyer, 1992; Meyer, 1994; Tenbaum and Baniahmad, 1997; Yamashita, 1998; Carson-Jurica et al., 1990). Bei der intrazellulären Lokalisation der Steroidhormonrezeptoren ging man lange Zeit davon aus, dass Steroidhormonrezeptoren in unbesetztem (inaktivem) Zustand im Zytoplasma und nach deren Aktivierung als Hormonrezeptorkomplex im Kern der Zelle lokalisiert sind ("*two-step model*" (Gasc and

Baulieu, 1986)). Heute jedoch wird die Meinung vertreten, dass die intrazelluläre Verteilung der Rezeptoren nicht ausschließlich durch den Liganden (Hormon) beeinflusst wird, sondern auch je nach Rezeptortyp variiert. Die wichtigsten Steroidhormonrezeptoren sind der Androgen-(AR), der Estrogen-(ER), sowie der Progesteron-Rezeptor (PR). Die im Zytoplasma gebildeten Rezeptoren werden kontinuierlich und aktiv über einen Transportmechanismus in den Kern transferiert. Untersuchungen haben gezeigt, dass sowohl der Androgen- als auch der Estrogen- und Progesteron-Rezeptor kontinuierlich zwischen dem Zytoplasma und dem Nukleus pendeln. Ermöglicht wird der Rücktransport des Rezeptors in das Zytoplasma durch Interaktion mit spezifischen Membranproteinen (Guiochon-Mantel et al., 1996; Guiochon-Mantel et al., 1991; Kumar et al., 2006; Kawata et al., 2001; Hager et al., 2000).



*TAF, Transkriptionsaktivierende Funktion

Abb. 2.4.2: 1: Schematische Darstellung der Struktur und der Bindungsdomänen des Steroidhormonrezeptors; konservierte Domänen (C und E) sind als Kästchen dargestellt [modifiziert nach (Gronemeyer, 1992)]

2.4.3 Growth-Hormon (GH), Growth- Hormon- Rezeptor (GHR)

"Growth-Hormon" ist ein Peptidhormon, das pulsatil vom Hypophysenvorderlappen ausgeschüttet wird. Die Bildung und Freisetzung des GH wird durch zwei vom Hypothalamus ausgeschüttete Releasing-Hormone, dem "Growth-Hormon releasing Hormon "(GHRH) und dem *Somatostatin*, reguliert (Mol et al., 1999). GH produzierende Zellen sind jedoch nicht nur im Hypophysenvorderlappen, sondern auch in Zellen der Milchdrüse des Hundes, der Katze sowie beim Menschen vorhanden. Untersuchungen haben gezeigt, dass das lokal in der Milchdrüse des Hundes gebildete GH identisch mit dem der Hypophyse ist (Lantinga-van Leeuwen et al., 1999). Das während des Metestrus in der Mamma der Hündin unter Progesteroneinfluß gebildete GH erfüllt über eine parakrine und autokrine Wirkung eine wichtige Funktion bei der Proliferation und Differenzierung der Milchdrüse (van Garderen and Schalken, 2002;Mol et al., 1999). Eine endokrine Wirkung von Mamma-GH, die z.B. zu Akromegalie führen kann, wurde ebenfalls beschrieben (Rijnberk et al., 2003). Die Ausschüttung von GH in der Milchdrüse kann auch durch die exogene Verabreichung von synthetischem Progesteron ausgelöst werden (Selman et al., 1994;Concannon et al., 1980).

Der "*growth-hormon-receptor*" (GHR) gehört zur Familie einfach membrangängiger Glykoprotein-Rezeptoren, zu der auch der Prolaktin- und Zytokin-Rezeptor zählt. Der Aufbau des GHR ist weitgehend einheitlich mit den anderer Rezeptoren dieser Familie. Der strukturelle Aufbau zeigt im extrazellulären Bereich die Hormonbindungsdomäne, den Amino(N)-Terminus, sowie einen kleinen Membrananteil gefolgt von einer großen zytoplasmatischen Domäne, die bei der Signal-Transduktion beteiligt ist (van Garderen et al., 1999;Meyer, 1994;Kelly et al., 1991). Als wasserlösliches Hormon interagiert Growth-Hormon mit seinem membranständigen Rezeptor. Nach der extrazellulären Bindung des GH am Rezeptor findet eine Konformationsänderung statt und es werden intrazelluläre Tyrosinkinasen aktiviert. Durch selektive Phosphorylierung wird die Aktivierung der zugeordneten Enzyme induziert (Meyer, 1994;Kelly et al., 1994).

Beim Hund kann GH, im Gegensatz zum Menschen und höheren Primaten, nur am GHR und nicht auch am Prolactin-Rezeptor binden (van Garderen and Schalken, 2002).

3 Material und Methoden

3.1 Material

In zwei regulatorischen 4-Wochenstudien und einer 39-Wochenstudie unter GLP-Bedingungen ("Good Laboratory Practise" gemäß den OECD Grundsätzen der Guten Laborpraxis (GLP; überarbeitete Fassung von 1997, ENV/MC/CHEM(98)17) und dem Chemikaliengesetz der Bundesrepublik Deutschland) an fertilen männlichen Beaglehunden waren am Ende der Behandlungszeit vergrößerte und verdickte inguinale Mammakomplexe aufgefallen, die als "Gynäkomastie" diagnostiziert worden waren. Jedem Tier waren täglich dermal auf einer Fläche von xxx cm³ entweder Placebo, 0.8-, 2.5- oder eine 8-prozentige Gelformulierung aufgetragen worden. Dies entspricht einer täglichen Dosis von XX mg/kg. Folgende Tabelle zeigt das Design der drei durchgeführten Prüfungen:

Tabelle 3.1: 1: Design der Studien

	Kontrollegruppe	niedrige Dosisgruppe	mittlere Dosisgruppe	hohe Dosisgruppe
	[n]	[n]	[n]	[n]
4 Wochen, Ment	4	4	4	4
4 Wochen, Ment Backup	4	4	4	4
39 Wochen, Ment Backup	8	8	8	8

n= Anzahl der Tiere

Somit standen Mammaproben von insgesamt 64 Hunden für die weitere Untersuchung zur Verfügung.

3.1.1 Prüfsubstanz

Bei der Test-Substanz handelt es sich um das steroidale Androgen Ment bzw. um ein Ment Analogon, einem Nachfolge-Kandidat. Ment ist ein um den Faktor zehn potenteres Mittel als Testosteron und soll in topischer Anwendung als Hormonersatztherapie bei Hypogonadismus eingesetzt werden.

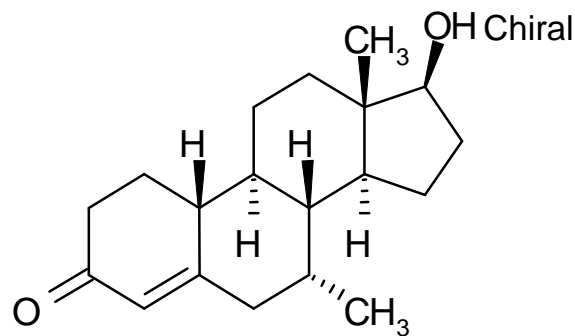


Abb.3.1.1: 1: Struktur der Prüfsubstanz MENT

3.1.2 Einbettung der Gewebeproben

Für die Anfertigung von Paraffinschnitten wurde die linke inguinale Milchdrüse eines jeden Tieres verwendet. Nach der Entnahme wurde die linke inguinale Milchdrüse in neutral gepuffertem Formalin nach Lillie (4 %) fixiert. Die Aufarbeitung der Milchdrüsen erfolgte nach den Standard Operation Procedures (SOP) der Bayer Schering Pharma AG in Anlehnung an Standard-Labormethoden (Romeis et al., 1989): die formalinfixierten Gewebeproben wurden entwässert und über eine aufsteigende Alkoholreihe in einem vollautomatischen Unterdruckautomat Tissue-Tek VIP der Fa. Sakura in Paraplast eingebettet.

3.1.3 Gefrierproben

Für die Isolation von RNA wurde zusätzlich auch die rechte inguinale Milchdrüse entnommen. Die rechte inguinale Milchdrüse wurde in vier etwa gleichgroße Portionen geteilt in Kunststoffröhrchen verbracht und unmittelbar danach in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C asserviert.

3.1.4 Schnittherstellung

Für die immunhistologische und molekularbiologische Untersuchung des formalinfixierten Gewebes wurden von den Paraffinblöcken jeweils 4-5 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf Superfrost®Plus- Objektträger (Menzel-Gläser®, Braunschweig) aufgezogen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Von jedem Tier einer jeden Gruppe wurde ein Milchdrüsenschnitt mit Hämatoxylin-Eosin (H.E.) gefärbt.

3.2 Immunhistochemie (Protokolle s. Anhang)

Jede Milchdrüse eines jeden Tieres wurde immunhistochemisch auf Aromatase, Growth-Hormon (GH), sowie auf Androgen-, Progesteron-, Estrogen- und GH-Rezeptor untersucht.

Die Detektion einer Primärantikörperbindung am Paraffinschnitt erfolgte mit Hilfe der Labeled–Streptavidin–Biotin–Peroxidase–Komplex (LSAB)–Methode (Cartun and Pedersen, 1989), einer modifizierten Biotin–Avidin–Komplex-Methode (Hsu et al., 1981).

3.2.1 Antigendemaskierung

Durch die Gewebefixierung mit Formalin kann die Antigenstruktur durch Quervernetzung im Gewebe verändert werden, so dass der eingesetzte Antikörper nicht mehr oder nur sehr schwach bindet (Antigen-Maskierung) (Boenisch, 2006; Shi et al., 1997; Shi et al., 2001). Um die dreidimensionale Struktur des Epitopes, an die der Antikörper bindet, wieder herzustellen, wurden die Schnitte einer Hitzevorbehandlung unterzogen:

Dazu wurden die getrockneten Schnitte in Xylol entparaffiniert und in absteigender Alkoholreihe rehydratisiert und in destilliertem Wasser gespült. Die anschließende Hitzevorbehandlung erfolgte mit einem Dampfgerät (Fa. Braun, Kronberg). Dabei wurden die Objektträger in eine mit einer Target Retrieval Lösung mit pH 6,1 (Fa. DakoCytomation, Hamburg) befüllte Küvette gestellt. Die Schnitte wurden bei ca. 90-100 °C für 18 Minuten gekocht und nach einer ca. 20 minütigen Abkühlung auf Raumtemperatur in Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS) überführt. Diese Vorbehandlung wurde für alle verwendeten Antikörper gleichermaßen durchgeführt.

3.2.2 LSAB-Methode

Nach der Antigendemaskierung wurden die Schnitte zur Reduzierung des Hintergrundes mit verschiedenen Blockierungslösungen behandelt. Das Auftragen der Blockierungslösungen, sowie der Sekundär (Link)- und Tertiärantikörper (Label) erfolgte mit Hilfe des DakoCytomation[®]-Autostainers, einem Pipettier-Automaten. Die Objektträger sind dabei horizontal in den Racks angeordnet. Nach jedem Auftragen einer Lösung wurden die Schnitte mit einem Waschpuffer (Fa. DakoCytomation) gespült. Nachdem Abgetragen der Blockierungslösungen wurde der Primär-Antikörper von Hand in entsprechender Verdünnung (Tabelle 3.2.2: 1) aufgetragen. Dafür wurden die Objektträger aus den Racks des Autostainers in eine verschließbare Färbekammer überführt und anschließend über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Schnitte wurden mit Haematoxilin (Mayer) gegengefärbt und mit Eukitt[®] eingedeckt.

Tabelle 3.2.2: 1: Übersicht aller verwendeten Antikörper

Primär-Antikörper <i>Hersteller</i>	Klon	Spezies	Verdünnung <i>in ABD</i>	Sek.-Antikörper* <i>Hersteller</i>	Verdünnung <i>in LABD</i>
Androgenrezeptor AR (C19) (polyklonal) Santa Cruz Biotechnology	Sc-815	Kaninchen	1:500	GaR-b Biogenex	1:20
Estrogenrezeptor** NCL-ER-LH2 (monoklonal) Novocastra Laboratories	CC4-5	Maus	1:80	GaM-b Biogenex	1:60
Growth-Hormonrezeptor MCA 1555 (monoklonal) Serotec	Mab 263	Maus	1:60	GaM-b Biogenex	1:20
Progesteronrezeptor NCL-PGRp (polyklonal) Novocastra Laboratories	-	Kaninchen	1:400	GaR-b Biogenex	1:80
Aromatase P₄₅₀ MCA 2077 (monoklonal) Serotec	H4	Maus	1:50	GaM-b Biogenex	1:20
Growth-Hormon hGH (polyclonal) Biogenex	-	Kaninchen	1:40	GaR-b Biogenex	1:30

ABD= Antikörperverdünnungsmedium DakoCytomation; GaR-b= biotinierter Ziege-anti-Kaninchen-Sekundär-Antikörper; GaM-b= biotinierter Ziege-anti-Maus-Sekundär-Antikörper; hGH= human Growth-Hormon; LABD= Link-Antikörperverdünnungsmedium Biogenex;

*Der Tertiäranantikörper (Label) (Fa. Biognex) wird in gleichem Verhältnis verdünnt wie der Sekundäranantikörper (Link)

** (Nieto et al., 2000)

3.2.3 Kontrollen

Als positive Kontrolle wurden jeweils Gewebe mitgefärbt, die das gesuchte Antigen für den speziellen Antikörper enthielten. In Vorversuchen wurde die Reaktivität der Antikörper an verschiedenen Organen verschiedener Spezies getestet (Tabelle 3.2.3: 1).

Tabelle 3.2.3: 1: Übersicht der Kontrollen

Antikörper	Kontrollgewebe
Androgenrezeptor	Prostata und Hoden von Hund und Ratte
Estrogenrezeptor	Mamma ♀ und Uterus vom Hund Mammatumorgewebe ♀ (human)*
Progesteronrezeptor	Mamma ♀ und Uterus vom Hund Mammatumorgewebe ♀ (human)*
Growth-Hormon-Rezeptor	Mamma vom Hund ♀
Aromatase P ₄₅₀	Ovar, Plazenta, Hoden der Ratte Hoden vom Hund
Growth-Hormon	Hypophyse von Hund und Ratte

*Fa. Dako Cytomation

In Vorversuchen wurden diese Antikörper an caniner Prostata und Mamma, sowie an caninem Hoden getestet, um eine mögliche Kreuzreaktivität zu evaluieren und um die geeignete Verdünnung zu bestimmen. Die positiven caninen Gewebe wurden als Positivkontrolle für die jeweilige immunhistochemische Färbung eingesetzt. Als Positivkontrolle für die Estrogenrezeptor und Progesteronrezeptor Antikörper diente humanes Mammatumorgewebe der Fa. DakoCytomation.

Als Negativkontrolle diente ein Folgeschnitt des zu untersuchenden Präparats, welcher statt mit dem primären Antikörper mit Aszitisflüssigkeit von nicht-immunisierten Balb/c-Mäusen bzw. mit einem präimmunem Kaninchenserum inkubiert wurde.

3.2.4 Auswertung der Histologie (HE-Färbungen) und der Immunhistochemie

Die HE-gefärbten Schnitte aller 64 Hunde wurden lichtmikroskopisch (nach-) untersucht, wobei die Befunde *semiquantitativ* ausgewertet wurden.

Die Bewertung der Entwicklung der mammären Alveolar- und Gangstrukturen erfolgte nach folgender Skala (Tabelle 3.2.4: 1) (Shackelford et al., 2002):

Tabelle 3.2.4: 1: Gradingschema der histologischen Befunde

-	= keine
+	= wenig
++	= leicht
+++	= moderat
++++	= deutlich
+++++	= ausgeprägt

dabei bedeutet

keine:

entspricht dem physiologischen Zustand einer männlichen Mamma: Weit im Bindegewebe verteilte herdförmige Ansammlungen kleiner epithelartiger Zellen.

wenig:

deutlich abgeflachte Epithelien, die andeutungsweise Alveolen ausbilden. Kleine obliterierte Gänge mit flachem ein- zuweilen auch zweischichtigem Epithel.

leicht:

gleich dem zuvor beschriebenen („wenig“), jedoch mit differenzierteren Alveolen.

moderat:

ödematöses Bindegewebe, moderate Proliferation der Alveolen; Gangsystem teilweise mit Ausknospungen sichtbar (*“Terminal end buds“*/ Vorläuferstrukturen der Alveolen); sowie z.T. flüssigkeitsgefüllten Lumina.

deutlich:

nahezu vollständig entwickelte Alveolen und z.T dilatierete Gänge mit teilweise flüssigkeitsgefüllten (eosinophilen) Lumina. Das Epithel erscheint isoprismatisch mit überwiegend runden Kernen.

ausgeprägt:

Vollständig entwickelte Alveolen mit flüssigkeitsgefüllten (eosinophilen) Lumina. Das Epithel erscheint prismatisch und weist je nach Sekretmenge abgeplattete, runde oder längsovale Kerne auf. Die interalveolären Ductuli sind z.T dilatiert und enthalten (eosinophiles) Sekret. Das Gangepithel ist mehrschichtig, teilweise hochprismatisch.

Die semiquantitative Abschätzung der Zellzahlen wurde mikroskopisch mit dem 10x-Objektiv vorgenommen, wobei jeweils fünf Gesichtsfelder von je 12 mm Durchmesser ausgewertet wurden. Bei der Immunhistochemie erfolgte die Auswertung ebenfalls *semiquantitativ* mit Hilfe eines "immunreaktive Score" (IRS). Der IRS ergibt sich aus der Multiplikation des Wertes der Färbeintensität (*Staining Intensity, SI*) mit dem der geschätzten Anzahl *positiv* gefärbter Zellen (*pZ*) (Tabelle 3.2.4: 2) (Remmele and Stegner, 1987).

Tabelle 3.2.4: 2: Die Ermittlung des IRS [modifiziert nach (Remmele and Stegner, 1987)]

SI-Einteilung	pZ-Einteilung	Hypothetischer Maximalwert (IRS)
0= keine Färbereaktion	0= keine positiven Zellen	
1= schwache Färbeintensität	1= wenig positive Zellen	
2= mäßige Färbeintensität	2= moderat positive Zellen	4x4= 16
3= starke Färbeintensität	3= viele positive Zellen	
4= sehr starke Färbeintensität	4= sehr viele positive Zellen	

SI= Färbeintensität (*Staining Intensity*); pZ= positiv gefärbte Zellen; IRS= Immunreaktiver Score

3.3 Molekularbiologische Präparationen (Protokolle s. Anhang)

Aus den bei -80 °C asservierten Gefrierproben wurde Growth-Hormon RNA isoliert, um zu klären, ob das in der Mamma immunhistochemisch nachgewiesene Growth-Hormon hypophysären Ursprung hat oder extrahypophysär in der Mamma gebildet wurde.

3.3.1 Allgemeine Maßnahmen

Um eine Kontamination mit DNA und RNasen bei der RNA-Isolierung zu vermeiden, wurden folgende Bedingungen während der molekularbiologischen Arbeitsschritte streng eingehalten:

- 1.) Tragen von Latex-Einweghandschuhen, die während der Präparation mehrmals gewechselt wurden.
- 2.) Arbeitsplätze mit RNaseZap® reinigen
- 3.) Diethylpyrokarbonat (DEPC)-behandeltes Wasser (Fa. Ambion®) für alle Arbeitsschritte mit RNA verwenden.
- 4.) Verwendung von RNase- und DNase-freien gestopften Pipettenspitzen und Plastikeinwegware
- 5.) Zur Vermeidung von Kontamination vor und während der Durchführung der RT-PCR wurden die RNA Präparationen und das Ansetzen der RT-PCR räumlich voneinander getrennt durchgeführt. Die Elektrophorese, und weitere DNS-Präparationen wurden nicht im gleichen Raum, in dem die RT-PCR stattfand, durchgeführt.
- 6.) Einsatz von Negativkontrollen bei der RT-PCR
- 7.) Mitführen einer Positivkontrolle bei der RT-PCR

3.3.2 RNA-Isolierung und -Aufreinigung

Für die RNA-Isolierung wurde schocktiefgefrorenes (-80 °C) Milchdrüsengewebe verwendet. Die Isolierung erfolgte auf Basis der *single-step*-Methode (Chomczynski and Sacchi, 1987) unter Verwendung des RNeasy® Lipid Tissue Mini Kits (Qiagen, Hilden). Dazu wurde 100 µg Milchdrüsengewebe mit einer sterilen Pinzette in ein mit 1 ml Lysispuffer gefülltes Reaktionsgefäß überführt. Die weitere RNA-Gewinnung sowie die Reinigung von Proteinen und kleineren RNA-Bruchstücken erfolgten gemäß den Angaben des Herstellers. Zusätzlich erfolgte eine Behandlung mit RNase-Free DNase I (Qiagen, Hilden), um eine potentielle Verunreinigung mit genomischer DNA auszuschließen. Nach Elution der RNA mit 40 µl RNase-freiem Wasser (Qiagen, Hilden) wurde 5 µl von der RNA-Lösung zur spektral-photometrischen Messung der optischen Dichte in einem Biophotometer (Eppendorf AG, Hamburg) bei 260 nm (OD₂₆₀) abgenommen (Verdünnung 1:15). Die restliche RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C asserviert.

3.3.3 Herstellung von cDNA mittels der reversen Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Ansatz und Durchführung der RT-PCR erfolgten jeweils in einem separaten Raum. Alle Präparationsschritte wurden im Eisbad durchgeführt.

Die cDNA-Synthese erfolgte unter Verwendung des Omniskripts® RT Kits (Qiagen, Hilden) und 250 ng/µl Random Hexamers (Promega, Mannheim) in einem Multicycler® PTC 200 (Biozym Diagnostic GmbH) nach Angaben des Herstellers. Unter Zugabe von 10 U/µl RnaseOut™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen) wurden 1,5 µg RNA in einem 20 µl RT-Reaktionsansatz inkubiert (Tabelle 3.3.3: 1). Der RT-Reaktionsansatz wurde unter folgenden Temperaturbedingungen inkubiert: 25 °C für zehn Minuten, 37 °C für eine Stunde, 93 °C für fünf Minuten und schließlich 4 °C bis zur Entnahme der Proben. Die cDNA-Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C asserviert.

Tabelle 3.3.3: 1: Herstellung eines 20 µl cDNA-Reaktionsansatzes (RT-PCR Mastermix)

Reagenz	Konz. Stamm-Lsg.	Volumen [µl]	Konz. 20 µl RT-MM	Hersteller
A.) RNA-Mix				
RNA aus 3.3.2	-	1,5	-	
RNase freies H ₂ O	-	10,5	-	Qiagen
B.) Random-Hexamers-Mix				
RNase freies H ₂ O	-	3,0	-	Qiagen
Random Hexamers	500 ng/µl	1,0	125 ng/µl	Promega
C.) RNaseOut-Mix				
RNase freies H ₂ O	-	6,5	-	Qiagen
buffer RT	10x	1,0	1x	Qiagen
RNaseOut TM Recombinant	40 U/µl	2,5	10 U/µl	Invitrogen
Ribonuclease Inhibitor				
D.) RT-Mastermix				
buffer RT	10x	2,0	1x	Qiagen
dNTP-Mix	5 mM	2,0	0,5 mM	Qiagen
Random-Hexamers-Mix aus B	125 ng/µl	2,0	250 ng/µl	-
Omniskript [®] Reverse Transcriptase	4 U/µl	1,0	4 U/µl	Qiagen
RNaseOut TM -Mix aus C	10 U/µl	1,0	10 U/µl	-
E.) 20 µl Reaktionsansatz				
RNA-Mix aus A		12		
RT-Mastermix aus D		8		-
Gesamt		20		-

Konz. Stamm-Lsg.= Konzentration der Stammlösung; Konz. 20 µl RT-MM= finale Konzentration im RT-Mastermix; RT= reverse Transkription; dNTP-Mix= Desoxynucleotid-Mix; RNA= Ribonukleinsäure (*ribonucleic-acid*)

3.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.3.4.1 Primer

Für die Amplifikation der in 3.3.3 hergestellten cDNA wurden folgende Primer (Tabelle 3.3.4.1: 1) mit Hilfe des Primer-Suchprogramms Primer3 ausgewählt (Rozen and Skaletsky, 1996) und bei der MWG Biotech AG, Ebersberg, in Auftrag gegeben. Um die erfolgreiche RNA-Extraktion zu überprüfen und um falsch-negative Ergebnisse zu vermeiden, wurden die RNA-Extraktionen aus der Mamma und der Hypophyse auf Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mRNA, welche für das Enzym GAPDH kodiert, untersucht. Die GAPDH-Primer wurden aus der Literatur (Gröters S., 2004) ausgewählt und ebenfalls bei der MWG Biotech AG, Ebersberg, in Auftrag gegeben.

Die Reaktion fand unter Verwendung des AmpliTaq Gold® (Fa. Applied Biosystems) und dem dazugehörigen Puffer (GeneAmp® 10x Buffer II, Fa. Applied Biosystems) in einem Multicycler® PTC 200 (Biozym Diagnostic GmbH) statt (Tabelle 3.3.4.1: 2). Die von der MWG Biotech AG erhaltenen Primer Lyophilisate wurden nach Herstellerangaben mit RNase freiem Wasser (Qiagen, Hilden) gelöst und auf eine Konzentration von 15 pmol/µl eingestellt. Diese Gebrauchslösungen wurden aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Zum Ausschluss einer Kontamination wurde für jedes Primerpaar als *Negativkontrolle* ein PCR-Ansatz mitgeführt, der Anstelle der DNA-Matrize RNase-freies Wasser (Fa. Biozym Diagnostic GmbH) enthielt.

3.3.4.2 Temperaturprogramm

Das Temperaturprogramm umfasste eine Primeranlagerung bei 59,5 °C. Der Primeransatz wurde wie folgt inkubiert:

- 1.) initiale Denaturierung bei 94 °C für eine Minute
- 2.) 40 Zyklen:
 - Denaturierung bei 94 °C für eine Minute
 - Primeranlagerung bei 59,5 °C für eine Minute
 - Elongation bei 72 °C für eine Minute
- 3.) Finale Elongation bei 72 °C für 5 Minuten zur Herstellung des 3' ATP-Überhangs und zum Beenden der Reaktion
- 4.) Kühlung bei 4 °C bis zur Entnahme der Proben

Die PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen (2 %ig), um die korrekte Größe der Amplifikate zu überprüfen. Die PCR-Produkte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 3.3.4.1: 1: Zusammenfassung der Namen, interne Bezeichnung, Sequenz, Amplikonlänge, sowie Accession-Nummer und Position der verwendeten Primer

Primer	Bez.	Sequenz (5' → 3' Richtung)	Amplk.	Acc.-Nr. und Pos.
GH s	p1	AGC AGG GTC TTC ACC AAC AG	309	NM 001003168; 409-717
GH as	p2	GAT GCC CAG CAA CTA GAA GG		
GAPDH s	p3	GCC AAA AGG GTC ATC ATC TC	228	BC014085; 1225-1452
GAPDH as	p4	GGG GCC ATC CAC AGT CTT CT		

Bez.= interne Bezeichnung des Primers; Amplk.= Amplifikatgröße; Acc.-Nr.= GenBank® Accession-Nummer ; Pos.= Position des Amplifikats in der veröffentlichten Sequenz; GH= Growth-Hormon; s= "sense"-Primer; as= "antisense"-Primer

Tabelle 3.3.4.1: 2: Herstellung eines 50 µl PCR-Reaktionsansatzes (PCR-Mastermix)

Reagenz	Konz. Stamm-Lsg.	Volumen [µl]	Konz. 50 µl PCR-MM	Hersteller
RNase freies H ₂ O	-	38,25	-	Biozym
GeneAmp® 10xPCR Puffer II (100 mM Tris-HCl, 500mM KCl)	-	5	1x PCR-Puffer	Applied Biosystems
MgCl ₂ (25mM)	25 mM	2,5	1,25 mM	Applied Biosystems
dNTP-Mix	10 mM	1	0,2 mM	Applied Biosystems
AmpliTaq® DNA Polymerase	5 U/µl	0,25	1,25 U	Applied Biosystems
antisense-Primer	-	1	-	MWG-Biotech AG
sense-Primer	-	1	-	MWG-Biotech AG
cDNS (Produkt aus 3.3.3)	-	1	-	-

dNTP-Mix= Desoxynucleotid-Mix; Konz. 50 µl PCR-MM= finale Konzentration im PCR-Mastermix

3.3.4.3 Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der korrekt amplifizierten mRNA wurde mit den PCR-Produkten eine gelelektrophoretische Auftrennung zusammen mit einem entsprechenden DNA-Größenmarker durchgeführt. Dazu wurde ein 2 %iges ethidiumbromidgefärbtes Agarosegel (E-Gel®, Fa. Invitrogen) in eine Laufkammer eingespannt. Die jeweiligen Gel-Taschen wurden mit 10 µl PCR-Produkt plus 3 µl Loading Dye (ABgene®, Advanced Biotechnologies, Hamburg) beladen. Zusätzlich wurde entsprechend der zu erwartenden Amplifikatgröße als Größenmarker 3 µl einer 100 bp-Leiter (Fa. ABgene®, Advanced Biotechnologies, Hamburg) aufgetragen. Danach erfolgte die Visualisierung des Gels mittels Durchlicht bei 304 nm auf einem UV-Transluminator (AlphaDigiDoc RT, Fa. Biozym Diagnostic GmbH). Die photographische Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mit einer Digitalkamera (C 5060 Wide Zoom, Fa. Olympus Europa GmbH).

3.3.4.4 Sequenzierung der aufgereinigten cDNA

Nachdem die gelelektrophoretische Trennung der PCR-Produkte DNA-Banden entsprechender Größe ergab, wurden nach der Aufreinigung mit dem *NucleoSpin® Extract II-Kit* (Fa. Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) gemäß den Angaben des Herstellers, ca. 125 ng DNA entnommen und zur Sequenzierung versendet (Sequence Laboratories GmbH, Göttingen).

Die Sequenzierungsergebnisse wurden mittels Align-Funktion der Gendatenbank (GenBank®: www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) mit bereits veröffentlichten kaninen Growth-Hormon-Sequenzen (GenBank® Acc.-No. NM 001003168.1) verglichen.

Die Sequenzanalyse wurde mit Hilfe der Software MacVector, MacVector-Inc. North Carolina (USA) durchgeführt (Rastogi P.A., 1999). Das Programm beinhaltet auch die ClustalW-Methode zum multiplen Sequenzvergleich (Thompson et al., 1994) und ermöglicht die Konstruktion eines phylogenetischen Baumes aus den AS-Sequenzen der verschiedenen GH-Proteine (Saitou and Nei, 1987).

4 Ergebnisse

Die fotografische Dokumentation der Histologie sowie der Immunhistologie findet sich im Abschnitt 9.7 „Lichtmikroskopische Abbildungen (Histologie/Immunhistologie)“.

4.1 Histologie (HE-Färbung) der Mamma

In den angefertigten HE-Färbungen ist eine deutliche dosisabhängige Differenzierung der alveolären und duktafen Strukturen zu erkennen. Insgesamt ist die Proliferation der o.g. Strukturen bei den einzelnen Hunden in den Gruppen aller drei Studien unterschiedlich stark ausgeprägt. Generell jedoch ist die behandlungsabhängige Entwicklung von der rudimentären Mamma bis hin zu differenziertem Milchdrüsengewebe mit der der zyklischen Veränderung der Mamma der Hündin vergleichbar:

In den Kontrolltieren ist eine typisch männliche Mamma mit weit verteilten herdförmigen Ansammlungen kleiner epithelartiger Zellen zu erkennen. In der niedrigen Dosisgruppe beginnen sich im Zitzenbereich andeutungsweise Alveolen zu bilden. Im weiteren Verlauf ist die Entwicklung der Drüsenstrukturen nicht nur auf den Bereich der Zitze beschränkt, sondern reicht bis in die Subcutis. Die Gänge stellen sich stärker differenziert dar und sind von einem ein- bis zweischichtigem Epithel ausgekleidet. Das Stroma zeigt einen verstärkten Zellgehalt und das Bindegewebe ist ödematös. Teilweise sind auch Ausknospungen, die von den Gangsystemen ausgehen, zu erkennen. Sie werden auch als "*Terminal End Buds*" ("*budding structures*") bezeichnet und sind als Vorläufer der Alveolen zu verstehen. In der höchsten Dosisgruppe sind die Alveolen und das Gangsystem voll entwickelt und die Lumina sind z.T. mit eosinophilem Sekret gefüllt. Die interalveolären Ductuli sind z.T. dilatiert und enthalten ebenfalls eosinophiles Sekret.

4.1.1 4 Wochen Behandlung MENT (16 Beagle-Rüden)

4.1.1.1 Vehikelgruppe

Bei den unbehandelten Hunden sind rudimentäre, weit verteilte herdförmige Ansammlungen kleiner epithelartiger Zellen zu erkennen, die dem typischen Bild einer männlichen Mamma entsprechen.

Tabelle 4.1.1.1: 1: individuelle mikroskopische Befunde

Tiernummer	1	2	3	4
rudimentäre Mamma	x	x	x	x
entwickelte Mamma	-	-	-	-

x = vorhanden; - = nicht vorhanden

4.1.1.2 Niedrige Dosisgruppe

Zu sehen ist eine beginnende Entwicklung der Milchdrüsen im Zitzenbereich, die bei einigen Hunden stärker ausgebildet ist als bei anderen in der gleichen Gruppe. Sie wird durch eine leichte Zunahme der Zellzahl der Alveolarepithelien, sowie durch Bildung erster Gangstrukturen charakterisiert.

Tabelle 4.1.1.2: 1: individuelle mikroskopische Befunde

Tiernummer	5	6	7	8
rudimentäre Mamma	-	-	-	-
entwickelte Mamma	+	+	++++	++

- = keine; + = wenig; ++ = leicht; ++++ = deutlich

4.1.1.3 Mittlere Dosisgruppe

In der mittleren Dosisgruppe setzt sich die Entwicklung der Mamma im Zitzenbereich fort. Auch hier ist keine einheitliche Entwicklung der Drüsenstrukturen vorhanden. Die Zellzahl der Alveolarepithelien, sowie die Bildung der Gangstrukturen nehmen zu. Vereinzelt finden sich alveoläre und duktale Strukturen auch unterhalb der Basis der Zitze.

Tabelle 4.1.1.3: 1: individuelle mikroskopische Befunde

Tiernummer	9	10	11	12
rudimentäre Mamma	-	-	-	-
entwickelte Mamma	++++	++++	++++	++

- = keine; ++ = leicht; ++++ = deutlich

4.1.1.4 Höchste Dosisgruppe

In der höchsten Dosisgruppe nimmt die Zellzahl der alveolären und dukталen Strukturen zu; insgesamt ist das Drüsengewebe gut differenziert und zum Teil ist eine mäßige bis starke Sekretbildung (eosinophil) vorhanden. Die Entwicklung der Drüsenstrukturen ist nicht mehr nur auf die Region an der Zitze beschränkt, sondern sie reicht bis in die Subcutis.

Tabelle 4.1.1.4: 1: individuelle mikroskopische Befunde

Tiernummer	13	14	15	16
rudimentäre Mamma	-	-		-
entwickelte Mamma	++++	+++	++++	++++

- = nicht vorhanden; +++ = moderat, ++++ = deutlich;

4.1.2 4 Wochen Behandlung Backup (16 Beagle-Rüden)

4.1.2.1 Vehikelgruppe

Bei den unbehandelten Hunden sind rudimentäre, weit verteilte herdförmige Ansammlungen kleiner epithelartiger Zellen zu erkennen, die dem typischen Bild einer männlichen Mamma entsprechen.

Tabelle 4.1.2.1: 1: individuelle mikroskopische Befunde

Tiernummer	1	2	3	4
Rudimentäre Mamma	x	-	x	x
entwickelte Mamma	-	-	-	-

x = vorhanden; - = nicht vorhanden

4.1.2.2 Niedrige Dosisgruppe

Bei den Hunden der niedrigen Dosisgruppe ist eine beginnende Entwicklung der Milchdrüsen im Zitzenbereich zu sehen. Sie wird durch eine leichte Zunahme der Zellzahl der Alveolarepithelien charakterisiert.

Tabelle 4.1.2.2: 1 individuelle mikroskopische Befunde

Tiernummer	5	6	7	8
rudimentäre Mamma	-	x	-	x
entwickelte Mamma	+	-	+	-

x = vorhanden; - = nicht vorhanden; + = wenig

4.1.2.3 Mittlere Dosisgruppe

In der mittleren Dosisgruppe ist eine beginnende Mammae-Entwicklung im Zitzenbereich zu sehen, die bei einigen Hunden stärker ausgebildet ist als bei anderen. Sie wird durch eine leichte Zunahme der Zellzahl der Alveolarepithelien, sowie durch Bildung erster Gangstrukturen charakterisiert. Vereinzelt finden sich alveoläre und duktales Strukturen auch unterhalb der Basis der Zitze.

Tabelle 4.1.2.3: 1: individuelle mikroskopische Befunde

Tiernummer	9	10	11	12
rudimentäre Mamma	-	x	-	-
entwickelte Mamma	++	-	++	++

x = vorhanden; - = nicht vorhanden; + = wenig;
++ = leicht

4.1.2.4 Höchste Dosisgruppe

In der höchsten Dosisgruppe nimmt die Zellzahl der alveolären und duktales Strukturen zu; insgesamt ist das Drüsengewebe gut differenziert. Die Alveolen sind komplett entwickelt und enthalten z.T. flüssigkeitsgefüllte Lumina. Das Epithel erscheint einschichtig prismatisch. Die interalveolären Ductuli sind z.T. dilatiert und enthalten ebenfalls Sekret. Das Gangepithel ist mehrschichtig. Die Entwicklung der Drüsenstrukturen ist nicht mehr nur auf die Region an der Zitze beschränkt, sondern sie reicht bis in die Subcutis.

Tabelle 4.1.2.4: 1: individuelle mikroskopische Befunde

Tiernummer	13	14	15	16
rudimentäre Mamma	-	-	-	-
entwickelte Mamma	+++	+++++	++++	++++

- = nicht vorhanden; +++ = moderat, ++++ = deutlich;
+++++ = ausgeprägt

4.1.3 39 Wochen Behandlung Backup (32 Beagle-Rüden)

4.1.3.1 Vehikelgruppe

Bei den unbehandelten Hunden sind rudimentäre, weit verteilte herdförmige Ansammlungen kleiner epithelartiger Zellen zu erkennen, die dem typischen Bild einer männlichen Mamma entsprechen.

Tabelle 4.1.3.1: 1: individuelle mikroskopische Befunde

Tiernummer	1	2	3	4	5	6	7	8
rudimentäre Mamma	x	x	x	x	x	x	x	x
entwickelte Mamma	-	-	-	-	-	-	-	-

x = vorhanden; - = nicht vorhanden

4.1.3.2 Niedrige Dosisgruppe

Bei den Hunden der niedrigen Dosisgruppe ist eine beginnende Entwicklung der Milchdrüsen im Zitzenbereich zu sehen. Sie ist durch eine leichte Zunahme der Zellzahl der Alveolarepithelien charakterisiert.

Tabelle 4.1.3.2: 1: individuelle mikroskopische Befunde

Tiernummer	9	10	11	12	13	14	15	16
rudimentäre Mamma	-	-	x	x	-	-	-	-
entwickelte Mamma	+	+	-	-	+	+	-	+

x = vorhanden; - = nicht vorhanden; + = wenig

4.1.3.3 Mittlere Dosisgruppe

In der mittleren Dosisgruppe ist eine beginnende Mamma-Entwicklung im Zitzenbereich zu sehen, die bei einigen Hunden stärker ausgebildet ist als bei anderen. Sie wird durch eine leichte Zunahme der Zellzahl der Alveolarepithelien, sowie durch Bildung erster Gangstrukturen charakterisiert. Vereinzelt finden sich alveoläre und duktale Strukturen auch unterhalb der Basis der Zitze.

Tabelle 4.1.3.3: 1: individuelle mikroskopische Befunde

Tiernummer	17	18	19	20	21	22	23	24
rudimentäre Mamma	-	-	-	-	-	-	-	-
entwickelte Mamma	+++	++	++	+	+++	++	++	++

- = nicht vorhanden; + = wenig; ++ = leicht; +++ = moderat

4.1.3.4 Höchste Dosisgruppe

In der höchsten Dosisgruppe nimmt die Zellzahl der alveolären und dukталen Strukturen zu; insgesamt ist das Drüsengewebe gut differenziert. Die Alveolen sind komplett entwickelt und enthalten z.T. flüssigkeitsgefüllte Lumina. Das Epithel erscheint einschichtig prismatisch. Die interalveolären Ductuli sind z.T. dilatiert und enthalten ebenfalls Sekret. Das Gangepithel ist mehrschichtig. Die Entwicklung der Drüsenstrukturen ist nicht mehr nur auf die Region an der Zitze beschränkt, sondern sie reicht bis in die Subcutis.

Tabelle 4.1.3.4: 1: individuelle mikroskopische Befunde

Tiernummer	25	26	27	28	29	30	31	32
rudimentäre Mamma	-	-	-	-	-	-	-	-
entwickelte Mamma	++++	+++++	+++++	++++	++++	++++	++++	+++

- = nicht vorhanden; +++ = moderat, ++++ = deutlich; +++++ = ausgeprägt

4.2 Immunhistologie

Die Auswertung der immunhistologischen Präparate erfolgt nach dem in 3.2.4 beschriebenen semiquantitativen Verfahren. Aufgrund der Hitzevorbehandlung ist bei einzelnen Gewebeschnitten die Morphologie derart in Mitleidenschaft gezogen worden, dass sie nicht mit in die Auswertung einbezogen werden konnten.

Die untersuchten Antikörper gegen Aromatase, Growth-Hormon, sowie gegen den Androgen-, Progesteron-, Estrogen- und GH-Rezeptor sind in den entsprechenden Kontrollgeweben (siehe 3.2.3) positiv.

4.2.1 Androgenrezeptor (AR)

Positive Reaktionen sind durch einen mäßig (Grad 2) bis stark (Grad 3) granulierten Niederschlag des DAB in den Zellkernen des Alveolar- und Gangepithels nachweisbar. Gelegentlich erstreckt sich der Niederschlag nur auf einen Teil des Kernes. Bei einigen Präparaten ist außerdem eine schwache diffuse Färbung des Zytoplasmas zu finden. Mäßige (Grad 2) bis starke (Grad 3) intranukleäre Färbungen sind in den Haarfollikeln, sowie den Talg- und Schweißdrüsen und in der Epidermis zu sehen.

Tabelle 4.2.1: 1: Zusammenfassung der Färbeintensität (SI= Staining Intensity) und der positiven Zellen (pZ) beim Androgenrezeptorantikörper

Gruppe	Anzahl Tiere	ausgewertete Gewebeschnitte	SI Ø	pZ Ø	IRS
4 Wo, MENT	4				
Vehikelgruppe		3	2	1,3	2,6
Niedrige Dosisgruppe		4	2,8	2,8	5,6
Mittlere Dosisgruppe		4	3	2,8	8,4
Höchste Dosisgruppe		3	2,6	2,8	7,3
4 Wo, Backup	4				
Vehikelgruppe		3	3	3	9
Niedrige Dosisgruppe		4	3	3	9
Mittlere Dosisgruppe		4	2,8	2,3	6,4
Höchste Dosisgruppe		4	2,3	3	6,9
39 Wo, Backup	8				
Vehikelgruppe		8	2,9	2,5	7,3
Niedrige Dosisgruppe		8	2,8	2,6	7,3
Mittlere Dosisgruppe		8	3	3,6	10,8
Höchste Dosisgruppe		8	2,9	3,5	10,2

SI (Staining Intensity)= Färbeintensität: 0= keine; 1= schwach; 2= mäßig, 3= stark, 4= sehr stark

pZ= positive Zellen: 0= keine; 1= wenig; 2= moderat; 3= viele; 4= sehr viele

IRS (immunreaktiver Score)= SI x pZ

4.2.2 Progesteronrezeptor (PR)

Positive Reaktionen im Milchdrüsengewebe waren durch einen mäßig (Grad 2) bis sehr starken (Grad 4) granulierten Niederschlag des DAB in den Zellkernen der Gangepithelien, sowie in den „budding structures“ nachzuweisen. Das Alveolarepithel ist wenig (Grad 1) bis mäßig (Grad 2) positiv. Das Myoepithel ist negativ. Die Intensität der Braunfärbung und die Anzahl positiver Zellen hat von der niedrigen zur höchsten Dosisgruppe zugenommen. Bei einigen Präparaten war auch eine schwache diffuse Färbung des Zytoplasmas zu sehen.

Tabelle 4.2.2: 1: Zusammenfassung der Verteilung der SI und pZ beim Progesteronrezeptorantikörper

Gruppe	Anzahl Tiere	ausgewertete Gewebeschnitte	SI Ø	pZ Ø	IRS
4 Wo, MENT	4				
Vehikelgruppe		3	3,3	3	10
Niedrige Dosisgruppe		4	3,3	3,8	12,5
Mittlere Dosisgruppe		4	4	3,5	14
Höchste Dosisgruppe		4	4	4	16
4 Wo, Backup	4				
Vehikelgruppe		3	3	3,7	11
Niedrige Dosisgruppe		4	3	4	12
Mittlere Dosisgruppe		3	3	4	12
Höchste Dosisgruppe		4	4	3,8	15
39 Wo, Backup	8				
Vehikelgruppe		8	2,1	2,6	5,5
Niedrige Dosisgruppe		8	2,5	2,6	6,5
Mittlere Dosisgruppe		8	2,9	3	8,7
Höchste Dosisgruppe		7	3,9	3,7	14,4

SI (Staining Intensity)= Färbeintensität: 0= keine; 1= schwach; 2= mäßig, 3= stark, 4= sehr stark

pZ= positive Zellen: 0= keine; 1= wenig; 2= moderat; 3= viele; 4= sehr viele

IRS (immunreaktiver Score)= SI x pZ

4.2.3 Estrogenrezeptor (ER)

Positive Reaktionen sind durch einen mäßig (Grad 2) bis sehr starken (Grad 4) granulierten Niederschlag des DAB in den Zellkernen des Alveolarepithels nachzuweisen. Der braune Niederschlag nimmt in der Färbeintensität dosisabhängig ab. In der höchsten Dosisgruppe finden sich sehr stark (Grad 4) positiv gefärbte Zellkerne im Alveolarepithel, wohingegen in den Gangepithelien schwache bzw. keine positive Färbungen der Kerne zu sehen sind. Vereinzelt ist auch im Epithel der Haut (stratum papillare) und in einigen Haarfollikeln ein starker (Grad 3) DAB Niederschlag im Zellkern zu erkennen. Das Stroma ist negativ.

Tabelle 4.2.3: 1: Zusammenfassung der Verteilung der SI und pZ beim Estrogenrezeptor-antikörper

Gruppe	Anzahl Tiere	ausgewertete Gewebeschnitte	SI Ø	pZ Ø	IRS
4 Wo, MENT	4				
Vehikelgruppe		1	0	0	0
Niedrige Dosisgruppe		3	1,7	1,4	2,4
Mittlere Dosisgruppe		4	0,8	0,5	0,4
Höchste Dosisgruppe		4	0,5	0,5	0,25
4 Wo, Backup	4				
Vehikelgruppe		3	2,3	2,7	6,2
Niedrige Dosisgruppe		4	1,5	1,5	2,3
Mittlere Dosisgruppe		3	2	2	4
Höchste Dosisgruppe		3	3	2,3	6,9
39 Wo, Backup	8				
Vehikelgruppe		7	3	2,9	8,7
Niedrige Dosisgruppe		8	2,5	2,5	6,3
Mittlere Dosisgruppe		8	2,1	2,6	5,5
Höchste Dosisgruppe		8	2,3	2,1	4,8

SI (Staining Intensity)= Färbeintensität: 0= keine; 1= schwach; 2= mäßig, 3= stark, 4= sehr stark

pZ= positive Zellen: 0= keine; 1= wenig; 2= moderat; 3= viele; 4= sehr viele

IRS (immunreaktiver Score)= SI x pZ

4.2.4 Growth-Hormonrezeptor (GHR)

Eine positive Reaktion im Zytoplasma ist sowohl im Alveolar-, Gang- und Myoepitheli zu sehen. Die Färbeintensität nimmt dosisabhängig stark zu. Das Stroma ist negativ. Sowohl Epithelgewebe der Haut als auch Haarfollikel sind immunpositiv.

Tabelle 4.2.4: 1: Zusammenfassung der Verteilung der SI und pZ beim Growth-Hormon-Rezeptorantikörper

Gruppe	Anzahl Tiere	ausgewertete Gewebeschnitte	SI Ø	pZ Ø	IRS
4 Wo, MENT	4				
Vehikelgruppe		2	1,25	2	2,5
Niedrige Dosisgruppe		4	2,5	2,75	6,87
Mittlere Dosisgruppe		4	3,25	3	9,75
Höchste Dosisgruppe		4	3,25	3,75	12,18
4 Wo, Backup	4				
Vehikelgruppe		3	3	3	9
Niedrige Dosisgruppe		4	3	3,5	10,5
Mittlere Dosisgruppe		3	2,6	4	10,4
Höchste Dosisgruppe		4	3	3,75	11,25
39 Wo, Backup	8				
Vehikelgruppe		7	2,28	2,71	4,99
Niedrige Dosisgruppe		7	2,85	3,28	9,34
Mittlere Dosisgruppe		8	3	4	12
Höchste Dosisgruppe		8	3,25	3,88	12,61

SI (Staining Intensity)= Färbeintensität: 0= keine; 1= schwach; 2= mäßig, 3= stark, 4= sehr stark

pZ= positive Zellen: 0= keine; 1= wenig; 2= moderat; 3= viele; 4= sehr viele

IRS (immunreaktiver Score)= SI x pZ

4.2.5 Growth-Hormon (GH)

Ein brauner Niederschlag des DAB ist im Zytoplasma des Aleveolar-, Gang- und Myoepithels zu sehen. Die Intensität nimmt dosisabhängig zu. Das Stroma ist negativ.

Tabelle 4.2.5: 1: Zusammenfassung der Verteilung der SI und pZ beim Growth-Hormon-antikörper

Gruppe	Anzahl Tiere	ausgewertete Gewebeschnitte	SI Ø	pZ Ø	IRS
4 Wo, MENT	4				
Vehikelgruppe		1	0	0	0
Niedrige Dosisgruppe		4	2,25	3,25	7,31
Mittlere Dosisgruppe		4	2,75	4	11
Höchste Dosisgruppe		4	2,5	3	7,5
4 Wo, Backup	4				
Vehikelgruppe		4	2,75	2,75	7,56
Niedrige Dosisgruppe		3	1,3	2,6	3,38
Mittlere Dosisgruppe		3	3	3,6	10,9
Höchste Dosisgruppe		4	3,5	3,75	13,12
39 Wo, Backup	8				
Vehikelgruppe		7	2,16	2,5	5,4
Niedrige Dosisgruppe		7	2,57	3	7,71
Mittlere Dosisgruppe		7	2,43	3,29	7,99
Höchste Dosisgruppe		8	2,75	3,88	10,76

SI (Staining Intensity)= Färbeintensität: 0= keine; 1= schwach; 2= mäßig, 3= stark, 4= sehr stark

pZ= positive Zellen: 0= keine; 1= wenig; 2= moderat; 3= viele; 4= sehr viele

IRS (immunreaktiver Score)= SI x pZ

4.2.6 Aromatase

Die Immunreaktion beim Aromatasenachweis ist überwiegend negativ. Jedoch ist eine schwach positive (Grad 1) Färbung des Zytoplasmas der Alveolar- und vereinzelt auch der Gangepithelien zu erkennen. Die Immunreaktivität ist in der ersten Studie deutlicher als bei den anderen zwei Studien.

Tabelle 4.2.6: 1: Zusammenfassung der Verteilung der SI und pZ beim Aromataseantikörper

Gruppe	Anzahl Tiere	ausgewertete Gewebeschnitte	SI Ø	pZ Ø	IRS
4 Wo, MENT	4				
Vehikelgruppe		2	1,3	2,5	3,25
Niedrige Dosisgruppe		4	1	2,5	2,5
Mittlere Dosisgruppe		4	1,5	4	6
Höchste Dosisgruppe		4	1,75	4	7
4 Wo, Backup	4				
Vehikelgruppe		4	0	0	0
Niedrige Dosisgruppe		4	0	0	0
Mittlere Dosisgruppe		4	0,25	0,25	0,5
Höchste Dosisgruppe		4	0,5	0,5	1
39 Wo, Backup	8				
Vehikelgruppe		8	0	0	0
Niedrige Dosisgruppe		8	0	0	0
Mittlere Dosisgruppe		8	0,25	0,25	0,5
Höchste Dosisgruppe		8	0,25	0,25	0,5

SI (Staining Intensity)= Färbeintensität: 0= keine; 1= schwach; 2= mäßig, 3= stark, 4= sehr stark

pZ= positive Zellen: 0= keine; 1= wenig; 2= moderat; 3= viele; 4= sehr viele

IRS (immunreaktiver Score)= SI x pZ

4.2.7 Growth-Hormon RNA-Nachweis in der Hypophyse und im Milchdrüsengewebe

Von den behandelten Hunden (höchste Dosis) wurden Proben der Hypophyse und der Mamma auf das Vorhandensein von Growth-Hormon-RNA mittels der RT-PCR unter Verwendung von in Tabelle 3.3.4.1: 1 dargestellten spezifischen Primern untersucht. Sowohl in der Hypophyse als auch in der Milchdrüse konnte Growth-Hormon-RNA nachgewiesen werden. Zellspezifische cDNA für das *Housekeeping Gene* GAPDH konnte ebenfalls mit den eingesetzten Primern in der Hypophyse und in der Mamma nachgewiesen werden.

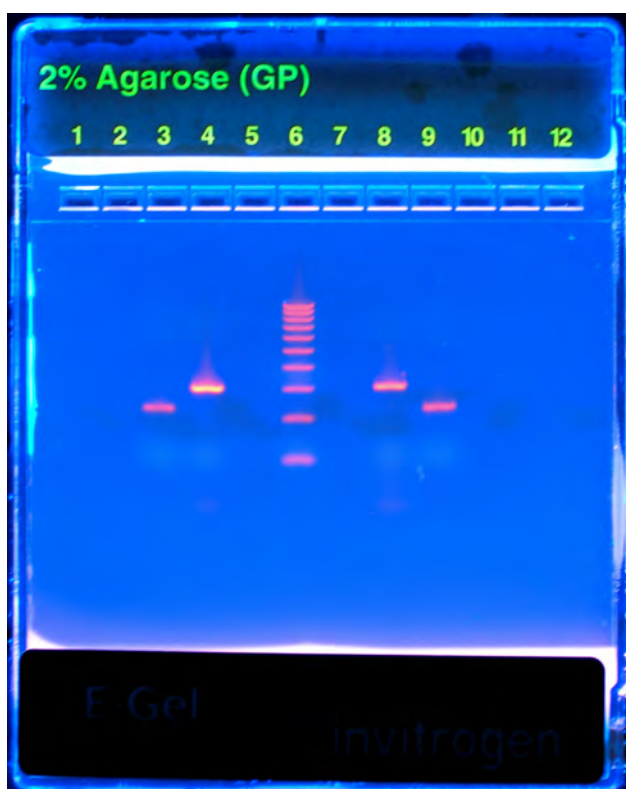


Abb. 4.7.2: 1: 2 %iges ethidiumbromidgefärbtes Agarosegel

Bande 3 = 228 bp GAPDH (Hypophyse), **Bande 4** = 309 bp GH (Hypophyse),
Bande 5 = PCR-Ansatz ohne cDNA, **Bande 6** = 100bp Leiter, **Bande 7** = PCR-Ansatz ohne cDNA,
Bande 8 = 309 bp GH (Mamma), **Bande 9** = 228 bp GAPDH (Mamma)

4.2.8 Sequenzanalyse

4.2.8.1 Auswertung der Sequenzdaten

Die Überprüfung und Korrektur der Sequenzen wurde mit Hilfe des Programms Sequence Navigator durchgeführt. Jede automatisch gelesene Base wurde auf ihre Richtigkeit überprüft. Mit dem Programm MacVector wurden mehrere Sequenzen gleichzeitig mit einer bestimmten Nukleotid- oder Aminosäure-Referenz-Sequenz verglichen (*aligned*). Damit wurden Basen- und Aminosäureaustausche identifiziert.

Nach Sequenzierung der 309 bp-Banden und anschließendem Blast® (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) ergab sich folgendes:

Tabelle 4.2.8.1: 1: BLAST-Auswertung

Referenz Acc.-No.	Beschreibung	Max. Score [bits]	Total Score [bits]	Query coverage [%]	E-Value	Max. ident [%]
NM 001003168.1	gb AF069071.1 AF069071 Canis lupus familiaris growth hormone (GH), mRNA	510	510	99	1e-142	98
NM 001009337.1	Felis catus growth hormone (GH), mRNA	422	422	99	6e-116	93
NM 001081948.1	gb U02929.1 Equus caballus growth hormone (GH), mRNA	390	390	94	2e-106	92
NM 213869.1	gb U19787.1 SSU19787 Sus scrofa growth hormone (GH), mRNA	377	377	99	1e-102	90
NM 180996.1	Bos taurus growth hormone (GH), mRNA	346	346	94	4e-93	89
NM 008117.2	gb BC061157.1 Mus musculus growth hormone (Gh), mRNA	329	329	93	4e-88	88
NM 001034848.1	gb U62779.1 RNU62779 Rattus norvegicus growth hormone 1 (Gh1), mRNA	291	291	93	2e-76	85

Referenz Acc.-No. = GenBank® Accession-Nummer der Referenzsequenz Score (bits) = Trefferhäufigkeit; E-Value beschreibt die Wahrscheinlichkeit der Übereinstimmung der gesuchten Sequenzen. Je kleiner der Wert, desto genauer das Ergebnis.

Der Sequenzvergleich der GH-mRNA verschiedener Säugetierspezies mit der des Menschen ergab folgende Übereinstimmung (Tabelle 4.2.8.1: 2):

Tabelle 4.2.8.1: 2: Prozentuale Übereinstimmung der GH-mRNA verschiedener Spezies. ClustalW multiple sequence alignment

	Homo sapiens	Sus scrofa	Rattus norvegicus	Mus musculus	Bos taurus	Felis catus	Equus caballus	Canis lupus
Homo sapiens	100,0	69,7	64,8	63,5	75,1	72,7	70,6	75,6
Sus scrofa	69,7	100,0	66,7	67,0	79,1	77,9	78,0	80,8
Rattus norvegicus	64,8	66,7	100,0	72,2	71,8	75,8	69,7	72,7
Mus musculus	63,5	67,0	72,2	100,0	68,8	67,4	68,3	69,6
Bos taurus	75,1	79,1	71,8	68,8	100,0	80,5	79,3	83,6
Felis catus	72,7	77,9	75,8	67,4	80,5	100,0	78,9	87,7
Equus caballus	70,6	78,0	69,7	68,3	79,3	78,9	100,0	82,9
Canis lupus	75,6	80,8	72,7	69,6	83,6	87,7	82,9	100,0

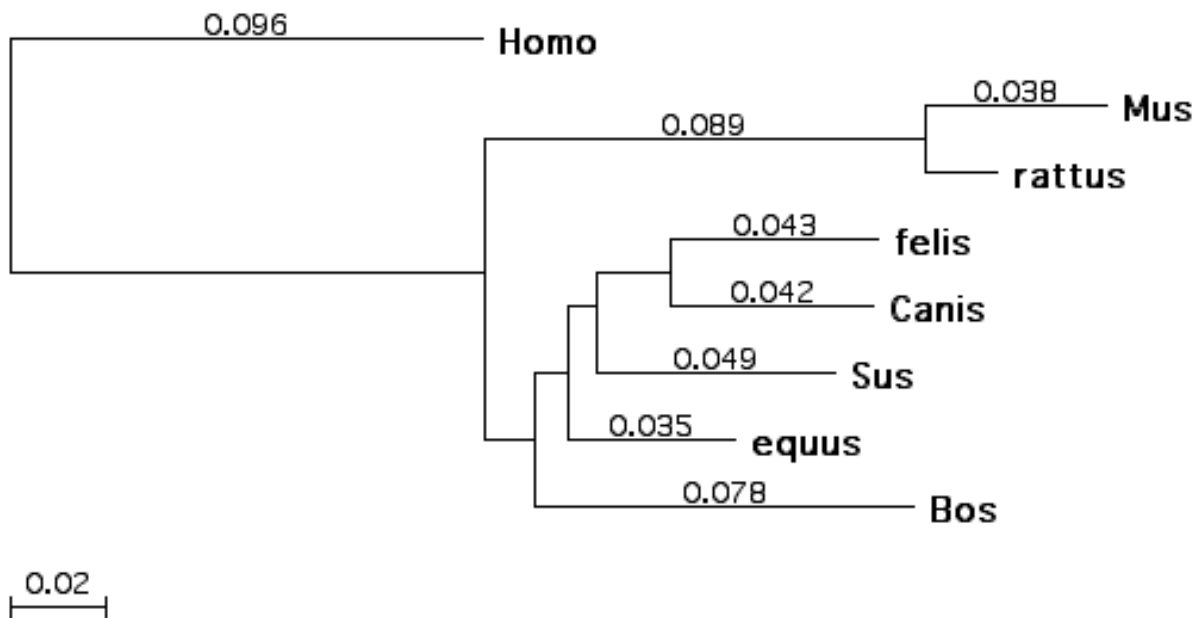


Abbildung 4.2.8.1: 1: Evolutionäre Distanz der GH-Sequenzen verschiedener Spezies

p-Wert: Durchschnittliche Änderung einer Basen-Position; p= 0,02 bedeutet, dass von 100 bp sich 2 bp unterscheiden

5 Diskussion

5.1 Versuchsaufbau

Die Gynäkomastie beim Rüden ist bisher nur als klinisches Symptom einer zugrundeliegenden Primärerkrankung meist beim Sertolizelltumor beschrieben worden.

Mit Hilfe der Immunhistochemie sowie molekularbiologischen Untersuchungen war es Ziel vorliegender Arbeit, Informationen über den zugrunde liegenden Mechanismus der mit steroidalem Androgen dermal behandelten Rüden zu erhalten. Dabei wurde folgende Arbeitshypothese mit in die Untersuchungen einbezogen:

die Proliferation der Mamma beim Rüden sei möglicherweise durch Growth-Hormon, sowie durch die Aktivierung des Progesteronrezeptors hervorgerufen. Zusätzlich wurde in den Umfang der immunhistochemischen Nachweise der beim Mann bekannte Mechanismus der Gynäkomastie miteinbezogen: die Gynäkomastie beim Mann beruht auf einer Veränderung im Androgen- und Estrogenhaushalt, hervorgerufen u.a. durch eine erhöhte Aromataseaktivität.

Hinreichende Angaben über den Mechanismus der Gynäkomastie beim Rüden konnten bis zum Zeitpunkt der Fertigstellung der Arbeit in der Literatur nicht gefunden werden.

5.2 Methode

Die Darstellung der Steroidhormonrezeptoren (ER, PR, AR), des Growth-Hormons, dessen Rezeptors sowie des Enzyms Aromatase erfolgte mittels immunhistochemischer Nachweisverfahren. Der Vorteil dieser Methode ist die genaue Identifizierung und Lokalisation der antigenexprimierenden Zellen. Aufgrund der Tatsache, dass nur die Zellen identifiziert werden, die die gesuchte Struktur ((Steroid-)Rezeptor, Hormon, Enzym) exprimieren und deshalb keine Aussage über die Konzentration in der Zelle gemacht werden kann, wurde die Auswertung semiquantitativ durchgeführt.

Bei der Durchführung des immunhistochemischen Nachweises wurden stets Kontrollschnitte mitgeführt. Dabei wurde der Primärantikörper durch ein nichtimmunogenes Serum der gleichen Spezies, aus der der Primärantikörper stammt, ersetzt, um falsch positive oder falsch negative Ergebnisse ausschließen zu können (Walter, 1998). Außerdem wurde als Positivkontrolle in jedem Test ein Gewebeschnitt mitgeführt (3.2.3), der mit der zu untersuchenden Probe in gleicher Weise vorbehandelt wurde und das jeweils nachzuweisende Antigen exprimiert.

Prinzipiell gilt für die Immunhistochemie, dass die Formalinfixierung zu Qualitätsverschlechterung der Antigenstruktur führt. Dies kann auch an der zeitlichen Einwirkung des Fixans liegen: Je länger die Fixationszeit (>24h), desto schlechter die Immunreaktivität, da sich Methylenbrücken bilden und die Antigenstrukturen maskieren (Leong and Gilham, 1989). Da dieser Vorgang teilweise reversibel ist, wurde ein Antigen-Retrieval mittels einer Hitzebehandlung (Dampfgarer) zur Demaskierung der Antigenstruktur durchgeführt. Die Morphologie der Milchdrüsenschnitte wurde dabei ganz respektive teilweise zerstört, in folgedessen war eine Auswertung einzelner Schnitte nicht mehr möglich.

5.3 Histologie/Immunhistochemie

Bei der HE-Färbung zeigten die behandelten Rüden dosisabhängig eine Zunahme der Mammaentwicklung. Bei der höchsten Dosisgruppe waren die Drüsenstrukturen am stärksten entwickelt und zeigten teilweise eine starke Sekretbildung sowie gut differenzierte alveoläre und ductale Strukturen, die histologisch dem Milchdrüsengewebe einer Hündin im Estrus respektive im frühen Metestrus entsprechen.

Eine positive kernständige Immunreaktion im Alveolar-, Gang- und Myoepithel war beim Androgen-, Estrogen und Progesteronrezeptor zu sehen. Dabei nahm die Färbereaktion und die Anzahl der Immunpositiven Zellen beim Androgen- und Progesteronrezeptor dosisabhängig zu. Beim Estrogenrezeptor verhielt es sich gerade umgekehrt. Neben dem nukleären Signal war der Androgen- und in einigen Fällen auch der Progesteronrezeptor bei allen Gewebeschnitten zusätzlich auch im Zytoplasma der Alveolar- und Gangepithelien nachzuweisen. Der Estrogenrezeptor hingegen stellt sich bei den hier vorliegenden Untersuchungen ausschließlich im Kern der Milchdrüsenepithelien immunhistochemisch dar. Die unterschiedliche immunhistochemische Darstellung der Steroidhormonrezeptoren lässt sich mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen (Kawata et al., 2001) erklären, in denen beschrieben wird, dass Steroidhormonrezeptoren, wenn an Ihren Liganden gebunden, prinzipiell kernständig sind. Im ungebundenen Zustand unterscheiden sie sich hinsichtlich der intrazellulären Verteilung, die als eine dynamische Situation dargestellt wird. Der freie (ungebundene) Androgenrezeptor ist im Zytoplasma der Zelle lokalisiert und in Anwesenheit des Liganden (Testosteron, Dihydrotestosteron oder synthetisches Androgen) kernständig. Die Translokation des Androgenrezeptors zum Kern ist hormon- und konzentrationsabhängig.

Im Gegensatz dazu ist der freie und besetzte Estrogen- und Progesteron-Rezeptor vorwiegend nukleär lokalisiert (Kumar et al., 2006) und nur in Falle des Progesteronrezeptors (Guiochon-Mantel et al., 1991; Guiochon-Mantel et al., 1996) in geringen Mengen im Zytoplasma der Zelle vorhanden.

Auch in der Epidermis, den Haarfollikeln (äußere Wurzelscheide, Haarbalgmuskel (Musculus arrector pili)), den Talgdrüsen, sowie dem Papillarkörper zeigten sich beim Androgen- und Estrogenrezeptorantikörper deutlich positive Reaktionen, die mit bereits veröffentlichten Ergebnissen übereinstimmen (Bratka-Robia et al., 2002). Das Vorkommen von Androgen- und Estrogenrezeptoren in den o.g. Strukturen diente daher als (interne) Positivkontrolle im Präparat selbst und bestätigt zudem die Spezifität der gewählten Antikörper.

Beim Progesteronrezeptornachweis nimmt die Intensität des braunen Niederschlags in den Zellkernen der ductalen Strukturen sowie den "budding structures" mit steigender Proliferation des Mammagewebes zu, die mit den Ergebnissen durch die Untersuchungen an der Milchdrüse der Hündin bestätigt werden (Lantinga-van Leeuwen et al., 2000). Folglich besitzt die Dosiszunahme einen unmittelbaren Effekt auf die Regulation des Progesteronrezeptors. Zudem konnte immunhistochemisch gezeigt werden, dass das Alveolar- und Gangepithel GH-positiv ist. Allerdings zeigte der direkte Vergleich dieser Gewebeschnitte, mit denen in den der Progesteronrezeptor nachgewiesen wurde, dass alle GH-positiven Zellen positiv für den Progesteronrezeptor waren, umgekehrt waren aber nicht alle Progesteronrezeptorpositiven Zellen auch positiv für GH.

Ein "Progesteron/Glukocorticoid-response-element" (PRE/GRE) ist im GH-Gen nachgewiesen und kann durch das Anlagern des Progesteronrezeptorkomplexes aktiviert werden. Das bedeutet, dass der Progesteronrezeptor unmittelbar einen stimulatorischen Effekt auf die mamäre GH-Ausschüttung über die direkte Aktivierung des GH-Gen-Promotors ausübt (Lantinga-van Leeuwen et al., 2002).

Der Growth-Hormonrezeptor konnte immunhistochemisch sowohl im Alveolar-, Gang- sowie dem Myoepithel nachgewiesen werden. Neben dem zytoplasmatischen Signal war auch eine positive Immunreaktion an der Membran der o.g. Strukturen festzustellen. In der Membran ist das GH-Binding-Protein lokalisiert, das die gleiche Antigenstruktur besitzt wie der GH-Rezeptor. Da der verwendete Antikörper genau an diese Antigenstruktur bindet, wird sowohl der GH-Rezeptor als auch das GH-Binding-Protein (GHBP) nachgewiesen. Neben der positiven Immunreaktion des GH-Rezeptors/GHBP an der Membran und im Zytoplasma war zudem ein brauner Niederschlag im Zellkern festzustellen. Diese Beobachtung wurde ebenso in zahlreichen Publikationen beschrieben (Lobie et al., 1990a; Lobie et al., 1992; Lobie et al., 1990b; van Garderen et al., 1999; Mertani et al., 1995). Die nukleäre Translokation des GH-Rezeptors lässt vermuten, dass das GH neben der ligandenabhängigen zytoplasmatischen Signalkette auch einen direkten Einfluß auf den Zellkern ausübt.

Lediglich der Aromatasenachweis zeigte bei allen Tieren aller Dosisgruppen schwach braun gefärbte alveoläre sowie ductale Epithelzellen; teilweise aber auch keine Immunreaktion. Die negative Immunreaktion ist nicht auf eine ausbleibende Kreuzreaktivität des humanen

Antikörpers mit caninem Gewebe zurückzuführen, da bei den mitgeführten Positivkontrollen eine spezifische Immunreaktion vorhanden war. Die Aromataseaktivität wird offensichtlich nicht durch die Verabreichung des Androgens verändert und lässt den Schluß zu, dass das hier dermal verabreichte Androgen, anders als Testosteron (Carreau et al., 2003), nicht dem Aromatasekomplex zugänglich ist.

5.4 Mechanismus zur Mammaproliferation

Die immunhistochemische Detektion des Growth-Hormons im Milchdrüsenepithel ergibt einen Hinweis, dass es an der Proliferation beteiligt sein kann. Um die Frage zu beantworten, ob es sich hier um hypophysäres GH, das über das Blut zum Milchdrüsenepithel gelangt, handelt oder, wie schon für die Hündin beschrieben (Mol et al., 1999), um eine extrahypophysäre lokale Produktion von Growth-Hormon in der Mamma, konnte mit Hilfe der Isolation von RNA aus der Mamma (RT-PCR) und anschließender Amplifizierung (PCR) unter Verwendung spezifischer caniner Primer (3.3.4.1) geklärt werden. Es zeigte sich, dass im untersuchten Mammagewebe GH-RNA vorhanden ist. Zusätzlich konnte geklärt werden, dass das Growth-Hormon aus der Hypophyse identisch ist mit dem aus der Milchdrüse. Beide Isolate wurden sequenziert (4.2.8) und zeigen, dass es sich beim Growth-Hormon aus der Hypophyse und der Milchdrüse um das gleiche Transkript handelt. Dieses wurde bereits bei der Hündin und der Katze beschrieben (Mol et al., 1995).

Toxikologische Langzeitstudien an weiblichen Beagle Hunden mit Progestinen (synthetischen Progesterone), die bei der hormonellen Verhütung ("Pille") eingesetzt wurden, haben gezeigt, dass die behandelten Hündinnen Akromegalie entwickelten. Es konnte gezeigt werden, dass Progestin eine GH-Ausschüttung induzierte, wodurch es zu den beschriebenen Veränderungen gekommen ist (Concannon et al., 1980; Rijnberk and Mol, 1997). Offensichtlich erhöhen Progestine auch das Risiko eines Mammatumors bei der Hündin (Rutteman, 1992). Aber auch beim Menschen und der Katze wurde das onkogene Potential von Growth-Hormon bei der Tumorbildung in der Mamma beschrieben (Perry et al., 2006).

Die Erkenntnis, dass endogenes und synthetisches Progesteron eine lokale mamäre Growth-Hormon-Ausschüttung induziert, führte zu der Hypothese, dass der proliferierende und/oder tumorfördernde Effekt der Steroid-Hormone auf das Milchdrüsenepithel Growth-Hormon vermittelt ist (Mol et al., 1996; van Garderen et al., 1997; Mol et al., 2000). In einer Studie führte die Behandlung von weiblichen Beagle-Hunden mit Progestin zu einer erhöhten Plasma-Growth-Hormon-Konzentration. Die Vermutung, dass GH in der Milchdrüse sezerniert wird, wurde durch die Entfernung der kompletten Mammaleiste gezeigt, da der erhöhte GH-Plasmaspiegel anschließend wieder abfiel (Selman et al., 1994).

Vergleichbar zu dem in der Literatur beschriebenen Mechanismus zur Milchdrüsenproliferation bei der Hündin, die sowohl während des Estrus als auch wie beschrieben durch Gestagen induziert werden kann, liegt beim Rüden offensichtlich der gleiche Mechanismus zu Grunde. Bei dem hier eingesetzten Steroid-Hormon handelt es sich zwar um ein synthetisches Androgen und nicht um ein synthetisches Progesteron (Gestagen), jedoch macht es den Eindruck als würde die Substanz bei diesem Tiermodell eine höhere Affinität zum Progesteronrezeptor als zum Androgenrezeptor besitzen. Entsprechend der in 2.4.2 beschriebenen Einteilung der Steroidhormonrezeptoren ist es durchaus vorstellbar, dass MENT bzw. der Nachfolgekandidat anstelle des ihm zugehörigen Rezeptors den Progesteronrezeptor bevorzugt besetzt und aus diesem Grund zusätzlich eine gestagene Eigenschaft besitzt (Gronemeyer, 1992).

Der in der Humanmedizin beschriebene Aromatase-Mechanismus bei der Gynäkomastie beim Mann konnte in der hier vorliegenden Arbeit für den Hund nicht bestätigt werden. Aromatase konnte zwar vereinzelt immunhistochemisch nachgewiesen werden, jedoch blieb ein dosisabhängiger Anstieg der Aromataseexpression aus. Ebenso wenig konnte eine Aufregulierung des Estrogenrezeptors beobachtet werden. Würde das hier eingesetzte synthetische Androgen (MENT, Nachfolgekandidat) über die Aromatisierung zu einem Estrogen überführt, so hätte die Estrogenrezeptorexpression dosisabhängig zunehmen müssen.

5.5 Schlussfolgerung

Aufgrund der vorliegenden und dargestellten Ergebnisse ist der Mechanismus der Gynäkomastie des Rüden mit der progesteronrezeptoraktivierten Growth-Hormon-Ausschüttung zu erklären. Das lokal in der Milchdrüse gebildete GH übt sowohl eine autokrine als auch parakrine Wirkung auf das Milchdrüsenepithel aus. Bei Anwendung des Prüfgegenstandes beim Mann ist dieser Mechanismus nicht übertragbar, da die Entwicklung der Milchdrüse beim Mann über Estrogen respektive eine erhöhte Aktivität der Aromatase induziert wird. Somit ist der Mechanismus des Rüden speziesspezifisch. Ob dieser Mechanismus reversibel ist, wie es bei der Hündin beschrieben ist, wurde in vorliegender Arbeit nicht untersucht.

6 Zusammenfassung

Einleitung: Nachdem fertilen Beagle-Rüden täglich ein synthetisches Androgen dermal über 4 und 39 Wochen verabreicht wurde, entwickelten sie Veränderungen der Milchdrüse im Sinne einer Gynäkomastie. Da es in der Literatur keinen Hinweis auf einen möglichen Mechanismus zur Entstehung der Gynäkomastie beim Rüden gibt, war es Ziel der vorliegenden Arbeit, die Umstände zu klären, die zu der Veränderung der Mamma führten. Dabei wurden die Ursachen der Gynäkomastie beim Mann (z.B. erhöhte Aromataseaktivität) ebenso wie die bereits bekannten und beschriebenen Mechanismen bei der Hündin (progesteronrezeptorvermittelt) mit in die Arbeitshypothese aufgenommen.

Material und Methoden: Die Untersuchungen erfolgten mit Hilfe immunhistochemischer und molekularbiologischer Methoden. Formalinfixiertes Milchdrüsenepithel von 64 männlichen Beagle Hunden wurde auf die mögliche Beteiligung von Growth-Hormon (GH), des Enzyms Aromatase sowie die Expression des Androgen-, Estrogen-, Progesteron-, und Growth-Hormonrezeptors untersucht.

Ergebnisse: Die Auswertung der histologischen Schnitte ergab, dass in den behandelten Gruppen dosisabhängig sowohl die alveolären als auch die duktaalen Strukturen zunehmen. Das Bild der höchsten Dosisgruppe erinnerte an das histologische Bild der Milchdrüse einer Hündin im Estrus.

Bei der immunhistochemischen Auswertung fanden in den Alveolar-, sowie in den Gangepithelien, teilweise auch im Myoepithel, bei den untersuchten Antikörpern bis auf den Aromatase-Antikörper gravierende Veränderungen in Abhängigkeit der Dosisgruppe statt. Die Aufregulierung des Progesteronrezeptors, sowie die zunehmende Expression von Growth-Hormon ließen den Schluss zu, dass es sich um den bei der Hündin bekannten Mechanismus handeln könnte. Mit Hilfe der RT-PCR und anschließender PCR konnte dann gezeigt werden, dass das in der Mamma immunhistochemisch dargestellte GH tatsächlich lokal exprimiert wurde und darüber hinaus ebenfalls mit der isolierten GH-RNA aus der Hypophyse übereinstimmt.

Schlussfolgerung: Mit der vorliegenden Arbeit ist es gelungen den Mechanismus einer medikamenten-induzierten Gynäkomastie beim Rüden zu beschreiben, der mit dem physiologischen Prozess in der Milchdrüse bei der Hündin im Metestrus übereinstimmt. Der Mechanismus ist spezies-spezifisch und nicht auf den Mann übertragbar.

7 Summary

Gynaecomastia in male beagle dog after application of steroidal androgen

Introduction: Male beagle dogs treated daily dermally for 4 and 39 weeks with a synthetic androgen developed alterations of the breast in the sense of a gynaecomastia. The well-known mechanism of gynaecomastia in man as well as the mechanism identified for the bitch during estrus cycle were considered to identify which mechanism is responsible for the mammary changes.

Material and Methods: Formalin fixed and paraffin embedded mammary gland tissue of 64 male beagle dog were examined for the expression of growth-hormon (GH), aromatase, androgen-, estrogen-, progesterone- and growth-hormon-receptors by immunohistochemical as well as molecular methods.

Results: Examination of the haematoxylin stained mammary gland tissue revealed a dose dependent increase of alveolar and ductal epithelia. In the high dose group the mammary gland resembled the mammary gland of a bitch during estrus. Immunohistochemistry showed dose dependend changes in alveolar and ductal epithelium for all antibodies used except the one for aromatse. The progesterone receptor and the GH were dose dependently upregulated in the mammary gland. Molecular techniques like RT-PCR and PCR revealed that the GH was produced locally in the mammary gland and was not of pituitary origin. In addition, sequence analysis showed homology between the GH isolated from the mammary gland and GH isolated from the pituitary.

Conclusion: In this study it was demonstrated that the mechanism of drug induced gynaecomastia in male dogs is comparable with the physiological process in the mammary gland of the bitch in the metestrus. In addition, the mechanism showed is species-specific and can not be translated into man.

8 Schrifttum

Agarwal,V.R., Takayama,K., Van Wyk,J.J., Sasano,H., Simpson,E.R. and Bulun,S.E., 1998. Molecular Basis of Severe Gynecomastia Associated with Aromatase Expression in a Fibrolamellar Hepatocellular Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 1797.

al Jassim,R.A. and Khamas,W.A., 1997. Gynaecomastia and galactorrhoea in a goat buck. *Aust. Vet. J.* 75, 669.

Basrur,P.K. and Yadav,B.R., 1990. Genetic diseases of sheep and goats. *Vet Clin. North Am. Food Anim Pract.* 6, 779.

Bembo,S.A. and Carlson,H.E., 2004. Gynecomastia: its features, and when and how to treat it. *Cleve. Clin. J. Med.* 71, 511.

Bidlingmaier,F. and Knorr,D., 1973. Plasma testosterone and estrogens in pubertal gynecomastia. *Z. Kinderheilkd.* 115, 89.

Boenisch,T., 2006. Heat-induced Antigen Retrieval: What Are We Retrieving? *J. Histochem. Cytochem.*

Bratka-Robia,C.B., Egerbacher,M., Helmreich,M., Mitteregger,G., Benesch,M. and Bamberg,E., 2002. Immunohistochemical localization of androgen and oestrogen receptors in canine hair follicles. *Vet. Dermatol.* 13, 113.

Braun,U., Leidl,W., De Coster,R., Schams,D., Kahn,W. and von Sandersleben,J., 1984. [Mammary changes in male dogs following gestagen treatment]. *Berl Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 97, 447.

Braunstein,G.D., 1993. Gynecomastia. *N. Engl. J. Med.* 328, 490.

Braunstein,G.D., 1999. Aromatase and gynecomastia. *Endocr. Relat Cancer* 6, 315.

Budras,K.D., Fricke,W. and Richter,R., 1996. Brust- und Bauchwand. In: *Atlas der Anatomie des Hundes*. [Schlütersche Verlagsanstalt und Druckerei GmbH & Co., Hannover], pp. 28-37.

Caine,M., Perlberg,S. and Gordon,R., 1975. The treatment of benign prostatic hypertrophy with flutamide (SCH: 13521): a placebo-controlled study. *J Urol.* 114, 564.

Cameron,A.M. and Faulkin,L.J., Jr., 1971. Hyperplastic and inflammatory nodules in the canine mammary gland. *J Natl. Cancer Inst.* 47, 1277.

Carreau,S., Lambard,S., Delalande,C., Denis-Galeraud,I., Bilinska,B. and Bourguiba,S., 2003. Aromatase expression and role of estrogens in male gonad : a review. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1, 35.

- Carson-Jurica, M.A., Schrader, W.T. and O'Malley, B.W., 1990. Steroid receptor family: structure and functions. *Endocr Rev* 11, 201.
- Cartun, R.W. and Pedersen, C.A., 1989. An immunohistochemical technique offering increased sensitivity and lowered cost with streptavidin-horseradish peroxidase conjugate. *Journal of Histotechnology* 12, 273.
- Castro, M., Santos, M.F., Silva, L., Tortelly, R., Voss, C., Oliveira, F. and Oliveira, C., 1999. Sertolioma of a dog: Ultrasound diagnostic. *Revista Brasileira de Reproducao Animal* 23, 464.
- Cavanaugh, J., Niewoehner, C.B. and Nuttall, F.Q., 1990. Gynecomastia and cirrhosis of the liver. *Arch. Intern. Med.* 150, 563.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156.
- Christensen G.C., 1979. The Mammae. In: Evans H.E.; Christensen G.C., Miller's Anatomy of the dog, second Edition. [W.B.Saunders Company Philadelphia London Toronto Mexico City Rio de Janeiro Sydney Tokyo, pp. 101-06.
- Concannon, P., Altszuler, N., Hampshire, J., Butler, W.R. and Hansel, W., 1980. Growth hormone, prolactin, and cortisol in dogs developing mammary nodules and an acromegaly-like appearance during treatment with medroxyprogesterone acetate. *Endocrinology* 106, 1173.
- Concannon, P., Hansel, W. and Mcentee, K., 1977. Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch. *Biol. Reprod.* 17, 604.
- Conley, A. and Hinshelwood, M., 2001. Mammalian aromatases. *Reproduction.* 121, 685.
- Evans, N.A., 1997. Gym and tonic: a profile of 100 male steroid users. *Br. J Sports Med.* 31, 54.
- Funder, J.W. and Mercer, J.E., 1979. Cimetidine, a histamine H2 receptor antagonist, occupies androgen receptors. *J Clin. Endocrinol Metab* 48, 189.
- Garcia Rodriguez, L.A. and Jick, H., 1994. Risk of gynaecomastia associated with cimetidine, omeprazole, and other antiulcer drugs. *BMJ* 308, 503.
- Gasc, J.M. and Baulieu, E.E., 1986. Steroid hormone receptors: intracellular distribution. *Biol. Cell* 56, 1.
- Geller, J., Vazakas, G., Fruchtman, B., Newman, H., Nakao, K. and Loh, A., 1968. The effect of cyproterone acetate on advanced carcinoma of the prostate. *Surg. Gynecol. Obstet.* 127, 748.
- Glass, A.R., 1994. Gynecomastia. *Endocrinol Metab Clin. North Am.* 23, 825.

- Gordon,G.G., Olivo,J., Rafil,F. and Southren,A.L., 1975. Conversion of androgens to estrogens in cirrhosis of the liver. J. Clin. Endocrinol. Metab 40, 1018.
- Gottswinter,J.M., Korth-Schutz,S. and Ziegler,R., 1984. Gynecomastia caused by estrogen containing hair lotion. J Endocrinol Invest 7, 383.
- Green,S. and Chambon,P., 1988. Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. Trends Genet. 4, 309.
- Green,S., Kumar,V., Theulaz,I., Wahli,W. and Chambon,P., 1988. The N-terminal DNA-binding 'zinc finger' of the oestrogen and glucocorticoid receptors determines target gene specificity. EMBO J 7, 3037.
- Gronemeyer,H., 1992. Control of transcription activation by steroid hormone receptors. FASEB J 6, 2524.
- Grosso,D.S., Boyden,T.W., Pamenter,R.W., Johnson,D.G., Stevens,D.A. and Galgiani,J.N., 1983. Ketoconazole inhibition of testicular secretion of testosterone and displacement of steroid hormones from serum transport proteins. Antimicrob. Agents Chemother. 23, 207.
- Gröters S. Nachweis von MMP-9-, MMP-14- und TIMP-1-mRNS im Gehirn von Hunden mit einer Staupeenzephalitis mittels *in situ*-Hybridisierung. 2004. Gießen, Justus-Liebig-Universität, Fachbereich Veterinärmedizin.
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Guay,A.T., Bansal,S. and Heatley,G.J., 1995. Effect of raising endogenous testosterone levels in impotent men with secondary hypogonadism: double blind placebo-controlled trial with clomiphene citrate. J Clin Endocrinol Metab 80, 3546.
- Guiochon-Mantel,A., Delabre,K., Lescop,P. and Milgrom,E., 1996. The Ernst Schering Poster Award. Intracellular traffic of steroid hormone receptors. J Steroid Biochem. Mol Biol. 56, 3.
- Guiochon-Mantel,A., Lescop,P., Christin-Maitre,S., Loosfelt,H., Perrot-Appianat,M. and Milgrom,E., 1991. Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor. EMBO J 10, 3851.
- Habermehl,K.-H., 1996. Haut und Hautorgane; Milchdrüse, Mamma. In: Nickel,R; Schummer,A; Seiferle,E, Lehrbuch der Anatomie der Haustiere III, 3., überarbeitete Auflage: Habermehl K.-H., Vollmerhaus B., Wikens H., Waibl H. [Paul Parey-Verlag, Berlin Hamburg, pp. 476-84.
- Hager,G.L., Lim,C.S., Elbi,C. and Baumann,C.T., 2000. Trafficking of nuclear receptors in living cells. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 74, 249.
- Hall,W.H., 1976. Letter: Breast changes in males on cimetidine. N. Engl. J Med. 295, 841.
- Hayes,F.J., Seminara,S.B., Decruz,S., Boepple,P.A. and Crowley,W.F., Jr., 2000. Aromatase inhibition in the human male reveals a hypothalamic site of estrogen feedback. J Clin. Endocrinol Metab 85, 3027.

- Heidbrink and Kaup, 1990. Sertoli cell tumour with feminization syndrome in a German Longhaired male dog. Case report. *Kleintierpraxis*, 1990, vol. 35, no. 12, p. 661-665, 8 ref. , 35, 661.
- Heidrich,H.J. and Renk W., 1967. Anomalies of Lactation. In: *Deseases of the Mammary Glands of Domestic Animals*. Translated by LW vanden Heever. [W.B.Saunders Company Philadelphia London Toronto Mexico City Rio de Janero Sydney Tokyo, pp. 37-46.
- Hershkovitz,E.M.D. and Leiberman,E.M.D., 2002. Gynecomastia: A Review. *Endocrinologist* 12, 321.
- Hsu,S.M., Raine,L. and Fanger,H., 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 29, 577.
- Ismail,A.A. and Barth,J.H., 2001. Endocrinology of gynaecomastia. *Ann. Clin. Biochem.* 38, 596.
- Janett,F., Stockli,A., Thun,R. and Nett,P., 1996. [Gynecomastia in a goat buck]. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 138, 241.
- Jenster,G., Spencer,T.E., Burcin,M.M., Tsai,S.Y., Tsai,M.J. and O'Malley,B.W., 1997. Steroid receptor induction of gene transcription: A two-stepámodel. *PNAS* 94, 7879.
- Kawata,M., Matsuda,K., Nishi,M., Ogawa,H. and Ochiai,I., 2001. Intracellular dynamics of steroid hormone receptor. *Neuroscience Research* 40, 197.
- Kelly,P.A., Djiane,J., Postel-Vinay,M.C. and Edey,M., 1991. The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocr Rev* 12, 235.
- Kelly,P.A., Goujon,L., Sotiropoulos,A., Dinerstein,H., Esposito,N., Edey,M., Finidori,J. and Postel-Vinay,M.C., 1994. The GH receptor and signal transduction. *Horm. Res.* 42, 133.
- Kew,M.C., Kirschner,M.A., Abrahams,G.E. and Katz,M., 1977. Mechanism of feminization in primary liver cancer. *N. Engl. J. Med.* 296, 1084.
- Khodakaram Tafti A and Ahmadi M R,B.A., 1998. Sertoli cell tumour and metastatic seminoma in a **dog**. *Indian Veterinary Journal* 75, 412.
- Kim,O. and Kim,K.S., 2005. Seminoma with hyperestrogenemia in a Yorkshire Terrier. *J Vet Med. Sci.* 67, 121.
- Koch,T. and Berg,R., 1993. Milchdrüse, Glandula lactifera. In: T.Koch and R.Berg (Eds.) *Lehrbuch de Veterinär-Anatomie, Band III*. [VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, Jena], pp. 566-69.
- Köhler,H., 1950. Seminom und Gynäkomastie bei einem Hund. *Exper. Vet. Med.* 1, 105.

Kumar,S., Saradhi,M., Chaturvedi,N.K. and Tyagi,R.K., 2006. Intracellular localization and nucleocytoplasmic trafficking of steroid receptors: An overview. *Molecular and Cellular Endocrinology* 246, 147.

LaFranchi,S.H., Parlow,A.F., Lippe,B.M., Coyotupa,J. and Kaplan,S.A., 1975. Pubertal gynecomastia and transient elevation of serum estradiol level. *Am. J. Dis. Child* 129, 927.

Lantinga-van Leeuwen,I.S., Oudshoorn,M. and Mol,J.A., 1999. Canine mammary growth hormone gene transcription initiates at the pituitary-specific start site in the absence of Pit-1. *Mol. Cell Endocrinol.* 150, 121.

Lantinga-van Leeuwen,I.S., Timmermans-Sprang,E.A. and Mol,J.A., 2002. Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the canine growth hormone gene. *Mol. Cell Endocrinol.* 197, 133.

Lantinga-van Leeuwen,I.S., van Garderen,E., Rutteman,G.R. and Mol,J.A., 2000. Cloning and cellular localization of the canine progesterone receptor: co-localization with growth hormone in the mammary gland. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 75, 219.

Lazala,C. and Saenger,P., 2002. Pubertal gynecomastia. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab* 15, 553.

Leong,A.S. and Gilham,P.N., 1989. The effects of progressive formaldehyde fixation on the preservation of tissue antigens. *Pathology* 21, 266.

Liebich H-G, 1999. Milchdrüse (Glandula mammaria, Mamma, Euter, Gesäuge). In: *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis.* [Schattauer, Stuttgart, New York, pp. 316-20.

Lobie,P.E., Breipohl,W., Aragon,J.G. and Waters,M.J., 1990a. Cellular localization of the growth hormone receptor/binding protein in the male and female reproductive systems. *Endocrinology* 126, 2214.

Lobie,P.E., Breipohl,W. and Waters,M.J., 1990b. Growth hormone receptor expression in the rat gastrointestinal tract. *Endocrinology* 126, 299.

Lobie,P.E., Garcia-Aragon,J., Wang,B.S., Baumbach,W.R. and Waters,M.J., 1992. Cellular localization of the growth hormone binding protein in the rat. *Endocrinology* 130, 3057.

Lofstedt,R.M., Laarveld,B. and Ihle,S.L., 1994. Adrenal neoplasia causing lactation in a castrated male goat. *J Vet. Intern. Med.* 8, 382.

loriaux, 1976. Spironolactone and endocrine dysfunction. *Annals of internal medicine*, Nov 1976, vol. 85, no. 5, p. 630-6, 85, 630.

Lukas,S.E., 1993. Current perspectives on anabolic-androgenic steroid abuse. *Trends in Pharmacological Sciences* 14, 61.

Ma,X.C., Wang,Y., Liu,J.H. and Tu,Z.H., 2000. Moclobemide-induced gynecomastia in rats. *Acta Pharmacol. Sin.* 21, 893.

- Mahler,C., Verhelst,J. and Denis,L., 1993. Ketoconazole and liarozole in the treatment of advanced prostatic cancer. *Cancer* 71, 1068.
- Maravelias,C., Dona,A., Stefanidou,M. and Spiliopoulou,C., 2005. Adverse effects of anabolic steroids in athletes. A constant threat. *Toxicol. Lett.* 158, 167.
- Marinelli,L., Gabai,G., Wolfswinkel,J. and Mol,J.A., 2004. Mammary steroid metabolizing enzymes in relation to hyperplasia and tumorigenesis in the dog. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 92, 167.
- Marx,D., Klempp,J., Loeffler,K. and Bohm,S., 1975. [Gynaecomastia in a male goat. I. Sexual activity and sperm and milk quality (author's transl)]. *Zuchthygiene.* 10, 125.
- Mathur,R. and Braunstein,G.D., 1997. Gynecomastia: pathomechanisms and treatment strategies. *Horm. Res.* 48, 95.
- Mertani,H.C., Pechoux,C., Garcia-Caballero,T., Waters,M.J. and Morel,G., 1995. Cellular localization of the growth hormone receptor/binding protein in the human anterior pituitary gland. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 80, 3361.
- Meyer,H.H.D., 1994. Hormonrezeptoren: Überträger der Hormonwirkung in den Zielzellen. In: Döcke, F *Veterinärmedizinische Endokrinologie 3.*, völlig überarbeitete und erweiterte Auflage. [Gustav Fischer Verlag Jena Stuttgart, pp. 76-91.
- Mischke,R., Meurer,D., Hoppen,H.-O., Ueberschar,S. and Hewicker-Trautwein,M., 2002. Blood plasma concentrations of oestradiol-17[beta], testosterone and testosterone/oestradiol ratio in dogs with neoplastic and degenerative testicular diseases. *Research in Veterinary Science* 73, 267.
- Mol,J.A., Lantinga-van Leeuwen,I., van Garderen,E. and Rijnberk,A., 2000. Progesterin-induced mammary growth hormone (GH) production. *Adv. Exp. Med. Biol.* 480, 71.
- Mol,J.A., Lantinga-van Leeuwen,I.S., van Garderen,E., Selman,P.J., Oosterlaken-Dijksterhuis,M.A., Schalken,J.A. and Rijnberk,A., 1999. Mammary growth hormone and tumorigenesis--lessons from the dog. *Vet. Q.* 21, 111.
- Mol,J.A., Selman,P.J., Sprang,E.P., van Neck,J.W. and Oosterlaken-Dijksterhuis,M.A., 1997. The role of progestins, insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding proteins in the normal and neoplastic mammary gland of the bitch: a review. *J. Reprod. Fertil. Suppl* 51, 339.
- Mol,J.A., van Garderen,E., Selman,P.J., Wolfswinkel,J., Rijnberk,A. and Rutteman,G.R., 1995. Growth hormone mRNA in mammary gland tumors of dogs and cats. *J. Clin. Invest* 95, 2028.
- Mol,J.A., van,G.E., Rutteman,G.R. and Rijnberk,A., 1996. New insights in the molecular mechanism of progestin-induced proliferation of mammary epithelium: induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary glands of dogs, cats and humans. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 57, 67.

Moore,D.C., Schlaepfer,L.V., Paunier,L. and Sizonenko,P.C., 1984. Hormonal changes during puberty: V. Transient pubertal gynecomastia: abnormal androgen-estrogen ratios. J. Clin. Endocrinol. Metab 58, 492.

Nelson and Cox, 2001. Integration und hormonelle Regulation des Stoffwechsels von Säugetieren. In: Nelson, Cox Lehninger Biochemie. [Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, pp. 941-78.

Nelson,L.W. and Kelly,W.A., 1974. Changes in canine mammary gland histology during the estrous cycle. Toxicol. Appl. Pharmacol. 27, 113.

Nickel,R., Schummer,A. and Seiferle,E., 1984. Milchdrüse, Mamma. In: R.e.al.Nickel (Ed.) Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Band III. [Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, pp. 485-93-511-513.

Nicolis,G.L., Modlinger,R.S. and Gabrilove,J.L., 1971. A study of the histopathology of human gynecomastia. J Clin. Endocrinol Metab 32, 173.

Nieto,A., Pena,L., Perez-Alenza,M.D., Sanchez,M.A., Flores,J.M. and Castano,M., 2000. Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. Vet. Pathol. 37, 239.

Olson,P.N., Bowen,R.A., Behrendt,M.D., Olson,J.D. and Nett,T.M., 1982. Concentrations of reproductive hormones in canine serum throughout late anestrus, proestrus and estrus. Biol. Reprod. 27, 1196.

Patricelli,A.J., Lappin,M.R. and Steyn,P.F., 1999. Mammary gland uptake of sodium Tc-pertechnetate in a cat with a drug-induced gynecomastia. Vet Radiol. Ultrasound 40, 87.

Perry,J.K., Emerald,B.S., Mertani,H.C. and Lobie,P.E., 2006. The oncogenic potential of growth hormone. Growth Horm. IGF. Res. 16, 277.

Peters,M.A., de Jong,F.H., Teerds,K.J., de Rooij,D.G., Dieleman,S.J. and van Sluijs,F.J., 2000. Ageing, testicular tumours and the pituitary-testis axis in dogs. J Endocrinol 166, 153.

Peters,M.A., Mol,J.A., van Wolferen,M.E., Oosterlaken-Dijksterhuis,M.A., Teerds,K.J. and van Sluijs,F.J., 2003. Expression of the insulin-like growth factor (IGF) system and steroidogenic enzymes in canine testis tumors. Reprod. Biol. Endocrinol. 1, 22.

Peters,M.A., Teerds,K.J., van,d.G., I, de Rooij,D.G. and van Sluijs,F.J., 2001. Use of antibodies against LH receptor, 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase and vimentin to characterize different types of testicular tumour in dogs. Reproduction. 121, 287.

Pont,A., Goldman,E.S., Sugar,A.M., Siiteri,P.K. and Stevens,D.A., 1985. Ketoconazole-induced increase in estradiol-testosterone ratio. Probable explanation for gynecomastia. Arch. Intern. Med. 145, 1429.

Prezioso,D., Piccirillo,G., Galasso,R., Altieri,V., Mirone,V. and Lotti,T., 2004. Gynecomastia due to hormone therapy for advanced prostate cancer: a report of ten surgically treated cases and a review of treatment options. Tumori 90, 410.

- Prisant,L.M. and Chin,E., 2005. Gynecomastia and hypertension. J Clin. Hypertens. (Greenwich.) 7, 245.
- Rastogi P.A., 1999. MacVector: Integrated Sequence Analysis for Macintosh. In: S.Misener & S.A.Krawetz (Ed.) Bioinformatics Methods and Protocols. [Humana Press, New Jersey (USA)], pp. 47-69.
- Remmele,W. and Stegner,H.E., 1987. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. Pathologe 8, 138.
- Rhoden,E.L. and Morgentaler,A., 2004. Treatment of testosterone-induced gynecomastia with the aromatase inhibitor, anastrozole. Int. J. Impot. Res. 16, 95.
- Rieck GW, 1975. Gynäkomastie bei einem Ziegenbock. II Zytogenetische Befunde: XO/XY-Mosaik mit variablen Deletionen des Y-Chromosoms. Zuchthyg 1975;10;159-168 10, 159.
- Rieu,M., Reznik,Y., Vannetzel,J.M., Mahoudeau,J., Berrod,J.L. and Kuhn,J.M., 1995. Testicular steroidogenesis in adult men with human chorionic gonadotropin-producing tumors. J Clin Endocrinol Metab 80, 2404.
- Rifka,S.M., Pita,J.C., Vigersky,R.A., Wilson,Y.A. and Loriaux,D.L., 1978. Interaction of digitalis and spironolactone with human sex steroid receptors. J Clin Endocrinol Metab 46, 338.
- Rijnberk,A., Kooistra,H.S. and Mol,J.A., 2003. Endocrine diseases in dogs and cats: similarities and differences with endocrine diseases in humans. Growth Horm. IGF. Res. 13 Suppl A, S158-S164.
- Rijnberk,A. and Mol,J.A., 1997. Progesterin-induced hypersecretion of growth hormone: an introductory review. J Reprod. Fertil. Suppl 51, 335.
- Ringler,D.H. and Abrams,G.D., 1972. Gynecomastia and galactorrhea in a male rhesus monkey (*Macaca mulatta*) with spontaneous metastatic carcinoma. J Med. Primatol. 1, 309.
- Rocheffort,H. and Garcia,M., 1983. The estrogenic and antiestrogenic activities of androgens in female target tissues. Pharmacology & Therapeutics 23, 193.
- Rochira,V., Zirilli,L., Genazzani,A.D., Balestrieri,A., Aranda,C., Fabre,B., Antunez,P., Diazzi,C., Carani,C. and Maffei,L., 2006. Hypothalamic-pituitary-gonadal axis in two men with aromatase deficiency: evidence that circulating estrogens are required at the hypothalamic level for the integrity of gonadotropin negative feedback. Eur J Endocrinol 155, 513.
- Romeis,B., Böck,P., Denk,H., Künzle,H., Plenk,H., Rüschoff,J. and Sellner,W., 1989. Mikroskopische Technik, 17. neubearbeitete Auflage Herausgegeben von P. Böck. Urban und Schwarzenberg München; Wien; Baltimore.
- Rozen,S. and Skaletsky,H.J. *Primer3*. Code available at http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html. 1996.
Ref Type: Computer Program

Rutteman,G.R., 1992. Contraceptive steroids and the mammary gland: is there a hazard?-- Insights from animal studies. *Breast Cancer Res. Treat.* 23, 29.

Saitou,N. and Nei,M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406.

Sasano,H., Kimura,M., Shizawa,S., Kimura,N. and Nagura,H., 1996. Aromatase and steroid receptors in gynecomastia and male breast carcinoma: an immunohistochemical study. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 81, 3063.

Schonbauer,M., 1981. [Mammary tumors in male dogs]. *Berl Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 94, 319.

Selman,P.J., Mol,J.A., Rutteman,G.R., van Garderen,E. and Rijnberk,A., 1994. Progestin-induced growth hormone excess in the dog originates in the mammary gland. *Endocrinology* 134, 287.

Shackelford,C., Long,G., Wolf,J., Okerberg,C. and Herbert,R., 2002. Qualitative and quantitative analysis of nonneoplastic lesions in toxicology studies. *Toxicol. Pathol.* 30, 93.

Shi,S.R., Cote,R.J. and Taylor,C.R., 1997. Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future. *J. Histochem. Cytochem.* 45, 327.

Shi,S.R., Cote,R.J. and Taylor,C.R., 2001. Antigen retrieval techniques: current perspectives. *J. Histochem. Cytochem.* 49, 931.

Silveira,L.F., MacColl,G.S. and Bouloux,P.M., 2002. Hypogonadotropic hypogonadism. *Semin. Reprod. Med.* 20, 327.

Simpson,E.R., Zhao,Y., Agarwal,V.R., Michael,M.D., Bulun,S.E., Hinshelwood,M.M., Graham-Lorence,S., Sun,T., Fisher,C.R., Qin,K. and Mendelson,C.R., 1997. Aromatase expression in health and disease. *Recent Prog. Horm. Res.* 52, 185.

Sinowatz,F., 1990. Haut (Integument) und Anhangsorgane. In: I.Rüsse and F.Sinowatz (Eds.) *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*. [Verlag Paul Parey Berlin und Hamburg, Hamburg], pp. 399-408.

Smollich,A. and Michel,G., 1992. Milchdrüse. In: A.Smollich and G.Michel (Eds.) *Mikroskopische Anatomie der Haustiere*. [VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, Jena], pp. 336-54.

Stratakis,C.A., Vottero,A., Brodie,A., Kirschner,L.S., DeAtkine,D., Lu,Q., Yue,W., Mitsiades,C.S., Flor,A.W. and Chrousos,G.P., 1998. The aromatase excess syndrome is associated with feminization of both sexes and autosomal dominant transmission of aberrant P450 aromatase gene transcription. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 83, 1348.

Stumpf,M., 2004. Gynecomastia. Diagnostic and therapeutic aspects. *Gynäkologische Endokrinologie* 2, 139.

Tenbaum,S. and Baniahmad,A., 1997. Nuclear receptors: structure, function and involvement in disease. *Int. J Biochem. Cell Biol.* 29, 1325.

Thompson,D.F. and Carter,J.R., 1993. Drug-induced gynecomastia. *Pharmacotherapy* 13, 37.

Thompson,J.D., Higgins,D.G. and Gibson,T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22, 4673.

Thun,R. and Schwarz-Porsche,D., 1994. Nebennierenrinde. In: Döcke, F. *Veterinärmedizinische Endokrinologie 3., völlig überarbeitete und erweiterte Auflage.* [Gustav Fischer Verlag Jena Stuttgart, pp. 309-53.

Turner,K.J., Macpherson,S., Millar,M.R., McNeilly,A.S., Williams,K., Cranfield,M., Groome,N.P., Sharpe,R.M., Fraser,H.M. and Saunders,P.T., 2002. Development and validation of a new monoclonal antibody to mammalian aromatase. *J. Endocrinol.* 172, 21.

van Garderen,E., de Wit,M., Voorhout,W.F., Rutteman,G.R., Mol,J.A., Nederbragt,H. and Misdorp,W., 1997. Expression of growth hormone in canine mammary tissue and mammary tumors. Evidence for a potential autocrine/paracrine stimulatory loop. *Am. J. Pathol.* 150, 1037.

van Garderen,E. and Schalken,J.A., 2002. Morphogenic and tumorigenic potentials of the mammary growth hormone/growth hormone receptor system. *Mol. Cell Endocrinol.* 197, 153.

van Garderen,E., van der Poel,H.J., Swennenhuis,J.F., Wissink,E.H., Rutteman,G.R., Hellmen,E., Mol,J.A. and Schalken,J.A., 1999. Expression and molecular characterization of the growth hormone receptor in canine mammary tissue and mammary tumors. *Endocrinology* 140, 5907.

Veldhuis,J.D., King,J.C., Urban,R.J., Rogol,A.D., Evans,W.S., Kolp,L.A. and Johnson,M.L., 1987. Operating characteristics of the male hypothalamo-pituitary-gonadal axis: pulsatile release of testosterone and follicle-stimulating hormone and their temporal coupling with luteinizing hormone. *J Clin. Endocrinol Metab* 65, 929.

von Bomhard,D. and Kappes,H., 1976. [Ultrastructural and ultrahistochemical studies on the canine mammary gland. I. Ultrastructural studies]. *Zentralbl. Veterinarmed. [C.]* 5, 68.

Walter,J.H. Epikrise epithelialer Neoplasien beim Hund
Epidemiologische, biochemische und immunhistochemische Untersuchungen. 1-307. 1998.
Institut für Veterinär-Pathologie der Freien Universität Berlin.
Ref Type: Thesis/Dissertation

Walter,J.H. Histomorphology and Mechanisms of Carcinogenicity Effects of the Mammary Gland in Dogs. ESTP Riws I-ESTPO-TIHo Seminar on November 20-22, 2003. 2003.
Ref Type: Unpublished Work

Weinstein,R.L., Kelch,R.P., Jenner,M.R., Kaplan,S.L. and Grumbach,M.M., 1974. Secretion of unconjugated androgens and estrogens by the normal and abnormal human testis before and after human chorionic gonadotropin. *J Clin. Invest* 53, 1.

Weiss,E. and Käufer-Weiss,I., 1999. Geschlechtsorgane. In: Dahme, E; Weiss, E Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere; 5., neu bearbeitete und erweiterte Auflage. [Ferdinan Enke Verlag Stuttgart, pp. 278-319.

Weyrauch,K.D. and Smollich,A., 1998. Haut und Hautorgane. In: K.D.Weyrauch and A.Smollich (Eds.) Histologie-Kurs für Veterinärmediziner. [Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, pp. 131-38.

Wilson,J.D., Aiman,J. and MacDonald,P.C., 1980. The pathogenesis of gynecomastia. Adv. Intern. Med. 25, 1.

Wooldridge,A.A., Gill,M.S., Lemarchand,T., Eilts,B., Taylor,H.W. and Otterson,T., 1999. Gynecomastia and mammary gland adenocarcinoma in a Nubian buck. Can. Vet. J. 40, 663.

Wrobel,K.H., El Etreby,M. and Gunzel,P., 1974. [Histochemical and histological studies on the mammary gland of the female beagle dog during different stages of reproduction (author's transl)]. Acta Histochem. 51, 61.

Yamashita,S., 1998. Localization and functions of steroid hormone receptors. Histol. Histopathol. 13, 255.

Young,W.A., 1980. Gynecomastia in a pet monkey. Vet. Med. Small Anim Clin. 75, 1229.

9 Anhang

9.1 Immunhistologie

9.1.1 Verdünnung der primären Antikörper

Gefriergetrocknete Antikörper werden nach Hinweis des Herstellers gelöst, in der Regel in sterilem Aqua bidest.. Antikörper-Konzentrate mit Antikörperverdünnungslösung verdünnen. Die Verdünnungen werden vor Gebrauch angesetzt.

9.1.1.1 Gebrauchslösung des biotinylierten anti-Immunoglobulin-Konzentrats (Link) bzw. des Streptavidin-Peroxidase-Konzentrats (Label)

Link/Label-Konzentrat vor Gebrauch mit entsprechender Link/Label-Verdünnungslösung verdünnen.

9.1.2 Protokoll der Immunhistologie (LSAB-Methode) für Paraffinschnitte

- Entparaffinierung in Xylol für zweimal für 10 min, in Isopropanol und 96 %igem Ethanol für je zweimal 2 min und für je 1 min in 70 %igem und 50 %igem Ethanol, zweimal spülen in Aqua bidest.
- Demaskierung der Antigene mittels Dampfgerar in einer Target Retrieval Lösung pH 6,1 (Fa. DakoCytomation) für insgesamt 38 min., wobei die erforderliche Temperatur von 90-100 °C erst nach 20 min. erreicht wird
- Abkühlen der Objektträger bei Raumtemperatur
- Überführen der Objektträger in den DakoCytomation Autostainer (Pipettierautomat) und umranden der Schnitte mit einem Fettstift (PapPen, Fa. DakoCytomation)
- Überschichten der Schnitte mit einer Ready-to-Use H₂O₂-Lösung (Fa. DakoCytomation) für 15 min zur Hemmung der endogenen Peroxidase
- Spülen der Schnitte mit TBS (Waschpuffer, Fa. DakoCytomation)
- Auftragen des Proteinblocks (DakoCytomation, für 10 min.
- Abblasen des Proteinblocks
- Überführen der Objektträger in eine feuchte Kammer (ausgelegt mit feuchtem Fliespapier)
- Auftragen von je 250 µl Primärantikörper in Antikörperverdünnungsmedium (Fa. DakoCytomation), bzw. entsprechendem Kontrollserum; Inkubation über Nacht bei 4 °C
- Erwärmen der Schnitte auf Zimmertemperatur (mind. 20 min.), anschließend Überführen der Objektträger in den Autostainer
- Spülen der Schnitte zweimal mit TBS
- Überschichten mit je 250 µl Sekundärantikörper (Link) in entsprechender Verdünnung; Inkubation für 30 min. bei Raumtemperatur

-
- Spülen der Schnitte zweimal mit TBS
 - Auftragen von je 250 µl Tertiärantikörper (Label) für 30 min. bei Raumtemperatur (Herstellung des LSAB-Komplexes mind. 30 min. vor Gebrauch)
 - Spülen der Schnitte zweimal mit TBS
 - Überführen der Objektträger in eine feuchte Kammer
 - Auftragen von DAB (3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) unter mikroskopischer Kontrolle bis das DAB-Oxid (Braunfärbung) sichtbar wird
 - Spülen der Schnitte in TBS für 5 min, anschließend Verbringen der Schnitte in Aqua bidest. für 5 min.
 - Gegenfärbung der Schnitte mit Hämalaun nach Mayer (Romeis, 1989) für 1 bis 2 min.;
 - Abspülen des überschüssigen Hämalauns mit Aqua bidest.
 - Bläuen der Schnitte in kaltem Leitungswasser für 10 min.
 - Entwässern der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe für je 1 bis 2 min. in 50 %igem, 70 %igem und 96 %igem Alkohol, für 3 min. in Isoprpanol und zweimal 3 min. in Xylol
 - Eindecken der Schnitte mit Hilfe des Objektträger-Eindeckautomaten RCM 7000 (Medite Medizintechnik GmbH, Bugdorf) in Eukitt®

9.2 Molekularbiologische Protokolle

9.2.1 Protokoll zur reversen Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Kit: Omniskript, Qiagen

20 µl Reaktionsansatz

Allgemeines

RNA und Enzyme immer schön auf Eis lassen

Zuerst RNaseOUT-Mix und Random Hexamer-Mix herstellen (beides gehört dann auf Eis)

Random Hexamer-Mix ruhig großzügig herstellen, Pipettierfehler mitkalkulieren (1-2 Portionen mehr herstellen)

Anzahl der Proben richtet sich nach Anzahl der RNA-Proben

Rechenbeispiel:

Bei Verwendung von 2 unterschiedlichen RNA *samples*

2 Proben RNA = 2 Reaktionsansätze a 20 µl

Es empfiehlt sich, mit einer hohen RNA-Konzentration zu arbeiten, da die fertige cDNA im Anschluss an die reverse Transkription immer noch mit DEPC-Aqua bidest., bzw. RNase freies H₂O verdünnt werden kann!

Step 1 (Vorbereiten)

Arbeitsfläche reinigen (RNase Zap, Fa. Ambion®)

Eis bereitstellen

Reagenzien (10 x buffer, dNTP-Mix, Random Hexamers und RNA) auftauen bei Raumtemperatur

aufgetaute RNA sofort auf Eis

0,5 ml PCR-tubes (Reaktionsansatz) und 1,5 ml Eppis (für den Mastermix) beschriften

aufgetaute Reagenzien gut mischen (Vortexen oder durch Schnippen)

alle Reagenzien kurz an zentrifugieren (3600-4000 x g/ 4000-7000 rpm)

Random Hexamers auf Eis stellen

Step 2 (Mixe herstellen)

Random Hexamer- und RNaseOUT-Mix herstellen: zuerst DEPC-Aqua bidest. vorlegen, dann den Rest, Enzym immer zum Schluss

Mixe gut mischen:

Random Hexamer-Mix (Vortexen oder durch Schnippen)

Rnase OUT-Mix vorsichtig Schnippen (nicht vortexen!!)

kurz an zentrifugieren (3600-4000 x g/ 4000-7000 rpm)

Random Hexamers-Mix und RnaseOUT-Mix auf Eis stellen

Step 3 (Mastermix herstellen)

Reagenzien der Reihe nach (wie im Protokoll) pipettieren:

buffer

dNTPs

Weiter geht's auf Eis!

Random Hexamer-Mix

RNaseOUT-Mix

reverse Transkriptase

Mastermix vorsichtig durch Schnippen mischen (nicht vortexen!!)

kurz anzentrifugieren und Mastermix sofort auf Eis setzen

Step 4 (Reaktionsansatz herstellen)

12 µl RNA der Probenzahl entsprechend auf Eis in 0,5 ml tubes pipettieren

8 µl Mastermix/ Probe zugeben

Nun sollten 20 µl voll sein!

Reaktionsansatz vorsichtig mischen durch Schnippen

Reaktionsansatz kurz anzentrifugieren

Bis zum Beladen des Thermocyclers Reaktionsansatz auf Eis belassen!

Step 5 (Lagern)

bei -20°C bis zum weiteren Gebrauch

9.2.2 Protokoll zur PCR

Kit: AmpliTaq, Applied Biosystems

50 µl Reaktionsansatz

Allgemeines

Immer als Erstes Gedanken zum Probenumfang machen!

Die Anzahl der Reaktionsansätze bemisst sich an der Anzahl der Primerpaare und der eingesetzten cDNA-Proben.

Für jedes Primerpaar immer eine Negativkontrolle mitführen (enthält keine cDNA, sondern nur entsprechendes Volumen DEPC-Aqua bidest.)

Rechenbeispiel:

Bei Verwendung von 2 Primerpaaren und zwei cDNA-Proben: 6 Reaktionsansätze bzw. 6 x 0,5 ml PCR-tubes:

(2 Proben cDNA + 1 Negativkontrolle) x 2 Primerpaare

Step 1 (Vorbereiten)

Arbeitsfläche reinigen

Eis bereitstellen

Reagenzien (10 x PCR buffer, MgCl₂-Lösung, dNTP-Mix, Primer und cDNA) auftauen

0,5 ml PCR-tubes (Reaktionsansatz) und 1,5 ml Eppis (für den Mastermix) beschriften

aufgetaute Reagenzien gut mischen (Vortexen oder durch Schnippen)

alle Reagenzien kurz an zentrifugieren (3600-4000 x g/ 4000-7000 rpm)

Primer und cDNA auf Eis stellen

Step 2 (Mastermix herstellen)

Reagenzien der Reihe nach (wie im Protokoll) pipettieren

DEPC-Aqua bidest.-H₂O, buffer, MgCl₂, dNTP-Mix, (evtl. Primer)

(Wird nur ein Primerpaar verwendet, diese dem noch nicht aliquotierten Mastermix zugeben; bei Verwendung unterschiedlicher Primer: diese in den aliquotierten Mastermix geben!)

Weiter geht's auf Eis!

Taq-Polymerase hinzufügen

Mastermix vorsichtig durch Schnippen mischen (nicht vortexen!!)

kurz an zentrifugieren und Mastermix sofort auf Eis setzen

Step 3 (Reaktionsansatz herstellen)

Mastermix der Probenzahl entsprechend aliquotieren und auf Eis stellen

Volumen ergibt sich aus

$50 \mu\text{l}$ Reaktionsansatz – Volumen cDNA (- Volumen Primerpaar)

(d.h.: bei Verwendung von $1 \mu\text{l}$ sense und $1 \mu\text{l}$ antisense Primer und $3 \mu\text{l}$ cDNA: pro Eppi $45 \mu\text{l}$ Mastermix ohne Primer geben, bzw. $47 \mu\text{l}$ Mastermix, falls er schon Primer enthält)

Falls der Mastermix keine Primer enthält, jetzt Primer nacheinander zugeben

cDNA hinzugeben: zuerst Negativkontrollen mit DEPC-Aqua bidest. befüllen, dann erst cDNA in andere Eppis geben (andersrum besteht Kontaminationsgefahr!)

Nun sollten $50 \mu\text{l}$ voll sein!

Reaktionsansatz vorsichtig mischen durch Schnippen

Reaktionsansatz kurz anzentrifugieren

Bis zum Beladen des Thermocyclers Reaktionsansatz auf Eis belassen!

9.3 Bezugsquellen für Reagenzien und Einmalware

ABgene® Advanced Biotechnologies, Hamburg <http://www.abgene.com/>

Superladder-Low, 100 bp-ladder, # SLL-100

6 x Type II DNA electrophoresis loading buffer, # AB-0564

Abcam®, Cambridge <http://www.abcam.com/>

Donkey Serum (sterile), # ab7475

Ambion® The RNA Company, Darmstadt <http://www.ambion.com>

DEPC-behandeltes Wasser, # AM9922-1L

RNaseZap® RNase Dekontaminations Lösung, # AM9780

RNaseZap® Wipes, # AM 9786

Applied Biosystems, Foster City <https://products.appliedbiosystems.com>

AmpliTaq Gold® with Gene Amp® 10x PCR Buffer, # N808-0241

Biogenex Laboratorities, San Ramon <http://www.biogenex.com/>

Anti-Human Growth-Hormone (hGH) polyclonal (rabbit), # PU 028-UP

Concentrated HRP Label (peroxidase-conjugated streptavidin), # HK 320-UK

Liquid DAB Substrate Pack Kit, # HK 153-5KE

Super Sensitive Mouse Link (biotinylated goat anti-mouse Ig), # HK 335-5M, 9M

Super Sensitive Rabbit Link (biotinylated goat anti-rabbit Ig), # HK 336-5R, 9R

Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf <http://www.biozym.com/>

Safeseal-Tips 1000 µl, # 692079

Safeseal-Tips 200 µl, # 692069

Safeseal-Tips 100 µl, # 692066

Safeseal-Tips 20 µl, # 692151

Safeseal-Tips 10 µl, # 693010

DakoCytomation GmbH, Hamburg <http://www.dakogmbh.de/>

DakoCytomation Control Slides, human breast carcinoma, # T1074

DakoCytomation Control Slides, human breast carcinoma, # T1382

DakoCytomation Permanent Red, # K0640

DakoCytomation Pen, # S 2002

DakoCytomation Peroxidase Blocking Reagent, # S2001

DakoCytomation Proteinase K Ready-to-Use, # S3020

DakoCytomation Protein Block Serum-Free, # X0909

DakoCytomation ChemMate™ Antibody Diluent Ready-to-Use, # S2022

DakoCytomation Target Retrieval Solution 10x Konzentrat, # S1699

DakoCytomation Target Wash Buffer 10x, # S3006

Diagonal GmbH & Co KG, Münster <http://www.diagonal.org>

Brand PCR-Reaktionsgefäße 0,5 ml, farblos # 781310

Brand PCR-Reaktionsgefäße 0,5 ml, rosa # 781311

Brand PCR-Reaktionsgefäße 0,5 ml, gelb # 781312

Brand PCR-Reaktionsgefäße 0,5 ml, grün # 781313

Brand PCR-Reaktionsgefäße 0,5 ml, blau # 781314

Zentrifugenröhrchen, 50 ml, steril # 227261

Eppendorf AG, Hamburg <http://www.eppendorf.de>

Safe-Lock-Reaktionsgefäße 1,5 ml, # 0030.120.086

Safe-Lock-Reaktionsgefäße 2,0 ml, # 0030.120.094

Fermentas GmbH, St. Leon-Rot <http://www.fermentas.com>

Ribonuklease-Inhibitor, # EO 0312

Invitrogen™ GmbH, Karlsruhe <http://www.invitrogen.com>

Horse Serum, # 16050-130

RNaseOUT™ *Recombinant Ribonuclease Inhibitor*, # 10777-019

Taq DNA Polymerase, rekombinant, # 10342-020

Kindler GmbH & Co KG, Freiburg <http://www.o-kindler.de>

Eukitt, #

Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren <https://www.macherey-nagel.com>

NucleoSpin® Extract II, # 740609.50

Medite Medizintechnik GmbH, Bugdorf <http://www.medite.de>

Hämatoxilin (Mayer), # 41513000

Menzel Gläser, Glasbearbeitungswerke GmbH & Co KG, Braunschweig <http://www.menzel.de>

SuperFrost Plus®-Objektträger, # 041300

MWG-Biotech, Ebersberg <http://www.mwg-biotech.com>

Primersynthese

Promega GmbH, Mannheim <http://www.promega.com>

Random Primers, # C1181

Qiagen GmbH, Hilden <http://www.invitrogen.com>

RNase-Free DNase Set, # 79254

RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit, # 74804

Omniskript® RT Kit, # 205111

Quartett Immundiagnostika & Biotechnologie GmbH, Berlin <http://www.quartett.com>

ProTaq Tris-Kochsalz-Puffer-Konzentrat (TBS) 50x, # 402000192

Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe <http://www.carl-roth.de>

Trichlormethan/ Chlorophorm Rotipuran®, # 3313.1

Sarstedt AG & Co, Nümbrecht <http://www.sarstedt.com>

Reaktionsgefäße 1,5 ml, # 72690

Reaktionsgefäße 2,0 ml, # 72695

Sequence Laboratories (SeqLab), Göttingen <http://www.seqlab.de>

Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten

9.4 Bezugsquellen für Geräte

Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf <http://www.biozym.com>

AlphaDigiDoc RT

Biophotometer & Thermodrucker DPU 414, # 6131000.012 & # 6131011.006

Multicycler[®] PTC 200

Bio RAD Laboratories, München <http://www.bio-rad.com>

Power Pac 200, # 165-5051

Braun GmbH, Kronberg

Braun Multigourmet FS 10 elektrischer Dampfgarer

Carl Zeiss, Göttingen <http://www.zeiss.de/>

Zeiss Axioskop 40 & AxioCam MRc

Zeiss AxioStar Plus

DakoCytomation GmbH, Hamburg <http://www.dakogmbh.de>

DakoCytomation Autostainer, # S3800

Eppendorf AG, Hamburg <http://www.eppendorf.de>

Eppendorf Zentrifuge 5417 R

Eppendorf *reference* 2,5 µl, # 4910000085

Eppendorf *reference* 20 µl, # 4910000026

Eppendorf *reference* 1000 µl, # 4910000069

Eppendorf Pipette *research* 100 µl, # 3111 000.130

Eppendorf Pipette *research* 200 µl, # 3111 000.157

Eppendorf Pipette *research* 1000 µl, # 3111 000.165

Eppendorf Pipette *research* 5000 µl, # 3111 000.173

Eppendorf Pipette *research* 10000 µl, # 3111 000.181

Safe-Lock-Reaktionsgefäße 1,5 ml, # 0030.120.086

Safe-Lock-Reaktionsgefäße 2,0 ml, # 0030.120.094

Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbolz (vormals Heraeus) <http://www.heraeus.de>

Heraeus Wärmeschrank ST 6200

Heraeus Zentrifuge Biofuge 13

Heraeus Zentrifuge Biofuge Pico

Tiefkühlschrank HFU 586 TOP, # 51014463

Medite Medizintechnik GmbH, Bugdorf <http://www.medite.de>

Objektträger-Eindeckautomat RCM 7000

Mettler-Toledo Laboratory & Weighing Technologies, Schweiz <http://de.mt.com>

Mettler-Toledo PG 403-5 Delta Range[®]

Mettler-Toledo AX 26 Delta Range[®]

Thermo Electron GmbH, Dreieich <http://www.thermo.com>

Umluft/Trockenschrank 6420, # 51013301

9.5 Lösungen und Puffer

9.5.1 Immunhistologie

Alkoholreihe (Dehydratation)

50 %iger Ethanol

250 µl Ethanol

250 µl Aqua bidest.

70 %iger Ethanol

s.oben, bei Raumtemperatur lagern

TBS, pH 7,6 (1000 ml)

20 ml ProTaq TRIS-Kochsalz-Puffer-Konzentrat 50x

ad 1000 ml Aqua bidest.

9.6 Tabellen

9.6.1 Androgenrezeptor (AR) individuelles Grading

9.6.1.1 4 Wochen MENT

Tabelle 9.6.1.1: 1 Vehikelgruppe

Tiernummer	1	2	3	4
Staining Intensity (SI)	2	2	-	2
Positive Zellen (pZ)	1	1	-	2

Tabelle 9.6.1.1: 2 niedrige Dosisgruppe

Tiernummer	5	6	7	8
Staining Intensity (SI)	3	2	3	3
Positive Zellen (pZ)	2	3	3	3

Tabelle 9.6.1.1: 3 mittlere Dosisgruppe

Tiernummer	9	10	11	12
Staining Intensity (SI)	3	3	3	3
Positive Zellen (pZ)	3	3	3	2

Tabelle 9.6.1.1: 4 höchste Dosisgruppe

Tiernummer	13	14	15	16
Staining Intensity (SI)	2	3	-	3
Positive Zellen (pZ)	3	4	-	4

SI (Staining Intensity)= Färbeintensität: 0= keine; 1= schwach; 2= mäßig, 3= stark, 4= sehr stark

pZ= positive Zellen: 0= keine; 1= wenig; 2= moderat; 3= viele; 4= sehr viele

- = wegen zerstörter Morphologie nicht gewertet

9.6.1.2 4 Wochen Backup

Tabelle 9.6.1.2: 1 Vehikelgruppe

Tiernummer	1	2	3	4
Staining Intensity (SI)	3	-	3	3
Positive Zellen (pZ)	3	-	3	3

Tabelle 9.6.1.2: 2 niedrige Dosisgruppe

Tiernummer	5	6	7	8
Staining Intensity (SI)	3	3	3	3
Positive Zellen (pZ)	3	3	3	3

Tabelle 9.6.1.2: 3 mittlere Dosisgruppe

Tiernummer	9	10	11	12
Staining Intensity (SI)	3	2	3	3
Positive Zellen (pZ)	2	1	3	3

Tabelle 9.6.1.2: 4 höchste Dosisgruppe

Tiernummer	13	14	15	16
Staining Intensity (SI)	2	2	2	3
Positive Zellen (pZ)	2	3	4	3

SI (Staining Intensity)= Färbeintensität: 0= keine; 1= schwach; 2= mäßig, 3= stark, 4= sehr stark

pZ= positive Zellen: 0= keine; 1= wenig; 2= moderat; 3= viele; 4= sehr viele

- = wegen zerstörter Morphologie nicht gewertet

9.6.1.3 39 Wochen Backup

Tabelle 9.6.1.3: 1 Vehikelgruppe

Tiernummer	1	2	3	4	5	6	7	8
Staining Intensity (SI)	2	3	3	3	3	3	3	3
Positive Zellen (pZ)	2	2	3	2	3	3	2	3

Tabelle 9.6.1.3: 2 niedrige Dosisgruppe

Tiernummer	9	10	11	12	13	14	15	16
Staining Intensity (SI)	2	3	2	3	3	3	3	3
Positive Zellen (pZ)	1	3	2	3	3	3	3	3

Tabelle 9.6.1.3: 3 mittlere Dosisgruppe

Tiernummer	17	18	19	20	21	22	23	24
Staining Intensity (SI)	3	3	3	3	3	3	3	3
Positive Zellen (pZ)	3	4	3	4	4	4	4	3

Tabelle 9.6.1.3: 4 höchste Dosisgruppe

Tiernummer	25	26	27	28	29	30	31	32
Staining Intensity (SI)	3	3	3	2	3	3	3	3
Positive Zellen (pZ)	4	3	4	3	3	4	3	4

SI (Staining Intensity)= Färbeintensität: 0= keine; 1= schwach; 2= mäßig, 3= stark, 4= sehr stark

pZ= positive Zellen: 0= keine; 1= wenig; 2= moderat; 3= viele; 4= sehr viele

9.6.2 Progesteronrezeptor (PR) individuelles Grading

9.6.2.1 4 Wochen MENT

Tabelle 9.6.2.1: 1 Vehikelgruppe

Tiernummer	1	2	3	4
Staining Intensity (SI)	-	3	3	4
Positive Zellen (pZ)	-	3	3	3

Tabelle 9.6.2.1: 2 niedrige Dosisgruppe

Tiernummer	5	6	7	8
Staining Intensity (SI)	3	3	3	4
Positive Zellen (pZ)	3	4	4	4

Tabelle 9.6.2.1: 3 mittlere Dosisgruppe

Tiernummer	9	10	11	12
Staining Intensity (SI)	4	4	4	4
Positive Zellen (pZ)	4	3	3	4

Tabelle 9.6.2.1: 4 höchste Dosisgruppe

Tiernummer	13	14	15	16
Staining Intensity (SI)	4	4	4	4
Positive Zellen (pZ)	4	4	4	4

SI (Staining Intensity)= Färbeintensität: 0= keine; 1= schwach; 2= mäßig, 3= stark, 4= sehr stark

pZ= positive Zellen: 0= keine; 1= wenig; 2= moderat; 3= viele; 4= sehr viele

- = wegen zerstörter Morphologie nicht gewertet

9.6.2.2 4 Wochen Backup

Tabelle 9.6.2.2: 1 Vehikelgruppe

Tiernummer	1	2	3	4
Staining Intensity (SI)	3	-	3	3
Positive Zellen (pZ)	3	-	4	4

Tabelle 9.6.2.2: 2 niedrige Dosisgruppe

Tiernummer	5	6	7	8
Staining Intensity (SI)	3	3	3	3
Positive Zellen (pZ)	4	4	4	4

Tabelle 9.6.2.2: 3 mittlere Dosisgruppe

Tiernummer	9	10	11	12
Staining Intensity (SI)	3	3	3	3
Positive Zellen (pZ)	4	4	4	4

Tabelle 9.6.2.2: 4 höchste Dosisgruppe

Tiernummer	13	14	15	16
Staining Intensity (SI)	4	4	4	4
Positive Zellen (pZ)	3	4	4	4

SI (Staining Intensity)= Färbeintensität: 0= keine; 1= schwach; 2= mäßig, 3= stark, 4= sehr stark

pZ= positive Zellen: 0= keine; 1= wenig; 2= moderat; 3= viele; 4= sehr viele

- = wegen zerstörter Morphologie nicht gewertet

9.6.2.3 39 Wochen Backup

Tabelle 9.6.2.3: 1 Vehikelgruppe

Tiernummer	1	2	3	4	5	6	7	8
Staining Intensity (SI)	2	2	2	2	2	2	2	3
Positive Zellen (pZ)	2	3	3	3	2	2	3	3

Tabelle 9.6.2.3: 2 niedrige Dosisgruppe

Tiernummer	9	10	11	12	13	14	15	16
Staining Intensity (SI)	2	2	2	2	3	3	3	3
Positive Zellen (pZ)	2	3	1	3	3	3	3	3

Tabelle 9.6.2.3: 3 mittlere Dosisgruppe

Tiernummer	17	18	19	20	21	22	23	24
Staining Intensity (SI)	2	3	3	2	3	3	3	4
Positive Zellen (pZ)	3	3	3	3	3	3	3	3

Tabelle 9.6.2.3: 4 höchste Dosisgruppe

Tiernummer	25	26	27	28	29	30	31	32
Staining Intensity (SI)	4	4	4	4	-	3	4	4
Positive Zellen (pZ)	4	4	4	4	-	3	3	4

SI (Staining Intensity)= Färbeintensität: 0= keine; 1= schwach; 2= mäßig, 3= stark, 4= sehr stark

pZ= positive Zellen: 0= keine; 1= wenig; 2= moderat; 3= viele; 4= sehr viele

- = wegen zerstörter Morphologie nicht gewertet

9.6.3 Estrogenrezeptor (ER) individuelles Grading

9.6.3.1 4 Wochen MENT

Tabelle 9.6.3.1: 1 Vehikelgruppe

Tiernummer	1	2	3	4
Staining Intensity (SI)	-	0	-	-
Positive Zellen (pZ)	-	0	-	-

Tabelle 9.6.3.1: 2 niedrige Dosisgruppe

Tiernummer	5	6	7	8
Staining Intensity (SI)	-	1	3	1
Positive Zellen (pZ)	-	2	1	1

Tabelle 9.6.3.1: 3 mittlere Dosisgruppe

Tiernummer	9	10	11	12
Staining Intensity (SI)	2	1	0	0
Positive Zellen (pZ)	1	1	0	0

Tabelle 9.6.3.1: 4 höchste Dosisgruppe

Tiernummer	13	14	15	16
Staining Intensity (SI)	0	1	1	0
Positive Zellen (pZ)	0	1	1	0

SI (Staining Intensity)= Färbeintensität: 0= keine; 1= schwach; 2= mäßig, 3= stark, 4= sehr stark

pZ= positive Zellen: 0= keine; 1= wenig; 2= moderat; 3= viele; 4= sehr viele

- = wegen zerstörter Morphologie nicht gewertet

9.6.3.2 4 Wochen Backup

Tabelle 9.6.3.2: 1 Vehikelgruppe

Tiernummer	1	2	3	4
Staining Intensity (SI)	2	-	2	3
Positive Zellen (pZ)	3	-	2	3

Tabelle 9.6.3.2: 2 niedrige Dosisgruppe

Tiernummer	5	6	7	8
Staining Intensity (SI)	2	2	0	2
Positive Zellen (pZ)	3	2	0	1

Tabelle 9.6.3.2: 3 mittlere Dosisgruppe

Tiernummer	9	10	11	12
Staining Intensity (SI)	2	-	2	2
Positive Zellen (pZ)	2	-	2	2

Tabelle 9.6.3.2: 4 höchste Dosisgruppe

Tiernummer	13	14	15	16
Staining Intensity SI	-	3	3	3
Positive Zellen (pZ)	-	2	3	2

SI (Staining Intensity)= Färbeintensität: 0= keine; 1= schwach; 2= mäßig, 3= stark, 4= sehr stark

pZ= positive Zellen: 0= keine; 1= wenig; 2= moderat; 3= viele; 4= sehr viele

- = wegen zerstörter Morphologie nicht gewertet

9.6.3.3 39 Wochen Backup

Tabelle 9.6.3.3: 1 Vehikelgruppe

Tiernummer	1	2	3	4	5	6	7	8
Staining Intensity (SI)	3	2	3	3	3	3	-	4
Positive Zellen (pZ)	2	3	3	3	3	3	-	3

Tabelle 9.6.3.3: 2 niedrige Dosisgruppe

Tiernummer	9	10	11	12	13	14	15	16
Staining Intensity (SI)	2	3	2	2	3	3	2	3
Positive Zellen (pZ)	1	3	2	2	3	3	3	3

Tabelle 9.6.3.3: 3 mittlere Dosisgruppe

Tiernummer	17	18	19	20	21	22	23	24
Staining Intensity (SI)	2	2	3	3	3	2	1	2
Positive Zellen (pZ)	3	2	3	3	3	2	2	3

Tabelle 9.6.3.3: 4 höchste Dosisgruppe

Tiernummer	25	26	27	28	29	30	31	32
Staining Intensity (SI)	3	2	4	2	2	2	2	1
Positive Zellen (pZ)	2	2	3	2	2	2	2	2

SI (Staining Intensity)= Färbeintensität: 0= keine; 1= schwach; 2= mäßig, 3= stark, 4= sehr stark

pZ= positive Zellen: 0= keine; 1= wenig; 2= moderat; 3= viele; 4= sehr viele

- = wegen zerstörter Morphologie nicht gewertet

9.6.4 Growth-Hormonrezeptor (GHR) individuelles Grading

9.6.4.1 4 Wochen MENT

Tabelle 9.6.4.1: 1 Vehikelgruppe

Tiernummer	1	2	3	4
Staining Intensity (SI)	2	-	3	-
Positive Zellen (pZ)	2	-	2	-

Tabelle 9.6.4.1: 2 niedrige Dosisgruppe

Tiernummer	5	6	7	8
Staining Intensity (SI)	2	3	2	3
Positive Zellen (pZ)	3	2	3	3

Tabelle 9.6.4.1: 3 mittlere Dosisgruppe

Tiernummer	9	10	11	12
Staining Intensity (SI)	4	3	3	3
Positive Zellen (pZ)	3	3	3	3

Tabelle 9.6.4.1: 4 höchste Dosisgruppe

Tiernummer	13	14	15	16
Staining Intensity (SI)	3	3	3	4
Positive Zellen (pZ)	4	4	3	4

SI (Staining Intensity)= Färbeintensität: 0= keine; 1= schwach; 2= mäßig, 3= stark, 4= sehr stark

pZ= positive Zellen: 0= keine; 1= wenig; 2= moderat; 3= viele; 4= sehr viele

- = wegen zerstörter Morphologie nicht gewertet

9.6.4.2 4 Wochen Backup

Tabelle 9.6.4.2: 1 Vehikelgruppe

Tiernummer	1	2	3	4
Staining Intensity (SI)	3	-	3	3
Positive Zellen (pZ)	3	-	3	3

Tabelle 9.6.4.2: 2 niedrige Dosisgruppe

Tiernummer	5	6	7	8
Staining Intensity (SI)	3	3	3	3
Positive Zellen (pZ)	4	3	4	3

Tabelle 9.6.4.2: 3 mittlere Dosisgruppe

Tiernummer	9	10	11	12
Staining Intensity (SI)	2	-	3	3
Positive Zellen (pZ)	4	-	4	4

Tabelle 9.6.4.2: 4 höchste Dosisgruppe

Tiernummer	13	14	15	16
Staining Intensity (SI)	3	3	4	2
Positive Zellen (pZ)	4	3	4	4

SI (Staining Intensity)= Färbeintensität: 0= keine; 1= schwach; 2= mäßig, 3= stark, 4= sehr stark

pZ= positive Zellen: 0= keine; 1= wenig; 2= moderat; 3= viele; 4= sehr viele

- = wegen zerstörter Morphologie nicht gewertet

9.6.4.3 39 Wochen Backup

Tabelle 9.6.4.3: 1 Vehikelgruppe

Tiernummer	1	2	3	4	5	6	7	8
Staining Intensity (SI)	3	2	2	3	3	0	3	-
Positive Zellen (pZ)	4	3	3	3	3	0	3	-

Tabelle 9.6.4.3: 2 niedrige Dosisgruppe

Tiernummer	9	10	11	12	13	14	15	16
Staining Intensity (SI)	3	-	3	2	3	3	3	3
Positive Zellen (pZ)	3	-	3	3	4	3	3	4

Tabelle 9.6.4.3: 3 mittlere Dosisgruppe

Tiernummer	17	18	19	20	21	22	23	24
Staining Intensity (SI)	3	3	3	3	3	3	3	3
Positive Zellen (pZ)	4	4	4	4	4	4	4	4

Tabelle 9.6.4.3: 4 höchste Dosisgruppe

Tiernummer	25	26	27	28	29	30	31	32
Staining Intensity (SI)	3	3	2	2	4	4	4	4
Positive Zellen (pZ)	4	3	4	4	4	4	4	4

SI (Staining Intensity)= Färbeintensität: 0= keine; 1= schwach; 2= mäßig, 3= stark, 4= sehr stark

pZ= positive Zellen: 0= keine; 1= wenig; 2= moderat; 3= viele; 4= sehr viele

- = wegen zerstörter Morphologie nicht gewertet

9.6.5 Growth-Hormon individuelles Grading

9.6.5.1 4 Wochen MENT

Tabelle 9.6.5.1: 1 Vehikelgruppe

Tiernummer	1	2	3	4
Staining Intensity (SI)	0	-	-	-
Positive Zellen (pZ)	0	-	-	-

Tabelle 9.6.5.1: 2 niedrige Dosisgruppe

Tiernummer	5	6	7	8
Staining Intensity (SI)	2	1	3	3
Positive Zellen (pZ)	3	3	4	3

Tabelle 9.6.5.1: 3 mittlere Dosisgruppe

Tiernummer	9	10	11	12
Staining Intensity (SI)	3	2	3	3
Positive Zellen (pZ)	4	4	4	4

Tabelle 9.6.5.1: 4 höchste Dosisgruppe

Tiernummer	13	14	15	16
Staining Intensity (SI)	0	3	3	4
Positive Zellen (pZ)	0	4	4	4

SI (Staining Intensity)= Färbeintensität: 0= keine; 1= schwach; 2= mäßig, 3= stark, 4= sehr stark

pZ= positive Zellen: 0= keine; 1= wenig; 2= moderat; 3= viele; 4= sehr viele

- = wegen zerstörter Morphologie nicht gewertet

9.6.5.2 4 Wochen Backup

Tabelle 9.6.5.2: 1 Vehikelgruppe

Tiernummer	1	2	3	4
Staining Intensity (SI)	2	3	2	4
Positive Zellen (pZ)	3	3	2	3

Tabelle 9.6.5.2: 2 niedrige Dosisgruppe

Tiernummer	5	6	7	8
Staining Intensity (SI)	1	2	1	-
Positive Zellen (pZ)	3	3	2	-

Tabelle 9.6.5.2: 3 mittlere Dosisgruppe

Tiernummer	9	10	11	12
Staining Intensity (SI)	2	-	4	3
Positive Zellen (pZ)	3	-	4	4

Tabelle 9.6.5.2: 4 höchste Dosisgruppe

Tiernummer	13	14	15	16
Staining Intensity (SI)	4	3	3	4
Positive Zellen (pZ)	4	3	4	4

SI (Staining Intensity)= Färbeintensität: 0= keine; 1= schwach; 2= mäßig, 3= stark, 4= sehr stark

pZ= positive Zellen: 0= keine; 1= wenig; 2= moderat; 3= viele; 4= sehr viele

- = wegen zerstörter Morphologie nicht gewertet

9.6.5.3 39 Wochen Backup

Tabelle 9.6.5.3: 1 Vehikelgruppe

Tiernummer	1	2	3	4	5	6	7	8
Staining Intensity (SI)	1	1	-	3	3	3	-	2
Positive Zellen (pZ)	3	2	-	3	3	2	-	2

Tabelle 9.6.5.3: 2 niedrige Dosisgruppe

Tiernummer	9	10	11	12	13	14	15	16
Staining Intensity (SI)	3	1	2	3	3	3	3	-
Positive Zellen (pZ)	3	3	2	3	3	3	4	-

Tabelle 9.6.5.3: 3 mittlere Dosisgruppe

Tiernummer	17	18	19	20	21	22	23	24
Staining Intensity (SI)	2	3	3	3	3	0	3	-
Positive Zellen (pZ)	4	3	4	4	4	0	4	-

Tabelle 9.6.5.3: 4 höchste Dosisgruppe

Tiernummer	25	26	27	28	29	30	31	32
Staining Intensity (SI)	1	2	1	2	4	4	4	4
Positive Zellen (pZ)	3	4	4	4	4	4	4	4

SI (Staining Intensity)= Färbeintensität: 0= keine; 1= schwach; 2= mäßig, 3= stark, 4= sehr stark

pZ= positive Zellen: 0= keine; 1= wenig; 2= moderat; 3= viele; 4= sehr viele

- = wegen zerstörter Morphologie nicht gewertet

9.6.6 Aromatase individuelles Grading

9.6.6.1 4 Wochen MENT

Tabelle 9.6.6.1: 1 Vehikelgruppe

Tiernummer	1	2	3	4
Staining Intensity (SI)	-	-	1	3
Positive Zellen (pZ)	-	-	2	3

Tabelle 9.6.6.1: 2 niedrige Dosisgruppe

Tiernummer	5	6	7	8
Staining Intensity (SI)	0	2	1	1
Positive Zellen (pZ)	0	3	4	3

Tabelle 9.6.6.1: 3 mittlere Dosisgruppe

Tiernummer	9	10	11	12
Staining Intensity (SI)	2	2	1	1
Positive Zellen (pZ)	4	4	4	4

Tabelle 9.6.6.1: 4 höchste Dosisgruppe

Tiernummer	13	14	15	16
Staining Intensity (SI)	2	2	1	2
Positive Zellen (pZ)	4	4	4	4

SI (Staining Intensity)= Färbeintensität: 0= keine; 1= schwach; 2= mäßig, 3= stark, 4= sehr stark

pZ= positive Zellen: 0= keine; 1= wenig; 2= moderat; 3= viele; 4= sehr viele

- = wegen zerstörter Morphologie nicht gewertet

9.6.6.2 4 Wochen Backup

Tabelle 9.6.6.2: 1 Vehikelgruppe

Tiernummer	1	2	3	4
Staining Intensity (SI)	0	0	0	0
Positive Zellen (pZ)	0	0	0	0

Tabelle 9.6.6.2: 2 niedrige Dosisgruppe

Tiernummer	5	6	7	8
Staining Intensity (SI)	0	0	0	0
Positive Zellen (pZ)	0	0	0	0

Tabelle 9.6.6.2: 3 mittlere Dosisgruppe

Tiernummer	9	10	11	12
Staining Intensity (SI)	0	0	1	0
Positive Zellen (pZ)	0	0	1	0

Tabelle 9.6.6.2: 4 höchste Dosisgruppe

Tiernummer	13	14	15	16
Staining Intensity (SI)	1	0	1	0
Positive Zellen (pZ)	1	0	1	0

SI (Staining Intensity)= Färbeintensität: 0= keine; 1= schwach; 2= mäßig, 3= stark, 4= sehr stark

pZ= positive Zellen: 0= keine; 1= wenig; 2= moderat; 3= viele; 4= sehr viele

9.6.6.3 39 Wochen Backup

Tabelle 9.6.6.3: 1 Vehikelgruppe

Tiernummer	1	2	3	4	5	6	7	8
Staining Intensity (SI)	0	0	0	0	0	0	0	0
Positive Zellen (pZ)	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 9.6.6.3: 2 niedrige Dosisgruppe

Tiernummer	9	10	11	12	13	14	15	16
Staining Intensity (SI)	0	0	0	0	0	0	0	0
Positive Zellen (pZ)	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 9.6.6.3: 3 mittlere Dosisgruppe

Tiernummer	17	18	19	20	21	22	23	24
Staining Intensity (SI)	0	0	0	0	0	1	0	1
Positive Zellen (pZ)	0	0	0	0	0	1	0	1

Tabelle 9.6.6.3: 4 höchste Dosisgruppe

Tiernummer	25	26	27	28	29	30	31	32
Staining Intensity (SI)	0	1	0	0	0	1	0	0
Positive Zellen (pZ)	0	1	0	0	0	1	0	0

SI (Staining Intensity)= Färbeintensität: 0= keine; 1= schwach; 2= mäßig, 3= stark, 4= sehr stark

pZ= positive Zellen: 0= keine; 1= wenig; 2= moderat; 3= viele; 4= sehr viele

9.7 Lichtmikroskopische Abbildungen (Histologie/Immunhistologie)

9.7.1 HE-Färbung

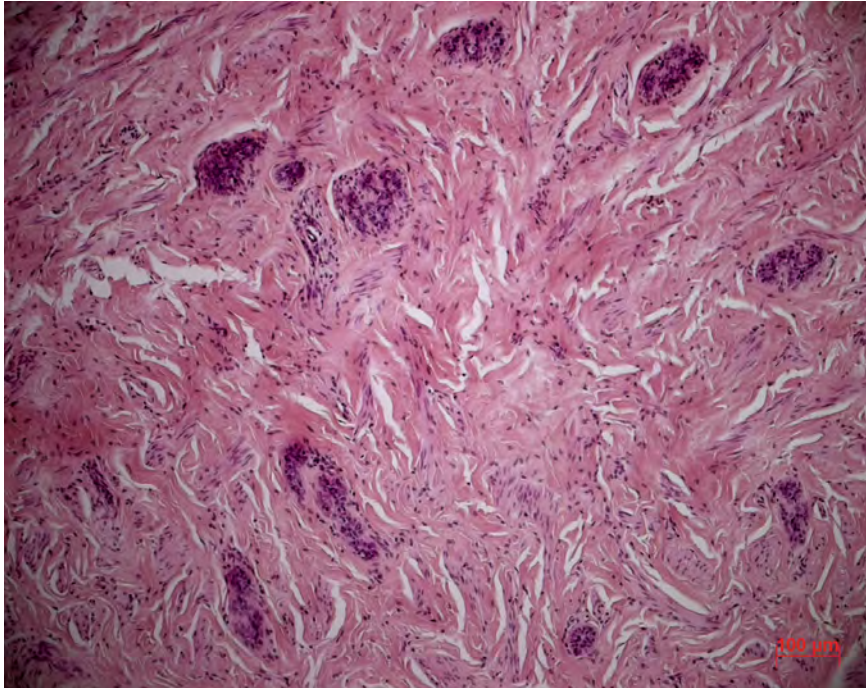


Abb. 9.7.1: 1: Milchdrüse Rude, Vehikel, Paraffinschnitt, 10x, HE-Färbung

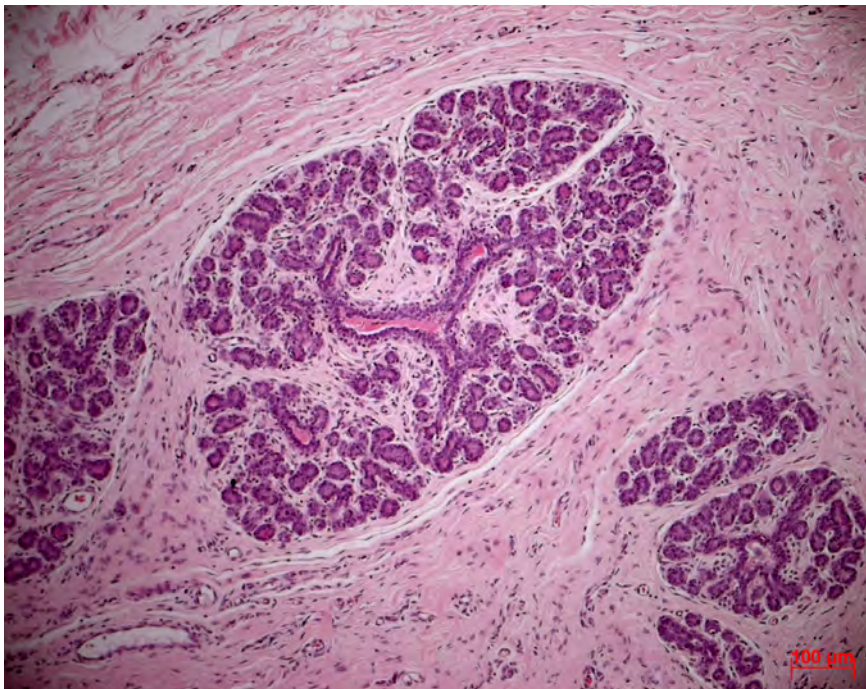


Abb. 9.7.1: 2: Milchdrüse Rude, hohe Dosis, Paraffinschnitt, 10x, HE-Färbung

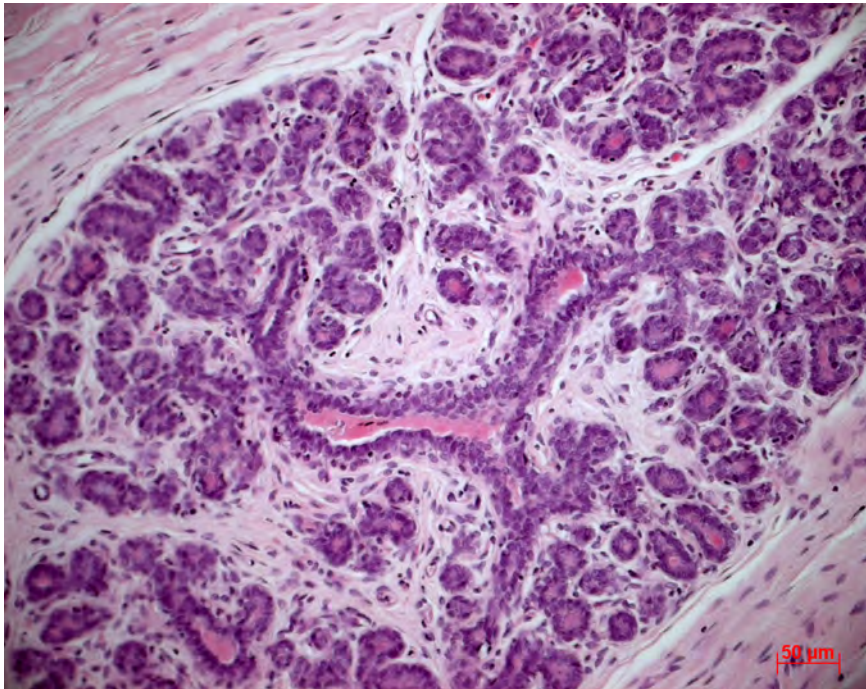


Abb. 9.7.1: 3: Milchdrüse Rude, hohe Dosis Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 9.7.1: 2, Paraffinschnitt, 20x, HE-Färbung

9.7.2 Androgenrezeptor

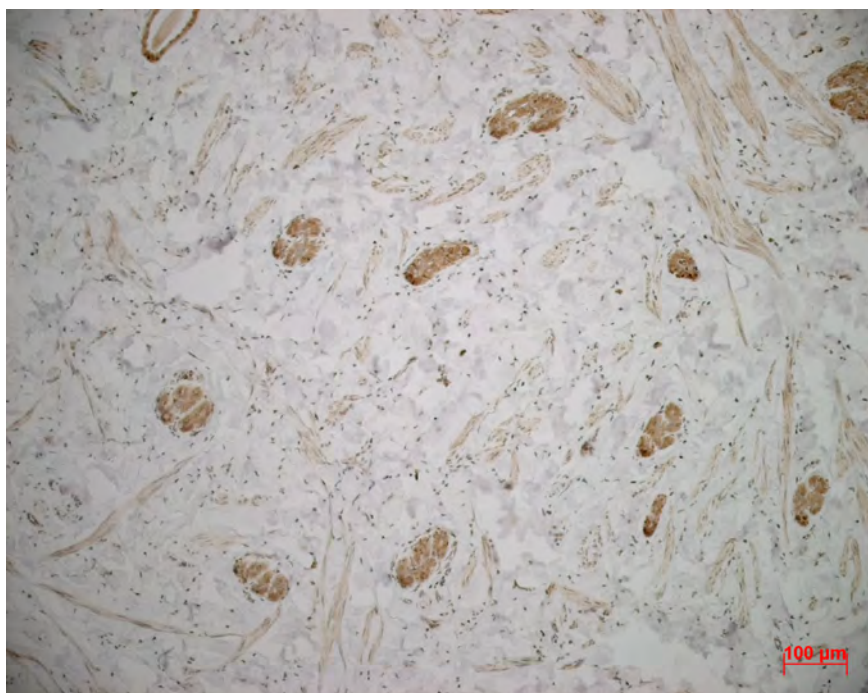


Abb. 9.7.2: 1: Milchdrüse Rude, Vehikel, Paraffinschnitt, 10x, AR-AK

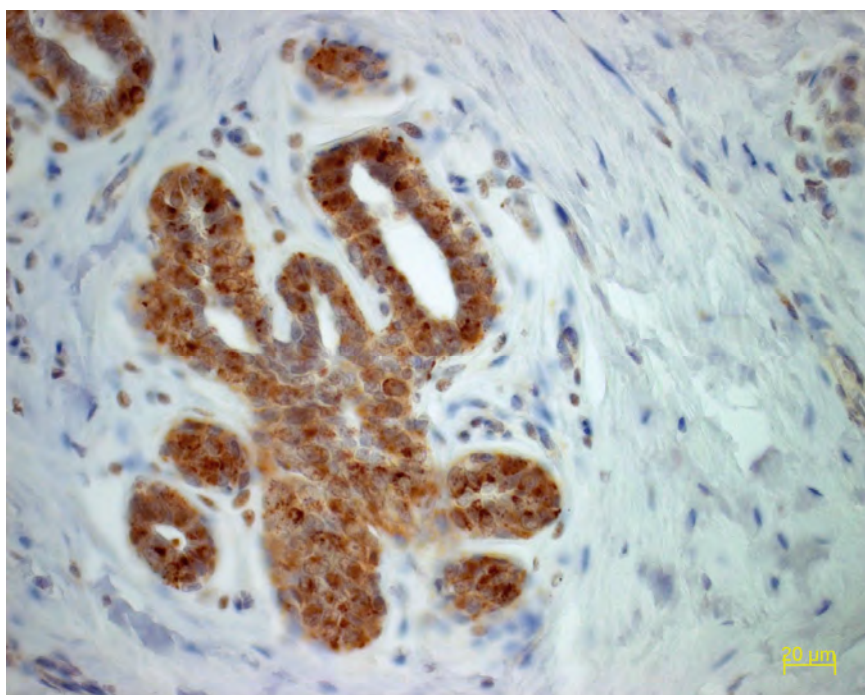


Abb. 9.7.2: 2: Milchdrüse Rude, hohe Dosis, Paraffinschnitt, 40x, AR-AK

9.7.3 Progesteronrezeptor

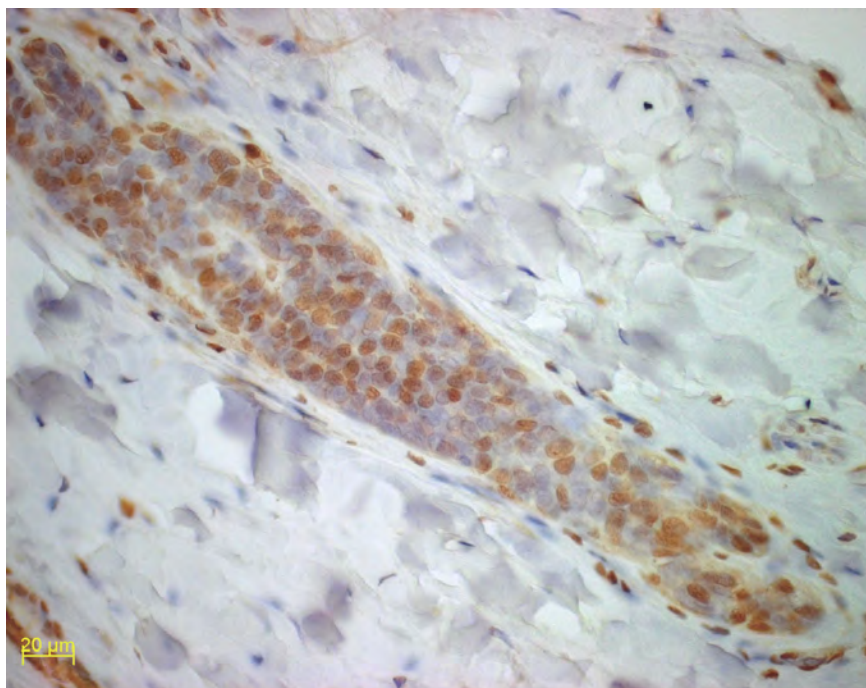


Abb. 9.7.3: 1: Milchdrüse Rüde, Vehikel, Paraffinschnitt, 40x, PR-AK

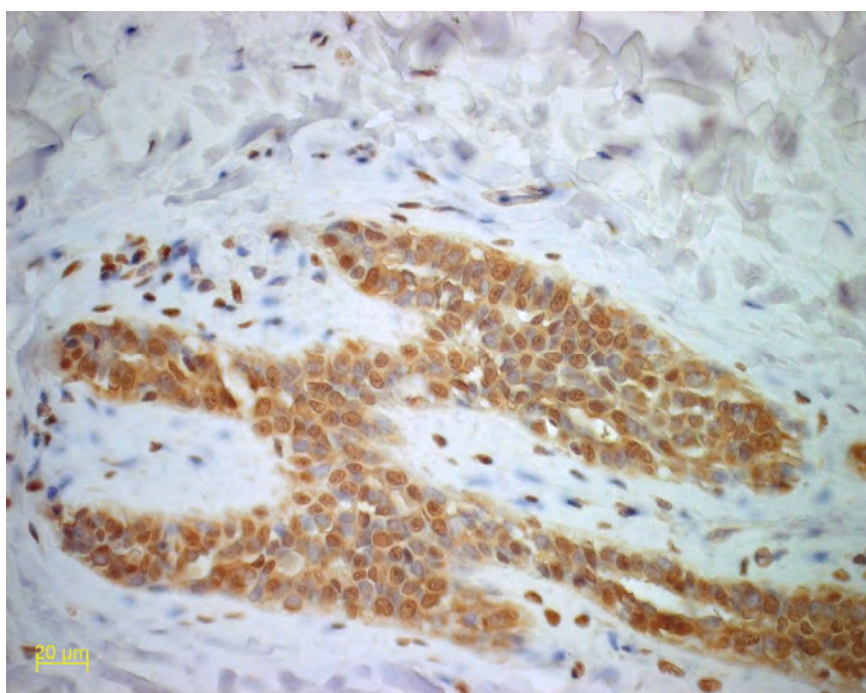


Abb. 9.7.3: 2: Milchdrüse Rüde, niedrige Dosis, Paraffinschnitt, 40x, PR-AK

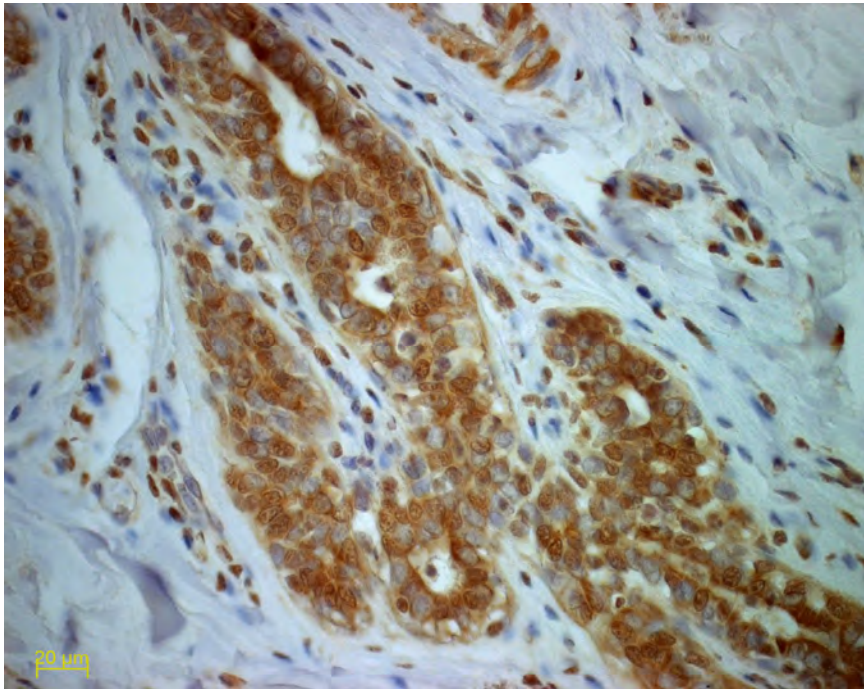


Abb. 9.7.3: 3: Milchdrüse Rude, mittlere Dosis, Paraffinschnitt, 40x, PR-AK

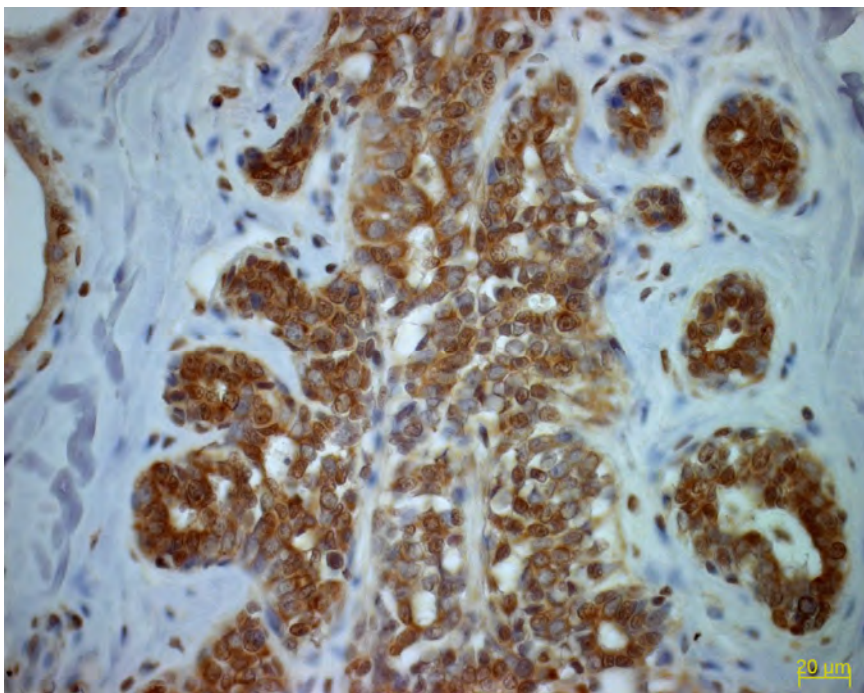


Abb. 9.7.3: 4: Milchdrüse Rude, hohe Dosis, Paraffinschnitt, 40x, PR-AK

9.7.4 Estrogenrezeptor

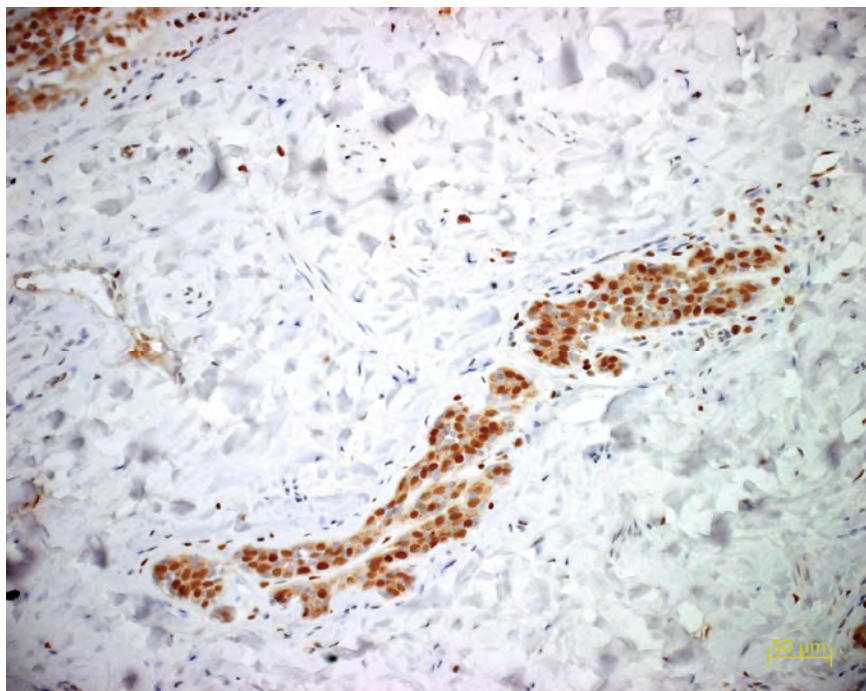


Abb. 9.7.4: 1: Milchdrüse Rde, Vehikel, Paraffinschnitt, 20x, ER-AK

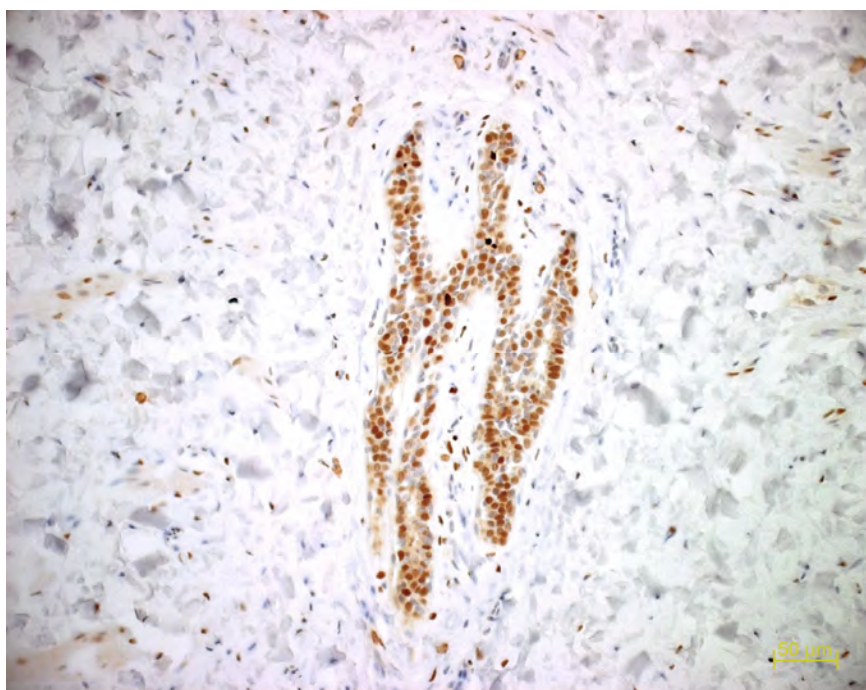


Abb. 9.7.4: 2: Milchdrüse Rde, niedrige Dosis, Paraffinschnitt, 20x, ER-AK

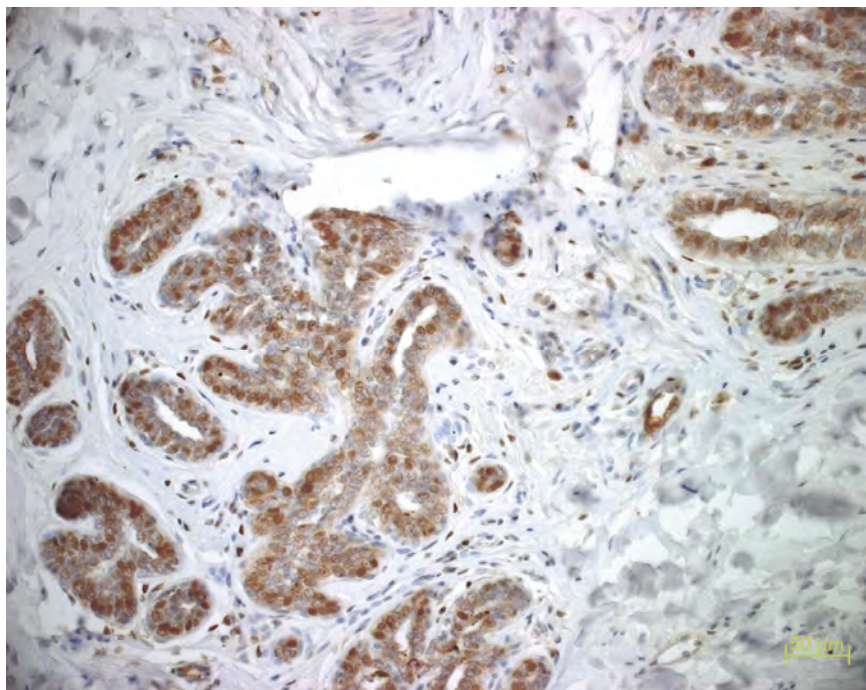


Abb. 9.7.4: 3: Milchdrüse Rude, mittlere Dosis, Paraffinschnitt, 20x, ER-AK

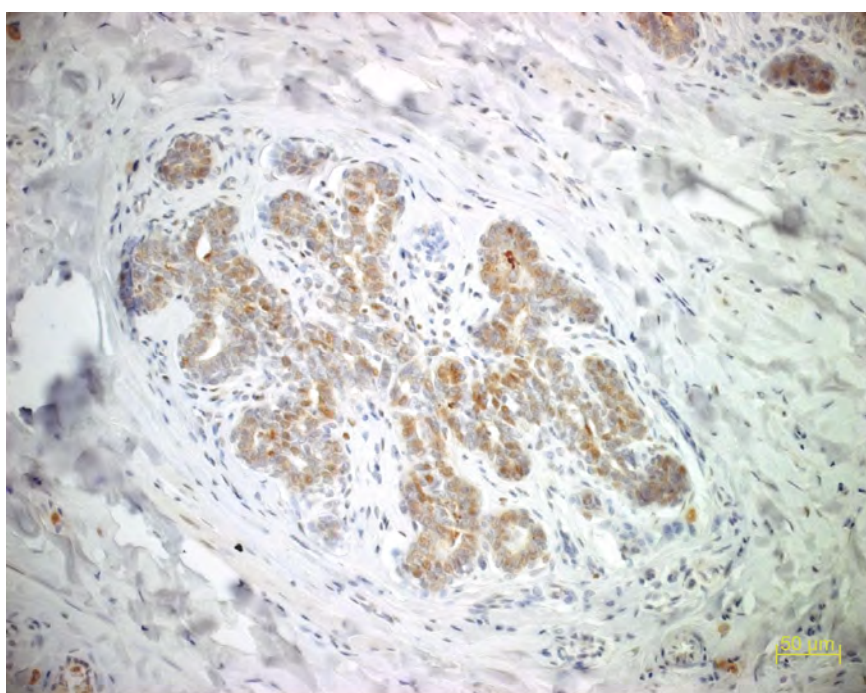


Abb. 9.7.4: 4: Milchdrüse Rude, hohe Dosis, Paraffinschnitt, 20x, ER-AK

9.7.5 Growth-Hormonrezeptor

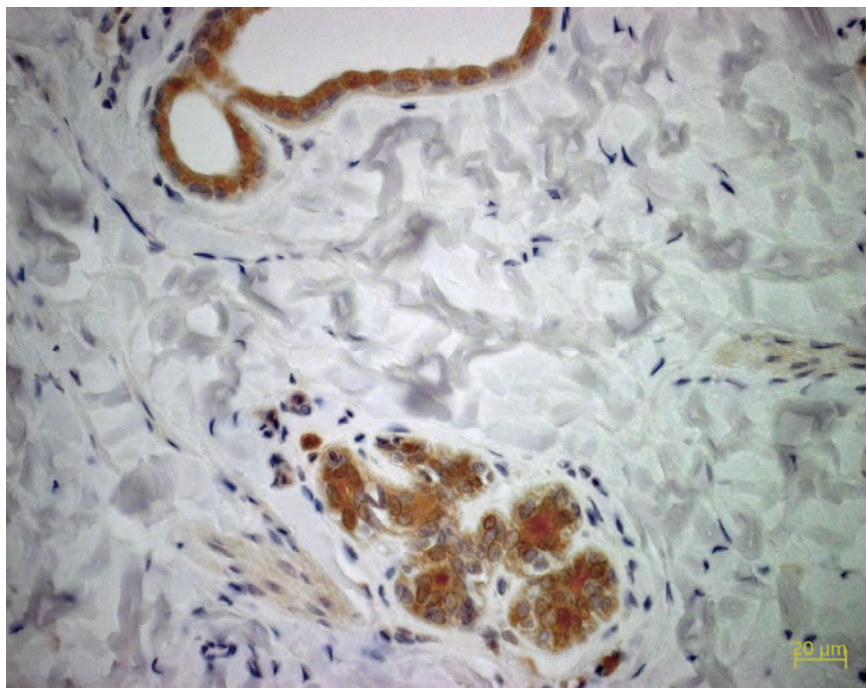


Abb. 9.7.5: 1: Milchdrüse Rude, Vehikel, Paraffinschnitt, 40x, GHR-AK

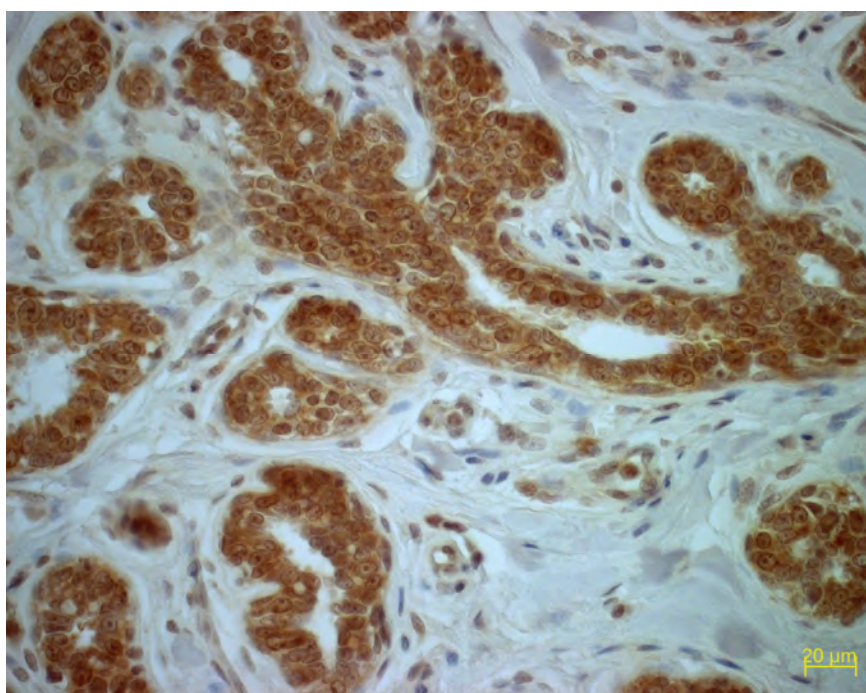


Abb. 9.7.5: 2: Milchdrüse Rude, hohe Dosis, Paraffinschnitt, 40x, GHR-AK

9.7.6 Growth-Hormon

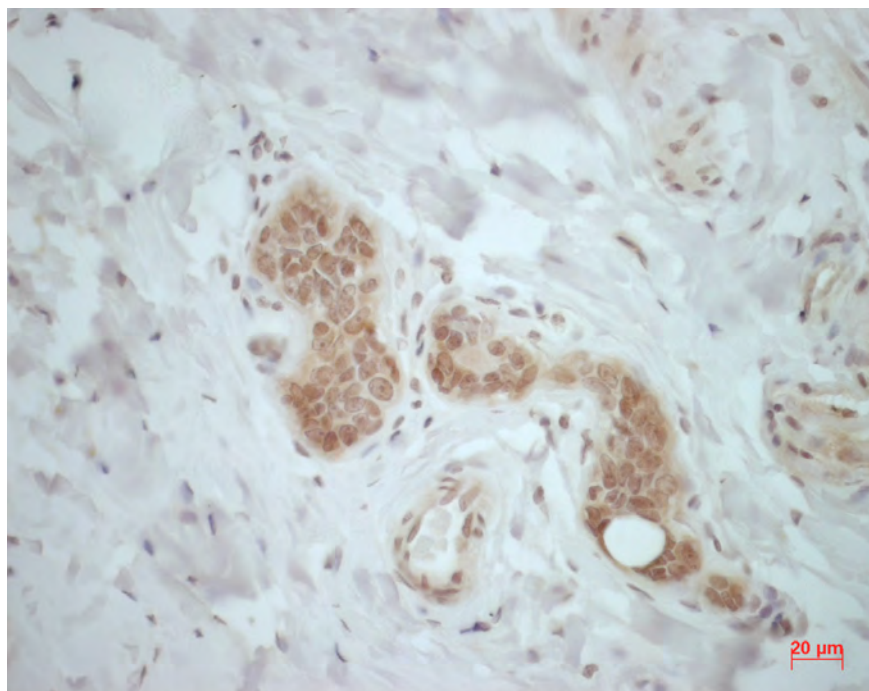


Abb. 9.7.6: 1: Milchdrüse Rude, Vehikel, Paraffinschnitt, 40x, GH-AK

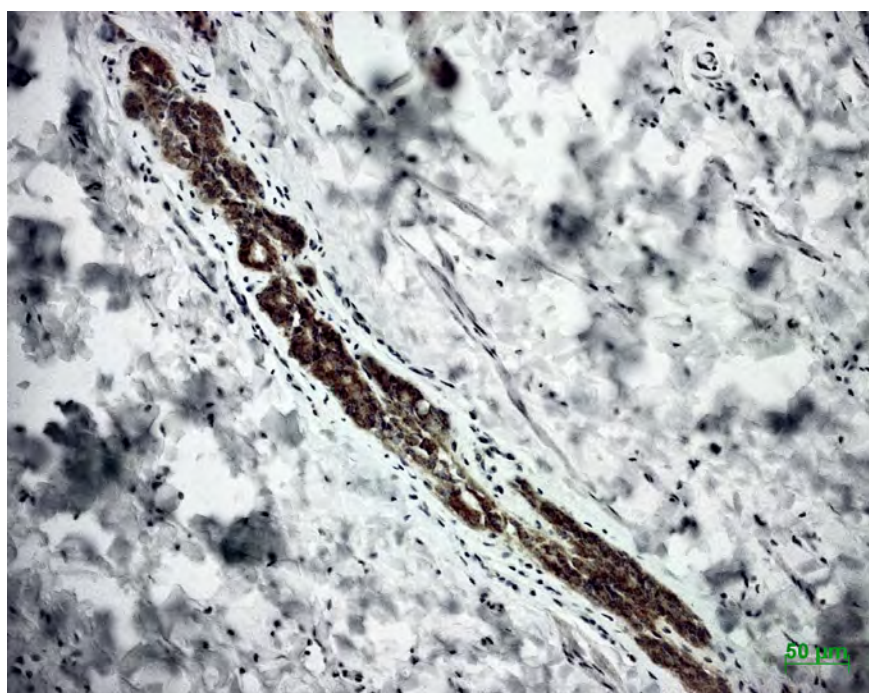


Abb. 9.7.6: 2: Milchdrüse Rude, niedrige Dosis, Paraffinschnitt, 20x, GH-AK

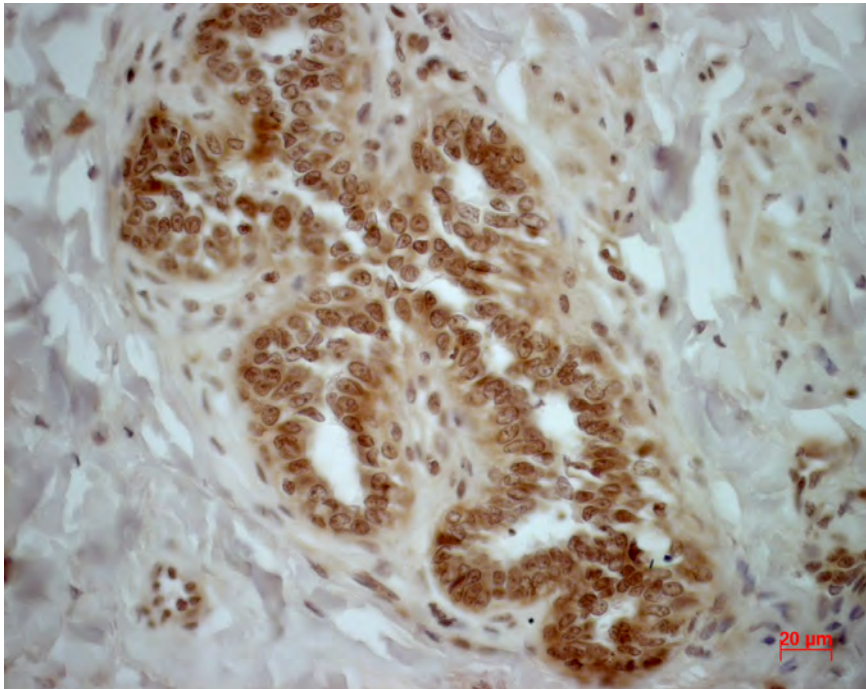


Abb. 9.7.6: 3: Milchdrüse Rude, mittlere Dosis, Paraffinschnitt, 40x, GH-AK

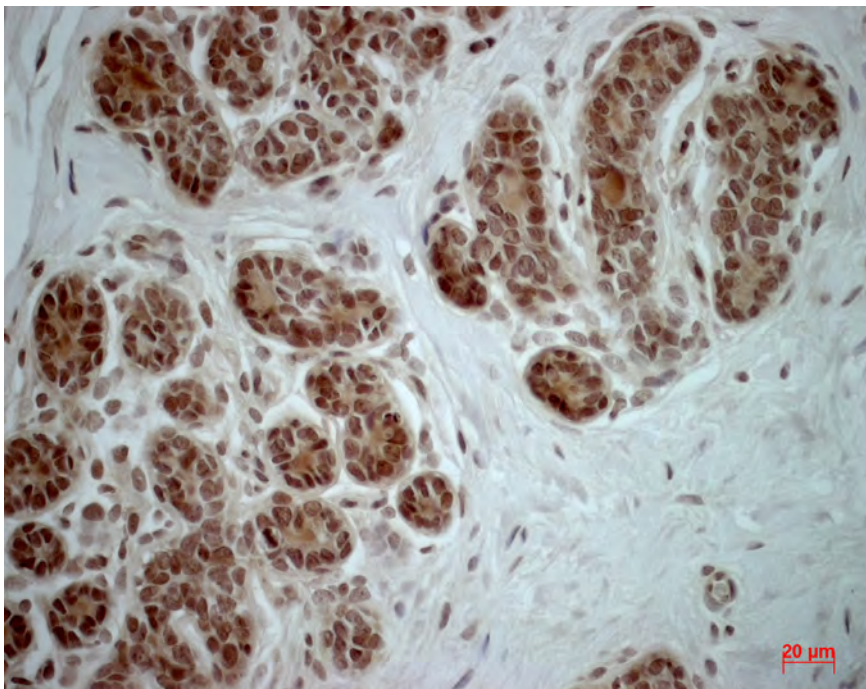


Abb. 9.7.6: 4: Milchdrüse Rude, hohe Dosis, Paraffinschnitt, 40x, GH-AK

9.7.7 Aromatase

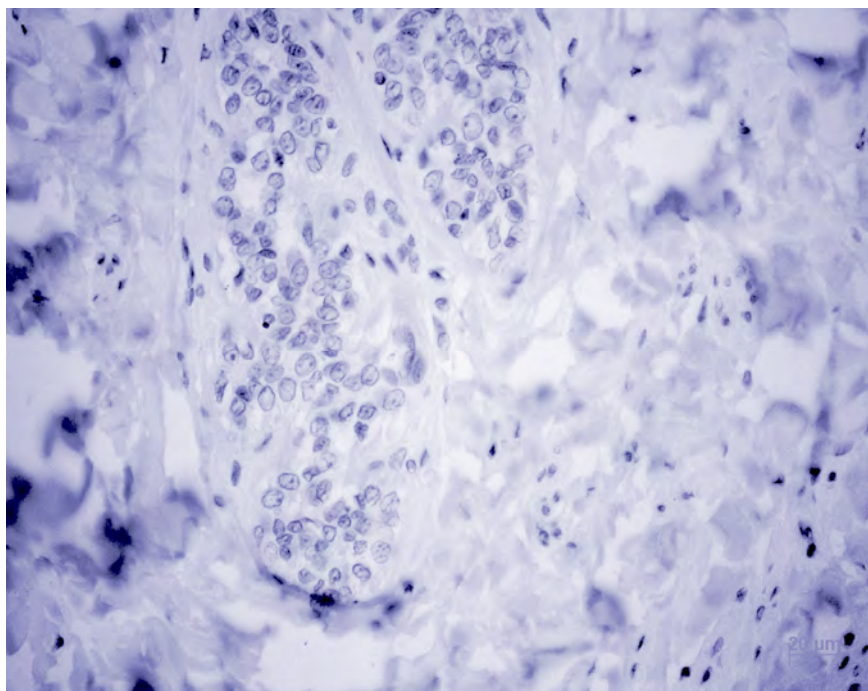


Abb. 9.7.7: 1: Milchdrüse Rude, Vehikel, Paraffinschnitt, 40x, Aromatase-AK

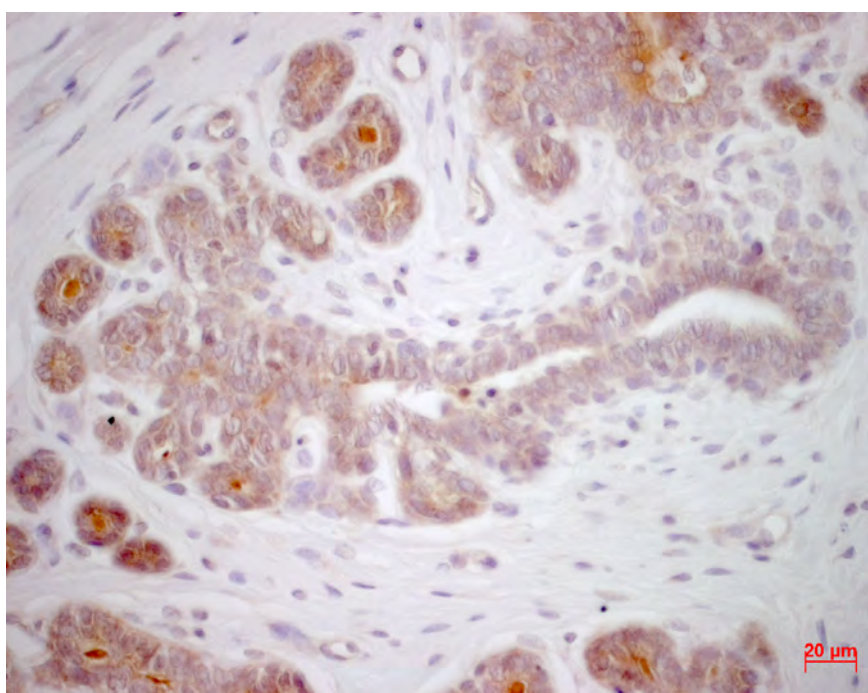


Abb. 9.7.7: 2: Milchdrüse Rude, hohe Dosis, Paraffinschnitt, 40x, Aromatase-AK

9.8 ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
AR	Androgenrezeptor
Arom	Aromatase
as	<i>antisense</i>
bp	Basenpaar
cDNA	komplementäre (<i>complementary</i>) DNA
cRNA	komplementäre (<i>complementary</i>) RNA
DAB	3'3'Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEA-S	Dehydroepiandrosteronsulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxy-ribonucleic-acid</i>)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
E ₂	Estradiol
ER	Estrogenrezeptor
FFPE	Formalin-fixiert und Paraffin-eingebettet
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GaM-b	Ziege-anti-Maus (<i>goat-anti-mouse</i>)-Antikörper, biotiniliert
GaR-b	Ziege-anti-Kaninchen (<i>goat-anti-rabbit</i>)-Antikörper, biotiniliert
GH	Growth-Hormon (Wachstumshormon)
GHBP	Growth-Hormon Binding-Protein
GHR	Growth-Hormon-Rezeptor
GHRH	Growth-Hormon-Releasing-Hormon

GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
HE	Hämatoxylin- und Eosinfärbung
HB	Hybridisierungsmix
hCG	Humanes Choriongonadotropin
HCL	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
HRE	Hormon response or regulating Elements
IH	Immunhistologie
IGF	Insulin-Like-Growth-Faktor
IRS	Immunreaktiver Score
LSAB	Labeled-Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
LH	Luteotropes Hormon
MgCl ₂	Magnesium-Chlorid
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MW	Molekulargewicht
n	Anzahl der Tiere
n.n.	nicht nachweisbar
nt	Nukleotid
n.u.	nicht untersucht
OD ₂₆₀	optische Dichte bei 260 nm
OT	Objektträger
p	Primerpaar
P ₄₅₀	Cytochrom P ₄₅₀ (Enzym)
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEN	Polyethylen-Naphtalat
PR	Progesteronrezeptor
pZ	Positive Zellen
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic-acid</i>)
RNase	Ribonuklease

rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RTemp.	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
s	<i>sense</i>
SHBG	Sexhormonbindendes Globulin
SI	Staining Intensity
SSC	<i>standard saline citrate</i>
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TAF	Transkriptionsaktivierende Funktion
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-buffered-saline
TEB	Terminal End Budds
T	Testosteron
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bedanken...

...bei PD Dr. Jakob Walter für das Überlassen des spannenden und interessanten Themas, das immer „offene“ Ohr bei all den Fragen, Sorgen und Problemen gerade auch in der „heißen“ Phase! Deine stets mit Humor und Ernst geäußerte Kritik!

...bei Herrn Dr. Schweinfurth und Frau Dr. Stark für die Bereitstellung des Stipendiums und die damit verbundene Möglichkeit die Dissertation in der experimentellen Toxikologie der Schering AG anzufertigen.

...bei Dr. Anna-Lena Frisk für die zahlreichen Gespräche, wertvollen Hilfestellungen und Anregungen!

...bei Sabina Baßow für die Einarbeitung in die Immunhistologie, deinen immerwährenden Optimismus und die vielen Tipps und Tricks der Immunwelt, die man in keinem Buch der Welt finden kann.

...bei Lilo Markworth, Moni Zielinski und Mic Mann für die Einführung in die Schnitttherstellung und die Hilfe wenn es mal „eng“ wurde.

...bei dir Doris für deine intensive Einarbeitung in die molekulare Welt. Vielen Dank auch für das unermüdliche Beantworten meiner doch so zahlreichen Fragen.

...bei Ulrike Zugmaier für die genaue und kritische Durchsicht des Manuskripts.

...bei Birgit Wendt, denn ohne dich hätte so manch bürokratischer Akt eine Ewigkeit gedauert-Danke!

...bei der Spielwiese (Claudia Neubert, Jana Zeilinger, Jan Göbes) für die immer lustige, freundliche, verrückte, kritische und aufbauende Stimmung!

...bei Bonny für die vielen Spaziergänge.

...bei Dieter, bei meinen Geschwistern Mathias und Nicola, meinen Schwiegereltern Bernd und Jutta für die seelische Unterstützung.

...bei Dir liebe Mumsche für alles was Du mir in dieser und der Zeit davor gegeben hast und den Glauben an mich-Danke!

...bei dir mein Schatz für die Kraft und Liebe und den Weg an meiner Seite.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den

O. Lüdtké-Handjery