

3.3 Gewinnung der Ejakulate

Die Samengewinnung erfolgte mit der künstlichen Scheide (Modell Hannover) unter Verwendung eines Phantoms oder einer rossenden Stute als Sprungpartner.

Von den Traberhengsten und dem Haflingerhengst der Gruppe A kamen 10 Ejakulate über eine Zeitspanne von 2 bis 10 Wochen zur Untersuchung, von den anderen Hengsten der Gruppe B standen 1-2 Ejakulate zur Verfügung.

Die Samenuntersuchung wurde unmittelbar nach der Gewinnung im Labor durchgeführt. Die Beurteilung der Samenqualität erfolgte im wesentlichen nach der von KRAUSE (1966) für Bullensperma beschriebenen Methode unter Verwendung eines spermatologischen Untersuchungsprotokolls.

Das schleimige Samenblasensekret wurde - wenn vorhanden - unverzüglich nach der Samenentnahme vom flüssigen Ejakulatanteil durch vorsichtiges Dekantieren getrennt.

3.4 Bestimmung der Spermienmotilität

Die Ermittlung der Bewegungsaktivität erfolgte durch Schätzung des prozentualen Anteils aller in irgendeiner Form beweglichen, der vorwärtsbeweglichen und der unbeweglichen Samenzellen.

Zu den vorwärtsbeweglichen zählen sowohl die gradeausgerichteten, als auch diejenigen Spermien, die einen weiten Kreisbogen beschreiben, dessen Radius größer ist als der des Sichtfeldes (NISHIKAWA 1959).

Die Beurteilung erfolgte unter Verwendung eines Phasenkontrastmikroskopes (Okular 8fach, Objektiv PH 16fach) mit auf 37°C angewärmtem Heiztisch.

Zum Vergleich der Schätzgenauigkeit wurden bei einigen Ejakulaten die Werte aus der gleichzeitig erstellten Videomikrographie herangezogen.

3.5 Tiefgefrierkonservierung des Samens

Verwendete Materialien und Geräte:

Kryokonservierungsgerät:

Scientific Biological Freezer (SY-LAB)

Pailletten :

0,5 ml Midipailletten mit Verschlusskugeln, Metall (MINITÜB)

Tiefgefrierverdünner:

Modifizierter **KENNEY** Verdünner (BURNS, 1992):

Magermilchpulver	2,4 g
Geklärte Eigelblösung	8 ml
Na Penicillin	150.000 IE
Streptomycin	150 mg
<hr/>	
Aqua bidest.	ad 100 ml
Glycerin	3,5 % der endgültigen Verdünnung
	pH 6,8
<hr/>	

Geklärte Eigelblösung: 25 ml Eigelb mit 25 ml Zentrifugierverdünner bei 10.000 G 15 Minuten zentrifugieren.

Zentrifugierverdünner:	Sukrose	5,0 g
	Glukose	3,0 g
	BSA	1,5 g
	Penicillin	150.000 IE
	Streptomycin	150 mg
<hr/>		
	Aqua bidest	ad 100 ml

Tiefgefrierablauf:

Der Tiefgefrierverdünner wurde in grösserer Menge bereitet und in Portionen zu jeweils 10 ml in sterilen Einwegröhrchen bei -18° C gelagert. Die Haltbarkeit beträgt bei dieser Lagerung 12 Monate.

Vor dem Verdünnen des Nativsamens wurde der Verdünner auf 37° C vortemperiert.

Von allen zur Untersuchung stehenden Ejakulaten wurden Proben tiefgefroren.

Unmittelbar nach der Gewinnung und Untersuchung der Ejakulate wurden 5 ml des Ejakulates abgenommen und mit der gleichen Menge Tiefgefrierverdünner 1 : 1 verdünnt.

Das verdünnte Sperma wurde dann anschliessend bei Raumtemperatur 15 Minuten belassen, um eine Anpassung an die Umgebungstemperatur und das Nährmedium zu ermöglichen.

Vor dem Konfektionieren des Samens wurde dieser nochmals auf eventuelle Änderungen der Motilität kontrolliert. Danach erfolgte die Befüllung der Pailletten mit Hilfe einer 5 ml Plastikspritze ohne Silikonstopfen und aufgesetzter langer Kanüle. Die gefüllten Pailletten wurden mit einer Metallkugel manuell verschlossen.

Zum Tiefgefrieren kamen die Pailletten nun in eine zum Einfriergerät gehörende Halterung, in der sie so fixiert wurden, dass sie sich nicht berührten.

Das Einfrierprogramm verlief in vier Schritten wie folgt:

Schritt	Temperaturbereich	Abkühlrate
1	+ 20°C bis + 5°C	- 0,5°C/Minute
2	+ 5°C	0°C/10 Minuten
3	+ 5°C bis - 15°C	- 10°C/Minute
4	- 15°C bis - 150°C	- 25°C/Minute

Im Anschluss wurden die tiefgefrorenen Pailletten in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Lagerungsbehälter verbracht und bis zur weiteren Untersuchung belassen.

3.6 Weitergehende Untersuchungen

3.6.1 Computergesteuerte Videomikrographie

Technische Geräte:

- Mikroskop BH-2 (Olympus) mit Hüllthermostat und Heiztisch Typ Ht100 (Minitüb)
- Schwarz-Weiss Videokamera Typ K 15 (Siemens)
- Videorekorder Typ DR. 80 (Panasonic)
- VHS Videokassetten
- Matrix-Drucker (IBM)
- 4 Zählkammern nach MAKLER (Sefi-Medical Instruments)
- Bildanalysesystem CMA Version 4.4 (1992) (Mika Medical GmbH)
- Personal Computer Typ AT 03 (IBM)

Messprinzip:

Die Grundlage der videomikrographischen Messungen sind Videoaufnahmen der Ejakulate. Das einzelne Videobild besteht aus 512 Zeilen mit je 512 Bildpunkten (Pixels). Jedes Pixel ist eine Informationseinheit. Wird ein Videobild einer Ejakulataufnahme in die einzelnen Bildpunkte zerlegt (digitalisiert), werden die Spermien nur noch als deutlich vom Bildhintergrund abgestufter Grauton sichtbar. Der Computer erkennt diese Ansammlung grauer Bildpunkte als Spermium, wenn sie einer bestimmten Form, Grauschwelle und vorher festgelegten Grösse entsprechen.

Man unterscheidet zur Zellidentifizierung eine *Viertelbildauswertung* (jedes zweite Pixel jeder zweiten Zeile) von einer *Halbbildauswertung* (jedes Pixel jeder zweiten Zeile), je nachdem wieviele Pixel zur Zellidentifizierung herangezogen werden.

Bei einem Messvorgang werden zwischen 8 und 32 hintereinander aufgenommene Fernsehbilder digitalisiert und anschliessend zur Verfolgung der Bewegungsbahn von Einzelbild zu Einzelbild ausgewertet.

Vor Beginn der Messungen wurden folgende Eck- und Grenzdaten festgelegt, die für die Spermien jeder Tierart unterschiedlich sind:

- Grössenintervall (zur Abgrenzung anderer Objekte als Spermien)
- Geschwindigkeitsgrenze (zur Abgrenzung immotiler, lokal beweglicher und vorwärtsbeweglicher Objekte)
- Grauschwelle (zur Abgrenzung anderer Objekte)
- Zeitintervall zwischen zwei aufeinanderfolgenden Bildern zur Digitalisierung

Der Computer ermittelt Daten zur Spermengeschwindigkeit, zur Geradlinigkeit der Bewegung, zur Motilität einschliesslich der lokalen ($10\text{-}20\ \mu\text{m}/\text{sek}$) und der Ortsbewegung ($>10\ \mu\text{m}/\text{sek}$) und zur Spermiedichte (Spermien/ml).

Die Geradlinigkeit der Bewegung errechnet sich durch einen Vergleich der tatsächlichen Bahn, die das Spermium zurücklegt, mit der geraden, kürzesten Strecke zwischen Anfang und Ende der aufgezeichneten Spermienbahn. Beträgt die Länge der geraden Bahn mehr als 80% der tatsächlichen Bahn, gilt die Bewegung als geradlinig.

Die verwendeten Zählkammern (MAKLER 1978a,b, 1980a,b) bestehen aus zwei runden, plangeschliffenen Gläsern von 30mm Durchmesser.

Die Untere, 2mm dicke, entspricht gleichzeitig dem Objektträger.

Die Obere, 1mm dicke, wird durch vier quarzbeschichtete Glasstifte in einem Abstand von $10\ \mu\text{m}$ mit der Funktion eines Deckglases aufgesetzt. Der entstehende

Spalt hat also eine genau definierte Höhe, die es den Spermien ermöglicht sich frei zu bewegen und trotzdem in einer fokussierten Ebene scharf abgebildet zu werden. Das Zählkammerraster des Deckglases ermöglicht eine automatische Dichtebestimmung.

Messdurchführung

Videomikrographische Messungen erfolgten zur Erfassung der Schätzgenauigkeit bei der Bestimmung der Motilität. Sie kamen zur Anwendung bei den Hengsten des Vorversuchs.

Dazu wurden unmittelbar nach der Gewinnung bzw. nach dem Auftauen Videobandaufzeichnungen von den einzelnen Ejakulaten aufgenommen, die dann zu einem späteren Zeitpunkt ausgewertet wurden.

Zur Untersuchung des Samens von Hengst 1 kamen der Nativsamen, der mit einem modifizierten Eigelbverdünner nach KENNEY verdünnte Samen (Dichte: 30-60 Mill.Spermien/ml) und der nach dem Tiefgefrieren und Lagerung von mindestens sieben Tagen aufgetaute Samen. Von Hengst 2 und 3 stammte der aufgetaute Tiefgefriersamen.

Die Maklerkammern wurden auf 37° C vorgewärmt und dann mit 3,5 µl Sperma beschickt. Pro Ejakulat bzw. Probe wurden jeweils vier Kammern verwendet; die Bandaufzeichnungen umfassten jeweils sechs Felder mit einer Aufnahmedauer von 10 Sekunden.

Für die Messungen wurden folgende Grundparameter gewählt:

Minimale Fläche eines Objektes in Pixel:	28
Maximale Fläche eines Objektes in Pixel:	200
Anzahl der Bilder der Sequenz:	50
Immotile Spermien:	10 µm/sek
Lokal bewegliche Spermien:	30 µm/sek

Viertelbildauswertung

3.6.2 Mukuspenetrationstest

Verwendete Materialien:

Flache Glaskapillaren:

Schichtdicke 0,2 mm, Aussenmasse: 0,6 x 2,4 mm, Länge 100 mm

(Mikroslide-Tubes: VOGEL, Giessen)

Synthetischer Mukus:

PBB (Phosphate-buffered Baker's medium)

Zusammensetzung (g/l) :	NaCl	4,991
	KCl	0,298
	KH ₂ PO ₄	0,150
	Na ₂ HPO ₄	1,790
	CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,074
	MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,247
	Glukose	13,515
	BSA	50,0

Sterile Filtration durch 0,22 µm Membranfilter

pH 7,4, 295 . 5 mOsm/kg

In 2 ml PBB wurden dann 6 mg Hyaluronsäure (Hyaluronic acid-Sodium salt, SIGMA) gelöst. Dieser Ansatz wurde einen Tag vor der Verwendung zubereitet, damit sich die Hyaluronsäure schonend löst.

Die Hyaluronsäuremoleküle werden durch starkes Schütteln oder Vermischen leicht zerstört; die Viskosität der Lösung wird damit verringert.

Verschlusskitt:

Eine Seite der Glaskapillaren wurde nach dem Befüllen mit synthetischem Mukus mit einem Verschlusskitt (Seal-ease, BECTON DICKINSON AND COMPANY, Rutherford) luftdicht verschlossen.

Versuchsprinzip:

Für den In-Vitro-Migrationstest wurde nach dem Prinzip von KREMER (1965) in Verbindung mit der Modifikation nach MORTIMER et al. (1990) vorgegangen.

Dabei soll, neben der durch ein Spermogramm festgestellten Spermaqualität, ein weiteres Qualitätsmerkmal in Form der Penetrationsfähigkeit durch den synthetischen Mukus festgestellt werden.

Der synthetische Mukus wird dazu in eine Kapillare aufgezogen, luftdicht verschlossen und bei Raumtemperatur senkrecht in ein Gefäß mit Ejakulat gestellt.

Die Spermatozoen wandern im Verlauf einer festgesetzten Zeit in dem Mukus entgegen der Schwerkraft.

KREMER verwendete für seine Versuchsdurchführung Zervikalmukus der Frau, um die Penetrationsfähigkeit der männlichen Samenzellen festzustellen.

MORTIMER modifizierte das Verfahren insoweit, dass er zur Standardisierung synthetischen Mukus verwendete. Das oben aufgeführte Rezept enthielt allerdings 10 mg Hyaluronsäure pro ml PBB und hat damit eine deutlich höhere Viskosität. Für die Hengstspermien ist diese Zusammensetzung ungeeignet, es erfolgt keine Wanderung.

Der Anteil an Hyaluronsäure wurde entsprechend verändert.

Nach einer festgesetzten Zeitspanne werden die Penetrationstiefe in Zentimetern und die Penetrationsdichte der Spermatozoen in einem bestimmten Kapillarabschnitt abgelesen.

Versuchsablauf:

Zur Untersuchung kamen alle zur Verfügung stehenden Ejakulate.

Bei allen Tieren wurde die Penetrationsfähigkeit im Nativsamen und nach dem Auftauen des Tiefgefrierspermas getestet. Bei den Hengsten des Vorversuches wurden zusätzlich die vor dem Tiefgefrieren mit modifizierten Eigelbverdünner nach KENNEY versetzten Spermaproben untersucht.

Für den synthetischen Mukus wurde PBB angesetzt und maximal zwei Wochen im Kühlschrank aufbewahrt und verwendet. Der Hyaluronsäurezusatz erfolgte jeweils frisch einen Tag vor der Untersuchung. Erst am Untersuchungstag wurde die Lösung vorsichtig geschwenkt, um eine Zerstörung der Hyaluronsäuremoleküle und eine Luftbläschenbildung zu vermeiden.

Auf eine 2 ml Spritze mit Luerkonus wurde ein weicher, sehr fest abschliessender Gummischlauch gesetzt, die Flachkapillare am anderen Ende fixiert, nun in den Hyaluronsäureansatz getaucht und unter Vermeidung von Luftbläschen gefüllt.

Eine Seite der gefüllten Kapillare wurde mit Kitt luftdicht verschlossen. Zur kurzfristigen Lagerung wurde das offene Ende bis zur Verwendung des Röhrchens in dem Hyaluronsäureansatz belassen, um eine Austrocknung und damit Blasenbildung zu vermeiden.

Unmittelbar nach der Gewinnung, Verdünnung und dem Auftauen des Spermas wurde 1 ml Samen in einen konisch zulaufenden Probenbecher (Penetrak, SERONO DIAGNOSTICS, Freiburg) pipettiert.

Je Probe wurden zwei Flachkapillaren aus dem Hyaluronsäureansatz entnommen, vorsichtig abgewischt, mit dem offenen Ende senkrecht in die Spermaprobe getaucht und entsprechend fixiert. Die Röhrchen wurden so bei Raumtemperatur 120 Minuten belassen.

Zum Ablesen der Ergebnisse diente ein Phasenkontrastmikroskop (Okular 8fach, Objektiv PH 16fach).

Die Penetrationsstrecke und Penetrationsdichte wurde durch Auflegen der Flachkapillare auf einen mit einer Messskala versehenen Objektträger mit Millimetereinteilung (Penetrak, SERONO DIAGNOSTICS, Freiburg) und unter ständigem Fokussieren bestimmt.

Die Penetrationsstrecke wurde ermittelt, indem das am weitesten in der Kapillare vorgedrungene Spermium aufgesucht wurde. Das Spermium musste allerdings deutliche Vorwärtsbewegung zeigen. Ab einer Wanderungsstrecke von mehr als 70 mm wurde der Wert > 70 mm in das Protokoll aufgenommen.

Die Dichtermittlung erfolgte innerhalb festgelegter Abschnitte im vorderen und hinteren Bereich der Röhren, zwischen 15 und 20 mm und zwischen 50 und 55 mm. In diesen Abschnitten wurden alle darin befindlichen Spermien mit Vorwärtsbewegung gezählt. Ab einer Dichte von mehr als 50 Spermien pro Abschnitt wurde der Wert > 50 in das Untersuchungsprotokoll aufgenommen.

3.6.3 Akrosinbestimmung mittels Gelatinolyse

Verwendete Materialien:

<u>Spermienpuffer:</u>	NaCl	0,6 g
	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	1,11 g
	KH ₂ PO ₄	0.058 g
	α-D-Glukose (anhydrid)	8,5 g
	<hr/>	
	Aqua bidest.	ad 300 ml 280 mOsmol/kg
<u>PBS:</u>	NaCl	2,0 g
	Na ₂ HPO ₄	1,4 g
	KH ₂ PO ₄	0,023 g
	<hr/>	
		Aqua bidest.

Versuchsprinzip:

Das im Akrosom befindliche Akrosin, ein trypsinähnliches proteolytisches Enzym, verantwortlich für die Penetration durch die Zona pellucida des Ovums, depolymerisiert Gelatine. Um die proteolytische Aktivität des Akrosins zu messen, wird nach dem Verfahren von WELKER et al. (1988) vorgegangen.

Dabei werden dünn mit Gelatine beschichtete Objektträger angefertigt. Die Objektträger werden in einer feuchten Kammer mit 100 % Luftfeuchtigkeit horizontal gelagert und bei 37° C zwei Stunden inkubiert.

Das Versuchsprinzip basiert auf der Messung des um den Spermienkopf aufgelösten Gelatinebereiches. Diese klar begrenzten Lysishöfe, Halos, werden unter dem Phasenkontrastmikroskop durch ihre unterschiedliche Lichtbrechung sichtbar. Der Durchmesser der Halos und der prozentuale Anteil der Spermien mit Halobildung sind ein Mass für die Akrosinaktivität.

Anschliessend werden die Objektträger auf Raumtemperatur gebracht. Damit wird die Akrosinaktivität beendet und die Auswertung der Gelatineplatten kann zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen.

Versuchsablauf:

Zur Untersuchung kamen alle zur Verfügung stehenden Ejakulate.

Die Gelatinolyse wurde beim Nativsamen und dem aufgetauten Tiefgefriersamen durchgeführt. Zusätzlich wurden bei den Hengsten des Vorversuchs die mit dem Tiefgefrierverdünner nach KENNEY versetzten Spermaproben untersucht.

Herstellung der Gelatineplatten:

100 mg Gelatine (MERCK) wurden in 2 ml bidestilliertem Wasser (= 5%) im Wasserbad bei 50° C gelöst.

Nach 30 – 60 Minuten wurden 40 µl der warmen Lösung auf die Mitte eines sauberen Objektträgers unter Vermeidung von Luftbläschen aufgetragen und sofort durch Auflegen und horizontales Auseinanderziehen eines zweiten gleichmässig verstrichen.

Diese beschichteten, unfixierten Objektträger wurden dann horizontal in einer feuchten Kammer mit ungefähr 60% Luftfeuchtigkeit im Kühlschrank für mindestens 18 Stunden gelagert.

Zum Fixieren wurde eine Lösung aus PBS und 0.05% Glutardialdehyd angefertigt. Die mit Gelatine beschichteten Objektträger wurden nun zwei Minuten in diese Lösung getaucht und anschliessend zweimal für 15 Sekunden in PBS und einmal für 20 Sekunden in bidestilliertem Wasser gespült.

Die fixierten Gelatineplatten wurden vertikal in einer feuchten Kammer mit ungefähr 60% Luftfeuchtigkeit mindestens 18 Stunden und maximal eine Woche gelagert.

Die PBS-Glutardialdehyd-Lösung wurde stets frisch angesetzt und nach jeweils 36 Objektträgern gewechselt. Der PBS-Puffer wurde im Kühlschrank für maximal drei Wochen gelagert und verwendet.

Verfahren des Akrosinaktivitätstests

Unmittelbar nach der Gewinnung, Verdünnung oder dem Auftauen des Spermas wurde eine 10fache Verdünnung mit Spermienpuffer vorgenommen und für 10 Minuten bei 37° C inkubiert.

Gleichzeitig wurden die aus dem Kühlschrank stammenden Gelatineplatten auf Raumtemperatur gebracht.

Für die Bestimmung der Aktivität beim Nativsamen und aufgetauten Gefriersamen wurden jeweils sechs Platten und für den verdünnten Samen je vier angefertigt.

20 µl des mit Puffer verdünnten Samens wurde auf die Objektträger aufgebracht und mit einem grossen Deckglas gleichmässig verstrichen, wobei darauf geachtet wurde, dass der Druck auf den Objektträger sehr gering war, um eine Beschädigung der Gelatineschicht zu vermeiden.

Im Anschluss wurden die Platten für 10 Minuten bei Raumtemperatur belassen, um etwas von der Feuchtigkeit verdunsten zu lassen.

Die Inkubation der Objektträger erfolgte wiederum in einer feuchten Kammer für zwei Stunden im Brutschrank bei 37° C. Danach wurden die Platten auf Zimmertemperatur gebracht und trocknen gelassen. Damit wurde die Akrosinaktivität beendet.

Auswertung der Lysiszonen

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops (Okular 8fach, Objektive PH 16-fach und PH 40-fach) und eines Okularmikrometers. Die Skaleneinteilung des Okularmikrometers entsprach einem Umrechnungsfaktor von 3,2, das heisst ein Teilstrich betrug 3,2 μm .

Die Bestimmung des prozentualen Anteils der Spermien mit Halobildung wurde anhand der Zählung von 100 morphologisch intakt erscheinenden Spermien pro Objektträger angegeben. Pro Probe wurden demnach 600 bzw. 400 Spermien ausgewertet.

Für die Ermittlung des Halodurchmessers wurden pro Objektträger jeweils 10 morphologisch intakt erscheinende Samenzellen mit Lysisreaktion mit Hilfe des Okularmikrometers ausgemessen, also für jede Probe 60 bzw. 40 Spermien.

3.7 Statistische Auswertung

3.7.1 Statistische Tests

Alle Auswertungen wurden mit dem Programmpaket STATISTICA (Fa. StatSoft, Inc., Tulsa/USA) durchgeführt.

Folgende Kennwerte wurden berechnet:

- n - Anzahl der gültigen Werte
- \bar{x} - arithmetischer Mittelwert
- Med - Median
- Min - Minimum
- Max - Maximum
- Unteres/Oberes Quartil
- s - Standardabweichung

Die durchgeführten statistischen Tests beziehen sich auf die Ermittlung von Zusammenhängen oder Unterschieden in abhängigen Stichproben. Ergebnis eines jeden Tests ist die Irrtumswahrscheinlichkeit p . Je kleiner p , desto grösser ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein postulierter Zusammenhang oder Unterschied zwischen Stichproben tatsächlich existiert. Die für einen Test aufgestellte Nullhypothese wird üblicherweise abgelehnt, wenn p kleiner als 0,05 (=5%) ist, d. h. das Testergebnis wird dann als statistisch signifikant bezeichnet.

Der Zusammenhang zwischen stetigen Variablen (z.B. Zusammenhang zwischen Vorwärtsbeweglichkeit nativ und gekühlt) wurde mittels des Spearman'schen Rang-Korrelationskoeffizienten R geprüft (SACHS 1997). Eine Prüfung von R auf Signifikanz erfolgt mit einem modifizierten t-Test.

Unterschiede in den Mittelwerten stetiger Variablen (z.B. Unterschied der mittleren Vorwärtsbeweglichkeit nativ und gekühlt) wurden anhand des Wilcoxon-Tests für Paardifferenzen geprüft (SACHS 1997).

3.7.2 Messfehleranalyse des Halodurchmessers

Die Messfehleranalyse soll Aufschluss darüber geben, wie genau die Bestimmung eines Parameters ist, wenn sie nur aus einer Messung oder aus wenigen gemittelten Messungen erfolgt. Dies wird hier am Beispiel des Halo-Durchmessers für die drei Hengste des Vorversuchs durchgeführt.

Dazu werden die Differenzen zwischen einer Einzelmessung des Halodurchmessers und dem Mittelwert weiterer Messungen berechnet. Für diese Differenzen werden Häufigkeitsverteilungen ermittelt, aus denen hervorgeht, in welchen Grenzen ein bestimmter Prozentsatz dieser Differenzen liegt. Gleiches geschieht mit den Mittelwerten aus den Messungen eines, zweier und dreier Objektträger. Man erhält auf diese Weise Kurven gleicher Fehlerwahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der Anzahl der Halos, aus denen der Durchmesser gemittelt wurde.