

Aus der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß-  
und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Darstellung von Estradiol-17 $\beta$ - und Progesteronrezeptoren im Corpus  
luteum der Hündin zu definierten Zeitpunkten im Östrus und Diöstrus**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**Paula de Carvalho Papa**

Gießen 2001

Aus der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß-  
und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Betreuer: Prof. Dr. Dr. h. c. Bernd Hoffmann**

**Darstellung von Estradiol-17 $\beta$ - und Progesteronrezeptoren im Corpus  
luteum der Hündin zu definierten Zeitpunkten im Östrus und Diöstrus**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**Paula de Carvalho Papa**

Tierärztin aus

São Paulo - Brasilien

Gießen 2001

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Manfred Reinacher

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h. c. Bernd Hoffmann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h. c. Rudolf Leiser

Tag der mündlichen Prüfung: 17. September 2001

# Inhaltsverzeichnis

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Aufgabenstellung</b> .....	<b>01</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b> .....	<b>03</b>
<b>2.1</b>	<b>Zyklus der Hündin</b> .....	<b>03</b>
2.1.1	Anöstrus .....	03
2.1.2	Proöstrus .....	03
2.1.3	Östrus .....	04
2.1.4	Diöstrus .....	05
<b>2.2</b>	<b>Makroskopische und mikroskopische Anatomie des Ovars der Hündin</b> .....	<b>06</b>
2.2.1	Lage und Aufbau des Ovars .....	06
2.2.2	Oogenese .....	06
2.2.3	Folikulogenese .....	07
2.2.4	Corpus luteum .....	08
<b>2.3</b>	<b>Folikuläre Hormone als endokrine bzw. parakrine/autokrine Wirkfaktoren</b> .....	<b>08</b>
2.3.1	Folikuläre Steroid- und Proteohormone .....	08
2.3.1.1	Folikuläre Steroidhormon-Biosynthese .....	08
2.3.1.2	Östrogene .....	11
2.3.1.3	Progesteron .....	12
2.3.1.4	Inhibin .....	12
2.3.2	Wachstumsfaktoren .....	12
2.3.3	Besonderheiten bei der Hündin .....	13
<b>2.4</b>	<b>Luteale Hormone als endokrine bzw. parakrine/autokrine Wirkfaktoren</b> .....	<b>13</b>
2.4.1	Allgemeine Angaben .....	13
2.4.1.1	Steroidhormone .....	13
2.4.1.1.1	Progesteron .....	13
2.4.1.1.2	Östrogene .....	16
2.4.1.2	Oxytocin .....	17

# Inhaltsverzeichnis

---

2.4.1.3	PGF <sub>2a</sub> .....	18
2.4.1.4	Wachstumsfaktoren .....	18
2.4.2	Spezielle Beobachtungen bei der Hündin .....	19
<b>2.5</b>	<b>Steroidhormonrezeptoren</b> .....	<b>20</b>
2.5.1	Östrogenrezeptoren (ER) .....	20
2.5.2	Progesteronrezeptoren (PR) .....	22
2.5.3	Intrazelluläre Lokalisation .....	23
2.5.4	Regulation der Expression des ER und PR .....	24
2.5.5	Weitere Faktoren der Regulation der Expression von PR und ER .....	24
2.5.6	Speziesunterschiede in der Expression von ER und PR im Corpus luteum .....	25
2.5.7	Expression von ER und PR im CL in Abhängigkeit vom Zyklusstadium .....	25
<b>2.6</b>	<b>Nicht Rezeptor-vermittelte zelluläre Steroidwirkungen</b> .....	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1</b>	<b>Versuchsaufbau</b> .....	<b>28</b>
<b>3.2</b>	<b>Tiermaterial</b> .....	<b>28</b>
<b>3.3</b>	<b>Definition des Ovulationszeitpunktes</b> .....	<b>28</b>
<b>3.4</b>	<b>Bestimmung von Progesteron im Blutplasma</b> .....	<b>29</b>
3.4.1	Bestimmung mittels RIA .....	29
3.4.1.1	Extraktion .....	29
3.4.1.2	Durchführung des RIA .....	29
3.4.1.3	Zuverlässigkeit .....	30
3.4.2	Messung von Progesteron mittels automatischer Chemilumineszens .....	30
3.4.2.1	Testdurchführung .....	31
3.4.2.2	Spezifität .....	31
3.4.2.3	Messbereich .....	31
3.4.3	Vergleich der Methoden .....	31
<b>3.5</b>	<b>Bestimmung von Estradiol im Blutplasma</b> .....	<b>31</b>

# Inhaltsverzeichnis

---

3.5.1	Testdurchführung .....	32
3.5.1.1	Extraktion .....	32
3.5.1.2	Durchführung des RIA.....	32
3.5.1.3	Zuverlässigkeit .....	32
<b>3.6</b>	<b>Ovariohysterektomie .....</b>	<b>32</b>
<b>3.7</b>	<b>Fixierung und Einbettung der Proben für die Immunhistochemie .....</b>	<b>33</b>
<b>3.8</b>	<b>Darstellung der Estradiol-17<math>\beta</math>- und Progesteronrezeptoren .....</b>	<b>33</b>
3.8.1	Vorbereitung .....	33
3.8.2	Immunhistochemischer Rezeptornachweis .....	34
3.8.2.1	Progesteronrezeptor .....	34
3.8.2.2	Östrogenrezeptor .....	35
<b>3.9</b>	<b>Quantitative Auswertung der gefärbten Gewebeschnitte .....</b>	<b>36</b>
<b>3.10</b>	<b>Statistische Auswertung .....</b>	<b>37</b>
<b>3.11</b>	<b>Materialien und Geräte .....</b>	<b>38</b>
3.11.1	Verwendete Antikörper .....	38
3.11.2	Puffer und Lösungen .....	39
3.11.3	Auflistung der besonderen Geräte .....	41
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>42</b>
<b>4.1</b>	<b>Immunhistochemische Darstellung der PR und ER im Follikel und Uterusgewebe .....</b>	<b>42</b>
<b>4.2</b>	<b>Immunhistochemische Darstellung von Progesteronrezeptoren im Corpus luteum der Hündin .....</b>	<b>45</b>
<b>4.3</b>	<b>Immunhistochemische Darstellung von Östrogenrezeptoren im Corpus luteum der Hündin .....</b>	<b>50</b>
<b>4.4</b>	<b>Progesteron- und Estradiol-17<math>\beta</math>- konzentration im peripheren Plasma .....</b>	<b>54</b>
<b>4.5</b>	<b>Korrelationen .....</b>	<b>55</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>57</b>

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>5.1</b>	<b>Diskussion des Versuchsaufbaues</b> .....	<b>57</b>
<b>5.2</b>	<b>Diskussion der Methodik</b> .....	<b>57</b>
5.2.1	Immunhistochemischer Rezeptornachweis .....	57
5.2.1.1	Nachweis von ER mittels Immunhistochemie .....	58
5.2.1.2	Nachweis von PR mittels Immunhistochemie .....	59
<b>5.3</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse</b> .....	<b>60</b>
5.3.1	Nachweis von PR und ER .....	60
5.3.2	Zyklusbezogenheiten der Expression von PR und ER im CL der Hündin .....	62
5.3.2.1	Progesteronrezeptor .....	62
5.3.3.2	Östrogenrezeptor .....	63
5.3.3	Veränderungen in der Morphologie der Luteinzellen während des Zyklusverlaufes .....	64
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b> .....	<b>68</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>70</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>97</b>
<b>9.1</b>	<b>Progesteronrezeptoren</b> .....	<b>97</b>
<b>9.2</b>	<b>Östrogenrezeptoren</b> .....	<b>107</b>

# Einleitung und Aufgabenstellung

---

## Abkürzungen

Abb	Abbildung
Abs	Abschnitt
ACS	Automatisches Chemilumineszenz-Immunoassay System
3 $\beta$ -HSD	3 $\beta$ Hydroxysteroiddehydrogenase
CL	Corpus luteum
DHEA	Dihydroepiandrosteron
DNA	Desoxyribonucleic acid
DSH	Deutscher Schäferhund
ER	Estrogenrezeptor
ER $\alpha$	Estrogenrezeptor $\alpha$
ER $\beta$	Estrogenrezeptor $\beta$
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotrophin releasing hormone
$^3\text{H}$	Tritium
H $_2$ O $_2$	Wasserstoffperoxid
hCG	human chorionic gonadotrophin
KGW	Körpergewicht
17-KSR	17 Ketosteroidreduktase
LH	Luteinisierendes Hormon
mRNA	messenger ribonucleic acid
NaCl	Natriumchlorid
OHE	Ovariohysterektomie(n)
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p. o.	post ovulationem
P450-17 $\alpha$	cytochrom P450 side chain cleavage
PR	Progesteronrezeptor
PR-A	Progesteronrezeptor A
PR-B	Progesteronrezeptor B
PR-C	Progesteronrezeptor C
r	Korrelationskoeffizient
RIA	Radioimmunoassay



## 1 Einleitung und Aufgabenstellung

Der Reproduktionszyklus der Haussäugetiere wird in verschiedene Kategorien unterteilt: Bei einigen Tierarten, zu denen z. B. Pferd, Schaf und Ziege gezählt werden, setzt die sexuelle Aktivität zumeist saisonabhängig ein und es folgen dann bei Ausbleiben einer erfolgreichen Bedeckung mehrere Zyklen tierartspezifischer Länge; diese Spezies werden demzufolge als saisonal polyöstrisch bezeichnet. Rinder und Schweine werden als asaisonal polyöstrisch bezeichnet, da sie während des ganzen Jahres zyklisch sind. Die Hauskatze ist zwar auch ein vorwiegend asaisonal polyöstrisches Tier, die Ovulation wird aber bei dieser Spezies erst durch den Deckakt induziert.

Bei der Haushündin weicht der Sexualzyklus stark vom dem anderer Haussäugetiere ab. In Abhängigkeit von Rasse und Individuum werden unabhängig von der Jahreszeit Hündinnen zwischen ein bis drei Mal pro Jahr mit einem Interöstrusintervall von bis zu mehreren Monaten läufig, sie werden demzufolge als asaisonal monöstrisch bezeichnet. Eine weitere Besonderheit ist, dass bei graviden als auch ingraviden Hündinnen die Hormonprofile von Estradiol-17 $\beta$  und Progesteron bis kurz vor die Geburt nahezu identisch verlaufen (Hoffmann et al., 1992; Concannon, 1993).

Hinsichtlich der hypophysären Hormone LH (luteinisierendes Hormon) und Prolaktin gilt, dass sie eine entscheidende Rolle bei der Erhaltung der lutealen Progesteronproduktion in der zweiten Hälfte des Diöstrus spielen (Concannon et al., 1987; Okkens und Bevers, 1990; Hoffmann et al., 1992; Hoffmann et al.; 1996). In der ersten Hälfte der Lutealphase konnte dagegen kein luteotroper Einfluss nachgewiesen werden (Vickery et al., 1980). Es wird daher vermutet, dass die Corpora lutea zunächst unabhängig und erst ab dem ca. 22. Tag des Diöstrus abhängig sind von hypophysären Luteotropinen. Trotz vermehrter Verfügbarkeit von Prolaktin und LH kommt es aber in der 2. Hälfte des Diöstrus zu einer allmählichen und zunehmend schneller verlaufenden funktionellen Luteolyse, gemessen am Abfall von Progesteron. Die dabei zugrunde liegenden Mechanismen sind unbekannt, eine Downregulation der lutealen LH- und Prolaktinrezeptoren scheidet aus, da Fernandes et al. (1987) gleichbleibende hohe Konzentrationen im Verlauf des Diöstrus gemessen haben.

Untersuchungen bei Nutztieren haben gezeigt, dass Wachstumsfaktoren eine parakrine und autokrine Funktion bei der Regulation des Corpus luteum spielen (Tapanainen et al., 1987; Miyamoto et al., 1992; McAllister et al., 1994; Grazul-Bliska et al., 1995). Dabei konnte gezeigt werden, dass offensichtlich auch die von den Luteinzellen produzierten Sexualhormone, vor allem Estradiol-17 $\beta$  aber auch Progesteron, parakrin wirksam sind (McAllister et al., 1994; Townson et al., 1996; Chen et al., 1997). Den vorliegenden Untersuchungen lag daher die Hypothese zugrunde, dass auch beim Hund luteale Steroidhormone eine Rolle bei der Steuerung der Corpus luteum Funktion spielen.

## Einleitung und Aufgabenstellung

---

Um dieser These nachzugehen war es Ziel dieser Arbeit, die Expression von Progesteron (PR)- und Estrogenrezeptoren (ER) im Verlauf des Diöstrus im CL ingravider Hündinnen zu erfassen und eine ggf. bestehende Korrelation zu den Konzentrationen von Progesteron und Estradiol-17 $\beta$  im peripheren Plasma darzustellen.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Zyklus der Hündin

Die hier verwendete Nomenklatur der Zyklusphasen der Hündin wurde 1987 von Feldman und Nelson definiert. Nach dieser Definition dauert der Proöstrus ca. 3-16, der Östrus 4-12, der Diöstrus 60-90 und der Anöstrus 15-265 Tage. Physiologischerweise beginnt der Proöstrus mit dem Auftreten blutigen Ausflusses aus der Vagina, der Östrus mit der Sexualakzeptanz des Rüden, der Diöstrus mit dem Verlust der Sexualakzeptanz und der Anöstrus mit dem Abfall der Progesteronkonzentration im Plasma auf Basalwerte, d. h. unter 1 ng/ml (Christiansen, 1984; Concannon, 1993; Arbeiter, 1994).

#### 2.1.1 Anöstrus

Die Länge des Anöstrus variiert zwischen 15 und 265 Tagen, wobei die durchschnittliche Dauer bei ca. 125 Tagen liegt (Christiansen, 1984). Der Anöstrus wird als die Ruhephase des Reproduktionszyklus definiert. Estradiol-17 $\beta$  sinkt im Blutplasma auf Werte unter 7 pg/ml und Progesteron auf solche unter 1 ng/ml (Arbeiter, 1994). Andere Hormone wie Prolaktin, FSH (follikelstimulierendes Hormon) und LH werden ebenfalls in geringer Menge produziert und in unregelmässigen Abständen freigesetzt (Concannon et al., 1986).

Erst im mittleren bis späten Anöstrus wird LH vermehrt und mit steigender Pulsfrequenz freigesetzt (Hoffmann et al., 1996; Riesenbeck, 1997). Dies ist als eine Folge der Desensibilisierung des Hypothalamus-Hypophysensystems auf den hemmenden Einfluss von Estradiol-17 $\beta$  zu sehen (Klein, 1999). Im gleichen Zeitraum nimmt der Gehalt an FSH im peripheren Blut zu, mit einem deutlichen Abfall zu Beginn des Proöstrus (Arbeiter 1994). Die mittlere Prolaktinkonzentration ist während des Übergangs vom Diöstrus zum Anöstrus und während des frühem Anöstrus gegenüber dem späten Anöstrus erhöht (Jeffcoate, 1993), wodurch sich die Frage der Bedeutung von absinkender Prolaktinkonzentration beim Auslösen des Proöstrus mit Ende des Anöstrus stellt (Okkens et al., 1997).

Das äußere Genitale ist während des Anöstrus klein und unauffällig, die Schleimhaut der Vagina ist rosarot, wenig konturiert, etwas feucht und der Ausstrich ist zellarm. Man findet Zellen aus allen Gewebeschichten in geringer Zahl, aber nur selten Superficialzellen (Arbeiter, 1994).

#### 2.1.2 Proöstrus

Der Proöstrus wird durch steigende Östrogenkonzentrationen charakterisiert, Estradiol-17 $\beta$  kann Werte bis zu 90 pg/ml Plasma erreichen. Unter Einfluss von Estradiol-17 $\beta$ , das in den

sich anbildenden Ovarfollikeln produziert wird, erfolgt eine Ödematisierung von Vulva und Perineum, die Vaginalschleimhaut wird hyperämisch (Arbeiter, 1994). Oettel (1979) beschreibt den mit Beginn des Proöstrus zu beobachtend vaginalen Ausfluss als eine Diapedeseblutung. Die Hündin ist zwar schon für den Rüden attraktiv, aber duldet noch keinen Aufsprung (Christiansen, 1984).

Gegen Ende des Proöstrus fällt Estradiol-17 $\beta$  auf Basalwerte (10-20 pg/ml) ab (Hoffmann et al., 1992) während der Progesteronspiegel, der bis dahin auf Werten < 1 ng/ml lag, steigt (Arbeiter, 1994).

Die Ausschüttung des luteinisierenden Hormons ist während dieser Phase gering und pulsatil (Concannon, 1993; Hoffmann et al., 1996; Riesenbeck, 1997) und die des follikelstimulierenden Hormons, wahrscheinlich wegen der negativ-rückkoppelnden Wirkung von Estradiol-17 $\beta$  und Inhibin (beide Wirkstoffe werden in den Granulosazellen der Follikel gebildet), am niedrigsten (Olson et al., 1982; Concannon, 1993).

Erythrozyten und hohe Intermediärzellen treten im Vaginalabstrich auf und der Anteil an verhornenden Superfizialzellen steigt (Christie et al., 1972). Vaginoskopisch zeigt sich aufgrund der Zunahme der Epithelschichten eine eher porzellanweiße und in Längsfalten gelegte Schleimhaut, in der ein rötliches Sekret zu erkennen ist (Lindsay, 1983). Diese Phase dauert ca. 8-10 Tage (Christiansen, 1984).

### 2.1.3 Östrus

Der Östrus ist vom Duldungsverhalten der Hündin geprägt (Arbeiter, 1994). Im Abstrich finden sich vor allem kernlose verhornte Superfizialzellen, die charakteristische Nesterbildung tritt erst in Verbindung mit dem präovulatorischen Progesteronanstieg auf und es finden sich zumeist keine Erythrozyten mehr (Gerres, 1991). Vaginoskopisch wirkt die Schleimhaut trocken und es finden sich sowohl Längs- als auch Querfalten (Arbeiter, 1994).

Der Gehalt an LH und FSH im zirkulierenden Blut nimmt zu. Abhängig vom Alter des Tieres erreicht der präovulatorische LH-Peak Werte von 20 bis 60 ng/ml, fällt aber spätestens nach drei Tagen auf Basalwerte zwischen 2 und 4 ng/ml zurück. Die FSH-Konzentration erhöht sich auf bis zu 208 ng/ml und sinkt innerhalb von 6 Tagen auf 69 ng/ml ab (Reimers et al., 1978). Im Zeitraum zwischen dem LH-Peak und der Ovulation (36-48 Stunden) reifen die Graafschen Follikel zu sprungreifen Follikel heran. Die Luteinisierung der Tertiärfollikel ist für die steigenden Progesteronwerte im Plasma bis auf im Mittel 5,0 ng/ml zum Zeitpunkt der Ovulation verantwortlich (Bouchard et al., 1991; Concannon, 1993). Nach dem LH-Peak werden in rascher Konzentrationszunahme Progesteronwerte von 16 ng/ml und darüber erreicht (Arbeiter, 1994).

### 2.1.4 Diöstrus

Die Dauer des Diöstrus bei der ingraviden Hündin schwankt zwischen 80-110 Tagen. Mit Beginn dieser Phase akzeptiert die Hündin den Rüden nicht mehr, die Ödematisierung der Vulva nimmt ab und im Vaginalabstrich erkennt man Leukozyten, deren Zahl im mittleren bis späten Diöstrus (21. bis 75. Tag nach dem LH-Peak) absinkt. Als vaginoskopischen Befund kann man die longitudinale Faltung der Schleimhautoberfläche, die feucht-opalisierend und blassrosa erscheint, erkennen. Im späten Diöstrus werden die Falten flacher und die Oberfläche bleibt feucht und glänzend (Arbeiter, 1994).

Die Estradiol-17 $\beta$ -, LH- und Progesteron-Konzentrationen im Plasma sind bei graviden und ingraviden Hündinnen bis kurz vor den Geburtszeitpunkt nahezu identisch (Jones et al., 1973; Reimers et al., 1978; Concannon et al., 1989). 24-48 Stunden vor der Geburt sinken Progesteron und Estradiol-17 $\beta$  rasch auf Basalwerte ab, während bei der ingraviden Hündin dieser Abfall allmählich erfolgt (Concannon et al., 1989). Dieser rasche Progesteronabfall ist wahrscheinlich Prostaglandin F2a vermittelt (Hoffmann et al., 1996; Riesenbeck, 1997).

Während der ersten 20 Tage nach der Ovulation ist das Corpus luteum beim Hund unabhängig von hypophysären gonadotropen Stimuli (Concannon, 1980; Concannon et al., 1987). LH, das nach dem präovulatorischen Peak weiter pulsatil in niedrigen Konzentrationen ausgeschüttet wird, wirkt ab dem ca. 30. Tag als luteotroper Faktor (Concannon, 1980). Ein weiterer luteotroper Faktor bei der Hündin ist das Prolaktin (Okkens und Bevers, 1990; Onclin et al., 1993; Onclin und Verstegen, 1997a). Der Konzentrationsverlauf des Prolaktins ist bei graviden und ingraviden Hündinnen bis zum 35. Tag nach der Ovulation identisch. Ab diesem Zeitpunkt ist die Konzentration im Plasma bei graviden Tieren höher (Onclin und Verstegen, 1997b) und der Abfall auf Basalwerte findet erst ab dem 60. Tag nach der Geburt statt (Concannon et al., 1989).

Relaxin ist das einzige bekannte Hormon, dessen Profil zwischen tragenden und nicht-tragenden Hündinnen deutlich variiert. Nur bei der graviden Hündin kann ab der dritten Trächtigkeitswoche Relaxin im Plasma nachgewiesen werden. Bisherige Untersuchungen konnten keinen direkten Einfluss von Relaxin auf die luteale Funktion nachweisen (Steinetz et al., 1987).

Bei der ingraviden Hündin sind die luteolytischen Mechanismen unbekannt. So konnte weder ein Luteolysin uterinen Ursprungs wie beim Rind u. a. landwirtschaftlichen Nutztieren nachgewiesen werden (Olson et al., 1989; Hoffmann et al., 1992), noch ein Mangel an hypophysär verfügbarem LH (Hoffmann und Schneider, 1993) oder Prolaktin (Onclin und Verstegen, 1997b). Hoffmann et al. (1996) schließen daraus, dass auto- und/oder parakrine Steuerungsmechanismen für die luteale Regression verantwortlich sind.

## 2.2 Makroskopische und mikroskopische Anatomie des Ovars der Hündin

### 2.2.1 Lage und Aufbau des Ovars

Bei der Hündin sind die Ovarien paarig angelegt. Das rechte Ovar liegt im Bereich des 3.-4. Lendenwirbels und etwas weiter cranial als das linke. Sie berühren den kaudalen Nierenpol oder liegen in dessen Nähe. Das Ovar stellt sich als längliches, ovales, leicht abgeplattetes, gelegentlich auch kugeliges Gebilde dar. Die Abmessungen sind rassen-abhängig; bei einer mittelgroßen Hündin sind die Ovarien ca. 12 x 8 x 6 mm groß. Sie werden von der Bursa ovarica bedeckt, ihre Oberfläche ist in der Follikel- und Gelbkörperphase feinhöckerig (Vollmerhaus et al., 1994).

Das Ovar kann in zwei Zonen unterteilt werden: die innere, lockere Zona vasculosa (*Medulla ovarii*), in der die plexusbildenden Blutgefäße, Lymphgefäße und Nerven in ein Netzwerk lockeren Bindegewebes eingebaut sind, und die äußere, dichter gefügte Zona parenchymatosa (*Cortex ovarii*). Die funktionellen Strukturen des Ovars (Oozyten, alle Stadien der Follikelentwicklung, Corpora lutea und deren Überreste, die sogenannten Corpora albicantia) sowie dazwischen gelagerte Stromazellen befinden sich in der Zona parenchymatosa. Das Oberflächenepithel, auch als Keimdrüsenepithel bezeichnet, besteht aus kubischen Zellen, die mit zunehmendem Alter etwas abplatteten. Sie gehen am *Margo mesovaricus* in das Peritoneum über, das auch die Bursa ovarica auskleidet. Unter dem Oberflächenepithel wird eine Organkapsel, die dünne *Tunica albuginea*, aus kollagenen Fasern gebildet (Vollmerhaus et al., 1994).

### 2.2.2 Oogenese

Die Oogenese besteht aus Bildung, Entwicklung und Reifung weiblicher Keimzellen. Die Entwicklung beginnt schon im embryonalem Stadium und wird im geschlechtsreifen Alter mit den beiden Schritten der Reifeteilung beendet. Die Vermehrungsperiode der Oogonien findet zwar schon während der fetalen Entwicklung statt, kann aber beim Hund auch noch in den ersten Tagen nach der Geburt beobachtet werden (Anderson und Simpson, 1973). Die Höchstzahl wird bei der Hündin mit ca. 700.000 kurz nach der Geburt erreicht (Schotterer, 1928). Der Eintritt der Keimzellen in die Meiose I beginnt erst ab dem Tag der Geburt und die letzten Oogonien sind noch Wochen nach der Geburt zu beobachten (Schotterer, 1928; Anderson und Simpson, 1973). Dies signalisiert das Ende der Vermehrungsphase, d. h., die Gesamtpopulation der weiblichen Keimzellen ist dadurch endgültig festgelegt. Die Eizellen verharren als primäre Oozyten in der Prophase der Meiose I bis sie einer eventuellen Ovulation zugeführt werden. Die Fortsetzung der meiotischen Teilung erfolgt erst kurz vor der Ovulation.

### 2.2.3 Follikulogenese

Als Follikulogenese werden Wachstums- und Differenzierungsvorgänge von Eizelle und Follikelzellen bezeichnet. Als Ausgangspunkte werden Primordialfollikel gebildet, was bei der Hündin ca. drei Woche nach der Geburt erfolgt (Klötzer, 1969). Sie sind durch eine große Oozyte, die von wenigen Follikelepithelzellen umgeben wird, charakterisiert. Die weitere Entwicklung des Primordialfollikels zum Primärfollikel ist neben dem Wachstum der Eizelle durch eine Änderung der Form (von flach nach kubisch) und Vermehrung der Follikelepithelzellen gekennzeichnet. Weiterhin ist die beginnende Ausbildung der Zona pellucida festzustellen, was bereits bei 5 Wochen alten Hundewelpen erkennbar ist (Vollmerhaus et al., 1994).

Im Folgenden wird die Anzahl der Follikelepithelzellen – jetzt auch als Granulosazellen bezeichnet - durch zahlreiche Mitosen vermehrt. Daraus resultiert eine Mehrschichtigkeit der Granulosazellen mit *Corona radiata*, eine Charakteristik des Sekundärfollikels. Der Sekundärfollikel wird weiterhin durch eine bindegewebige Hüllschicht, die *Theca follicularis*, gekennzeichnet. Sekundärfollikel finden sich beim Hund ab einem Alter von 15 Wochen. Ab einem halben Jahr beginnt die Ausbildung von Tertiärfollikeln. Die Verlagerung der Eizelle an den Rand des Follikels, die Ausbildung des *Cumulus oophorus* und des *Antrum folliculare* und die Teilung der *Theca follicularis* in *Theca externa* und *Theca interna* charakterisieren dieses Stadium der Follikelentwicklung. Insbesondere bei der Hündin erscheinen regelmäßig Follikel mit mehreren Eizellen (bis zu 5 an der Zahl), die dadurch gekennzeichnet werden, dass das *Antrum folliculare* in der Regel fast völlig vom *Stratum granulosum* ausgefüllt ist (Vollmerhaus et al., 1994). In dieser Phase erreicht der Follikel eine Größe von ca. 150 mm.

Der reife, präovulatorische Follikel wird als Graafscher-Follikel bezeichnet und erreicht bei der Hündin eine durchschnittliche Größe von 2 mm. In diesem Stadium schwimmt die Oozyte, umgeben von der Zona pellucida, den Zellen der Corona radiata und einzelnen Follikelepithelzellen, frei in der Follikelflüssigkeit.

Die sprungreifen Follikel befinden sich an der Ovaroberfläche, direkt unterhalb der *Tunica albuginea* (s. Abs. 2.2.1). Die präovulatorische Reifung wird hormonell gesteuert. Eine diesbezügliche Besonderheit bei der Hündin ist die Progesteronsynthese, die von den Granulosaluteinzellen bereits kurz vor der Ovulation ausgeht (s. Kap. 2.3.1). An einer umschriebenen Zone, dem Stigma, wird die Follikelwand anämisch und durchsichtig. Bei der spontanen Ovulation der Hündin kommt es in diesem Bereich zur Ruptur der Follikelwand, und die Eizelle wird zusammen mit den anhaftenden Granulosazellen ausgeschwemmt. Die erste meiotische Teilung wird erst kurz nach dem Follikelsprung durch die Abtrennung des ersten Polkörperchens beendet. Die Anzahl ovulierender Follikel ist abhängig von Rasse und Alter und schwankt in der Regel zwischen drei und acht (Vollmerhaus et al., 1994).

### 2.2.4 Corpus luteum

Das auch als Gelbkörper bezeichnete Corpus luteum (CL) ist eine temporäre, endokrine Drüse, die sich nach der Ovulation aus den verbliebenen Zellen der Follikelwand (Granulosazellen) und den Stromazellen der Theca follicularis bildet. Bei der Hündin ist das CL nicht gelb, sondern besitzt eine zart graurosa getönte Farbe (Vollmerhaus et al., 1994).

In dem vormals avaskulären Raum des rupturierten Follikels sprossen innerhalb weniger Stunden Gefäße ein, die die sich vermehrenden Luteinzellen mit den u. a. für die Steroidbiosynthese erforderlichen Substraten versorgen. Beim Menschen sind 52% der Zellen des CL Endothelzellen und Perizyten, hormonproduzierende Luteinzellen haben einen Anteil von ca. 25%. Im Mittel hat eine Lutealzelle Kontakt mit vier Kapillaren. Über das Kapillarsystem des CL erreichen Stromazellen, Fibroblasten und Makrophagen in großer Zahl die ehemalige Follikelhöhle und die Makrophagen phagozytieren Blutbestandteile und Follikelfragmente (Neulen, 1998).

Durch Vergrößerung des Zytoplasmas (funktionelle Hypertrophie) und Zellerneuerung (Hyperplasie) transformieren die Granulosazellen der Follikelwand und die Stromazellen der Theca interna zu Luteinzellen. Die Granulosa- und Thecaluteinzellen tragen durch ihre hohe mitotische Aktivität entscheidend zur Größe des CL bei. Sie sind pleomorphisch und weisen prominente, runde Kerne mit einem Nukleolus sowie unterschiedlich geartete Lipid-einlagerungen auf. Bei anderen Spezies, wie z. B. Mensch und Rind, kann zwischen großen und kleinen Luteinzellen unterschieden werden, beim Hund dagegen nicht (Abel et al., 1975a; Leiser und Meyer, unveröffentlichte Daten).

Die Rückbildung des Gelbkörpers der Hündin zeigt sich bei Vermehrung des Bindegewebes und Auflockerung des Zentrums durch Abnahme des Gesamtvolumens. Das während der Trächtigkeit vorhandene Corpus luteum graviditatis unterscheidet sich vom Corpus luteum cyclicum nur durch eine stärkere bindegewebige Durchwucherung, die auch größere Gefäße führt (Vollmerhaus et al., 1994).

## 2.3 Follikuläre Hormone als endokrine bzw. parakrine/autokrine Wirkfaktoren

### 2.3.1 Follikuläre Steroid- und Proteohormone

#### 2.3.1.1 Follikuläre Steroidhormon-Biosynthese

In den Thecazellen des Follikels entsteht Pregnenolon nach Cleavage der terminalen C6 Einheit aus der Seitenkette des Cholesterins durch das Enzym P450 Side-Chain Cleavage (P450<sub>SCC</sub>) (siehe Abb. 1). Je nach weiterem Verlauf der Biosynthese entstehen aus diesem entweder auf dem



## Literaturübersicht

---

D5-Syntheseweg der Reihe nach das 17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolon, Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Androstenedion oder auf dem D4-Syntheseweg das Progesteron, gefolgt von der Bildung von 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron und Androstendion.

Durch Reduktion der 17-Ketogruppe des Androstendions erfolgt in den Thecazellen die Bereitstellung von Testosteron. Diese Androgenbiosynthese ist auf die Zellen der Theca interna beschränkt, da die Granulosazellen nicht über das Enzym 17 $\alpha$ -Hydroxylase verfügen. Die Bildung von Östrogenen durch die Granulosazellen setzt also die Bereitstellung von Androgenen durch die Thecazellen voraus (s. Abb. 1).

Im Hinblick auf die Ausstattung mit den Enzymen 3 $\beta$ -OH-Steroiddehydrogenase / D4/5-Isomerase sind die Granulosazellen allerdings zur Progesteronsynthese befähigt. Insbesondere bei der Frau und beim Hund wurde ein präovulatorischer Progesteronanstieg beschrieben (Concannon, 1993).

LH induziert den Transport von Cholesterin von der äußeren zu der inneren Membran der Mitochondrien und fördert somit die Pregnenolon- bzw. Progesteronbiosynthese (Niswender, 2000). In den Granulosazellen wird die Aromatisierung von Androgenen zu Östrogenen unter dem Einfluss von FSH ausgelöst (Döcke, 1994a).

# Literaturübersicht

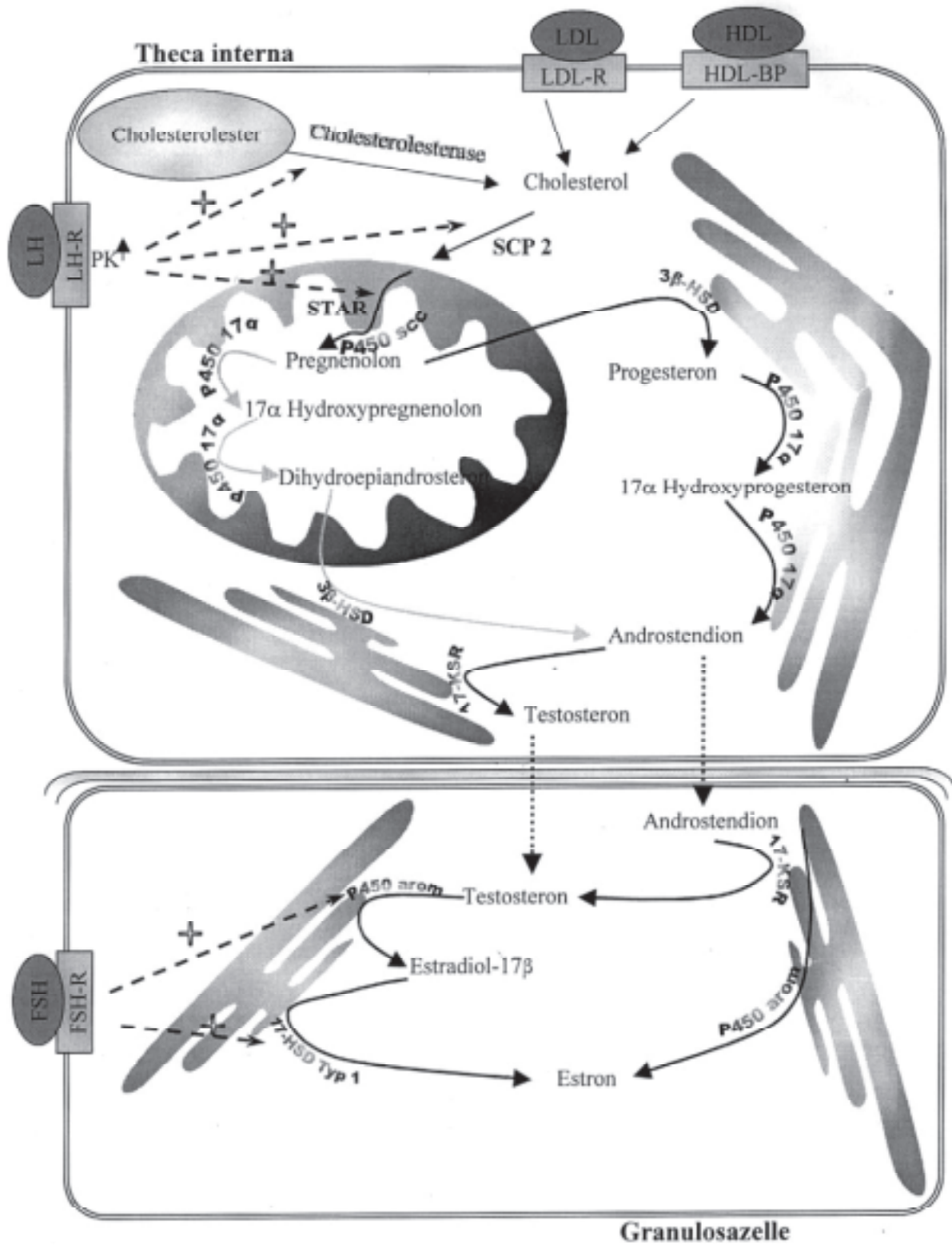


Abb. 1: (Legende s. nächste Seite)

# Literaturübersicht

Abb. 1: Schematische Darstellung der Steroidbiosynthese im zwei Zellmodell des Follikels unter der Berücksichtigung des Einflusses der Gonadotropine FSH und LH. **SCP2**: Sterol carrier protein 2; **STAR**: steroidogenic acute regulatory protein **P450 scc**: P450 side chaine cleavage enzyme; **3 $\beta$  HSD**: 3 $\beta$  Hydroxysteroid-dehydrogenase/D4-D5 Isomerase; **P450 17 $\alpha$** : 17 $\alpha$  Hydroxylase/ C 17-20 Lyase; **17-KSR**: 17-Ketosteroidreductase; **P450 arom**: P450 aromatase; **LH-R**: LH-Rezeptor; **FSH-R**: FSH-Rezeptor; **LDL / HDL**: Low / High Density Lipoprotein; **LDL-R**: LDL-Rezeptor; **HDL-BP**: HDL-Binding Protein.



## 2.3.1.2 Östrogene

Estradiol-17 $\beta$  ist das primäre Produkt der folliculären Östrogensynthese. Es spielt eine wichtige Rolle bei der zyklusabhängigen Steuerung der Funktionalität des äußeren und inneren Genitale, insbesondere bei der Proliferation und Differenzierung des uterinen und vaginalen Epithels, der Aktivierung der sekretorischen Zellen des Zervixepithels und - in Abhängigkeit von den Spezies - Erhöhung der Eileiter- und Uterusmotilität während des Östrus (Galand et al., 1971). Estradiol-17 $\beta$  führt zu einer Aufregulierung des Gehaltes an PR mRNA und -Protein sowie von Oxytocinrezeptoren im Uterus; auch eine Erhöhte Expression der *c-fos* mRNA (Hauptkomponente einiger Transkriptionsfaktoren) wurde beobachtet (Kraus und Katzenellenbogen, 1993).

Im Zusammenspiel mit anderen Faktoren stimuliert Estradiol-17 $\beta$  als parakriner Faktor die Entwicklung und Reifung der Follikel, die Expression der FSH- und LH-Rezeptoren in den Granulosazellen, die Formation von „Gap Junctions“ zwischen Granulosazellen und die Expression des zellulären proliferativen nukleären Antigens (PCNA) in den Granulosazellen; des weiteren schützt Estradiol-17 $\beta$  die Zellen vor oxidativer stress-induzierter Apoptose, wie Lund et al. (1999) beim Schaf nachweisen konnten.

Der Einfluss von Estradiol auf die hypothalamo-hypophysäre Achse führt beim geschlechtsreifen Tier im Endeffekt aufgrund der positiv-rückkoppelnden Mechanismen zum ovulationsauslösenden LH-Peak (Döcke, 1994b). Bis zur Geschlechtsreife wirkt das nur in geringen Mengen produzierte endogene Estradiol-17 $\beta$ , hier dagegen vor allem negativ rückkoppelnd (Foxcroft et al., 1984). Im Verlauf des Wachstums ist Estradiol-17 $\beta$  an der Entwicklung der Milchdrüse während der Pubertät sowie der Steuerung des Lipidstoffwechsels beteiligt (Katzenellenbogen et al., 1979; Döcke, 1994b),

### 2.3.1.3 Progesteron

Bei den meisten Haussäugetieren liegt Progesteron während der Follikelphase in sehr niedrigen Konzentrationen vor. Aufsteigende Konzentrationen am Ende des Östrus modifizieren oder hemmen die Wirkung von Estradiol-17 $\beta$ , indem es den Abbau der Östrogenrezeptoren fördert (Leavitt und Takeda, 1986; Kraus und Katzenellenbogen, 1993; Perrot-Applanat et al., 1994; Parandoosh et al., 1995). Beim Hund wird durch folliculäres Progesteron zudem die Duldung induziert, weiterhin ergeben sich mit der Nesterbildung charakteristische zytologische Veränderungen in Vaginalabstrich.

### 2.3.1.4 Inhibin

Inhibin wird im Tertiärfollikel von den Granulosazellen produziert, wie Untersuchungen beim Wiederkäuer zeigten. Während des Zyklus steigt es parallel mit den Östrogenen im Verlauf der Follikelphase bis zur Ovulation an (Döcke, 1994a). Es erhielt seinen Namen aufgrund der hemmenden Wirkung auf die Freisetzung von FSH aus der Hypophyse; es hat somit eine regulierende Wirkung auf die Follikelanbildung (Findlay et al., 1990).

### 2.3.2 Wachstumsfaktoren

Die Beteiligung von FSH und LH am folliculären Wachstum, der Reifung der Oozyte sowie der Ovulation wurde ausführlich beschrieben (Adashi, 1994). Neben den Gonadotropinen und Steroidhormonen zeigen dabei aber auch Wachstumsfaktoren wichtige regulatorische Funktionen (Adashi, 1992). So konnte für den basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) bei Rind und Mensch gezeigt werden, dass er von den Granulosazellen des Follikels synthetisiert wird (Neufeld et al., 1987; Yamamoto et al., 1997) und als autokriner Faktor die Proliferation dieser Zellen mitbeeinflusst. In den Thecazellen scheint bFGF den Luteinisierungsgrad zu steuern (van Wezel et al., 1995; Yamamoto et al., 1997). Unter dem Einfluss von LH, Insulin und IGF-I (Insulin-like Growth Factor-I) hemmen bFGF und EGF (Epidermal Growth Factor) die Androstendionproduktion in bovinen Thecazellkulturen sowie die FSH-abhängige Östrogensynthese. Diese Hemmung der Androstendionsynthese scheint für das Ruhen der antralen Follikel in einem undifferenzierten Stadium wichtig zu sein, oder sie spielt eine Rolle bei der Unterdrückung der Estradiolsynthese in den differenzierten antralen Follikeln (Spicer und Stewart, 1996). Bei der Katze wurde gezeigt, dass EGF eine wichtige Rolle in der ovariellen Follikulogenese spielt, während der Wachstumsphase wirkt EGF als mitogener Faktor bei Induzierung der Granulosazellproliferation; in antralen Follikeln reguliert EGF die Differenzierung der Granulosazellen und die Reifung der Oozyten (Göritz et al., 1996).

TGF $\alpha$  (Transforming Growth Factor  $\alpha$ ) zeigt eine hohe strukturelle Homologie mit dem EGF, wodurch die analoge Fähigkeit beider Wachstumsfaktoren die Differenzierung der Granulosazellen zu modulieren, erklärt werden kann (Lobb et al., 1989). TGF $\beta$  zeigt eine hohe Homologie mit Inhibin, was darauf hindeutet, dass die Mitglieder der TGF $\beta$ -Inhibin Familie eine Rolle als autokrine und/oder parakrine Faktoren bei Wachstum und Differenzierung der Follikel spielen. Zudem wurde gezeigt, dass TGF $\beta$  die FSH-abhängige LH-Rezeptorinduktion und die Progesteronsynthese in Granulosazellen der Ratte stimuliert (Dodson und Schomberg, 1996). IGF-I stimuliert auch die Progesteronsynthese porciner und humaner Granulosazellen unter in-vitro Bedingungen; dies gilt sowohl für die Biosynthese aus endogenen Sterolsubstraten (25-Hydroxycholesterol) als auch für die durch Estradiol-17 $\beta$  stimulierte Progesteronbiosynthese (Veldhuis und Furlanetto, 1985; Di Blasio et al., 1994).

### 2.3.3 Besonderheiten bei der Hündin

Wie oben bereits dargestellt, produzieren bei der Hündin die Granulosazellen des präovulatorischen Follikels größere Menge an Progesteron. Dies manifestiert sich in dem deutlich meßbaren Progesteronanstieg von 1 ng/ml am Ende des Proöstrus auf 2 ng/ml zum Zeitpunkt des LH-Peaks bzw.  $4,9 \pm 1$  ng/ml zum Zeitpunkt der Ovulation (Bouchard et al., 1991; Concannon, 1993).

## 2.4 Luteale Hormone als endokrine bzw. parakrine/autokrine Wirkfaktoren

### 2.4.1 Allgemeine Angaben

Zentrale und übergeordnete Faktoren bei der Kontrolle der CL-Funktion sind die Gonadotropine hypophysären Ursprungs sowie - in Abhängigkeit von der Spezies - luteolytische Faktoren (PGF $_{2\alpha}$ ) aus dem Endometrium. Darüber hinausgehend haben jedoch Untersuchungen beim Menschen (Rossmanith et al., 1990; Hinney et al., 1995) und Schwein (Wuttke et al., 1998) gezeigt, dass im CL produzierte Substanzen, wie z.B. Steroide, Eicosanoide, Cytokine und Wachstumsfaktoren als auto- und/oder parakrine Faktoren ebenfalls an der Steuerung der lutealen Progesteron- und Estradiol-17 $\beta$ -Sekretion beteiligt sind. Hoffmann et al. (1996) vermuteten, dass ähnliche Mechanismen auch bei der Hündin zur Wirkung kommen.

#### 2.4.1.1 Steroidhormone

##### 2.4.1.1.1 Progesteron

Wie in Abb. 2 dargestellt, kann Progesteron entweder auf dem D4-Syntheseweg oder auf dem D5-Syntheseweg entstehen. In vitro Untersuchungen mit Luteinzellen vom Schwein (Weiss et

## Literaturübersicht

---

al., 1976), Pferd (Savard, 1973), Frettchen (Kintner und Mead, 1983) und Stinktier (Ravindra et al., 1984) haben gezeigt, dass bei diesen Tierarten der D4-Syntheseweg bevorzugt wird. Für den Menschen haben entsprechenden Untersuchungen gezeigt, dass sowohl der D4- als auch der D5-Syntheseweg nebeneinander existieren und die jeweilige Syntheseroute vom Zyklusstadium und dem Alter der Zellkultur abhängig ist (Shimizu et al., 1982; Hurtwitz et al., 1989).

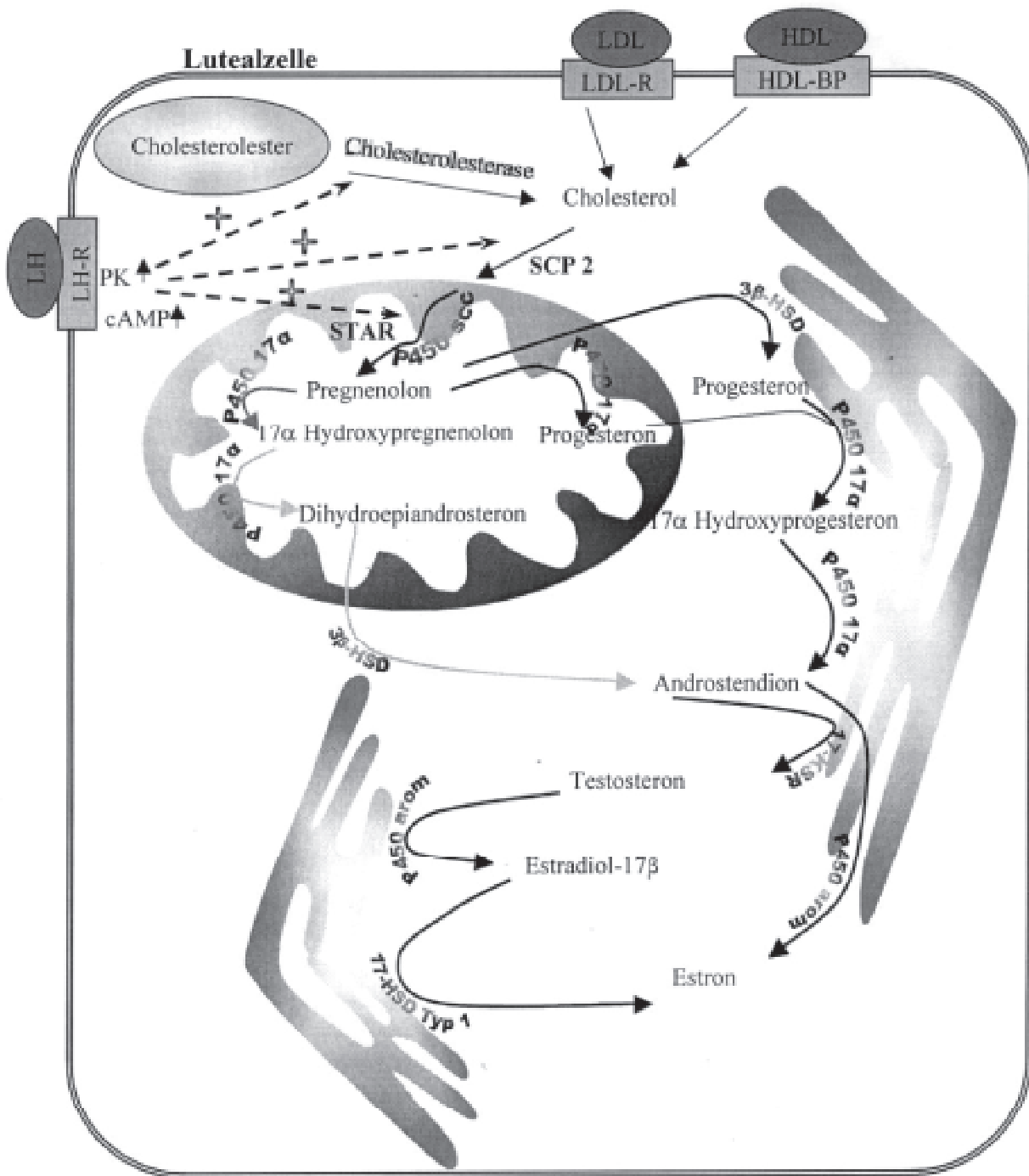


Abb. 2: Schematische Darstellung der Steroidbiosynthese in einer Luteinzelle des Corpus luteum unter der Berücksichtigung des Einflusses des Gonadotropins LH. **SCP2**: Sterol carrier protein 2; **STAR**: steroidogenic acute regulatory protein **P450 scc**: P450 side chaine cleavage enzyme; **3β HSD**: 3β Hydroxysteroiddehydrogenase / D4-D5 Isomerase; **P450 17a**: 17a Hydroxylase/C 17-20 Lyase; **17-KSR**: 17-Ketosteroid-reductase; **P450 arom**: P450 aromatase; **LH-R**: LH-Rezeptor; **LDL / HDL**: Low / High Density Lipoprotein; **LDL-R**: LDL-Rezeptor; **HDL-BP**: HDL-Binding Protein.

Bereits 1981 postulierte Rothchild, dass Progesteron speziessübergreifend eine luteotrope Wirkung hat und somit als auto- bzw. parakriner Faktor im CL wirkt. Die Aktivität der Enzyme 3 $\beta$ -HSD und P450<sub>scc</sub> wurde *in vitro* bei der Ratte (Ruiz de Galarreta et al., 1985) sowie beim Schwein (Tonetta, 1987) und Schaf (Caffrey et al., 1979) untersucht; Progesteron stimulierte deren Aktivität, was zu einer Steigerung der Progesteron Produktion in der Zellkultur führte. Außerdem wurde die Progesteronkonzentration durch synthetische Gestagene in der bovinen Lutealzellkultur erhöht (Pate, 1996).

Progesteron hemmt die menschliche Granulosazellproliferation in Kultur, während EGF (Epidermal Growth Factor) in der Lage ist, diese Proliferation zu induzieren. Der Hemmungseffekt des Progesterons im Kulturmedium ist dosisabhängig und wird zumindest teilweise über den Progesteronrezeptor vermittelt, da die Bindung von Progesteron an seinen Rezeptor die Fähigkeit des EGF, die Mitose zu induzieren, hemmt. Außerdem wird diese Wirkung vom Progesteronrezeptor-Antagonist RU 486 vermindert. Ebenso wird die Kapazität zur Luteinisierung der Granulosa- und Thecazellen von Progesteron reguliert, indem es diese Kapazität steigert (Chaffkin et al., 1993).

Auch die Ansprechbarkeit des CL auf Prolaktin wird von Progesteron verändert; so hemmt Progesteron die Prolaktin-induzierte Apoptose der Luteinzellen durch eine Senkung der *Fas* mRNA (*Fas*: Molekül der Zellmembran, das Signale zur Apoptoseinduktion übermittelt) im CL der Ratte, was bedeutet, dass ein autonomes Zell/Gewebe System für die Regression des CL existiert (Kuranaga et al., 2000).

### 2.4.1.1.2 Östrogene

Estradiol-17 $\beta$  wird in den Luteinzellen vom Schwein (Gregoraszcuk, 1983; Gregoraszcuk, 1992), Mensch (Johnson et al., 1996; Väänänen et al., 1997) und Hund (Nishiyama et al., 1999) produziert. Die Mechanismen, welche die Estradiol-17 $\beta$ -Synthese im CL regulieren, sind noch weitgehend unbekannt. Sowohl parakrine, wie z.B. IGF-1 und PGF<sub>2a</sub>, als auch endokrine Faktoren, wie z.B. GnRH oder beim Menschen hCG (Väänänen et al., 1997), könnten eine Rolle dabei spielen.

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass die Wirkung von lutealem Estradiol-17 $\beta$  abhängig ist von der Spezies, dem Zeitpunkt nach der Ovulation und von der Konzentration. Je nachdem kann Estradiol-17 $\beta$  luteotrop oder luteolytisch wirken.

Ein Mangel an Estradiol-17 $\beta$  während der präovulatorischen Phase führt z. B. beim Schaf zu einer Insuffizienz der Granulosaluteinzellen (Lund et al., 1999). Die Progesteronproduktion der humanen Luteinzellen wird konzentrationsabhängig von Estradiol-17 $\beta$  gesteuert; so beschrieben Endo et al. (1998), dass eine niedrige (5 ng/ml) Estradiol-17 $\beta$ -Konzentration in der Lage war, die



Progesteronproduktion akut zu stimulieren, während eine hohe Konzentration (100 ng/ml) die basale Progesteronproduktion hemmte.

Beim Schwein spielt Estradiol-17 $\beta$  in der späten (13-16 Tage nach der Ovulation) Lutealphase eine aktive Rolle bei der Steuerung der lutealen Regression: so hemmt es als autokriner Faktor in der Luteinzelle die Synthese des luteotrop wirksamen Prostaglandins E<sub>2</sub> und damit die Progesteronproduktion; das Verhältnis von PGE<sub>2</sub> zu PGF<sub>2a</sub> sinkt (Gregoraszczyk und Oblonczyk, 1996). Estradiol-17 $\beta$  ist beim Kaninchen der wichtigste luteotrope Faktor (Goodmann et al., 1998). So führt eine Senkung des Gehaltes an Estradiol-17 $\beta$  im Blut zu einer schnellen Erniedrigung der Progesteronkonzentration beim scheinträchtigen, hypophysektomierten Kaninchen (Bill und Keyes, 1983). Diese stimulierende Wirkung von Estradiol-17 $\beta$  auf die Progesteron Sekretion in der Kaninchen Luteinzellkultur ist nicht auf eine direkte Stimulation der Progesteronsynthese zurück zu führen, sondern auf eine Potenzierung des luteotropen Effekts vom IGF-I (Chen et al., 1997). Beim Schaf wurde beobachtet (Hazzard und Stormshak, 1997), dass eine Behandlung mit Estradiol-17 $\beta$  über 20 Tage, beginnend 4 Tage nach der Ovulation, zu einer Verlängerung des Interöstrus-Intervalls durch eine Verlängerung der CL-Lebenspanne führt. Bei der trächtigen, hypophysektomierten Ratte hält Estradiol-17 $\beta$  den Progesteron Gehalt im Serum vom Tag 12 bis Tag 15 aufrecht und erhöht gleichzeitig die Konzentration von Östrogenrezeptoren im CL (Gibori und Keyes, 1978).

„In vivo“ Mikrodialyse-Systeme bei frei sich bewegenden Schweinen zeigten, dass PGF<sub>2a</sub> und Oxytocin in der Lage sind, die Progesteronsekretion in der mittleren Lutealphase über eine Interaktion mit dem Östrogenrezeptor zu steigern. Ein ähnlicher Effekt wurde bei der Mikrodialyse „in vitro“ beim Gelbkörper der Frau beobachtet; dies bestätigt die Einstufung von Estradiol-17 $\beta$  als luteotropen Faktor im CL (Maas et al., 1992; Wuttke et al., 1998).

Der Einfluss von Estradiol-17 $\beta$  auf die Downregulierung von GnRH und seinen Rezeptoren in Granulosaluteinzellkultur beim Menschen und somit die Unterdrückung der GnRH-induzierten Apoptose in Luteinzellen ist ein anderer Beweis für die wichtige Rolle von Estradiol-17 $\beta$  im CL (Maas et al., 1992).

### 2.4.1.2 Oxytocin

Oxytocin wird u. a. im CL von Wiederkäuern (Hazzard und Stormshak, 1997; Schams et al., 1988; Skarzynski und Okuda, 1999), Schwein (Wuttke et al., 1998) und Primaten (Maas et al., 1992; Khan-Dawood et al., 1996) produziert und in Pulsen, unabhängig von einem vorangehenden gonadotropen Stimulus, freigesetzt (Jarry et al., 1990). In der Luteinzellkultur beim Schwein hat Oxytocin ähnliche Effekte wie PGF<sub>2a</sub>, d. h., es hemmt die luteale Progesteronsynthese und stimuliert die Estradiol-17 $\beta$ -Produktion (Pitzel et al., 1988).

### 2.4.1.3 Prostaglandin F<sub>2a</sub> (PGF<sub>2a</sub>)

PGF<sub>2a</sub> wird bei Wiederkäuer, Primaten und Ratte im CL produziert (Olofsson und Leung, 1994; Dawood et al., 1997; Stocco und Deis, 1998; Gobbetti et al., 1999; Friden et al., 2000; Sakumoto et al., 2000).

Miyamoto et al. (1993) bestätigten, dass niedrige Konzentrationen von PGF<sub>2a</sub> die Progesteronsekretion im Mikrodialyse-System vom bovinen CL stimulieren. Stocco und Deis (1998) zeigten, dass PGF<sub>2a</sub> an der LH-induzierten Luteolyse im CL der Ratte beteiligt ist, während Gobbetti et al. (1999) beschrieben, dass PGF<sub>2a</sub> die Aktivität des Enzyms NOS (Nitric Oxide Synthase) steigert und somit die Progesteronproduktion bei scheinträchtigen Kaninchen unterdrückt. Diese Befunde unterstützen die auto-parakrine Rolle des PGF<sub>2a</sub> im CL.

### 2.4.1.4 Wachstumsfaktoren

IGF-I (insulin like growth factor I) fördert die Synthese von Progesteron in der Luteinzellkultur von Kaninchen und Menschen (Constantino et al., 1991; Devoto et al., 1995). In der Kultur von porcinen Granulosaluteinzellen steigert IGF-I die Progesteronsynthese, wahrscheinlich durch die Steigerung der P450<sub>scc</sub> mRNA, und mindert dadurch die Apoptoserate dieser Zellen (Guthrie et al., 1998), wie auch bei der Ratte beobachtet wurde (Peluso und Pappalardo, 1994). Außerdem steigert IGF-I die Estradiol-17 $\beta$ -Produktion der Luteinzellen, sowohl bei der Ratte als auch beim Menschen, und wirkt dadurch als parakriner und autokriner Wachstumsfaktor am Ovar (Parmer et al., 1991; Johnson et al., 1996).

bFGF (basic fibroblast growth factor), der von den Luteinzellen produziert wird, wirkt als autokrine Wachstumsfaktoren auf die Luteinzellen des Rindes, indem er die Proliferation der Luteinzellen und die Progesteronbiosynthese steigert (Miyamoto et al., 1992); er wirkt als parakriner Angiogenese stimulierender Wachstumsfaktor auf die Endothelzellen (Stirling et al., 1991). Bei der Ratte dienen Gefäßwachstumsfaktoren der Regulierung der Kapillarversorgung im CL; bFGF, TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor  $\beta$ 1) und Prostaglandin E<sub>2</sub> wirken als parakrine unspezifische permissive Effektoren auf die Angiogenese. Dagegen sind VEGF (vascular endothelial growth factor) und VPF (vascular permeability factor) die einzigen wirklich gefäßspezifischen Wachstumsfaktoren (Gaytán et al., 1999). Yan et al. (1993) identifizierten VEGF/VPF spezifische mRNA mittels Northern Blot in humanen Granulosaluteinzellen in Kultur. Die Expression dieses Wachstumsfaktors konnte durch hCG dosis- und zeitabhängig gesteigert werden. Ratten, die im Proöstrus mit Prolaktin behandelt wurden, zeigten eine erhöhte Anzahl von proliferativen Endothelzellen im Diöstrus (Gaytán et al., 1997). Blutgefäße spielen eine wichtige Rolle im parakrinen System des CL; Endothelzellen und Perizyten wirken mit Immun- und Parenchymzellen

zusammen, die Zytokine und Wachstumsfaktoren für die Regulierung der Luteogenese und Luteolyse sezernieren (Bukowsky et al., 1995).

Die Zellen des Germinativ- und Oberflächenepithels und Stromazellen im Ovar des Menschen, Kaninchens sowie von Hühnern und Affen exprimieren Progesteronrezeptoren (Korte und Isola, 1988; Press und Greene, 1988; Chandrasekher et al., 1991; Yoshimura und Bahr, 1991), was darauf hindeutet, dass die Funktion dieser Zellen parakrin von den Luteinzellen moduliert wird. Das ovarielle Stroma wirkt auch als Produktionsort verschiedener parakriner Wirkstoffe (Yoshimura, 1995). Die IGF-I mRNA wurde durch *in situ Hybridisierung* im ovariellen Stroma des Schafes während des ganzen Reproduktionszyklus nachgewiesen (Bennett et al., 1996). Auch der EGF und seine mRNA wurden während des ganzen Zyklus im Stroma des humanen Ovars nachgewiesen (Tamura et al., 1995).

Die Zellen des Immunsystems kommunizieren mit den Luteinzellen über spezifische von ihnen sezernierte Faktoren, den Prostaglandinen und Zytokinen. Beim Rind konnte nachgewiesen werden, dass Zytokine in der Lage sind, die FSH-stimulierte Steroidbiosynthese sowie die Proliferation und Differenzierung der Granulosazellen zu hemmen (Smith et al., 1994). Zudem unterdrückt Interferon-g die LH-stimulierte Progesteron Sekretion in bovinen Luteinzellen (Fairchild und Pate, 1991).

### 2.4.2 Spezielle Beobachtungen bei der Hündin

Bei der Hündin wird Progesteron sowohl im Diöstrus als auch während der Trächtigkeit praktisch ausschließlich in den Corpora lutea gebildet. Die Progesteron Sekretion im CL ist bei der Hündin ab dem 25-35 Tag nach der Ovulation von LH (Concannon et al., 1989; Riesenbeck, 1997) und Prolaktin (Onclin und Versteegen, 1997b) abhängig.

Auch Estadiol-17 $\beta$  wird in den Luteinzellen der Hündin synthetisiert, die funktionelle Bedeutung ist jedoch unklar (Nishiyama et al., 1999).

Inwieweit weitere hormonelle Wirkstoffe im CL der Hündin gebildet werden, ist derzeit nicht bekannt. Sicher ist, dass kein uterus Luteolysin (PGF<sub>2a</sub>) an der lutealen Regression bei der nicht graviden Hündin beteiligt ist (Hoffmann et al., 1992). Hoffmann et al. (1996) schließen daher auf lokale, autokrine und parakrine Mechanismen.

Bei der Hündin wurde die Expression (mRNA) verschiedener Zytokine während des Diöstrus nachgewiesen (Engel et al., 2001). IL-8, IL-10, IL-12 und TGF $\beta$ 1 zeigen eine konstant hohe Expression, IFN $\gamma$  zeigt eine besonders starke Expression an den Tagen 35 und 45 des Diöstrus, TNFa war am Tag 5 und ab Tag 35 des Diöstrus erhöht. Diese Ergebnisse lassen auf eine Beteiligung dieser Zytokine an der Regulation der Lutealfunktion auch bei der Hündin schließen.

## 2.5 Steroidhormonrezeptoren

Steroidhormone regulieren Wachstum, Differenzierung und Funktion zahlreicher Gewebe innerhalb und außerhalb des Reproduktionstraktes. Ihre biologische Wirkung wird eingeleitet durch eine Bindung an spezifische, intrazelluläre Rezeptoren, welche ausschließlich in bestimmten Zielzellen synthetisiert werden, da ansonsten keine gezielte Wirkung eintreten könnte (Meyer, 1994). Dieses Kapitel behandelt zwei Steroidhormonrezeptoren, den Östrogen (ER)- und den Progesteronrezeptor (PR).

### 2.5.1 Östrogenrezeptoren (ER)

Östrogenrezeptoren ordnet man der Familie intrazellulärer Rezeptoren für hydrophobe Ringmoleküle zu. Die Rezeptormoleküle dieser Familie zeichnen sich durch eine einheitliche Struktur und Funktionsorganisation aus. Unterschiede bestehen bei den Rezeptoren in den 6 verschiedenen Molekülbereichen (Domänen), die mit A bis F bezeichnet werden (s. Abb 3).



DNA-Bindung    Hormon-Bindung  
Dimerisierung    Dimerisierung  
Zellkern-  
Erkennungssignal

TAF 1 <sup>1)</sup>

TAF 2 <sup>1)</sup>

Abb. 3: Struktur des humanen Östrogenrezeptors; Bindungsdomänen und deren Funktionen (nach Hoffmann und Schuler, 2000)

<sup>1)</sup> Transkriptionsaktivierende Funktionen

Die DNA-bindende Domäne C ist am stärksten konserviert; bei dieser Domäne formen Aminosäurenreste zwei hervorstehende Strukturen, sogenannte Zinkfinger, die von zwei separaten Exons kodiert werden. Die Anheftung des Liganden erfolgt in der Hormonbindungsdomäne E, die

ebenfalls hochkonserviert ist. Man vermutet, dass die Dimerisierung der Rezeptoren nach Ligandbindung über Wechselwirkungen zwischen den Hormonbindungsdomänen abläuft. Der C-Terminus weist eine Ligand-abhängige Transkriptionsaktivierende Funktion 2 (TAF2) auf; d. h. deren Aktivität wird durch Bindung des Steroidhormons beeinflusst. Innerhalb der Rezeptorfamilie sind die Längen und Aminosäuresequenzen der Domäne A/B des N-terminalen Endes sehr variabel. Die genauen Funktionen dieser Regionen sind bis jetzt noch nicht endgültig geklärt. Eine Transkriptionsaktivierende Funktion 1 (TAF1), die Ligand-unabhängig agiert, ist jedoch in dieser Region identifiziert worden (Kumar et al., 1987; Evans, 1988; Beato, 1989; O'Malley, 1990; Landers und Spelsberg, 1992).

Steroidhormone binden in der Zielzelle, deren Membran sie auf Grund ihres lipophilen Charakters diffundieren können, an einen für sie spezifischen Rezeptor (Aporezeptor). Durch die Bindung des Hormons werden aufgrund von Konformationsänderungen des Rezeptors Hormon-Rezeptor-Dimere (Holorezeptor) gebildet. Die Konformationsänderung des Aporezeptors bedingt auch Veränderungen an der DNA-Bindungsdomäne. Dadurch ist es dem Holorezeptor möglich, mittels der Zinkfinger-Strukturen an spezifische DNA-Erkennungs-sequenzen (Hormon-responsive Elemente) in der Nähe hormonabhängiger Gene zu binden und die Transkriptionsaktivität zu modulieren. So kann durch Aktivierung von Rezeptoren eine Änderung des Genexpressionsmusters ausgelöst werden.

Lange glaubte man, dass Estradiol-17 $\beta$  über einen einzigen Rezeptor, den sogenannten ER $\alpha$ , wirkt. Die Entdeckung eines Estrogen Rezeptors  $\beta$  (ER $\beta$ ) von Kuiper et al. (1996) bzw. Mosselman et al. (1996) war daher eine wesentliche Erweiterung des damaligen Kenntnisstandes. Der auch als „klassischer“ Estradiolrezeptor bezeichnete ER $\alpha$  wurde 1962 von Jensen und Jacobsen als ein intrazelluläres uterines Protein identifiziert, welches in der Lage ist, Estradiol-17 $\beta$  mit hoher Affinität und Spezifität zu binden. Beide Rezeptortypen vermögen Estradiol-17 $\beta$  mit einer ähnlich hohen Affinität zu binden, jedoch wird die halbmaximale Aktivierung des ER $\alpha$  bei niedrigeren Estradiol-17 $\beta$ -Konzentrationen erreicht als die des ER $\beta$  (Mosselmann et al., 1996; Couse et al., 1997; Pace et al., 1997).

Die beiden Subtypen des ER werden von zwei unabhängigen Genen exprimiert. Das ER $\alpha$ -Gen ist beim Menschen mit ca. 140 kb deutlich größer als das ER $\beta$ -Gen mit ca. 40 kb. Der ER $\alpha$  wird von 596 Aminosäuren gebildet und weist ein Molekulargewicht von 67 kDa auf, der ER $\beta$  besteht aus 530 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 57 kDa (Enmark et al., 1997).

Einen Vergleich der Aminosäuresequenzen von ER $\alpha$  und ER $\beta$  verschiedener Spezies gibt Wirth (2001). Eine Sequenzierung der beiden Subtypen beim Hund wurde bis jetzt noch nicht beschrieben.

Die Hormon-bindende Domäne der ER<sub>a</sub> und ER<sub>b</sub> zeigen verschiedene Bindungsaffinitäten gegenüber verschiedenen Liganden. So ist z. B. die durch Estradiol-17 $\beta$  induzierte Transkriptionsaktivierung via ER<sub>a</sub> deutlich höher als via ER<sub>b</sub>. Auch die aminoternale Region der beiden Rezeptoren ist unterschiedlich (nur 21% Homologie). Dadurch ergaben sich verschiedene transkriptionale Aktivitäten in Abhängigkeit vom Liganden (Katzenellenbogen, 2000).

### 2.5.2 Progesteronrezeptoren (PR)

Der Progesteronrezeptor ähnelt in seinem Aufbau dem ER. Das PR-Gen erstreckt sich über 90000 Basenpaare und beinhaltet acht Exons. Das erste Exon kodiert den N-terminalen Teil des Rezeptors, der die Ligand-unabhängige TAF1 enthält. Die DNA-Bindungsdomäne wird von zwei Exons kodiert, wobei jedem Exon ein Zinkfinger zugeordnet werden kann. Die Steroidhormon-Bindungsdomäne, welche die TAF2 sowie die dimerisierende Funktion enthält, wird von fünf Exons kodiert (Gronemeyer, 1992; Landers und Spelsberg, 1992; Misrahi et al., 1993). Innerhalb der C-terminalen Domäne findet sich nach Xu et al. (1996) zusätzlich eine Repressor-Funktion, welche für die Unterschiede bezüglich der PR-abhängigen Transkription in Abhängigkeit von der Bindung des PR mit dem spezifischen Liganden Progesteron bzw. mit einem Antigestagen verantwortlich ist. Die verschiedenen PR-mRNAs stammen vermutlich von einem einzigen PR-Gen, das unterschiedliche Translations-Startkodons nutzt und auf diese Weise die verschiedenen PR-Isoformen entstehen lässt (s.u.) (Vegeto et al., 1993; Ogle et al., 1997).

Die DNA-Bindungsdomäne ist auch beim Progesteronrezeptor hoch konserviert. Sie ist identisch im PR von Maus, Mensch und Kaninchen. Zwischen diesen Spezies und dem Huhn besteht eine Homologie von 99%. Für die Steroid-Bindungsdomäne beträgt die Homologie zwischen Maus-, Mensch- und Kaninchen-PR 96%. Mit dem Huhn-PR besteht eine 86%ige Homologie. Der PR von Mensch und Kaninchen unterscheidet sich in der Steroid-Bindungsdomäne des C-terminalen Endes lediglich in einer einzigen ausgetauschten Aminosäure (Conneely et al., 1986; Loosfelt et al., 1986; Schott et al., 1991; Misrahi et al., 1993). Beim Hund wurde die Sequenzierung von Latinga-van Leeuwen et al. (2000) beschrieben. Im Vergleich zum humanen PR zeigt der canine PR am C-terminalen Ende nur eine ausgetauschte Aminosäure; die Homologie in Bezug auf das ganze Molekül betrifft etwa 95%.

Beim Menschen und anderen Spezies existieren zwei isomere Formen des PR, welche als PR-A und PR-B bezeichnet werden. PR-B ist ein lineares Molekül, das beim Menschen aus 933 Aminosäuren besteht mit einem Molekulargewicht von ca. 114 kDa.

Das kleinere Isomer PR-A mit 94 kDa unterscheidet sich von PR-B durch das Fehlen der ersten 164 Aminosäuren am N-terminalen Ende des Moleküls (Mohamed et al., 1994; Giangrande

et al., 1997). Dieses fehlende Segment ist zumindest teilweise für die funktionellen Unterschiede beider Isomere verantwortlich. So enthält die N-terminale Verlängerung des humanen PR-B eine dritte Transkriptions-aktivierende Funktion (Sartorius et al., 1994). Nach Mohamed et al. (1994) kommen in humanen Zielgeweben beide Isoformen gleichzeitig vor, was die Bildung von Homo- und Heterodimeren ermöglicht: A/A, A/B und B/B.

Beide PR-Isoformen können sich in Abhängigkeit von der Spezies und vom Zelltyp in ihren biologischen Aktivitäten deutlich unterscheiden. So funktioniert der humane PR-A in den meisten Zelllinien als ein unabhängiger Transkriptions-Repressor der DNA-Bindung, wobei sich die inhibierende Wirkung auf alle Steroidhormonrezeptoren erstreckt (Vegeto et al., 1993; Wen et al., 1994; Giangrande et al., 1997). Beim Huhn dagegen findet man für PR-A eine aktivierende Funktion auf die Transkription. Der humane PR-B fungiert als Transkriptions-Aktivator der Progesteron-responsiven Gene.

Schließlich konnte von Wei et al. (1996 und 1997) noch eine dritte Variante des Progesteronrezeptors mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa nachgewiesen werden. Diese als PR-C bezeichnete Isoform ist am N-terminalen Ende des Rezeptormoleküls weiter verkürzt, so dass die erste Zinkfinger-Struktur der DNA-Bindungsdomäne fehlt. Die Hormon-Bindungsdomäne sowie die für die Dimerisierung und die nukleäre Lokalisation verantwortlichen Bereiche sind jedoch vollständig vorhanden.

Der PR-C ist zur Bildung von Heterodimeren mit dem PR-B befähigt und kann die Transkriptionsaktivität der beiden längeren PR-Isoformen verstärken. Die genauen Funktionen der verschiedenen PR-Isoformen sind bisher noch nicht vollständig aufgeklärt.

### **2.5.3 Intrazelluläre Lokalisation**

Lange Zeit nahm man an, dass die unbesetzten Rezeptoren im Zytosol der Zelle lokalisiert sind. Heute jedoch geht man vor allem aufgrund immunhistochemischer Untersuchungen von einer vorwiegend nuklearen Lokalisation freier und besetzter Estradiol- bzw. Progesteron-Rezeptoren aus (Greene et al., 1984; King und Greene, 1984; Perrot-Appianat et al., 1986; Press und Greene, 1988; Brenner et al., 1990; O'Malley, 1990; Renoir et al., 1990; Landers und Spelsberg, 1992).

Die nukleäre Lokalisation der PR und ER reflektiert eine dynamische Situation: PR und ER werden im Zytoplasma gebildet, kontinuierlich und aktiv über einen Transportmechanismus in den Kern transferiert. Diffusion und/oder Interaktion mit spezifischen Membranproteinen ermöglichen den Rücktransport des Rezeptors in das Zytoplasma (Guiochon-Mantel et al., 1991).

### 2.5.4 Regulation der Expression des ER und PR

Die Regulation der Expression von ER und PR ist komplex. Estradiol kann sowohl die Synthese seiner eigenen Rezeptoren (Leavitt und Takeda, 1986; Bergman et al., 1992; Wu et al., 1996; Ing und Tornesi, 1997; Xiao und Goff, 1999) als auch diejenige der Progesteronrezeptoren (Katzenellenbogen und Norman, 1990; Aronica und Katzenellenbogen, 1991; Kraus und Katzenellenbogen, 1993; Song und Fraser, 1995; Ing und Tornesi, 1997; Xiao und Goff, 1999) positiv beeinflussen (Aufregulation). Die Anwesenheit hoher Estradiol- bzw. Progesteron-Konzentrationen reduziert bzw. unterdrückt dagegen die Expression der ER und PR (Hsueh et al., 1975 und 1976; Evans und Leavitt, 1980; Horwitz und McGuire, 1980; Leavitt und Takeda, 1986; Kraus und Katzenellenbogen, 1993; Parandoosh et al., 1995). Darüber hinausgehend wurde allerdings auch gezeigt, dass im Deviduagewebe der Ratte Progesteron auch die Expression seines eigenen Rezeptors stimuliert (Ogle et al. 1990, 1998). Diese positiv regulierende Wirkung konnte auch beim Menschen in kultivierten Stromazellen des Endometriums nach länger dauernder Exposition mit dem Liganden beobachtet werden (Tseng und Zhu, 1997). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Rezeptorregulation auch in Abhängigkeit von Zelltyp und der Zellfunktion stattfindet ist (Ogle und George, 1995).

Das PR-Gen wird ER-abhängig reguliert. Von Kraus et al. (1994) wurden mehrere verschiedene Östrogen-responsive Regionen im PR-Gen der Ratte lokalisiert. Andererseits können Ligand-bindende PR-A und PR-B die Estradiol-stimulierte ER-Aktivität hemmen, wobei die Höhe der Repression von der PR-Isoform, dem Promoter, dem Gestagen und dem Zelltyp abhängig ist. Diese Befunde unterstreichen die immer zahlreicheren Hinweise für die Wichtigkeit der Interaktionen zwischen Mitgliedern der Steroidhormon-Rezeptor Familie.

### 2.5.5 Weitere Faktoren der Regulation der Expression von PR und ER

Auch Wachstumsfaktoren sind in der Lage, die Expression von ER und PR zu beeinflussen. In Kulturen mit Zelllinien humaner Mammacarcinome konnte gezeigt werden, dass die Transkription des ER- $\alpha$  Genes um 70% nach der Behandlung mit EGF (Epidermal Growth Factor) abnahm. In höheren Konzentrationen induziert EGF die Expression des PR. Diese Effekte scheinen über die EGF Rezeptoren und Protein Kinase B (einen „Second Messenger“) vermittelt zu werden (Stoica et al., 2000b).

Ankrapp et al. (1998) zeigten, dass die durch EGF induzierte Expression von PR bei pubertären und erwachsenen Mäuse an einen ER-abhängigen Mechanismus gekoppelt ist.

IGF-1 unterdrückt in Kulturen mit Zelllinien humaner Mammacarcinome die Expression der ER- $\alpha$  mRNA durch eine Inhibition der Transkription. In den gleichen Zellen



induziert dagegen die Behandlung mit IGF-1 die Expression der durch Estradiol-17 $\beta$  regulierten PR (Stoica et al., 2000a).

### **2.5.6 Speziesunterschiede in der Expression von ER und PR im Corpus luteum**

Bei vielen Säugetierspezies wie Ratte (Telleria et al., 1998; Tetsuka et al., 1998; Mowa und Iwanaga, 2000), Kaninchen (Holt et al., 1983; Miller und Toft, 1983), Schaf (Zieba et al., 2000), Rind (Walther et al., 1999) und einigen Primaten, einschließlich des Menschen, (Revelli et al., 1996; Misao et al., 1999; Duffy et al., 2000), konnte die Expression von ER-mRNA und dem ER im Corpus luteum nachgewiesen werden. Dabei wurde beim Schaf bis jetzt nur der ER $\alpha$  (Zieba et al., 2000), beim Rind nur der ER- $\beta$  nachgewiesen (Walther et al., 1999); bei allen anderen oben genannten Spezies wurde dagegen unter Zuhilfenahme verschiedener Nachweismethoden sowohl ER $\alpha$  wie auch ER $\beta$  dargestellt (Holt et al., 1983; Telleria et al., 1998; Misao et al., 1999; Duffy et al., 2000). Durch immunhistochemische Untersuchungen an der Ratte und beim Schaf konnte gezeigt werden, dass die ER sowohl in den Luteinzellen wie auch in den Endothel- und Bindegewebszellen exprimiert werden (Mowa und Iwanaga, 2000; Zieba et al., 2000).

Das luteale Gewebe von Primaten einschließlich des Menschen (Duffy und Stouffer, 1995; Duffy et al., 1997; Hild-Petito und Fazleabas, 1997; Misao et al., 1998a; Misao et al., 1998b; Ottander et al., 2000), vom Rind (Rueda et al., 2000) und Schwein (Slomczynska et al., 2000) wurde auf die Expression von PR untersucht und die mRNA wie auch das Protein nachgewiesen. Untersuchungen beim Menschen haben die PR in den steroidproduzierenden Zellen des CL nachgewiesen (Ottander et al., 2000).

Bei der Ratte konnten bis jetzt keine PR im CL nachgewiesen werden (Park-Sarge et al., 1995; Telleria et al., 1999), Sugino et al. (1997) zeigten jedoch, dass auto- und parakrine Wirkungen von Progesteron über die Aktivierung des Glucocorticoidrezeptors ablaufen.

### **2.5.7 Expression von ER und PR im CL in Abhängigkeit vom Zyklusstadium**

ER und PR werden in Abhängigkeit von der Isoform speziesspezifisch und im Verlauf des Zyklus unterschiedlich exprimiert.

Die PR-A und PR-B Isoformen sind in allen Zyklusstadien im Lutealgewebe beim Primaten nachzuweisen: so zeigten densitometrische Analysen von Western blot Ergebnissen, dass der luteale PR-B Gehalt zu allen untersuchten Zyklusstadien gleich ist. Zu jedem Untersuchungszeitpunkt war die PR-A Expression niedriger als die von PR-B und nahm im Verlauf der Lutealphase ab. Der Gesamt-PR-Gehalt tendierte jedoch zu einem Abstieg über den Verlauf der Lutealphasen mit dem

höchsten mittleren PR-Gehalt in der frühen Lutealphase (Duffy et al., 1997; Hild-Petito und Fazleabas, 1997; Misao et al., 1998b; Ottander et al., 2000).

Beim Menschen ist der Gehalt an ERa und ERb mRNA im CL während der späten sekretorischen Phase des Endometriums, also bei hohen Progesteronkonzentrationen im Plasma, signifikant niedriger als während der frühen und mittleren Phasen (Misao et al., 1998a). Das Verhältnis ERa zu ERb zeigt keine Veränderung während des Verlaufes der sekretorischen Phase des Endometriums (Misao et al., 1999).

Untersuchungen zum Vorkommen von PR im CL vom Hund liegen nicht vor. De Cock et al. (1997) konnten allerdings zeigen, dass im oberflächlichen Epithel und im sogenannten subepithelialen „Ingrowth“ zyklusabhängig signifikante Unterschiede in der Expression von ER zu finden sind. Die stärkste Expression findet sich im oberflächlichen Epithel des Ovars in der frühen proliferativen und späten sekretorischen Phase des Endometriums, wogegen während der späten proliferativen und frühen sekretorischen Phase die Anzahl ER-exprimierender Zellen im Epithel herabgesetzt ist. Das subepitheliale „Ingrowth“ ist während des Zyklus nicht oder nur schwach ausgeprägt. Tragende Hündinnen haben geringere Mengen an ER im oberflächlichen Epithel und im subepithelialen „Ingrowth“. In anderen Kompartimenten des Ovars, einschließlich der Corpora lutea, konnten von De Cock et al. (1997) keine ER nachgewiesen werden.

### **2.6 Nicht Rezeptor-vermittelte zelluläre Steroidwirkungen**

Steroide und ihre Metaboliten haben in zahlreichen Geweben unterschiedliche Effekte, so z. B. im Gehirn, Uterus, glatter Muskulatur, Spermien und Oozyte. Zu dieser Wirkung zählen Änderungen in der elektrophysiologischen Reizübertragung, Einleitung der Anästhesie, Steuerung der Gonadotropinsekretion, Steuerung der Estradiolrezeptor-Expression, Modulation der uterinen Kontraktilität, Auslösung der Akrosomenreaktion und Oozytenreifung. Die Latenz dieser Effekten variiert zwischen Sekunden und mehreren Stunden, ein Hinweis auf die Beteiligung verschiedener Mechanismen (Mahesh et al., 1996).

In der Literatur gibt es zahlreiche Hinweise (Koch et al., 1977; Pietras und Szego, 1980; Towle und Sze, 1983; Blondeau und Baulieu, 1984; Bression et al., 1986; Tesarik et al., 1992), dass Steroide an Rezeptoren in der Plasmamembran unterschiedlicher Gewebe binden und dass diese Interaktion eine Rolle bei den schnellen nicht-genomischen Wirkungen der Steroide spielt. Ursächlich werden hierfür „Fluiditätsänderungen“ der Plasmamembran verantwortlich gemacht, die sich z. B. in einer erhöhten Permeabilität für Ionen (z. B. Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>) zeigen.

## Literaturübersicht

---

Entsprechende membrangebundenen „Progesteronrezeptoren“ wurden in Granulosa- und Thecazellen von Follikeln verschiedener Entwicklungsstadien von Rae et al. (1998) beim Rind beschrieben.

Progesteron bindet auch an der humanen Spermienmembran und induziert einen Kalzium Influx und damit die Akrosomreaktion (Blackmore und Lattanzio, 1991; Tesarik et al., 1992; Mendoza und Tesarik, 1993). Auch Bindungsstellen für Estradiol wurden an der humanen Spermienmembran lokalisiert, aber über die physiologische Bedeutung dieser Bindungsstellen ist noch nichts bekannt (Hyne und Boettcher, 1977; Cheng et al., 1981).

Die Bindung von Progesteron und anderen Steroiden an die Plasmamembran führt zur Aktivierung von „Second Messenger“ Systemen, noch bevor der intranukleäre Rezeptor aktiviert wird (Mahesh et al., 1996).

Die Phosphorylierung ist dabei ein wichtiger Schritt in der Genaktivierung, und Progesteron kann z. B. den Lordosis Reflex durch Hemmung der Phosphodiesterase induzieren (Beyer et al., 1981).

Auch Metaboliten von Progesteron können noch in vegetativen Prozessen beteiligt sein. So haben Majewska et al. (1986) gezeigt, dass die LH Sekretion von 3 $\alpha$ -Hydroxy-5 $\alpha$ -Pregnan-20-one über GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren positiv moduliert wird.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Versuchsaufbau

Bei 20 Hündinnen unterschiedlicher Rassen wurden zu definierten Zeitpunkten nach der Ovulation (Tag 5, 15, 25, 35 und 45) die Ovarien mittels Ovariohysterektomie (OHE) entnommen, die Corpora lutea separiert und anschließend in Paraffin eingebettet.

Die Darstellung der Progesteron- und Estradiol-17 $\beta$ -Rezeptoren erfolgte über etablierte immunhistochemische Verfahren (Hoffmann und Büttner, 1998; Schuler et al., 1999).

### 3.2 Tiermaterial

Verwendet wurden 20 geschlechtsgesunde Hündinnen verschiedener Rassen, bei denen eine Ovariohysterektomie durchgeführt werden sollte. Die Tiere befanden sich während der Beobachtungsperiode z. T. bei ihren Besitzern, teilweise waren die Tiere (so alle 8 Beagle-Hündinnen) der Klinik überstellt worden. Die Zuordnung der einzelnen Tiere zu den Zeitpunkten der Ovariohysterektomie ergibt sich wie folgt.

- Tag 5 nach der Ovulation: Marla (Deutscher Schäferhund (DSH); 3 Jahre), Asta (DSH; 7 Jahre), Pila (DSH-Mischling; 1,5 Jahre) und Zora (DSH-Mischling; 4 Jahre).

- Tag 15 nach der Ovulation: Kim (Beagle; 4 Jahre), PatII (Beagle; 6 Jahre), Fee (Stafford-Mischling ; 2,5 Jahre) und Rejka (Schäferhund-Husky-Mischling ; 2,5 Jahre).

- Tag 25 nach der Ovulation: Daisy (Cocker Spaniel-Mischling; 2,5 Jahre), Luca (Riesenschnauzer-Mischling; 20 Monate), Rieke (Pudel-Schnauzer-Mischling; 3 Jahre) und Flo (Beagle; 4 Jahre).

- Tag 35 nach der Ovulation: Fox (Beagle; 3,5 Jahre), Maja (Beagle; 3,5 Jahre), Oda (Beagle; 3,5 Jahre) und Timba (Bobtail-Schäferhund-Mischling; 11 Monate).

- Tag 45 nach der Ovulation: Gil (DSH-Mischling; 12 Monate), Sinah (Golden Retriever; 3 Jahre), Luna (Beagle; 3,5 Jahre) und Pat (Beagle; 2,5 Jahre).

### 3.3 Definition des Ovulationszeitpunktes

Der Tag der Ovulation wurde als der erste Tag definiert, an dem die Konzentration von Progesteron im Plasma gleich oder größer als 5 ng/ml (15,9 nmol/l) war (Concannon et al., 1989).

Mit Beginn der Läufigkeit wurde alle zwei Tage bei den Hündinnen in Privathaltung und täglich bei den der Klinik überstellten Beaglehündinnen Blut entnommen. Die Uhrzeit der

Probegewinnung wurde nach Absprache mit dem Besitzer gewählt, bei den Beaglehündinnen erfolgte die Probennahme zwischen 8<sup>00</sup> und 10<sup>00</sup> Uhr.

Das Blut wurde nach Punktion der V. saphena oder der V. cephalica antibrachii mit sterilen Kanülen (Sterican 0,9 x 40 mm) gewonnen, in mit NH<sub>4</sub>-Heparin-präparierten Probenröhrchen (Fa. Sarstedt) aufgefangen und bis zur Zentrifugation (10 min bei 1500g) im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Das Plasma wurde mittels Pasteurpipetten dekantiert und bis zur weiteren Untersuchung in Polypropylenröhrchen (Fa. Sarstedt) bei -20°C gelagert.

Die Konzentration von Progesteron im Plasma wurde mittels RIA oder eines automatischen Chemilumineszenz Immunoassay-Systems (ACS) (siehe Abschnitte 3.4.1. und 3.4.2.) bestimmt.

### **3.4 Bestimmung von Progesteron im Blutplasma**

Die Bestimmung erfolgte nach dem bei Hoffmann et al. (1973) beschriebenen und im Labor etablierten Radioimmunoassay (RIA) für die Proben, die bis zum Januar 1999 gewonnen wurden. Ab diesem Zeitpunkt wurde Progesteron mittels ACS bestimmt.

#### **3.4.1 Bestimmung mittels RIA**

##### **3.4.1.1 Extraktion**

Alle Proben wurden im Doppelansatz bestimmt. Je nach Zyklusstand der Hündin wurden 0,025 ml (Ende Östrus bis Anfang Diöstrus), 0,05 ml (Mitte Diöstrus bis später Diöstrus) oder 0,1 ml (Proöstrus bis Mitte Östrus) Plasma der zu messenden Proben zur Probenaufbereitung in ein 16 ml Extraktionsröhrchen pipettiert und 2 mal jeweils über 15 min mit 2 ml Hexan im Rotationsmischer extrahiert. Nach jeder Extraktion wurden die Röhrchen zur Phasentrennung 1 min bei 2000g zentrifugiert, die wässrige Phase im Trockeneis-Alkoholbad über 30 sec bei -50 bis -60 °C gefroren und anschließend der Überstand in Einweg-Reaktionsgefäße dekantiert. Das Lösungsmittel wurde im Vortex-Evaporator abgedampft (bei 55°C ca. 25 min) und die Proben anschließend in 0,1 ml BSA-Phosphatpuffer rückgelöst.

##### **3.4.1.2 Durchführung des RIA**

Die Durchführung erfolgte unter Ansatz der üblichen Referenzwerte: Gesamtaktivität (TOT) und nichtspezifische Bindung (NSB).

Die Eichkurve, angesetzt in BSA-Phosphatpuffer, deckte den Bereich von 0,025-1,5 ng pro Ansatz (0,1ml) ab. Als Tracer wurde 44,8 pg <sup>3</sup>H-Progesteron = 24000 dpm, aufgenommen in 0,1 ml

BSA-Phosphatpuffer, zugegeben. Nach Hinzufügen der Antiserumverdünnung (0,4 ml) wurden die Proben „en bloc“ am Vortex-Apparat geschüttelt, dann zunächst im Wärmeschüttelbad über 20 min bei 37°C und anschließend für mindestens 1 Stunde im Eiswasserbad bei 4°C inkubiert. Die Trennung von freiem und gebundem Progesteron erfolgte durch Adsorption an Holzkohle. Dazu wurde den Proben 0,2 ml eisgekühlte 0,5% -ige Holzkohlensuspension (2,5 g Holzkohle und 0,25 g Dextran in 500 ml Aqua dest.) zugegeben, danach wurden sie über 10 min bei 4°C stehen gelassen und anschließend über 15 min bei 2220g und 4°C zentrifugiert. Zur Messung der antikörpergebundenen Radioaktivität im Flüssigkeits-Scintillationszähler wurden 0,6 ml des Überstandes mit einem Diluter-Dispenser dekantiert und unter Nachspülen mit 3 ml Scintillationsflüssigkeit in Scintillationsküvetten überführt. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte im On-line Verfahren mit dem von der Fa. Beckman bereitgestellten Programm (Linearisierung nach Logit/Log-Transformation).

### **3.4.1.3 Zuverlässigkeit:**

Der Intraassayvariationskoeffizient lag zwischen 8,8% und 9,6% (n=15). Der Interassayvariationskoeffizient lag zwischen 8,9% und 11,3% (n=10). Die untere Nachweisgrenze ergab sich mit ca. 0,1 ng/ml (0,318 nmol/l).

### **3.4.2 Messung von Progesteron mittels automatischer Chemilumineszens**

Das Prinzip der Chemilumineszenz basiert auf Lichtabstrahlung organischer Moleküle. Die Mehrheit der für die Chemilumineszenz eingesetzten Substanzen geben Licht durch eine oxidative Reaktion unter dem nicht immer notwendigen Einfluss eines Katalysators ab.

Diese Reaktion hat sich als signalgebende Komponente bei Immunoassays bewährt und von verschiedenen Firmen werden entsprechende für den Einsatz in der Humanmedizin konzipierte semi- oder vollautomatische Messplätze angeboten. Ein solches Gerät war das für die vorliegenden Untersuchungen zur Verfügung stehende ACS:180 der Fa. Bayer Diagnostics, 35403 Fernwald.

Bei dem für den Einsatz auf dem vollautomatischen Immunoassay-Analysegerät ACS:180 konzipierten Test handelt es sich um einen heterologen, immunometrischen Test. Unmarkiertes Progesteron bindet an einen mit Akridiumester markierten monoklonalen und im Überschuss zugegebenen Maus-Antiprogesteron-Antikörper (MAK). In einem nachfolgenden Schritt binden die nicht Progesteron-besetzten Antikörper an ein an Paramagnetische Partikel (PMP) kovalent gebundenes Progesteron-Derivat. Die Trennung des Progesteron-MAK-Komplexes von den PMP-MAK-Komplex erfolgt magnetisch, gemessen wird die sich aus dem PMP-MAK-Komplex ergebende Licht(Lumineszens)-reaktion (Bayer Diagnostics Kundeninformation).

### 3.4.2.1 Testdurchführung

Das System führt automatisch die folgenden Schritte durch: Spülung der Probennadel mit 225 ml Waschreagenz; Dispensierung von 10 ml Probe und 90 ml sogenanntem Releasing Agens in eine Küvette; Dispensierung von 100 ml Lite-Reagenz und Inkubation für 2,5 min bei 37°C; Dispensierung von 200 ml Solid-Phase und Inkubation für 2,5 min bei 37°C; Reinigung der Küvetten mit deionisiertem Wasser; Dispensierung von jeweils 300 ml der Reagenzien 1 und 2, um die Chemilumineszenz-Reaktion auszulösen; Messung des emittierten Lichtes und Berechnung der Ergebnisse nach einer einprogrammierten Standardkurve (kleinster gemessener Wert der Progesteron Konzentration = 0,01 ng/ml; Maximalwert der Progesteron Konzentration = 43.41 ng/ml). Das Ergebnis wird in ng/ml oder nmol/l angegeben, je nachdem welche Einheiten in den Testdefinitionen angewählt wurden.

Zu Beginn jeder Messreihe ist eine Kalibration des Gerätes mit einem vorgegebenen niedrigen und hohen Kalibrator (Probe mit definiertem Progesterongehalt) erforderlich.

### 3.4.2.2 Spezifität

Der ACS:180 Progesteron Test ist hochspezifisch. Die Kreuzreaktivität mit anderen Steroidhormonen wurde ermittelt, sie lagen bei 0,08% für 11-Deoxycorticosteron, 0,95% für Corticosteron, 0,46% für Pregnenolon und 0,31% für 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron. Andere Steroidhormone zeigten keine Kreuzreaktivität.

### 3.4.2.3 Messbereich

Der obere Messbereich des Systems lag bei ca. 43,41 ng/ml (138,0 nmol/l), die untere Nachweisgrenze bei 0,11 ng/ml. Die Wiederfindung nach Verdünnung lag im Bereich von 96%.

### 3.4.3 Vergleich der Methoden

Die Vergleichbarkeit zwischen der Bestimmung von Progesteron im Plasma mittels ACS:180 und etabliertem RIA wurde anhand von 21 Hundeproben in dem Konzentrationsbereich von 0,11 und 50,5 ng/ml ermittelt. Der Korrelationskoeffizient (r) betrug 0,928. Die Korrelation war hoch signifikant mit  $p < 0,001$ .

## 3.5 Bestimmung von Estradiol im Blutplasma

Die Bestimmung erfolgte in Anlehnung an den von Hoffmann et al. (1992) beschriebenen Sequenztest.

### 3.5.1 Testdurchführung

#### 3.5.1.1 Extraktion

Das Verfahren entspricht der in Kapitel 3.4.1. beschriebenen Extraktion von Progesteron. Allerdings wurden 0,25 ml (unabhängig vom Zyklusstadium) der zu messenden Proben 2 x mit 2,5 ml Toluol über 15 min im Rotationsmischer extrahiert.

#### 3.5.1.2 Durchführung des RIA

Zur Definition der nichtspezifischen Bindung (NSB) wurde dem 0-Wert der Standardkurve ein 312-facher Überschuss von Estradiol-17 $\beta$  (10ng) zugesetzt.

Die Eichkurve, angesetzt in BSA-Phosphatpuffer, deckte den Bereich von 0,5-32 pg pro Ansatz (0,1 ml) ab. Nach Zugabe der Antiserumverdünnung (0,4 ml) erfolgte die erste Inkubation über Nacht bei 4°C. Zur Fortführung des Tests wurden 32 pg <sup>3</sup>H-markiertes Estradiol-17 $\beta$  (0,1ml) = 24000 dpm in BSA-7Phosphatpuffer zugegeben und die Proben über weitere 45 min bei 4°C inkubiert.

Die Trennung von freiem und gebundenem Hormon und die weitere Vorgehensweise entsprachen den Verfahren von Progesteron.

#### 3.5.1.3 Zuverlässigkeit

Der Intraassayvariationskoeffizient lag zwischen 6,0% und 11,4% (n=24), der Interassayvariationskoeffizient zwischen 13,1% und 13,2% (n=17). Die untere Nachweisgrenze lag bei 0,4 pg/ml (1,47 pmol/l).

### 3.6 Ovariohysterektomie

Für die Gewinnung der Corpora lutea wurden Ovariohysterektomien (OHE) durchgeführt. Alle OHE fanden zwischen 8<sup>00</sup> und 12<sup>00</sup> statt, nachdem die Patienten einer Untersuchung auf Narkosefähigkeit unterzogen worden waren. Kurz vor dem Beginn der Operation wurde ein venöser Zugang an der V. cephalica oder V. saphena gelegt und Blutproben für die Hormonenbestimmung sowie die klinische chemische Untersuchung entnommen. Die Einleitung der Narkose erfolgte über den venösen Zugang mit L-Methadon (L-Polamivetâ , 0,75 mg/kg KGW) und Azepromazin (Vetranquilâ 1%, 0,0375 mg/kg KGW).

Das ventrale Abdomen vom Rippenbogen bis zum Becken wurde geschoren und mittels Alkohol 70% und Skinseptâ G Lösung desinfiziert. Nach Bedarf erfolgte eine Dauertropfinfusion mit physiologischer Kochsalzlösung (Fa. Serpy Wiessner).



Unter Isofluran, Lachgas und Sauerstoff Narkose wurde zuerst die Laparotomie in der Linea alba durchgeführt. Die beiden Uterushörner wurden vorgelagert und die Ovarien *in situ* dargestellt. Eine Massenligatur sowie eine Durchstichligatur wurden am linken Mesovar möglichst weit proximal gelegt. Nach Setzen einer Klemme auf die linke Hornspitze mit dem entsprechenden Lig. latum uteri wurde das Ovar entfernt und in eisgekühlte physiologische NaCl 0,9% verbracht; die gleiche Prozedur wurde für das rechte Ovar durchgeführt, wonach die Proben zur weiteren Bearbeitung ins Labor verbracht wurden. Anschließend wurde der Uterus mit einer Darmklemme kaudal der Zervix fixiert. Eine Massenligatur und eine Durchstichligatur wurden gesetzt. Nach dem Absetzen des Uterus wurde die Schleimhaut des Vaginalstumpfes entfernt und das verbleibende Bindegewebe mit Jodtinktur touchiert. Der Vaginalstumpf wurde einstülpend nach Schmieden vernäht. Der Uterus wurde analog zu den Ovarien bis zur Weiterverarbeitung konserviert. Die Laparotomiewunde wurde in vier Schichten verschlossen (Schebitz und Brass, 1985).

### **3.7 Fixierung und Einbettung der Proben für die Immunhistochemie**

Die gewonnenen Corpora lutea wurden vereinzelt und so gut wie möglich vom übrigen Ovargewebe befreit, mit NaCl 0,9% gespült und in neutral gepuffertem Formol nach Lillie (1951) für 20-24 Stunden fixiert. Danach verblieben sie im 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,2) bis zur Einbettung in Paraffin (Gerät: Einbettungsautomat Microm Laborgeräte GmbH, Heidelberg mit dazugehörigem Histoembedder EG1160 Leica Instruments GmbH, Nussloch). Der Uterus wurde in 15 x 8 x 10 mm große Stücke geschnitten und auf die gleiche Weise konserviert. Er diente als positives Kontrollgewebe.

### **3.8 Darstellung der Estradiol-17 $\beta$ - und Progesteronrezeptoren**

Der Nachweis der PR und ER erfolgte in Anlehnung an Hoffmann und Büttner (1998) sowie Schuler et al. (1999).

#### **3.8.1 Vorbereitung**

Am Mikrotom wurden 3 mm dicke Schnitte angefertigt und auf Aminopropyl-triethoxysilan (APES)-beschichtete Objektträger gezogen. Die Schnitte wurden durch eine Xylol-Alkohol Reihe entparaffiniert und rehydriert. Die Entparaffinierung der Gewebeschnitte erfolgte für 2 x 15 min in Xylol, anschließend wurden die Schnitte zunächst 2 x 10 min in reinem Ethanol und danach jeweils 5 min in 96%igem, 80%igem, 70%igem und 50%igem Ethanol rehydriert. Es folgte eine 5-minütige Spülung in Aqua dest.

Vor dem eigentlichen immunhistochemischen Nachweis des Antigens mussten die Schnitte zur Demaskierung der durch Formalinfixierung veränderten Epitope zunächst einer Vorbehandlung in der Mikrowelle mit Citratpuffer unterzogen werden. Die Schnitte äquilibrierten dazu für 5 min bei Raumtemperatur in Citratpuffer (10 mM; pH 6,0), wurden anschließend in eine mikrowellengeeignete Plastikschiene mit heißem Citratpuffer überführt und in dieser in der Mikrowelle gekocht. Im Hinblick auf Antigenität und Strukturhaltung wurden die besten Ergebnisse für Lutealgewebe mit 3 x 5 min bei 560 Watt erzielt. Zwischendurch wurde durch Verdunstung verlorenes Wasser durch Aqua dest. ersetzt, da die Schnitte während des Kochvorgangs nicht austrocknen dürfen. Nach Beendigung dieser Behandlung wurden die Schnitte bei Raumtemperatur im sich abkühlendem Citratpuffer 20 min belassen und anschließend 2 x 2 min in Aqua dest gewaschen.

Im Anschluss daran wurden die Objektträger 1 x 5 min in PBS-Puffer (pH 7,2) gespült. Zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase folgte für 5 min eine Überschichtung mit 2,0%igem Wasserstoffperoxid in PBS-Puffer. Gespült wurde anschließend wiederum 3 x 5 min in PBS-Puffer. Danach wurden die Objektträger aus dem Puffer entnommen, mit der Präparatseite nach oben flach in eine feuchte Kammer (s. Geräte im Abs. 3.11.3) gelegt und überschüssige Flüssigkeit, die sich um die Schnitte herum befand, abgesaugt. Zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen erfolgte die Überschichtung der Schnitte mit 10%igem inaktiviertem Pferdeserum in PBS-Puffer und eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, wonach sich der immunhistochemische Rezeptornachweis anschloß.

### **3.8.2 Immunhistochemischer Rezeptornachweis**

Die immunhistologische Darstellung der Rezeptoren erfolgte mittels einer indirekten Immunperoxidase-Färbung unter Verwendung der Avidin-Biotin-Technik zur Signal-verstärkung, wie bei Sternberger (1967) erstmals beschrieben.

#### **3.8.2.1 Progesteronrezeptor**

Nach Absaugen der überschüssigen Blockierungslösung verblieb eine dünne Schicht auf den Präparaten. Die Schnitte wurden mit der Verdünnung des antigenspezifischen Primärantikörpers (1:20 in PBS-Puffer; Proteingehalt 0,70 mg/ml) überschichtet und für 20 Stunden in der feuchten Kammer bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Als Primärantikörper gegen den PR wurde der murine monoklonale Antikörper vom Typ IgG<sub>2a</sub> mit der Klonbezeichnung 10A9 verwendet. Er ist gegen die Aminosäuren 922-933 innerhalb der hochkonservierten carboxyterminalen Hormonbindungs-Domäne E des humanen PR gerichtet und erkennt somit alle bisher bekannten Isoformen (s. auch Seite 22). Die Antikörperlösung wurde nach Ablauf der Inkubationszeit abgesaugt, die Objektträger

für 3 x 5 min in PBS-Puffer gewaschen und anschließend flach in die feuchte Kammer gelegt und überschüssige Flüssigkeit um die Gewebeschnitte entfernt. Es folgte die Übersichtung der Schnitte mit dem biotinylierten sekundären Antikörper, einem Pferde anti Maus-IgG Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 in PBS-Puffer für 30 min bei Raumtemperatur. Der biotinylierte Sekundärantikörper war gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet (s. auch Abs. 3.11.1). Anschließend wurden die Präparate 3 x 5 Min in PBS-Puffer gewaschen.

Nun erfolgte die Inkubation mit dem Peroxidase-konjugierten Avidin-Biotin-Komplex, der in einer Verdünnung von 1:100 in PBS-Puffer mindestens 30 min vor Gebrauch angesetzt wurde. Die Inkubationszeit betrug 30 min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer. Die Lösung wurde abgesaugt und die Schnitte 3 x 5 min in PBS gespült. Anschließend folgte die 2-minütige Inkubation in der unmittelbar zuvor frisch in Imidazol-Puffer angesetzten und gefilterten 3-3' Diaminobenzidin-Lösung (DAB), zu der kurz vor dem Eintauchen der Objektträger 70 ml einer 30%-igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Lösung zugegeben worden waren. Die Präparate wurden 2 x 10 min in Aqua dest. gewaschen und danach eine Sekunde in Hämatoxylin nach Harris, 2:1 in Wasser verdünnt, getaucht, um eine schwache Gegenfärbung (Kernfärbung) zu erhalten, die die spezifische Rezeptorfärbung nicht überlagerte. Nach dem 15-minütigen „Bläuen“ unter fließendem Leitungswasser wurden die Schnitte mit KAISERS Glyceringelatine eingedeckt. Dazu wurden auf die noch feuchten Gewebeschnitte einige Tropfen des Eindeckmediums gegeben, ein Deckgläschen aufgelegt und der Überschuss an Medium mit einem Papiertuch entfernt. Die Trocknung der Präparate erfolgte bei Raumtemperatur.

Kontrollproben: Da in jedem Schnitt auch noch umgebende Follikel erkennbar waren, und Granulosazellen bekanntermaßen (De Cock et al., 1997; Slomczynska et al., 2000) den PR und ER exprimieren, dienten diese als probeinterne Kontrolle.

Als positive Kontrolle diente identisch behandeltes Gewebe mit bekannt hohem Rezeptorgehalt, in diesem Fall Schnitte des Uterus einer Hündin vom Tage 15 nach der Ovulation. Als negative Kontrollen zur Überprüfung unspezifischer Bindung von murinem IgG<sub>2a</sub> an canines Gewebe wurden in jedem Test zusätzlich Schnitte von Corpora lutea sowie vom Uterus mitgeführt, bei denen der spezifische Primärantikörper durch einen irrelevanten monoklonalen Maus-IgG<sub>2a</sub>-Antikörper (Klon 7T4-1F5) in entsprechender Endverdünnung des Proteins ersetzt wurde. Dieser Isotyp-Kontrollantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1420 in PBS-Puffer eingesetzt.

### 3.8.2.2 Östrogenrezeptor

Die immunhistochemische Methodik zur Darstellung von Estrogenrezeptoren im Corpus luteum der Hündin, inclusive der Kontrollen, entsprach weitgehend derjenigen zum PR-Nachweis.

Bei der Vorbereitung der Paraffinschnitte für die immunhistochemischen Untersuchungen wurde den in Kapitel 3.8.2. beschriebenen Verfahren gefolgt.

Als Primärantikörper wurde der monoklonale Maus IgG1 anti humaner-ER, Klon 6F11 eingesetzt. Dieser Antikörper war gegen ein rekombinantes Protein gerichtet, das der vollen Länge der  $\alpha$ -Isoform des ER entspricht (s. Seite 21). Die Antikörperlösung wurde 1:10 in PBS-Puffer verdünnt (Proteingehalt nach Verdünnung war unbekannt, da die Firma Novo Castra über den Proteingehalt der Antikörperpräparation nicht informieren konnte).

Identisch behandelte Gewebeschnitte des Uterus einer Hündin vom Tag 15 mit bekannt hohem Rezeptorgehalt dienten als positive Kontrollpräparate. Als interne Kontrolle dienten auch hier im Schnitt erkennbare perilutealliegende Follikel. Weiterhin wurden negative Kontrollen zur Überprüfung der unspezifischen Bindung des verwendeten Immunglobulins angefertigt. So wurde pro Objektträger ein Schnitt mit entsprechender Menge eines monoklonalen irrelevanten Antikörpers desselben Isotyps und derselben Spezies (ein kommerziell erhältlicher Maus-IgG<sub>1</sub>-Isotypkontrollantikörper mit der Bezeichnung CBL 600) statt des spezifischen Primärantikörpers verwendet. Dieses Kontrollreagenz wurde in der gleichen Verdünnung wie der Primärantikörper 6F11 eingesetzt, da auch über den Proteingehalt dieses Kontrollreagenz keine Angabe vorlag.

### **3.9 Quantitative Auswertung der gefärbten Gewebeschnitte**

Die Auswertung der Präparate erfolgte lichtmikroskopisch bei 400-facher Vergrößerung, im Vergleich zu den negativen bzw. positiven Kontrollen, um unspezifische und positive Färbereaktionen zu differenzieren.

Die Auswertung wurde pro Hund an einem Paraffinblock durchgeführt. Vom diesen Block wurden 3 Schnitte gefärbt. Ausgezählt wurden je nach Schnitt 13 bis 21 Gesichtsfelder, wobei einem imaginären Kreuz gefolgt wurde (s. Abb. 4). Jedes Gesichtsfeld hatte die Außenmaße 0,63 x 0,48 mm und die Fläche von 0,3 mm<sup>2</sup>. Es wurden durchschnittlich  $39,97 \pm 8,60$  Luteinzellen und  $56,87 \pm 6,02$  sonstige Zellen pro Gesichtsfeld gezählt. Pro Schnitt wurden auf dem imaginären Kreuz immer 4 Randfelder (A) gezählt; die Anzahl der B-Felder war von der Größe des Corpus luteum und der Schnittebene abhängig.



Abb. 4: Schnitt eines CL mit Darstellung des imaginären Kreuzes entlang dem die Gesichtsfelder gezählt und ausgewertet wurden.

Pro Gesichtsfelder wurden alle Lutein- und sonstigen Zellen (Fibrozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Stromazellen) gezählt. Diese Zuordnung erwies sich als notwendig, da sich nur die Luteinzellen deutlich differenzieren ließen. Die Luteinzellen wurden sowohl im Hinblick auf die Darstellung des PR als auch des ER in stark und schwach positive sowie negative Zellen unterteilt; die sonstigen Zellen in positive und negative. Das spezifisch zytoplasmatische Signal wurde qualitativ ausgewertet. Aufgrund der Färbeintensität wurde dieses als -,  $\pm$ , +, oder ++ beurteilt (s. Abs. 9.1 und 9.2 im Anhang). Da diese Beurteilung nicht quantitativ zu erfassen war, wurden die so erhaltenen Ergebnisse nicht in die statistischen Auswertungen einbezogen.

### 3.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Es wurde das Statistikprogrammpaket BMDP/Dynamic, Release 7.0 (Dixon 1993) verwendet.

Bei rechtsschiefer Verteilung positiver quantitativer Merkmale (Hormonkonzentration im Blut) wurde eine logarithmische Transformation der Daten durchgeführt und die Datenbeschreibung mit Hilfe von geometrischen Mittelwerten ( $x_g$ ) und Streufaktoren (SF), dargestellt in der Form  $x_g \cdot SF^{\pm 1}$ , vorgenommen.

Zur statistischen Prüfung des Einflusses des Faktors Zeit wurde bei den annähernd normal verteilten Merkmalen eine einfaktorische Varianzanalyse mit dem Programm BMDP7D durchgeführt.

Um die Gleichheit der Varianz zu überprüfen, wurde der *Levene Test* benutzt. Wenn der *Levene Test* Varianzunterschiede anzeigte, wurde der *Welch Test* (Varianzen werden nicht als gleich angenommen) verwendet. Waren die Varianzunterschiede nicht statistisch signifikant, wurde die Varianzanalyse für den Mittelwertvergleich verwendet. Gerechnet wurde bis auf 3 Parameter mit der Varianzanalyse und die übrigen anderen drei Parameter (OMLnab<sup>1</sup>, OMSpab<sup>2</sup>, Pkonz<sup>3</sup>) mit dem *Welch Test*.

Die Untersuchung auf Zusammenhänge zwischen den einzelnen Messparametern erfolgte mit Hilfe von Korrelationsanalysen mit dem Program BMDP6D unter Angabe des Kreuzkorrelationskoeffizienten (r) bzw. mit dem Rang-Korrelationskoeffizient nach Sperman ( $r_s$ ).

Bei der Benennung von Signifikanzen wurden folgende Bezeichnungen verwendet:

$p \leq 0,001$  ☞ hoch signifikant

$p \leq 0,01$  ☞ signifikant

$p \leq 0,05$  ☞ schwach signifikant

$p > 0,05$  ☞ nicht signifikant

### 3.11 Materialien und Geräte

#### 3.11.1 Verwendete Antikörper

BA-2000

Pferd biotiniliertes anti-Maus IgG

Firma Vector Laboratories

Burlingame – USA

CBL-600

Maus IgG1

Firma Cymbus Biotechnology Ltd

Chandlers Ford – UK

---

1. OMLnab = Östrogen Rezeptor Luteinzellen negative absolut

2. OMSpab = Östrogen Rezeptor sonstige Zellen positive absolut

3. Pkonz = Progesteron Konzentration

Klon 7T4-1F5

Maus-IgG2a

Firma Coulter – Immunotech

Krefeld – Deutschland

NCL-ER-6F11

Antikörper gegen die ganze Länge der  $\alpha$ -Isoform des humanen Estrogenrezeptors

Firma Novo Castra

New Castle – UK

PR10A9

Antikörper gegen ein Epitop des humanen Progesteronrezeptors

Firma Coulter-Immunotech

Krefeld – Deutschland

### 3.11.2 Puffer und Lösungen

10 mM Citratpuffer (pH 6,0):

Lösung A:

Citronensäure-Monohydrat ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ )	21,01	g
---	-------	---

Aqua dest.	ad 1000,00	ml
------------	------------	----

Lösung B:

Trinatriumcitrat-Dihydrat ( $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$ )	29,41	g
---	-------	---

Aqua dest.	ad 1000,00	ml
------------	------------	----

49 ml Lösung A und 41 ml Lösung B mit 450 ml Aqua dest. mischen.

DAB (Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid)-Substratlösung:

0,1 M Imidazol-HCl	200,00	ml
--------------------	--------	----

Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid	0,10	g
-----------------------------------	------	---

Die Lösung direkt vor Gebrauch frisch ansetzen und filtern.

$H_2O_2$ 30%ig	70,00	$\mu$ l
----------------	-------	---------

## Material und Methoden

---

Formaldehyd 4%ig, gepuffert (pH 7,0):

40%iges Formol	500,00	ml
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	20,00	g
Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	32,50	g
Aqua dest.	ad 5000,00	ml

0,1 M Imidazol-HCl-Lösung (pH 7,08):

Imidazol	8,51	g
1N HCl	60,00	ml
Aqua dest.	ad 2000,00	ml

0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,2):

Lösung A:

Natriumphosphat-Monohydrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	13,80	g
Aqua dest.	ad 1000,00	ml

Lösung B:

Dinatriumphosphat-Dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	17,80	g
Aqua dest.	ad 1000,00	ml

Für 100 ml Natriumphosphatpuffer werden 28,3 ml Lösung A mit 71,7 ml Lösung B gemischt.

PBS-Puffer für die Immunhistologie, Stammlösung:

NaCl reinst	41,00	g
Dinatriumphosphat-Dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	11,00	g
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	2,75	g
Aqua dest.	ad 1000,00	ml

Für die Gebrauchslösung (pH 7,2) 200 ml der Stammlösung mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen.



Wasserstoffperoxid - Lösung 2,0%ig:

30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 13,33 ml

Aqua dest. ad 200,00 ml

### 3.11.3 Auflistung der besonderen Geräte

- ACS: 180™ PLUS System (Chiron Diagnostics) mit dazugehörigen Chemikalien
- CCD-Farbvideokamera DXC-107AP (Sony Deutschland GmbH, Köln)
- Einbettungsautomat (Microm Laborgeräte GmbH, Heidelberg) mit dazugehörigem Histoembedder EG1160 (Leica Instruments GmbH, Nussloch)
- Farb-Videokamerakopf TK-1070E, F.Nr. 06052298 (JVC Professional Products GmbH, Friedberg)
- Feuchte Kammer; dazu wurde eine Keks-Schachtel (20 x 20 cm) aus Blech mit Deckel verwendet
- Leitz-Mikroskop DM-RB, F.Nr. 161388 (Leica Mikroskopie GmbH, Wetzlar)
- Magnetrührer MR 2002, Nr. 50304 (Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Kelheim)
- Mikrotom, F.Nr. 23076 (Reichardt Jung AG, Heidelberg)
- Haushaltsmikrowellenherd Compact Y50, F.Nr. 25027231 (Moulinex, Solingen)
- Pumpe Typ N035.1.2AN.18, F.Nr. 83424 (KnF Neuberger, Freiburg)
- Vortex-Evaporator (Fa. Haake-Buchler Meßtechnik GmbH, Karlsruhe)
- Zählbrett „ferrari-Statitest“ (Ferrari, Berlin, Deutschland)

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Immunhistochemische Darstellung der PR und ER im Follikel und Uterusgewebe

Wie erwähnt (s. S. 36), dienten die periluteal liegenden Follikel als probeinterne Kontrolle. Parallel dazu wurde Uterusgewebe vom Hund (s. S. 35) als weitere Kontrolle herangezogen.

**Progesteronrezeptor:** Die im perilutealen Gewebe erkennbaren Granulosa- und Thekazellen heranreifender Follikel zeigten bei Verwendung des PR-spezifischen Antikörpers (Klon 10A9) ein deutlich positives nukleäres Signal (Abb. 5 A) und konnten auf Grund dessen als schnittinterne Positivkontrolle herangezogen werden. Der als Positivgewebe eingesetzte Uterus einer am Tag 15 p. o. kastrierten Hündin zeigte ebenfalls ein deutlich positives nukleäres Signal in den Drüsenepithelzellen sowie in manchen Stromazellen (Abb. 5 C). Bei Verwendung des als Isotypenkontrolle eingesetzten Antikörpers aus dem Klon 7T4-1F5 jeweils im gleichen Test war weder ein nukleäres noch ein zytoplasmatisches Signal im CL, in den Follikelzellen oder im Uterus zu erkennen (Abb. 5 B und D).

**Estrogenrezeptor:** Die im perilutealen Gewebe erkennbaren Granulosa- und Thekazellen heranreifender Follikel zeigten bei Verwendung des ER-spezifischen Antikörpers (Klon 6F11) ein deutlich positives nukleäres Signal (Abb. 6 A) und konnten auf Grund dessen als schnittinterne Positivkontrolle herangezogen werden. Der als Positivgewebe eingesetzte Uterus einer am Tag 15 p. o. kastrierten Hündin zeigte ebenfalls ein deutlich positives nukleäres Signal in den Drüsenepithelzellen (Abb. 6 C). Bei Verwendung des als Isotypenkontrolle eingesetzten Antikörpers aus dem Klon CBL-600 jeweils im gleichen Test war weder ein nukleäres noch ein zytoplasmatisches Signal im CL, in den Follikeln oder im Uterus zu erkennen (Abb. 6 B und D).

## Ergebnisse

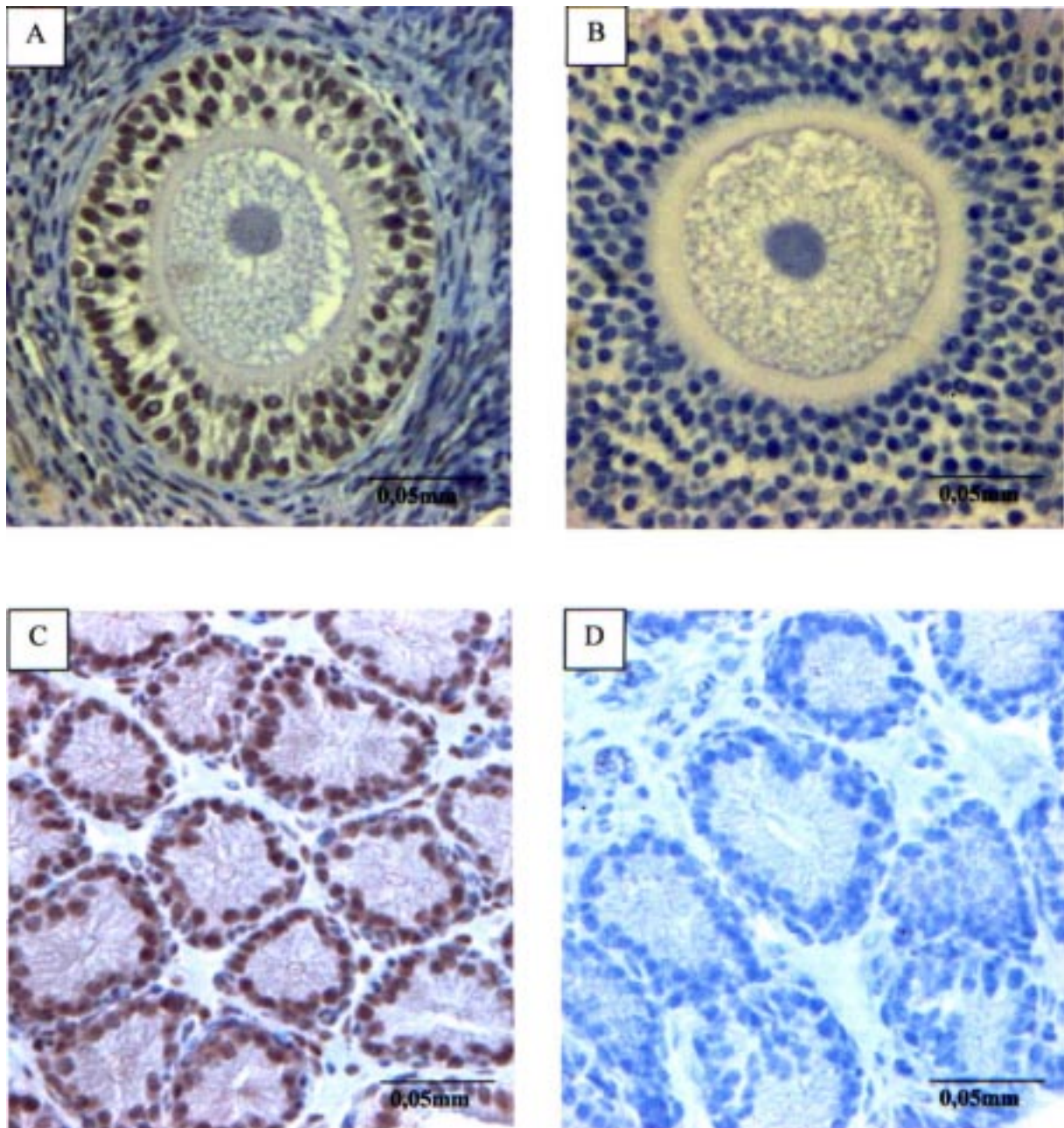


Abb. 5: Lichtmikroskopische Darstellung einzelner Gesichtsfelder von 3  $\mu\text{m}$  dicken Schnitten von Uterus- (C und D) und Follikelgewebe (A und B) nach Inkubation mit dem PR-spezifischen Antikörper (Klon 10A9; A, C) bzw. der entsprechenden Isotypenkontrolle (Klon 7T4-1F5; B, D).

## Ergebnisse

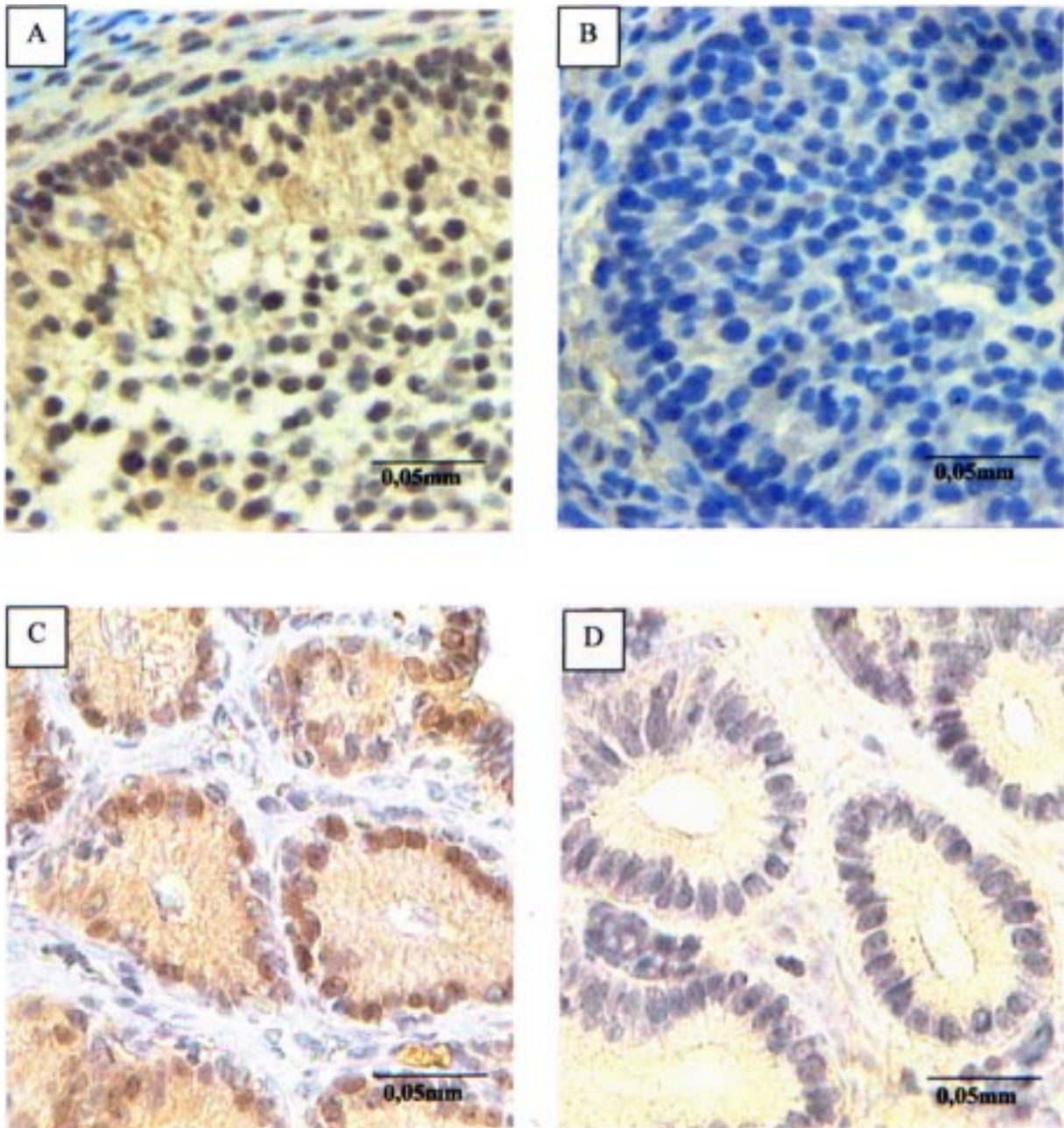


Abb. 6: Lichtmikroskopische Darstellung einzelner Gesichtsfelder von 3  $\mu\text{m}$  dicken Schnitten von Uterus- (C und D) und Follikelgewebe (A und B) nach Inkubation mit dem ER spezifischen Antikörper (Klon 6F11; A, C) bzw. der entsprechenden Isotypenkontrolle (Klon CBL 600; B, D).

### **4.2 Immunhistochemische Darstellung von Progesteronrezeptoren im Corpus luteum der Hündin**

Zu allen Zyklusstadien ließ sich das Lutealgewebe gut darstellen. In ihm wurde eine einheitliche Population an Luteinzellen gefunden, die sich allerdings im Laufe des Diöstrus morphologisch veränderte. Dies zeigte sich vor allem in einer Zunahme zytoplasmatischer Vakuolen (s. Veränderungen vom Tag 5 über Tag 25 auf Tag 45 in Abb. 9).

Progesteronrezeptor (PR)-positive Signale konnten in den Gewebeschnitten der Corpora lutea zu allen 5 untersuchten Stadien post ovulationem (p. o.) nachgewiesen werden. Diese Signale betrafen sowohl die Luteinzellen als auch die sonstigen Zellen (s. Kap. 3.9, S. 36), wobei die sonstigen Zellen ausschließlich nukleäre Signale aufwiesen, die Luteinzellen daneben auch noch zytoplasmatische Signale. Das Ergebnis der quantitativen Auswertung der nukleären Reaktion der Luteinzellen (Lz) ist in Abb. 7 zusammenfassend dargestellt, das der sonstigen Zellen (sZ) in Abb. 8. Die Einzelergebnisse der Auszählung der Gesichtsfelder sind – geordnet nach Tier und Tag – im Abs. 9.1 im Anhang wiedergegeben.

Der Anteil positiver Luteinzellen (positiv + schwach positiv) war mit im Mittel 65% höher ( $p < 0,01$ ) als der Anteil negativer Luteinzellen (mittlerer Anteil 34%). Wie aus Abb. 7 hervorgeht, ergab sich für den Verlauf der positiven Luteinzellen (positiv + schwach positiv) ein hoch signifikanter ( $p < 0,001$ ) Einfluss des Faktors Zeit, wobei Randfelder (A-Felder) und mittlere Felder (B-Felder) gleichsinnig reagierten. Die größte Anzahl positiver Luteinzellen wurde am Tag 5 p. o. gemessen, die niedrigste Anzahl an den Tagen 15 und 25, wonach ein Anstieg auf Tag 45 folgte. Umgekehrt ergaben sich für die Tage 15 und 25 die höchste Anzahl PR negative Luteinzellen, an den Tagen 5, 35 und 45 lagen die Werte deutlich niedriger. Bei Relativierung der erhaltenen Messwerte (Gesamtzahl der erfassten Lz = 100%) zeigen sich die Effekte entsprechend verdeutlicht.

Auch bei getrennter Betrachtung der positiven und schwach positiven Luteinzellen zeigt sich ein signifikanter Einfluss des Faktors Zeit, d. h. des Zeitpunktes nach der Ovulation auf die Expression PR positiver ( $p < 0,03$ ), schwach positiver ( $p < 0,02$ ) Luteinzellen. Dieser Einfluss ist auch bei den positiven ( $p < 0,001$ ) und negativen ( $p < 0,001$ ) sonstigen Zellen erkennbar. Wie aus Abs. 8 hervorgeht, wurde die größte Anzahl positiver sonstiger Zellen am Tag 5 p. o. gemessen, die niedrigste Anzahl am Tag 35, wonach ein Anstieg auf Tag 45 folgte. Die Anzahl PR negative sonstiger Zellen steigt sich allmählich vom Tag 5 bis zum Tag 45 an. Bei Relativierung der erhaltenen Messwerte (Gesamtzahl der erfassten sZ = 100%) zeigen sich die Effekte entsprechend verdeutlicht. Die Expression der PR-positiven Zellen in den Randfeldern war immer höher ( $p < 0,002$ ) als in den mittleren Feldern.

## Ergebnisse

---

Wie aus Abb. 9 hervorgeht, konnten neben negativen, positiven und schwach positiven nukleären Reaktionen bei den Luteinzellen auch positive zytoplasmatische Signale erkannt werden, die sich als diffuse braune Reaktionen zeigten. Die diffusen zytoplasmatischen Reaktionen waren nicht in den Isotypenkontrollen nachweisbar und wurden deshalb als spezifisch bewertet. Sie wurden zu allen untersuchten Stadien p. o. beobachtet, wobei am Tag 25. das Signal am stärksten vorhanden war. Der Verlauf des Auftretens zytoplasmatischer Reaktionen bei den Luteinzellen entsprach ungefähr dem Verlauf des Auftretens negativer Luteinzellen, d. h. nach einem Anstieg vom Tag 5 auf Tag 25 folgte ein Abstieg auf die Tage 35 und 45 (im Anhang befinden sich die Datensätze aller gezählten Gesichtsfelder mit der entsprechenden Beurteilung des zytoplasmatischen Signals).

## Ergebnisse

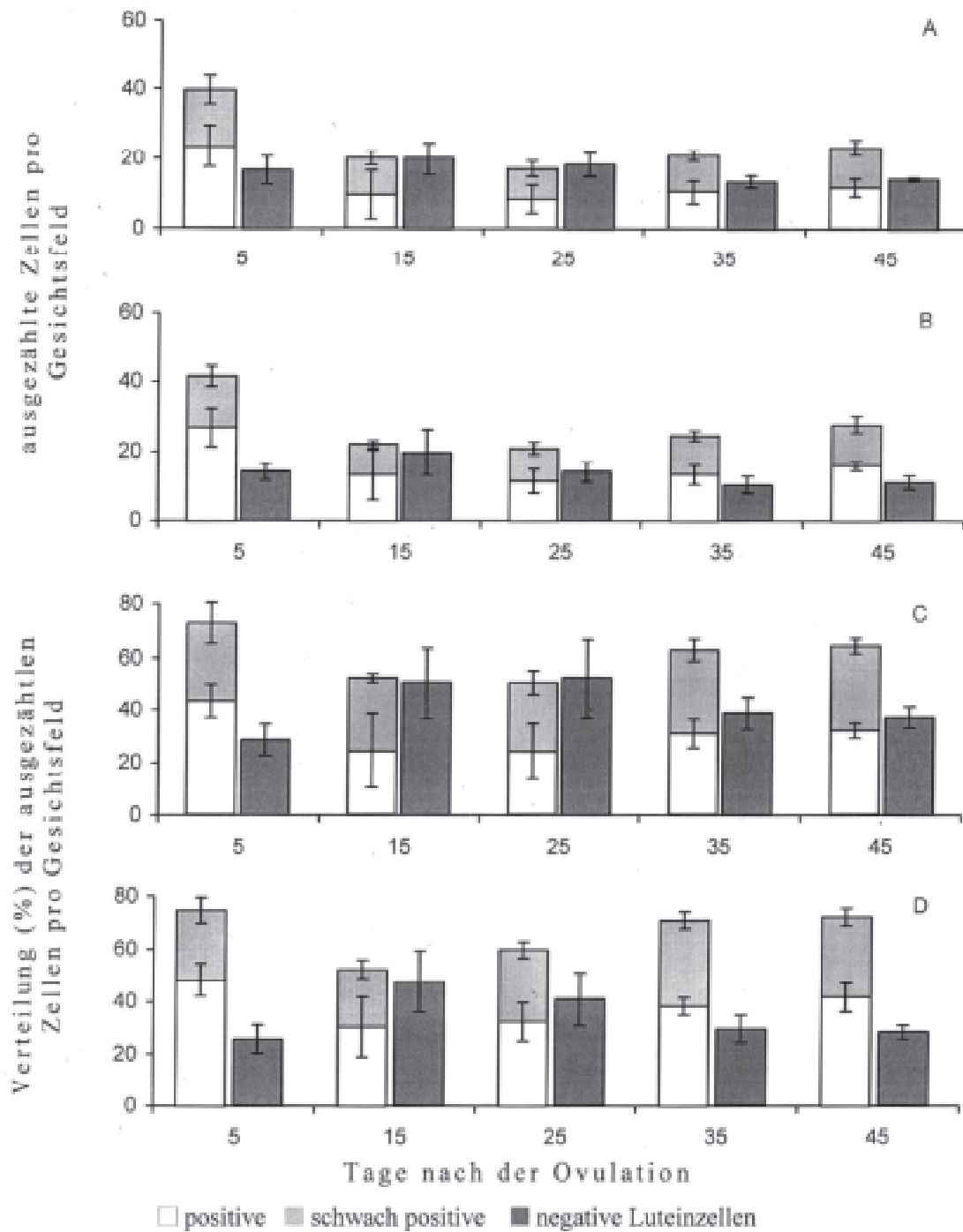


Abb. 7: Durchschnittlicher ( $x \pm SD$ ) Anteil Progesteronrezeptor-positiver und -negativer Luteinzellen im CL der Hündin vom 5. bis zum 45. Tag nach der Ovulation, gemessen mittels Immunhistochemie und Erfassung der nuklearen Reaktion.

A: Anzahl PR-positiver und -negativer Luteinzellen im Randfeld (A-Felder; s. Seite 37).

B: Anzahl PR-positiver und -negativer Luteinzellen in mittleren Feldern (B-Felder; s. Seite 37).

C: Prozentuale Verteilung PR-positiver und -negativer Luteinzellen im Randfeld.

D: Prozentuale Verteilung PR-positiver und -negativer Luteinzellen in den mittleren Feldern.

## Ergebnisse

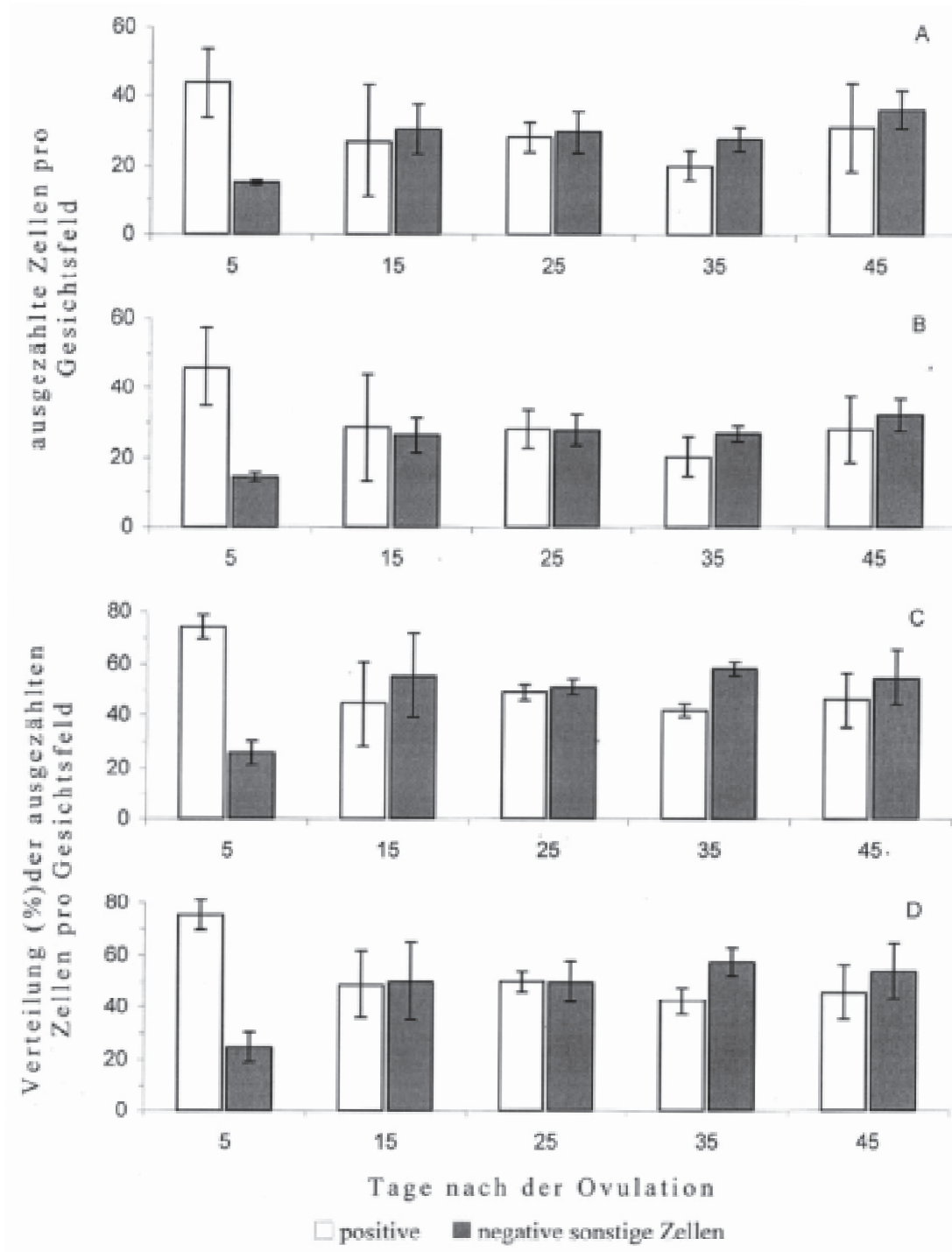
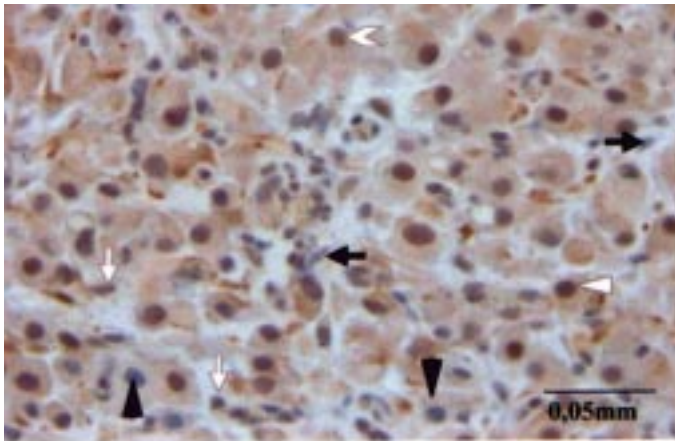


Abb. 8: Durchschnittlicher ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) Anteil Progesteronrezeptor-positiver und -negativer sonstigen Zellen im CL der Hündin vom 5. bis zum 45. Tag nach der Ovulation, gemessen mittels Immunhistochemie und Erfassung der nuklearen Reaktion.

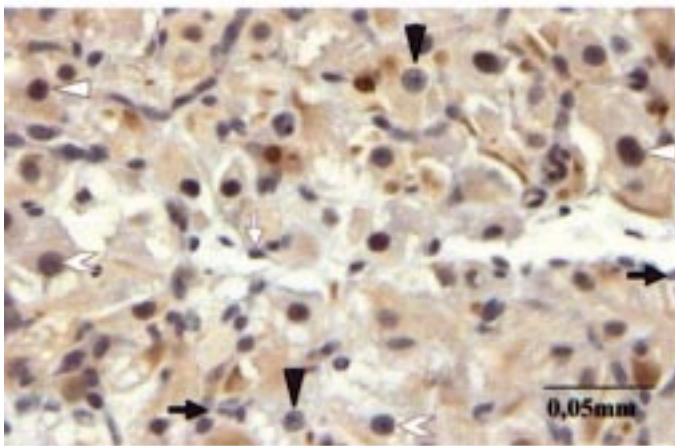
- A: Anzahl PR-positiver und -negativer sonstigen Zellen im Randfeld (A-Felder; s. Seite 37).
- B: Anzahl PR-positiver und -negativer sonstigen Zellen in mittleren Feldern (B-Felder; s. Seite 37).
- C: Prozentuale Verteilung PR-positiver und -negativer sonstigen Zellen im Randfeld.
- D: Prozentuale Verteilung PR-positiver und -negativer sonstigen Zellen in den mittleren Feldern.



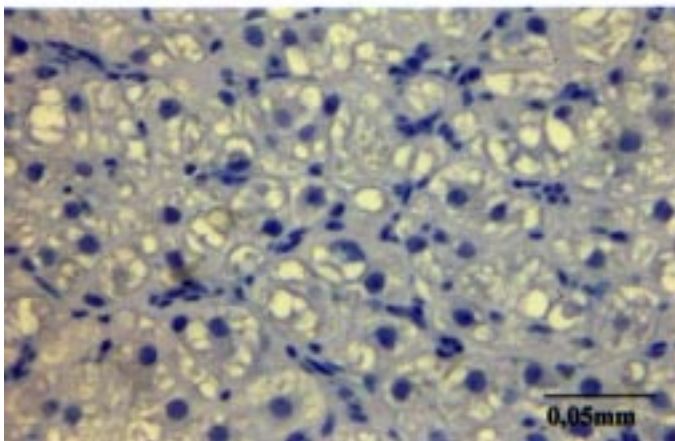
# Ergebnisse



A: Hündin „Zora“ Tag 5 p. o.



B: Hündin „Luca“ Tag 25 p. o.



C: Hündin „Sinah“ Tag 45 p. o.  
(negative Kontrolle)

Abb. 9: A und B: Lichtmikroskopische Darstellung einzelner Zählfelder von 3 µm dicken Paraffinschnitten lutealen Gewebes nach spezifischem Nachweis von Progesteronrezeptoren mit Antikörpern aus dem Klon 10A9 (braune DAB-Nachweisreaktion) mit leichter blauer Hämatoxylin Gegenfärbung zu definierten Zeitpunkten nach der Ovulation; A: Tag 5; B: Tag 25

C: Kontrollschnitt nach Einsetzen des Isotypenantikörpers aus dem Klon 7T4-1F5 anstelle des Klon 10A9 (Tag 45 nach der Ovulation).

Luteinzellen:	▲ negative-	◁ schwach positive-	◁ positive nucleäre Reaktion
sonstige Zellen:	← negative-	◁ positive sonstige nucleäre Reaktion	

### **4.3 Immunhistochemische Darstellung von Östrogenrezeptoren im Corpus luteum der Hündin**

Unter den gleichen der Darstellung des PR entsprechenden Bedingungen konnte Östrogenrezeptor-positive Reaktionen zu allen 5 untersuchten Stadien post ovulationem nachgewiesen werden.

Die positiven Signale betrafen sowohl die Luteinzellen als auch die sonstigen Zellen (s. Kap. 3.9, S. 36), wobei die sonstigen Zellen ausschließlich nukleäre Signale aufwiesen, die Luteinzellen daneben auch noch zytoplasmatische Signale. Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung der nukleären Reaktionen der Luteinzellen sind in Abb. 10 zusammenfassend dargestellt, die der sonstigen Zellen in Abb. 11. Die Einzelergebnisse der Auszählung der Gesichtsfelder sind – geordnet nach Tier und Tag – im Abs. 9.2 im Anhang wiedergegeben.

Wie aus Abb. 10 und 11 hervorgeht, streut die Anzahl der den ER exprimierenden Zellen innerhalb der einzelnen Tage stark. Die aus der Grafik ersichtlichen Änderungen der Expression des ER im Verlauf des Diöstrus in CL waren statistisch nicht signifikant. Wie beim PR war aber auch hier Expression des ER in den Luteinzellen in den Randfeldern höher ( $p < 0,004$ ) als in den mittleren Feldern.

Abb. 10 zeigt, dass der Tendenz nach der Anteil positiver Luteinzellen (positiv plus schwach positiv) langsam vom Tag 5 auf Tag 45 anstieg, während der Anteil ER-negativer Luteinzellen ab Tag 15 p. o. langsam fiel. Wie weiter aus Abb. 11 hervorgeht, war in den sonstigen Zellen tendenziell ein Anstieg der ER-positiven sonstigen Zellen von Tag 5 auf Tag 25 erkennbar, danach erfolgte ein Abstieg auf Tag 45. Die ER-negativen sonstigen Zellen zeigten eine ansteigende Tendenz in der Expression des ER von Tag 5 auf Tag 45. Auch bei getrennter Betrachtung der positiven und schwach positiven Lutealzellen zeigte sich kein signifikanter Einfluss des Faktors Zeit auf die Expression des ER.

Neben negativen, positiven und schwach positiven nukleären Reaktionen konnten bei den Luteinzellen auch positive zytoplasmatische Signale erkannt werden (s. Abb. 12). Nach einem allmählichen Anstieg ab dem Tag 5 erreichten die zytoplasmatischen Signale am Tag 35 die stärkste Expression, danach erfolgte ein Abfall bis Tag 45. Im Anhang befinden sich die Datensätze aller gezählten Gesichtsfelder mit der entsprechenden Beurteilung des zytoplasmatischen Signals.

## Ergebnisse

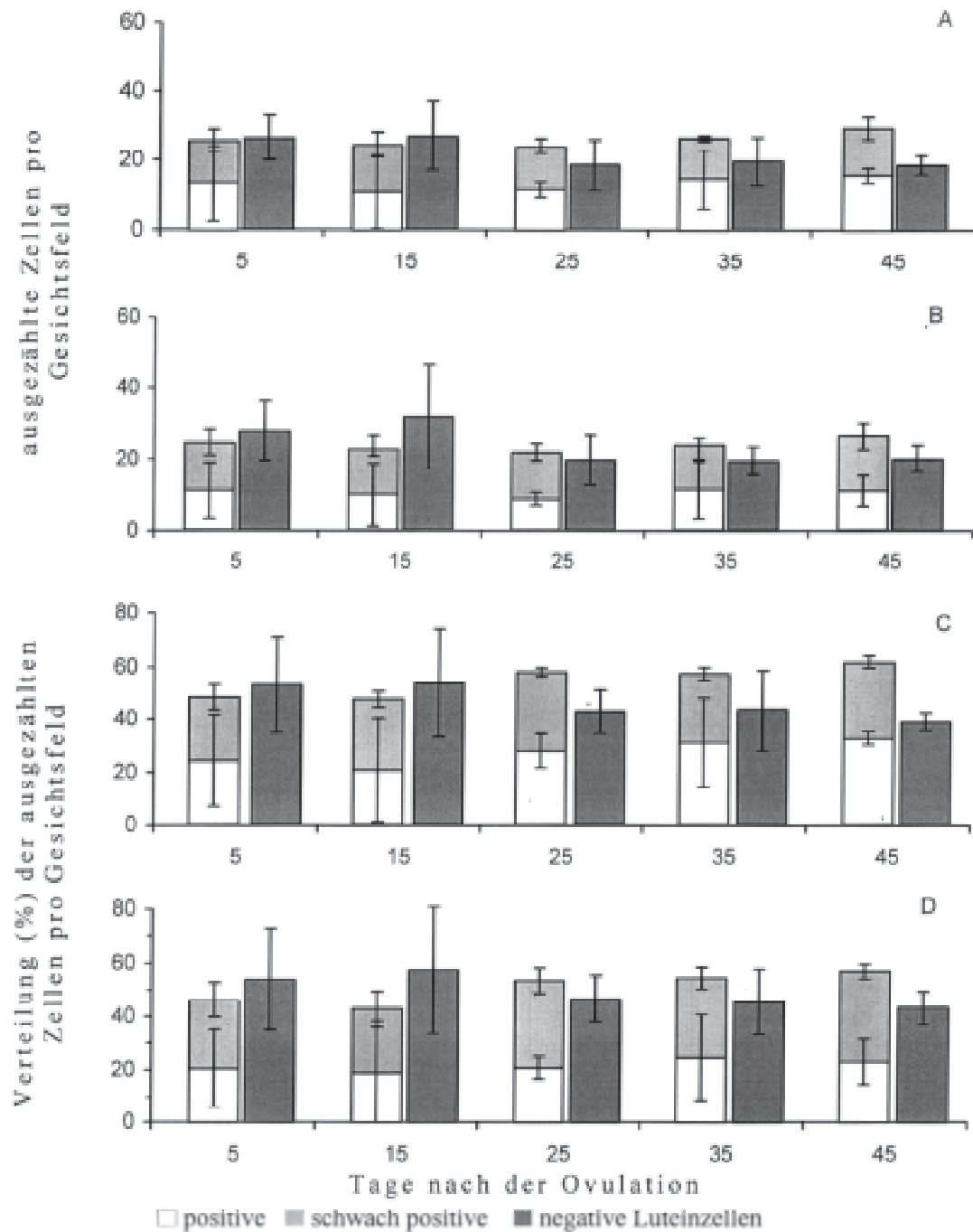


Abb. 10: Durchschnittlicher ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) Anteil Östrogenrezeptor-positiver und -negativer Luteinzellen im CL der Hündin vom 5. bis zum 45. Tag nach der Ovulation, gemessen mittels Immunhistochemie und Erfassung der nuklearen Reaktion.

A: Anzahl ER-positiver und -negativer Luteinzellen im Randfeld (A-Felder; s. Seite 37).

B: Anzahl ER-positiver und -negativer Luteinzellen in mittleren Feldern (B-Felder; s. Seite 37).

C: Prozentuale Verteilung ER-positiver und -negativer Luteinzellen im Randfeld.

D: Prozentuale Verteilung ER-positiver und -negativer Luteinzellen in den mittleren Feldern.

## Ergebnisse

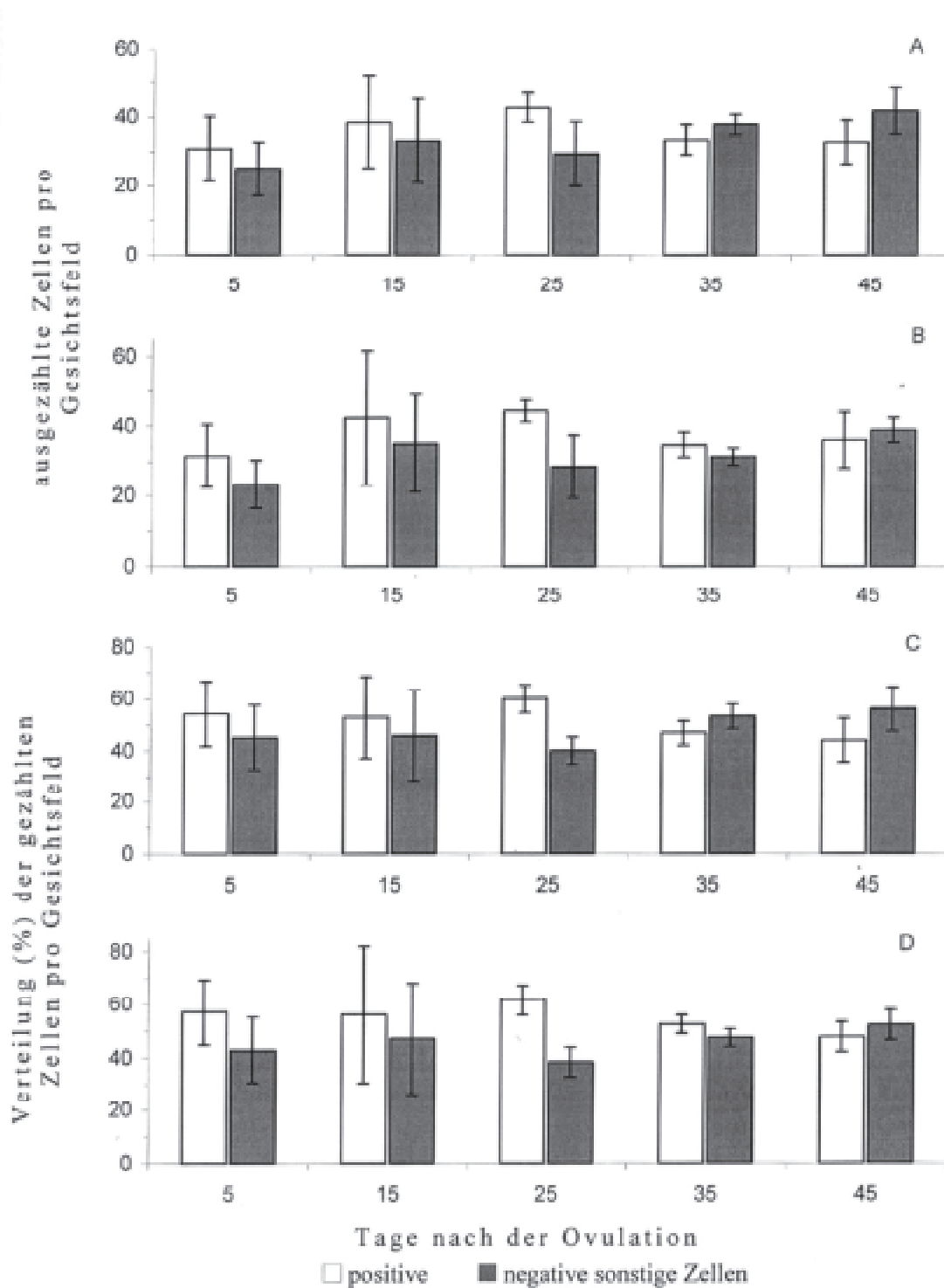


Abb. 11: Durchschnittlicher ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) Anteil Östrogenrezeptor-positiver und -negativer sonstigen Zellen im CL der Hündin vom 5. bis zum 45. Tag nach der Ovulation, gemessen mittels Immunhistochemie und Erfassung der nuklearen Reaktion.

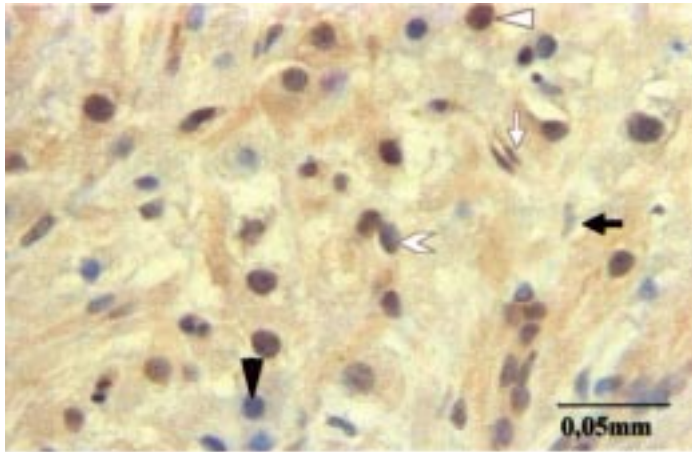
A: Anzahl ER-positiver und -negativer sonstigen Zellen im Randfeld (A-Felder; s. Seite 37).

B: Anzahl ER-positiver und -negativer sonstigen Zellen in mittleren Feldern (B-Felder; s. Seite 37).

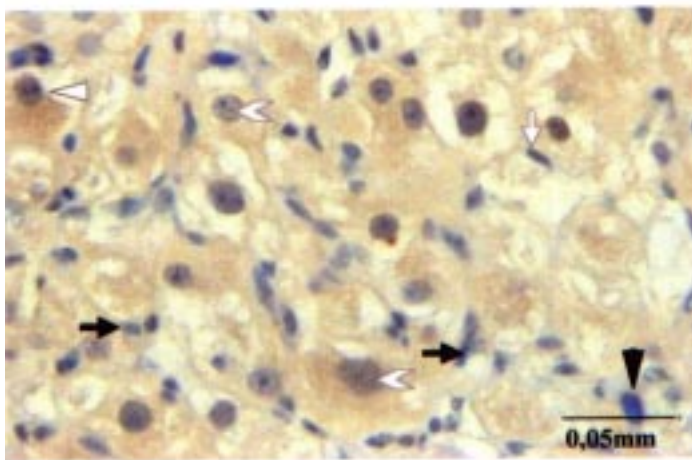
C: Prozentuale Verteilung ER-positiver und -negativer sonstigen Zellen im Randfeld.

D: Prozentuale Verteilung ER-positiver und -negativer sonstigen Zellen in den mittleren Feldern.

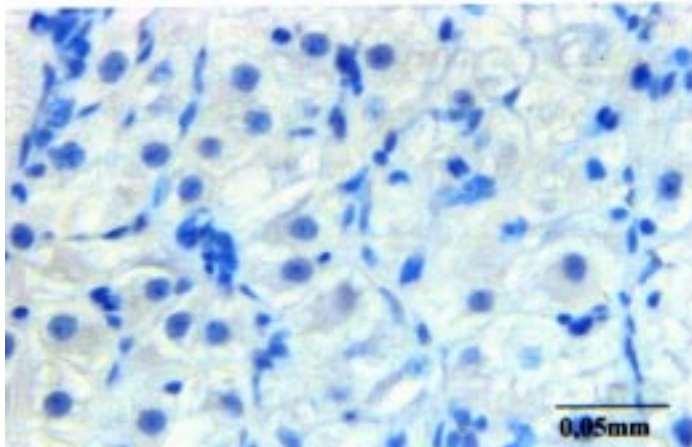
# Ergebnisse



A: Hündin „Kim“ Tag 15 p. o.



B: Hündin „Rieke“ Tag 25 p. o.



C: Hündin „Luna“ Tag 45 p. o.

Negativkontrolle

Abb. 12: A und B: Lichtmikroskopische Darstellung einzelner Zählfelder von 3 µm dicken Paraffinschnitten lutealen Gewebes nach spezifischem Nachweis von Östrogenrezeptoren mit Antikörpern aus dem Klon NCL-6F11 (braune DAB-Nachweisreaktion) mit leichter blauer Hämatoxilin Gegenfärbung zu definierten Zeitpunkten nach der Ovulation; A: Tag 15; B: Tag 25

C: Kontrollschnitt nach Einsetzen des Isotypenantikörpers aus dem Klon CBL-600 anstelle des Klon NCL-6F11 (Tag 45 nach der Ovulation).

Luteinzellen:	▲ negative-	◁ schwach positive-	◁ positive nucleäre Reaktion
sonstige Zellen:	→ negative-	◁ positive sonstige nucleäre Reaktion	

## 4.4 Progesteron- und Estradiol-17 $\beta$ -konzentration im peripheren Plasma

Die Auswertung des Verlaufes der Progesteronkonzentrationen im peripheren Plasma zeigt einen hochsignifikanten ( $p = 0,0002$ ) Einfluss des Faktors Zeit. Wie aus Abb. 13 ersichtlich ist, zeigt sich dies durch einen Anstieg der Konzentration vom Tag 5 auf Tag 15, gefolgt von einem Abfall über die Tage 25 und 35 bis zum Ende der Versuchsperiode.

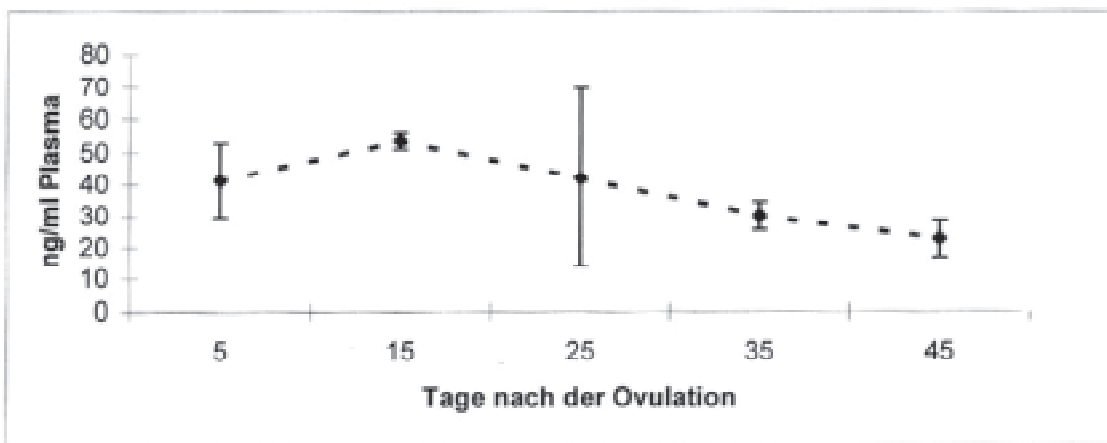


Abb. 13: Verlauf der Progesteronkonzentrationen (-●-) im peripheren Plasma zu definierten Tagen nach der Ovulation (Angaben in  $\bar{x} \pm SD$ )

Dagegen lässt die Auswertung des Verlaufes der Estradiol-17 $\beta$ -Konzentrationen im peripheren Plasma keine gesicherten zeitlichen Beziehungen erkennen. Wie aus Abb. 14 ersichtlich, ist aber der Tendenz nach ein Anstieg der mittleren Konzentrationen am Tag 25 nach der Ovulation festzustellen, gefolgt von einem Abfall auf die Tage 35 und 45.

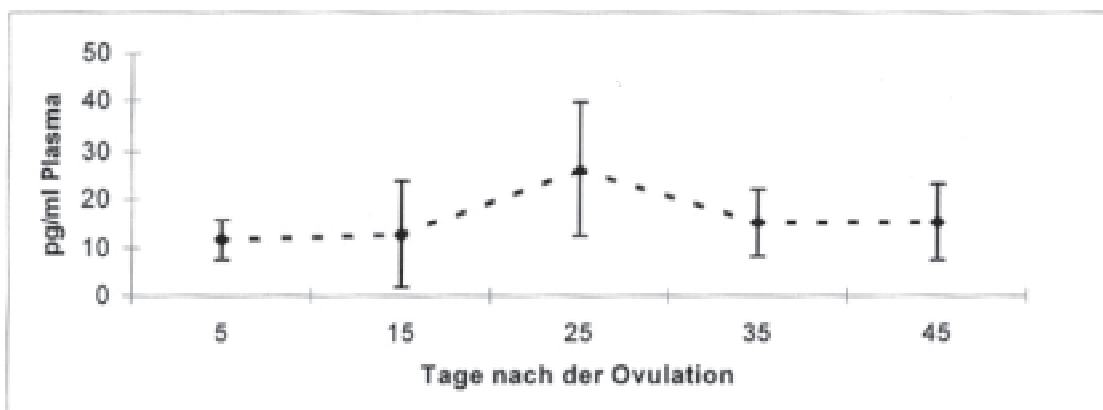


Abb. 14: Verlauf der Estradiol-17 $\beta$ -Konzentrationen (-●-) im peripheren Plasma zu definierten Tagen nach der Ovulation (Angaben in  $\bar{x} \pm SD$ )

## 4.5 Korrelationen

Soweit gesicherte und biologische sinnvolle Korrelationen ermittelt werden konnten, ergaben sich diese wie folgt:

### 4.5.1 Hormonkonzentrationen im Plasma und Expression des PR und ER

Der Verlauf der Progesteronkonzentration im Plasma korreliert mit dem Verlauf der PR-negativen Luteinzellen in den mittleren Feldern des CL ( $r = 0,490$ ;  $p = 0,028$ ). Die Anzahl der PR schwach positiven Luteinzellen am Rand war negativ korreliert ( $r = -0,444$ ;  $p = 0,05$ ) zum Verlauf der Progesteronkonzentration.

### 4.5.2 Expression des PR und ER

Die Expression des PR und ER in den Luteinzellen (positive + schwach positive) wies in den Randfeldern und mittleren Feldern eine schwach signifikant positive Korrelation auf ( $r = 0,466$ ;  $p = 0,038$ ;  $r = 0,501$ ;  $p = 0,024$ ). Diese Korrelation blieb bei der getrennten Betrachtung der positiven und schwach positiven Zellen erhalten.

Bei den sonstigen Zellen war die Zahl der PR- und ER-negativen Zellen in den Randfeldern und mittleren Feldern positiv korreliert ( $r = 0,649$ ,  $p = 0,002$  bzw.  $r = 0,654$ ,  $p = 0,002$ ). Auch die Gesamtzahl der PR- und ER-positiven Zellen war positiv korreliert ( $r = 0,481$ ;  $p = 0,032$  bzw.  $r = 0,482$ ;  $p = 0,031$ ).

Tabelle 1 gibt eine Übersicht der erhaltenen Korrelationen.

## Ergebnisse

---

Tabelle 1 – Anhand der Absolutwerte ermittelte Korrelationen

Verglichene Parameter	r	p
PR-M-Lz-n- x PKonz	+ 0,490	0,028
PR-M-Lz- <i>psp</i> x ER-M-Lz- <i>psp</i>	+ 0,501	0,024
PR-R-Lz- <i>psp</i> x ER-R-Lz- <i>psp</i>	+ 0,466	0,038
PR-M-Lz- <i>p</i> x ER-M-Lz- <i>p</i>	+ 0,518	0,019
PR-R-Lz- <i>p</i> x ER-R-Lz- <i>p</i>	+ 0,475	0,034
PR-R-sZ-n x ER-R-sZ-n	+ 0,649	0,002
PR-M-sZ-n x ER-M-sZ-n	+ 0,654	0,002

PR = Progesteronrezeptor; ER = Estrogenrezeptor; R = Randfeld; M = Mittlere Felder; Lz = Luteinzellen; sZ = sonstige Zellen; p = positive; *sp* = schwach positive; *psp* = positive + schwach positive; n = negative; r = Korrelationskoeffizient; p = Irrtumswahrscheinlichkeit; + = positiv korreliert.



## 5 Diskussion

### 5.1 Diskussion des Versuchsaufbaues

Im Hinblick auf die den Untersuchungen zugrunde liegende These, dass auch beim Hund luteales Progesteron und Estradiol-17 $\beta$  als parakrine Faktoren wirken, war es Ziel vorliegender Arbeit, Informationen über die Expression von PR und ER im Corpus luteum zu erhalten. Entsprechende Angaben konnten bis zum Zeitpunkt der Fertigstellung der Arbeit in der Literatur nicht gefunden werden. Da weiter davon ausgegangen wurde, dass eine eventuelle Expression von PR und ER mit dem Funktionszustand des Corpus luteum korreliert, wurden die Untersuchungen im späten Östrus sowie dem frühen und mittleren Diöstrus durchgeführt, d. h. in der Phase, in der es nach zunächst weiter ansteigenden Progesteronwerten zu einem ersten Abfall der Progesteronsekretion kommt (s. Abb. 13).

### 5.2 Diskussion der Methodik

#### 5.2.1 Immunhistochemischer Rezeptornachweis

Die Darstellung von PR und ER im Corpus luteum der Hündin erfolgte mittels immunhistochemischer Nachweisverfahren. Der Vorteil dieser Methode liegt einmal darin, dass sie mit wenig Probenmaterial durchgeführt werden kann. Zudem kann eine genaue Identifizierung der die Rezeptoren exprimierenden Zellpopulation erfolgen (Thorpe, 1987; Helin et al., 1989; Pertschuck et al. 1990). Eine quantitative Auswertung wie beim Rezeptorligandbindungstest (s. z. B. Klauke und Hoffmann, 1992; Büttner 2001) ist allerdings nicht möglich - allenfalls eine semiquantitative -, da zwar der Anteil der den Rezeptor exprimierender Zellen bestimmt werden kann, nicht aber die Rezeptorkonzentration in der Zelle selbst. Des Weiteren können die Ergebnisse von der Art des verwendeten Antikörpers abhängig sein (Goussard, 1998), worauf in Abschnitt 5.2.1.1 nochmals ausführlich eingegangen wird.

In vorliegender Arbeit wurden bei der Durchführung des immunhistochemischen Nachweises stets Kontrollschnitte mitgeführt. Dabei wurde als sogenannte Isotypenkontrolle bei jeder Probe ein Schnitt nicht mit dem antigenspezifischen Primärantikörper sondern mit einem „nonsens“ Antikörper des gleichen Isotyps überschichtet, d. h. einem Antikörper, der gegen ein Antigen gerichtet ist, das beim Hund nicht vorkommt. So konnte ausgeschlossen werden, dass der beobachteten Farbreaktion eine Bindung des 1. Antikörpers an ein nicht definiertes Protein zugrunde lag. Gleichzeitig konnte an solchen Kontrollschnitten bei alleiniger Inkubation mit dem 2. Antikörper gezeigt werden, dass das sekundäre System, d.h. zweiter Antikörper, ABC-System und Chromogen, kein unspezifisches Signal produziert und es zu falsch positiven Ergebnissen

kommt (siehe Abb. 9 und 12). Weiterhin wurde als Positivkontrolle in jedem Test ein Objektträger mit Gewebeschnitten mitgeführt, in denen das jeweils nachzuweisende Antigen vorkam. Dazu dienten sowohl für den PR als auch den ER Schnitte vom Uterus einer am Tag 15 nach der Ovulation kastrierten Hündin (Büttner 2001). Durch das Mitführen dieser Schnitte war es weiterhin möglich, die Tests über die Zeit zu vergleichen und somit vor allem falsch negative Ergebnisse zu vermeiden (siehe Abb. 5 und 6). Die schnittinternen positiven Kontrolle (Granulosazellen, s. Abb. 5) dienten insbesondere der Objektivierung der Beurteilung der Signalstärke in den Lutealzellen, da die Granulosazellen immer positiv und nie schwach positiv waren.

### 5.2.1.1 Nachweis von ER mittels Immunhistochemie

Der Einsatz von rekombinanten Proteinen zur Induktion von Immunreaktionen ist effektiver als eine durch Peptide induzierte Immunität, da aufgrund der Molekülgröße mehrere Epitope als Antigene zur Verfügung stehen. Bei der Herstellung monoklonaler Antikörper ergibt sich daraus eine höhere Zahl von potentiellen Hybridomen, aus denen der effektivste Klon ausgewählt werden kann. Der für die Hauptversuche eingesetzte monoklonale Primärantikörper aus dem Klon 6F11 wurde auf dieser Weise produziert und zeigt nach Untersuchungen von Bevitt et al. (1997) eine spezifische Bindung an den ER bei in Paraffin eingebettetem Gewebe. In den vorliegenden Untersuchungen konnte die nukleäre Lokalisation des ER in den Kontrollgeweben Endometrium (externe Kontrolle) und Follikel (interne Kontrolle) dargestellt werden. Auch im CL der Hündin ergaben sich bei Anwendung dieses Antikörpers spezifische nukleäre Reaktionen in den Lutein-, Stroma- und Endothelzellen (s. Abb. 12). Entgegen den Angaben vom Hersteller ergaben sich jedoch in einigen Luteinzellen auch zytoplasmatische Signale; diese traten aber immer zusammen mit einer nukleären Färbung auf. Dies kann mit der Verteilung der Rezeptoren in der Zelle erklärt werden, wie weiter in Kap. 5.3.1 beschrieben wird (s. S. 60).

Die beiden anderen in den Vorversuchen ausgetesteten ER-spezifischen Antikörper waren die Klone 1D5 und AER314.

Bei dem Klon AER314 handelt es sich um einen murinen Antikörper, welcher das Epitop mit den Aminosäuren 120-170 (Domäne B) des N-Terminus des bovinen ER erkennt. Bei Schnitten vom Ovar ergaben sich mit diesem Antikörper in den Granulosazellen der Follikel (interne Kontrolle) deutlich positive nukleäre Reaktionen, während die Luteinzellen, anders als bei Klon 6F11, ein rein zytoplasmatisches Signal zeigten; in den Stromazellen war kein Signal vorhanden. Im Endometrium vom Hund (externe Kontrolle) zeigten die epithelialen Anteile sowie Stromazellen deutliche positive nukleäre Reaktionen, bei den Myometriumszellen reagierten sowohl Kern als auch Zytoplasma positiv. Warum Klon AER314 in den Luteinzellen – im Gegensatz zu den

Granulosazellen – nur die zytoplasmatische Form des ER erkennt, entzieht sich einer Interpretation. Im Hinblick auf die bei den beiden anderen Antikörpern erzielten Ergebnisse (s. o. bzw. s. u.) wurde daher auf weitere Untersuchungen mit diesem Klon verzichtet.

Der Antikörper 1D5 ist ein monoklonaler Maus IgG<sub>1</sub>-Antikörper, der gegen ein Epitop innerhalb der A/B-Domäne des humanen ER $\alpha$  (Al Saati et al., 1993) gerichtet ist. Er zeigt beim Menschen ein spezifisches Signal beim Nachweis des ER in Formalin-fixiertem und gefrorenem Gewebe (Al Saati et al., 1993; Sierralta und Thole, 1996; Ravn et al., 1998). Auch mit diesem Antikörper zeigten sich in den epithelialen Zellen des Endometriums und einigen Stromazellen deutlich positive nukleäre Reaktionen, während die Myometriumszellen sowohl im Kern als auch im Zytoplasma positive Reaktionen zeigten. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Befunden von De Cock et al. (1997), die für ihre Untersuchungen ebenfalls diesen Klon eingesetzt hatten. In den Vorversuchen zeigte sich am Corpus luteum ein deutlich positives Signal in einigen Zellkernen der Lutein- und Stromazellen sowie ein zytoplasmatisches Signal in wenigen Luteinzellen. Da in diesem Vorversuch allerdings auch in der Isotypenkontrolle ein leichtes Singal zu finden war, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um eine unspezifische Bindung handelt.

Der Unterschied in den Ergebnissen bei der Verwendung verschiedener Antikörper kann mit der Lage der Epitope im Rezeptormolekül sowie der Anwesenheit von am Rezeptor gebundenem „Heat-Shock-Protein“ zusammenhängen (Smith und Toft, 1993; Kaufmann et al., 1998). In einer vergleichenden Studie von Bevit et al. (1997) mit den Klonen 6F11 und 1D5 zeigte sich, dass in 50 von 55 Fällen übereinstimmende Ergebnisse erzielt werden konnte. In 5 Fällen zeigte sich eine Färbung nur mit dem Klon 6F11. Dies deutet darauf hin, dass das von dem Klon 6F11 erkannte Epitop besser exprimiert wird und der Antikörper eine höhere Bindungsaffinität zu seinem Epitop hat (Bevitt et al., 1997; Kaufmann et al., 1998). Aus diesem Grund und weil mit dem Klon 6F11 eine preiswertere Alternative des ER-nachweises möglich war, wurde auch auf weitere Vorversuche mit dem Klon ID5 verzichtet.

### 5.2.1.2 Nachweis von PR mittels Immunhistochemie

Erfahrungen der Arbeitsgruppe Hoffmann zeigten, dass mit dem Klon 10A9 sowohl bei der Hündin (Hoffmann und Büttner, 1998) als auch beim Rind (Schuler et al., 1999) Progesteronrezeptoren spezifisch nachzuweisen sind. Der Klon 10A9 erkennt ein Epitop, das aus den letzten 12 Aminosäuren des Carboxyendes des humanen PR-Proteins gebildet wird. Bei den Spezies Mensch (Misrahi et al., 1987), Maus (Schott et al., 1991), Huhn (Conneely et al., 1986), Kaninchen (Loosfelt et al., 1986), Ratte (Park und Mayo, 1991) und Hund (Latinga-van Leeuwen et al., 2000) stimmt die Sequenz des Epitops vollständig überein, Unterschiede im Hinblick auf Isoformen des PR bestehen offensichtlich

ebenfalls nicht. Mit diesem Antikörper werden somit alle drei Isoformen nachgewiesen (s. S. 23), so dass eine Aussage über den Gesamtrezeptorgehalt gemacht wird. Da bei der Durchführung der Vorversuche beim Einsatz des isotypischen Kontrollantikörpers kein Signal erhalten wurde, konnten isotyp-bedingte falsch positive Ergebnisse ausgeschlossen werden. Aus den obengenannten Gründen wurden hier keine weiteren Antikörper ausgetestet.

### 5.3 Diskussion der Ergebnisse

#### 5.3.1 Nachweis von PR und ER

Zu allen Untersuchungszeitpunkten ergaben sich Färbereaktionen, die das Vorkommen von PR und ER sowohl in den Luteinzellen als auch in den sonstigen Zellen anzeigten, wobei bei den Luteinzellen im Hinblick auf die nukleäre Reaktion zwischen „positiven“ und „schwach positiven“ Zellen differenziert werden konnte. Daneben ergaben sich auch zytoplasmatische Signale. Weiterhin zeigten sich, bezogen auf die Lokalisation, Unterschiede in der Dichte rezeptorpositiver Zellen. Nur für den PR ließ sich ein Bezug zum Zeitpunkt der Probenentnahme feststellen. Diese Befunde weisen erstmals darauf hin, dass auch beim Hund den lokal im CL gebildeten Sexualhormonen Progesteron und Estradiol-17 $\beta$  eine parakrine bzw. autokrine Funktion zukommt.

Diese Befunde liefern erstmals eine Erklärung für die Beobachtung, dass bei der Hündin nach Anwendung hoch dosierter Antigestagene (Concannon, 1990; Blendingen, 1995; Hoffmann et al, 2000), nicht aber bei niedrigeren Dosierungen (Gerres, 1991) eine verzögerte Luteolyse beobachtet werden konnte. Nachdem dieser Effekt bisher nicht über Interaktionen mit den Hypothalamisch-hypophysären Regelzentren erklärt werden konnte, bietet sich nun an, eine direkte Blockierung der Wirkung von Progesteron auf der Ebene des CL zu unterstellen.

Schwach positive und positive Luteinzellen: Die Intensität der Darstellung nukleärer PR und ER in den Luteinzellen ließ eine Einteilung in zwei Kategorien zu: in schwach braun gefärbte Kerne (schwach positive Luteinzellen) und in deutlich braun gefärbte Kerne (positive Luteinzellen – s. Seite 49 und 53). Diese unterschiedliche Ausprägung des Signals ergibt sich einmal aus der Quantität der Expression der Rezeptoren in den Luteinzellen, teilweise aber auch aus der Größe der Zelle und des Zellkerns, die weitgehend von der Ebene abhängt, in der die Zelle angeschnitten wurde. Die Auswertung der Gesichtsfelder wurde jedoch stets von der gleichen Person durchgeführt, so dass die leicht subjektive Bewertung des Signals bei dieser Unterteilung immer die gleiche blieb.

Für die statistische Auswertung wurden zunächst schwach positive und positive Luteinzellen als eine einheitliche Gruppe positiver Zellen bewertet. In Ergänzung dazu wurde

## Diskussion

---

zudem getrennt mit schwach positiven und positiven Luteinzellen gerechnet. Dabei ergaben sich keine Unterschiede.

Zytoplasmatisches Signal: Neben dem nukleären Signal zeigten die ER- sowie PR-positiven Luteinzellen auch eine zytoplasmatische Färbung. Da die diffusen zytoplasmatischen Reaktionen nicht in den mit dem isotypischen Kontrollantikörper inkubierten Schnitten vorhanden waren, wurden sie als spezifisches Signal bewertet. Die zelluläre Verteilung der Steroidrezeptoren, insbesondere der PR, wurde von Guiochon-Mantel et al. (1991) genauer untersucht. Ihre Ergebnisse zeigten, dass die nukleäre Lokalisation der PR eine dynamische Situation widerspiegelt, d.h. der Rezeptor diffundiert kontinuierlich in das Zytoplasma und wird konstant und aktiv, d.h. unter Energieaufwand, zurück in den Kern transportiert. Dieses Modell steht in Übereinstimmung mit der These, dass die Bildung des Hormon-Rezeptor-Komplexes im Zytoplasma erfolgt (Perrot-Appianat et al., 1986). In der gleichen Studie ergaben sich entsprechende Gegebenheiten für den ER, wie sie bereits von Miller und Toft (1983) beobachtet worden waren. Diese konnten auch zeigen, dass ein Energiemangel in der Zelle zu einem Efflux von ER aus dem Kern in das Zytoplasma führt.

Lokalisation der nukleären PR und ER: Bei vorliegenden Untersuchungen zeigte sich ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,004$ ) in der Verteilung der PR- bzw. ER-positiver Luteinzellen und sonstiger Zellen; so war die Konzentration in den Randfeldern höher als in den mittleren Feldern. Ein durch Austrocknung im Randbereich des Schnittes bedingter Artefact, der sich in einer unspezifischen zytoplasmatischen und nukleären Färbung zeigt, konnte jedoch durch die gleichzeitige Beurteilung der Negativkontrollen ausgeschlossen werden.

Bei Erfassung der Korrelationen zeigte sich, dass die Progesteron-Konzentration im peripherem Plasma positiv mit den PR-negativen Luteinzellen in der Mitte des CL und negativ mit den PR-schwach positiven Luteinzellen am Rand des CL korreliert war. Die Tatsache, dass entsprechende Korrelationen nicht für die Gesamtzahl (Rand und Mitte) PR-negativer bzw. positiver Zellen errechnet werden konnte, läßt möglicherweise auf einen Gradienten der Progesteronkonzentration im CL schließen. Auf einen solchen Gradienten deutet auch die spezifische Anreicherungen steroidogener Enzyme in den Randbereichen hin (Nishiyama et al., 1999). Möglicherweise weisen diese Befunde auf spezielle Regulationsmechanismen der Rezeptorexpression bei hohen lokalen, die peripheren Werte um das 1000-fache übersteigende Ligandkonzentrationen hin (Misao et al., 1998b).

Corpora lutea aus den linken und rechten Ovarien zeigten keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ ) in Beziehung zur PR- und ER-Expression, wie auch De Cock et al. (1997) für die ER-Expression am Ovar des Hundes feststellten.

### 5.3.2 Zyklusbezogenheiten der Expression von PR und ER im CL der Hündin

#### 5.3.2.1 Progesteronrezeptor

Die Expression des PR wies signifikante Beziehungen ( $p < 0,001$ ) zum Zeitpunkt der Probenentnahme, d. h. zum Verlauf des Zyklus auf. So wurde ein Abfall der den PR-exprimierenden Luteinzellen vom Tag 5 auf den Tag 15 nach der Ovulation und ein Anstieg ab dem 25.-35. Tag nach der Ovulation festgestellt. Dieser Verlauf ist gegensätzlich zur lutealen Funktion, gemessen an den Progesteronwerten im peripheren Plasma; d.h. mit steigender lutealer Progesteronproduktion werden weniger PR exprimiert. Entsprechend verlief auch die Expression des PR in den sonstigen Zellen im Lutealgewebe; d. h. auch hier wurde ein Abfall der Expression vom 5. zum 15. Tag nach der Ovulation, gefolgt von einem Anstieg, beobachtet (s. Seite 47 und 48).

Damit ergibt sich für den Verlauf der PR im CL der Hündin ein ähnliches Bild wie für den Verlauf der PR im Endometrium, wie es für den Hund von Johnston et al. (1985), Lessey et al. (1988), Donnay et al. (1995a), Dhaliwal et al. (1997), Vermeirsch et al. (2000) und Büttner (2001) beschrieben wurde. Dort wurde einen Abfall der PR-Konzentration in allen untersuchten Zelltypen des Uterus der Hündin vom frühen (Tag 15 nach der Ovulation) zum mittleren Diöstrus (Tag 30 bis 45 nach der Ovulation), gefolgt von einem Anstieg im späten Diöstrus und frühen Anöstrus, beobachtet. In normalem Mammagewebe der Hündin zeigte sich, dass die PR Expression bei anöstrischen Hündinnen am höchsten ist (Donnay et al., 1995b).

Auch bei der Frau konnte gezeigt werden, dass PR im CL exprimiert werden. Misao et al. (1998a,b) bestimmten mittels RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) und Southern blot die Expression der mRNA für den PR-A und PR-B in Bezug zur Sekretionsphase des Endometriums. Mittels Western blot wurde ergänzend festgestellt, dass PR-A und PR-B mit der entsprechenden mRNA positiv korrelieren, wobei in jedem Fall die Expression von PR-A dominierte. Für beide Rezeptoren ergaben sich die niedrigsten mRNA-Konzentrationen in der späten Sekretionsphase nach bereits abgefallenen Progesteron-Werten. In einem gewissen Widerspruch zu dieser Feststellung steht die Aussage, dass die Expression der PR-B mRNA negativ korreliert war mit der Progesteronkonzentration im Serum, was in Übereinstimmung ist mit den eigenen Beobachtungen. Im Ovar und CL des Affen wurde dagegen vor allem die Isoform PR-B nachgewiesen (Duffy et al., 1997), die im Gegensatz zur Situation beim Menschen in den verschiedenen Stadien der Lutealphase relativ konstant exprimiert wurde; der PR-A-Gehalt war vom Beginn der Lutealphase an niedriger als der PR-B-Gehalt und fiel im weiteren Verlauf weiter ab. Dies führte zu einer Erhöhung des Verhältnisses von PR-B : PR-A von der frühen zur späten Lutealphase, was darauf hindeutet, dass die Wirkung von Progesteron im CL von Veränderungen

im Verhältnis der PR-Isoformen moduliert wird. Die eigenen Untersuchungen zeigen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen beim Affen eine höhere Expression der PR in der frühen als mittleren Lutealphase.

### 5.3.2.2 Östrogenrezeptor

In vorliegenden Untersuchungen konnte eine Zyklusbezogenheit der Expression des ER im CL der Hündin für den Zeitraum vom 5. bis 45. Tag nach Ovulation nicht aufgezeigt werden. Auf eine Zyklusbezogenheit weist allerdings die positive Korrelation zwischen den PR- und ER-positiven Luteinzellen ( $r = 0,466$ ;  $p = 0,038$ ) wie auch für die sonstigen Zellen ( $r = 0,649$ ,  $p = 0,002$ ) hin. Es ist davon auszugehen, dass sich dieser Widerspruch bei Erhöhung der Stichprobengröße auflöst. Der Befund läßt jedoch unzweifelhaft erkennen, dass die Feinabstufung der Expression der ER im CL ein Progesteron vermittelter Effekt ist, was in Übereinstimmung ist mit den im CL während des erfassten Zeitraumes gleichbleibend niedrig verlaufenden Estradiol-17 $\beta$ -Werten im peripheren Plasma. Der Befund einer positiven Korrelation der Expression des ERa mit den PR im CL steht in Übereinstimmung mit zahlreichen entsprechenden Befunden in anderen Geweben, wie z. B. dem Mammagewebe von Hund, Ratte und Mensch (Baker et al., 1992; Donnay et al., 1995a,b; Kurita et al., 2001). Auch im tumorösen Mammagewebe wurde eine entsprechende Korrelation bestätigt (Donnay et al., 1995b). Bocklehurst et al. (1989) und Vermeirsch et al. (2000) leiten daraus ab, dass das Vorhandensein von PR als Indikator für das Vorhandensein funktioneller ER dienen kann. Dies steht allerdings in einem gewissen Widerspruch zu der klassischen Arbeitshypothese, dass sich die Aufregulation des PR aus der Aufregulation des ER ergibt (s. Kap. 2.5.4). Möglicherweise wird daher die Expression von PR von oder über einem weiteren Faktor oder eine spezifische Isoform des ER reguliert (Kurita et al., 2001).

Anders als im CL wurde in den sekundären Geschlechtsorganen eine deutliche Zyklusabhängigkeit in der Expression des ER beobachtet. Im Endometrium ist die Expression des ER sowohl im glandulären und luminalen Epithel als auch im Myometrium während des Östrus am höchsten und fällt während des Diöstrus deutlich ab, um zum späten Diöstrus und frühen Anöstrus wieder auf hohe Werte anzusteigen (Donnay et al., 1995a; Dhaliwal et al., 1997; Hoffmann und Büttner, 1998; Büttner, 2001). In Übereinstimmung mit den Befunden im CL ist auch hier davon auszugehen, dass sich im Hinblick auf die konstant im unteren Bereich verlaufende Estradiol-17 $\beta$ -Konzentration die beobachteten Veränderungen aus einer Downregulation des ER durch die hohe Progesteronwerte im Diöstrus ergeben. Es überrascht daher, dass genau umgekehrt im Mammagewebe der Hündin signifikante höhere ER-Konzentrationen in der lutealen Phase als im Proöstrus, Östrus oder im Anöstrus festgestellt wurden (Donnay et al., 1995b). Eine Erklärung für

dieses Phänomen kann nicht gegeben werden. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass es, wie Beobachtungen bei der Frau (Miller und O'Neill, 1987) und Kuh (Janowski et al., 2000) gezeigt haben, in der Mamma zu einer aktiven Verstoffwechslung ovarieller Steroide kommt, die eine spezifische Regulation der ER-Expression in diesem Organ gestatten würde.

Inwieweit die Regulation der Expression der ER im CL von der lokalen Verfügbarkeit von Progesteron und Estradiol-17 $\beta$  abhängt, kann derzeit nur spekulativ vermutet werden. Angaben über die lokalen Konzentrationen liegen nicht vor und konnten auch bei Durchführung der vorliegenden Untersuchungen mangels ausreichenden Probenmaterials nicht durchgeführt werden. Der Verlauf der Hormonspiegel in der peripartalen Phase legt jedoch nahe, dass luteales Estradiol-17 $\beta$  gebildet und sezerniert wird (Hoffmann et al., 1992).

Kritisch muss angemerkt werden, dass die bisherigen Aussagen zum Vorkommen von ER im CL beim Hund dadurch eingeschränkt sind, dass bisher nur der ER $\alpha$  und nicht auch der ER $\beta$  erfasst wurde. So haben Untersuchungen am CL der Ratte gezeigt, dass neben dem ER $\alpha$  auch der ER $\beta$ , in allerdings deutlich niedrigeren Konzentrationen, durch RT-PCR und RPA (ribonuclease protection assay) nachweisbar war. Damit ergab sich für das CL eine andere Situation als für den Follikel, wo in den Granulosazellen eine 2-3mal höhere Expression des ER $\beta$  als des ER $\alpha$  gefunden wurde (Tetsuka et al., 1998); die läßt auf unterschiedliche, noch zu definierende Regulationsmechanismen schließen. Beim Affen (Duffy et al., 2000) konnte in Übereinstimmung mit den eigenen Untersuchungen zwischen den verschiedenen Stadien der Lutealphase im CL keine Veränderungen der ER $\alpha$  mRNA und des Proteins nachgewiesen werden, die Expression des ER $\beta$  mRNA und des entsprechenden Proteins wies dagegen einen Anstieg während der mittleren bis späten lutealen Phase auf, gefolgt von einem Abfall in der späten Lutealphase. Die Autoren schloßen daraus, dass Progesteron hemmend auf die Expression des ER $\beta$  zu wirken scheint, so dass eine Verringerung der Progesteron Konzentration zu einer Steigerung der Sensitivität des CL auf Estradiol-17 $\beta$  in der späten Lutealphase führen kann.

Bei der Frau fanden sich beide Isoformen während der verschiedenen Stadien der Lutealphase zu gleichen Anteilen im CL (Misao et al., 1999). Die geringsten Konzentrationen wurden in der späten Lutealphase gemessen, zudem zeigten sich keine Änderungen im Verhältnis ER $\alpha$  : ER $\beta$  während des gesamten Zyklus.

### **5.3.3 Veränderungen in der Morphologie der Luteinzellen während des Zyklusverlaufes**

In den vorliegenden Untersuchungen konnten von Tag 5 auf Tag 45 morphologische Veränderungen der Luteinzellen beobachtet werden, die sich vor allem in einer Zunahme zytoplasmatischer Vakuolen zeigten. Dieses Phänomen wurde bei der Hündin bereits von Abel



## Diskussion

---

et al. (1975b) und Dore (1989) beschrieben und reflektiert eine physiologische Lipideinlagerung, zu der es im Zusammenhang mit der Steroidbiosynthese kommt. Entsprechende Beobachtungen liegen für die Katze (Guraya, 1969), Kuh (Priedkalns und Weber, 1968), Stute (Levine et al., 1979) und das Schwein (Mirecka, 1969) vor. Der Hauptunterschied zwischen diesen Spezies und dem Hund liegt darin, dass bei der Hündin dieser Prozess langsamer und allmählicher erfolgt. Dies gibt den Luteinzellen die Möglichkeit, sich an diese Situation zu adaptieren und längere Zeit relativ intakt zu bleiben (Dore, 1989), bevor sie in die Apoptose übergehen (Leiser und Meyer unveröffentlichte Daten).

### 6 Zusammenfassung

Nachdem weder ein uterines Luteolysin noch ein Mangel an Gonadotropinen (LH, Prolaktin) kausal mit der ab dem ersten Drittel des Diöstrus einsetzenden Luteolyse in Zusammenhang gebracht werden kann, lag vorliegender Arbeit die Arbeitshypothese zugrunde, dass auch beim Hund – analog zur Situation bei anderen Spezies – luteale Steroidhormone als parakrine/autokrine Faktoren eine Rolle bei der Steuerung der Corpus luteum Funktion spielen.

Da eine solche Wirkung an die Expression spezifischer Rezeptoren gebunden ist, war es Ziel vorliegender Arbeit im Hinblick einer Verifizierung der aufgestellten These, die Expression von Progesteron- und Östrogenrezeptoren im Verlauf des Diöstrus im Corpus luteum in graviden Hündinnen zu erfassen.

Die Untersuchungen erfolgten immunhistochemisch unter Verwendung spezifischer Antikörper und Einbeziehung externer und interner Kontrollen.

Bei jeweils 4 Hündinnen unterschiedlicher Rassen wurden an den Tagen 5, 15, 25, 35 und 45 nach der Ovulation die Ovarien mittels Ovariohysterektomie entnommen, die Corpora lutea separiert, und für die Immunhistochemie in 4% Lilliformol fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. 3 mm dicke Schnitte, aufgezogen auf mit Aminopropyltriethoxysilan beschichtete Objektträger, wurden durch eine Xylol-Alkohol Reihe entparaffiniert, rehydriert und zur Demaskierung der Epitope einer Mikrowellenbehandlung mit Citratpuffer unterzogen. Zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase folgte eine Überschichtung mit Wasserstoffperoxid in PBS-Puffer, zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen die Überschichtung mit inaktiviertem Pferdeserum; es schloss sich der immunhistochemische Rezeptornachweis an. Zum Nachweis von Progesteron- und Estradiol-17 $\beta$ -Rezeptoren kamen Antikörper aus dem Klon 10A9 bzw. 6F11 zur Anwendung. Externe Kontrolle war Uterusgewebe vom 15. Tag post ovulationem, interne Kontrollen waren die periluteal liegenden Follikel. Zur Überprüfung unspezifischer Bindung an caninem Gewebe wurden in jedem Test zusätzliche Schnitte mitgeführt, bei denen der spezifische Primärantikörper durch einen “nonsens” Antikörper aus dem Klon 7T4-1F5 bzw. CBL-600 in entsprechender Endverdünnung des Proteins ersetzt wurde. Die lichtmikroskopische Auswertung der Präparate erfolgte bei 400-facher Vergrößerung.

Pro Hund wurde ein Paraffinblock, d. h. ein Corpus luteum, herangezogen. Von diesem Block wurden 3 Schnitte gefärbt. Ausgezählt wurden je nach Schnitt 13 bis 21 Gesichtsfelder, wobei einem imaginären Kreuz gefolgt wurde. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogrammpaket BMDP/Dynamic, Release 7.0 (Dixon 1993).

Zu allen Untersuchungszeitpunkten ergaben sich Färbereaktionen, die das Vorkommen von PR und ER sowohl in den Luteinzellen als auch in den sonstigen Zellen anzeigten, wobei

## Zusammenfassung

---

bei den Luteinzellen im Hinblick auf die nukleäre Reaktion zwischen „positiven“ und „schwach positiven“ Zellen differenziert werden konnte. Daneben ergaben sich auch zytoplasmatische Signale. Weiterhin zeigten sich, bezogen auf die Lokalisation, mehr positive Reaktionen in den Randfeldern als in den mittleren Feldern. Nur für den PR ließ sich ein Bezug zum Zeitpunkt der Probenentnahme feststellen, obwohl die Expression des ER positiv mit der des PR korreliert war. Die Progesteronkonzentration im peripheren Plasma korrelierte negativ mit der Zahl der PR exprimierenden Luteinzellen und sonstigen Zellen. Diese Befunde weisen erstmals darauf hin, dass beim Hund den lokal im CL gebildeten Sexualhormonen Progesteron und Estradiol-17 $\beta$  eine parakrine bzw. autokrine Funktion bei der Regulation der CL-Funktion zukommt. Inwieweit die Regulation der Expression der ER und PR im CL von den lokalen Verfügbarkeit von Progesteron und Estradiol-17 $\beta$  abhängt, kann derzeit nur spekulativ vermutet werden.

### 7 Summary

In the dog neither an uterine luteolysine nor a lack of gonadotropins (LH, Prolactin) seem to be functionally correlated to luteolysis which commences after the first third of diestrus. As a result of these observations the hypothesis was developed that in the dog, as in other species, steroid hormones of luteal origin act as local paracrine/autocrine factors controlling luteal function.

In order to test for this hypothesis the present work deals with the determination of progesterone and estrogen receptors during the course of diestrus in corpora lutea of non-pregnant bitches. Immunohistochemical methods were applied using specific antibodies and adequate external and internal controls.

Four bitches of different breeds were ovariectomized on days 5, 15, 25, 35 and 45 after ovulation, corpora lutea were separated from the ovaries obtained, fixed with Lillie formole (4%) and embedded in paraffin; 3 mm thick slices were placed on slides coated with aminopropyltriethoxysilane. The samples were then deparaffinized and dehydrated by treatment with xylene and alcohol, followed by a microwave treatment in citrate-buffer for retrieval of epitopes. Endogenous peroxidase was inactivated by treatment with hydrogen peroxide in phosphate buffered solution, unspecific binding sites were blocked by incubation with horse serum prior to performing the immunocytochemical reaction. Antibodies derived from the clones 10A9 and 6F11 were used for detection of progesterone and estradiol-17 $\beta$  receptors, respectively. Uterine tissue obtained from a bitch 15 days after ovulation served as external control, follicles in periluteal position served as sample inherent (internal) controls. To test for unspecific binding in additional control samples the specific primary antibody was replaced by a nonsens-antibody derived from the clones 7T4-1F5 and CBL-600, respectively. Nonsens and primary antibodies were used in the same dilution. All slides were evaluated using a 400-fold magnification.

Evaluation was restricted to one corpus luteum per dog. From each corpus luteum 3 slides were prepared, evaluation followed an imaginary cross yielding between 13 to 21 views per slide. The program BMDP/Dynamic, Release 7.0 (Dixon 1993) was used for statistical evaluation.

At all time-points investigated positive staining reactions were observed, indicating the presence of progesterone and estradiol receptors in luteal cells as well as in other cells. In respect to luteal cells a distinction was possible between positive and weakly positive nuclear reactions. Luteal cells also showed a cytoplasmic signal. There was a higher incidence of positive stained cells in the periphery and only the expression of the progesterone receptor was correlated to the

## Summary

---

stage of cycle. However, expression of the estrogen receptor was also positively correlated to the expression of the progesterone receptor. Progesterone concentrations in peripheral plasma were negatively correlated to the number of luteal cells expressing the progesterone receptor and the other progesterone receptor-positive cells.

These are the first results indicating a paracrine/autocrine role of progesterone and estradiol in the regulation of luteal function in the dog. The observations warrant further studies to test for control of the expression of progesterone and estrogen receptors in the corpus luteum and the role of local luteal hormone concentrations.

## 8 Literaturverzeichnis

**ABEL, J. H., McCLELLAN, M. C., VERHAGE, H. G., NISWENDER, G. N. (1975a)**

*Subcellular compartmentalization of the luteal cell in the ovary of the dog.*

Cell Tiss. Res. 158: 461-480.

**ABEL, J. H., VERHAGE, H. G., McCLELLAN, M. C., NISWENDER, G. N. (1975b)**

*Ultrastructural analysis of the granulosa-luteal cell transition in the ovary of dog.*

Cell Tiss. Res. 160: 155-176.

**ADASHI, E. Y. (1992)**

*Intraovarian peptides. Stimulators and inhibitors of follicular growth and differentiation.*

Endocrinol. Metab. Clin. North Am. 21: 1-17.

**ADASHI, E. Y. (1994)**

*Endocrinology of the ovary.*

Hum. Reprod. 9: 815-827.

**AL SAATI, T., CLAMENS, S., COHEN-KNAFO, E., FAYE, J.C., PRATS, H., COINDRE, J.M., WAFFLART, J., CAVERIVIÈRE, P., BAYARD, F., DELSOL, G. (1993)**

*Production of monoclonal antibodies to human estrogen-receptor protein (ER) using recombinant ER (RER).*

Int. J. Cancer, 55: 651 – 654.

**ANDERSON, A. C. & SIMPSON, M. E. (1973)**

*The ovary and the reproductive cycle of the dog (Beagle).*

Geront-X, Los Altos, Calif.

**ANKRAPP, D.P., BENNETT, J.M., HASLAM, S.Z. (1998)**

*Role of epidermal growth factor in the acquisition of ovarian steroid hormone responsiveness in the normal mouse mammary gland.*

J. Cell Physiol. 174: 251-260.

**ARBEITER, K. (1994)**

*Anwendung von Hormonen in der Reproduktion von Hund und Katze.*

In: Veterinärmedizinische Endokrinologie (ed. F. Döcke)

Gustav Fischer Verlag Jena-Stuttgart, 823-841.

**ARONICA, S. M. & KATZENELLENBOGEN, B. S. (1991)**

*Progesterone receptor regulation in uterine cells: stimulation by estrogen, cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate, and insulin-like growth factor I and suppression by antiestrogens and protein kinase inhibitors.*

Endocrinology 128: 2045-2052.

**BAKER, V. A., PUDDEFOOT, J. R., MARSIGLIANTE, S., BARKER, S., GOODE, A. W., VINSON, G.P. (1992)**

*Oestrogen receptor isoforms, their distribution and relation to progesterone receptor levels in breast cancer samples.*

Br. J. Cancer 66:1083-1087.

**BEATO, M. (1989)**

*Gene Regulation by steroid hormones.*

Cell 56: 335-344.

**BENNETT, R. A., OSATHANONDH, R., YEH, J. (1996)**

*Immunohistochemical localization of transforming growth factor-alpha, epidermal growth factor (EGF), and EGF receptor in the human fetal ovary.*

J. Clin. Endocrinol. Metab. 81: 3073-3076.

**BERGMAN, M. D., SCHACHTER, B. S., KARELUS, K., COMBATSIARIS, E. P., GARCIA, T., NELSON, J. F. (1992)**

*Up-regulation of the uterine estrogen receptor and its messenger ribonucleic acid during the mouse estrous cycle: the role of estradiol.*

Endocrinology 130: 1923 – 1930.

**BEVITT, D. J., MILTON, J. D., PIGGOT, N., HENRY, L., CARTER, M. J., TOMS, G. L., LENNARD, T. J., WESTLEY, B., ANGUS, B., HORNE, C. H. W. (1997)**

*New monoclonal antibodies to estrogen and progesterone receptors effective for paraffin section immunohistochemistry.*

J. Pathol. 183: 228-232.

**BEYER, C., CANCHOLA, E., LARSSON, K. (1981)**

*Facilitation of lordosis behavior in the ovariectomized estrogen primed rat by dibutyryl cAMP.*

Physiol. Behav. 26: 249-251.

**BILL II, C. H. & KEYES, P. L. (1983)**

*17 $\beta$ -Estradiol maintains normal function of corpora lutea throughout pseudo-pregnancy in hypophysectomized rabbits.*

Biol. Reprod. 28: 608-617.

**BLACKMORE, P. F. & LATTANZIO, F. A. (1991)**

*Cell surface localization of a novel non-genomic progesterone receptor on the head of human sperm.*

Biochem. Biophys. Res. Commun. 181: 331-336.

**BLENDINGER, K. (1995)**

*Untersuchungen zum hormonellen Status von Hündinnen mit Pyometra und Effekte einer Antigestagenbehandlung auf den Krankheitsverlauf und die Uterusmorphologie.*

Inaugural-Dissertation Fachbereich Veterinärmedizin Justus-Liebig-Universität Gießen.

**BLONDEAU, R. M. & BAULIEU, E. E. (1984)**

*Progesterone receptor characterized by photoaffinity labelling in the plasma membrane of *Xenopus laevis* oocytes.*

Biochem. J. 219: 785-792.

**BOCKLEHURST, D., WILDE, C. E., FINBOW, J. A., BRETT, R., CHAMPION, A. E., DEWHURST, D. G. (1989)**

*Relative importance of estrogen and progesterone receptor assays as prognostic indicators in primary breast cancer: a short-term study.*

Clin. Chem. 35: 238-240.

**BOUCHARD, G. F., SOLORZANO, N., CONCANNON, P. W., YOUNGQUIST, R. S., BIRSCHWAL, C. J. (1991)**

*Determination of ovulation time in bitches based on teasing, vaginal cytology and elisa for progesterone.*

Theriogenology 35: 603-611.

**BRENNER, R. M., WEST, N. B., McCLELLAN, M. C. (1990)**

*Estrogen and progestin receptors in the reproductive tract of male and female primates.*

Biol. Reprod. 42: 11-19.

**BRESSION, D., MICHARD, M., LE DAFNIET, M., PAGESY, P., PEULLON, F. (1986)**

*Evidence for a specific estradiol binding site on rat pituitary membranes.*

Endocrinology 119: 1048-1051.

**BUKOWSKY, A., CAUDLE, M. R., KEENAN, J. A., WIMALASENA, J., UPADHYAYA, N. B., VAN METER, S. E. (1995)**

*Is corpus luteum regression an immune-mediated event? Localization of immune system components and luteinizing hormone receptor in human corpora lutea.*

Biol. Reprod. 53: 1373-1384.

**BÜTTNER, G. (2001)**

*Biochemische und Immunhistochemische Untersuchungen zum Vorkommen von Östrogen- und Progesteronrezeptoren im caninen Uterus im Verlauf des Diöstrus und frühem Anöstrus.*

Inaugural-Dissertation Fachbereich Veterinärmedizin Justus-Liebig-Universität Gießen.

**CAFFREY, J. L., FLETCHER, P. W., DIEKMAN, M. A., O'CALLAGHAN, P. L., NISWENDER, G. D. (1979)**

*The activity of ovine luteal cholesterol esterase during several experimental conditions.*

Biol. Reprod. 21: 601-608.

**CHAFFKIN, L. M., LUCIANO, A. A., PELUSO, J. J. (1993)**

*The role of progesterone in regulating human granulosa cell proliferation and differentiation in vitro.*

J. Clin. Endocrinol. Metab. 76: 696-700.

**CHANDRASEKHER, Y. A., BRENNER, R. M., MOLSKNESS, T. A., YU, Q., STOUFFER, R. L. (1991)**

*Titration of luteinizing hormone surge requirements for ovulatory changes in primate follicles. II. Progesterone receptor expression in luteinizing granulosa cells.*

J. Clin. Endocrinol. Metab. 73: 584-589.



**CHEN, S., ZANAGNOLO, V., PREUTTHIPAN, S., ROBERTS, K. P., GOODMAN, S. B., DHARMARAJAN, A. (1997)**

*The role of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and estradiol in rabbit corpus luteum progesterone production.*

Endocrine 6(1): 73-77.

**CHENG, C. Y., ROSE, R. J., BOETTCHER, B. (1981)**

*The binding of oestradiol-17beta to human spermatozoa – an electron microscope autoradiographic study.*

Int. J. Androl. 4: 304-313.

**CHRISTIANSEN (1984)**

*In: Reproduction in the Dog and Cat*

Bailliere Tindall, London.

**CHRISTIE, D. W., BAILEY, J. B., BELL, E. T. (1972)**

*Classification of cell types in vaginal smears during the canine oestrous cycle.*

Br. Vet. J. 128: 301-310.

**CONCANNON, P. W. (1980)**

*Effects of hypophysectomy and of LH administration on luteal phase plasma progesterone levels in the beagle bitch.*

J. Reprod. Fert. 58: 407-410.

**CONCANNON, P. W., WHALEY, S., ANDERSON, S. P. (1986)**

*Increased LH pulse frequency associated with termination of anestrus during the ovarian cycle of the dog.*

Biol. Reprod. 34, 119.

**CONCANNON, P. W., WEINSTEIN, P., WHALEY, S., FRANK, D. (1987)**

*Suppression of luteal function in dogs by luteinizing hormone antiserum and by bromocriptine.*

J. Reprod. Fertil. 81: 175-180.

**CONCANNON, P. W., McCANN, J. P., TEMPLE, M. (1989)**

*Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog.*

J. Reprod. Fert. Suppl. 39: 3-25.

**CONCANNON, P. W., YAEGER, A., FRANK, D., IYAMPILLAI, A. (1990)**

*Termination of pregnancy and induction of premature luteolysis by the antiprogesterone, mifipristone, in dogs.*

J. Reprod. Fert. 88: 99-104.

**CONCANNON, P. W. (1993)**

*Effects of contraceptive doses of the progestagen megestrol acetate on luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in female dogs.*

J. Reprod. Fert. Suppl. 47: 3-27.

- CONNELLY, O. M., SULLIVAN, W. P., TOFT, D. O., BIRNBAUMER, M., COOK, R. G., MAXWELL, B. L., ZARUCKI-SCHULZ, T., GREENE, G. L. (1986)**  
*Molecular cloning of the chicken progesterone receptor.*  
Science 223: 767-770.
- CONSTANTINO, C. X., KEYES, P. L., KOSTYO, J. L. (1991)**  
*Insulin-like growth factor-I stimulates steroidogenesis in rabbit luteal cell.*  
Endocrinology 128: 1702-1708.
- COUSE, J. F., LINDZEY, J., GRANDIEN, K., GUSTAFSSON, J.-A., KORACH, R. S. (1997)**  
*Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (Eralpha) and estrogen receptor-beta (Erbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse.*  
Endocrinology 138: 4613-4621.
- DAWOOD, M. Y., CHELLARAM, R., KAHN-DAWOOD, F. S. (1997)**  
*Interleukin-1 beta inhibits in vitro pulsatile progesterone secretion and stimulates prostaglandin F2alpha secretion by micro-retrodialysed baboon corpus luteum.*  
Horm. Metab. Res. 29: 483-490
- DE COCK, H., DUCATELLE, R., LOGGHE, J. P. (1997)**  
*Immunohistochemical localization of estrogen receptor in the normal canine female genital tract.*  
Domest. Anim. Endocrinol. 14: 133-147.
- DEVOTO, L., KOHEN, P., CASTRO, O., VEGA, M., TRONCOSO, J. L., CHARREAU, E. (1995)**  
*Multihormonal regulation of progesterone synthesis in cultured human mid luteal cells.*  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 80: 1566-1579.
- DHALIWAL, G. K., ENGLAND, G. C., NOAKES, D. E. (1997)**  
*Immunocytochemical localization of oestrogen and progesterone receptors in the uterus of the normal bitch during oestrus and metoestrus.*  
J. Reprod. Fertil. Suppl. 51: 167-176.
- DI BLASIO, A. M., VIGANÓ, P., FERRARI, A. (1994)**  
*Insulin-like growth factor-II stimulates human granulosa-luteal cell proliferation in vitro.*  
Fertil. Steril. 61: 483-487.
- DIXON, W. J. (1993)**  
*BMDP Statistical Software Manual, Vol 1 and 2.*  
University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London.
- DÖCKE, F. (1994a)**  
*Ovarialzyklus.*  
In: Veterinärmedizinische Endokrinologie; Hrsg: F. Döcke; Gustav Fischer Verlag Jena: 486- 508.

**DÖCKE, F. (1994b)**

*Wirkungen der Östrogene und Gestagene.*

n: Veterinärmedizinische Endokrinologie; Hrsg: F. Döcke; Gustav Fischer Verlag Jena: 486- 508.

**DODSON, W. C. & SCHOMBERG, D. W. (1996)**

*The effect of transforming growth factor- $\beta$  on follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cells.*

Endocrinology 120: 512-516.

**DONNAY, I., WOUTERS-BALLMAN, P., DEVLEESCHOUWER, N., LECLERCQ, G., VERSTEGEN, J. (1995a)**

*Changes in oestrogen, progesterone and epidermal growth factor receptor concentrations and affinities during the oestrous cycle in the normal mammary gland and uterus of dogs.*

Vet. Res. Commun. 19:101-113.

**DONNAY, I., RAUÏS, J., DEVLESSCHOUWER, N., WOUTERS-BALLMAN, P., LECLERCQ, G., VERSTEGEN, J. (1995b)**

*Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs.*

Am. J. Vet. Res. 56: 1188-1194.

**DORE, M. A. P. (1989)**

*Structural aspects of luteal function and regression in the ovary of domestic dog.*

J. Reprod. Fertil. Suppl. 39: 41-53.

**DUFFY, D. M. & STOUFFER, R. L. (1995)**

*Progesterone receptor messenger ribonucleic acid in the primate corpus luteum during the menstrual cycle: possible regulation by progesterone.*

Endocrinology 136: 1869-1876.

**DUFFY, D. M., WELLS, T. R., HALUSKA, G. J., STOUFFER, R. L. (1997)**

*The ratio of progesterone receptor isoforms changes in the monkey corpus luteum during the luteal phase of the menstrual cycle.*

Biol. Reprod. 57: 693-699.

**DUFFY, D. M., CHAFFIN, C. L., STOUFFER, R. L. (2000)**

*Expression of estrogen receptor alpha and beta in the rhesus monkey corpus luteum during the menstrual cycle: regulation by luteinizing hormone and progesterone.*

Endocrinology 141: 1711-1717.

**ENDO, T., HENMI, H., KITAJIMA, Y., NISHIKAWA, A., MANASE, K., YAMAMOTO, H., KUDO, R. (1998)**

*Effects of estradiol and an aromatase inhibitor on progesterone production in human cultured granulosa cells.*

Gynecol. Endocrinol. 12: 29-34.

- ENMARK, E., PELTO-HUIKKO, M., GRANDIEN, K., LAGERCRANZ, S., LAGERCRANZ, J., FRIED, G., NORDENSKJÖLD, M., GUSTAFSSON, J.-A. (1997)**  
*Human estrogen receptor  $\beta$ -gene structure, chromosomal localization and expression pattern.*  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 82: 4258-4265.
- ENGEL, E., KLEIN, R., HOFFMANN, B. (2001)**  
*Investigations of the expression of cytokines in the canine corpus luteum.*  
Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes 109 Suppl 1 p. 66.
- EVANS, R. M. (1988)**  
*The steroid and thyroid hormone receptor superfamily.*  
Science 240: 889-895.
- EVANS, R. M. & LEAVITT, W. W. (1980)**  
*Progesterone inhibition of uterine nuclear estrogen receptor dependence on RNA and protein synthesis.*  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5856-5860.
- FAIRCHILD, D. L. & PATE, J. L. (1991)**  
*Modulation of bovine luteal cell synthetic capacity by interferon-gamma.*  
Biol. Reprod. 44: 357-363.
- FELDMAN, E. C. & NELSON, R. W. (1987)**  
*Canine and feline reproduction.*  
In: Canine and feline Endocrinology and Reproduction. W.B. Saunders, Philadelphia, London, Toronto, 399-480.
- FERNANDES, P. A., BOWEN, R. A., KOSTAS, A. C., SAWYER, H. R., NETT, T. M., OLSON, P. N. (1987)**  
*Luteal function in the bitch: changes during diestrus in pituitary concentration and the number of luteal receptors for luteinizing hormone and prolactin.*  
Biol. Reprod. 37: 804-811.
- FINDLAY, J. K., SAI, X., SHUKORSKI, L. (1990)**  
*Role of inhibin-related peptides as intragonadal regulators.*  
Reprod. Fertil. Dev. 2: 205-218.
- FOXCROFT, G. R., ELSAESSER, F., STICKNEY, K., HAYNES, N. B., BACK, H. L. (1984)**  
*Ovarian estrogen-dependent maturation of the LH-FSH surge mechanism during prepubertal development in the gilt.*  
J. Endocrinol. 101: 371-380.
- FRIDEN, B. E., WALLIN, A., BRANNSTROM, M. (2000)**  
*Phase-dependent influence of nonsteroidogenic cells on steroidogenesis and rostaglandin production by the human corpus luteum.*  
Fertil. Steril. 73: 359-365

**GALAND, P., LERROY, F., CHRETIEN, J. (1971)**

*Effect of oestradiol on cell proliferation and histological changes in the uterus and vagina of mice.*

J. Endocrinol. 49: 243-251.

**GAYTÁN, F., MORALES, C., BELLIDO, C., AGUILAR, E., SÁNCHEZ-CRIADO, J. E. (1997)**

*Role of prolactin in the regulation of macrophages and in the proliferative activity of vascular cells in newly formed and regressing rat corpora lutea.*

Biol. Reprod. 57: 478-486.

**GAYTÁN, F., MORALES, C., GARCÍA-PARDO, L., REYMUNDO, C., BELLIDO, C., SÁNCHEZ-CRIADO, J. E. (1999)**

*A quantitative study of changes in the human corpus luteum microvasculature during the menstrual cycle.*

Biol. Reprod. 60: 914-919.

**GERRES, S. (1991)**

*Untersuchungen zur Bedeutung von Progesteron als Regelfaktor bei der Entstehung der Pseudogravidität der Hündin.*

Inaugural-Dissertation Fachbereich Veterinärmedizin Justus-Liebig-Universität Gießen.

**GIANGRANDE, P. H., POLLIO, G., McDONNELL, D. P. (1997)**

*Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of A and B isoforms of the human progesteron receptor.*

J. Biol. Chem. 272 32889-32900.

**GIBORI, G. & KEYES, P. L. (1978)**

*Role of intraluteal estrogen in the regulation of the rat corpus luteum during pregnancy.*

Endocrinology 102: 1176-1182.

**GOBBETTI, A., BOITI, C., CANALI, C., ZERANI, M. (1999)**

*Nitric oxide synthase acutely regulates progesterone production by in vitro cultured rabbit corpora lutea.*

J. Endocrinol. 160: 275-283

**GOODMAN, S. B., KUGU, K., CHEN, S. H., PREUTTHIPAN, S., TILLY, J. L., DHARMARAJAN, A. M. (1998)**

*Estradiol-mediated suppression of apoptosis in the rabbit corpus luteum is associated with a shift in expression of bcl-2 family members favoring cellular survival.*

Biol. Reprod. 59: 820-827.

**GÖRITZ, F., JEWGENOW, K., MEYER, H. D. (1996)**

*Epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in the ovary of the domestic cat (*Felis catus*).*

J. Reprod. Fert. 106: 117-124.

**GOUSSARD, J. (1998)**

*Paraffin section immunocytochemistry and cytosol-based ligand-binding assays for ER and PR detection in breast cancer: the time has come for more objectivity.*  
Cancer Lett. 132: 61-66.

**GRAZUL-BILSKA, A. T., REDMER, D. A., JABLONKA-SHARIFF, A., BIONDINI, M. E., REYNOLDS, L. P. (1995)**

*Proliferation and progesterone production of ovine luteal cells from several stages of the estrous cycle: effects of fibroblast growth factors and luteinizing hormone.*  
Can. J. Physiol. Pharmacol. 73: 491-500.

**GREENE, G. L., SOBEL, N. B., KING, W. J., JENSEN, E. V. (1984)**

*Immunochemical studies of estrogen receptors.*  
J. Steroid. Biochem. 20: 51-56.

**GREGORASZCZUK, E. L. (1983)**

*Steroid hormone release in cultures of pig corpus luteum and granulosa cells. Effect of LH, hCG, PRL and estradiol.*  
Endocrinol. Experim. 17: 59-63.

**GREGORASZCZUK, E. L. (1992)**

*Interrelationship between steroid hormone secretion and morphological changes of porcine corpora lutea at various periods of luteal phase.*  
Endocr. Reg. 26: 189-194.

**GREGORASZCZUK, E. L. & OBLONCZYK, K. (1996)**

*Effect of a specific aromatase inhibitor on oestradiol secretion by porcine corpora lutea at various stages of the luteal phase.*  
Reprod. Nutr. Dev. 36: 65-72.

**GRONEMEYER, H. (1992)**

*Control of transcription activation by steroid hormone receptors.*  
FASEB J. 6: 2524-2529.

**GUIOCHON-MANTEL, A., LESCOP, P., CHRISTIN-MAITRE, S., LOOSFELT, H., PERROT-APPLANAT, M., MILGROM, E. (1991)**

*Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor.*  
EMBO 10: 3851-3859.

**GURAYA, S. S. (1969)**

*Some observations on the histochemical features of developing follicle and corpus luteum in the cat and dog ovary.*  
Acta Vet. Acad. Sci. Hung. 19:351-362.

**GUTHRIE, H. D., GARETT, W. M., COOPER, B. S. (1998)**

*Follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I attenuate apoptosis in cultured porcine granulosa cells.*  
Biol. Reprod. 58: 390-396.

- HAZZARD, T. M. & STORMSHAK, F. (1997)**  
*Down-regulation of oxytocin receptors and secretion of prostaglandin F<sub>2</sub>alpha after chronic treatment of ewes with estradiol-17beta.*  
Biol. Reprod. 56: 1576-1581.
- HELIN, H. J., HELLE, M. J., KALLIONIEMI, O. P., ISOLA, J. J. (1989)**  
*Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptors in human breast carcinoma. Correlation with histopathology and DNA flow cytometry.*  
Cancer 63: 1761-1767.
- HILD-PETITO, S. & FAZLEABAS, A. T. (1997)**  
*Expression of steroid receptors and steroidogenic enzymes in the baboon (Papio anubis) corpus luteum during the menstrual cycle and early pregnancy.*  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 82: 955-962
- HINNEY, B., IMSE, V., GERLAND, W., HENZE, C., WUTTKE, W. (1995)**  
*Regulation of luteal function by luteinizing hormone and prolactin at different times of the luteal phase.*  
Eur. J. Endocrinol. 133: 701-717.
- HOFFMANN, B., SCHAMS, D., GIMÉNEZ, T., ENDER, M. L., HERRMANN, C., KARG, H. (1973)**  
*Changes of progesterone, total oestrogens, corticosteroids, prolactin and LH in bovine peripheral plasma around parturition with special reference to the effect of exogenous corticoids and a prolactin inhibitor respectively.*  
Acta Endocr. 73: 385-399.
- HOFFMANN, B., HÖVELER, R., HASAN, S. H., FAILING, K. (1992)**  
*Ovarian and pituitary function in dogs after hysterectomy.*  
J. Reprod. Fert. 96: 837- 845.
- HOFFMANN, B. & SCHNEIDER, S. (1993)**  
*Secretion and release of luteinizing hormone during the luteal phase of the oestrus cycle in the dog.*  
J. Reprod. Fert. Suppl. 47: 85-91.
- HOFFMANN, B., RIESENBECK, A., KLEIN, R. (1996)**  
*Reproductive endocrinology of bitches.*  
Anim. Reprod. Sci. 42: 275-288.
- HOFFMANN, B. & BÜTTNER, G. (1998)**  
*Biochemical and immunohistochemical investigations on the occurrence of the estrogen receptor in the canine uterus during the estrous cycle.*  
Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes 106. Suppl. 1 p. 42.
- HOFFMANN, B. & SCHULER, G. (2000)**  
*Receptor blockers general aspects with respect to their use in domestic animal reproduction.*  
Anim. Reprod. Sci. 2: 295-312

- HOFFMANN, B., LEMMER, W., BOSTEDT, H., FAILING, K. (2000)**  
Die Anwendung des Antigestagens Aglépristone zur konservativen Behandlung der Pyometra bei der Hündin.  
Tierärztl. Prax. 28: 323-329.
- HOLT, J. A., LORINCZ, M. A., KING, W. J. (1983)**  
*Monoclonal antibody recognition of estrogen receptor in rabbit corpus luteum.*  
Am. J. Physiol. 244: E494-8
- HORWITZ, K. B. & McGUIRE, W. L. (1980)**  
*Nuclear estrogen receptors.*  
J. Biol. Chem. 255: 9699-9705.
- HSUEH, A. J., PECK, E. J., CLARK, J. H. (1975)**  
*Progesterone antagonism of the estrogen receptor and estrogen induced uterine growth.*  
Nature 254: 337-339.
- HSUEH, A.J., PECK, E.J., CLARK, J.H. (1976)**  
*Control of uterine estrogen receptor levels by progesterone.*  
Endocrinology, 98, 438 - 444
- HURTWITZ, A., LAUFER, N., PALTI, Z., SCHENKER, J. B., VECSEI, P., ROSLER, A. (1989)**  
*In-vitro steroid production by human granulosa lutein cells in long-term cultures.*  
Gynecol. Endocrinol. 3: 203-211.
- HYNE, R. V. & BOETTCHER, B. (1977)**  
*The selective binding of steroids by human spermatozoa.*  
Contraception 15: 163-174.
- ING, N. H. & TORNESI, M. B. (1997)**  
*Estradiol up-regulates estrogen receptor and progesterone receptor gene expression in specific ovine uterine cells.*  
Biol. Reprod. 56: 1205-1215.
- JANOWSKI, T., ZDUNCZYK, S., MWAANGA, E. S., BABINSKI, J., RAS, A. (2000)**  
*In vivo and in vitro investigations on the synthesis of estradiol-17 $\beta$  by the bovine mammary gland near term.*  
Reprod. Dom. An. 35: 142-144.
- JARRY, H., EINSPANIER, A., KANNGIESSER, L., DIETRICH, M., PITZEL, L., HOLZ, W., WUTTKE, W. (1990)**  
*Release and effects of oxytocin on estradiol and progesterone secretion in porcine corpora lutea as measured by an in vivo microdialysis system.*  
Endocrinology 126: 2350-2358.
- JEFFCOATE, I. A. (1993)**  
*Endocrinology of anoestrous bitches.*  
J. Reprod. Fertil. Suppl. 47: 69-76.



**JENSEN, E. V. & JACOBSEN, H. I. (1962)**

*Basic guides to the mechanism of estrogen action.*

Recent Prog. Horm. Res. 18: 387-414.

**JONES, G. E., BOYNS, A. R. , CAMERON, E. H. D. , BELL, E. T. , CHRISTIE, D. W. , PARKES, M. F. (1973)**

*Plasma estradiol, luteinizing hormone and progesterone during the oestrous cycle in the beagle bitch.*

J. Endocri. 57: 331-332.

**JOHNSON M. C., DEVOTO, L., RETAMALES, E. , KOHEN, P. , TRONCOSO, J. L., AGUILERA, G. (1996)**

*Localization of insulin-like growth factor (IGF-I) and IGF-I receptor expression in human corpora lutea: role on estradiol secretion.*

Fertil. Steril. 65: 489-494.

**JOHNSTON, S. D., KIANG, D. T., SEGUIN, B. E., HEGSTAD, R. L. (1985)**

*Cytoplasmic estrogen and progesterone receptors in canine endometrium during the estrous cycle.*

Am. J. Vet. Res. 46: 1653-1658.

**KATZENELLENBOGEN, B. S., BHAKOO, H. S, FERGUSON, E. R. (1979)**

*Estrogen and antiestrogen action in reproductive tissues and tumors.*

Recent Prog. Horm. Res. 35: 259-300.

**KATZENELLENBOGEN, B. S. & NORMAN, M. J. (1990)**

*Multihormonal regulation of the progesterone receptor in MCF-7 human breast cancer cells: interrelationships among insulin/insulin-like growth factor-I, serum, and estrogen.*

Endocrinology 126: 891-898.

**KATZENELLENBOGEN, B. S. (2000)**

*Mechanisms of action and cross-talk between estrogen receptor and progesterone receptors pathways.*

J. Soc. Gynekol. Investig. 7: 33-37.

**KAUFMANN, O., KÖTHER, S., DIETEL, M. (1998)**

*Use of antibodies against estrogen and progesterone receptors to identify metastatic breast and ovarian carcinomas by conventional immunohistochemical and tyramide signal amplification methods.*

Mod. Pathol. 11: 357-363.

**KHAN-DAWOOD, F. S., YANG, J., DAWOOD, M. Y. (1996)**

*Expression of gap junction protein connexin-43 in the human and baboon (*Papio anubis*) corpus luteum.*

J. Clin. Endocrinol. Metab. 81:835-842.

**KING, W. J. & GREENE, G. L. (1984)**

*Monoclonal antibodies localize estrogen receptor in the nuclei of target cell.*

Nature 307: 74-747.

**KINTNER, P. J. & MEAD, R.A. (1983)**

*Steroid metabolism in the corpus luteum of the ferret.*  
Biol. Reprod. 29: 1121-1127.

**KLAUKE, M. & HOFFMANN, B. (1992)**

*Progesterone and estrogen receptors in the myometrium of the cow during the estrous cycle and pregnancy and of the sheep at the time of parturition.*  
Anim. Reprod. Sci. 29: 195-203.

**KLEIN, R. (1999)**

*Untersuchung zur Wiederstellung des positiven Feedback Mechanismus von Estradiol-17 $\beta$  und zur Sekretion von Estradiol-17 $\beta$  im Verlauf des Anöstrus der Hündin.*  
Inaugural-Dissertation Fachbereich Veterinärmedizin Justus-Liebig-Universität Gießen.

**KLÖTZER, I. (1969)**

*Die postnatale Entwicklung des Hundeovars und seine Beeinflussbarkeit durch extrahypophysäre Gonadotropine.*  
Diss. med. vet. München.

**KOCH, B., LUTZ-BUCHER, B., BRIAUD, B., MIALHE, C. (1977)**

*Glucocorticoid binding to plasma membranes of the adenohipophysis.*  
J Endocrinol. 73:399-400.

**KORTE, J. M. & ISOLA, J. J. (1988)**

*An immunocytochemical study of the progesterone receptor in rabbit ovary.*  
Mol. Cell Endocrinol. 58: 93-101

**KRAUS, W. L. & KATZENELLENBOGEN, B. S. (1993)**

*Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone and sex steroid hormone antagonists.*  
Endocrinology 132: 2371-2379.

**KRAUS, W. L., MONTANO, M. M., KATZENELLENBOGEN, B.S. (1994)**

*Identification of multiple, widely spaced estrogen-responsive regions in the rat progesterone receptor gene.*  
Mol. Endocrinol. 8: 952 – 969.

**KUIPER, G. G. J. M., ENMARK, E., PELTO-HUIKKO, M., NILSSON, S., GUSTAFSSON, J-A. (1996)**

*Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary.*  
Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 5925-5930.

**KUMAR, V., GREEN, S., STACK, G., BERRY, M., JIN, J.-R., CHAMBON, P. (1987)**

*Functional domains of the human estrogen receptor.*  
Cell 51: 941 – 951.

- KURANAGA, E., KANUKA, H., HIRABAYASHI, K., SUZUKI, M., NISHIHARA, M., TAKAHASHI, M. (2000)**  
*Progesterone is a cell death suppressor that downregulates Fas expression in rat corpus luteum.*  
FEBS Lett 466: 279-282.
- KURITA, T., LEE, K-J., SAUNDERS, P. T. K., COOKE, P. S., TAYLOR, J. A., LUBAHN, D. B., ZHAO, C., MÄKELÄ, S., GUSTAFSSON, J-A., DAHIYA, R., CUNHA, G. R. (2001)**  
*Regulation of progesteron receptors and decidualization in uterine stroma of the estrogen receptor- $\alpha$  knockout mouse.*  
Biol. Reprod. 64: 272-283.
- LANDERS, J. P. & SPELSBERG, T. C. (1992)**  
*New concepts in steroid hormone action: transcription factors, proto-oncogenes, and the cascade model for steroid regulation of gene expression.*  
Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expr. 21: 19 – 63.
- LATINGA-VAN LEEUWEN, I. S., VAN GARDEREN, E., MOL, J. A. (2000)**  
*Molecular cloning and cellular localization of the canine progesterone receptor.*  
Gene library – PUBMED Nr. AAGO9282
- LEAVITT, W. W. & TAKEDA, A. (1986)**  
*Hormonal regulation of estrogen and progestin receptors in decidual cells.*  
Biol. Reprod. 35: 475 – 484.
- LEVINE, H., WIGHT, T, SQUIRES, E. (1979)**  
*Ultrastructure of the corpus luteum of the cycling mare.*  
Biol. Reprod. 20: 492-504.
- LESSEY, B. A., KILLIAM, A. P., METZGER, D. A., HANEY, A. F., GREENE, G. L., McCARTY, K. S. (1988)**  
*Immunohistochemical analysis of human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle.*  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 67: 334-340.
- LILLIE, R. D. (1951)**  
Histopathologic Technic and Practical Histochemistry.  
The Blakiston Company, New York.
- LINDSAY, F. E. (1983)**  
*The normal endoscopic appearance of the caudal reproductive tract of the cyclic and non-cyclic bitch: post-uterine endoscopy.*  
J. An. Sci. Pract. 24: 1-15.
- LOBB, D. K., KOBRIN, M. S., KUDLOW, J. E., DORRINGTON, J. S. (1989)**  
*Transforming growth factor- $\alpha$  in the adult bovine ovary: identification in growing ovarian follicles.*  
Biol. Reprod. 40: 1087-1093.

**LOOSFELT, H., ATGER, M., MISRAHI, M., GUIOCHON-MANTEL, A., MERIEL, C., LONGEAT, F., BENAROUS, R., MILGROM, E. (1986)**

*Cloning and sequence analysis of rabbit progesterone-receptor complementary DNA.*  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 9045 – 9049.

**LUND, S. A., MURDOCH, J., VAN KIRK, E. A., MURDOCH, W. J. (1999)**

*Mitogenic and antioxidant mechanisms of estradiol action in preovulatory ovine follicles: relevance to luteal function.*  
Biol. Reprod. 61: 388-392.

**MAAS, S., JARRY, H., TEICHMANN, A., RATH, H., KUHN, W., WUTTKE, W. (1992)**

*Paracrine actions of oxytocin, prostaglandins F<sub>2a</sub> and estradiol within the human corpus luteum.*  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 74: 306-312.

**MAHESH, V. B., BRANN, D. W., HENDRY, L. B. (1996)**

*Diverse modes of action of progesterone and its metabolites.*  
J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 56: 209-219.

**MAJEWSKA, M. D., HARRISON, N. L., SCHWARTZ, R. D., BARKER, J. L., PAUL, S. M. (1986)**

*Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor.*  
Science 232: 1004-1007.

**McALLISTER, J. M., BYRD, W., SIMPSON, E. R. (1994)**

*The effects of growth factors and phorbol esters on steroid biosynthesis in isolated human theca interna and granulosa-lutein cells in long term culture.*  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 79: 106-112.

**MENDOZA, C. & TESARIK, J. (1993)**

*A plasma-membrane progesterone receptor in human sperm is switched on by increasing intracellular free calcium.*  
FEBS Lett. 330: 57-60.

**MEYER, H. H. D. (1994)**

*Hormonrezeptoren: Überträger der Hormonwirkung in den Zielzellen.*  
In: Veterinärmedizinische Endokrinologie. 3. Auflage.  
Hrsg.: Döcke, F. Gustav Fischer Verlag Jena und Stuttgart, 76 – 88.

**MILLER, J. B. & TOFT, D. O. (1983)**

*Characterization and physiological variation of estrogen receptors in rabbit corpora lutea throughout pregnancy and pseudopregnancy: the effect of hysterectomy and sustained estradiol treatment.*  
Biol. Reprod. 29: 620-629.

**MILLER, W. R. & O'NEILL, J. (1987)**

*The importance of local synthesis of estrogen within the breast.*  
Steroids 50: 537-548

**MIRECKA, J. (1969)**

*Characters of granulo-lutein and theca-lutein cells as shown by lipid metabolism of corpus luteum.*  
Folia histochem. cytochem. 7: 117-132.

**MISAO, R., NAKANISHI, Y., FUJIMOTO, J., TAMAYA, T. (1998a)**

*Steroid receptor mRNA levels in human corpus luteum.*  
Horm. Res. 50: 155-159.

**MISAO, R., NAKANISHI, Y., IWAGAKI, S., FUJIMOTO, J., TAMAYA, T. (1998b)**

*Expression of progesterone receptor isoforms in corpora lutea of human subjects: correlation with serum oestrogen and progesterone concentrations.*  
Mol. Hum. Reprod. 4: 1045-1052.

**MISAO, R., NAKANISHI, Y., SUN, W. S., FUJIMOTO, J., IWAGAKI, S., HIROSE, R., TAMAYA, T. (1999)**

*Expression of oestrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  mRNA in corpus luteum of human subjects.*  
Mol. Hum. Reprod. 5: 17-21.

**MISRAHI, M., ATGER, M., D'AURIOL, L., LOOSFELT, H., MERIEL, C., FRIDLANSKY, F., GUIOCHON-MANTEL, A., GALIBERT, F., MILGROM, E. (1987)**

*Complete amino acid sequence of the human progesterone receptor deduced from cloned cDNA.*  
Biochem Biophys Res Commun. 143: 740-748.

**MISRAHI, M., VENENCIE, P. Y., SAUGIER-VEBER, P., SAR, S., DESSEN, P., MILGROM, E. (1993)**

*Structure of the human progesterone receptor gene.*  
Biochim. Biophys. Acta 1216: 289 – 292.

**MIYAMOTO, A., OKUDA, K., SCHWEIGERT, F. J., SCHAMS, D. (1992)**

*Effects of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor- $\beta$  and nerve growth factor on the secretory function of the bovine corpus luteum in vitro.*  
J. Endocr. 135: 103-114.

**MIYAMOTO, A., LÜTZOW, H., SCHAMS, D. (1993)**

*Acute actions of prostaglandin  $F_{2a}$ ,  $E_2$ , and  $I_2$  in microdialysed bovine corpus luteum in vitro.*  
Biol. Reprod. 49: 423-430.

**MOHAMED, M. K., TUNG, L., TAKIMOTO, G. S., HORWITZ, K. B. (1994)**

*The leucine zippers of c-fos and c-jun for progesterone receptor dimerization: A-dominance in the A/B heterodimer.*  
J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 51: 241-250.

**MOSSELMAN, S., POLMAN, J., DIJKEMA, R., ORGANON, N. V. (1996)**

*ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor.*  
FEBS Lett. 392: 49-53.

**MOWA, C. N. & IWANAGA, T. (2000)**

*Differential distribution of oestrogen receptor- and -mRNAs in the female reproductive organ of rats as revealed by in situ hybridization.*  
J. Endocrinol. 165: 59-66.

**NEUFELD, G, FERRARA, N., SCHWEIGERER, L., MITCHELL. R., GOSPODAROWICZ, D. (1987)**

*Bovine granulosa cells produce basic fibroblast growth factor.*  
Endocrinology 121: 597-603.

**NEULEN, J. (1998)**

*Mechanismen, die die Vascularisation des Corpus luteum beeinflussen.*  
Endokrinologische Informationen 22: 135-137.

**NISHIYAMA, T., TSUMAGARI, S., ITO, M., KIMURA, J., WATANABE, G., TAYA, K., TAKEISHI, M. (1999)**

*Immunohistochemical study of steroidogenic enzymes in the ovary and placenta during pregnancy in the dog.*  
Anat. Histol. Embryol. 28: 125-129.

**NISWENDER, G. D., JUENGEL, J. L., SILVA, P. J., ROLLYSON, M. K., MCINTUSCH, E. W. (2000)**

*Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum.*  
Physiol. Rev. 80: 1-29.

**OETTEL, M. (1979).**

*Reproduktionsbiologie der Hündin.*  
Mh. Vet. Med., 34: 937-942.

**OGLE, T. F., MILLS, T. M., COSTOFF, A. (1990)**

*Progesterone maintenance of the placental progesterone receptor and placental growth in ovariectomized rats.*  
Biol. Reprod., 43, 276 – 284.

**OGLE, T. F. & GEORGE, P. (1995)**

*Regulation of the estrogen receptor in the decidua basalis of the pregnant rat.*  
Biol. Reprod. 53: 65-77.

**OGLE, T. F., DAI, D., GEORGE, P., MAHESH, V. B. (1997)**

*Stromal cell progesterone and estrogen receptors during proliferation and regression of the decidua basalis in the pregnant rat.*  
Biol. Reprod. 57: 495-506.

**OGLE, T. F., DAI, D., GEORGE, P., MAHESH, V. B. (1998)**

*Regulation of the progesterone receptor and estrogen receptor in decidua basalis by progesterone and estradiol during pregnancy.*  
Biol. Reprod. 58: 1188-1198.

**OKKENS, A. C. & BEVERS, M. M. (1990)**

*Evidence for prolactin as the main luteotropic factor in the cyclic dog.*  
Veterinary Quarterly 12: 193-201.

**OKKENS, A. S. C., KOOISTRA, H. S., DIELEMAN, S. J., BEVERS, M. M. (1997)**

*Dopamine-agonistic effects as opposed to the prolactin concentrations as the influencing factor on the length of the anoestrus in the dog.*  
J. Reprod. Fertil. Suppl. 51: 55-58.

**OLOFSSON, J. & LEUNG, P. C. (1994)**

*Auto/paracrine role of prostaglandins in corpus luteum function.*  
Mol. Cell Endocrinol. 100: 87-91

**OLSON, P. N., BOWEN, R. A., BEHRENDT, M. D., OLSON, J. D., NETT, T. M. (1982)**

*Concentrations of reproductive hormones in canine serum throughout late anestrus, proestrus and estrus.*  
Biol. Reprod. 27: 1196-1206.

**OLSON, P. N., NETT, T. M., BOWEN, R. A., SAWYER, H. R., NISWENDER, G. D. (1989)**

*Endocrine regulation of the corpus luteum of the bitch as a potential target for altering fertility.*  
J. Reprod. Fert. Suppl. 39: 27-40.

**O'MALLEY, B. (1990)**

*The steroid receptor superfamily: more excitement predicted for the future.*  
Mol. Endocrinol. 4: 363-369.

**ONCLIN, K., SILVA, L. D. M., CONCANNON, P. W. (1993)**

*Luteotropic action of prolactin in dogs and the effects of a dopamine agonist cabergoline.*  
J. Reprod. Fertil. Suppl. 47: 403-409.

**ONCLIN, K. & VERSTEGEN, J. P. (1997a)**

*In vivo investigation of luteal function in dogs: effects of cabergoline, a dopamine agonist, and prolactin on progesterone secretion during mid-pregnancy and -diestrus.*  
Domest. Anim. Endocrinol. 14: 25-38.

**ONCLIN, K. & VERSTEGEN, J. P. (1997b)**

*Secretion patterns of plasma prolactin and progesterone in pregnant compared with nonpregnant dioestrous beagle bitches.*  
J. Reprod. Fertil. Suppl. 51: 203-208.

**OTTANDER, U., HOSOKAWA, K., LIU, K., BERGH, A., NY, T., OLOFSSON, J. I. (2000)**

*A putative stimulatory role of progesterone acting via progesterone receptors in the steroidogenic cells of the human corpus luteum.*  
Biol Reprod 62: 655-663

- PACE, P., TAYLOR, J., SUNTHARALINGAM, S., COOMBES, R. C., ALI, S. (1997)**  
*Human estrogen receptor beta binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor alpha.*  
J. Biol. Chem. 272: 25832-25838.
- PARANDOOSH, Z., CROMBIE, D. L., TETZKE, T. A., HAYES, J. S., HEAP, R. B., WANG, M. -W. (1995)**  
*Progesterone and oestrogen receptors in the decidualized mouse uterus and effects of different types of anti-progesterone treatment.*  
J. Reprod. Fert. 105: 215-220.
- PARK, O. K. & MAYO, K. E. (1991)**  
*Transient expression of progesterone receptor messenger RNA in ovarian granulosa cells after the preovulatory luteinizing hormone surge.*  
Mol. Endocrinol. 5: 967-978.
- PARK-SARGE O. K., PARMER, T. G., GU, Y., GIBORI, G. (1995)**  
*Does the rat corpus luteum express the progesterone receptor gene ?*  
Endocrinology 136: 1537-1543.
- PARMER, T., ROBERTS, C. T. JR., LEROITH, D., ADASHI, E. Y., KAHN, I., SOLAN, N., NELSON, S., ZILBERSTEIN, M., GIBORI, G. (1991)**  
*Expression, action, and steroidal regulation of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-I receptor in the rat corpus luteum: their differential role in the two cell populations forming the corpus luteum.*  
Endocrinology 129: 2924-2932.
- PATE, J. L. (1996)**  
*Intercellular communication in the bovine corpus luteum.*  
Theriogenology 45: 1381-1397.
- PELUSO, J. J. & PAPPALARDO, A. (1994)**  
*Progesterone and cell-cell adhesion interact to regulate rat granulosa cell apoptosis.*  
Biochem. Cell Biol. 72: 547-551.
- PERROT-APPLANAT, M., GROYER-PICARD, M.T., LOGEAT, F., MILGROM, E. (1986)**  
*Ultrastructural localization of the progesterone receptor by an immunogold method: effect of hormone administration.*  
J. Cell. Biol. 102: 1191-1199.
- PERTSCHUK, L. P., KIM, D. S., NAYER, K., FELDMAN, J. G., EISENBERG, K. B., CARTER, A. C., RONG, Z. T., THELMO, W. L., FLEISHER, J., GREENE, G. L. (1990)**  
*Immunocytochemical estrogen and progestin receptor assays in breast cancer with monoclonal antibodies. Histopathologic, demographic, and biochemical correlations and relationship to endocrine response survival.*  
Cancer 66: 1663-1670.



**PIETRAS, R. J. & SZEGO, C. M. (1980)**

*Partial purification and characterization of oestrogen receptors in subfractions of hepatocyte plasma membranes.*

Biochem. J. 191: 743-760.

**PITZEL, L., PROBST, I., JARRY, H., WUTTKE, W. (1988)**

*Inhibitory effect of oxytocin and vasopressin on steroid release by culture porcine luteal cells.*

Endocrinology 122: 1780-1785.

**PRESS, M. F. & GREENE, G. L. (1988)**

*Localization of progesterone receptor with monoclonal antibodies to the human progesterin receptor.*

Endocrinology 122: 1165-1175

**PRIEDKALNS, J. & WEBER, A. F. (1968)**

*The succinic dehydrogenase and lipid content of follicular and luteal cells of the bovine ovary.*

Acta anat. 71: 542-564.

**RAE, M. T., MENZIES, G. S., McNEILLY, A. S., WOAD, K., WEBB, R., BRAMLEY, T. A. (1998)**

*Specific non-genomic, membrane-localized binding sites for progesterone in the bovine corpus luteum.*

Biol. Reprod. 58: 1394-1406.

**RAVINDRA, R., BHATIA, K., MEAD, R. A. (1984)**

*Steroid metabolism in corpora lutea of the western spotted skunk (*Spilogale putorius latifrons*).*

J. Reprod. Fertil. 72: 495-502.

**RAVN, V., HAVSTEEN, H., THORPE, S. M. (1998)**

*Immunohistochemical evaluation of estrogen and progesterone receptors in paraffin-embedded, formalin-fixed endometrial tissues: comparison with enzyme immunoassay and immunohistochemical analysis of frozen tissue.*

Mod. Pathol. 11: 709-715.

**REIMERS, T. J., PHEMISTER, R. D., NISWENDER, G. D. (1978)**

*Radioimmunological measurement of follicle-stimulating hormone and prolactin in the dog.*

Biol. Reprod. 19: 673-679.

**RENOIR, J.M., RADANYI, C., JUNG-TESTAS, I., FABER, L.E., BAULIEU, E.E. (1990)**

*The nonactivated progesterone receptor is a nuclear heterooligomer.*

J. Biol. Chem. 265: 14402-14406.

**REVELLI, A., PACCHIONI, D., CASSONI, P., BUSSOLATI, G., MASSOBRIO, M. (1996)**

*In situ hybridization study of messenger RNA for estrogen receptor and immunohisto-*

*chemical detection of estrogen and progesterone receptors in the human ovary.*  
Gynecol. Endocrinol. 10: 177-186.

**RIESENBECK, A. (1997)**

*Untersuchungen über die Verfügbarkeit von LH bei ingraviden und graviden Hündinnen und zur Bedeutung des Regelfaktors PGF<sub>2a</sub> für die Luteolyse im peripartalen Zeitraum.*

Inaugural-Dissertation Fachbereich Veterinärmedizin Justus-Liebig-Universität Gießen.

**ROSSMANITH, W. E., LAUGHLIN, G. A., MORTOLA, J. F., YEN, S. S. C. (1990)**

*Secretory dynamics of oestradiol (E2) and progesterone (Progesteron) during periods of relative pituitary LH quiescence in the midluteal phase of the menstrual cycle.*

Clin. Endocrinol. 32: 13-23.

**ROTHCHILD, I. (1981)**

*The regulation of the mammalian corpus luteum.*

Rec. Prog. Horm. Res. 37: 183-298.

**RUEDA, B. R., HENDRY, I. R., HENDRY III, W. J., STORMSHAK, F., SLAYDEN, O. D., DAVIS, J. S. (2000)**

*Decreased progesterone levels and progesterone receptor antagonists promote apoptotic cell death in bovine luteal cells.*

Biol. Reprod. 62: 269-276.

**RUIZ DE GALARRETA, C. M., FANJUL, L. F., HSUEH, A. J. W. (1985)**

*Progestin regulation of progesterone biosynthetic enzymes in cultured rat granulosa cells.*

Steroids 46: 987-1002.

**SAKUMOTO, R., MURAKAMI, S., OKUDA, K. (2000)**

*Tumor necrosis factor-alpha stimulates prostaglandin F2alpha secretion by bovine luteal cells via activation of mitogen-activated protein kinase and phospholipase A2 pathways.*

Mol. Reprod. Dev. 56: 387-391

**SARTORIUS, C. A., MELVILLE, M. Y., HOVLAND, A. R., TUNG, L., TAKIMOTO, G. S., HORWITZ, K. B. (1994)**

*A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform.*

Mol. Endocrinol. 8: 1347-1360.

**SAVARD, K. (1973)**

*The biochemistry of the corpus luteum.*

Biol. Reprod. 8: 183-202.

**SCHAMS, D., KOLL, R., LI, C. H. (1988)**

*Insulin-like growth factor-I stimulates oxytocin and progesterone production by bovine granulosa cells in culture.*

J. Endocr. 116: 97-100.

**SCHEBITZ, H. & BRASS, W. (1985)**

*Ovariohysterektomie.*

In: Operationen an Hund und Katze Hrsg: H. Schebitz und W. Brass, Verlag Paul Parey: 172-173.

**SCOTTERER, A. (1928)**

*Beitrag zur Feststellung der Eizahl in verschiedenen Altersperioden bei der Hündin.*  
Anat. Anz. 65: 177-192.

**SCHOTT, D. R., SHYAMALA, G., SCHNEIDER, W., PARRY, G. (1991)**

*Molecular cloning, sequence analyses, and expression of complementary DNA encoding murine progesterone receptor.*

Biochemistry 30: 7014-7020.

**SCHULER, G., WIRTH, C., KLISCH, K., PFARRER, C., LEISER, R., HOFFMANN, B. (1999)**

*Immunolocalization of progesterone receptors in bovine placentomes throughout mid and late gestation and at parturition.*

Biol. Reprod. 61: 797-801.

**SHIMIZU, A., HIRATO, K., HIDAKA, T., YANAIHARA, T., NAKAYAMA, T. (1982)**

*Difference of steroidogenesis in human ovary at different stage of cycle.*

Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi 34: 693-700.

**SIERRALTA, W. D. & THOLE, H. H. (1996)**

*Retrieval of estradiol receptor in paraffin sections of resting porcine uteri by microwave treatment. Immunostaining patterns obtained with different primary antibodies.*

Histochem. Cell. Biol. 105: 357-363.

**SKARZYNSKI, D. & OKUDA, K. (1999)**

*Sensitivity of bovine corpora lutea to prostaglandin $F_{2a}$  is dependent on progesterone, oxytocin and prostaglandins.*

Biol. Reprod. 60: 1292-1298.

**SŁOMCZYNSKA, M., KROK, M., PIERSCINSKI, A. (2000)**

*Localisation of the progesterone receptor in the porcine ovary.*

Acta Histochem. 102: 183-191.

**SMITH, D. F. & TOFT, D. O. (1993)**

*Steroid receptors and their associated proteins.*

Mol. Endocrinol. 7: 4-11.

**SMITH, M. F., Mc'INTOSH, E. W., SMITH, G. W. (1994)**

*Mechanisms associated with corpus luteum development.*

J. Anim. Sci. 72: 1857-1873.

**SONG, J. Y. & FRASER, I. S. (1995)**

*Effects of progestogens on human endometrium.*

Obstet. Gynecol. Surv. 50: 385-394.

**SPICER, L. J. & STEWART, R. E. (1996)**

*Interactions among basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin, and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cell numbers and steroidogenesis of bovine thecal cells: role of IGF-I receptors.*

Biol. Reprod. 54: 255-263.

**STEINETZ, B. G., GOLDSMITH, L. T., LUST, G. (1987)**

*Plasma relaxin levels in pregnant and lactating dogs.*

Biol. Reprod. 37: 719-725.

**STERNBERGER, L. A. (1967)**

*Electron microscopic immunocytochemistry: a review.*

J. Histochem. Cytochem. 115: 139-59.

**STIRLING, D., WATERMAN, M. R., SIMPSON, E. R. (1991)**

*Expression of mRNA encoding basic fibroblast growth factor (bFGF) in bovine corpora lutea and cultured luteal cells.*

J. Reprod. Fertil. 91: 1-8

**STOCCO, C. O. & DEIS, R. P. (1998)**

*Participation of intraluteal progesterone and prostaglandin F<sub>2</sub>alpha in LH-induced luteolysis in pregnant rat.*

J. Endocrinol. 156: 253-259

**STOICA, A., SACEDA, M., FAKHRO, A., JOYNER, M., MARTIN, M. B. (2000a)**

*Role of insulin-like growth factor-I in regulating estrogen receptor-alpha gene expression.*

J. Cell Biochem. 76: 605-614.

**STOICA, A., SACEDA, M., DORAISWAMY, V. L., COLEMAN, C., MARTIN, M. B. (2000b)**

*Regulation of estrogen receptor-alpha gene expression by epidermal growth factor.*

J. Endocrinol. 165: 371-378.

**SUGINO, N., TELLERIA, C. M., GIBORI, G. (1997)**

*Progesterone inhibits 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase expression in the rat corpus luteum through the glucocorticoid receptor.*

Endocrinology 138: 4497-4500.

**SUZUKI, T., SASANO, H., KIMURA, N., TAMURA, M., FUKAIA, T., YAJIMA, A., NAGURA, H. (1994)**

*Immunohistochemical distribution of progesterone, androgen and oestrogen receptors in the human ovary during the menstrual cycle. Relationship to expression of steroidogenic enzymes.*

Hum. Reprod. 9: 1589-1595.

**TAMURA, M., SASANO, H., SUZUKI, T., FUNAYAMA, Y., TAKAYAMA, K., TAKAYA, R., YAJIMA, A. (1995)**

*Expression of epidermal growth factors and epidermal growth factor receptor in normal cycling human ovaries.*

Hum. Reprod. 10: 1891-1896.

**TAPANAINEN, J., LEINONEN, P. J., TAPANAINEN, P., YAMAMOTO, M., JAFFE, R. B. (1987)**

*Regulation of human granulosa-luteal cell progesterone production and proliferation by gonadotropins and growth factors.*

Fertil. Steril. 48: 576-580.

**TELLERIA, C. M., ZHONG, L., DEB, S., SRIVASTAVA, R. K., PARK, K. S., SUGINO, N., PARK-SARGE, O. K. (1998)**

*Differential expression of the estrogen receptors alpha and beta in the rat corpus luteum of pregnancy: regulation by prolactin and placental lactogens.*

Endocrinology 139: 2432-2442.

**TELLERIA, C. M., STOCCO, C. O., STATI, A. O., DEIS, R. P. (1999)**

*Progesterone receptor is not required for progesterone action in the rat corpus luteum of pregnancy.*

Steroids 64: 760-766.

**TESARIK, J., MENDOZA, C., MOOS, J., FENICHEL, P., FEHLMANN, M. (1992)**

*Progesterone action through aggregation of a receptor on the sperm plasma membrane.*

FEBS Lett. 308: 116-120.

**TETSUKA, M., MILNE, M., HILLIER, S. G. (1998)**

*Expression of oestrogen receptor isoforms in relation to enzymes of oestrogen synthesis in rat ovary.*

Mol. Cell Endocrinol. 141: 29-35

**THORPE, S. M. (1987)**

*Monoclonal antibody technique for detection of estrogen receptors in human breast cancer: greater sensitivity and more accurate classification of receptor status than the dextran-coated charcoal method.*

Cancer Res. 47: 6572-6575.

**TONETTA, S. A. (1987)**

*Paracrine control of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, 17,20-lyase and aromatase enzyme systems in porcine thecal cells.*

Adv. Exp. Med. Biol. 219: 665-670.

**TOWLE, A. C. & SZE, P. Y. (1983)**

*Steroid binding to synaptic plasma membrane: differential binding of glucocorticoids and gonadal steroids.*

J. Steroid. Biochem. 18: 135-143.

- TOWNSON, D. H., WANG, X. J., KEYES, P. L., KOSTYO, J. L., STOCCO, D. M. (1996)**  
*Expression of the steroidogenic acute regulatory protein in the corpus luteum of the rabbit: dependence upon the luteotropic hormone, estradiol-17 $\beta$*   
Biol. Reprod. 55: 868-874.
- TSENG, L. & ZHU, H.H. (1997)**  
*Regulation of progesterone receptor messenger ribonucleic acid by progestin in human endometrial stromal cell.*  
Biol. Reprod. 57: 1360-1366.
- VÄÄNÄNEN, J. E., TONG, B. L. P., VÄÄNÄNEN, C. C. M., CHAN, I. H. Y., YUEN, B. H., LEUNG, P. C. K. (1997)**  
*Interaction of prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  and gonadotropin-releasing hormone on progesterone and estradiol production in human granulosa-luteal cells.*  
Biol. Reprod. 57: 1346-1353.
- VAN WEZEL, I. L., UMAPATHYSIVAM, K., TILLEY, W. D., RODGERS, R. J. (1995)**  
*Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine ovarian follicles.*  
Mol. Cell. Endocrinol. 115: 133-140.
- VEGETO, E., SHAHBAZ, M.M., WEN, D.K., GOLDMAN, M.E., O' MALLEY, B.W., MCDONNELL, D.P. (1993)**  
*Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function.*  
Mol. Endocrinol. 7: 1244-1255.
- VELDHUIS, J. D. & FURLANETTO, R. W. (1985)**  
*Tropic actions of human somatomedin C/ insulin-like growth factor I on ovarian cells: in vitro studies with swine granulosa cells.*  
Endocrinology 116: 1235-1242.
- VERMEIRSCH, H., SIMOENS, P., HELLEMANS, A., CORYN, M., LAUWERS, H. (2000)**  
*Immunohistochemical detection of progesterone receptors in the canine uterus and their relation to sex steroid hormone levels.*  
Theriogenology 53: 773-788.
- VICKERY, B., RAE, M. C., KENT, J., TOMLINSON, R. (1980)**  
*Manipulation of duration of action of a synthetic prostaglandin analogue (PTT) assessed in the pregnant bitch.*  
Prostaglandins and Medicine 5: 93-100.
- VOLLMERHAUS, B., SINOWATZ, F., AMSELGRUBER, W. (1994)**  
*Weibliche Geschlechtsorgane*  
In: Anatomie von Hund und Katze; Hrsg: Josef Frewein und Bernd Vollmerhaus; Blackwell-Wiss Verlag Berlin: 224-240.

- WALTHER, N., LIOUTAS, C., TILLMANN, G., IVELL, R. (1999)**  
*Cloning of bovine estrogen receptor beta (ERbeta): expression of novel deleted isoforms in reproductive tissues.*  
Mol. Cell Endocrinol. 152:37-45.
- WEI, L.L., HAWKINS, P., BAKER, C., NORRIS, B., SHERIDAN, P.L., QUINN, P.G. (1996)**  
*An amino-terminal truncated progesterone receptor isoform, PRc, enhances progestin-induced transcriptional activity.*  
Mol. Endocrinol. 10: 1379-1387.
- WEI, L.L., NORRIS, B., BAKER, C. (1997)**  
*An N-terminally truncated third progesterone receptor protein, PR(C), forms heterodimers with PR(B) but interferes in PR(B)-DNA binding.*  
J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 62: 287-297.
- WEISS, J. R., BRINKLEY, H. J., YOUNG, E. P. (1976)**  
*In vitro steroidogenesis in porcine corpora lutea.*  
J. Anim. Sci. 42: 121-130.
- WEN, D. X., XU, Y. F., MAIS, D. E., GOLDMAN, M. E., MCDONNELL, D. P. (1994)**  
*The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells.*  
Mol. Cell Biol. 14: 8356-8364.
- WIRTH, C. (2001)**  
*Immunhistologische Untersuchungen zum Vorkommen von Östrogen- und Progesteronrezeptoren sowie Charakterisierung der Zelldynamik in der Rinder-plazenta.*  
Inaugural-Dissertation Fachbereich Veterinärmedizin Justus-Liebig-Universität Gießen.
- WU, W.X., OWINY, J., ZHANG, Q., MA, X.H., NATHANIELSZ, P.W. (1996)**  
*Regulation of the estrogen receptor and its messenger ribonucleic acid in the ovariectomized sheep myometrium and endometrium: the role of estradiol and progesterone.*  
Biol. Reprod. 55: 762-768.
- WUTTKE, W., THEILING, K., HINNEY, B., PITZEL, L. (1998)**  
*Regulation of steroid production and its function within the corpus luteum.*  
Steroids 63: 299-305.
- XIAO, C.W. & GOFF, A.K. (1999)**  
*Hormonal regulation of oestrogen and progesterone receptors in cultured bovine endometrial cells.*  
J. Reprod. Fertil. 115: 101-109.
- XU, J., NAWAZ, Z., TSAI, S.Y., TSAI, M.-J., O'MALLEY, B.W. (1996)**  
*The extreme C terminus of progesterone receptor contains a transcriptional repressor domain that functions through a putative corepressor.*  
Proc. Natl. Acad. Sci., 93: 12195-12199.

- YAMAMOTO, S., KONISHI, I., NANBU, K., KOMATSU, T., KURODA, H., MATSUSHITA, K., MORI, T. (1997)**  
*Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor (bFGF) during folliculogenesis in the human ovary.*  
Gynecol. Endocrinol. 11: 223-230.
- YAN, Z., WEICH, H. A., BERNART, W., BRECKWOLDT, M., NEULEN, J. (1993)**  
*Vascular endothelial growth factor (VEGF) messenger ribonucleic acid (mRNA) expression in luteinized human granulosa cells in vitro.*  
J. Clin. Endocr. Metab. 77: 1723-1725.
- YOSHIMURA, Y. & BAHR, J. (1991)**  
*Localization of progesterone receptors in pre- and post-ovulatory follicles of the domestic hen.*  
Endocrinology 128: 323-330.
- YOSHIMURA, Y. (1995)**  
*Regulatory system and physiological significance of local factors in the ovary during follicular development and maturation.*  
Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi 47: 763-774.
- ZIEBA, D., BILINSKA, B., SCHMALZ-FRACZEK, B., MURAWSKI, M. (2000)**  
*Immunohistochemical localization of estrogen receptors in the ovine corpus luteum throughout the estrous cycle.*  
Folia Histochem. Cytobiol. 38: 111-117.



# Anhang

## 9 Anhang

### 9.1 Einzelergebnisse der Auszählung der Gesichtsfelder: Darstellung von Progesteron-rezeptoren im CL der Hündin.

#### 9.1.1 Tag 5 nach der Ovulation

Absolute Zahlen		Pila Oli OT53 SCH2 17.02.00					Pila Oli OT53 SCH3 18.02.00					Pila Oli OT53 SCH4 18.02.00							
		zyt. Sig.	Lutealz.				so. Z.				zyt. Sig.	Lutealz.				so. Z.			
Gesichtsfelder		zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+
Horizontal	Rand 1	+ -	27	22	17	14	29	+ -	16	12	11	19	41	+ -	34	19	13	14	41
	Rand 2	+ -	20	21	14	14	58	+ -	30	15	17	12	32	+ -	16	19	10	18	65
	1	+ -	14	22	18	17	43	+ -	19	19	17	8	19	+ -	26	19	13	15	27
	2	+ -	27	20	12	16	30	+ -	17	14	16	19	27	+ -	18	21	17	9	34
	3	+ -	27	11	13	10	37	+ -	9	26	17	16	17	+ -	11	19	19	18	40
	4	+ -	23	22	11	14	36	+ -	10	28	12	14	24	+ -	17	39	20	16	22
	5	+ -	33	17	13	9	36	+ -	20	16	8	11	24	+ -	16	21	18	18	34
6																			
Vertical	Rand 1	+ -	26	14	14	18	50	+ -	26	20	9	8	50	+ -	21	21	8	22	65
	Rand 2	+ -	31	16	9	11	39	+ -	25	23	20	14	54	+ -	28	15	18	19	50
	1	+ -	15	14	15	15	53	+ -	25	16	19	12	38	+ -	22	22	10	14	33
	2	+ -	13	15	16	26	44	+ -	21	16	18	19	25	+ -	22	22	13	27	34
	3	+ -	16	17	15	9	35	+ -	13	28	13	10	29	+ -	11	26	11	21	33
	4	+ -	36	13	12	15	36	+ -	17	25	19	11	36	+ -	21	22	24	12	38
	5	+ -	29	15	16	17	43	+ -	6	18	18	21	37	+ -	33	25	11	11	40
6																			

Absolute Zahlen		Marla Ore OT78 SCH2 22.05.00					Marla Ore OT78 SCH3 22.05.00					Marla Ore OT78 SCH4 22.05.00							
		zyt. Sig.	Lutealz.				so. Z.				zyt. Sig.	Lutealz.				so. Z.			
Gesichtsfelder		zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+
Horizontal	Rand 1	++	26	7	27	15	67	++	21	9	19	12	52	++	45	13	8	7	63
	Rand 2	++	9	21	29	23	41	++	30	9	17	15	59	++	38	12	12	10	57
	1	++	18	10	27	16	62	++	32	10	27	11	41	++	31	15	16	9	64
	2	++	22	7	22	14	43	++	31	17	23	22	64	++	30	18	15	12	55
	3	++	31	3	23	21	48	++	25	12	25	14	49	++	39	9	15	7	58
	4	++	17	13	22	18	65	++	31	15	18	17	55	++	31	10	16	13	57
	5	++	22	11	30	25	55	++	29	9	28	15	46	++	44	15	12	13	42
6																			
Vertical	Rand 1	++	41	6	12	15	50	++	47	11	10	12	62	++	27	20	6	11	69
	Rand 2	++	24	9	21	12	54	++	20	15	21	10	63	++	48	14	13	11	64
	1	++	23	12	19	15	50	++	26	12	15	11	55	++	26	12	19	13	56
	2	++	23	11	31	18	54	++	40	9	7	17	70	++	27	11	14	19	58
	3	++	23	7	41	13	37	++	32	11	20	11	55	++	46	6	15	11	51
	4	++	13	11	36	8	48	++	25	13	26	13	42	++	24	10	19	12	68
	5	++	22	20	14	15	63	++	27	13	12	13	66	++	34	15	16	12	71
6																			

zyt. Sig. = zytoplasmatisches Signal  
 Lutealz = Luteinzellen  
 so. Z. = sonstige Zellen  
 - = kein Signal  
 + - = schwaches Signal

Oli = Ovar links      Ore = Ovar rechts  
 OT = Objekträgenummer  
 SCH = Schnittnummer  
 + = mäßiges Signal  
 ++ = deutliches Signal

# Anhang

Absolute Zahlen		Zora II Oli OT 51 SCH 2 07.02.00					Zora II Oli OT 51 SCH 3 07.02.00					Zora II Oli OT 51 SCH 4 07.02.00							
		Lutealz. so. Z.					Lutealz. so. Z.					Lutealz. so. Z.							
Gesichtsfelder		zyt. Sig.	+	+-	-	-	+	zyt. Sig.	+	+-	-	-	+	zyt. Sig.	+	+-	-	-	+
Horizontal	Rand 1	+	21	16	19	19	44	+	21	18	9	15	37	+	28	17	15	19	62
	Rand 2	+	28	12	13	14	38	+	43	14	13	15	44	+	29	13	4	7	67
	1	+	38	14	11	12	31	+	31	21	13	13	39	+	31	10	12	17	64
	2	+	19	16	11	19	59	+	21	16	12	18	48	+	47	15	8	16	49
	3	+	22	18	17	23	71	+	26	23	13	15	41	+	33	15	14	20	44
	4	+	27	28	17	20	52	+	25	27	13	18	53	+	19	19	9	15	53
	5	+	38	17	18	23	41	+	46	20	14	10	39	+	32	20	14	16	60
6																			
Vertical	Rand 1	+	26	10	9	20	56	+	24	12	11	17	44	+	40	17	8	20	42
	Rand 2	+	31	9	11	17	40	+	40	22	9	15	38	+	33	15	6	11	53
	1	+	25	16	18	23	49	+	23	22	12	9	53	+	32	17	7	12	44
	2	+	28	16	15	14	45	+	17	16	12	17	43	+	33	21	11	14	32
	3	+	28	24	10	15	51	+	28	17	10	17	38	+	29	18	7	16	62
	4	+	32	17	11	17	39	+	25	23	10	12	43	+	30	21	10	15	43
	5	+	23	20	15	13	44	+	30	24	13	10	35	+	40	18	13	17	67
	6	+	33	11	15	13	65	+	24	21	5	11	79	+	29	16	10	12	70
	7	+	27	17	15	17	48	+	27	21	10	15	46	+	27	19	13	16	47
8																			

Absolute Zahlen		Asta Oli OT52 SCH2 16.02.00					Asta Oli OT52 SCH3 17.02.00					Asta Oli OT52 SCH4 17.02.00							
		Lutealz. so. Z.					Lutealz. so. Z.					Lutealz. so. Z.							
Gesichtsfelder		zyt. Sig.	+	+-	-	-	+	zyt. Sig.	+	+-	-	-	+	zyt. Sig.	+	+-	-	-	+
Horizontal	Rand 1	+-	13	13	21	12	21	+-	34	9	12	14	29	+-	20	10	14	20	44
	Rand 2	+-	19	11	16	14	29	+-	14	12	13	10	26	+-	12	23	14	19	26
	1	+	11	19	15	12	28	+	25	11	14	9	45	+	29	19	13	15	41
	2	+-	13	20	18	26	30	+-	32	11	16	14	30	+-	22	12	12	17	40
	3	+-	9	12	14	35	40	+-	21	13	15	9	25	+-	27	13	8	19	56
	4	+-	12	20	16	12	29	+-	15	14	12	10	27	+-	9	11	15	9	38
	5	+-	16	11	16	13	27	+-	21	15	13	11	39	+-	18	12	17	8	34
	6	+-	19	11	16	23	64	+-	18	14	17	11	30	+-	13	14	13	11	25
	7	+-	24	12	13	13	30	+-	16	13	10	24	55	+-	12	16	15	8	30
8	+-	13	13	11	18	36	+-	13	12	13	15	25	+-	10	22	9	12	33	
9																			
Vertical	Rand 1	+	18	8	16	16	36	+-	19	15	14	12	24	+-	18	12	12	11	37
	Rand 2	+-	14	13	16	17	33	+-	37	9	16	12	32	+-	11	10	9	16	34
	1	+	19	11	12	15	44	+	17	8	13	10	41	+	12	12	12	15	39
	2	+-	13	20	10	14	55	+-	18	12	23	25	48	+-	22	14	18	15	39
	3	+-	19	15	17	13	45	+-	17	8	15	10	48	+-	10	13	10	9	33
	4	-	25	10	18	12	24	-	17	12	14	17	41	+-	25	17	5	7	38
5																			

zyt. Sig. = zytoplasmatisches Signal  
Lutealz = Luteinzellen  
so. Z. = sonstige Zellen  
- = kein Signal  
+- = schwaches Signal

Oli = Ovar links      Ore = Ovar rechts  
OT = Objekträgernummer  
SCH = Schnittnummer  
+ = mäßiges Signal  
++ = deutliches Signal

# Anhang

## 9.1.2 Tag 15 nach der Ovulation

Absolute Zahlen		Rejca Oli OT31 SCH2 15.11.99					Rejca Oli OT31 SCH3 15.11.99					Rejca Oli OT31 SCH4 15.11.99							
		Lutealz.			so. Z.		Lutealz.			so. Z.		Lutealz.			so. Z.				
Gesichtsfelder		zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+
Horizontal	Rand 1	+	9	9	33	26	23	+	9	5	44	40	30	+	17	9	20	40	29
	Rand 2	+	5	2	29	30	40	+	11	13	24	26	30	+	8	6	21	23	48
	1	+	8	10	28	41	21	+	3	10	25	37	29	+ -	11	12	21	27	27
	2	+	7	10	18	42	27	+	5	16	19	30	21	+ -	5	11	23	51	30
	3	+	6	5	37	32	17	+	8	13	20	45	18	+	2	10	22	54	26
	4	+	4	13	31	45	16	+	4	15	22	43	27	+	5	21	15	25	26
	5	+	9	13	21	29	16	+	6	17	25	45	21	+	6	21	20	30	22
	6	+	10	8	18	32	27	+	4	10	25	33	23	+	15	13	11	39	45
	7	+	7	6	25	25	33	+	8	13	27	32	29	+	7	13	11	35	50
8																			
Vertical	Rand 1	+	16	15	20	29	30	+	14	9	26	25	25	+	12	12	26	24	32
	Rand 2	+	14	6	19	29	39	+	6	11	48	44	34	+ -	11	6	34	50	43
	1	+	9	11	20	30	23	+ -	6	4	28	42	28	+	17	15	24	35	24
	2	+	8	19	22	33	27	+	4	7	28	41	37	+ -	11	12	30	31	22
	3	+	4	14	26	28	8	+	10	12	21	41	30	+ -	6	10	25	39	25
	4	+	4	13	30	44	17	+	5	20	22	35	12	+ -	5	11	23	41	17
	5	+	4	12	19	35	26	+	5	14	24	58	21	+ -	3	13	22	57	21
	6	+	11	15	24	27	28	+	4	14	25	61	40	+ -	3	14	25	59	17
	7	+	9	14	32	29	20	+	3	7	37	52	32	+	7	19	22	56	33
8																			

Absolute Zahlen		Fee Oli OT79 SCH2 20.05.00					Fee Oli OT79 SCH3 20.05.00					Fee Oli OT79 SCH4 20.05.00							
		Lutealz.			so. Z.		Lutealz.			so. Z.		Lutealz.			so. Z.				
Gesichtsfelder		zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+
Horizontal	Rand 1	++	16	12	12	18	54	++	16	13	21	40	51	++	39	3	13	27	56
	Rand 2	++	25	9	16	18	54	++	11	14	8	12	55	++	19	11	22	38	35
	1	++	20	9	12	24	56	++	25	12	8	36	36	++	30	9	14	26	32
	2	++	23	10	10	17	37	++	22	8	12	29	38	++	19	11	14	31	30
	3	++	15	13	9	29	36	++	20	10	19	26	38	++	26	12	14	26	31
	4	++	31	7	12	15	80	++	16	12	3	12	61	++	19	10	16	31	53
	5	++	16	15	17	27	69	++	17	10	13	25	73	++	20	12	15	27	55
	6	++	14	12	11	16	53	++	26	12	6	18	62	++	19	11	14	26	71
7																			
Vertical	Rand 1	++	32	8	14	21	66	++	26	8	34	28	21	++	28	10	20	30	48
	Rand 2	++	19	17	17	25	40	++	20	7	14	24	53	++	30	11	9	17	47
	1	++	20	10	8	18	54	++	17	10	16	16	39	++	31	9	22	26	49
	2	++	16	14	14	21	68	++	25	15	12	23	55	++	17	11	24	25	56
	3	++	15	15	14	15	52	++	15	9	13	25	31	++	19	13	17	24	57
	4	++	16	16	14	11	44	++	15	15	12	20	44	++	15	16	13	16	42
5																			

zyt. Sig. = zytoplasmatisches Signal  
 Lutealz = Luteinzellen  
 so. Z. = sonstige Zellen  
 - = kein Signal  
 + - = schwaches Signal

Oli = Ovar links      Ore = Ovar rechts  
 OT = Objekträgnummer  
 SCH = Schnittnummer  
 + = mäßiges Signal  
 ++ = deutliches Signal

# Anhang

Absolute Zahlen		Kim Oli OT2 SCH2 08.11.99					Kim Oli OT2 SCH3 08.11.99					Kim Oli OT2 SCH4 09.11.99							
		Lutealz.			so. Z.		Lutealz.			so. Z.		Lutealz.			so. Z.				
Gesichtsfelder		zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+
Horizontal	Rand 1	-	4	6	24	33	15	+ -	6	6	23	20	18	-	7	13	20	22	15
	Rand 2	-	5	7	13	32	17	+ -	3	9	19	20	21	+ -	8	11	18	23	17
	1	-	1	8	23	26	4	-	5	10	17	32	14	-	2	6	21	29	21
	2	-	4	10	15	30	19	-	1	7	16	22	9	-	5	6	18	25	14
	3	-	2	5	10	32	16	-	2	6	19	22	13	-	1	12	25	20	16
	4	-	6	7	24	25	11	-	2	16	17	26	14	-	5	8	16	27	11
	5	-	4	9	15	34	22	-	0	13	19	17	8	-	8	7	20	19	13
6	-	2	5	18	28	21	-	2	10	14	20	6	-	5	8	20	18	11	
7																			
Vertical	Rand 1	-	11	4	10	36	16	+ -	6	9	16	22	14	+ -	10	7	22	19	14
	Rand 2	-	3	9	15	21	16	-	9	6	16	15	15	+ -	16	11	14	17	14
	1	-	8	7	12	32	11	-	6	9	22	22	12	-	6	10	22	33	8
	2	+ -	7	8	13	28	16	+ -	2	11	23	44	16	+ -	4	6	22	28	18
	3	+ -	7	10	13	30	20	+ -	3	14	25	35	24	-	4	9	29	27	14
	4	-	9	10	16	31	9	+ -	2	8	19	29	11	-	4	9	22	23	13
	5	-	5	4	24	37	12	-	3	7	20	24	16	+ -	6	6	20	35	13
	6	+ -	3	5	23	36	10	+ -	2	8	16	18	13	-	9	8	20	28	14
	7	+ -	5	5	20	29	4	-	9	14	15	33	21	-	10	7	15	26	18
8	+ -	1	8	19	29	10	-	13	11	15	22	17	-	13	15	23	27	14	
9																			

Absolute Zahlen		Patti Oli OT1 SCH2 4.11.99					Patti Oli OT1 SCH3 16.11.99					Patti Oli OT1 SCH4 16.11.99							
		Lutealz.			so. Z.		Lutealz.			so. Z.		Lutealz.			so. Z.				
Gesichtsfelder		zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+
Horizontal	Rand 1	+	22	4	6	14	15	+ -	8	6	9	21	20	-	17	4	6	27	28
	Rand 2	+	4	11	21	36	7	-	4	5	19	39	16	+ -	7	7	13	30	26
	1	+ -	3	11	7	31	12	-	7	13	17	24	25	-	5	7	19	45	23
	2	+ -	7	4	12	24	7	-	3	10	26	26	19	-	15	6	13	49	24
	3	-	5	7	10	33	27	-	4	7	15	35	23	-	16	4	15	28	16
4	-	4	4	17	28	7	-	7	3	21	30	26	+ -	8	10	24	33	16	
5																			
Vertical	Rand 1	+ -	16	8	16	26	7	+ -	12	8	19	21	25	-	19	7	10	34	23
	Rand 2	+	4	19	16	46	9	-	5	5	13	18	17	-	5	11	18	32	12
	1	+	7	11	32	24	9	+ -	5	8	23	25	22	+ -	7	16	12	25	19
	2	+	5	13	22	41	5	-	8	7	21	47	25	+ -	5	10	22	37	29
	3	+	2	14	28	29	8	-	9	6	19	31	28	-	8	3	15	28	28
	4	+ -	0	16	30	32	9	-	9	4	22	45	26	-	11	5	13	41	24
5	+ -	12	31	12	22	3	-	14	11	17	27	21	-	8	1	20	34	24	
6																			

zyt. Sig. = zytoplasmatisches Signal  
 Lutealz = Luteinzellen  
 so. Z. = sonstige Zellen  
 - = kein Signal  
 + - = schwaches Signal

Oli = Ovar links      Ore = Ovar rechts  
 OT = Objektträgernummer  
 SCH = Schnittnummer  
 + = mäßiges Signal  
 ++ = deutliches Signal

# Anhang

## 9.1.3 Tag 25 nach der Ovulation

Absolute Zahlen		Rieke Ore OT25 SCH2 18.11.99					Rieke Ore OT25 SCH3 19.11.99					Rieke Ore OT25 SCH4 19.11.99								
		zyt. Sig.		Lutealz.		so. Z.	zyt. Sig.		Lutealz.		so. Z.	zyt. Sig.		Lutealz.		so. Z.				
Gesichtsfelder		+	+ -	-	-	+	+	+ -	-	-	+	+	+ -	-	-	+				
Horizontal	Rand 1	+	14	4	20	21	19	+	8	10	26	38	21	+	17	12	23	38	24	
	Rand 2	+	13	13	12	4	3	14	++	5	13	16	30	25	+	15	11	20	36	36
	1	+	7	9	20	4	1	25	+	9	11	11	36	28	+	14	12	16	38	31
	2	+	11	8	16	34	26	+	8	6	22	34	27	+	8	6	17	41	24	
	3	+	11	9	15	36	16	+-	7	11	27	33	29	+	10	11	14	57	17	
	4	+	6	10	19	34	26	+-	9	10	19	26	21	+	11	11	30	42	20	
	5	+	13	6	13	34	24	+	6	8	21	36	16	+	8	8	17	34	20	
	6	+	11	6	14	19	31	+	14	18	19	23	27	+	13	13	21	33	23	
7	+	16	6	13	30	19	+	12	8	16	43	28	+	10	10	15	43	17		
8																				
Vertical	Rand 1	+-	10	11	10	37	40	+	11	12	14	28	27	+	12	10	17	32	37	
	Rand 2	+	15	12	10	23	24	++	19	12	11	19	28	+	23	6	14	36	29	
	1	+	6	11	14	25	30	+	11	18	17	33	19	+	14	7	20	25	33	
	2	+	5	12	18	29	29	+	13	10	17	40	28	+	15	11	18	30	17	
	3	+	13	6	17	22	39	+	7	8	21	25	29	+	10	8	22	47	22	
	4	+	11	17	19	18	31	+	7	14	21	33	27	+	11	9	21	42	29	
	5	+	7	10	18	25	39	+	11	13	20	32	20	+	8	9	28	37	19	
	6	+	9	10	20	36	34	+	10	10	17	25	22	+	9	6	16	31	32	
	7	+	4	10	18	38	31	+	6	16	13	22	26	+	10	7	15	42	14	
	8	+	8	10	16	28	28	+	11	7	12	28	29	+	8	10	20	38	22	
	9	+	5	13	21	25	39	+	4	14	22	19	33	+	9	7	26	37	39	
10	+	8	11	19	39	21	++	9	14	11	19	30	+	11	10	11	28	26		
11																				

Absolute Zahlen		Luca Oli OT 43 SCH2 29.11.99					Luca Oli OT 43 SCH3 29.11.99					Luca Oli OT 43 SCH3 29.11.99							
		zyt. Sig.		Lutealz.		so. Z.	zyt. Sig.		Lutealz.		so. Z.	zyt. Sig.		Lutealz.		so. Z.			
Gesichtsfelder		+	+ -	-	-	+	+	+ -	-	-	+	+	+ -	-	-	+			
Horizontal	Rand 1	+	11	15	11	24	37	+	9	4	14	36	37	+	11	9	12	44	34
	Rand 2	+	12	9	16	25	29	+	8	12	7	43	28	+	18	11	10	31	39
	1	+	17	6	12	23	29	+	11	4	19	44	33	+	12	17	15	38	32
	2	+	9	7	17	40	19	+	8	6	19	38	50	+	11	12	9	40	33
	3	+	6	11	16	29	38	+	8	10	25	37	31	+	12	9	20	40	30
	4	+	5	7	22	21	34	+	5	7	18	45	30	+	8	11	16	38	37
	5	+	10	7	22	24	22	+	9	7	18	40	36	+	9	8	13	44	66
	6	+	13	5	17	31	29	+	10	5	21	47	25	++	6	13	13	36	46
7	+	6	10	11	29	37	+	5	9	14	47	34	+	14	11	10	38	50	
8																			
Vertical	Rand 1	+	10	5	8	24	29	+	20	6	7	31	34	+	18	8	14	26	42
	Rand 2	+	9	13	7	20	43	+	8	9	11	48	32	+	16	16	6	24	44
	1	+	5	10	14	34	32	+	11	10	14	39	33	+	15	11	13	32	45
	2	+	8	10	17	26	25	+	5	5	13	32	28	+	7	9	16	32	55
	3	+	8	13	16	27	18	+	12	8	23	53	23	+	14	9	14	45	42
	4	+	16	8	17	23	18	+	7	10	22	39	21	+	8	7	17	30	47
	5	+	5	5	12	25	33	+	10	8	21	53	25	+	11	11	16	34	39
6	+	11	8	16	37	25	+	24	9	14	47	16	+	12	11	11	43	78	
7																			

zyt. Sig. = zytoplasmatisches Signal

Lutealz = Luteinzellen

so. Z. = sonstige Zellen

- = kein Signal + - = schwaches Signal

+ = mäßiges Signal

Oli = Ovar links

Ore = Ovar rechts

OT = Objektträgernummer

SCH = Schnittnummer

++ = deutliches Signal

# Anhang

Absolute Zahlen		Flo Oli OT4 SCH2 10.11.99					Flo Oli OT4 SCH4 6.11.99					Flo Ore OT16 SCH2 7.11.99																			
		zyt. Sig.		Lutealz.			so. Z.			zyt. Sig.		Lutealz.			so. Z.			zyt. Sig.		Lutealz.			so. Z.								
Gesichtsfelder		+	+-	-	-	+	+	+-	-	-	+	+	+-	-	-	+	+	+-	-	-	+	+	+-	-	-	+	+	+-	-	-	+
Horizontal	Rand 1	-		4	3	14	20	25	-		6	13	17	34	23	++		8	4	14	33	10									
	Rand 2	+		5	7	22	12	26	+		14	3	10	20	24	++		1	14	13	19	13									
	1	-		6	7	20	23	27	-		1	10	21	36	31	+		5	9	20	30	17									
	2	-		1	3	22	23	31	+-		1	5	20	32	40	+		0	5	23	26	15									
	3	-		2	3	21	22	26	+-		1	5	23	34	30	++		0	3	29	32	17									
	4	+-		2	2	19	19	29	-		1	6	23	34	29	+		5	5	24	27	17									
	5	+-		6	4	25	22	34	-		1	17	11	27	29	+		3	7	19	22	22									
	6	+-		3	1	21	25	28	+-		0	9	28	25	42	+		1	9	18	32	18									
	7	+-		5	1	27	23	24	+-		0	6	24	32	41	++		1	15	14	25	15									
8	+-		1	2	21	18	25	-		0	3	31	29	41	+		1	2	9	20	29										
Vertical	Rand 1	+-		7	2	14	26	32	+		7	2	17	29	23	++		0	12	15	24	18									
	Rand 2	-		8	9	22	19	29	+-		9	3	16	36	30	++		7	10	15	29	20									
	1	+-		3	4	16	21	28	+-		3	8	13	35	35	+		1	9	19	18	14									
	2	+-		3	4	19	22	35	+-		4	4	21	24	35	++		0	5	17	28	8									
	3	-		2	2	25	25	27	+-		10	5	11	30	22	+		2	7	25	25	17									
4																															

Absolute Zahlen		Daisy Oli OT34 SCH2 12.11.99					Daisy Oli OT34 SCH3 12.11.99					Daisy Oli OT34 SCH5 15.11.99																			
		zyt. Sig.		Lutealz.			so. Z.			zyt. Sig.		Lutealz.			so. Z.			zyt. Sig.		Lutealz.			so. Z.								
Gesichtsfelder		+	+-	-	-	+	+	+-	-	-	+	+	+-	-	-	+	+	+-	-	-	+	+	+-	-	-	+	+	+-	-	-	+
Horizontal	Rand 1	++		9	6	16	25	30	++		15	9	15	24	23	++		7	11	11	27	20									
	Rand 2	++		18	10	8	27	31	++		9	17	16	19	26	+++		9	12	9	15	33									
	1	++		15	13	12	30	26	++		7	10	18	22	32	++		9	10	15	26	20									
	2	++		14	10	13	25	38	++		6	18	19	33	13	++		14	10	16	26	26									
	3	++		12	5	11	19	38	++		6	11	15	36	18	++		12	10	12	18	17									
	4	++		19	11	12	28	41	++		12	10	14	31	20	++		17	9	8	14	24									
	5	++		18	7	15	23	28	++		5	11	20	31	23	++		14	8	11	14	29									
	6	++		13	9	12	21	22	++		7	7	17	32	10	++		6	9	9	16	40									
7																															
Vertical	Rand 1	++		15	5	13	23	28	++		12	11	20	28	23	++		16	18	8	18	36									
	Rand 2	+		15	10	13	35	32	++		15	10	12	23	28	++		9	7	9	15	15									
	1	++		16	15	16	26	25	++		11	12	10	25	24	++		6	13	14	30	23									
	2	++		11	7	23	37	34	++		15	17	9	19	29	++		16	15	9	19	19									
	3	++		16	9	16	22	31	++		15	9	16	27	20	++		14	13	9	13	12									
	4	+		17	14	10	21	27	++		13	13	15	32	20	++		7	13	12	20	21									
	5	++		16	11	21	20	22	++		11	13	12	22	15	++		5	9	9	18	15									
	6	++		13	8	12	26	46	++		9	9	8	26	24	++		7	5	9	13	33									
	7	+		14	6	14	19	31	++		4	13	12	24	28	++		10	8	9	22	22									
	8	+		11	14	13	25	43	++		5	14	13	25	19	++		12	11	11	12	25									
9																															

zyt. Sig. = zytoplasmatisches Signal  
 Lutealz = Luteinzellen  
 so. Z. = sonstige Zellen  
 - = kein Signal  
 +- = schwaches Signal

Oli = Ovar links      Ore = Ovar rechts  
 OT = Objekträgernummer  
 SCH = Schnittnummer  
 + = mäßiges Signal  
 ++ = deutliches Signal

# Anhang

## 9.1.4 Tag 35 nach der Ovulation

Absolute Zahlen		Oda Oli OT6 SCH3 11.11.99					Oda Oli OT6 SCH4 11.11.99					Oda Oli OT6 SCH5 12.11.99												
		zyt. Sig.		Lutealz.			so. Z.			zyt. Sig.		Lutealz.			so. Z.			zyt. Sig.		Lutealz.			so. Z.	
Gesichtsfelder		+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+
Horizontal	Rand 1	+	16	7	14	23	26	++	17	18	15	56	27	+	28	15	13	28	25					
	Rand 2	++	16	16	18	24	25	+	17	20	9	32	24	+	14	16	11	28	24					
	1	+	18	15	9	34	19	++	19	15	18	25	17	+ -	17	15	15	25	28					
	2	+	19	12	15	45	20	+	21	14	18	42	22	+ -	14	13	14	27	20					
	3	+	21	11	17	40	30	+	18	7	14	51	32	+ -	12	5	19	28	25					
	4	+	18	12	10	32	25	+ -	15	12	15	42	34	+ -	16	10	18	32	31					
	5	++	17	10	18	34	32	+ -	12	14	18	34	16	+ -	23	10	13	28	21					
	6	++	12	18	9	29	17	+ -	10	10	20	24	25	+	14	15	15	33	20					
	7	++	14	15	2	25	24	+ -	10	9	17	40	15	+	20	12	13	36	26					
8	++	14	9	15	25	24	+ -	8	6	12	25	20	+	20	15	18	29	18						
9																								
Vertical	Rand 1	+	19	13	10	30	23	++	21	14	13	24	19	+	15	8	12	30	25					
	Rand 2	+ -	13	8	13	23	21	+	15	5	4	32	33	+	14	12	10	20	15					
	1	+	22	13	17	32	24	+	10	16	15	26	9	+	20	15	23	26	31					
	2	+	19	10	8	24	18	+ -	11	8	18	28	18	+	14	19	19	22	15					
	3	+	21	11	14	37	32	+	15	7	12	31	28	+ -	14	11	16	26	24					
	4	+	17	11	12	30	21	+ -	10	12	19	27	27	+	19	5	25	37	26					
	5	+	17	12	13	34	26	+ -	10	8	18	37	22	+ -	14	13	21	19	29					
	6	+ -	15	14	14	33	18	+ -	8	21	13	32	34	+	12	13	16	31	26					
	7	+	17	5	14	28	18	+	14	15	18	22	16	+	23	13	20	28	22					
8	+ -	10	8	17	21	29	+	15	6	8	20	26	+	18	9	16	18	15						
9																								

Absolute Zahlen		Timba Ore OT27 SCH2 22.11.99					Timba Ore OT27 SCH3 22.11.99					Timba Ore OT27 SCH4 23.11.99												
		zyt. Sig.		Lutealz.			so. Z.			zyt. Sig.		Lutealz.			so. Z.			zyt. Sig.		Lutealz.			so. Z.	
Gesichtsfelder		+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+
Horizontal	Rand 1	+	11	11	19	26	1	+	16	7	7	26	23	+	15	11	10	18	11					
	Rand 2	+	12	8	20	20	22	+	13	13	11	31	16	+	14	10	7	29	8					
	1	+	10	8	13	19	12	+	11	10	9	27	15	+	11	12	10	29	21					
	2	+	8	8	13	29	11	+	11	6	9	26	9	+	9	6	7	14	18					
	3	+	6	5	12	32	18	+	5	12	15	19	26	+	4	6	11	19	23					
	4	+	3	9	12	25	15	+	10	6	14	31	25	+	4	7	12	13	10					
	5	+	6	6	14	14	18	+	9	9	11	24	25	+	3	3	17	25	15					
6	+	11	7	13	26	11	+	10	11	13	22	7	+	8	8	11	24	13						
7																								
Vertical	Rand 1	+	7	11	12	25	21	+	15	7	8	24	13	+	22	11	10	23	15					
	Rand 2	+	5	9	16	27	11	+	1	11	14	29	13	+	4	11	13	19	12					
	1	+	16	12	14	24	23	+	5	8	11	21	12	+	7	11	11	15	11					
	2	+	9	8	15	31	20	+ -	2	6	9	17	5	+	5	8	9	30	10					
	3	+	2	14	12	26	11	+	3	10	15	17	15	+	7	11	17	18	11					
	4	+	1	14	19	24	16	+	2	10	12	24	8	+	2	12	16	33	19					
5	+	2	8	18	18	17	+	3	13	9	17	6	+	9	5	15	33	13						
6																								

zyt. Sig. = zytoplasmatisches Signal  
 Lutealz = Luteinzellen  
 so. Z. = sonstige Zellen  
 - = kein Signal  
 + - = schwaches Signal

Oli = Ovar links      Ore = Ovar rechts  
 OT = Objekträgernummer  
 SCH = Schnittnummer  
 + = mäßiges Signal  
 ++ = deutliches Signal

# Anhang

Absolute Zahlen		Fox Oli OT5 SCH2 09.11.99					Fox Oli OT5 SCH3 09.11.99					Fox Oli OT5 SCH4 10.11.99							
		Lutealz.					Lutealz.					Lutealz.							
Gesichtsfelder		zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+
Horizontal	Rand 1	+	12	15	7	35	20	+	9	15	9	23	21	+	19	11	5	26	15
	Rand 2	+ -	13	7	9	20	12	+ -	12	17	12	25	21	+	8	11	8	31	24
	1	+	5	13	8	29	17	+	13	18	12	30	12	+	13	11	9	24	17
	2	+	8	7	10	28	9	+	10	12	6	31	23	+ -	11	16	9	28	19
	3	+	6	10	11	43	11	+	6	14	10	19	21	+ -	9	14	13	17	23
	4	+	4	10	7	40	18	+ -	6	12	10	24	24	+ -	8	13	12	27	20
	5	+	11	12	1	28	15	+ -	17	12	12	27	19	+	9	10	11	16	16
	6	+ -	7	11	10	26	17	+	14	15	8	24	20	+ -	8	11	10	21	23
	7	+ -	11	11	18	28	16	+	6	15	14	22	17	+ -	7	11	14	21	13
	8	+ -	10	12	10	22	12	+	14	14	13	26	24	+	4	16	11	24	17
9	+ -	7	9	7	19	15	+	16	10	9	25	25	+	7	11	8	35	20	
10																			
Vertical	Rand 1	+	9	11	7	33	18	+	8	11	9	26	14	+	18	13	11	15	18
	Rand 2	+ -	12	12	5	29	16	+	9	12	6	20	14	++	21	8	6	18	18
	1	+	7	10	3	26	12	+ -	16	8	7	23	15	+	10	12	14	31	11
	2	+	11	8	8	35	11	+	14	11	13	29	9	+	11	11	22	16	15
	3	+	12	10	6	30	13	+	15	10	8	23	11	+	7	16	15	11	12
	4	+ -	11	15	2	31	17	+ -	10	8	8	27	14	+	13	8	9	22	22
	5	+	18	9	10	26	15	+ -	9	3	12	36	14	++	12	8	8	21	22
	6	+ -	13	8	11	26	21	+ -	10	10	10	23	12	+	2	18	9	22	29
	7	+	11	9	9	40	28	+	5	14	8	18	12	+	9	18	13	20	17
	8	+	8	16	7	16	21	+ -	11	11	12	21	15	+	12	10	10	32	15
9																			

Absolute Zahlen		Maja Oli OT36 SCH2 17.11.99					Maja Oli OT36 SCH3 06.11.99					Maja Oli OT36 SCH4 17.11.99							
		Lutealz.					Lutealz.					Lutealz.							
Gesichtsfelder		zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+
Horizontal	Rand 1	++	13	6	7	30	24	++	12	9	6	30	31	++	14	4	11	34	25
	Rand 2	++	18	5	4	23	30	++	6	13	14	22	20	++	15	9	3	32	27
	1	++	14	9	8	31	20	++	11	10	8	34	24	++	12	8	14	33	18
	2	++	9	11	11	33	12	++	10	12	11	24	26	+	3	11	14	22	23
	3	++	10	11	14	21	23	++	5	6	19	22	26	+	3	12	16	25	15
	4	++	20	7	21	33	33	++	1	14	14	35	21	+	7	9	14	15	21
	5	++	7	9	9	31	42	++	11	11	4	34	29	++	9	9	14	19	46
	6	++	15	5	10	22	18	++	7	11	13	33	18	++	17	10	6	30	36
7																			
Vertical	Rand 1	++	12	13	7	20	25	++	8	9	14	34	17	++	12	9	2	35	41
	Rand 2	++	5	13	13	33	22	++	12	15	8	27	28	++	12	13	9	21	23
	1	++	9	15	12	35	31	+	4	8	18	37	12	++	11	8	10	34	24
	2	++	23	10	10	28	23	+	5	12	17	50	22	++	9	5	4	46	26
	3	++	15	14	8	36	34	++	7	13	16	38	20	++	8	14	10	22	23
	4	++	11	11	15	41	23	++	7	11	24	42	7	++	12	12	13	19	18
	5	++	16	6	13	33	28	++	10	17	17	47	15	++	9	6	14	23	36
	6	++	13	3	11	25	27	++	8	12	13	53	32	+	11	8	15	30	24
7	++	9	12	8	23	24	++	11	10	17	35	30	+	8	7	10	31	44	
8																			

zyt. Sig. = zytoplasmatisches Signal  
 Lutealz = Luteinzellen  
 so. Z. = sonstige Zellen  
 - = kein Signal  
 + - = schwaches Signal

Oli = Ovar links      Ore = Ovar rechts  
 OT = Objekträgernummer  
 SCH = Schnittnummer  
 + = mäßiges Signal  
 ++ = deutliches Signal



# Anhang

## 9.1.5 Tag 45 nach der Ovulation

Absolute Zahlen		Pat Oli OT8 SCH2 17.11.99					Pat Oli OT8 SCH3 05.11.99					Pat Oli OT8 SCH4 17.11.99							
		Lutealz.			so. Z.		Lutealz.			so. Z.		Lutealz.			so. Z.				
Gesichtsfelder		zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+
Horizontal	Rand 1	-	10	10	9	46	17	-	13	17	11	30	18	-	13	15	10	42	22
	Rand 2	-	15	8	9	51	18	-	8	21	11	42	6	-	19	14	18	44	19
	1	-	15	14	17	45	16	+ -	8	26	12	40	15	-	18	12	13	48	35
	2	-	11	10	18	37	15	+ -	9	21	19	46	6	-	24	14	15	40	22
	3	-	13	12	17	58	29	-	15	12	8	41	6	-	17	19	11	54	27
	4	-	21	13	13	45	30	-	10	17	12	46	6	-	15	11	15	39	17
	5	-	15	14	16	40	24	-	17	14	7	46	8	-	20	15	17	40	34
6																			
Vertical	Rand 1	-	19	17	17	44	11	-	13	21	14	34	12	-	18	17	19	39	37
	Rand 2	-	15	13	14	29	23	+ -	14	10	11	31	11	-	19	12	13	28	18
	1	-	17	15	8	40	29	-	13	16	13	18	9	-	16	15	9	37	31
	2	-	21	15	10	52	27	+ -	12	21	18	46	10	-	23	14	14	46	31
	3	-	15	13	9	34	25	-	17	9	15	55	20	-	19	13	16	40	17
	4	-	17	10	16	33	20	-	15	16	15	61	10	-	12	15	19	49	23
	5	-	15	15	14	39	14	-	11	7	9	50	20	-	14	16	14	41	28
6																			

Absolute Zahlen		Luna Oli OT44 SCH2 30.11.99					Luna Oli OT44 SCH3 01.12.99					Luna Oli OT44 SCH4 01.12.99							
		Lutealz.			so. Z.		Lutealz.			so. Z.		Lutealz.			so. Z.				
Gesichtsfelder		zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+
Horizontal	Rand 1	+ -	11	14	10	18	44	-	13	13	9	46	35	+	21	13	14	37	45
	Rand 2	-	15	11	12	21	45	-	20	9	10	39	34	+ -	13	13	5	34	32
	1	+ -	9	12	11	27	64	-	5	9	15	55	27	+ -	8	18	17	31	56
	2	-	7	12	10	38	77	-	9	8	14	37	28	+ -	16	15	16	57	59
	3	+ -	10	13	8	33	65	-	5	11	15	34	28	+ -	17	12	11	37	48
	4	-	8	12	13	45	61	-	5	10	12	31	37	+ -	18	19	11	46	58
	5	-	9	7	11	30	71	-	10	12	11	45	43	+ -	12	17	7	30	53
6	-	7	9	17	23	55	-	13	14	12	27	53	+ -	18	14	11	46	45	
7																			
Vertical	Rand 1	+ -	16	10	13	30	45	-	15	13	13	25	33	+	26	13	10	45	45
	Rand 2	+ -	19	11	11	14	45	-	20	11	6	28	39	+	22	13	8	31	42
	1	-	12	11	17	30	49	-	10	12	20	31	47	+ -	10	12	14	37	52
	2	-	9	10	14	39	42	-	4	13	13	29	32	+ -	10	9	14	43	42
	3	-	10	9	14	30	42	-	10	10	10	42	35	+ -	10	13	23	49	43
	4	-	8	9	11	32	57	-	8	12	9	34	48	+ -	16	7	13	34	46
	5	-	4	14	8	32	53	-	7	15	7	41	38	+	19	10	16	47	51
6	-	3	9	14	32	44	-	11	11	10	27	58	+ -	14	13	10	38	36	
7																			

zyt. Sig. = zytoplasmatisches Signal  
 Lutealz = Luteinzellen  
 so. Z. = sonstige Zellen  
 - = kein Signal  
 + - = schwaches Signal

Oli = Ovar links      Ore = Ovar rechts  
 OT = Objektträgernummer  
 SCH = Schnittnummer  
 + = mäßiges Signal  
 ++ = deutliches Signal

## Anhang

Absolute Zahlen		Sinah Ore OT30 SCH2 24.11.99					Sinah Ore OT30 SCH3 24.11.99					Sinah Ore OT30 SCH4 25.11.99							
		Lutealz.			so. Z.		Lutealz.			so. Z.		Lutealz.			so. Z.				
Gesichtsfelder		zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+
Horizontal	Rand 1	+ -	15	12	4	26	26	+ -	15	10	11	30	23	+ -	13	9	8	40	22
	Rand 2	+	12	11	14	35	23	+	17	7	11	33	34	+ -	18	10	11	43	30
	1	+	8	7	11	36	20	+	4	14	18	32	21	+ -	7	5	8	36	29
	2	+	11	14	14	27	16	+	9	7	17	45	23	-	12	9	12	34	25
	3	+ -	3	12	13	24	19	+ -	16	6	18	39	32	-	7	12	12	40	17
	4	+ -	11	7	12	29	20	+ -	19	7	14	42	43	-	5	9	10	29	25
	5	+ -	3	11	10	25	14	+ -	6	8	15	26	35	-	5	6	15	45	30
	6	+ -	13	8	8	27	18	+ -	12	10	19	32	17	+ -	12	9	12	26	24
	7	+	15	7	12	44	17	+ -	16	8	14	35	21	-	9	5	21	39	23
8																			
Vertical	Rand 1	+	18	4	8	29	31	+	16	12	7	26	33	+ -	17	5	8	31	26
	Rand 2	+	15	8	9	34	20	+	16	4	5	31	33	+ -	15	14	8	31	35
	1	+	11	10	12	24	29	+	15	14	4	37	32	+	15	12	10	23	25
	2	+	10	5	17	33	26	+	12	11	7	29	16	+	11	12	12	30	31
	3	+	3	7	15	24	16	+	9	8	15	33	17	+ -	8	8	18	28	23
	4	+	9	13	12	24	33	+ -	12	10	8	40	31	+ -	3	8	15	33	32
	5	+	9	5	13	29	28	+	11	13	10	30	25	+ -	8	5	16	34	34
	6	+ -	14	6	13	41	14	+	21	9	9	43	18	+ -	7	9	15	29	23
	7																		

Absolute Zahlen		Gil Ore OT29 SCH2 23.11.99					Gil Ore OT29 SCH3 23.11.99					Gil Ore OT29 SCH4 24.11.99							
		Lutealz.			so. Z.		Lutealz.			so. Z.		Lutealz.			so. Z.				
Gesichtsfelder		zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+
Horizontal	Rand 1	+	11	9	12	34	28	+ -	11	8	14	40	33	+	20	14	11	23	24
	Rand 2	+	12	12	15	27	26	+	12	10	14	18	40	+	13	14	10	41	22
	1	+	13	13	15	34	13	+	14	12	10	34	20	++	11	20	11	31	30
	2	+	13	12	2	27	30	+	8	9	14	31	32	+	11	8	18	33	36
	3	+	13	16	10	24	22	+	6	14	12	30	18	+	15	8	12	31	32
	4	+	6	17	10	34	31	+ -	7	14	17	30	32	+	12	8	16	35	43
	5	+	10	14	17	29	13	+ -	11	15	11	21	52	+	7	13	19	35	22
	6	+	8	12	15	30	41	+	10	7	20	32	34	+	9	10	16	42	28
	7	+	7	17	10	21	27	+ -	12	12	6	22	36	+	17	11	11	38	35
8																			
Vertical	Rand 1	+	16	10	11	24	30	+	16	17	8	23	18	+	21	13	11	27	14
	Rand 2	+	20	7	5	19	25	+ -	18	3	10	26	31	+	10	18	10	27	26
	1	+ -	8	15	14	29	23	+	5	13	14	36	32	+	14	15	15	34	29
	2	+ -	13	3	18	26	24	+	12	9	21	44	25	+	12	17	12	29	35
	3	+ -	8	8	14	25	40	+	5	6	21	33	26	+	15	14	15	45	27
	4	+ -	10	11	16	30	36	+	14	7	22	35	25	+	19	8	14	39	37
	5	+	12	9	10	34	22	+ -	9	12	16	41	41	++	14	11	15	34	47
	6	+ -	11	14	7	29	52	+	11	12	11	37	23	+	14	6	13	21	27
	7	+	8	15	14	33	21	+	7	12	19	29	40	+	11	10	9	25	42
8	+	12	15	5	26	42	+	18	7	11	38	31	+	15	16	13	20	35	
9																			

zyt. Sig. = zytoplasmatisches Signal  
 Lutealz = Luteinzellen  
 so. Z. = sonstige Zellen  
 - = kein Signal  
 + - = schwaches Signal

Oli = Ovar links      Ore = Ovar rechts  
 OT = Objekträgernummer  
 SCH = Schnittnummer  
 + = mäßiges Signal  
 ++ = deutliches Signal

## Anhang

### 9.2 Einzelergebnisse der Auszählung der Gesichtsfelder: Darstellung von Östrogenrezeptoren im CL der Hündin.

#### 9.2.1 Tag 5 nach der Ovulation

Absolute Zahlen		Asta Oli OT57 SCH2 28.02.00					Asta Oli OT57 SCH3 28.02.00					Asta Oli OT57 SCH4 28.02.00							
		Lutealz.			so. Z.		Lutealz.			so. Z.		Lutealz.			so. Z.				
Gesichtsfelder		zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+
Horizontal	Rand 1	++	3	2	32	41	9	++	8	10	22	20	13	+	2	7	34	22	20
	Rand 2	++	5	10	24	26	17	++	3	9	30	20	20	+	1	8	22	34	23
	1	+	0	3	46	61	19	++	4	9	43	25	14	+	0	9	20	23	26
	2	+	0	7	56	45	30	++	2	9	36	25	19	+	1	11	31	24	33
	3	+	1	7	39	34	26	++	3	8	29	17	4	+	0	4	40	27	25
	4	+	7	17	20	22	23	++	3	2	38	43	27	+	2	8	37	22	7
	5	+	2	20	31	29	16	++	1	4	31	18	20	+	8	13	27	35	37
	6	+	7	7	24	33	45	++	5	8	25	21	21	+	3	7	27	24	33
7																			
Vertical	Rand 1	+	0	4	42	31	11	++	9	14	17	21	13	+	3	9	32	11	26
	Rand 2	+	3	4	51	35	11	+	2	13	25	18	22	+	2	4	23	11	25
	1	+	0	12	55	29	8	++	5	5	46	22	25	+	1	8	31	19	20
	2	+	3	9	35	21	24	+	5	4	50	28	18	+	1	10	33	19	14
	3	+	1	2	36	41	7	+	2	8	38	38	17	+	2	7	43	24	20
	4	+	4	14	45	28	12	+	5	10	38	16	21	+	4	5	39	14	24
	5	+	4	10	35	35	15	+	5	9	36	22	13	+	1	3	40	20	16
	6	+	2	5	47	34	17	+	2	7	38	18	12	+	4	8	30	15	15
7																			

Absolute Zahlen		Pila Oli OT59 SCH2 01.03.00					Pila Oli OT59 SCH3 01.03.00					Pila Oli OT59 SCH4 01.03.00							
		Lutealz.			so. Z.		Lutealz.			so. Z.		Lutealz.			so. Z.				
Gesichtsfelder		zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+
Horizontal	Rand 1	+ -	3	10	52	43	35	+	17	16	28	36	40	+ -	6	17	22	25	40
	Rand 2	+ -	2	5	48	44	16	+	27	8	16	22	39	+ -	25	20	23	23	31
	1	+ -	10	17	32	21	25	+	10	22	29	41	40	+ -	6	14	23	29	42
	2	+ -	10	13	31	19	43	+ -	13	12	26	27	33	+ -	7	22	30	28	20
	3	+ -	11	12	21	28	32	+ -	4	18	33	24	53	+ -	9	16	29	23	28
	4	+ -	7	10	40	25	23	+ -	11	13	29	28	17	+ -	4	17	35	22	24
	5	+ -	6	12	36	20	31	+ -	10	20	26	21	32	+ -	5	22	29	23	22
	6	+ -	0	2	60	43	12	+	20	10	24	26	37	+ -	9	22	31	23	26
7																			
Vertical	Rand 1	+ -	2	8	47	42	18	+ -	5	10	42	41	18	+	14	15	27	35	27
	Rand 2	+ -	10	10	28	30	38	+ -	14	21	26	24	36	+	23	14	31	26	34
	1	+ -	4	2	54	32	15	+ -	8	19	30	38	28	+	11	20	34	23	26
	2	+ -	1	5	49	29	11	+ -	7	17	30	28	31	+	14	15	26	24	41
	3	+ -	10	9	33	38	30	+ -	4	19	35	28	27	+ -	7	14	35	21	36
	4	+ -	13	11	28	30	32	+	11	15	25	23	36	+ -	6	10	28	36	50
	5	+ -	8	2	29	27	33	+	11	19	36	14	30	+ -	7	24	45	33	41
	6	+ -	4	9	34	18	22	+	17	7	29	33	35	+ -	5	23	24	27	41
7																			

zyt. Sig. = zytoplasmatisches Signal  
 Lutealz = Luteinzellen  
 so. Z. = sonstige Zellen  
 - = kein Signal  
 + - = schwaches Signal

Oli = Ovar links      Ore = Ovar rechts  
 OT = Objektträgernummer  
 SCH = Schnittnummer  
 + = mäßiges Signal  
 ++ = deutliches Signal

# Anhang

Absolute Zahlen		Zora Oli OT52 SCH2 16.03.00					Zora Oli OT52 SCH3 16.03.00					Zora Oli OT52 SCH4 16.03.00							
		zyt. Sig.	Lutealz.				so. Z.	zyt. Sig.	Lutealz.				so. Z.	zyt. Sig.	Lutealz.				so. Z.
			+	+ -	-	-			+	+	+ -	-			-	+	+	+ -	
Horizontal	Rand 1	+ -	8	14	32	36	34	+ -	2	8	41	49	21	+ -	4	15	28	23	41
	Rand 2	+ -	9	9	19	40	39	+ -	8	11	26	26	49	+ -	7	15	16	21	49
	1	+ -	10	23	26	38	40	+ -	1	14	45	47	19	+ -	13	23	24	27	36
	2	+ -	9	18	27	25	29	+ -	6	13	39	34	35	+ -	6	13	22	15	52
	3	+ -	14	21	24	25	48	+ -	15	15	22	35	62	+ -	5	22	31	25	33
	4	+ -	12	19	18	20	50	+ -	10	23	19	23	48	+ -	10	19	26	13	35
	5	+ -	22	17	25	19	38	+ -	11	15	24	18	43	+ -	6	12	18	18	41
6																			
Vertical	Rand 1	+ -	9	21	28	37	35	+ -	17	14	31	15	42	+ -	7	20	19	24	34
	Rand 2	+ -	10	19	23	30	51	+ -	15	14	29	23	40	+ -	12	26	23	19	33
	1	+ -	12	24	35	35	21	+ -	23	12	29	25	44	+ -	14	16	15	21	48
	2	+ -	8	13	11	35	35	+ -	18	15	20	35	50	+ -	7	18	22	24	44
	3	+ -	12	19	21	30	48	+ -	18	21	18	29	42	+ -	12	11	26	21	48
	4	+ -	6	26	23	27	54	+ -	9	11	30	34	49	+ -	11	17	19	24	40
	5																		

Absolute Zahlen		Maria Ore OT80 SCH2 22.05.00					Maria Ore OT80 SCH3 22.05.00					Maria Ore OT80 SCH4 22.05.00							
		zyt. Sig.	Lutealz.				so. Z.	zyt. Sig.	Lutealz.				so. Z.	zyt. Sig.	Lutealz.				so. Z.
			+	+ -	-	-			+	+	+ -	-			-	+	+	+ -	
Horizontal	Rand 1	+	10	14	26	17	46	++	34	12	16	10	35	++	34	14	22	21	41
	Rand 2	+	42	12	20	16	15	++	24	9	19	9	42	++	30	17	14	20	33
	1	+	19	20	22	11	24	++	20	18	16	16	34	++	15	19	23	20	22
	2	+	15	13	24	15	36	++	20	16	15	5	22	++	26	22	25	8	21
	3	+	21	18	29	19	36	++	33	10	15	12	39	++	15	12	19	13	40
	4	+	27	15	16	9	21	++	25	11	17	11	41	++	18	15	22	14	31
	5	+	16	17	21	12	27	++	23	8	15	13	27	++	23	16	20	13	23
6																			
Vertical	Rand 1	+	28	11	18	14	45	++	27	7	15	16	35	++	22	16	17	13	31
	Rand 2	+	33	19	11	10	36	++	30	12	19	17	40	++	30	17	11	12	26
	1	+	25	14	25	14	41	++	19	10	17	12	39	++	20	16	28	19	26
	2	+	19	16	18	16	32	++	22	13	11	6	21	++	16	12	16	17	38
	3	+	17	12	13	9	33	++	23	11	7	11	62	++	17	13	7	19	52
	4	++	25	11	9	12	31	++	19	14	22	15	20	++	21	12	16	17	44
	5	+	26	16	14	8	44	++	23	9	19	15	30	++	41	13	10	13	31
6																			

zyt. Sig. = zytoplasmatisches Signal  
 Lutealz = Luteinzellen  
 so. Z. = sonstige Zellen  
 - = kein Signal  
 + - = schwaches Signal

Oli = Ovar links      Ore = Ovar rechts  
 OT = Objekträgernummer  
 SCH = Schnittnummer  
 + = mäßiges Signal  
 ++ = deutliches Signal

# Anhang

## 9.2. Tag 15 nach der Ovulation

Absolute Zahlen		Kim Oli OT61 SCH2 28.02.00					Kim Oli OT61 SCH3 28.02.00					Kim Oli OT61 SCH5 28.02.00							
		Lutealz.					so. Z.					Lutealz.					so. Z.		
Gesichtsfelder		zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+
Horizontal	Rand 1	+	0	10	28	40	14	+	0	7	40	50	20	+	2	10	34	39	21
	Rand 2	+	2	16	27	41	23	+	2	5	35	54	25	++	1	14	24	28	22
	1	+	0	12	25	56	13	+	0	7	38	54	21	+	2	8	28	44	23
	2	+	2	7	42	48	8	+	0	4	36	59	8	+	2	6	41	43	17
	3	+	1	4	40	69	10	+	0	5	51	55	10	+	3	8	48	48	21
	4	+	1	12	39	65	11	+	0	5	44	52	21	++	1	4	41	40	10
	5	+	3	8	50	65	25	+	0	6	46	63	12	+	3	12	33	31	21
6	+	1	8	45	41	15	+	0	5	55	41	17	+	0	17	24	36	27	
7																			
Vertical	Rand 1	+	2	12	22	61	47	+	0	8	48	40	21	+	3	12	27	54	13
	Rand 2	+	1	9	18	56	19	+	4	7	28	46	21	+	1	4	45	44	19
	1	+	0	11	44	63	15	+	2	4	58	38	12	+	1	5	49	43	10
	2	+	0	6	43	59	35	+	0	4	43	45	16	+	1	8	51	67	10
	3	+	1	5	49	59	14	+	4	7	30	54	20	+	1	10	38	56	12
	4	+	0	12	43	67	24	+	2	3	54	50	11	+	0	6	50	44	15
5																			

Absolute Zahlen		Rejca Oli OT62 SCH2 07.03.00					Rejca Oli OT62 SCH4 07.03.00					Rejca Oli OT62 SCH5 07.03.00							
		Lutealz.					so. Z.					Lutealz.					so. Z.		
Gesichtsfelder		zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+
Horizontal	Rand 1	+	3	18	41	41	45	+	5	10	25	58	44	+	3	21	40	42	41
	Rand 2	+	6	15	41	44	54	+	2	19	39	37	64	+	3	23	41	39	47
	1	+	9	18	50	33	40	+	3	18	41	40	42	+	1	13	23	36	64
	2	+	11	8	59	39	41	+ -	11	9	46	31	54	+	10	17	39	35	49
	3	+	12	17	55	40	57	+ -	8	15	38	60	59	+ -	9	11	41	30	63
	4	+	9	16	54	40	54	+ -	5	13	41	58	56	+ -	10	21	52	39	57
	5	+	11	12	57	45	53	+ -	12	14	52	42	73	+ -	5	20	43	46	58
6	+	7	13	50	47	50	+ -	5	17	46	35	67	+ -	7	11	51	42	54	
7																			
Vertical	Rand 1	+	4	23	53	35	52	++	14	24	43	37	65	++	7	21	24	29	61
	Rand 2	+	10	7	40	24	40	++	13	12	34	24	51	++	10	30	28	25	62
	1	+	10	23	44	35	56	+	8	26	44	21	45	++	15	13	38	28	37
	2	+	5	17	45	37	64	++	5	16	37	37	64	++	12	14	48	25	54
	3	+	9	21	41	24	51	++	9	19	55	31	53	++	6	17	34	53	66
	4	+	6	20	30	25	54	++	8	27	30	35	71	++	10	21	36	35	49
5																			

zyt. Sig. = zytoplasmatisches Signal  
 Lutealz = Luteinzellen  
 so. Z. = sonstige Zellen  
 - = kein Signal  
 + - = schwaches Signal

Oli = Ovar links      Ore = Ovar rechts  
 OT = Objekträgnummer  
 SCH = Schnittnummer  
 + = mäßiges Signal  
 ++ = deutliches Signal

# Anhang

Absolute Zahlen		Patll Oli OT 60 SCH 2 10.03.00					Patll Oli OT 60 SCH 2 10.03.00					Patll Oli OT 60 SCH 3 10.03.00							
		Lutealz.		so. Z.			Lutealz.		so. Z.			Lutealz.		so. Z.					
Gesichtsfelder		zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+
Horizontal	Rand 1	+	7	10	45	46	8	+	18	9	36	36	36	+	5	13	21	33	26
	Rand 2	+	5	11	21	43	27	+	9	17	22	23	22	+	22	10	19	17	43
	1	+	11	18	22	25	29	+	14	7	29	27	35	+	7	16	21	32	25
	2	+	8	15	20	41	33	+	6	14	30	37	36	+	4	17	20	17	38
	3	+	9	15	33	34	39	+	5	7	37	32	36	+	12	12	21	25	49
	4	+	5	22	32	38	38	+	10	8	33	40	37	+	5	19	21	31	49
	5	+	3	17	23	32	36	+	3	13	38	24	37	+	5	17	22	18	60
6																			
Vertical	Rand 1	+	9	15	29	34	49	+	7	14	20	29	43	+	8	16	25	36	45
	Rand 2	+	8	12	20	30	27	+	6	16	17	31	45	+	7	13	26	40	36
	1	+	7	17	41	36	16	+	5	16	19	37	42	+	7	17	29	35	30
	2	+	11	17	26	51	41	+	7	21	28	25	26	+	11	13	32	29	45
	3	+	3	12	45	49	42	+	7	15	26	36	45	+	13	5	38	36	42
	4	+	8	9	37	47	36	+	7	16	19	27	38	+	6	19	23	26	44
	5	+	7	19	22	32	43	+	9	16	24	25	50	+	11	16	31	30	57
	6	+	9	16	20	49	50	+	9	13	16	23	47	+	17	17	19	42	48
7																			

Absolute Zahlen		Fee Oli OT81 SCH2 24.05.00					Fee Oli OT81 SCH3 24.05.00					Fee Oli OT81 SCH4 24.05.00							
		Lutealz.		so. Z.			Lutealz.		so. Z.			Lutealz.		so. Z.					
Gesichtsfelder		zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+
Horizontal	Rand 1	+	17	22	16	19	50	+	29	13	8	25	50	+	22	6	4	11	50
	Rand 2	+	24	15	18	17	46	+	54	20	22	21	49	+	21	19	18	24	44
	1	+	23	13	15	20	46	+	23	12	9	29	47	+	25	9	10	10	60
	2	+	20	7	14	17	51	+	19	13	16	16	55	+	28	7	9	9	72
	3	+	26	13	16	19	35	+	23	15	10	26	48	+	21	12	7	8	47
	4	+	18	15	15	20	30	+	24	14	19	20	49	+	23	16	12	9	47
	5	+	14	10	6	13	52	+	32	11	14	23	45	+	19	11	12	12	58
6	+	29	8	14	14	64	+	24	17	14	21	47	+	21	13	15	31	56	
7																			
Vertical	Rand 1	+	16	7	15	20	49	+	25	11	24	12	31	+	29	14	11	13	46
	Rand 2	+	22	20	7	11	54	+	27	14	9	14	35	+	22	8	15	14	43
	1	+	12	11	7	17	43	+	27	10	21	21	48	+	26	10	9	19	49
	2	+	23	10	15	24	61	+	19	12	15	17	40	+	20	20	13	10	40
	3	+	16	12	14	18	58	+	29	13	13	20	39	+	21	13	15	23	63
4	+	20	18	8	17	55	+	16	9	12	21	44	+	17	21	16	12	30	
5																			

zyt. Sig. = zytoplasmatisches Signal  
 Lutealz = Luteinzellen  
 so. Z. = sonstige Zellen  
 - = kein Signal  
 +- = schwaches Signal

Oli = Ovar links      Ore = Ovar rechts  
 OT = Objekträgernummer  
 SCH = Schnittnummer  
 + = mäßiges Signal  
 ++ = deutliches Signal

# Anhang

## 9.2.3 Tag 25 nach der Ovulation

Absolute Zahlen		Luca Oli OT67 SCH2 09.03.00					Luca Oli OT67 SCH3 09.03.00					Luca Oli OT67 SCH4 09.03.00							
		Lutealz.					so. Z.					Lutealz.					so. Z.		
Gesichtsfelder		zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+
Horizontal	Rand 1	+ -	11	9	39	49	37	+ -	15	13	16	28	56	+ -	6	18	30	46	52
	Rand 2	+ -	11	17	31	50	47	+ -	10	26	24	47	41	+ -	7	18	27	43	46
	1	+ -	5	12	39	40	59	+ -	14	13	32	49	29	+ -	8	17	26	30	55
	2	+ -	15	12	22	34	37	+ -	10	15	23	32	42	+ -	6	20	35	42	40
	3	+ -	14	13	45	36	49	+ -	6	14	36	43	51	+ -	4	21	23	54	58
	4	+ -	15	13	39	33	42	+ -	6	19	32	42	36	+ -	11	14	25	40	41
	5	+ -	17	15	23	31	63	+ -	4	17	23	38	42	+ -	15	10	32	39	43
	6	+ -	8	15	35	48	63	+ -	13	12	24	39	47	+ -	6	17	27	41	52
7	+ -	8	20	42	42	61	+ -	2	22	22	48	49	+ -	10	12	33	49	30	
8																			
Vertical	Rand 1	+ -	10	16	33	56	72	+ -	17	16	37	35	43	+ -	12	11	30	43	43
	Rand 2	+ -	13	11	34	41	65	+ -	7	16	30	55	46	+ -	6	11	21	30	28
	1	+ -	6	17	30	46	61	+ -	6	16	23	39	41	+ -	17	10	23	48	53
	2	+ -	9	19	26	38	62	+ -	11	14	40	48	46	+ -	18	16	25	44	42
	3	+ -	8	18	27	26	62	+ -	5	9	32	40	48	+ -	14	21	42	50	37
	4	+ -	8	14	39	41	45	+ -	10	11	25	38	43	+ -	11	19	28	37	47
	5	+ -	10	10	31	43	64	+ -	6	14	25	45	40	+ -	12	19	25	35	30
	6																		

Absolute Zahlen		Flo Oli OT65 SCH2 14.03.00					Flo Oli OT65 SCH3 14.03.00					Flo Oli OT65 SCH4 14.03.00							
		Lutealz.					so. Z.					Lutealz.					so. Z.		
Gesichtsfelder		zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+
Horizontal	Rand 1	+ -	10	14	13	37	36	+ -	7	6	10	7	37	+ -	3	16	18	17	41
	Rand 2	+ -	13	8	17	29	37	+ -	1	4	20	29	28	+ -	13	15	11	16	37
	1	+ -	2	10	19	28	49	+ -	6	12	15	34	38	+ -	7	9	13	25	47
	2	+ -	7	9	21	37	44	+ -	3	5	22	3	52	+ -	1	7	20	22	53
	3	+ -	7	12	21	29	37	+ -	2	8	37	41	30	+ -	4	8	25	24	42
4	+ -	12	7	20	32	27	+ -	5	6	20	37	34	+ -	3	9	17	16	71	
5																			
Vertical	Rand 1	+ -	12	10	14	19	36	+	11	9	18	21	25	+	6	11	9	17	40
	Rand 2	+	9	10	15	29	27	+ -	8	8	11	10	33	+ -	17	9	15	21	69
	1	+ -	11	7	9	18	36	+ -	3	14	18	19	43	+ -	8	8	16	19	51
	2	+ -	4	15	16	29	41	+ -	5	7	20	21	49	+ -	5	9	18	24	50
	3	+ -	6	13	15	39	33	+ -	8	10	12	21	52	+ -	9	11	16	16	56
	4	+ -	6	10	26	19	50	+ -	7	8	13	24	34	+ -	12	13	16	18	53
	5	+ -	3	17	19	40	33	+ -	6	10	15	18	44	+ -	6	13	15	10	51
	6	+ -	8	11	23	34	44	+ -	5	7	19	17	42	+ -	8	6	24	19	53
7	+ -	0	12	15	24	34	+ -	4	5	16	16	41	+ -	8	15	11	21	45	
8																			

zyt. Sig. = zytoplasmatisches Signal  
 Lutealz = Luteinzellen  
 so. Z. = sonstige Zellen  
 - = kein Signal  
 + - = schwaches Signal

Oli = Ovar links      Ore = Ovar rechts  
 OT = Objekträgernummer  
 SCH = Schnittnummer  
 + = mäßiges Signal  
 ++ = deutliches Signal

# Anhang

Absolute Zahlen		Daisy Ore OT83 SCH2 19.05.00					Daisy Ore OT83 SCH3 19.05.00					Daisy Ore OT83 SCH4 19.05.00							
		Lutealz.			so. Z.		Lutealz.			so. Z.		Lutealz.			so. Z.				
Gesichtsfelder		zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+
Horizontal	Rand 1	++	15	10	25	27	55	++	16	20	19	37	34	++	17	6	16	26	65
	Rand 2	++	7	11	14	14	49	++	7	20	19	20	29	++	13	14	12	22	41
	1	++	13	18	14	18	22	++	8	15	14	27	46	++	14	15	13	15	40
	2	++	6	14	11	17	34	++	18	16	16	31	49	++	10	13	15	12	40
	3	++	3	16	18	22	20	++	15	15	22	26	40	++	9	12	19	19	36
	4	++	5	15	12	21	21	++	15	15	17	18	33	++	2	12	15	14	49
	5	++	7	10	18	9	21	++	7	13	15	21	58	++	7	15	15	20	39
	6	++	8	13	19	12	41	++	12	12	22	22	44	++	2	16	14	16	47
Vertical	Rand 1	++	14	12	18	26	32	++	13	19	15	26	47	++	23	12	16	38	41
	Rand 2	++	17	11	19	27	60	++	12	11	10	25	51	++	12	14	24	27	34
	1	++	11	13	12	21	41	++	15	13	17	25	41	++	13	15	16	35	42
	2	++	10	16	21	17	41	++	14	17	11	29	50	++	4	16	11	28	46
	3	++	6	12	19	11	40	++	7	11	16	9	49	++	3	15	20	25	45
	4	++	11	10	12	21	35	++	9	13	8	13	45	++	8	14	19	20	33
	5	++	13	11	10	25	33	++	11	14	16	16	40	++	7	11	21	25	60
	6																		

Absolute Zahlen		Rieke Ore OT82 SCH2 18.05.00					Rieke Ore OT82 SCH3 18.05.00					Rieke Ore OT82 SCH4 18.05.00							
		Lutealz.			so. Z.		Lutealz.			so. Z.		Lutealz.			so. Z.				
Gesichtsfelder		zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+
Horizontal	Rand 1	++	12	9	19	40	48	++	18	8	9	25	48	++	4	6	12	20	35
	Rand 2	++	15	11	14	34	42	+	15	14	13	23	55	++	13	10	15	34	35
	1	++	13	15	18	43	33	++	12	11	8	38	67	++	4	14	9	15	48
	2	++	7	21	17	40	36	++	11	16	13	27	52	++	8	15	16	32	25
	3	++	7	18	15	19	53	+	6	13	13	27	55	++	10	14	10	27	43
	4	++	13	10	12	44	48	+	8	14	15	28	35	++	5	14	17	20	47
	5	++	19	8	22	25	40	+	12	15	15	34	26	++	9	13	8	29	46
	6	++	6	12	17	28	46	+	7	12	14	28	47	++	7	18	10	32	29
	7	++	16	11	15	32	49	+	7	13	22	32	44	++	10	18	14	21	48
8	++	13	19	15	14	40	+	11	17	14	36	38	++	6	13	15	25	41	
Vertical	Rand 1	++	9	12	11	30	38	+	11	18	15	30	37	++	12	11	12	24	35
	Rand 2	++	14	16	14	18	36	+	17	16	10	20	44	++	14	12	14	21	37
	1	++	4	15	16	21	69	+	8	12	15	36	37	++	8	15	14	28	40
	2	++	8	16	16	28	44	+	7	10	14	37	47	++	9	11	20	43	59
	3	++	12	17	15	29	48	+	9	9	15	14	58	++	12	17	11	14	49
	4	++	12	12	11	31	52	+	8	14	15	19	49	++	15	16	14	21	52
	5	++	15	18	14	37	31	+	10	10	9	29	70	++	7	12	14	37	38
	6																		

zyt. Sig. = zytoplasmatisches Signal

Lutealz = Luteinzellen

so. Z. = sonstige Zellen

- = kein Signal

+ - = schwaches Signal

Oli = Ovar links      Ore = Ovar rechts

OT = Objekträgernummer

SCH = Schnittnummer

+ = mäßiges Signal

++ = deutliches Signal



# Anhang

## 9.2.4 Tag 35 nach der Ovulation

Absolute Zahlen		Maja Oli OT68 SCH2 06.03.00					Maja Oli OT68 SCH4 06.03.00					Maja Oli OT68 SCH5 07.03.00							
		Lutealz.					so. Z.					Lutealz.					so. Z.		
Gesichtsfelder		zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+
Horizontal	Rand 1	++	4	12	29	40	24	++	8	6	25	28	33	++	11	18	18	32	26
	Rand 2	+	3	7	38	58	15	+	1	11	28	42	25	++	11	21	21	39	14
	1	++	1	15	26	22	39	++	1	17	23	40	24	++	6	21	16	27	24
	2	++	5	9	25	32	29	++	5	11	25	31	30	++	5	10	10	34	21
	3	++	2	16	19	32	28	++	9	4	36	26	34	++	5	15	20	32	41
	4	+	7	11	22	37	25	+	3	13	27	27	30	++	5	23	17	25	21
	5	+	3	10	29	23	27	+	3	10	30	36	22	+	4	20	26	26	19
	6	+	2	25	19	25	33	+	3	21	26	34	28	+	3	21	14	20	33
	7	+	1	6	37	41	23	+	0	11	32	34	29	+	4	22	17	28	32
8	+	1	12	34	42	26	+	1	9	34	29	33	+	5	22	17	33	45	
9																			
Vertical	Rand 1	+	2	6	49	41	43	+	0	6	49	63	24	++	11	17	17	44	45
	Rand 2	++	3	10	31	41	23	++	8	10	25	31	30	++	15	23	24	41	31
	1	+	0	6	40	48	22	+	1	7	45	47	30	+	2	21	13	23	34
	2	+	1	10	33	42	28	+	0	4	41	38	21	+	0	25	17	19	33
	3	++	5	32	16	28	28	++	3	17	22	41	28	++	5	19	24	29	33
	4	++	4	17	17	23	42	++	6	14	27	29	31	++	10	16	18	21	37
5																			

Absolute Zahlen		Timba Oli OT71 SCH2 08.03.00					Timba Oli OT71 SCH3 08.03.00					Timba Oli OT71 SCH4 08.03.00							
		Lutealz.					so. Z.					Lutealz.					so. Z.		
Gesichtsfelder		zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+
Horizontal	Rand 1	+	1	7	32	48	16	++	13	12	9	37	25	+	5	8	27	44	22
	Rand 2	+	2	7	25	75	24	+	7	14	8	33	32	+	17	16	21	33	39
	1	+	1	1	33	44	18	++	13	15	14	28	51	+	8	13	23	44	27
	2	+	0	8	26	39	21	+	1	5	14	31	47	+	8	7	21	27	37
	3	+	0	5	28	43	28	+	4	9	19	23	42	+	4	10	23	39	31
	4	+	6	9	16	37	33	+	10	10	14	23	44	+	9	12	14	32	54
	5	+	3	11	19	44	28	+	8	13	17	29	30	+	11	16	21	39	40
6																			
Vertical	Rand 1	+	3	5	32	36	24	+	12	13	13	23	56	+	10	21	16	30	39
	Rand 2	+	10	10	10	31	29	+	11	10	14	19	47	+	9	13	18	23	43
	1	+	0	10	22	29	32	+	10	6	17	27	40	+	6	21	20	27	36
	2	+	2	12	12	29	29	+	3	13	14	30	60	+	13	13	24	35	43
	3	+	4	10	20	20	34	+	4	17	15	22	35	+	5	8	29	45	36
	4	+	10	12	12	25	43	+	6	15	13	24	38	+	6	6	17	23	46
5																			

zyt. Sig. = zytoplasmatisches Signal  
 Lutealz = Luteinzellen  
 so. Z. = sonstige Zellen  
 - = kein Signal  
 +- = schwaches Signal

Oli = Ovar links      Ore = Ovar rechts  
 OT = Objektragnummer  
 SCH = Schnittnummer  
 + = maiges Signal  
 ++ = deutliches Signal

## Anhang

Absolute Zahlen		Fax Oli OT84 SCH2 23.09.00					Fax Oli OT84 SCH3 23.09.00					Fax Oli OT84 SCH4 23.09.00							
		Lutealz.		so. Z.			Lutealz.		so. Z.			Lutealz.		so. Z.					
Gesichtsfelder		zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+
Horizontal	Rand 1	++	25	10	11	30	54	++	27	12	16	39	48	++	28	7	14	50	38
	Rand 2	++	18	18	10	37	51	++	23	14	10	35	40	++	19	12	10	43	20
	1	++	23	20	19	28	30	++	36	8	11	29	30	++	31	9	16	51	30
	2	++	34	8	24	20	44	++	16	18	19	40	31	++	19	7	15	36	34
	3	++	14	17	14	23	36	++	22	13	15	31	48	++	21	12	18	26	25
	4	++	21	18	18	23	39	++	22	12	16	30	40	++	23	14	14	27	29
	5	++	22	10	14	23	37	++	18	9	17	13	33	++	14	10	19	40	32
	6	++	24	11	12	24	45	++	22	13	8	21	41	++	13	17	14	35	19
7	++	26	10	14	26	44	++	16	11	16	24	43	++	16	15	15	51	30	
8																			
Vertical	Rand 1	++	32	10	9	32	50	+	20	11	19	44	30	+	21	15	13	30	44
	Rand 2	++	26	13	9	34	45	+	23	8	17	42	14	++	26	7	15	46	23
	1	++	33	14	13	25	54	+	23	13	17	25	21	+	12	11	17	28	33
	2	++	24	7	11	24	68	+	31	14	22	29	19	+	17	10	15	23	33
	3	++	30	16	10	26	49	+	12	8	20	24	33	+	15	9	20	19	40
	4	++	25	8	10	20	56	+	11	10	16	21	21	+	18	15	19	27	47
	5	++	25	10	7	27	50	+	19	11	23	28	40	+	13	14	15	31	32
	6	++	27	15	15	24	46	+	11	14	14	45	19	+	15	17	16	31	25
7																			

Absolute Zahlen		Oda Ore OT85 SCH2 19.05.00					Oda Ore OT85 SCH3 19.05.00					Oda Ore OT85 SCH4 19.05.00							
		Lutealz.		so. Z.			Lutealz.		so. Z.			Lutealz.		so. Z.					
Gesichtsfelder		zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+
Horizontal	Rand 1	+	15	13	21	39	43	+	13	14	30	28	39	+	23	12	15	50	25
	Rand 2	+	21	13	21	32	26	+	23	13	21	35	32	+	21	5	19	33	42
	1	+	20	14	11	46	35	+	7	13	26	38	27	+	18	13	15	54	28
	2	+	22	19	13	39	33	+	12	13	23	38	36	+	13	8	18	37	24
	3	+	19	12	12	39	41	+	13	13	16	30	38	+	19	13	21	36	38
	4	+	17	11	14	31	46	+	18	13	15	31	47	+	17	15	16	33	38
5																			
Vertical	Rand 1	++	28	11	15	18	34	+	17	18	19	44	40	+	20	7	15	38	33
	Rand 2	++	19	18	14	38	31	+	13	19	14	37	35	+	18	12	8	30	38
	1	++	13	11	24	28	47	+	24	17	17	40	28	+	25	19	14	26	38
	2	++	7	14	26	23	38	+	15	16	22	52	36	+	14	13	21	35	29
	3	++	13	12	21	25	24	+	21	11	12	37	38	+	8	10	13	30	40
	4	++	10	11	25	24	28	+	10	11	13	29	27	+	12	10	14	23	36
5	++	12	9	16	23	52	+	17	14	21	37	32	+	5	10	17	36	38	
6																			

zyt. Sig. = zytoplasmatisches Signal

Lutealz = Luteinzellen

so. Z. = sonstige Zellen

- = kein Signal

+ - = schwaches Signal

Oli = Ovar links      Ore = Ovar rechts

OT = Objekträgernummer

SCH = Schnittnummer

+ = mäßiges Signal

++ = deutliches Signal

## Anhang

### 9.2.5 Tag 45 nach der Ovulation

Absolute Zahlen		Luna Oli OT74 SCH2 02.03.00					Luna Oli OT74 SCH3 02.03.00					Luna Oli OT74 SCH5 02.03.00							
		Lutealz.					so. Z.					Lutealz.					so. Z.		
Gesichtsfelder		zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+
Horizontal	Rand 1	+	3	12	33	63	11	++	14	15	22	42	36	+	14	12	12	42	31
	Rand 2	+	16	8	17	36	30	++	11	16	19	43	42	+	21	5	19	45	50
	1	+	5	16	14	43	32	+	4	15	17	43	36	+	11	13	25	44	22
	2	+	7	10	21	46	42	+	1	17	21	28	76	+	10	12	21	39	47
	3	+	10	8	22	46	49	+	4	11	22	32	68	+	9	15	28	37	61
	4	+	2	12	18	52	54	+	14	16	16	36	67	+	10	17	25	40	41
	5	+	6	13	21	42	52	+	8	8	24	42	28	+	8	16	23	31	62
6																			
Vertical	Rand 1	+	9	13	18	35	43	+	11	20	18	48	35	++	24	14	16	48	21
	Rand 2	+	9	18	20	38	32	++	23	11	23	39	38	++	13	9	24	32	34
	1	+	8	19	30	39	41	+	10	15	24	35	39	+	10	15	18	52	38
	2	+	11	13	16	44	62	+	8	20	28	60	36	+	14	13	24	30	44
	3	+	6	24	13	25	59	+	7	12	23	53	40	+	5	15	26	53	48
	4	+	3	20	24	32	57	+	12	10	17	38	45	+	3	19	17	40	45
	5																		

Absolute Zahlen		Pat Oli OT73 SCH2 15.03.00					Pat Oli OT73 SCH3 15.03.00					Pat Oli OT73 SCH4 15.03.00							
		Lutealz.					so. Z.					Lutealz.					so. Z.		
Gesichtsfelder		zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+
Horizontal	Rand 1	+ -	23	23	20	60	28	+ -	19	20	22	43	36	+ -	25	14	18	48	20
	Rand 2	+ -	19	16	20	48	26	+ -	12	14	18	41	25	+ -	21	11	19	44	26
	1	+ -	13	23	26	36	31	+ -	11	20	25	34	33	+ -	22	20	21	45	32
	2	+ -	11	13	35	51	42	+ -	11	20	13	45	16	+ -	20	25	21	42	25
	3	+ -	15	22	31	37	34	+ -	13	17	24	37	28	+ -	12	36	26	26	28
	4	+ -	22	15	23	45	26	+ -	14	26	30	41	31	+ -	8	24	22	38	39
	5	+ -	11	15	19	43	44	+ -	17	26	15	46	32	+ -	11	26	25	29	39
6	+ -	20	14	21	53	21	+ -	18	11	25	53	28	+ -	24	20	22	40	27	
7																			
Vertical	Rand 1	+ -	18	27	16	60	7	+ -	12	24	17	40	27	+ -	10	20	20	57	33
	Rand 2	+ -	21	15	21	57	26	+ -	24	20	35	36	19	+ -	18	18	20	34	14
	1	+ -	22	17	11	36	23	+ -	8	20	25	42	36	+ -	13	17	22	32	52
	2	+ -	12	23	28	49	34	+ -	21	21	23	40	30	+ -	11	20	27	25	41
	3	+ -	22	21	26	40	27	+ -	16	22	24	30	34	+ -	16	13	22	43	33
	4	+ -	14	20	27	47	35	+ -	16	19	23	41	25	+ -	15	21	18	37	24
	5																		

zyt. Sig. = zytoplasmatisches Signal  
 Lutealz = Luteinzellen  
 so. Z. = sonstige Zellen  
 - = kein Signal  
 + - = schwaches Signal

Oli = Ovar links      Ore = Ovar rechts  
 OT = Objektträgernummer  
 SCH = Schnittnummer  
 + = mäßiges Signal  
 ++ = deutliches Signal

# Anhang

Absolute Zahlen		Gil Oli OT72 SCH2 17.03.00					Gil Oli OT72 SCH3 17.03.00					Gil Oli OT72 SCH4 20.03.00							
		Lutealz.					Lutealz.					Lutealz.							
Gesichtsfelder		zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+
Horizontal	Rand 1	+ -	9	11	25	47	39	+ -	23	13	20	30	44	+ -	19	20	16	36	49
	Rand 2	+ -	18	10	21	24	42	+ -	19	13	13	36	30	+ -	13	7	23	29	38
	1	+ -	2	9	29	37	33	+ -	12	18	22	34	34	+ -	14	25	16	34	40
	2	+ -	2	10	34	47	28	+ -	13	21	17	40	32	+ -	9	20	14	39	31
	3	+ -	5	12	39	45	34	+ -	11	17	15	42	35	+ -	8	10	21	39	31
	4	+ -	3	18	25	32	28	+ -	4	20	28	36	33	+ -	5	12	16	33	29
	5	+ -	6	18	16	37	30	+ -	11	19	17	26	37	+ -	7	17	21	29	44
	6	+ -	14	17	10	24	38	+ -	8	15	19	23	38	+ -	8	19	21	30	32
7																			
Vertical	Rand 1	+ -	24	18	16	28	40	+ -	15	16	13	43	25	+ -	5	17	24	20	39
	Rand 2	+ -	18	11	19	35	33	+ -	12	11	20	35	47	+ -	11	14	16	25	38
	1	+ -	2	16	28	21	43	+ -	8	21	16	47	26	+ -	2	16	24	33	32
	2	+ -	8	16	20	32	40	+ -	9	13	23	39	36	+ -	1	12	17	35	23
	3	+ -	12	12	19	23	39	+ -	3	19	20	35	33	+ -	1	11	35	25	32
	4	+ -	4	22	19	23	47	+ -	1	19	22	30	34	+ -	7	14	24	34	35
	5	+ -	15	12	19	35	38	+ -	5	14	14	41	35	+ -	10	14	18	38	34
	6	+ -	3	13	25	32	45	+ -	4	31	15	34	36	+ -	7	12	19	28	39
7																			

Absolute Zahlen		Sinah Oli OT75 SCH2 17.03.00					Sinah Oli OT75 SCH4 17.03.00					Sinah Oli OT75 SCH5 16.03.00							
		Lutealz.					Lutealz.					Lutealz.							
Gesichtsfelder		zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+	zyt. Sig.	+	+ -	-	-	+
Horizontal	Rand 1	+ -	7	14	23	50	40	+ -	11	9	20	63	50	+ -	16	11	12	45	33
	Rand 2	+ -	13	14	7	34	28	+ -	16	12	12	37	15	+ -	15	12	12	39	27
	1	+ -	18	12	11	40	21	+ -	18	9	18	45	40	+ -	15	15	16	34	51
	2	+ -	12	19	14	32	36	+ -	11	12	13	50	40	+ -	11	9	14	38	26
	3	+ -	12	15	16	30	35	+ -	10	12	13	44	20	+ -	11	15	15	40	41
	4	+ -	14	9	12	39	41	+ -	10	12	25	48	21	+ -	13	16	11	30	40
	5	+ -	18	10	13	40	15	+ -	9	17	16	42	19	+ -	8	8	6	25	54
6																			
Vertical	Rand 1	+ -	21	11	15	57	27	+ -	14	8	11	32	36	+ -	15	11	14	51	52
	Rand 2	+ -	12	11	22	37	32	+ -	14	13	20	54	33	+ -	16	6	6	42	50
	1	+ -	13	10	19	57	23	+ -	17	9	11	47	25	+ -	18	17	9	39	47
	2	+ -	18	12	13	44	26	+ -	17	10	9	37	24	+ -	14	14	12	49	39
	3	+ -	18	11	11	43	35	+ -	9	9	12	30	22	+ -	8	15	32	37	28
	4	+ -	15	16	13	36	27	+ -	7	10	20	39	31	+ -	11	16	13	39	27
	5	+ -	16	13	16	50	22	+ -	11	11	15	39	24	+ -	17	8	18	30	29
6	+ -	18	9	14	60	19	+ -	10	11	18	56	20	+ -	20	8	9	40	21	
7																			

zyt. Sig. = zytoplasmatisches Signal  
 Lutealz = Luteinzellen  
 so. Z. = sonstige Zellen  
 - = kein Signal  
 + - = schwaches Signal

Oli = Ovar links      Ore = Ovar rechts  
 OT = Objekträgernummer  
 SCH = Schnittnummer  
 + = mäßiges Signal  
 ++ = deutliches Signal

# Danksagung

---

## **Danksagung**

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben..

Ich danke Herrn Prof. Dr. B. Hoffmann für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Anfertigung vorliegender Arbeit.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Frau Dr. R. Klein, nicht nur für die intensive und freundliche Betreuung, sondern auch für die mutige Hilfe bei der Lösung aller Probleme.

Bei Frau Dr. A. Riesenbeck und Herrn PD Dr. G. Schuler, aber auch allen Doktoranden und technischen Mitarbeitern der Professur für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung II, bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Durchführung des praktischen Teils dieser Arbeit sowie für die Diskussionsbeiträge. Herrn Dörr danke ich für die abgestimmte Pflege der Beaglehündinnen. Frau Hergott und Frau Weik für ihre Hilfe bei Überwindung aller bürokratischen Probleme und ihre ständige Freundlichkeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. R. Leiser danke ich für die technische Unterstützung sowie für seine Freundlichkeit und stets Hilfsbereitschaft während meines Aufenthaltes in Deutschland.

Den Mitarbeitern der Abteilung für Biomathematik und Datenverarbeitung, insbesondere Herrn Dr. Failing, danke ich für ihre Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Familie für die moralische und finanzielle Unterstützung. Besonderen Freunden wie Silke Zebandt, Falk Sittner, Astrid Hock-Breitwiese und Familie Kühle danke ich für die moralische Unterstützung sowie Hilfe bei Bewältigung der deutschen Sprache.

Meiner Tochter danke ich für ihr Dasein, was uns viel Kraft und Friede gebracht hat. Renato möchte ich für alles danken „nós conseguimos, amor!“

Diese Arbeit wurde durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft und des DAAD gefordert.