

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

**Biochemische und immunhistochemische
Untersuchungen zum Vorkommen von Östrogen-
und Progesteronrezeptoren im caninen Uterus im
Verlauf des Diöstrus und frühen Anöstrus**

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

Eingereicht von
Gudula Büttner

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. B. Hoffmann

**Biochemische und immunhistochemische
Untersuchungen zum Vorkommen von Östrogen-
und Progesteronrezeptoren im caninen Uterus im
Verlauf des Diöstrus und frühen Anöstrus**

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

Eingereicht von
Gudula Büttner
Tierärztin aus Kleve

Gießen 2001

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

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

1. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Hoffmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Bergmann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.01.2001

*Den Menschen gewidmet,
die mich etwas gelehrt haben.*

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT	2
2.1 Der canine Reproduktionszyklus	2
2.1.1 Einteilung des Zyklus aufgrund äußerer Brunstsymptome und verhaltensbiologischer Merkmale	2
2.1.2 Endokrine Regulation des Zyklus	3
2.2 Der Uterus der Hündin	5
2.2.1 Anatomie und Histologie des caninen Uterus	5
2.2.2 Zyklische Veränderungen des Uterus unter dem Einfluß der Sexualhormone	5
2.2.2.1 Zyklische Veränderungen des Endometriums	6
2.2.2.2 Zyklische Veränderungen des Myometriums	8
2.3 Steroidhormonrezeptoren	9
2.3.1 Definition, Vorkommen und Eigenschaften von Steroidhormonrezeptoren	9
2.3.2 Einteilung in Rezeptorfamilien und Struktur der nukleären Rezeptoren am Beispiel des Östrogenrezeptors	10
2.3.3 Wirkungsmechanismen der Steroidhormonrezeptoren	12
2.3.4 Lokalisation der Steroidhormonrezeptoren in der Zelle	15
2.3.5 Phosphorylierung von Steroidhormonrezeptoren	17
2.4 Östrogen- und Progesteronrezeptoren im Uterus der Hündin	18
2.4.1 Biochemische Eigenschaften der Östrogen- und Progesteronrezeptoren	18
2.4.2 Konzentration der Östrogen- und Progesteronrezeptoren im Verlauf des Zyklus	19
2.4.3 Verteilung der Östrogen- und Progesteronrezeptoren im Uterus	22
2.5 Uterine Östrogen- und Progesteronrezeptoren im Spezies-Vergleich	23
2.5.1 Konzentration der Östrogen- und Progesteronrezeptoren	23
2.5.2 Verteilung der Östrogen- und Progesteronrezeptoren	29

3.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	32
3.1	Versuchstiere und Tierhaltung	32
3.2	Bestimmung des Ovulationszeitpunktes	32
3.2.1	Klinische Untersuchung	32
3.2.2	Vaginalzytologie	32
3.2.3	Blutprobenentnahme und Hormonanalytik	33
3.2.4	Versuchsaufbau	33
3.3	Ovariohysterektomie	34
3.4	Biochemische Untersuchungen	35
3.4.1	Gewebepräparation	35
3.4.2	Ligand-Bindungs-Test	36
3.4.2.1	Prinzip der Darstellung der Rezeptorkonzentration und der Rezeptoraffinität	36
3.4.2.2	Bestimmung der Östrogenrezeptorkonzentration	37
3.4.2.3	Bestimmung der Progesteronrezeptorkonzentration	38
3.4.3	Proteinbestimmung	39
3.4.4	Berechnung der Rezeptorkonzentration und der Assoziations- konstanten	40
3.4.5	Zuverlässigkeit der angewandten Methodik	48
3.4.5.1	Linearität	48
3.4.5.2	Präzision	48
3.5	Immunhistochemische Untersuchungen	50
3.5.1	Probenaufbereitung	50
3.5.2	Anfertigung der histologischen Präparate	50
3.5.2.1	Objekträgerbeschichtung	50
3.5.2.2	Aufziehen der Schnitte auf Objektträger	51
3.5.2.3	Prinzip der immunhistochemischen Reaktion und angewandtes Färbeverfahren	51
3.5.2.4	Verwendete Antikörper	54
3.5.2.5	Kontrollen	55
3.5.3	Morphometrische Untersuchung der histologischen Uterusschnitte	55
3.5.4	Erfassung der Verteilung der Östrogen- und Progesteronrezeptoren im Uterus	55

3.5.4.1	Auswahl der Stichproben und Klassifizierung in positive bzw. negative Zellen	56
3.5.4.2	Computergestützte Auswertung von lumenalem Epithel, oberflächlichen und tiefen Drüsen	57
3.5.4.3	Seminquantitative Auswertung von Stroma, Myometrium und Serosa	57
3.6	Statistik	58
3.7	Reagentien und Materialien	59
3.7.1	Reagentien und Materialien für die biochemischen Untersuchungen	59
3.7.2	Reagentien und Materialien für die immunhistochemischen Untersuchungen	61
4.	ERGEBNISSE	64
4.1	Verlauf der Estradiol -17β - und der Progesteronkonzentration im Blutplasma während des Diöstrus und frühen Anöstrus	65
4.2.	Proteingehalt im Zytosol	66
4.3	Ergebnisse der biochemischen Untersuchungen	66
4.3.1	Konzentration und Assoziationskonstante des Östrogenrezeptors im caninen Uterus während des Diöstrus und frühen Anöstrus	66
4.3.2	Konzentration und Assoziationskonstante des Progesteronrezeptors im caninen Uterus während des Diöstrus und frühen Anöstrus	65
4.3.3	Zusammenhang zwischen Hormonspiegel im peripheren Blut und Rezeptorkonzentration im Uterus	69
4.4	Ergebnisse der morphometrischen Untersuchungen	71
4.4.1	Größe und Gewicht des Uterus im Verlauf des Diöstrus und frühen Anöstrus	71
4.4.2	Proliferationsgrad des Uterus im Verlauf des Diöstrus und frühen Anöstrus	73
4.5	Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen	74
4.5.1	Konzentration und Verteilung von Östrogenrezeptoren im caninen Uterus	74
4.5.1.1	Luminales Epithel	74

4.5.1.2	Oberflächliche Drüsen	75
4.5.1.3	Tiefe Drüsen	75
4.5.1.4	Stroma	76
4.5.1.5	Myometrium	77
4.5.1.6	Gefäßschicht	77
4.5.1.7	Serosa	77
4.5.2	Konzentration und Verteilung von Progesteronrezeptoren im caninen Uterus	78
4.5.2.1	Luminales Epithel	78
4.5.2.2	Oberflächliche Drüsen	80
4.5.2.3	Tiefe Drüsen	81
4.5.2.4	Stroma	83
4.5.2.5	Myometrium	83
4.5.2.6	Gefäßschicht	84
4.5.2.7	Serosa	84
5.	DISKUSSION	98
5.1	Diskussion des Versuchsaufbaus	98
5.2	Diskussion der Methodik	99
5.3	Diskussion der Ergebnisse	101
6.	ZUSAMMENFASSUNG	109
7.	SUMMARY	111
8.	LITERATURVERZEICHNIS	113
9.	ANHANG	130

1. EINLEITUNG

Der canine Uterus erfährt im Verlauf des Zyklus unter dem Einfluß der Steroidhormone Estradiol-17 β und Progesteron beträchtliche strukturelle und funktionelle Veränderungen (BARRAU et al., 1975; BUHI et al., 1992; CUNHA et al., 1983). Ihre Wirkung wird dabei durch spezifische Rezeptoren übertragen (MEYER, 1994), deren Konzentration im Gewebe durch die Hormone selbst moduliert wird (LEAVITT et al., 1983). Der Rezeptorspiegel beeinflusst wiederum die Ansprechbarkeit des Organs durch Steroide.

Das bei der Hündin im Diöstrus häufige Auftreten uteriner Dysfunktionen - hier sind insbesondere verschiedene Formen der Endometritis zu nennen - konnte bisher nicht eindeutig auf Störungen der Hormonsekretion zurück-geführt werden. So läßt sich z.B. bei der ätiologisch nicht geklärten Entstehung der Pyometra kein direkter Zusammenhang mit dem Hormonstatus belegen (BLENDINGER et al., 1997; DE COCK et al., 1997). Dies legt die Vermutung nahe, daß Abweichungen von der physiologischen Funktion möglicherweise in einer Dysregulation des Rezeptorstatus begründet sind.

Zur Darstellung möglicher Wechselwirkungen zwischen Ovar- und Uterusfunktion sind umfassende Informationen bezüglich der Rezeptorkonzentration und ihrer Lokalisation im Gewebe während des Zyklusgeschehens notwendig. In verschiedenen Arbeiten wurde der Verlauf der Östrogen- und Progesteronrezeptoren im Uterus mittels biochemischer Verfahren bestimmt, die allerdings nicht zwischen den Lokalisationen der Rezeptoren im Uterus differenzieren (FERNANDES et al., 1989; JOHNSTON et al., 1985). Erste Hinweise über die lokale Verteilung im Östrus und frühen Diöstrus ergeben sich aus der Arbeit von DHALIWAL et al. (1997). Im Hinblick auf diesen Kenntnisstand war es Ziel vorliegender Arbeit, unter Einbeziehung der weiteren Zyklusphasen und durch parallele Anwendung biochemischer und immunhistochemischer Methoden, weiterführende Angaben über den Verlauf der Rezeptorkonzentrationen und ihre Lokalisation und Verteilung zu erhalten.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Der canine Reproduktionszyklus

Der Reproduktionszyklus des Haushundes wird allgemein als asaisonal monöstrisch bezeichnet. Die Hündin zeigt im Durchschnitt jährlich zwei Fortpflanzungsperioden, die saisonal unabhängig zu jeder Jahreszeit auftreten können. Der Zyklus wird aufgrund verhaltensbiologischer, morphologischer und endokrinologischer Merkmale in unterschiedliche Phasen eingeteilt, wobei mit der Zuordnung in Proöstrus, Östrus, Diöstrus und Anöstrus in der vorliegenden Arbeit die Einteilung nach FELDMAN und NELSON (1987) übernommen wurde.

2.1.1 Einteilung des Zyklus aufgrund äußerer Brunstsymptome und verhaltensbiologischer Merkmale

Der Beginn des Proöstrus ist durch eine Ödematisierung der Vulva und das Auftreten von blutigem Vaginalausfluß gekennzeichnet. Die Hündin ist durch die Sekretion von Pheromonen für Rüden sexualattraktiv, duldet den Deckakt aber noch nicht. Die Dauer des Proöstrus wird in der Literatur mit 5 bis 15 Tagen angegeben (CONCANNON, 1987) und geht mit dem Beginn der Sexualakzeptanz in den Östrus über. Endokrinologisch markiert der präovulatorische LH-Gipfel den Wechsel vom Proöstrus zum Östrus (PHEMISTER et al., 1973). Der Östrus dauert im Mittel 9 Tage und umfaßt den Zeitraum der Deckbereitschaft. In dieser Phase zeigt sich anfangs gelb-rötlicher Vaginalausfluß von wässriger Konsistenz, der im weiteren Verlauf nachläßt oder vollständig versiegt. Die Ovulationen finden in der Regel zu Beginn des Östrus statt (ALLEN, 1992 a).

Der sich anschließende Diöstrus beginnt mit dem ersten Tag fehlender Deckbereitschaft. Eine wesentliche tierartspezifische Besonderheit ist die Dauer des Diöstrus von 60 bis 90 Tagen (STABENFELDT, SHILLE, 1977), die damit die Dauer der Gravidität (63 ± 2 Tage) noch übersteigt. Der Diöstrus endet definitionsgemäß mit dem Abfall der Progesteronkonzentration im Blut unter 1 ng/ml (CONCANNON, 1987).

Es folgt der Anöstrus mit einer sehr variablen Zeitspanne von 1 bis 9 Monaten. Diese Phase wird aufgrund fehlenden Sexualverhaltens sowie basaler Estradiol-17 β - und Progesteronspiegel als Periode der Sexualruhe angesehen (OETTEL, 1979).

2.1.2 Endokrine Regulation des Zyklus

Die in Kapitel 2.1.1 beschriebenen Zyklusphasen werden durch endokrine Regelmechanismen gesteuert. Die Abbildung 1 zeigt eine Übersicht der Hormonprofile während des caninen Reproduktionszyklus.

Auf eine ausführliche Darstellung der endokrinen Regulation des caninen Sexualzyklus wird an dieser Stelle verzichtet. Detaillierte Ausführungen finden sich u.a. bei GERRES (1991), WEILENMANN et al. (1993), ARBEITER (1994) und HOFFMANN et al. (1996, 1999).

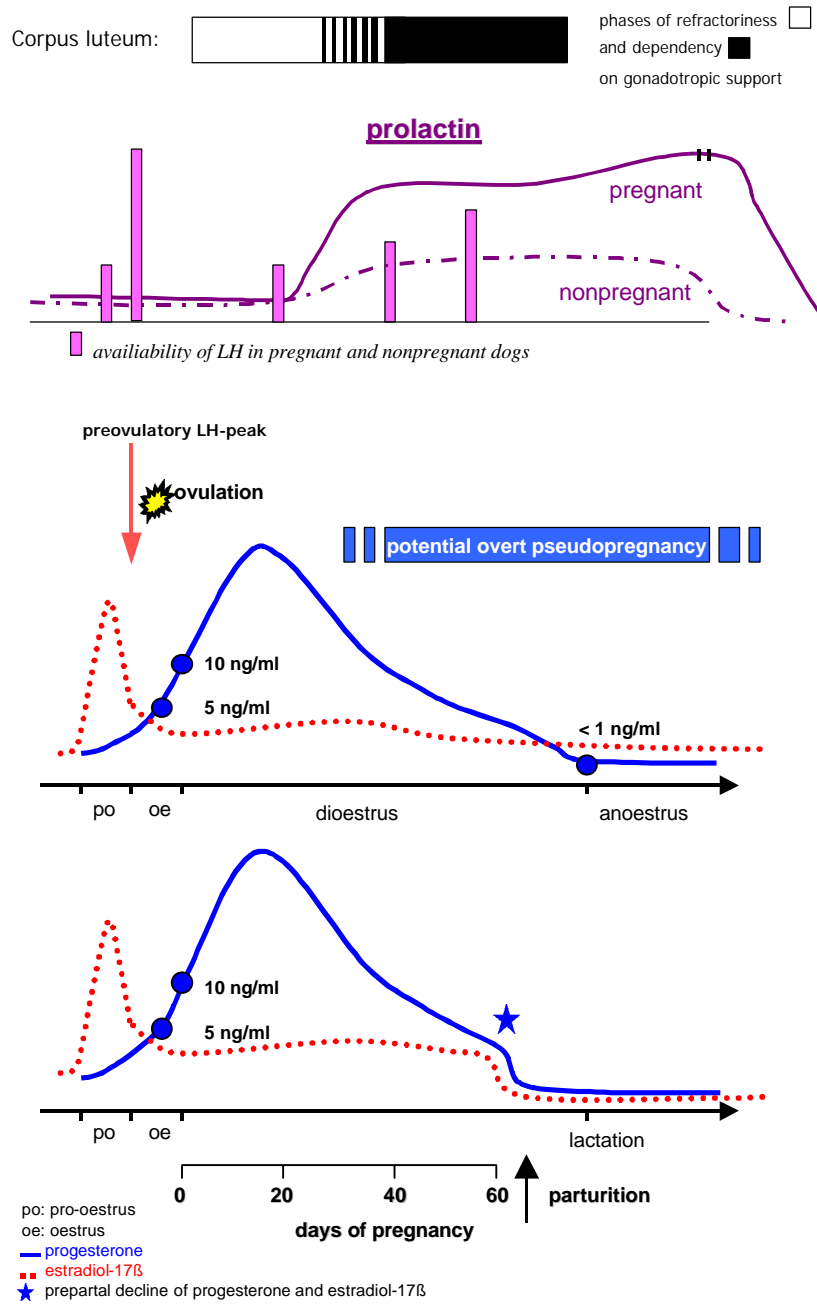


Abb. 1: Schematische Darstellung der Hormonprofile bei der graviden und ingraviden Hündin (HOFFMANN et al., 1999)

2.2 Der Uterus der Hündin

2.2.1 Anatomie und Histologie des caninen Uterus

Der Uterus der Hündin besteht aus den beiden Uterushörnern (Cornua uteri), dem Uteruskörper (Corpus uteri) und dem Gebärmutterhals (Cervix uteri). Die Uterushörner sind bei mittelgroßen Hündinnen 12 bis 15 cm lang und etwa bleistiftstark, dagegen besitzt der Uteruskörper eine Länge von lediglich 1 bis 3 cm (NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE, 1987).

Die Wandung des Uterus bzw. der Uterushörner setzt sich aus dem Endometrium, dem Myometrium und dem Perimetrium zusammen. Das Endometrium besteht aus einem einschichtigen Epithel und der Lamina propria mucosae, ein zellreiches und stark kapillarisiertes Bindegewebe, in das zahlreiche tubuläre Drüsen eingelagert sind (NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE, 1987). Man unterscheidet hierbei wiederum drei Zonen: die Kryptenzone, die Intermediärzone und die Basalzone. In der Kryptenzone liegen kurze Drüsen, die sich in das Uteruslumen öffnen. Einige ragen durch die vorwiegend aus Bindegewebe bestehende Intermediärzone hindurch und reichen bis in die Basalzone, wo sie unter Bildung von dichten Windungen und Verzweigungen enden (BARRAU et al., 1975).

Das Myometrium besteht aus einer inneren zirkulär verlaufenden sowie einer äußeren longitudinalen Schicht. Beide Lagen beinhalten vorwiegend glatte Muskelzellen und sind durch eine umfangreiche Gefäßschicht voneinander getrennt.

Schließlich wird der Uterus von einer vom Mesometrium ausgehenden Bauchfellfalte, dem Perimetrium, überzogen (NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE, 1987).

2.2.2 Zyklische Veränderungen des Uterus unter dem Einfluß der Sexualhormone

Der Uterus als Zielorgan ovarieller Steroide ist zyklischen morphologischen Veränderungen unterworfen, die mit seinen unterschiedlichen Funktionen - Aufnahme und Einnistung der befruchteten Eizellen, Bildung der Embryotrophe und plazentare Ernährung der Embryonen bzw. Feten - korrelieren.

Im Proöstrus ist der Uterus der Hündin umfangsvermehrt, ödematös und sehr gut durchblutet. Dieser Zustand bleibt bis zum Diöstrus erhalten. In dem Zeitraum 50 bis 150 Tage nach Beginn des Proöstrus läßt sich bei ca. 50 % der Uteri eine muköse, proteinreiche Flüssigkeit feststellen. Nach dem 150. Tag besitzt der Uterus wieder die ursprüngliche Größe und weist eine glatte, schlanke Form auf (VAN DER HORST, VOGEL, 1981).

2.2.2.1 Zyklische Veränderungen des Endometriums

Das canine Endometrium zeigt unter dem Einfluß der im Proöstrus sezernierten Östrogene (vorwiegend Estradiol-17 β) eine starke Zunahme seines Durchmessers. Diese resultiert zunächst aus einer Hyperämisierung und Ödematisierung des Gewebes und führt im Weiteren durch eine gesteigerte Proteinsynthese und erhöhte Mitoserate zu echtem Wachstum. Die Proliferation der Schleimhaut vollzieht sich aus den basalen Drüsen heraus, die während des Zyklusgeschehens weitgehend unverändert bleiben (DÖCKE, 1994; ANDERSON et al., 1975).

BARRAU und Mitarbeiter (1975) berichten von zwei zyklisch auftretenden Wachstumsphasen, von denen die erste im frühen Proöstrus stattfindet. Sie ist gekennzeichnet durch eine Hypertrophie und Hyperplasie der Drüsenepithelien, die zu zylindrischen, Schleim sezernierenden Zellen differenzieren, woraus die in der zweiten Hälfte des Proöstrus und im frühen Östrus stattfindende Schleimproduktion resultiert. Sekretorische, glycogen-haltige Vakuolen sind am zahlreichsten in den Drüsen der Kryptenzone anzutreffen und sezernieren ihren Inhalt in das Drüsen- bzw. Uteruslumen. Ziel der vermehrten Schleimproduktion ist es, zum Zeitpunkt des Deckaktes ein für Spermien geeignetes Medium zu schaffen.

Die zweite Wachstumsphase beginnt am vierten Tag des Östrus und verläuft unter starker Hypertrophie der glandulären Epithelzellen und zahlreichen Mitosen noch dramatischer als die erste. Gegen Ende des Östrus sind die Krypten merklich verlängert und die basalen Drüsen zeigen eine starke Zunahme an Windungen und Verzweigungen (BARRAU et al., 1975).

Die post-translationalen Mechanismen der Östrogenwirkungen sind noch vielfach ungeklärt. Jedoch wurde eine gesteigerte Synthese von Lipiden und Proteinen unter dem Einfluß von Östrogenen experimentell nachgewiesen (ANDERSON et al., 1975; KRAUS, KATZENELLENBOGEN, 1993). Der unter dem Einfluß der Östrogene gebildete Epidermal Growth Factor (EGF) übt unter Beteiligung weiterer Wachstumsfaktoren einen synergistischen Effekt auf das Wachstum aus (SUMIDA et al., 1988; 1989). Weiterhin scheint für die Erhöhung der Mitoserate in den Drüsenepithelien der Kontakt zu den Stromalen Fibrozyten notwendig zu sein, die bei verschiedenen Spezies während bestimmter Zyklusphasen die einzigen Zellen sind, die Östrogenrezeptoren aufweisen (DÖCKE, 1994; BRENNER et al., 1988) (s. Kap. 2.5.2). ROBERTS et al. (1988) vermuten einen interzellulären Informationsaustausch als Grundlage für eine normale Epithelzell-entwicklung. Im humanen Endometrium deuten ultrastrukturelle Veränderungen des Epithel-Stroma-Kontaktes auf die Bedeutung dieser Beziehung hin. So entstehen beim Übergang vom proliferativen zum sekretorischen Stadium des Zyklus zunehmend Unterbrechungen der Lamina densa, durch die Epithelzell-Fortsätze dringen und engen Kontakt zu Stromazellen aufnehmen. Gleichzeitig nehmen Anzahl und Größe von Gap junctions zu (ROBERTS et al., 1988). Die bei der Hündin schon vor der Ovulation einsetzende Luteinisierung der Follikel führt zur Bildung von Progesteron, unter dessen Einfluß es zu einer verstärkten Sekretion durch die Uterindrüsen kommt (BARRAU et al., 1975). Der Proteingehalt und die Viskosität des Sekretes, der sogenannten Uterinmilch, nehmen zu. Sie enthält verschiedene Proteine, Glycogen, Zucker, anorganische Substanzen und Enzyme, die die Blastocyste bis zur Implantation schützen und ernähren (BUHI et al., 1992). Von Bedeutung ist auch die durch Progesteron induzierte immunsuppressive Aktivität der Uterinmilch. Für ihre physiologische Zusammensetzung ist ein fein abgestimmtes Östrogen-Progesteron-Verhältnis Voraussetzung (DÖCKE, 1994). Progesteron stimuliert weiterhin in Gemeinschaft mit Wachstumsfaktoren die Proliferation von Stromazellen (PIVA et al., 1996).

Bis zum sechsten Tag des Diöstrus findet Wachstum nur noch in den basalen Drüsen statt und nach einer weiteren Woche lassen sich erste Anzeichen der Regression feststellen. Die Blutversorgung des Endometriums nimmt ab und eine Infiltration mit Leukozyten führt zur Resorption des proliferierten Endometriums (DÖCKE, 1994). Vom 16. Tag des Diöstrus an schreitet die Regression rasch fort und läßt die Zellgröße

bald auf anöstrische Ausmaße zurückgehen. Während die Zellen der Kryptenzone der Degeneration unterworfen sind, weisen die basalen Drüsenepithelien Merkmale intakter, lebender Zellen auf (BARRAU et al., 1975).

Im Anöstrus sind Länge und Durchmesser der Uterindrüsen am geringsten und ihre Epithelzellen besitzen kubische Form. Der Durchmesser des Endometriums bzw. des Uterus geht auf sein Minimum zurück (BARRAU et al., 1975).

2.2.2.2 Zyklische Veränderungen des Myometriums

Auch im Myometrium läßt sich unter Östrogeneinwirkung eine Hyperämisierung und Ödematisierung feststellen (DÖCKE, 1994). Im Zusammenspiel mit unterschiedlichen Wachstumsfaktoren findet eine Steigerung der Proteinsynthese und der Mitoserate statt, die zur Hypertrophie und Hyperplasie des Gewebes führt (REXROAD, 1981). Östrogene induzieren weiterhin eine verstärkte RNS-Synthese zur Bildung von verschiedenen Enzymen, die zur Bereitstellung von Energiereserven in Form von Glykogen, ATP und Kreatinphosphat dienen. Diese Energielieferanten sind Voraussetzung für die Kontraktilität des Myometriums, das im Proöstrus und Östrus starke, koordinierte Kontraktionen zum Transport der Spermien aufweist (IBUKI et al., 1997). Die Wirksamkeit des dafür verantwortlichen Oxytocins wird durch die Östrogen-vermittelte Zunahme von Oxytocinrezeptoren gesteigert (ALEXANDROVA, SOLOFF, 1980). Die vermehrte Ausbildung von Gap junctions, die die Myometriumzellen zu einer metabolischen und elektrischen Funktionseinheit verbinden, kommt ebenfalls unter dem Einfluß von Östrogenen zustande (SAITO et al., 1985).

Gestagene üben eine zu den Östrogenen antagonistische Wirkung auf das Myometrium aus. Die wichtigste Funktion kommt dabei der Ruhigstellung des Uterus während der Gravidität zu. Dazu trägt vor allem das durch Progesteron erhöhte Ruhepotential der Zellmembranen und die reduzierte Verfügbarkeit von intrazellulärem Calcium bei (SALLOCH, 1969). Außerdem verringert sich im Myometrium die Anzahl der Gap junctions unter Progesteroneinwirkung (SAITO et al., 1985). Die herabgesetzte

Kontraktilität des Uterus äußert sich im Diöstrus durch schwache, unkoordinierte und durch Oxytocin nicht stimulierbare Kontraktionen (IBUKI et al., 1997).

2.3 Steroidhormonrezeptoren

2.3.1 Definition, Vorkommen und Eigenschaften von Steroidhormonrezeptoren

Steroidhormonrezeptoren sind intrazelluläre Proteine, die als Informationsvermittler zwischen den Steroidhormonen und ihren Zielzellen bzw. Zielorganen dienen. Der entscheidende Schritt ist dabei die Aktivierung der Transkription durch Bindung des Hormon-Rezeptorkomplexes an die DNS (s. Kap. 2.3.3).

Bei den Steroidhormonen handelt es sich um von Cholesterin abstammende hydrophobe Ringmoleküle, die nicht nur bei Vertebraten, sondern auch bei Insekten, Pflanzen und sogar Prokaryonten zu finden sind, was auf ihr phylogenetisch hohes Alter schließen läßt (YAMAMOTO, 1985). Steroidhormone sind sehr kleine, einfach gebaute Moleküle, die alleine nicht in der Lage wären, ihre vielfältigen Funktionen auszuüben. Erst durch Bindung an spezifische Rezeptoren wird eine Kaskade von Reaktionen in Gang gesetzt, die über die Aktivierung bestimmter Gensequenzen zur Transkription und Translation und schließlich zur Synthese von spezifischen Proteinen führt.

Steroidhormone können auf Grund ihres lipophilen Charakters Zellmembranen ungehindert passieren, so daß sie in allen Geweben nachweisbar sind und zwischen extra- und intrazellulärem Raum ein Diffusionsgleichgewicht herrscht. Ihre gezielte Wirkung ergibt sich durch die Eigenschaft, an spezifische Rezeptoren zu binden, deren Existenz auf bestimmte Zielzellen beschränkt ist (MEYER, 1994).

Da Rezeptoren nur in Zielgeweben anzutreffen sind, wird ihre Existenz in einem Organ als Hinweis auf die Sensitivität für das homologe Hormon angesehen.

Östrogen- und/oder Progesteronrezeptoren wurden bisher nicht nur im Reproduktionstrakt, sondern auch in zahlreichen anderen Organen nachgewiesen; dazu zählen z.B.

- Mamma (PRESS, GREENE, 1988)
- Hypothalamus (AL-KHOURI, GREENSTEIN, 1985; SIMERLY, YOUNG, 1991)
- Hypophyse (ADAMS, RITAR, 1986)
- Schilddrüse (VAN HOEVEN et al., 1993)
- Leber (JOHNSTON et al., 1985)
- Lunge (PRESS, GREENE, 1988)
- Verdauungstrakt (SALIH et al., 1996)

Ein charakteristisches Merkmal aller Rezeptoren ist die Eigenschaft, das homologe Steroid mit hoher Spezifität und Affinität zu binden. Die Assoziationskonstante ist ein Maß für die Affinität zweier Substanzen und liegt für Steroidrezeptor-Ligand-Interaktionen in der Größenordnung 10^8 bis 10^{10} l/M (VU HAI, MILGROM, 1978; ZACHARIAH, CHAKMAKJIAN, 1983). Durch die hohe Affinität wird gewährleistet, daß das zirkulierende Hormon aus dem Blut abgefangen wird und an den spezifischen Rezeptor bindet. Da dieser in dem Gewebe nur in begrenzter Zahl zur Verfügung steht, ist das Ausmaß der biologischen Reaktion regulierbar - eine veränderte Konzentration des Rezeptors führt zu einer quantitativen Veränderung der biologischen Reaktion.

2.3.2 Einteilung in Rezeptorfamilien und Struktur der nukleären Rezeptoren am Beispiel des Östrogenrezeptors

Rezeptoren sind Proteine mit einem Molekulargewicht von 30.000 bis 200.000 Dalton. Die Haupteinteilung erfolgt in die Familie der nukleären Rezeptoren für hydrophobe Ringmoleküle und die Familie der membranständigen Rezeptoren für hydrophile Verbindungen. Obwohl die Steroidhormonrezeptoren eine weitgehend einheitliche Struktur- und Funktionsorganisation besitzen, lassen sie sich zwei Subfamilien zuordnen. Zur Östrogenrezeptor-Subfamilie gehören außer den Rezeptoren für Östrogene auch die Bindungsproteine für Vitamin D und für die Schilddrüsenhormone T3 und T4. Sie sind mit einer Kettenlänge von 400 bis 600 Aminosäuren kürzer als die Vertreter der Glucocorticoidrezeptor-Subfamilie, die 750 bis 1000 Aminosäuren umfassen. Ihnen werden unter anderem die Rezeptoren für Gestagene und Androgene zugeordnet (MEYER, 1994).

Der Familie der nukleären Rezeptoren ist die strukturelle Gliederung in sechs Untereinheiten gemeinsam, die als Domänen A bis F bezeichnet werden (Abb. 2).

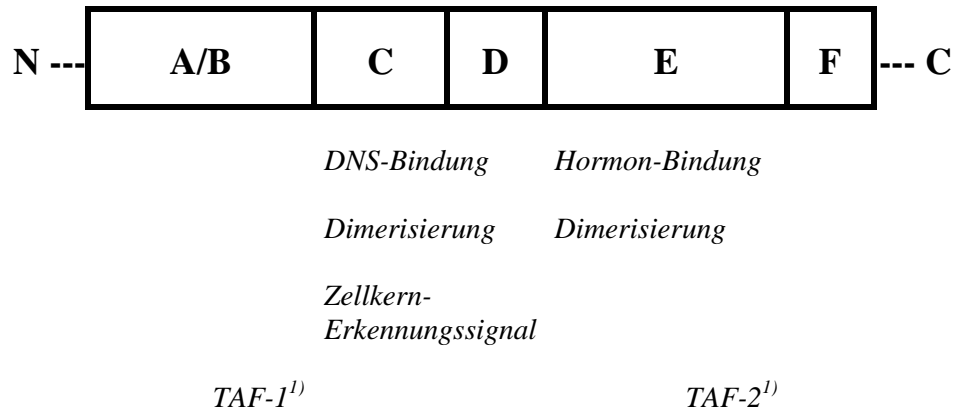


Abb. 2: *Struktur des humanen Östrogenrezeptors; Bindungsdomänen und deren Funktionen (nach HOFFMANN, SCHULER, 2000)*
¹⁾ *Transkriptionsaktivierende Funktionen*

Über die A/B-Region am N-terminalen Ende des Proteins ist bisher am wenigsten bekannt. Sie weist die variabelste Aminosäuresequenz innerhalb der Rezeptorfamilie auf. Man geht davon aus, daß diese Domäne als Modulator (Transkription-aktivierende Funktion-1, TAF-1) der Genaktivierung dient (EVANS, 1988), wobei ihr Verlust nicht zur Inaktivierung des Rezeptors führt. Sie besitzt, verglichen mit den anderen Regionen, die stärkste Antigenität, so daß in Labortieren produzierte Antikörper meist gegen Epitope innerhalb dieser Region gerichtet sind (GEHRING et al., 1989).

Die ca. 100 Aminosäuren der Domäne C sind am stärksten konserviert und dienen der Bindung des Rezeptors an die DNS. Unter ihnen befindet sich eine Anhäufung von Cystein-Resten, die diese Region zu zwei sogenannten „Zinkfingern“ organisieren. Dies sind Windungen der α -Helices, in denen jeweils vier Cystein-Reste ein Zinkion binden und dadurch die Tertiärstruktur der Domäne stabilisieren (GEHRING et al., 1989). Der amino-terminale Zinkfinger ist für die spezifische DNS-Erkennung verantwortlich und stellt den spezifischen Kontakt zu bestimmten Basen, den sogenannten „Hormone-Responsive-Elements“, her. Diese Bindung wird durch nicht-spezifische Interaktionen des carboxy-terminalen Zinkfingers mit den flankierenden Nukleotiden stabilisiert (GREEN, CHAMBON, 1988).

Weniger gut konserviert ist die Ligand (Hormon) - Bindungsdomäne, bestehend aus 200 bis 300 Aminosäuren und lokalisiert in den Regionen E und F. Sie wird in verschiedenen Exons kodiert und besitzt eine komplexe Struktur, die vermutlich vielfältige Aufgaben erfüllt (s. Kap. 2.3.3).

Durch Mutationsanalysen konnten die unterschiedlichen Funktionen der Ligand-Bindungsdomäne spezifischen Aminosäuresequenzen zugeordnet werden. Die Positionen 503 bis 514 des humanen Östrogenrezeptors dienen der Dimerisierung (s. Kap. 2.3.3); an den folgenden Aminosäuren 515 bis 535 erfolgt die Bindung des Liganden. Besondere Bedeutung haben die Aminosäuren 521, 524, 525 und 528, deren Verlust eine bis zu 250-fach reduzierte Transkriptionsaktivität, resultierend aus einer verminderten Östrogenaffinität, zur Folge hat. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß alle vier Aminosäuren auf derselben Seite der α -Helix direkt nebeneinander liegen (EKENA et al., 1996). Für Rezeptoren der gleichen Familie wurden die korrespondierenden Aminosäuren als Ligand-Bindungsstelle identifiziert. Die Aminosäuren 534 bis 548 am Übergang von der E- zur F-Domäne werden der „Transkription-aktivierenden Funktion-2“ (TAF-2) (s.u.) zugeordnet und sind somit an der Aktivierung der Genexpression beteiligt (EKENA et al., 1996).

2.3.3 Wirkungsmechanismen der Steroidhormonrezeptoren

Zahlreiche Modelle wurden bisher über den Wirkungsmechanismus der Rezeptoren aufgestellt, die zum Teil korrigiert, erweitert oder verworfen wurden. Lange Zeit ging man von einem zytoplasmatischen Rezeptor aus, der erst nach hormoneller Aktivierung in den Zellkern wandert und seine Bindungsfähigkeit an die DNS erlangt. Diese These wurde allgemein akzeptiert, obwohl die häufig gemachte Beobachtung, daß sich größere Mengen unbesetzter Rezeptoren im Kern befinden, sich nicht mit dem Modell vereinbaren ließ. Seit Mitte der achtziger Jahre wurden zunehmend immunhistochemische Methoden entwickelt, mit deren Hilfe Steroidhormonrezeptoren fast ausschließlich im Kern nachgewiesen wurden. GORSKI et al. vertraten 1984 die These eines ausschließlich im Kern lokalisierten Rezeptors, nach der sowohl der aktive als auch der unbesetzte Rezeptor mit bestimmten Kernstrukturen assoziiert ist. Weiterhin vermuteten sie auf Grund von Extraktionsexperimenten die Existenz zweier

Bindungsmodalitäten an den Zellkern: schwächere Bindung der unbesetzten und stärkere Bindung der besetzten, aktiven Rezeptorform.

Die weitgehende Strukturaufklärung der Rezeptoren trug wesentlich zum besseren Verständnis ihres Wirkungsmechanismus bei. Nach dem heutigen Wissensstand vollzieht sich die Transkriptionsregulation entsprechend des in Abbildung 3 dargestellten Modells.

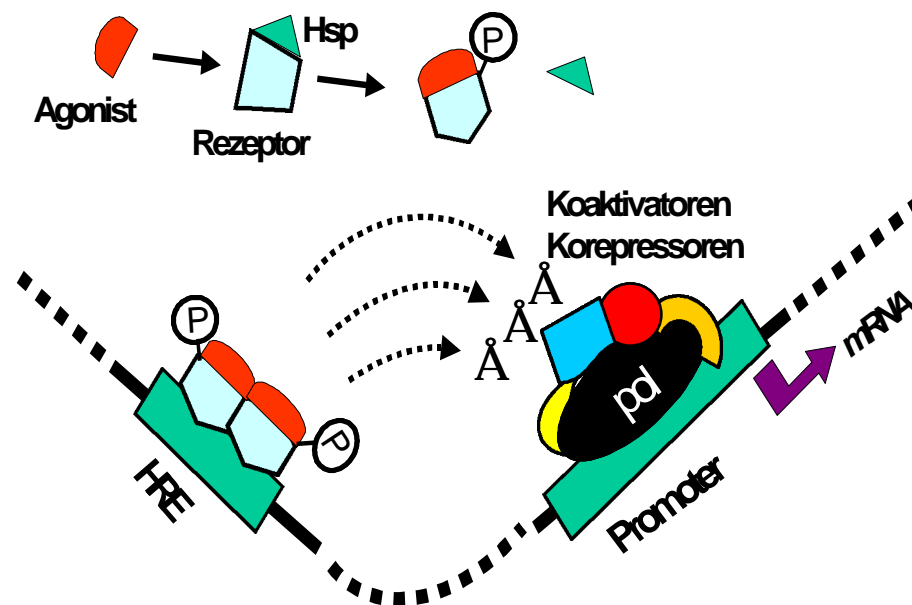


Abb. 3: Modell der Transkriptionsregulation durch Hormone via nukleäre Rezeptoren; HRE: Hormone-Responsive-Element; Hsp: mit dem Rezeptor assoziiertes Protein (SCHULER, 2000)

Das Steroid bindet an die Hormon-Bindungsdomäne des Rezeptors. Daraufhin dissoziieren verschiedene Proteine, wie das Hsp90, vom Rezeptor und heben so ihre hemmende Wirkung auf die DNS-Bindungs-fähigkeit des Rezeptors auf (s. Abb. 3). Man vermutet, daß das Hsp90 die DNS-Bindungsstelle maskiert und dadurch die Interaktion mit den Hormone-Responsive-Elements verhindert (SULLIVAN, TOFT, 1993). Die Bindung des Hormons führt außerdem zur Dimerisierung des Rezeptors und zieht eine ausgeprägte Steigerung der Affinität zur DNS nach sich (GEHRING et al., 1989). Gleichzeitig kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, aus der

eine weitere Zunahme der Affinität und der Assoziationsrate resultiert (SULLIVAN, TOFT, 1993).

Im nächsten Schritt bindet das Hormon-besetzte Rezeptordimer an spezifische Hormone-Responsive-Elements (HRE) der DNS (s. Abb. 3). Es handelt sich dabei um 15 Basenpaare, die ein unvollständiges Palindrom darstellen. Es umfaßt zwei Arme, bestehend aus jeweils 6 komplementären Basenpaaren, und ein Mittelstück von 3 Basenpaaren mit dem Zentrum bei Position 8 (GREEN, CHAMBON, 1988) (s. Abb. 4). Seine bilaterale Symmetrie deutet auf die Eigenschaft des Rezeptors hin, als Dimer zu agieren.

```

5`  A G G T C A   C G G   T G G C C A  3`
3`  T C C A G T   G C C   A C C G G T  5`

```

Abb. 4: *Hormone-Responsive-Element des humanen Östrogenrezeptor-spezifischen Gens pS2 (entnommen aus GREEN, CHAMBON, 1988)*

Die Hormone-Responsive-Elements weisen eine bemerkenswerte Homologie auf, obwohl sie spezifisch von verschiedenen Steroidhormonrezeptoren erkannt werden. So unterscheiden sich die Estrogen-Responsive-Elements nur in zwei Basenpaaren von den Glucocorticoid-Responsive-Elements. Für alle Vertreter der Glucocorticoidrezeptor-Subfamilie ist die 15-Basen-Sequenz sogar völlig identisch. GREEN und CHAMBON (1988) vermuten auf Grund von Deletionsexperimenten, daß multiple Regionen des Rezeptors an der Transkriptions-Aktivierung beteiligt sind, wobei die Domänen je nach Rezeptorsubtyp und Zielgen unterschiedliche Funktionen ausüben.

Da Hormone-Responsive-Elements in einem Gen mehrfach vorliegen, können viele Rezeptoren gleichzeitig gebunden werden. Interaktionen zwischen mehreren Rezeptormolekülen scheinen die Transkriptionsinitiation zu fördern (GEHRING et al., 1989).

Der Nachweis mehrerer beteiligter Proteine läßt auf einen Synergismus multipler Transkriptionsfaktoren schließen, die eventuell gemeinsam einen Initiationskomplex bilden. Wie oben bereits dargelegt, werden als TAF-1 und TAF-2 zwei Transkriptions-aktivierende Funktionen bezeichnet, die in der A/B- bzw. E/F-Domäne des Rezeptors lokalisiert sind (s. Abb. 2) und Zell- und Promoter-spezifisch agieren (MEYER et al.,

1992). Für die volle Rezeptoraktivität und damit Hormonwirkung ist das synergistische Zusammenspiel beider Funktionen Voraussetzung. Die Bindung von Estradiol führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, bei der sich die Amino- und die Carboxyterminale Region verbinden und eine Transkriptions-aktivierende Interaktion zwischen TAF-1 und TAF-2 ermöglichen (KRAUS et al., 1995; McINERNEY et al., 1996).

Die Wirkung der Transkriptions-aktivierenden Funktionen wird durch weitere Faktoren, sogenannte Koaktivatoren, übertragen. Zu diesen gehört u.a. der Steroidrezeptor-Koaktivator-1 (SRC-1), ein Protein, das die Östrogenrezeptor-Aktivität deutlich steigert - vermutlich indem es Interaktionen zwischen TAF-1 und TAF-2 fördert und deren Wirkung verstärkt (Mc INERNEY et al., 1996).

Weiterhin ist das CREB (cAMP response element binding protein) - binding protein zu nennen. Es verstärkt die Transkriptionsaktivität des Östrogenrezeptors zehnfach und übt zusammen mit SRC-1 einen synergistischen Effekt aus (SMITH et al., 1996)

Ziel der Genaktivierung ist die Synthese einer m-RNS, anhand derer die Proteinbiosynthese in den Ribosomen erfolgt. Durch Estradiol wird beispielsweise die Bildung von Ovalbumin, Ovomucoïd und Lysozym angeregt. Progesteron induziert u.a. die Produktion von Avidin und Uteroglobulin (SCHÜTZ, 1988).

2.3.4 Lokalisation der Steroidhormonrezeptoren in der Zelle

Auf Grund biochemischer Experimente ging man lange Zeit von der Existenz einer zytoplasmatischen und einer nukleären Rezeptorform aus (s. S. 14). Zytoplasmatische Rezeptoren wurden gängigerweise durch Homogenisierung des Gewebes gewonnen, sie waren dabei in den üblichen Puffermedien löslich (LEAVITT et al., 1983; GREEN, LEAKE, 1987); man bezeichnet sie daher auch als die locker gebundene, extrahierbare Rezeptorfraktion (BERGMAN et al., 1992). Im Gegensatz dazu konnten die nukleären Rezeptoren nur durch hochmolekulare Extraktionsmedien in Lösung gebracht werden (GREEN, LEAKE, 1987; CHEN, LEAVITT, 1979); sie repräsentieren die Klasse der stark gebundenen, nicht-extrahierbaren Bindungsstellen (BERGMAN et al., 1992). Hormonelle Einflüsse verschieben das Verhältnis beider Fraktionen zueinander. Unter Estradiol-17 β -Stimulation vermindert sich der Anteil zytoplasmatischer Östrogenrezeptoren bei gleichzeitigem Anstieg der entsprechenden nukleären

Bindungsstellen (LEAVITT et al., 1983; SIERRALTA et al., 1992 a). Die Verabreichung von Progesteron führt ebenfalls zu einer Verminderung seiner spezifischen Bindungsproteine im Zytosol, während ihre Konzentration im Zellkern zunimmt (SAFFRAN, LOESER, 1980). Aufbauend auf diesen Beobachtungen wurde zunächst das Modell der Rezeptor-Aktivierung und -Translokation in den Kern entwickelt (JUNGBLUT et al., 1983). Dagegen interpretierten GREEN und CHAMBON (1988) die Vorgänge als eine hormonell aktivierte Affinitätssteigerung der Rezeptoren, durch die die zunächst lockere Kernbindung gefestigt wird.

Immunhistochemische Untersuchungen weisen besetzte und unbesetzte Östrogen- und Progesteronrezeptoren praktisch ausschließlich in den Zellkernen nach (KING, GREENE, 1984; GASC, BAULIEU, 1986; ISOLA et al., 1986). Auch die Trennung von Nukleoplast (Zellkern, Kernmembran und schmaler, den Kern umgebender Zytoplasmasaum) und Zytoplast (verbleibendes Zytoplasma) belegt, daß der größte Anteil ungebundener Östrogenrezeptoren in der Kernfraktion zu finden ist, während das Zytoplasma kaum Bindungsaktivität für Östrogene besitzt (WELSHONS et al., 1984). Nach Homogenisierung der Nukleoplasten finden sich jedoch - wie auch nach Homogenisierung von intaktem Gewebe - die unbesetzten Steroidrezeptoren wiederum in der löslichen Phase (WELSHONS et al., 1985). Unter hormoneller Stimulation verlaufen die immunhistochemisch beobachteten Änderungen der Rezeptordichte gleichgerichtet mit der (biochemisch ermittelten) zytosolischen und der totalen Östrogenrezeptor-konzentration, nicht aber mit dem Anteil der nur schwer extrahierbaren nukleären Fraktion (BRENNER et al., 1988). Demnach müssen die immunhistochemisch nachgewiesenen Bindungsstellen jenen entsprechen, die nach der Homogenisierung im Zytosol nachweisbar sind. Man vermutet, daß locker gebundene, nukleäre Rezeptoren durch den Homogenisierungsprozeß gelöst und ins Zytosol ausgewaschen werden, die sogenannten „zytosolischen Rezeptoren“ letztendlich also ein Artefakt darstellen (BRENNER et al., 1988; WELSHONS et al., 1984).

Als Ort der Rezeptorbildung muß allerdings das endoplasmatische Reticulum angesehen werden, wie u.a. aus immunelektronenmikroskopischen Untersuchungen hervorgeht (ISOLA et al., 1986).

Im Hinblick auf das Vorkommen von Steroidhormonrezeptoren im Zytoplasma zeigten DAUVOIS et al. (1993) an Zellkulturen, daß der murine Östrogenrezeptor permanent zwischen Zellkern und Zytoplasma hin und her pendelt und auf diese Weise ein

dynamisches Gleichgewicht zwischen den Kompartimenten erreicht wird. Die Translokation in den Nukleus ist energieabhängig und kann durch das Antiöstrogen ICI 182780 verhindert werden. Es kommt dann zu einer Akkumulation von Östrogenrezeptoren im Zytoplasma. Ergänzende Untersuchungen liegen von NIRMALA und THAMPAN (1995) vor. Sie isolierten aus dem Ziegenuterus ein ATPase- Aktivität besitzendes 55-kDa Protein, das den Östrogenrezeptor durch das Zytoplasma zum Zellkern transportiert. Daraufhin bindet der Rezeptor an die Kernmembran und wird mit Hilfe eines 14-kDa Proteins unter Verbrauch von ATP in den Zellkern geschleust.

KARTHIKEYAN und THAMPAN (1996) identifizierten im Uterus der Ziege außer dem regulären nukleären Östrogenrezeptor mit DNS-Bindungskapazität einen „nicht-aktivierten“ Rezeptor, der Bestandteil der Plasmamembran ist. Er stellt ein Rezeptormonomer mit Hormon-Bindungsfähigkeit dar, das unter Östrogen-Exposition von der Plasmamembran dissoziiert und zusammen mit dem nukleären Bindungsprotein ein Rezeptorheterodimer bildet.

2.3.5 Phosphorylierung von Steroidhormonrezeptoren

Steroidhormonrezeptoren sind Phosphoproteine (DOUGHERTY et al., 1982), ihre Funktion wird durch Phosphorylierungs- bzw. Dephosphorylierungsmechanismen manipuliert (DAYANI et al., 1990). Es handelt sich dabei um ATP- und Mg^{2+} -abhängige Prozesse, bei denen die Rezeptoren in einen energiereicheren Zustand transformiert werden. Nicht-Estradiol-bindende Rezeptorvorstufen werden dabei unter Verbrauch von Phosphoryl-Gruppen des ATP in eine Estradiol-bindende Rezeptorform überführt (DAYANI et al., 1990). Der phosphorylierte Status geht weiterhin einher mit einer gesteigerten Affinität zur DNS und einer erhöhten Transkriptionsaktivität (DENTON et al., 1992).

Bisher wurden verschiedene Serin-, Threonin- (TAKIMOTO et al., 1992) und Tyrosinreste (AURICCHIO et al., 1981) der Rezeptorproteine als Zielort der Phosphorylierung identifiziert.

Die Phosphorylierung von Rezeptoren geschieht hormonspezifisch, so daß sie bei Östrogenrezeptoren durch Estradiol, nicht aber durch Progesteron stimuliert wird (DENTON et al., 1992). Umgekehrt steigert außer Progesteron kein anderes Steroid die

Phosphorylierung des Progesteronrezeptors und die Dissoziierung des Hsp90 vom Rezeptor (NAKAO, MOUDGIL, 1989).

Demnach führt die Exposition mit Steroidhormonen über Phosphorylierungsmechanismen zur Aktivierung der spezifischen Rezeptoren mit der Folge einer gesteigerten Transkription.

2.4 Östrogen- und Progesteronrezeptoren im Uterus der Hündin

2.4.1 Biochemische Eigenschaften der Östrogen- und Progesteronrezeptoren

Erste Untersuchungen über canine Östrogenrezeptoren bei juvenilen, Estradiol-17 β -stimulierten Tieren liegen von LESSEY und GORELL (1980 a) vor. Als Präparation diente nach Homogenisierung des Gewebes der im Zytosol vorkommende sog. zytosolische Rezeptor (s. Kap. 2.3.4). In Zielgeweben wie Uterus und Salpinx war der Rezeptorspiegel bedeutend höher als in Leber, Herz, Zwerchfell oder Niere. Weiterhin wurde die hohe Bindungsspezifität des caninen Östrogenrezeptors zu Estradiol-17 β belegt. Bei Gleichsetzung der Bindung von Estradiol-17 β mit 100% wurden für Diethylstilbestrol, Estron und Estriol mit 85, 57,7 und 43 % vergleichsweise geringere Affinitäten gemessen, für Hydrocortison, Dexamethason, Testosteron und Progesteron dagegen nur minimale (LESSEY, GORELL, 1980 a) bzw. keine (JOHNSTON et al., 1985). Die Östrogenrezeptoren im Zytosol aus caninem Uterus sind sättigbar mit Konzentrationen von 10 nM (JOHNSTON et al., 1985) bzw. 30 nM ³H-Estradiol-17 β (LESSEY, GORELL, 1980 a) und zeigen im Rahmen der Scatchard Analyse (s. Kap. 3.4.2 u. 3.4.4) eine einheitliche Klasse von Bindungsproteinen mit einem relativ geringen Anteil unspezifischer Bindungen. Die Dissoziationskonstante (K_D) beträgt bei Estradiol-17 β -stimulierten Welpen sowie bei zyklischen Hündinnen mit unterschiedlichem Hormonstatus durchschnittlich $1,4 \times 10^{-9}$ M (LESSEY, GORELL, 1980 a; LESSEY et al., 1981). JOHNSTON et al. (1985) stellten während verschiedener Zyklusstadien deutliche Unterschiede der Affinität fest. So erweist sich in der zitierten Studie die Dissoziationskonstante im frühen Diöstrus (bei hohen Östrogenrezeptorkonzentrationen) mit $2,66 \times 10^{-9}$ M als signifikant höher als während der übrigen Zeitpunkte ($K_d = 0,63-1,12 \times 10^{-9}$ M). Auch DONNAY et al. (1995)

ermittelten in der frühen Lutealphase mit $2,9 \times 10^{-9}$ M eine vergleichsweise höhere Dissoziationskonstante als während des übrigen Zyklus ($K_d = 1,1-1,3 \times 10^{-9}$ M).

Biochemische Untersuchungen zum Vorkommen und zur Charakterisierung des Progesteronrezeptors wurden vielfach unter Verwendung des synthetischen Gestagens R5020 durchgeführt, das eine zwei- bis dreifach höhere Affinität zum Progesteronrezeptor besitzt als das natürliche Progesteron. Es läßt sich durch Estradiol-17 β , Estron und Testosteron kaum, und durch Dexamethason, Estriol und Hydrocortison gar nicht aus seiner hochaffinen Bindung an den Rezeptor verdrängen (LESSEY, GORELL, 1980 b). Außerdem bietet R5020 den Vorteil, nicht - wie Progesteron - an Corticosteroid-bindendes Globulin (CBG) zu binden; es erfährt auch keine kompetitive Hemmung durch Cortisol (LESSEY, GORELL, 1980 b).

Entsprechende Studien weisen den caninen Progesteronrezeptor ebenfalls als ein Bindungsprotein mit hoher Gewebe- und Ligandenspezifität aus. Hohe Rezeptorkonzentrationen kennzeichnen auch hier Uterus und Salpinx als Zielgewebe, während in Herz, Leber, Milz und Niere keine Bindung von Gestagenen erfolgt (JOHNSTON et al., 1985). Zur Sättigung der spezifischen Bindungsstellen im Zytosol des caninen Uterus wurde eine Konzentration von 30 nM ^3H -R5020 benötigt (LESSEY, GORELL, 1980 b; JOHNSTON et al., 1985). Bei der Scatchard Analyse (s. Kap. 3.4.2. u. 3.4.4) ergab sich eine einheitliche Klasse von Rezeptoren mit einer Dissoziationskonstanten von $2,5 \times 10^{-9}$ M, die zyklusunabhängig war (LESSEY, GORELL, 1980 b, LESSEY et al., 1981). Hiervon abweichend ermittelten JOHNSTON et al. (1985) eine K_d von $5,83 \times 10^{-9}$ M im Proöstrus und von $2,02-3,03 \times 10^{-9}$ M während der übrigen Zyklusstadien. Dagegen lag der von DONNAY et al. (1995) im frühen Diöstrus festgestellte Wert bei $K_d = 5,0 \times 10^{-9}$ M, im übrigen Zyklusverlauf wurde er mit $K_d = 2,2 - 4,3 \times 10^{-9}$ M angegeben.

2.4.2 Konzentration der Östrogen- und Progesteronrezeptoren im Verlauf des Zyklus

Angaben über den Verlauf der Östrogen- und Progesteronrezeptorkonzentrationen während des Zyklus der Hündin liegen aus verschiedenen Untersuchungen vor. Allerdings lassen sie sich kaum in Beziehung zueinander setzen, da zum einen die

Maßeinheiten nicht vergleichbar sind, und zum anderen unterschiedliche Zyklusstadien untersucht wurden. Die Autoren definieren den Ovulationszeitpunkt - und damit die Zyklusphasen - nicht identisch. In den Tabellen 1 und 2 wird der Versuch unternommen, die erhobenen Daten einander gegenüber zu stellen.

Tab. 1: Östrogenrezeptorkonzentrationen im Uterus der Hündin während verschiedener Zyklusphasen nach Angaben aus der Literatur

Autor		Lessey et al. (1981)	Johnston et al. (1985)	Fernandes et al. (1989)	Donnay et al. (1995)
Maßeinheit		<i>pmol/g Uterus</i>	<i>pmol/g Endometrium</i>	<i>pmol/g Endometrium</i>	<i>fmol/mg zytos. Protein (Uterus)</i>
Zyklusphase	Zyklus-tag				
Proöstrus	1.	10,7	3,35		
Proöstrus	9.	46,6		9,9	650
Östrus	0	13,0			
Östrus	3.		3,98	10,5	390
Diöstrus	2.		6,18	16,3	
Diöstrus	14.	10,7	0,69	16,2	400
Diöstrus	28.			4,9	
Diöstrus	40.			3,7	90
Diöstrus	60.			13,4	
Diöstrus	70.			15,7	
Diöstrus	80.			19,8	
Anöstrus		8,5	1,06		550
Ovariectomiert		1,5			

Ein direkter Vergleich der absoluten Zahlen ist aufgrund unterschiedlicher Maßeinheiten nicht möglich. Aussagekräftiger ist es jedoch, die jeweiligen Konzentrationsmaxima und -minima im Verlauf des Zyklus zu betrachten.

LESSEY et al. (1981) stellen einen dramatischen Zuwachs an Östrogenrezeptoren auf das Vierfache während des Proöstrus fest, dem ein ebenso starker Rückgang im Östrus und eine weitere Verminderung im Diöstrus sowie im Anöstrus folgt. Sehr niedrige Spiegel weisen ovariectomierte Tiere auf.

JOHNSTON et al. (1985) dagegen geben weitgehend gleiche Östrogenrezeptorkonzentrationen für Proöstrus und Östrus an und berichten über eine Verdoppelung im frühen Diöstrus. Bereits wenige Tage danach sinkt der Gehalt auf minimale Werte ab,

um dann - im Gegensatz zu Lessey's Beobachtungen - im Anöstrus wieder leicht anzusteigen.

Auch FERNANDES et al. (1989) stellen für Proöstrus und Östrus keine signifikanten Unterschiede des Östrogenrezeptorgehaltes fest. Ähnlich wie bei JOHNSTON et al. (1985) steigt die Konzentration im frühen Diöstrus deutlich an, minimale Rezeptorspiegel werden hier aber erst zwischen dem 30. und 40. Tag gemessen. Im weiteren Verlauf des Diöstrus nehmen die Rezeptorkonzentrationen kontinuierlich zu und erreichen am 80. Tag ein absolutes Maximum.

Vergleichbar mit LESSEY et al. (1981) geben DONNAY et al. (1995) einen Rezeptor-Peak im Proöstrus an, dem ein Rückgang im Östrus und ein gleichbleibend niedriger Gehalt im frühen Diöstrus folgt. Minimale Konzentrationen ermitteln DONNAY et al. (1995) dagegen erst im mittleren Diöstrus, gefolgt von einem erneuten starken Anstieg im Anöstrus. Dabei wird das Niveau des Proöstrus allerdings nicht wieder erreicht.

Tab. 2: Progesteronrezeptorkonzentrationen im Uterus der Hündin während verschiedener Zyklusphasen nach Angaben aus der Literatur

Autor		Lessey et al. (1981)	Johnston et al. (1985)	Fernandes et al. (1989)	Donnay et al. (1995)
Maßeinheit		<i>pmol/g Uterus</i>	<i>pmol/g Endometrium</i>	<i>pmol/g Endometrium</i>	<i>fmol/mg zytos. Protein (Uterus)</i>
Zyklusphase	Zyklus-tag				
Proöstrus	1.	28,2	17,32		
Proöstrus	9.	24,8		4,9	700
Östrus	0	19,8			
Östrus	3.	7,3	5,94	4,0	385
Diöstrus	2.		4,29	6,4	
Diöstrus	14.	3,9		1,7	210
Diöstrus	20.		1,85	2,3	
Diöstrus	28.			1,2	
Diöstrus	40.			1,5	150
Diöstrus	50.			4,6	
Diöstrus	60.			6,6	
Diöstrus	70.			6,7	
Diöstrus	80.			5,5	
Anöstrus		10,4	3,01		200
Ovariectomiert		0,0			

Auch bezüglich der Progesteronrezeptorkonzentrationen im Verlauf des Zyklus liefern die Autoren differente Ergebnisse (s. Tab. 2). LESSEY et al. (1981) stellen ein Konzentrationsmaximum im Proöstrus fest, dem im Östrus und im Diöstrus jeweils ein starker Rückgang folgt. Im Anöstrus verzeichnen sie einen erneuten Zuwachs.

Einen ähnlichen Verlauf beschreiben auch JOHNSTON et al. (1985), deutlich abweichend von ihren Angaben zum Östrogenrezeptor. Bei FERNANDES et al. (1989) liegt ein Konzentrationsmaximum im frühen Diöstrus vor, minimale Konzentrationen finden sich im mittleren Diöstrus und ein weiteres Maximum im späten Diöstrus. DONNAY et al. (1995) erzielen ganz ähnliche Ergebnisse.

Der Uterus von 6 bis 12 Wochen alten Welpen enthält geringe Mengen an Östrogenrezeptoren, vergleichbar etwa mit Konzentrationen, die bei zyklischen Hündinnen im mittleren Diöstrus gemessen werden. Progesteronrezeptoren konnten im Uterus von Welpen nicht nachgewiesen werden (LESSEY et al., 1981).

Bei Hündinnen mit Pyometra sind die Progesteronrezeptorkonzentrationen im Endometrium mit 1,53 pmol/g Gewebe auf dem gleichen Niveau wie bei gesunden Tieren im Diöstrus, wo 1,89 pmol/g Gewebe gemessen worden sind (NOMURA, 1985). Demgegenüber weisen während der Sekretionsphase Uteri von Hündinnen mit glandulär-zystischer-Hyperplasie, verglichen mit gesunden Uteri, signifikant höhere Östrogenrezeptorspiegel auf (DE COCK et al., 1997).

2.4.3 Verteilung der Östrogen- und Progesteronrezeptoren im Uterus

Immunhistochemische Untersuchungen liefern ergänzend zu den auf biochemischem Wege mittels Radio-Rezeptor-Test gewonnenen Daten Erkenntnisse über die Verteilung der Rezeptoren innerhalb des Uterus und der einzelnen Zellen.

Positive Reaktionen werden allgemein nur in den Zellkernen, nicht aber im Zytoplasma beobachtet (DE COCK et al., 1997; DHALI WAL et al., 1997). Östrogenrezeptoren finden sich sowohl im Oberflächenepithel, im Drüsenepithel und im Stroma des Endometriums als auch in den glatten Muskelzellen des Myometriums (DE COCK et al., 1997). Das gleiche gilt für die Progesteronrezeptoren (DHALI WAL et al., 1997).

Im Östrus ist eine starke Expression beider Rezeptoren im luminalen und glandulären Epithel, sowie im Stroma und im Myometrium zu verzeichnen. Während des frühen Diöstrus sinkt die Zahl der Östrogenrezeptor-positiven Zellkerne und auch Intensität und Homogenität der Anfärbung nehmen ab. Eine Ausnahme bilden die Epithelien der tiefen Drüsen, die auch in diesem Zyklusabschnitt positive Reaktionen aufweisen.

Die Progesteronrezeptoren zeigen im gleichen Zeitraum eine insgesamt stärkere Ausprägung und weniger deutliche, statistisch nicht signifikante Änderungen ihrer Konzentration. Im Diöstrus sind sie vorwiegend in den tiefen Drüsen und im Myometrium konzentriert, aber auch im luminalen und glandulären Epithel sind sie im Vergleich zu den Östrogenrezeptoren deutlich stärker vertreten (DHALIWAL et al., 1997).

Während des späten Diöstrus nimmt der Gehalt an Östrogenrezeptoren in allen Zellpopulationen wieder zu, um im Anöstrus erneut zurück zu gehen (DE COCK et al., 1997).

2.5 Uterine Östrogen- und Progesteronrezeptoren im Spezies-Vergleich

2.5.1 Konzentration der Östrogen- und Progesteronrezeptoren

Die in diesem Kapitel gemachten Angaben beziehen sich auf biochemische Untersuchungen bei Differenzierung zwischen zytosolischen und nukleären Rezeptoren (s. Kap. 2.3.4). Unter Anwendung solcher Verfahren konnten BERGMAN et al. (1992) belegen, daß bei der **Maus** die Konzentrationen von zytosolischen und nukleären Östrogenrezeptoren im Verlauf des Zyklus beträchtlich variieren. Sie sind im Östrus (Plasma-Estradiol-17 β : 10,3 pg/ml) signifikant höher als im Metöstrus (Plasma-Estradiol-17 β : 3,1 pg/ml). Der Anteil der nukleären Bindungsstellen nimmt dabei von 32 % auf 41 % der Gesamtfraktion zu. Ergänzende Untersuchungen ergaben, daß der DNS-Gehalt - und damit die Zellzahl - während des Zyklus weitgehend konstant bleibt, so daß der zyklische Anstieg uteriner Östrogenrezeptoren auf der Zunahme von Bindungsproteinen in der Zelle und nicht auf einer Steigerung der Zellzahl beruhen muß.

Den Verlauf der zytosolischen und nukleären Östrogen- und Progesteronrezeptorkonzentration im Uterus des **Hamsters** verdeutlicht die Abbildung 4. Hier zeigen die zytosolischen und nukleären Progesteronrezeptoren und die nukleären Östrogenrezeptoren einen Peak während der Follikelphase des Zyklus, zeitgleich mit dem präovulatorischen Serum-Estradiol-Anstieg. Die Werte fallen jedoch - anders als bei der Maus - bereits im Östrus auf ihr Basalniveau ab (LEAVITT et al., 1983).

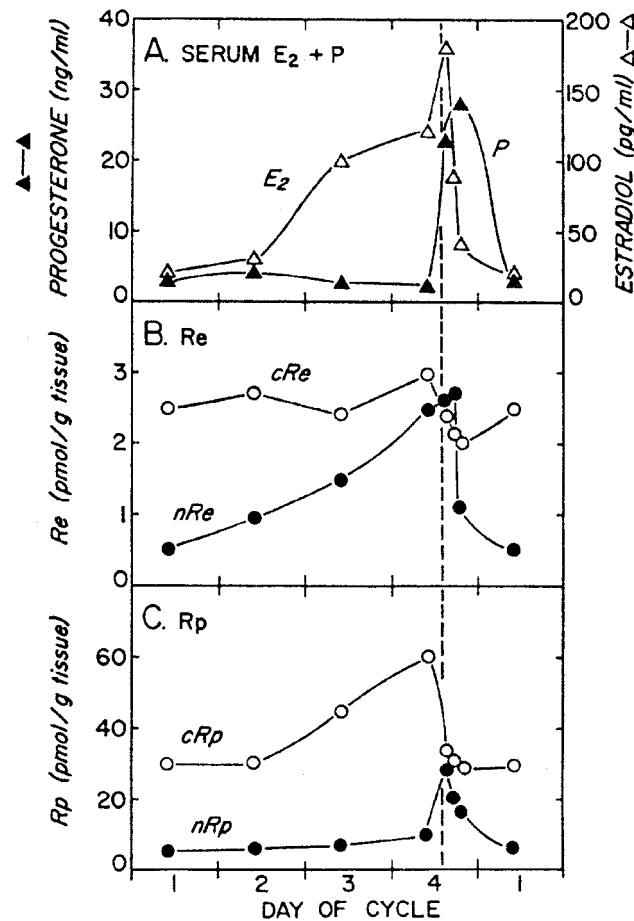


Abb. 4: Serum - Progesteron und - Estradiol-17b in Beziehung zur Konzentration der zytosolischen sowie nukleären Östrogen- und Progesteronrezeptoren im Uterus des Hamsters während des Zyklus. Die gestrichelte, senkrechte Linie markiert die präovulatorische Freisetzung von Gonadotropinen. Abkürzungen: E_2 : Estradiol-17b; P : Progesteron; c : zytosolisch; n : nukleär; Re : Östrogenrezeptor; Rp : Progesteronrezeptor (entnommen aus LEAVITT et al., 1983).

Wie bei der Maus beschrieben, findet man auch im Myometrium der **Kuh** maximale Östrogen- und Progesteronrezeptorspiegel im Östrus. Die niedrigsten Werte werden im Diöstrus gemessen (KLAUKE, HOFFMANN, 1992). Die Tabelle 3 veranschaulicht den Rezeptorstatus im Verlauf des Zyklus.

Tab. 3: *Zytoplasmatische Östrogen- und Progesteronrezeptoren im Myometrium der Kuh während des Zyklus (KLAUKE, HOFFMANN, 1992)*

Zyklusphase	Östrogenrezeptor	Progesteronrezeptor
	<i>fmol/ mg zytosol. Protein</i>	<i>fmol/ mg zytosol. Protein</i>
Östrus	287,4	1432
Postöstrus	130,1	866
Diöstrus	97,2	296
Proöstrus	157,7	450

Zu übereinstimmenden Ergebnissen kommen auch VESANEN et al. (1991). Die Tabelle 4 gibt den Rezeptorstatus im bovinen Endometrium und Myometrium in Beziehung zum Progesteronspiegel im Blutplasma wieder.

Tab. 4: *Östrogen- und Progesteronrezeptoren im Uterus der Kuh während des Zyklus (VESANEN et al., 1991)*

Plasma- Progesteron	Östrogenrezeptor		Progesteronrezeptor	
	Endometrium	Myometrium	Endometrium	Myometrium
<i>nmol/ l</i>	<i>fmol/ mg zytosol. Protein</i>	<i>fmol/ mg zytosol. Protein</i>	<i>fmol/ mg zytosol. Protein</i>	<i>fmol/ mg zytosol. Protein</i>
< 2,7	291	237	1162	1315
2,7 - 6,4	164	135	695	694
> 6,4	173	132	491	485

Bei niedrigem Progesterongehalt im Plasma weisen die Östrogen- und Progesteronrezeptoren sowohl im Endometrium als auch im Myometrium höhere Konzentrationen auf als bei mittleren und hohen Progesteronkonzentrationen. Endometrium und Myometrium unterscheiden sich nicht signifikant bezüglich ihres Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus. Auch das zum Ovar mit dem Graafschen Follikel bzw. Corpus luteum ipsilaterale Uterushorn differiert nicht signifikant von dem kontralateralen Uterushorn (VESANEN et al., 1991).

Beim **Schwein** liegen die Konzentrationsmaxima der Östrogen- und Progesteronrezeptoren ebenfalls im Östrus, was für Endometrium und Myometrium gleichermaßen gilt. In der Lutealphase wurde ein Rückgang der Rezeptorkonzentrationen lediglich im Myometrium beobachtet. Im Endometrium bleiben die Östrogenrezeptoren dagegen auf einem hohen Niveau und vermindern sich erst am 17. Tag des Zyklus (KOZIOROWSKI et al., 1984).

Ausführliche Angaben über den Verlauf der Östrogenrezeptor-konzentrationen liegen auch für den **Pavian** vor. Erhöhte Rezeptorspiegel finden sich hier vom 13. bis zum 4. Tag prae ovulationem; bereits vor dem ovulatorischen Estradiol-17 β -Peak ist ein signifikanter Rückgang zu verzeichnen. Die Rezeptorkonzentration stagniert zwischen dem vierten Tag prae- und dem zwölften Tag post ovulationem auf Basalniveau und steigt dann zeitgleich mit der rückläufigen Progesteronsekretion wieder an (MARTEL et al., 1980). Die Abbildung 5 veranschaulicht den Verlauf der Östrogenrezeptorkonzentration in Beziehung zum Hormonprofil während des Sexualzyklus.

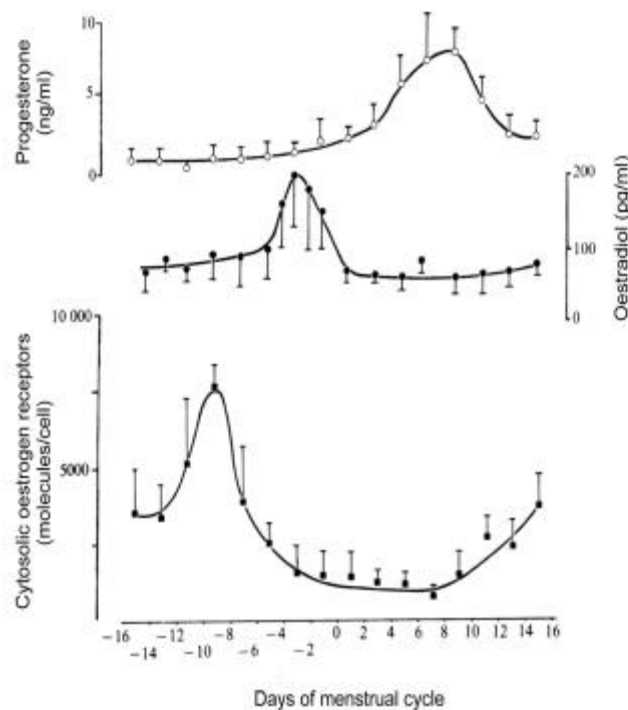


Abb. 5: Verlauf der Progesteron- und Estradiol-17 β -Konzentration im Plasma und der uterinen Östrogenrezeptorkonzentration beim Pavian während des Sexualzyklus (entnommen aus MARTEL et al., 1980)

Obwohl Zykluslänge und Hormonprofile beim Affen und bei der **Frau** ähnlich sind (MARTEL et al., 1980), differieren die zyklischen Schwankungen der Rezeptorkonzentrationen. Im Endometrium der Frau haben die Östrogen- und Progesteronrezeptoren ihr Konzentrationsmaximum in der späten Proliferationsphase, die vom vierten Tag prae ovulationem bis zur Ovulation andauert. Erst in der späten Sekretionsphase vom 7. bis zum 12. Tag post ovulationem vermindern sie sich auf ein Minimum (BAYARD et al., 1978), (s. Tab. 5).

Tab. 5: *Verlauf der Östrogen- und Progesteronrezeptorkonzentrationen im Endometrium der Frau während des Sexualzyklus (BAYARD et al., 1978)*

Zyklusphase	Östrogenrezeptor	Progesteronrezeptor
	<i>fmol/ mg DNS</i>	<i>fmol/ mg DNS</i>
I	1544	1521
II	1933	3013
III	1213	1895
IV	648	885

- I = Frühe Proliferationsphase, 10. bis 5. Tag prae ovul.
 II = Späte Proliferationsphase, 4. Tag prae ovul. bis Ovul.
 III = Frühe Sekretionsphase, 1. bis 6. Tag post ovul.
 IV = Späte Sekretionsphase, 7. bis 12. Tag post ovul.

2.5.2 Verteilung der Östrogen- und Progesteronrezeptoren

Immunhistochemische Studien zur Lokalisation von Östrogen- und Progesteronrezeptoren im Uterus liegen für eine Reihe von Labor- und landwirtschaftlichen Nutztieren sowie für die Frau vor. Dabei werden speziesspezifische Unterschiede bezüglich der Rezeptorverteilung in Abhängigkeit vom Zyklusstadium deutlich.

Übereinstimmend in allen Untersuchungen beschränken sich spezifische Immunreaktionen auf die Zellkerne. Auf elektronenmikroskopischer Ebene sind Rezeptorproteine nur im Euchromatin, jedoch nicht im Heterochromatin erkennbar (PRESS et al., 1985).

Östrogen- und Progesteronrezeptoren sind zumeist in den Fibrozyten des Stromas und in den glatten Muskelzellen des Myometriums auffindbar, während Oberflächen- und Drüsenepithelien unter dem Einfluß der Steroidhormone unterschiedliche Färbemuster zeigen (BRENNER et al., 1990).

Bei Darstellung der Progesteronrezeptoren im Uterus der **Ratte** zeigen die stromalen Fibrozyten und die glatten Muskelzellen des Myometriums im Proöstrus die stärkste und im Metöstrus die geringste Immunfärbung. Die Reaktion des Oberflächenepithels läßt dagegen im Diöstrus auf einen hohen Progesteronrezeptorgehalt schließen, der im Proöstrus, Östrus und Metöstrus auf minimale Werte zurückgeht (OHTA et al., 1993).

Beim **Affen** sind in der Mitte des Zyklus (Östrus) die Fibrozyten und Drüsenepithelzellen mehrheitlich Östrogenrezeptor-positiv. Nach der Ovulation nimmt die Intensität der Färbung in den genannten Zellen - von innen nach außen fortschreitend - ab. In der Basalis weisen jedoch die Drüsenepithelzellen - im Gegensatz zu den Rezeptor-negativen Fibrozyten - weiterhin eine positive Immunreaktion auf. Die glatten Muskelzellen des Myometriums zeigen in der Follikelphase eine starke Anfärbung, die auch in der Lutealphase nur wenig schwächer ausfällt. Die Blutgefäße reagieren unabhängig vom Zyklusstand. So sind die Endothelien in den untersuchten Stadien stets negativ, die Muskelzellen der Tunica media und das perivaskuläre Bindegewebe dagegen jeweils positiv (BRENNER et al., 1988).

Ähnliches gilt auch für den Progesteronrezeptor. Er läßt sich in der luteal-follikulären Übergangsphase zunehmend in den Epithelzellen nachweisen und vermindert sich nach

der Ovulation in der gleichen Weise wie für den Östrogenrezeptor beschrieben. Die stromalen Fibrozyten zeigen dabei nur eine leichte Reduktion der Färbintensität. Die Blutgefäße und das Myometrium zeigen ein mit dem Östrogenrezeptor identisches Färbemuster (BRENNER et al., 1988).

Wie beim Affen ist auch beim **Pferd** die stärkste Immunreaktion im Östrus festzustellen. Östrogen- und Progesteronrezeptoren zeigen sich hier am deutlichsten im Stroma und in geringerem Ausmaß im Myometrium sowie in den glandulären Epithelien. Während des Diöstrus geht die Färbintensität im Myometrium und im Stroma, nicht aber im luminalen Epithel zurück. (WATSON et al., 1992).

Gemeinsamkeiten bezüglich des Östrogenrezeptor-Vorkommens lassen sich auch beim **Rind** finden. Während des Östrus ist die Immunreaktion im Drüsenepithel und im Stroma jeweils am stärksten, im Diöstrus (15. Zyklustag) ist sie am schwächsten. Im luminalen Epithel sind Östrogenrezeptoren im gesamten Zyklus nachweisbar und zeigen eine signifikante Zunahme am 15. Zyklustag. Progesteronrezeptoren sind im Oberflächenepithel dagegen am 8. Zyklustag sehr stark vertreten, an den übrigen untersuchten Zeitpunkten (Tage 1, 15 und 19) ist es jedoch frei davon. Ähnliche Verhältnisse gelten für die glandulären Epithelien. Bei den stromalen Fibrozyten gleicht der Progesteronrezeptor-Nachweis dem des Östrogenrezeptors (BOOS et al., 1996). Im Unterschied zu den Verhältnissen bei Pferd und Affe variiert beim Rind die Zahl der Östrogen- und Progesteronrezeptoren in den Muskelzellen des Myometriums beträchtlich; in der Tunica media der Blutgefäße konnten von BOOS et al. (1996) keine Rezeptoren ausgemacht werden.

Gleiches gilt für die Blutgefäße im **humanen** Endometrium. Im Gefäßendothel und in der Tunica media wurden auch hier keine Progesteronrezeptoren nachgewiesen (PRESS, GREENE, 1988).

Bei der **Katze** scheinen die verschiedenen Zellpopulationen des Endometriums bezüglich ihres Östrogen- und Progesteronrezeptorgehaltes in Abhängigkeit vom Zyklusstand eher gleichsinnigen Schwankungen unterworfen zu sein. Im Östrus und nach Estradiol-Stimulation steigern sich Intensität und Anzahl immungefärbter Zellkerne. Dies gilt bei den Östrogenrezeptoren für Oberflächen- und Drüsenepithelien sowie für die stromalen Fibrozyten. Progesteronrezeptoren finden sich allerdings nur in

den Zellkernen des Bindegewebes. Die Verabreichung von Progesteron führt zur Reduktion der Immunreaktion in Qualität und Quantität und zum völligen Verschwinden der Östrogenrezeptoren im luminalen Epithel. Die glatten Muskelzellen des Myometriums weisen (während der Gravidität) beide Bindungsproteine auf (LI et al., 1992).

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Für die Untersuchungen standen 19 klinikseigene Beagle-Hündinnen im Alter von 3 bis 7 Jahren zur Verfügung. Die Unterbringung erfolgte in Gruppen zu je drei bis vier Tieren in einer 12 m² großen Box mit Hobelspaneinstreu. Die Hündinnen wurden einmal täglich mit einem handelsüblichen Trocken- und Dosenfutter gefüttert. Wasser wurde ad libitum angeboten.

Desweiteren ging eine 8 Jahre alte Cocker-Hündin in die Untersuchung ein, die zum Patientengut der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Gross- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität in Gießen gehörte.

3.2 Bestimmung des Ovulationszeitpunktes

3.2.1 Klinische Untersuchung

Einmal täglich wurden die Hündinnen adspektorisch auf ihren Gesundheitszustand überprüft. Besonderes Augenmerk galt den äußeren Geschlechtsorganen, wobei insbesondere auf Anzeichen einer beginnenden Läufigkeit, wie Ödematisierung der Vulva und blutigen Vaginalausfluß geachtet wurde. Lagen diese vor, wurde mit der Probenentnahme bei dem betreffenden Tier begonnen.

3.2.2 Vaginalzytologie

Vom ersten Tag der proöstrischen Blutung bis zum Auftreten neutrophiler Granulozyten im Vaginalepithel, das den beginnenden Diöstrus anzeigte, wurde täglich ein Vaginalabstrich angefertigt. Danach beschränkte sich die Probenentnahme bis zur Ovariohysterektomie auf einen Abstrich pro Woche.

Mit Hilfe eines sterilen Stieltupfers wurde aus dem cranialen Bereich des Vaginaldaches zytologisches Material entnommen, auf einem entfetteten Objektträger abgerollt und in einem 95 %-igen Äther-Alkohol-Gemisch 30 Minuten lang fixiert. Die

Färbung erfolgte mit dem standardisierten Verfahren nach Papanicolaou-Schorr. Danach wurden die Präparate entwässert, 10 Minuten in Xylol geklärt und anschließend mit Eukitt (Hecht-Mertens, Kiel) eingedeckt.

3.2.3 Blutprobenentnahme und Hormonanalytik

Für die Hormonanalytik wurde vom ersten Tag der proöstrischen Blutung bis zum Anstieg des Plasmaprogesteronspiegels auf Werte um 20 ng/ml täglich eine Blutprobe entnommen. Danach wurde bis zur Ovariohysterektomie der Hündin die Blutprobenentnahme auf zwei mal wöchentlich reduziert.

Die Entnahme von ca. 5 ml Vollblut erfolgte durch Punktion der Vena cephalica antebrachii oder der Vena saphena. Die Proben wurden in NH₄-Heparin-Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht) aufgefangen und bei 3000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma abpipettiert und in Kunststoffröhrchen (Sarstedt) bei -20°C bis zur Hormonbestimmung aufbewahrt.

Die Bestimmung der im Blutplasma vorliegenden Konzentrationen von Progesteron und Estradiol-17 β erfolgte mit standardisierten und validierten radioimmunologischen Methoden, wie sie von HOFFMANN (1977) und HOFFMANN et al. (1992) beschrieben worden sind.

3.2.4 Versuchsaufbau

Zur Ermittlung des Ovulationszeitpunktes war die Progesteronkonzentration im peripheren Blut die maßgebliche Größe. Der Tag, an dem der Progesterongehalt über 5 ng/ml Plasma anstieg, wurde als Tag 1 (Tag der Ovulation) festgesetzt. Ergänzend wurden die Ergebnisse der Vaginalzytologie herangezogen, die zwar mit geringerer Genauigkeit die Ovulation anzeigten, aber im übrigen mit dem Hormonstatus übereinstimmten.

Zu definierten Zeitpunkten des Zyklus wurden jeweils drei bzw. vier Hündinnen ovariohysterektomiert. Dies waren im Diöstrus der 15., 30., 45., 60. und 75. Tag post

ovulationem. Zusätzlich wurden drei weitere Hündinnen im Anöstrus am 110. Tag post ovulationem ovariohysterektomiert und in die Untersuchungen aufgenommen.

3.3 Ovariohysterektomie

Von jedem Tier wurden vor der Operation 5 ml Blut für die Hormonanalytik entnommen.

Die Narkose wurde über einen venösen Zugang an der Vena cephalica antebrachii mit Levomethadon (Polamivet®; 0,75 mg/kg KGW) und Acepromazin (Vetranquil®; 0,15 mg/kg KGW) eingeleitet. Nach Vorbereitung des Abdomens für die Laparotomie und trachealer Intubation erfolgte die Inhalationsnarkose mit Sauerstoff, Lachgas und Halothan®.

Die Bauchdecke wurde in der Linea alba 2 cm caudal des Nabels bis ca. 2 cm cranial des Schambeines eröffnet. Um eine möglichst lang anhaltende Blutversorgung des Uterus und der Ovarien zu gewährleisten, wurde nicht nach der herkömmlichen Methode verfahren, bei der man als erstes den Uterus am Übergang zur Cervix abbindet. Statt dessen wurden zunächst die beiden jeweils in der Bursa ovarica liegenden Ovarien cranial und caudal doppelt ligiert und zusammen mit Mesovar und Mesosalpinx abgesetzt. Im nächsten Schritt wurde der Uterus im Bereich der Cervix ligiert und nach stumpfer Durchtrennung des Mesometriums abgesetzt. Der Uterus wurde sofort in eisgekühlte Kochsalzlösung verbracht. Nach Entfernung der überstehenden Cervikalschleimhaut wurde der Cervixstumpf einstülpend nach Schmieden verschlossen, wobei die Uteringefäße in die Naht einbezogen wurden. Für die genannten Ligaturen wurde Softcatgut 3,5 metric verwendet. Die Bauchwunde wurde mit synthetischem, resorbierbarem Nahtmaterial verschlossen und die Inhalationsnarkose ausgeleitet.

Während der gesamten Operation wurden die Tiere mit ca. 200 ml Stereofundin® per Dauertropfinfusion versorgt. Weiterhin wurden sie post operativ über fünf Tage unter Antibiose gesetzt (Synulox® 2 • 250 mg/Tag).

3.4 Biochemische Untersuchungen

Der biochemische Rezeptornachweis mittels Radioligand-Bindungs-Test stellt ein gängiges und etabliertes Verfahren dar, das routinemäßig zur qualitativen und quantitativen Rezeptorbestimmung eingesetzt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde im Wesentlichen die Methodik von GREEN und LEAKE (1987) sowie KLAUKE und HOFFMANN (1992) angewandt. Das Verfahren umfaßte folgende Schritte:

- 3.4.1 Präparation und Homogenisierung des Gewebes
- 3.4.2 Ligand-Bindungs-Test
- 3.4.3 Proteinbestimmung
- 3.4.4 Auswertung mittels Scatchard Plot

3.4.1 Gewebepräparation

Da Steroidhormonrezeptoren sehr labil sind, wurde bei der Gewebepräparation darauf geachtet, daß die Temperatur des biologischen Materials einschließlich aller damit in Berührung kommenden Substanzen zu keiner Zeit 8°C überschritt.

Unmittelbar nach Extirpation des Uterus wurde dieser in eiskalter physiologischer Kochsalzlösung gespült und auf einem eisgekühlten Tablett ausgebreitet. Das Mesometrium wurde abpräpariert, der Uterus gewogen und vermessen und aus der Mitte der beiden noch geschlossenen Uterushörner jeweils ein ca. 8 mm breites Segment mit einer Rasierklinge heraus geschnitten. Diese Proben waren für die immunhistochemischen Untersuchungen bestimmt.

Daraufhin wurde der Uterus mit einer Präparierschere der Länge nach eröffnet, um ihn auf seinen Inhalt und seine Schleimhautoberfläche hin zu untersuchen. Je nach Größe und Gewicht wurden die Uteri in 5 bis 10 Teile zu je ca. zwei Gramm geschnitten, nochmals in Kochsalzlösung gespült und mit Zellstoff abgetupft, um sie dann zu wiegen. Anschließend wurden die Gewebeproben in vierfach liegender, extrastarker Alufolie verpackt und in flüssigem Stickstoff bei -196°C gefroren. Nach etwa 10 Minuten wurden die Proben einzeln entnommen und in gefrorenem Zustand durch mehrere Hammerschläge zertrümmert. Das zerkleinerte Material wurde in ein

Zentrifugenglas gegeben, in dem sich 4 ml eiskalter Homogenisierungspuffer je Gramm Gewebe befanden.

Die Proben wurden mit dem Ultra-Turrax in drei Durchgängen von jeweils 10 Sekunden unter permanenter Kühlung homogenisiert. Dabei wurden der Reihe nach die Aufsätze 18N, 10N und S25N8G benutzt. Zwischen den Durchgängen wurden die Proben eine Minute lang im Eisbad gekühlt. Das Homogenat wurde 10 Minuten lang bei 800 g und 0°C zentrifugiert und der Überstand noch einmal 60 Minuten lang bei 105.000 g und 0°C zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand stellte das Zytosol dar. Es wurde in 5 ml Glasgefäße mit Schraubverschluß dekantiert und bis zur Bestimmung der Rezeptorkonzentrationen bei -80°C aufbewahrt.

3.4.2 Ligand-Bindungs-Test

3.4.2.1 Prinzip der Darstellung der Rezeptorkonzentration und der Rezeptoraffinität

Dem quantitativen Rezeptornachweis liegt eine Sättigungsanalyse zugrunde, bei der den endogenen Rezeptoren radioaktiv markiertes Hormon in aufsteigender Konzentration angeboten wird. Zur Differenzierung zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung werden in einem Parallelansatz durch den Zusatz von nicht markiertem Hormon in hundertfachem Überschuß alle Bindungsstellen abgesättigt. Der dann noch meßbare gebundene ^3H -Ligand gibt die „nichtspezifische Bindung“ (B_{NS}) an und wird von der „Gesamtbindung“ (B_{G}) subtrahiert. Auf diese Weise erhält man die „Spezifische Bindung“ (B_{S}) als Maß für die Rezeptorkonzentration. Mit ansteigenden Konzentrationen des angebotenen ^3H -Liganden nimmt die Spezifische Bindung zunächst zu. Sie erreicht dann aber einen Sättigungsbereich, in dem zusätzlich angebotenes Hormon an keine weiteren Rezeptoren bindet. Dieser Bereich stellt die Rezeptorkonzentration in der Probe dar.

Der sogenannte Scatchard-Plot, bei dem die Daten in eine lineare Form transformiert werden, vereinfacht die Berechnung der Rezeptorkonzentration (s.u.).

In jedem Testlauf werden mehrere Ansätze zur Qualitätskontrolle mitgeführt:

Die „technische nichtspezifische-Bindung“ ($t-B_{NS}$) gibt Auskunft darüber, wie gut das nach der Inkubation nicht gebundene Hormon durch Kohleadsorption entfernt wird. Weiterhin wird jeweils eine Zytosolprobe mit bekannt niedrigem bzw. hohem Rezeptorgehalt als Negativ- (KW-) bzw. Positivkontrollwert (KW+) eingesetzt. Nachdem Skelettmuskel nur geringe Mengen an Östrogenrezeptoren aufweist (MEYER, RAPP, 1985), der Uterus von juvenilen Tieren dagegen recht hohe Rezeptorkonzentrationen erreicht (REDEUILH et al., 1981; SÖDERGARD, 1986), dienten im vorliegenden Fall Skelettmuskel als KW- und Uterus als KW+, jeweils gewonnen von einem juvenilen Schaf.

3.4.2.2 Bestimmung der Östrogenrezeptorkonzentration

Als Radioligand für den Östrogenrezeptor Test wurde mit Tritium markiertes Estradiol (3H -Estradiol) verwendet.

Die methanolische Stammlösung besaß eine Konzentration von 280 nM 3H -Estradiol und wurde durch Verdünnung mit HED-Puffer zur Herstellung von 11 Arbeitslösungen zwischen 0,70 und 12,00 nM herangezogen. Die Arbeitslösungen 9, 10 und 11 dienten zur Messung der nichtspezifischen Bindung (B_{NS}) durch Zugabe von nicht markiertem Diethylstilbestrol in jeweils hundertfachem Überschuß.

Die einzelnen Arbeitslösungen besaßen folgende Konzentrationen:

- 1: 0,70 nM 3H -Estradiol
- 2: 1,05 nM 3H -Estradiol
- 3: 1,58 nM 3H -Estradiol
- 4: 2,37 nM 3H -Estradiol
- 5: 3,56 nM 3H -Estradiol
- 6: 5,33 nM 3H -Estradiol
- 7: 8,00 nM 3H -Estradiol
- 8: 12,00 nM 3H -Estradiol
- 9: 5,33 nM 3H -Estradiol + 533 nM Diethylstilbestrol
- 10: 8,00 nM 3H -Estradiol + 800 nM Diethylstilbestrol
- 11: 12,00 nM 3H -Estradiol + 1200 nM Diethylstilbestrol

Alle Tests wurden im Doppelansatz bei Einbeziehung von KW+ und KW- durchgeführt. Für jede der 11 Arbeitslösungen wurden eine „Totale“, d.h. eine Probe ohne Zusatz von Zytosol sowie eine technische nichtspezifische Bindung (t- B_{NS}) angesetzt. Das Zytosol war zuvor aufgrund von Vorversuchen je nach Rezeptorgehalt 3-, 6-, 9- oder 12-fach mit HED-Puffer verdünnt worden.

Zur Durchführung des Tests wurden jeweils 50 μ l der 3 H-Estradiol-Arbeitslösung zu 150 μ l HED-Puffer (Totale) bzw. verdünntem Zytosol gegeben, die Proben dann „en bloc“ geschüttelt und 20 h (über Nacht) im Eisbad (ca. 4°C) inkubiert. Zur Abtrennung des nicht gebundenen 3 H-Estradiols wurden anschließend zu jeder Probe 200 μ l eiskalte Holzkohlesuspension pipettiert, die Proben danach erneut en bloc geschüttelt und 15 Minuten ab Zugabe zum ersten Röhrchen bei 4°C inkubiert. Zur „Totalen“ wurde anstelle der Kohlesuspension die gleiche Menge Aqua dest. pipettiert. Durch fünfminütige Zentrifugation bei 1000 g setzte sich die Holzkohle als Pellet ab; danach wurden 200 μ l des Überstandes abgehebert, mit 4 ml Szintillatorflüssigkeit gemischt und die Radioaktivität durch Flüssigszintillation (LSC) gemessen.

Eine Übersicht über den Testablauf ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tab. 6: *Versuchsprotokoll des Ligand-Bindungs-Tests zur Bestimmung der Östrogenrezeptorkonzentration*

	Totale	t-N_{SB}	KP+	KP-	Probe
HED-Puffer	150 μ l	150 μ l	---	---	---
Zytosol	---	---	150 μ l	150 μ l	150 μ l
Arbeitslösungen 1-11	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
Inkubation; 20 h					
Kohlesuspension	---	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l
Aqua dest.	200 μ l	---	---	---	---
Inkubation; 15 Min.					

3.4.2.3 Bestimmung der Progesteronrezeptorkonzentration

Zur Bestimmung der Progesteronrezeptorkonzentration wurde das synthetische, mit Tritium markierte Gestagen Promegeston (3 H-R5020) verwendet, da sich Progesteron

aufgrund seiner auch zum Glucocorticoidrezeptor ausgeprägten Affinität weniger gut eignet.

Unter Verwendung einer methanolischen Stammlösung mit der Konzentration 500 nM $^3\text{H-R5020}$ wurden 11 Arbeitslösungen hergestellt. Der dazu benutzte HED-Puffer enthielt in diesem Fall 10 % Glycerin. Zur Bestimmung der nichtspezifischen Bindung wurde auch hier den Arbeitslösungen 9, 10 und 11 nicht markiertes Promegeston in hundertfachem Überschuß zugesetzt.

- 1: 1,15 nM $^3\text{H-R5020}$
- 2: 1,75 nM $^3\text{H-R5020}$
- 3: 2,64 nM $^3\text{H-R5020}$
- 4: 3,95 nM $^3\text{H-R5020}$
- 5: 5,93 nM $^3\text{H-R5020}$
- 6: 8,85 nM $^3\text{H-R5020}$
- 7: 13,33 nM $^3\text{H-R5020}$
- 8: 20,00 nM $^3\text{H-R5020}$
- 9: 8,85 nM $^3\text{H-R5020}$ + 885nM R5020
- 10: 13,33 nM $^3\text{H-R5020}$ + 1333nM R5020
- 11: 20,00 nM $^3\text{H-R5020}$ + 2000nM R5020

Da sich bei dem Progesteronrezeptor-Test in Vorversuchen Probleme durch hohe nichtspezifische Bindungen ergaben, wurde allen Arbeitslösungen zur Absättigung nicht progesteron-spezifischer Bindungsstellen 500 nM Cortisol und 50 nM Dihydroxytestosteron zugesetzt.

Ansonsten erfolgte die Durchführung des Tests nach dem oben für die Östrogenrezeptoren dargestellten Testprotokoll einschließlich des Pipettierschemas.

3.4.3 Proteinbestimmung

Die Menge der zytosolischen Steroidrezeptoren wurde entsprechend der Literaturangaben (KLAUKE, HOFFMANN, 1992; VESANEN et al., 1991; SÖDERGARD, 1986) auf die Proteinkonzentration im Zytosol bezogen.

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem Coomassie[®] Protein Assay (Pierce) nach der dort beschriebenen Vorgehensweise. Mit Bovinem Serum Albumin wurde eine Standardkurve erstellt, anhand derer der in den Proben vorliegende Proteingehalt abgelesen werden konnte.

3.4.4 Berechnung der Rezeptorkonzentration und der Assoziationskonstanten

Die Berechnung der Rezeptorkonzentration und der Assoziationskonstanten erfolgte nach SCATCHARD (1949) und KING (1982) und der darauf aufbauenden Computeranalyse nach GREEN und LEAKE (1987).

Die im Überstand der Proben mittels LSC gemessene Radioaktivität wurde in cpm (gemessene Zerfälle pro Minute) angegeben. Von den Doppelansätzen wurden anschließend die arithmetischen Mittel berechnet und unter Berücksichtigung der Zählhausbeute des Counters von 58 % für Tritium die tatsächlichen Zerfälle pro Minute (dpm) ermittelt, die dann in Becquerel (Zerfälle pro Sekunde) umgerechnet wurden. Unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivität der Radioliganden (Bq/pmol) wurde die Menge des gebundenen Hormons in dem entnommenen 200 µl Aliquot (s. S. 42) bestimmt und auf die Einheit nmol/l umgerechnet.

Diese Berechnungen wurden für die Totale (T) und die Gesamtbindung (B_G) der einzelnen Proben durchgeführt. Die für jede Arbeitslösung angesetzte t- B_{NS} (s. S. 41) diente lediglich zur Überprüfung des technischen Systems und ging nicht in die Auswertung ein.

Der weiteren Analyse lagen folgende Zusammenhänge zugrunde (GREEN, LEAKE, 1987):

$$B_G = B_0 \cdot T \quad (1)$$

$$B_S = B_G - B_{NS} \quad (2)$$

$$B_{NS} = T \cdot a \quad (3)$$

B_0 : $(B_G / T) \cdot 100$ (%) = Anteil der Gesamtbindung (B_G) an der Totalen (T) in Prozent

B_S : Spezifische Bindung = gebundenes Hormon abzüglich des nichtspezifisch gebundenen Hormons

B_{NS} : Nichtspezifisch gebundenes Hormon, Meßergebnisse der Arbeitslösungen 9, 10 und 11

a: Steigungsfaktor der Geraden

Für B_{NS} gilt dabei, wie oben bereits dargelegt, daß der Radioligand außer den hochaffinen Bindungen mit Steroidhormonrezeptoren auch Bindungen mit weiteren Proteinen im Zytosol eingeht, die durch niedrige Affinität gekennzeichnet und nicht absättigbar sind. Der Graph dieser nicht-spezifischen Bindung, gegen die Totale aufgetragen, ergibt eine Gerade mit der konstanten Steigung a .

Geradengleichung: $Y = a \cdot X + b$

$$a = Y/X, \text{ oder}$$

$$a = B_{NS}/T$$

Zur Berechnung von a wurde für die Meßpunkte 9, 10 und 11 jeweils die Bindung (B_{NS}) durch die Totale dividiert und der arithmetische Mittelwert aus den Ergebnissen gebildet. Die nichtspezifische Bindung für jeden beliebigen Punkt ist dann $B_{NS} = T \cdot a$.

Dieser zunächst kompliziert erscheinende Rechenweg hat den Vorteil, daß man im Test nicht für jeden Meßpunkt, sondern lediglich für die drei höheren Konzentrationen eine B_{NS} ansetzen muß (GREEN, LEAKE, 1987).

Durch Einsetzen und Umformen der Gleichung (2) ergaben sich die Formeln (4) und (5); mit Hilfe letzterer wurde jeweils B_S errechnet.

$$B_S = B_0 \cdot T - T \cdot a \quad (4)$$

$$B_S = T (B_0 - a) \quad (5)$$

Die Gesamtbindung (B_G), die spezifische Bindung (B_S) und die nichtspezifische Bindung (B_{NS}) wurden in einem Koordinatensystem gegen die Totale aufgetragen. Anhand des Graphen der spezifischen Bindung ließ sich der Sättigungsbereich des Rezeptors ablesen (s. Abb. 6 und 7). Zusätzlich wurde die Sättigung rechnerisch ermittelt, indem der prozentuale Zuwachs der spezifischen Bindung von einem Meßpunkt zum nächsten berechnet wurde. Sobald die spezifische Bindung um weniger als 6 % anstieg, galten die Rezeptorproteine als abgesättigt. In die Berechnung der Rezeptorkonzentration und -affinität gingen nur die Werte im ungesättigten Bereich ein.

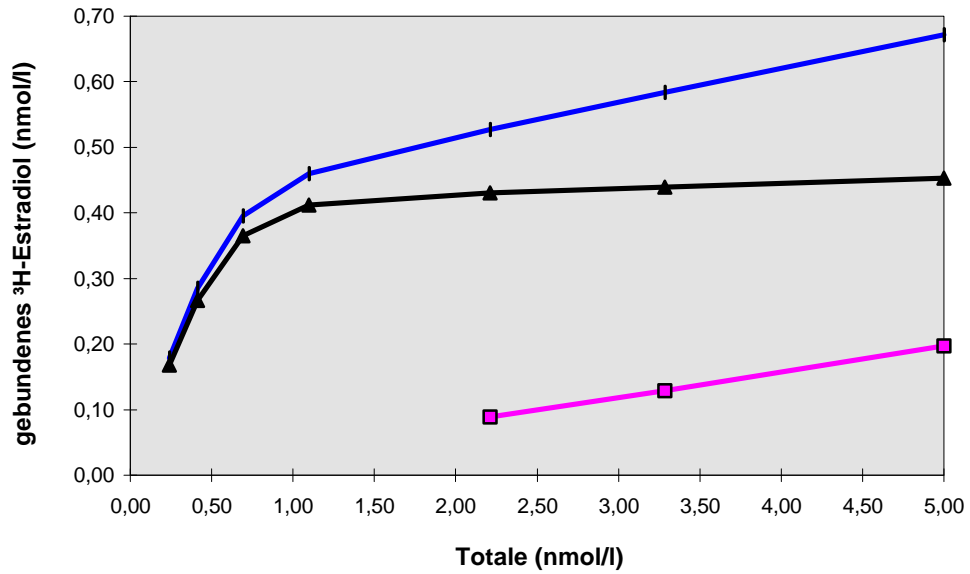


Abb. 6: Sättigungskurve des zytoplasmatischen Östrogenrezeptors am Beispiel der Hündin „Cora“ (Zyklusst. 30. Tag p.ov.)

- ◆— B_G (nmol/l)
- B_{NS} (nmol/l)
- ▲— B_S (nmol/l)

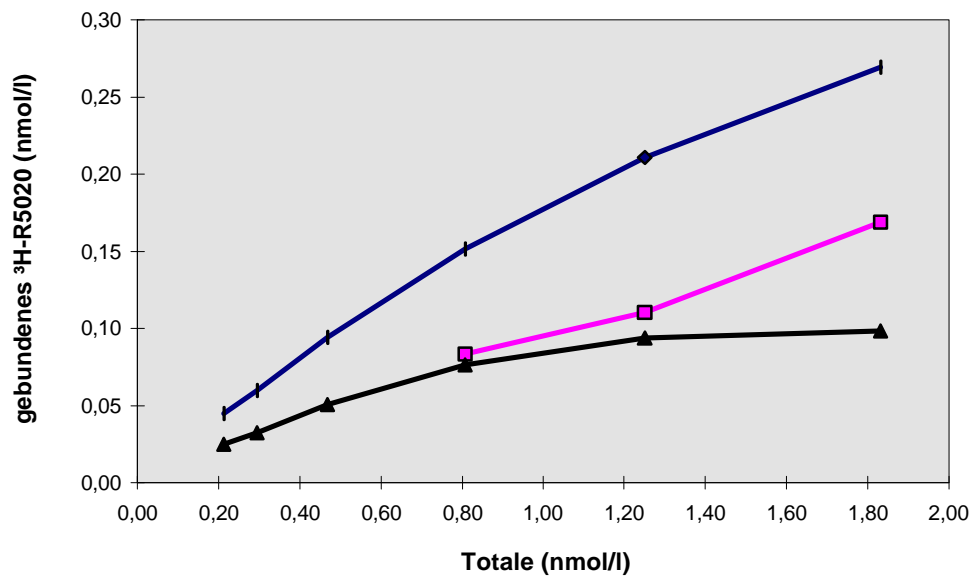


Abb. 7: Sättigungskurve des zytoplasmatischen Progesteronrezeptors am Beispiel der Hündin „Ferdie“ (Zyklusst. 15. Tag p.ov.)

- +— B_G (nmol/l)
- B_{NS} (nmol/l)
- ▲— B_S (nmol/l)

Wie oben dargelegt, handelt es sich bei dem durchgeführten Test um eine Sättigungsanalyse, bei der die Rezeptorkonzentration mit dem Verfahren nach SCATCHARD (1949) berechnet werden kann (s. S. 49). Voraussetzung dafür ist, daß zwischen Hormon (H), Rezeptor (R) und Hormon-Rezeptor-Komplex (HR) ein Sättigungsgleichgewicht eingetreten ist. Die Hormon-Rezeptor-Wechselwirkung folgt dem Massenwirkungsgesetz:



Es sei:

$$H = F \quad \text{und} \quad HR = B \quad \text{und} \quad R = R_0 - B$$

F: freies Hormon

B: gebundenes Hormon

R_0 : Gesamt-Rezeptorkonzentration

Dann gilt:



Die Dissoziationskonstante K_D ist definiert als:

$$K_D [\text{mol/l}] = \frac{F \cdot (R_0 - B)}{B} \quad (8)$$

Die Dissoziationskonstante ist ein Maß für die Affinität des Liganden zum Rezeptor und wird in der Einheit [mol/l] angegeben. Liegt das Gleichgewicht der Reaktion (6) auf der linken Seite, so liegt ein großer Teil der Moleküle in dissoziierter Form vor. Es ergibt sich ein hoher Wert für K_D als Ausdruck einer geringen Affinität. Umgekehrt sind bei hoher Affinität die verfügbaren Moleküle überwiegend in gebundener Form vorzufinden. Die Assoziationskonstante K_A nimmt dann einen hohen Wert an.

$$K_A [1/\text{mol}] = \frac{B}{F \cdot (R_0 - B)} \quad (9)$$

Nach SCATCHARD (1949) kann man die Gleichung (9) in eine lineare Form überführen, die eine einfache Berechnung von R_0 und K_A erlaubt. Durch diverse Umformungen kommt man zu der Formel:

$$\frac{B}{F} = K_A (R_0 - B)$$

oder:

$$\frac{B}{F} = -K_A (B) + K_A (R_0) \quad (10) \quad (Y = m \cdot X + a)$$

Es ergibt sich der sogenannte Scatchard Plot, im Idealfall dargestellt durch eine Gerade mit der Steigung $m = -K_A$ (K_A ist der negative Wert der Steigung m), deren Schnittpunkt mit der X-Achse die molare Konzentration der Bindungsstellen R_0 repräsentiert.

GREEN und LEAKE (1987) haben die Berechnung von B_S/F noch weiter vereinfacht, indem sie in der Gleichung

$$F = T - B_S \quad (11)$$

B_S durch die Gleichung (5) ersetzt haben:

$$F = T - T \cdot (B_0 - a) \quad (12)$$

$$F = T \cdot (1 - B_0 + a) \quad (13)$$

$$\frac{B_S}{F} = \frac{T \cdot (B_0 - a)}{T \cdot (1 - B_0 + a)} = \frac{B_0 - a}{1 - B_0 + a} \quad (14)$$

Aus den entsprechend umgerechneten Meßwerten wurde für jede Probe die Sättigungskurve (s.o.) und der Scatchard Plot erstellt. Mit Hilfe der ermittelten Geradengleichung ließ sich anhand der Steigung die Assoziationskonstante ablesen. Der Schnittpunkt der Geraden mit der X-Achse gab die Rezeptorkonzentration in der Einheit $nmol/l$ Ansatzvolumen an und wurde nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor des Zytosols in die Einheit $fmol$ Rezeptor/ mg zytosolisches Protein transformiert. Die Abbildungen 8 und 9 veranschaulichen die Vorgehensweise.

Voraussetzung für die Anwendbarkeit des Scatchard Plots ist, daß im Testansatz eine einheitliche Klasse von Bindungsproteinen vorliegt, an die das Hormon bindet; andernfalls ergeben die ermittelten Daten keine Gerade (KING, 1982; GREEN, LEAKE, 1987). Im vorliegenden Fall wurde der Grad der Übereinstimmung mit der Ideallinie durch das Bestimmtheitsmaß (R^2) überprüft. Bei der Berechnung der Östrogenrezeptorkonzentrationen fanden sich Übereinstimmungen von $R^2 = 0,80 - 0,99$ und bei der Berechnung der Progesteronrezeptorkonzentrationen von $R^2 = 0,80 - 0,98$ (5 Ausnahmen mit $R^2 = \emptyset 0,62$).

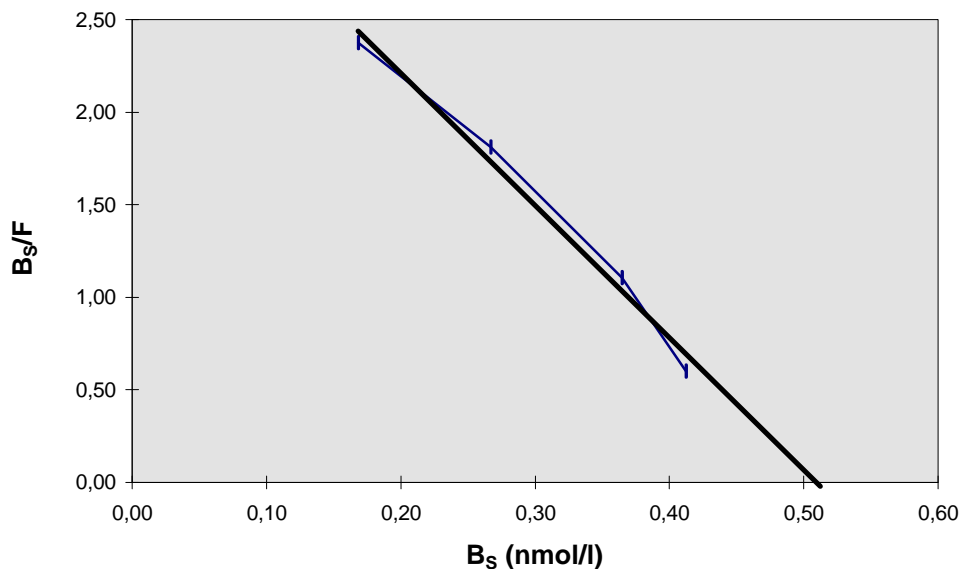


Abb. 8: Scatchard Plot des zytoplasmatischen Östrogenrezeptors am Beispiel der Hündin „Cora“ (Zyklusst. 30. Tag p.ov.); Geradengleichung: $Y = -7,1478 X + 3,6398$ ($R^2 = 0,99$), daraus abgeleitete Assoziationskonstante: $7,1478 \text{ l/nmol}$, Rezeptorkonzentration: $0,51 \text{ nmol/l} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} = 1,53 \text{ nmol/l} = 247,99 \text{ fmol/mg Protein}$

—◆— B_s/F
 ——— Linear (B_s/F)

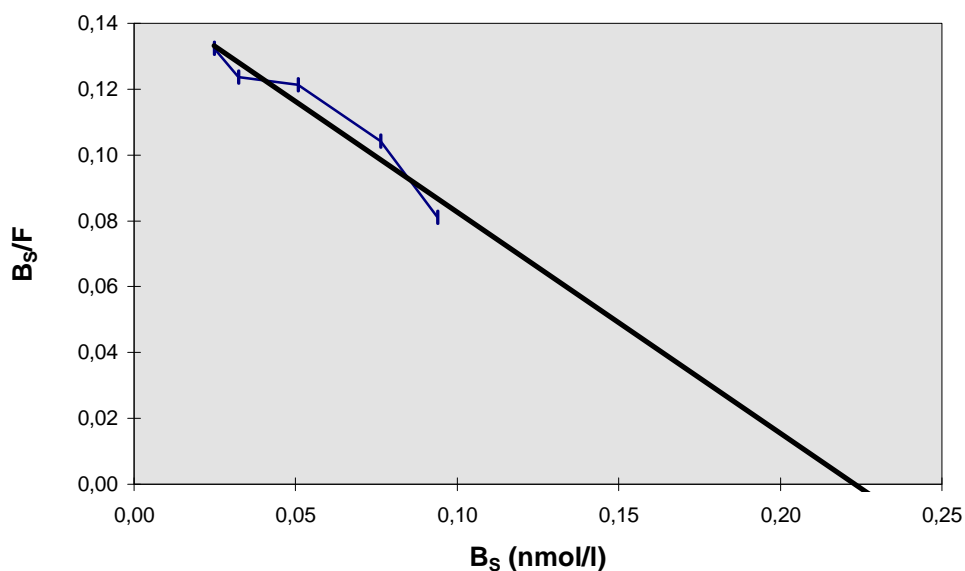


Abb. 9: Scatchard Plot des zytoplasmatischen Progesteronrezeptors am Beispiel der Hündin „Ferdi“ (Zyklusst. 15. Tag p.ov.) Geradengleichung: $Y = -0,6721 X + 0,1499$ ($R^2 = 0,93$), daraus abgeleitete Assoziationskonstante: $0,6721 \text{ l/nmol}$, Rezeptorkonzentration: $0,223 \text{ nmol/l} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} = 0,6691 \text{ nmol/l} = 97,54 \text{ fmol/mg Protein}$

—◆— B_s/F
 ——— Linear (B_s/F)

Anmerkung zur Handhabung des Scatchard Plots:

In Vorversuchen zeigte sich, daß der Scatchard Plot nur unter bestimmten Voraussetzungen verlässliche Ergebnisse liefert. Es wurde ein Kriterienkatalog für den korrekten Einsatz dieser Rechenmethode erstellt, dessen Bedingungen alle gültigen Ergebnisse erfüllen mußten:

1. Im Reaktionsansatz muß ein Sättigungsgleichgewicht eintreten, erkennbar an dem Plateau im oberen Bereich der Sättigungsbindungskurve.
2. Für die Berechnung mittels Scatchard Plot werden nur die Werte im ansteigenden Bereich der Sättigungsbindungskurve verwendet. Werte, die um weniger als 6 % zunehmen, gehen nicht in die Auswertung ein.
3. Der Progesteronrezeptor bindet unter den gegebenen Verhältnissen maximal 15 bis 30 Prozent des angebotenen Hormons (drei Ausnahmen mit 10-14 Prozent). Liegt die relative Bindung über diesem Bereich, so ist in dem Testansatz i.d.R. keine Sättigung erreicht worden. Liegt sie darunter, ist das Zytosol zu stark verdünnt worden und es resultieren sehr variable Ergebnisse. Aus diesen Gründen werden nur die Testansätze verwendet, die zu einer relativen Bindung in dem angegebenen Bereich führen. Für den Östrogenrezeptor gilt analog eine relative Bindung von 65 bis 80 Prozent als Referenzbereich.
4. Die Werte für die Spezifische Bindung (B_S) müssen kontinuierlich ansteigen, gleichzeitig muß sich das Verhältnis von gebundenem zu freiem Hormon (B_S/F) kontinuierlich vermindern. Wird diese Regel durchbrochen, fallen die betroffenen Punkte aus der Auswertung heraus.

3.4.5 Zuverlässigkeit der angewandten Methodik

3.4.5.1 Linearität

Zur Überprüfung der Linearität wurde die Konzentration des Östrogenrezeptors in zwei, die des Progesteronrezeptors in fünf unterschiedlichen Verdünnungsstufen derselben Zytosolprobe gemessen. Die daraus ermittelten Variationskoeffizienten lagen bei 1,3 % für die Bestimmung des Östrogenrezeptors und bei 3,7 % für die Bestimmung des Progesteronrezeptors.

3.4.5.2 Präzision

Zur Überprüfung der Präzision wurden die Konzentration und die Assoziationskonstante der Östrogen- und Progesteronrezeptoren in einer Zytosolprobe sechsmal im gleichen Test gemessen (Intra-assay-Variation). Die Mehrfachbestimmungen ergaben einen Variationskoeffizienten von 5,6 % für die Konzentration des Östrogenrezeptors und von 7,9 % für die des Progesteronrezeptors. Für die Assoziationskonstanten wurden Werte von 9,3 und 8,1 % ermittelt.

Weiterhin wurde eine Zytosolprobe in vier separaten Tests auf die oben genannten Parameter hin untersucht (Inter-assay-Variation). Hierbei ergab sich ein Variationskoeffizient von 15,0 % für die Konzentration des Östrogenrezeptors und von 17,3 % für die des Progesteronrezeptors. Die Variationskoeffizienten für die Assoziationskonstanten lagen bei 22,9 und 26,0 %.

Die Daten sind im Einzelnen den Tabellen 7 und 8 zu entnehmen.

Tab. 7: Mittelwert (X_a), Standardabweichung (SD) und Variationskoeffizient (VK) von Mehrfachbestimmungen (n) der Konzentrationen und der Assoziationskonstanten des Östrogen- und Progesteronrezeptors in einer Zytosolprobe im gleichen Test (Intra-assay-Variation)

Rezeptor	Parameter	n	X_a	SD	VK (%)
Östrogenrezeptor	Rezeptorkonz. (fmol/mg Prot.)	6	2289	128,2	5,6
	Assoziationsk. (l/nmol)	6	2,1	0,2	9,3
Progesteronrezeptor	Rezeptorkonz. (fmol/mg Prot.)	6	921	72,8	7,9
	Assoziationsk. (l/nmol)	6	0,9	0,07	8,1

Tab. 8: Mittelwert (X_a), Standardabweichung (SD) und Variationskoeffizient (VK) von Mehrfachbestimmungen (n) der Konzentrationen und der Assoziationskonstanten des Östrogen- und Progesteronrezeptors in einer Zytosolprobe in vier separaten Tests (Inter-assay-Variation)

Rezeptor	Parameter	n	X_a	SD	VK (%)
Östrogenrezeptor	Rezeptorkonz. (fmol/mg Prot.)	4	2230	335,5	15,0
	Assoziationsk. (l/nmol)	4	2,4	0,5	22,9
Progesteronrezeptor	Rezeptorkonz. (fmol/mg Prot.)	4	774	133,6	17,3
	Assoziationsk. (l/nmol)	4	0,8	0,2	26,0

3.5 Immunhistochemische Untersuchungen

Ziel dieser Untersuchungen war es zunächst, ein geeignetes Testsystem zum immunhistochemischen Nachweis der Östrogen- und Progesteronrezeptoren im Uterus der Hündin zu entwickeln. Über die semiquantitative Bewertung der Rezeptorkonzentration hinaus sollte zusätzlich die Lokalisation der Rezeptoren innerhalb der Zelle und im Gewebe beobachtet werden. Weiterhin sollte überprüft werden, ob die Resultate mit den Ergebnissen des Ligand-Bindungs-Tests korrelieren.

3.5.1 Probenaufbereitung

Wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben, wurde aus beiden Uterushörnern jeweils ein etwa 8 mm breites Segment heraus geschnitten und in eisgekühlter, physiologischer Kochsalzlösung gespült. Daraufhin wurden die Proben in Methylbutan als Kältevermittler, das mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurde, schonend tiefgefroren. Nach zwei bis drei Minuten wurden sie in Aluminiumkapseln überführt, die mit einem Einbettungsmedium (O.C.T.[®]) gefüllt waren. Das Tiefgefrieren der gesamten Proben geschah in Stickstoffdampf (ca. -100°C), woraufhin sie im Hochleistungsgefrierschrank bei -80° C bis zur weiteren Verwendung gelagert wurden.

3.5.2 Anfertigung der histologischen Präparate

3.5.2.1 Objektträgerbeschichtung

Zur besseren Haftung der histologischen Schnitte an den Objektträgern wurden diese mit 0,5 % Chromalaun-Gelatine beschichtet.

Dazu wurden vorgereinigte Objektträger der Reihe nach in Aqua dest., zwei mal in Methanol (100 %) und in drei weiteren Küvetten mit Gelatinelösung getaucht. Wenn die Objektträger sauber und schlierenfrei abfließen, wurden sie zum Trocknen staubfrei weggestellt.

3.5.2.2 Aufziehen der Schnitte auf Objektträger

Da sich sowohl bei den radiobiochemischen als auch bei den immunhistochemischen Vorversuchen keine Unterschiede bezüglich des Rezeptorstatus zwischen dem rechten und dem linken Uterushorn bzw. dem Corpus uteri feststellen ließen, ging von allen Hündinnen jeweils nur ein Uterushorn in die Untersuchung ein.

Von dem gefrorenen Probenmaterial wurden Gefrierschnitte angefertigt. Es wurde bei einer Temperatur von -27°C in der Kryotomkammer und -25°C am Objekthalter gearbeitet.

Von den Probenblöckchen wurde zunächst eine etwa 1 mm dicke Schicht abgetragen, um an unversehrtes Gewebe in der Tiefe zu gelangen. Daraufhin wurden 8 bis 12 Serienschnitte je Probe mit einer Stärke von $9\ \mu\text{m}$ angefertigt und an den vorbereiteten Objektträgern angeschmolzen. Nach einem zweistündigen Trocknungsprozeß bei Raumtemperatur wurden die Schnitte 10 Minuten in reinem Aceton, ebenfalls bei Raumtemperatur, fixiert. Es schloß sich ein Spülvorgang von drei mal fünf Minuten in PBS-Puffer an. Die histologischen Schnitte wurden nach der Fixierung stets sofort weiter verarbeitet, da bereits nach 24-stündiger Lagerung im Kühlschrank die Antigenität abnahm bzw. völlig verloren ging.

3.5.2.3 Prinzip der immunhistochemischen Reaktion und angewandtes Färbeverfahren

Das Prinzip des immunhistochemischen Verfahrens ergibt sich in Kürze wie folgt: Zunächst bindet der Primärantikörper an das gesuchte Antigen im Gewebe. Nach Ablauf der ersten Inkubation und Waschung erfolgt die Zugabe des markierten Sekundärantikörpers, der gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichtet ist und somit die Antigen-Lokalisation markiert (s. Abb. 10, Schritt 1). In den vorliegenden Untersuchungen wurde ein mit Biotin markierter Sekundärantikörper verwendet. Dies erlaubt die Detektion (Farbreaktion) mittels der Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode unter Verwendung des Peroxidase Vectastain[®] ABC-Kits (Vector Laboratories, Inc.). Durch die außergewöhnlich hohe Affinität und Bindungskapazität des Proteins Avidin zu dem niedermolekularen Vitamin Biotin wird an dieser Stelle eine große Anzahl von

Peroxidase-Molekülen eingebracht (s. Abb. 10, Schritt 2), die selbst bei geringen Antigenkonzentrationen eine sichtbare Farbreaktion hervorruft. Die Peroxidase-Enzyme reagieren mit Wasserstoffperoxid und 3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB) zu braunen Farbmolekülen, die am Ort des Antigens präzipitieren und letztendlich seine Lokalisation im Gewebe sichtbar machen.

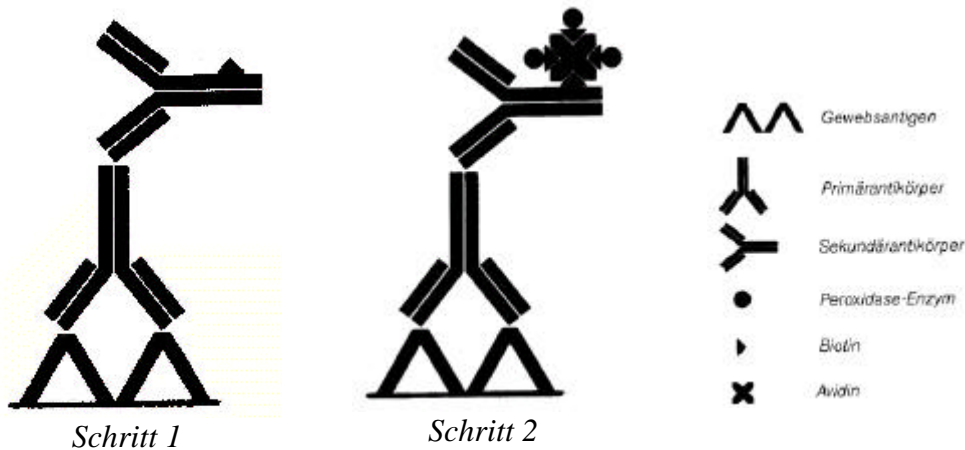


Abb. 10: Schematische Darstellung des immunhistochemischen Antigennachweises mittels Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode
 Schritt 1: Primär- und biotinylierter Sekundärantikörper markieren das Gewebsantigen
 Schritt 2: Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex bindet an Sekundärantikörper

Zur immunhistochemischen Färbung der Präparate wurde nach dem empfohlenen Schema der Firma DAKO Corporation (1989) folgendermaßen vorgegangen:

Alle beschriebenen Schritte wurden in der feuchten Kammer bzw. in einer Küvette bei Raumtemperatur durchgeführt. Einzig der Primärantikörper inkubierte bei 4°C in der feuchten Kammer.

Nach dem Spülvorgang in PBS-Puffer (s. S. 56), der sich - soweit nicht anders erwähnt - in gleicher Weise an jeden weiteren Arbeitsschritt anschloß (s. Übersicht S. 60), wurden die Präparate zur Blockade von endogener Peroxidase 15 Minuten lang in eine 0,3-prozentige H₂O₂-Lösung in PBS-Puffer gestellt. Daraufhin wurden die Schnitte mit 10-prozentigem Pferdeserum in PBS-Puffer für 20 Minuten inkubiert. Dieser Schritt ist nötig, um eine unspezifische Anlagerung der Antikörper an stark geladene Bindegewebelemente der Präparate zu verhindern, die zu einer unerwünschten Hintergrundfärbung führen. Die Lösung wurde lediglich abgesaugt und

ohne weiteren Spülvorgang sofort der Primärantikörper aufgetragen. Dieser inkubierte zunächst 20 Minuten bei Raumtemperatur und danach über Nacht im Kühlschrank (4°C). Anschließend folgte die 30-minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Die ABC-Lösung (Vector Laboratories, Inc.) wurde nach Angaben des Herstellers angesetzt und inkubierte 20 Minuten. Schließlich fand die eigentliche Färbereaktion statt, indem die Schnitte 9 Minuten lang in einer dunklen Kammer der DAB-Lösung ausgesetzt wurden. Zuletzt erfolgte die Gegenfärbung der Präparate mit Hämatoxilin und das Bläuen in fließendem Leitungswasser (Farbumschlag des Hämalauns in Gegenwart von Wasser). Zur Versiegelung wurden die Schnitte mit Glyceringelatine unter einem Deckglas eingedeckt.

Die beschriebene Methode wurde für den Östrogen- und Progesteronrezeptor-Test angewandt; für den Nachweis der Östrogenrezeptoren entfiel jedoch die H₂O₂-Inkubation, da sie sich in Vorversuchen schädlich auf die Anitgenität ausgewirkt hatte.

Eine Übersicht über das immunhistochemische Färbeverfahren gibt das folgende Protokoll:

- 2 h trocknen
- 10 Min. fixieren in Aceton
- 3 x 5 Min. waschen in PBS-Puffer
- 15 Min. H₂O₂-Puffer-Bad (entfällt beim Östrogenrezeptor)
- 3 x 5 Min. waschen in PBS-Puffer
- 20 Min. 10 %-iges Pferdeserum; absaugen
- 20 Min./20 h 1. Antikörper
- 3 x 5 Min. waschen in PBS-Puffer
- 30 Min. 2. Antikörper
- 3 x 5 Min. waschen in PBS-Puffer
- 20 Min. ABC-Lösung
- 3 x 5 Minuten waschen in PBS-Puffer
- 9 Min. DAB-Lösung
- 2 x 5 Min. waschen in Aqua dest.
- 7 Sek. gegenfärben mit Hämatoxilin
- 10 Min. bläuen in Leitungswasser
- eindecken mit Glyceringelatine

3.5.2.4 Verwendete Antikörper

Die optimale Antikörperkonzentration wurde mit Hilfe von Verdünnungsreihen ausgetestet. Es wurde die Verdünnung verwendet, die die größte Intensität der spezifischen Anfärbung und gleichzeitig die geringste Hintergrundfärbung aufwies.

Die Spezifität der Primärantikörper wurde überprüft, indem sie unter standardisierten Versuchsbedingungen an verschiedenen Geweben mit bekanntem Rezeptorgehalt eingesetzt wurden. So fielen Uteruspräparate von Hündinnen, die in den vorausgegangenen biochemischen Untersuchungen als Rezeptor-positiv identifiziert worden waren, auch bei der immunhistochemischen Rezeptordarstellung positiv aus. Dagegen färbten sich histologische Schnitte von quergestreifter Muskulatur und vom Darm, bis auf einige Drüsenanschnitte in der Darmmukosa, nicht an.

Ersetzte man die Primärantikörper durch identische Konzentrationen entsprechender Substitutionsantikörper, so war in verschiedenen bekannt positiven Geweben keine Immunreaktion zu verzeichnen; dabei wurden Antikörper gleichen Isotyps aus der gleichen Tierspezies verwendet. Die Antiseren waren gegen Antigene gerichtet, die in der zu testenden Probe nicht vorkommen.

Folgende Antikörper (Ak) wurden verwendet:

Östrogenrezeptor-Nachweis

1. Ak: monokl. Maus IgG anti hum. Östrogenrez. (Verdünnung 1:40)
2. Ak: biotinyliertes Pferd IgG anti Maus (H + L) (Verdünnung 1:200)

Progesteronrezeptor-Nachweis

1. Ak: monokl. Maus IgG_{2a} anti hum. Progesteronrez. (70,4 ng/ml)
2. Ak: biotinyliertes Pferd IgG anti Maus (H + L) (Verdünnung 1:200)

Substitutions-Antikörper

monokl. Maus IgG₁ anti α -Toxin von Clostridium perfringens (Verdünnung 1:40)

monokl. Maus IgG_{2a}, Klon 07.27 (70,4 ng/ml)

monokl. Maus IgG_{2a}, Klon 7T4-1F5 (70,4 ng/ml)

3.5.2.5 Kontrollen

In jedem Testlauf wurden mehrere Präparate als Kontrollen mitgeführt. Als positive Kontrolle diente Uterusgewebe einer im biochemischen Rezeptornachweis positiven Hündin. Weiterhin wurde von den unbekanntenen Proben ein zusätzlicher Schnitt mit PBS-Puffer anstelle des Primärantikörpers inkubiert (Negativkontrolle). Beim Progesteronrezeptor-Test waren an den äußeren Rändern der Präparate positive Färbungen erkennbar, ansonsten wiesen die negativen Kontrollen bis auf eine ganz dezente Hintergrundfärbung keine Signale auf.

3.5.3 Morphometrische Untersuchung der histologischen Uterusschnitte

Da sich die Durchmesser der Uteri am frischen Material nicht exakt ermitteln ließen, wurden anhand der histologischen Schnitte computergestützte Messungen vorgenommen. Unter Verwendung des Grafikprogrammes *Image Tool* wurden zunächst die Umrisse der Präparate mit der Maus exakt nachgezeichnet. Aus dem so bestimmten Umfang der Probe ermittelte das Programm automatisch die Fläche der Uterusquerschnitte in mm².

Weiterhin wurden die Stärke von Endometrium und Myometrium in µm bestimmt. Auch hierbei wurde mit der Maus die zu messende Strecke markiert und die Länge dieses Abschnittes von dem Programm automatisch angegeben.

3.5.4 Erfassung der Verteilung der Östrogen- und Progesteronrezeptoren im Uterus

Bei der Auswertung wurden fünf Kompartimente des Uterus getrennt berücksichtigt, die bei der Immunreaktion ein unterschiedliches Färbeverhalten gezeigt hatten. So wurden das das Uteruslumen begrenzende Epithel (luminales Epithel), die unmittelbar angrenzenden Drüsenanschnitte (oberflächliche Drüsen) und die Myometrium-nahen Drüsenanschnitte (tiefe Drüsen) sowie die Ring- und die Längsmuskelschicht einzeln beurteilt.

Dabei erfolgte die Bewertung der epithelialen Zonen quantitativ, indem die positiven und negativen Zellkerne ausgezählt und das Verhältnis gebildet wurde. Die Muskulatur und das endometriale Stroma wurden semiquantitativ beurteilt (s. u.).

3.5.4.1 Auswahl der Stichproben und Klassifizierung in positive bzw. negative Zellen

Auswahl des histologischen Präparates:

Von den untersuchten Uterusproben existierten aus technischen Gründen jeweils zwei bis acht Serienschnitte, deren Färbeintensität teilweise inhomogen war. Das Färbemuster, also die Lokalisation der stärker bzw. schwächer gefärbten Bereiche, stimmte jedoch bei den Parallelansätzen grundsätzlich überein. Von jeder Serie wurde daher der erste morphologisch gut erhaltene Schnitt der Auswertung zugeführt.

Festlegung der auszuwertenden Lokalisation im Präparat:

Ein repräsentatives Segment, das etwa ein Viertel des Uterusquerschnittes zeigte, wurde unter Verwendung des Grafikprogrammes *Impac* im Computer abgespeichert. Zum Vergleich wurde das gleiche Segment von der entsprechenden negativen Kontrolle kopiert. Danach wurden bei 200-facher Vergrößerung vom luminalen Epithel, den oberflächlichen und den tiefen Drüsen jeweils drei aufeinander folgende Gesichtsfelder abgespeichert. Jedes dieser Gesichtsfelder enthielt etwa 80 bis 200 Drüsenzellen, so daß pro Kompartiment etwa 240 bis 600 Zellkerne in die Auswertung eingingen. Waren ausnahmsweise in den drei Gesichtsfeldern nicht genügend Zellen enthalten, wurden die sich anschließenden Gesichtsfelder mit einbezogen.

Die beiden Schichten des Myometriums wurden mit jeweils zwei Gesichtsfeldern berücksichtigt, wobei die Serosa miterfaßt wurde.

Klassifizierung:

Die Klassifizierung in immunologisch „positiv“ oder „negativ“ richtete sich ausschließlich nach der Anfärbung des Zellkerns; Hinweise auf eine Färbung des Zytoplasmas sind rein deskriptiv. Bei der Darstellung des Östrogenrezeptors konnte mit dem verwendeten Antikörper lediglich zwischen immunpositiven und immunnegativen Zellkernen differenziert werden. Hingegen war es aufgrund der Art des Färbesignals möglich, bei der Darstellung des Progesteronrezeptors zwischen negativ (-), einer

schwachen bis mittelgradigen Farbintensität (+) und einer starken Farbintensität (++) zu differenzieren.

3.5.4.2 Computergestützte Auswertung von luminalem Epithel, oberflächlichen und tiefen Drüsen

Die Auszählung der positiven und negativen Zellkerne fand am Computer mit Hilfe des Grafikprogrammes *Image Tool* statt, das unter anderem die Markierung und Zählung von Objekten in einem gespeicherten Bild erlaubte. Das Programm bot weiterhin eine Grauwertskala, mit der die Farbdichte einer Fläche objektiv beurteilt werden konnte. Die positiven Zellkerne zeigten eine hell- bis dunkelbraune Färbung, die auf der Grauwertskala mit einem Wert von 0 bis 100 ausgewiesen wurde. Die negativen Kerne dagegen waren durch die Gegenfärbung mit Hämatoxin blaßblau angefärbt und besaßen auf der Skala entsprechend einen Wert von mehr als 100.

Mit dem Befehl „*Count and Tag*“ wurden per Mausklick alle zu zählenden Zellkerne durch einen farbigen Punkt markiert und deren Anzahl gespeichert. Nachdem alle positiven Kerne markiert waren, wurde das Zwischenergebnis notiert und mit der Zählung der negativen Kerne fortgefahren. Aus den drei Gesichtsfeldern wurde der Mittelwert gebildet und zuletzt der Anteil positiver bzw. negativer Zellkerne an der Gesamtzahl erfaßter Kerne je Kompartiment berechnet.

3.5.4.3 Semiquantitative Auswertung von Stroma, Myometrium und Serosa

Die semiquantitative Auswertung positiv gefärbter Zellkerne in Ring- und Längsmuskelschicht, Gefäßschicht und Serosa erfolgte anhand einer Skala von 1 (negativ) bis 5 (stark positiv). Die genannten Kompartimente ließen sich aufgrund homogener Reaktionsmuster mehr oder weniger einheitlich klassifizieren. Das endometriale Stroma zeigte dagegen insbesondere beim Progesteronrezeptor-Nachweis sehr differenzierte Immunreaktionen in Bezug auf Lokalisation und Intensität der Färbung, was zusätzlich berücksichtigt wurde.

3.6 Statistik

Die Hormonwerte und biochemisch ermittelten Rezeptorkonzentrationen im Verlauf des Zyklus folgten keiner Normalverteilung, weshalb für die weitere Auswertung die geometrischen Mittelwerte (X_g) und die Streufaktoren (SF) berechnet wurden. Ebenso wurde bei der Assoziationskonstanten des Progesteronrezeptors vorgegangen. Dagegen zeigten die Assoziationskonstante des Östrogenrezeptors sowie die Ergebnisse der morphometrischen Studien (Uterusgröße und -gewicht, Schichtdicke) Normalverteilungen, so daß hier die arithmetischen Mittelwerte (X_a) einschließlich ihrer Standardabweichungen (SD) bestimmt wurden.

Bei der Verteilung der Östrogen- und Progesteronrezeptoren im Endometrium wurden zunächst relative Häufigkeiten berechnet, die aufgrund ihrer links- bzw. rechtsschiefen Verteilung mit Hilfe der Arcus-Sinus-Transformation normalisiert werden mußten (SACHS, 1992). Im Ergebnisteil wurden jeweils der Median nach Rücktransformation (X_m) und die Spannweiten in Form des kleinsten und größten Meßwertes (Min/Max) in Prozent angegeben.

Der Einfluß des Zyklusstadiums auf die untersuchten Parameter (s. Tab. 10) wurde mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse untersucht. Weiterhin wurde der Zusammenhang zwischen den Estradiol- und Progesteronkonzentrationen im Blut einerseits und den uterinen Rezeptorkonzentrationen andererseits durch Berechnung der Kreuz-Korrelation überprüft.

In einigen Fällen kam der t-Test zur Feststellung von Unterschieden im Rezeptorgehalt zwischen den Zellpopulationen im Uterus zur Anwendung (SACHS, 1992).

Alle Berechnungen wurden am Personal Computer (Pentium) mit dem Programm *Excel 4.0* unter *Windows 95/NT 4.0* durchgeführt und fanden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Universität Gießen (Dr. Failing) statt. Dort wurde insbesondere für die Varianzanalyse und die Arcus-Sinus-Transformation das Statistikprogramm BMDP / Dynamic, Release 7.0 (DIXON, 1993) eingesetzt.

3.7 Reagentien und Materialien

3.7.1 Reagentien und Materialien für die biochemischen Untersuchungen

Stammpuffer

200 mM Tris HCl [Tris(hydroxymethyl)-aminomethane • HCl] (Serva)

15 mM NaN₃ [Natriumacid] (Merck)

in Aqua dest.

pH 7,7 bei 20°C (mit 2n Natronlauge einstellen)

Homogenisierungspuffer

1 mM MgCl₂ • 6 H₂O [Magnesiumchloridhydrat] (Sigma)

250 mM Sucrose (Serva)

10 % Glycerin (v/v) (Serva)

10 % Stammpuffer (v/v)

1 mM DTT [1,4-Dithiothreitol] (am Tag des Tests zusetzen) (Serva)

in Aqua dest.

pH 7,4

HED-Puffer

20 mM Hepes Puffer, 1M (Sigma)

1,5 mM EDTA [Ethylendiamintetraessigsäure] (Serva)

0,25 mM DTT [1,4-Dithiothreitol] (am Tag des Tests zusetzen) (Serva)

in Aqua dest.

pH 7,4 (mit 2N NaOH einstellen)

HED-Puffer + Glycerin

HED-Puffer

10 % Glycerin (v/v) (Serva)

Holzkohlesuspension

0,25 %	Norit A	(Serva)
0,025 %	Dextran T-70	(Serva)
10 %	Glycerin (v/v)	(Serva)

in HE-Puffer (wie HED-Puffer, jedoch ohne Dithiothreitol)

Steroidhormone

2,4,6,7- ³ H-Estradiol, (3,3 TBq/mmol)	(NEN Life Science Products, Köln)
Diethylstilbestrol (DES)	(Sigma)
17 α -Methyl- ³ H-Promegeston -(R5020), (3,21 TBq/mmol)	(NEN Life Science Products, Köln)
Promegeston (R5020)	(NEN Life Science Products, Köln)
Cortisol	(Paesel)
Dihydroxytestosteron	(Paesel)

Sonstige Substanzen

Eukitt	(Hecht-Mertens, Kiel)
Methanol	(Merck)
Szintillatorflüssigkeit : Aquasafe 300 Plus	(Zinsser)
Coomassie [®] Protein Assay Reagent	(Pierce)
BSA [bovines Serumalbumin], 98-99% Albumin,	(Sigma)

Geräte

Homogenisierung: Ultra-Turrax	(Janke-Kunkel)
Ultrazentrifugation: Ultrazentrifuge TGA-65	(Kontron)
Flüssigszintillation: Liquid Szintillation System LS 5000 TD	(Beckmann)

3.7.2 Reagentien und Materialien für die immunhistochemischen Untersuchungen

0,5 %-ige Chromalaun-Gelatine

3 g	Gelatine	(handelsüblich aus dem Supermarkt)
0,3 g	KCr (SO ₄) ₂ • 12H ₂ O [Kaliumchrom III sulfat-Dodecahydrat]	(Fluka)
600 ml	Aqua dest.	

Die Gelatine wurde in Aqua dest. bei 50° C aufgelöst. Danach wurde das Chromalaun zugegeben, gut durchmischt und die Lösung durch Faltenfilter filtriert.

PBS-Puffer (0,01 M)

1,48 g	Na ₂ HPO ₄ [di-Natriumhydrogenphosphat]	(Merck)
0,43 g	KH ₂ PO ₄ [Kaliumdihydrogenphosphat]	(Fluka)
7,20 g	NaCl [Natriumchlorid]	(Merck)
1000 ml	Aqua dest.	
pH 7,2		

0,3 %-ige H₂O₂-Lösung

2,5 ml	H ₂ O ₂ [Wasserstoffperoxid] (30 % ig)	(Sigma)
250 ml	PBS-Puffer	

10 %-iges Pferdeserum

Serum von Pferden der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Gross- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz in Gießen wurde im Wasserbad bei 56°C innerhalb von 30 Minuten inaktiviert (DAKO Corporation, 1989). Die Aufbewahrung erfolgte bei -20°C. Vor Gebrauch wurde das Serum mit PBS-Puffer 1:10 verdünnt.

ABC-Lösung

Peroxidase Vectastain® ABC-Kit	(Vector Laboratories, Inc.)
9 µl	Komponente A
9 µl	Komponente B
1 ml	PBS-Puffer (30 Min. vor Gebrauch ansetzen)

Imidazol-Puffer

8,51 g	Imidazol	(Fluka)
1925 ml	Aqua dest.	
ca. 60 ml	1N HCl	(Fluka)

Das Imidazol wurde in Aqua dest. gelöst und Salzsäure bis zum Erreichen eines pH-Wertes von 7,08 zugesetzt.

DAB-Lösung

100 mg	DAB [3,3`-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid]	(Fluka)
200 ml	Imidazol-Puffer	
70 µl	H ₂ O ₂ (30 %-ig)	(Sigma)

Das DAB wurde in Imidazol-Puffer gelöst, die Lösung durch ein Faltenfilter filtriert und zuletzt das H₂O₂ zugegeben. Die Lösung wurde stets unmittelbar vor dem Gebrauch angesetzt.

Antikörper

monokl. Maus IgG anti hum. Östrogenrezeptor	(Loxo 6F11)
monokl. Maus IgG _{2a} anti hum. Progesteronrezeptor, Klon 10A9	(Immunotech 1408)
biot. Pferd IgG anti Maus	(Vector BA-2000)
monokl. Maus IgG ₁ anti α-Toxin von Clostr. perfr.	(Geschenk von Fr. Dr. Schoepe, Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der JLU Gießen)
monokl. Maus IgG _{2a} ; Klon 07.27	(Immunotech 0572)
monokl. Maus IgG _{2a} ; Klon 7T4-1F5	(Immunotech)

Sonstige Substanzen

Methanol, reinst, 99,8 %-ig	(Merck)
Aceton, reinst	(Merck)
2-Methylbutan	(Roth)

Tissue Tek [®] O.C.T. Compound	(Sakura Finetek Europe B.V.)
Faltenfilter, 15 cm	(Schleicher & Schüll)
Objektträger, gereinigt, 76 x 26 x 1 mm	
Deckgläser, 24x50 mm und 24x60 mm	(Menzel-Gläser)
Hämatoxylinlösung S für Färbungen nach Papanicolaou	(Merck)
Kaisers Glyceringelatine	(Merck)

Geräte

Kryotom: 2800 Frigocut-E	(Reichert Jung)
Mikroskop: Leitz DM-RB	(Leica)
Color Video Camera: CCD-IRIS, Modell DXC-107AP	(Sony)
Kontroll Monitor: Trinitron Color Video Monitor, PVM-1450QM	(Sony)
Camera Adapter: Modell CMA-D7CE	(Sony)
Personal Computer: Intel Pentium 233 MHz, 96 MB RAM	

Software

Windows 95/NT 4.0	(Microsoft)
Excel für Windows	(Microsoft)
Word für Windows	(Microsoft)
Impac 4.0	(ViDiSys Bildanalyse GmbH)
Image Tool 2.0	(Uthscsa)

4. ERGEBNISSE

Insgesamt standen für die Versuche 20 Hündinnen, und damit drei bis vier Tiere je Zyklusstadium zur Verfügung. Tabelle 9 gibt einen Überblick über die Anzahl der auf die einzelnen Zyklustage und Messparameter fallenden Tiere.

Tab. 9: Übersicht über die durchgeführten Versuche

Zyklusstadium*	15	30	45	60	75	110
Parameter:	Anzahl der Versuchstiere:					
Estradiol-17 β im Blutplasma	3	4	3	3	4	2
Progesteron im Blutplasma	3	4	3	3	4	3
zytosol. Östrogenrezeptorkonzentration u. Assoziationskonstante im Uterus	3	4	3	3	4	3
zytosol. Progesteronrezeptorkonzentration u. Assoziationskonstante im Uterus	3	4	3	3	4	3
Uterusgröße und -gewicht	3	4	3	3	4	3
Proliferationsgrad des Uterus	3	4	3	3	4	2
Verteilung der Östrogenrezeptoren im Uterus	3	4	3	3	4	2
Verteilung der Progesteronrezeptoren im Uterus	3	3	3	3	3	2

*Zyklusstadium

15: 15. Tag p.ov., früher Diöstrus
30: 30. Tag p.ov., mittlerer Diöstrus
45: 45. Tag p.ov., mittlerer Diöstrus
60: 60. Tag p.ov., später Diöstrus
75: 75. Tag p.ov., später Diöstrus
110: 110. Tag p.ov., Anöstrus

4.1 Verlauf der Estradiol-17 β - und der Progesteronkonzentrationen im Blutplasma während des Diöstrus und frühen Anöstrus

Unmittelbar vor der Ovariohysterektomie wurde den Hündinnen eine Blutprobe entnommen und deren Estradiol-17 β - und Progesteronkonzentration bestimmt. Es ergaben sich jeweils physiologische Werte, die mit den Literaturangaben übereinstimmten (HOFFMANN et al., 1992, 1996).

Für beide Hormone ergaben sich weiterhin signifikante Beziehungen zum Zyklusstadium. Die Estradiol-17 β -konzentrationen lagen im frühen Diöstrus bei 34,51 pmol/l, stiegen im mittleren Diöstrus auf durchschnittlich 72,95 pmol/l an und fielen ab dem 60. Tag p.ov. auf Ausgangswerte zurück. Die Abhängigkeit vom Zyklusstadium war signifikant mit $p < 0,05$.

Für den Verlauf der Progesteronkonzentrationen war die Beziehung zum Zyklusstadium mit $p < 0,0001$ hochsignifikant. Die Konzentrationen fielen erwartungsgemäß im frühen und mittleren Diöstrus von 105,2 nmol/l auf 12,08 nmol/l ab und gingen schließlich auf Basalwerte von durchschnittlich 2,14 nmol/l zurück. Tabelle 10 faßt die durchschnittlichen Hormonkonzentrationen für jedes erfaßte Zyklusstadium zusammen; die Einzelergebnisse finden sich im Anhang (Tab.19; S. 141).

Tab. 10: Durchschnittliche (X_g ; SF) Estradiol-17 β - und Progesteronkonzentrationen im peripheren Blut der untersuchten Hündinnen im Verlauf des Diöstrus und frühen Anöstrus

Zyklusstadium	Estradiol-17 β (pmol/l Plasma)		Progesteron (nmol/l Plasma)	
	X_g	SF	X_g	SF
15. Tag	34,51	1,34	105,20	1,08
30. Tag	58,35	1,50	86,50	1,47
45. Tag	72,95	1,54	41,50	1,25
60. Tag	49,77	1,11	12,08	1,58
75. Tag	33,27	1,62	6,61	1,41
110. Tag	(25,57)	(22,8/28,3) ¹⁾	2,14	1,48

X_g : geometrischer Mittelwert
SF: Streufaktor

¹⁾ 2 Werte, s. Tab. 9

4.2. Proteingehalt im Zytosol

Aus der Proteinbestimmung im Zytosol, das aus dem Homogenat des gesamten Uterusquerschnittes (Endometrium und Myometrium) gewonnen wurde, errechnete sich ein durchschnittlicher Proteingehalt von $5,83 \pm 0,73$ mg/ml Zytosol. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Hinweise auf zyklusabhängige Schwankungen der Proteinkonzentration.

4.3 Ergebnisse der biochemischen Untersuchungen

4.3.1 Konzentration und Assoziationskonstante des Östrogenrezeptors im caninen Uterus während des Diöstrus und frühen Anöstrus

In den Zytosolproben wurden Konzentration und Assoziationskonstante des Östrogenrezeptors mittels Radioligand-Bindungs-Test (s. Kap. 3.4.2 und 3.4.4) ermittelt. Die entsprechenden Sättigungskurven und Scatchard Plots werden hier nicht im Einzelnen aufgeführt, die resultierenden Daten befinden sich im Anhang (Tab. 20). Tabelle 11 gibt die Ergebnisse als Durchschnittswerte für jedes erfaßte Zyklusstadium wieder.

Tab. 11: *Konzentration und Assoziationskonstante des Östrogenrezeptors im caninen Uterus während des Diöstrus und frühen Anöstrus*

Zyklusstadium	Östrogenrezeptor (<i>fmol/mg zytosol. Protein</i>)		Assoziationskonstante (<i>l/nmol</i>)	
	X_g	SF	X_a	SD
15. Tag	590,20	1,22	5,867	3,027
30. Tag	211,35	1,33	8,331	2,598
45. Tag	248,31	1,16	9,557	2,424
60. Tag	302,69	1,48	8,734	0,885
75. Tag	762,08	1,27	9,282	1,906
110. Tag	1013,91	1,27	7,968	2,613

X_g : geometrischer Mittelwert
SF: Streufaktor

X_a : arithmetischer Mittelwert
SD: Standardabweichung

Für die Konzentrationen des Östrogenrezeptors ergaben sich hochsignifikante Abhängigkeiten vom Zyklusstadium ($p < 0,0001$). So ließ sich vom Tag 15 auf Tag 30 p.ov. ein Rückgang der Rezeptorkonzentrationen um den Faktor 2,8 verzeichnen, worauf das niedrige Niveau bis zum späten Diöstrus (Tag 60 p.ov.) erhalten blieb. Daraufhin stiegen die Rezeptorgehalte erneut auf Werte an, die am Tag 75 p.ov. 1,3-fach und im Anöstrus (Tag 110 p.ov.) 1,7-fach über den Ausgangswerten vom 15. Tag p.ov. lagen.

Die Assoziationskonstante des Östrogenrezeptors zeigte dagegen keine zyklusabhängigen Schwankungen ($p = 0,455$); sie hatte einen durchschnittlichen Wert von $8,29 \pm 1,33$ l/nmol.

Die Östrogenrezeptoren sind während des Sexualzyklus demnach einer Dynamik unterworfen, die durch die Variation der Rezeptorkonzentration, nicht aber durch Änderungen der Affinität des Hormons zum Rezeptor zustande kommt.

4.3.2 Konzentration und Assoziationskonstante des Progesteronrezeptors im caninen Uterus während des Diöstrus und frühen Anöstrus

Konzentration und Assoziationskonstante des Progesteronrezeptors wurden analog zum Östrogenrezeptor ermittelt (s. Kap. 3.4.2 und 3.4.4). Die Ergebnisse sind als Durchschnittswerte für jedes erfaßte Zyklusstadium der Tabelle 12 zu entnehmen (s. auch Tab. 20 im Anhang).

Tab. 12: *Konzentration und Assoziationskonstante des Progesteronrezeptors im caninen Uterus während des Diöstrus und frühen Anöstrus*

Zyklus- stadium	Progesteronrezeptor (<i>fmol/mg zytosol. Protein</i>)		Assoziationskonstante (<i>l/nmol</i>)	
	X _g	SF	X _g	SF
15. Tag	132,13	1,84	0,883	1,29
30. Tag	38,55	1,20	0,828	1,39
45. Tag	62,81	1,53	2,275	2,07
60. Tag	274,16	1,18	2,028	1,66
75. Tag	401,79	1,08	1,462	1,23
110. Tag	467,74	1,23	0,995	1,46

X_g: geometrischer Mittelwert
SF: Streufaktor

Auch für die Konzentrationen des Progesteronrezeptors waren hochsignifikante Unterschiede ($p < 0,0001$) in Abhängigkeit vom Zyklusstadium festzustellen, wobei die Rezeptordynamik eine weitgehende Übereinstimmung mit dem Verlauf der Östrogenrezeptoren zeigte. So war von Tag 15 auf Tag 30 p.ov. ein Abfall der Progesteronrezeptorkonzentrationen auf etwa ein Drittel zu beobachten. Bereits am 60. Tag p.ov. fand - früher als für die Östrogenrezeptoren erkennbar - ein Anstieg auf das Vierfache und am 75. Tag p.ov. ein weiterer Zuwachs um den Faktor 1,5 statt.

Für die Assoziationskonstante des Progesteronrezeptors ließ sich bei einer relativ großen Schwankungsbreite ebenfalls eine gewisse Abhängigkeit vom Zyklusstand feststellen ($p < 0,05$), wobei an den Tagen 15 und 30 p.ov. die niedrigste und an den Tagen 45 und 60 p.ov. die höchste Affinität ermittelt wurde. Die Assoziationskonstante lag im Durchschnitt bei $1,41 \pm 0,62$ l/nmol.

Die Ergebnisse bestätigen eine zyklusabhängige Dynamik des Progesteronrezeptors, die in erster Linie durch die Variation seiner Konzentration, möglicherweise aber auch durch Änderungen seiner Affinität hervorgerufen wird.

4.3.3 Zusammenhang zwischen dem Hormonspiegel im peripheren Blut und der Rezeptorkonzentration im Uterus

In den Abbildungen 11 und 12 ist der Verlauf der uterinen Rezeptorkonzentrationen dem Verlauf der Steroidhormonkonzentrationen im peripheren Blut gegenüber gestellt.

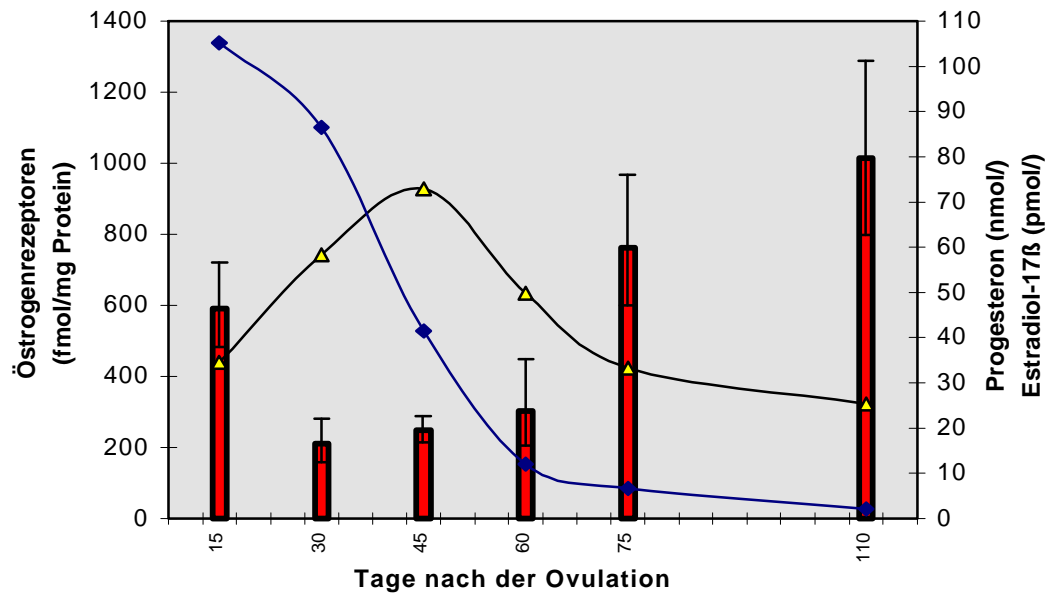


Abb. 11: Verlauf der mittleren uterinen Östrogenrezeptorkonzentrationen (X_g , SF) und der durchschnittlichen Konzentrationen von Progesteron und Estradiol-17b im Plasma im Diöstrus und frühen Anöstrus

- Rezeptorkonzentration (fmol/mg Protein)
- ▲ Estradiol-17b (pmol/l)
- ◆ Progesteron (nmol/l)

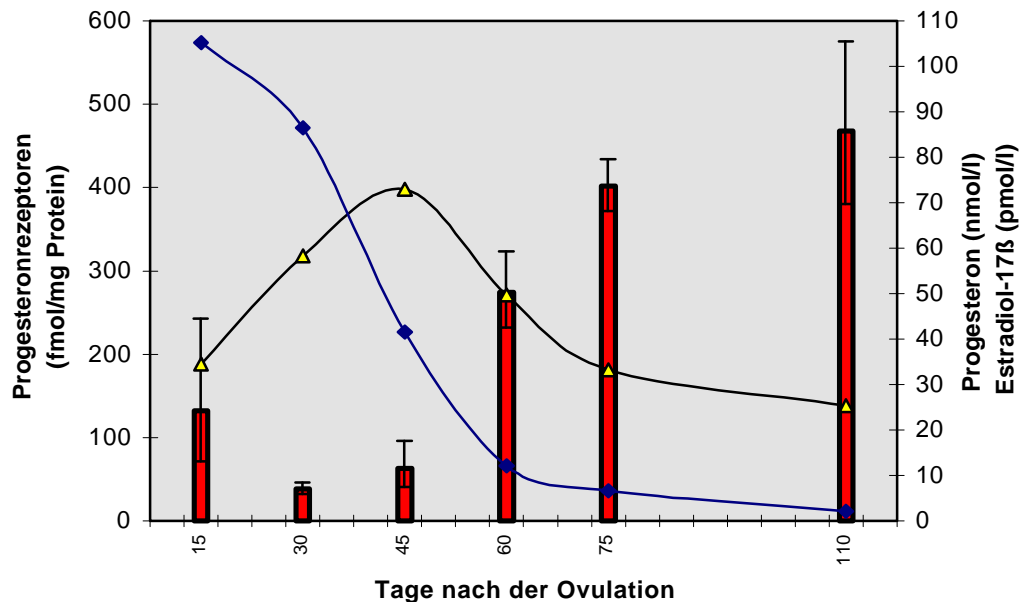


Abb. 12: Verlauf der mittleren uterinen Progesteronrezeptorkonzentrationen (X_g , SF) und der durchschnittlichen Konzentrationen von Progesteron und Estradiol-17b im Plasma im Diöstrus und frühen Anöstrus

- Rezeptorkonzentration (fmol/mg Protein)
- ▲ Estradiol-17b (pmol/l)
- ◆ Progesteron (nmol/l)

Der Abfall der Progesteronrezeptorkonzentrationen vom 15. auf den 30. Tag p.ov. ging einher mit einem Rückgang der Progesteronkonzentrationen im Plasma. Bei weiterhin abnehmenden Plasmaprogesteronwerten von 86,5 nmol/l am Tag 30 p.ov. auf 41,5 nmol/l am Tag 45 p.ov. behielten die Rezeptorkonzentrationen ihren Tiefstand bei. Während die Progesteronkonzentration im Plasma am Tag 60 p.ov. das Basalniveau erreicht hatte, stieg der Gehalt an Progesteronrezeptoren zu diesem Zeitpunkt erneut deutlich an. Die Konzentrationsänderungen des Östrogenrezeptors wiesen einen ähnlichen Verlauf auf ($r = 0,85$; $p < 0,001$), allerdings erfolgte nach dem Erreichen der Basalwerte ein Anstieg erst wieder ab Tag 75 p. ov.. Im Anöstrus wiesen sowohl der Progesteron- als auch der Östrogenrezeptor unter basalen Hormonkonzentrationen maximale Konzentrationen auf.

Der Verlauf der Progesteronspiegel im Plasma und der Östrogen- bzw. Progesteronrezeptorkonzentrationen im Uterus waren mit $r = -0,43$ (ÖR) und $r = -0,79$ (PR) negativ korreliert und mit $p < 0,01$ für den Progesteronrezeptor signifikant. Für den Zeitraum vom 45. bis 110. Tag p.ov. war die Korrelation mit $r = -0,76$ (ÖR) und $r = -0,97$ (PR) für beide Rezeptoren mit $p < 0,01$ bzw. $p < 0,001$ signifikant.

Auch für den Verlauf der Estradiolwerte im Plasma ließ sich ab Tag 45 p.ov. eine negative Korrelation von $r = -0,9$ zum Verlauf der Östrogen- und von $r = -0,79$ zum Verlauf der Progesteronrezeptorkonzentrationen feststellen. Die Korrelationen waren mit $p < 0,001$ (ÖR) bzw. $p < 0,01$ (PR) signifikant.

4.4 Ergebnisse der morphometrischen Untersuchungen

4.4.1 Größe und Gewicht des Uterus im Verlauf des Diöstrus und frühen Anöstrus

Unmittelbar nach Exstirpation der Uteri wurden Messungen und Wägungen durchgeführt, wobei die Fläche der Uterusquerschnitte nachträglich anhand der histologischen Präparate mit Hilfe eines Grafikprogrammes am Computer ermittelt wurde (s. Kap. 3.5.3). Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 zusammengefaßt (s. auch Tab. 21 im Anhang).

Tab. 13: *Durchschnittlicher Verlauf (X_a ; SD) von Gewicht, Länge und Fläche des caninen Uterus im Verlauf des Diöstrus und frühen Anöstrus*

Zyklus- stadium	Gewicht (g)		Länge (cm)		Fläche (im Querschnitt) (mm ²)	
	X_a	SD	X_a	SD	X_a	SD
15. Tag	31,83	6,77	17,67	1,53	72,73	7,62
30. Tag	24,88	2,34	16,50	1,73	66,43	9,44
45. Tag	18,24	3,29	15,67	2,51	68,63	15,28
60. Tag	20,78	9,20	13,67	4,04	66,35	3,04
75. Tag	13,61	1,92	17,50	3,70	49,78	5,64
110. Tag	7,33	3,33	14,33	2,52	26,20	12,16

X_a : arithmetischer Mittelwert

SD: Standardabweichung

Für Gewicht und Fläche ergaben sich hochsignifikante Beziehungen zum Zyklusstadium ($p < 0,001$ bzw. $p < 0,01$). So ging das Uterusgewicht im Untersuchungszeitraum bei einem Ausgangsgewicht von durchschnittlich etwa 32 g im frühen Diöstrus auf ca. 7 g im frühen Anöstrus zurück. Die Fläche des Uterus nahm von 72,7 mm² am 15. Tag p.ov. auf 26,2 mm² am 110. Tag p.ov. ab. Die Länge der untersuchten Uteri ließ mit durchschnittlich 15,9 cm keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Zyklusstadien erkennen.

4.4.2 Proliferationsgrad des Uterus im Verlauf des Diöstrus und frühen Anöstrus

An den Gefrierschnitten wurde mit Hilfe eines Grafikprogrammes die Stärke von Endometrium und Myometrium gemessen (s. Kap. 3.5.3). Die Ergebnisse sind als Durchschnittswerte für die erfaßten Zyklustage in der Tabelle 14 aufgeführt, in Tabelle 21 im Anhang finden sich die Einzelwerte.

Tab. 14: *Durchschnittlicher Verlauf (X_a ; SD) der Stärke von Endometrium und Myometrium des caninen Uterus im Verlauf des Diöstrus und frühen Anöstrus*

Zyklus- stadium	Endometrium		Myometrium	
	X_a (μm)	SD	X_a (μm)	SD
15. Tag	1838	179	3284	151
30. Tag	1788	545	2757	326
45. Tag	1610	491	2405	210
60. Tag	1373	292	2631	163
75. Tag	1355	246	1510	403
110. Tag	822	185	1002	169

X_a : arithmetischer Mittelwert

SD: Standardabweichung

Mit $p < 0,0001$ ergaben sich hochsignifikante Zusammenhänge zwischen dem Verlauf des Zyklus und der Verschmälerung des Myometriums von $3284 \pm 151 \mu\text{m}$ am Tag 15 p.ov. auf $1002 \pm 169 \mu\text{m}$ am Tag 110 p.ov.. Obwohl auch die Stärke des Endometriums im gleichen Zeitraum von $1838 \pm 179 \mu\text{m}$ auf $822 \pm 185 \mu\text{m}$ abnahm, ergab sich hier mit $p = 0,082$ keine Signifikanz. Allerdings war die Größenentwicklung von Endometrium und Myometrium über den erfaßten Zeitraum mit $r = 0,896$ hochsignifikant ($p < 0,001$) korreliert.

4.5 Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen

Es lagen histologische Präparate von 19 Uterusproben aus sechs unterschiedlichen Zyklusstadien zur Untersuchung auf Östrogenrezeptoren und 17 Proben zur Untersuchung auf Progesteronrezeptoren vor (s. Tab. 9).

In den Drüsenepithelien des Endometriums fanden gravierende Veränderungen der Rezeptordichte in Abhängigkeit vom Zyklusstadium statt, während Myometrium, Gefäßschicht und Serosa im gesamten Untersuchungszeitraum ein eher einheitliches Bild ergaben. Entsprechend erfolgte die Auswertung wie in Kapitel 3.5.4 beschrieben.

4.5.1 Konzentration und Verteilung von Östrogenrezeptoren im caninen Uterus

4.5.1.1 Luminales Epithel

Positive Reaktionen waren durch einen gering- bis mittelgradigen granulierten Niederschlag des DAB in den Zellkernen nachzuweisen, der sich häufig nur auf einen Teil des Kernes erstreckte. Bei einigen Präparaten war auch eine leichte diffuse Färbung des Zytoplasmas festzustellen.

Es lagen hochsignifikante ($p < 0,001$) Zusammenhänge zwischen dem Zyklusstadium und der prozentualen Verteilung der Östrogenrezeptoren vor. Wie aus Tabelle 15 (S. 84) hervorgeht, fiel der Anteil Östrogenrezeptor-positiver Zellkerne im luminalen Epithel von 10,5 % am Tag 15 p.ov. auf 0,25 % am Tag 30 p.ov. ab; zu diesem Zeitpunkt konnten nur vereinzelte immunpositive Zellkerne ausgemacht werden. Danach erfolgte ein Anstieg der Östrogenrezeptorkonzentration, wobei mit fast 90 % immun-positiver Zellkerne im frühen Anöstrus (Tag 110 p.ov.) der höchste Anteil gemessen wurde (s. Abb. 13; S. 95).

Bei Betrachtung der Spannweiten (s. Tab. 15, Spalten Min/Max) fallen allerdings z. T. starke individuelle Variationen auf, so vor allem an den Tagen 45 und 60 p.ov.. Hier lagen die Ergebnisse in einem Bereich von 4 bis 41 % am Tag 45 p.ov. bzw. von 6 bis 76 % am Tag 60 p.ov.. Bei den Untersuchungsgruppen Tag 75 und 110 p.ov. ergab sich mit relativ geringen Spannweiten wieder eine eher homogene Situation (s. Tab. 22 im Anhang).

4.5.1.2 Oberflächliche Drüsen

Auch hier zeigten sich positive Immunreaktionen durch eine leichte bis mittelgradige, granuliert Braunfärbung der Zellkerne. Das Zytoplasma blieb davon - bis auf wenige Ausnahmen - unberührt.

Die festgestellten Veränderungen in der Expression der nukleären Rezeptoren wiesen hochsignifikante ($p < 0,0001$) Beziehungen zum Zyklusstadium auf und entsprachen weitgehend denen im luminalen Epithel ($r = 0,851$; $p < 0,001$). Wie Tabelle 15 (S. 84) zeigt, kam es auch hier zunächst zu einem Abfall der Rezeptor-positiven Zellkerne von 6,12 % am 15. Tag p.ov. auf 3,68 % am 30. Tag p.ov.. Es folgte ein rascher Anstieg, wobei mit 99,7 % Rezeptor-positiver Zellkerne am Tag 60 p.ov. ein danach nicht mehr erreichtes mittleres Maximum (X_m) gemessen wurde; am Tag 110 p.ov. lag der errechnete Durchschnittswert bei 93,5 % (s. Abb. 13).

Individuelle Variationen traten auch hier an den Zyklustagen 45 und 60 p.ov. auf. Am 45. Tag p.ov. lagen die Einzelwerte bei 2, 3 und 27 % positiver Messpunkte und am 60. Tag p.ov. bei 70, 99 und 100 % (s. Tab. 22 im Anhang).

4.5.1.3 Tiefe Drüsen

Für die tiefen Drüsen ergab die einfaktorielle Varianzanalyse mit $p = 0,0683$ keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der Expression des nukleären Östrogenrezeptors und dem Zyklusstadium. Mit $r = 0,515$ ($p < 0,05$) und $r = 0,459$ ($p > 0,05$) waren auch keine gesicherten Zusammenhänge zum Verlauf der Östrogenrezeptor-positiven Zellkerne im luminalen Epithel und in den oberflächlichen Drüsen festzustellen. Am Tag 15 p.ov. war der Anteil von ca. 90 % Östrogenrezeptor-positiver Zellkerne mit jeweils $p < 0,001$ hochsignifikant höher als im luminalen und im oberflächlichen Drüsenepithel (vergl. Abb. 13; S. 95 u. Abb. 14; S. 97). Ebenso waren am Tag 30 p.ov. die Unterschiede zu den zentral gelegenen Drüsenbereichen mit $p < 0,01$ signifikant. Bei insbesondere an den Tagen 30 und 45 p.ov. stark variierenden Einzelwerten (s. Tab. 22 im Anhang) zeigte sich allerdings auch hier der Tendenz nach ein Abfall von Tag 15 auf Tag 30 p.ov., gefolgt von einem erneuten Anstieg ab Tag 60 p.ov., der sich bis zum frühen Anöstrus (110. Tag p.ov.) fortsetzte (s. Tab. 15 u. Abb. 14).

Tab. 15: Durchschnittlicher prozentualer Anteil (X_m ; Min/Max) Östrogenrezeptor-positiver Zellkerne im caninen Endometrium im Verlauf des Diöstrus und frühen Anöstrus

Zyklus- stadium	Luminales Epithel		Oberflächliche Drüsen		Tiefe Drüsen	
	X_m (%)	Min/Max (%)	X_m (%)	Min/Max (%)	X_m (%)	Min/Max (%)
n Tage p.ov.						
15	10,50	1/29	6,12	1/21	90,18	86/92
30	0,25	0/4	3,68	0/10	35,95	4/64
45	16,40	4/41	8,01	2/27	37,30	3/71
60	36,91	6/76	99,75	70/100	67,01	57/99
75	74,81	71/79	93,15	90/95	73,05	54/93
110	89,76	81/96	93,50	93/94	81,17	77/85

X_m : Arcus-Sinus-transformierter Mittelwert nach Rücktransformation

Min/Max: kleinster / größter Meßwert

4.5.1.4 Stroma

Mit dem gegen den Östrogenrezeptor gerichteten Antikörper konnte in der bindegewebigen Grundlage des Endometriums nur eine sehr geringe Antigenität nachgewiesen werden. Die Fibrozyten waren entweder völlig negativ oder zeigten in Regionen mit Rezeptor-positiven Drüsenepithelien eine ganz dezente Braunfärbung. Dies war vor allem bei den Zyklusstadien 75. und 110. Tag p.ov., vereinzelt auch am 15. Tag p.ov., zu beobachten (s. Abb. 13 u. 14).

4.5.1.5 Myomterium

In der zentral gelegenen Ringmuskelschicht fanden sich an den Tagen 15, 30, 45 und 60 p.ov. keine Immunreaktionen (s. Abb. 15 A; S. 99). Bei den Proben vom 75. Tag konnte etwa ein Drittel der Zellkerne als positiv angesprochen werden. Die Uterusschnitte vom Anöstrus (Tag 110 p.ov.) wiesen dagegen sehr zahlreiche deutliche Signale auf, wobei die Antigen-Anhäufungen stellenweise sehr dicht waren. Außer den Zellkernen färbte sich dort auch das Zytoplasma an (s. Abb. 15 B).

Die Längsmuskelschicht zeigte eine von innen nach außen zunehmende Rezeptordichte. Während die an die Gefäßschicht angrenzenden Bereiche ungefärbt waren, ließen sich in den äußeren Randschichten sehr dezente bis geringgradige Immunreaktionen verzeichnen. Die Stärke der Signale stand dabei in keiner erkennbaren Beziehung zum Zyklusstadium (s. Abb. 15 C).

4.5.1.6 Gefäßschicht

In der Gefäßschicht waren bis auf wenige Ausnahmen keine Östrogenrezeptoren immunhistochemisch nachweisbar. Lediglich bei vier Tieren unterschiedlicher Zyklusstadien (15., 30., 60. und 110. Tag p.ov.) fielen einzelne positive Reaktionen in der Tunica media der Arterien auf, die vorwiegend aus glatten Muskelzellen besteht. Die Gefäßendothelien der Arterien, die Venen und das einbettende Bindegewebe zeigten keine Immunantwort.

4.5.1.7 Serosa

Die Tunica serosa beinhaltete - unabhängig vom Zyklusstadium - überwiegend immun-negative Bereiche, die regelmäßig von vereinzelt schwach braun gefärbten Zellkernen unterbrochen wurden (s. Abb. 15 C).

4.5.2 **Konzentration und Verteilung von Progesteronrezeptoren im caninen Uterus**

4.5.2.1 **Luminales Epithel**

Im luminalen Epithel waren Progesteronrezeptoren ausschließlich in den Zellkernen in Form eines homogenen, teilweise auch granulären, hell- bis dunkelbraunen Niederschlags des DAB nachweisbar. Das Zytoplasma blieb von der Immunreaktion unberührt. Lediglich bei einer Hündin (Tess, 110. Tag) war an Stellen mit intensiv gefärbten Zellkernen auch das Zytoplasma betroffen.

Auch hier erwies sich der Untersuchungszeitpunkt als signifikante Einflußgröße. Wie aus Tabelle 16 (S. 87) hervorgeht, stieg der Anteil Rezeptor-negativer Zellkerne von etwa 70 % am Tag 15 p.ov. auf 88 % am Tag 30 p.ov. an. Danach war ab Tag 45 p.ov. ein kontinuierlicher Rückgang auf 2,48 % im frühen Anöstrus (110. Tag p.ov) festzustellen. Der Verlauf des Anteils immun-negativer Zellkerne zeigte mit $p < 0,05$ einen signifikanten Zusammenhang mit dem Zyklusstadium und war negativ und hochsignifikant korreliert mit dem Anteil stark positiver Immunreaktionen ($r = -0,91$; $p < 0,001$). Diese waren zwischen dem 15. und 45. Zyklustag p.ov. zu lediglich 0,00 bis 1,53 % vertreten, um ab dem 60. Tag p.ov. langsam auf 74,11 % am Tag 110 p.ov. anzusteigen (s. Abb. 16; S. 101). Dementsprechend lag auch für den Anteil stark positiver Immunreaktionen eine signifikante Beziehung zum Zyklusverlauf vor ($p < 0,01$). Für den Anteil an Zellkernen mit mittlerer Farbtintensität wurde keine Abhängigkeit vom Zyklusstadium festgestellt ($p = 0,38$). Die Werte lagen in einem Bereich zwischen etwa 12 und 50 %, wobei am Tag 15 p.ov. ein relatives und am Tag 60 p.ov. ein absolutes Maximum zu verzeichnen war. Es zeigten sich auch keine signifikanten Zusammenhänge mit dem Vorkommen von negativen bzw. stark positiven Immunreaktionen ($r = -0,15$ bzw. $r = -0,27$).

Insbesondere im Zeitraum vom 45. bis zum 75. Tag p.ov. fielen beachtliche Spannweiten innerhalb der untersuchten Gruppen auf (s. Tab. 16, Spalten Min/Max). Am Tag 45 p.ov. wurden jedoch trotz großer individueller Unterschiede fast alle Meßpunkte als negativ oder nur schwach positiv eingestuft. Wenngleich am 75. Tag p.ov. innerhalb der Gruppen Spannweiten von bis zu 64 % auftraten, so wurde doch der überwiegende Anteil der Zellkerne als mittelgradig bis stark positiv klassifiziert (s. Tab 16). Die Ergebnisse sind im Anhang (Tab. 23) detailliert aufgeführt.

Tab. 16: Durchschnittlicher prozentualer Anteil (X_m ; Min/Max) Progesteronrezeptor -positiver und -negativer Zellkerne im luminalen Epithel des Endometriums im Verlauf des Diöstrus und frühen Anöstrus

Zyklus- stadium	keine Immunre- aktion vorhanden		schwache bis mitt- lere Farbintensität		starke Farb- intensität	
	-		+		++	
n Tage p.ov.	X_m (%)	Min/Max (%)	X_m (%)	Min/Max (%)	X_m (%)	Min/Max (%)
15	69,99	62/80	29,67	20/37	0,45	0/1
30	88,06	82/93	11,95	7/18	0,00	0/0
45	67,67	46/86	29,48	14/48	1,53	0/6
60	35,76	10/89	49,56	11/84	6,91	0/34
75	5,11	0/40	20,83	12/36	66,92	24/88
110	2,48	2/3	23,32	19/28	74,11	70/78

X_m : Arcus-Sinus-transformierter Mittelwert nach Rücktransformation
 Min/Max: kleinster / größter Meßwert

4.5.2.2 Oberflächliche Drüsen

In den Drüsenepithelien wurden Progesteronrezeptoren vorwiegend in den Zellkernen nachgewiesen. Weiterhin ließ sich eine sehr leichte, diffuse Braunfärbung des Zytoplasmas sowie vereinzelt schwach braun gefärbtes Material in den Drüsenlumina feststellen.

Das Verteilungsmuster der Progesteronrezeptoren in den oberflächlichen Drüsen entsprach nahezu dem des luminalen Epithels (vergl. Tab. 16 u. 17). In beiden Kompartimenten verliefen die Anteile an Zellkernen ohne Immunreaktion bzw. mit mittlerer und starker Farbreaktion im Untersuchungszeitraum mit hoher Übereinstimmung ($r = 0,94; 0,98$ bzw. $0,94; p < 0,001$).

Der Anteil Rezeptor-negativer Zellkerne zeigte zunächst einen Anstieg von 74 % am Tag 15 p.ov. auf knapp 94 % am Tag 30 p.ov., dem ein Abfall auf Werte im Bereich von 0,1 bis 0,5 % im späten Diöstrus und frühen Anöstrus (Tage 60 -110 p.ov.) folgte (s. Abb. 16). Es ergab sich ein hochsignifikanter Zusammenhang dieser Veränderungen mit dem Zyklusstadium ($p < 0,0001$), wie auch der Anteil der Meßpunkte mit mittlerer bzw. starker Farbintensität signifikante ($p < 0,05$) bzw. hochsignifikante ($p < 0,0001$) Abhängigkeiten vom Zyklustag aufwiesen. Allerdings waren nur die Anteile negativer und die stark positiver Zellkerne negativ korreliert ($r = -0,8996; p < 0,001$). Entsprechend waren vom 15. bis 45. Tag p.ov. praktisch keine Zellen mit hohem Antigengehalt (++) nachweisbar, ab Tag 60 p.ov. stieg ihr Anteil auf Werte zwischen 40 und 92 % an. Für die Meßpunkte mit mittlerer Farbintensität wurden - ähnlich wie im luminalen Epithel - am Tag 30 p.ov. mit ca. 6 % der niedrigste und am Tag 60 p.ov. mit knapp 60 % der höchste Wert ermittelt.

Insbesondere an den Tagen 15 und 45 p.ov. fielen Spannweiten zwischen 27 und 47 % auf (s. Tab. 17, Spalten Min/Max), jedoch wurden hier praktisch alle Meßpunkte als negativ bzw. schwach positiv (+) klassifiziert. Die Einzelergebnisse sind im Anhang (Tab. 23) zu finden.

Tab. 17: *Durchschnittlicher prozentualer Anteil (X_m ; Min/Max) Progesteronrezeptor -positiver und -negativer Zellkerne in den oberflächlichen Drüsen des Endometriums im Verlauf des Diöstrus und frühen Anöstrus*

Zyklus- stadium	keine Immunre- aktion vorhanden -		schwache bis mitt- lere Farbintensität +		starke Farb- intensität ++	
	X_m (%)	Min/Max (%)	X_m (%)	Min/Max (%)	X_m (%)	Min/Max (%)
n Tage p.ov.						
15	74,20	57/86	25,21	14/41	0,22	0/2
30	93,98	77/99	5,98	1/23	0,00	0/0
45	73,23	52/98	26,79	2/48	0,00	0/0
60	0,11	0/1	59,70	53/66	39,93	34/47
75	0,34	0/3	7,17	1/24	92,00	72/99
110	0,50	0/2	18,76	11/28	80,39	70/89

X_m : Arcus-Sinus-transformierter Mittelwert nach Rücktransformation
 Min/Max: kleinster / größter Meßwert

4.5.2.3 Tiefe Drüsen

Progesteronrezeptoren fanden sich praktisch nur in den Zellkernen. Lediglich bei hoher Antigendichte war stellenweise auch im Zytoplasma eine leichte, diffuse Braunfärbung zu verzeichnen (Tag 15, 75 und 110 p.ov.).

Abhängigkeiten vom Zyklusstadium waren für den Verlauf des Anteils negativer ($p < 0,01$) und stark positiver Zellkerne ($p < 0001$) erkennbar. Zellkerne ohne Immunreaktion waren an den Tagen 30 bzw. 45 p.ov. zu einem Anteil von ca. 83 % bzw. 54 % vertreten. An den übrigen Zyklustagen wurde für den überwiegenden Anteil der Zellkerne ein mittlerer bis starker Rezeptorgehalt registriert (s. Tab. 18 u. Abb. 17; S. 103). Während die zentralen Bereiche des Endometriums übereinstimmende

Verteilungsmuster besaßen (s. Kap. 4.5.2.1 u. 4.5.2.2), korrelierten diese Daten mit $r = 0,49$ und $r = 0,48$ (jeweils $p > 0,05$) nicht mit den Ergebnissen in den basalen Drüsenabschnitten. Hier fielen insbesondere zu Beginn des Untersuchungszeitraums (15. Tag p.ov.) hohe Rezeptorkonzentrationen von fast 90 % auf.

Tab. 18: *Durchschnittlicher prozentualer Anteil (X_m ; Min/Max) Progesteronrezeptor -positiver und -negativer Zellkerne in den tiefen Drüsen des Endometriums im Verlauf des Diöstrus und frühen Anöstrus*

Zyklus- stadium	keine Immunre- aktion vorhanden		schwache bis mitt- lere Farbintensität		starke Farb- intensität	
	-		+		++	
n Tage p.ov.	X_m (%)	Min/Max (%)	X_m (%)	Min/Max (%)	X_m (%)	Min/Max (%)
15	0,00	0/0	10,08	3/29	89,94	71/97
30	82,79	63/98	17,23	2/37	0,00	0/0
45	53,66	12/98	46,26	2/88	0,00	0/0
60	7,53	1/35	58,03	49/74	29,12	16/50
75	0,34	0/3	23,15	11/35	76,27	63/89
110	1,02	0/4	39,73	14/69	58,62	28/86

X_m : Arcus-Sinus-transformierter Mittelwert nach Rücktransformation

Min/Max: kleinster / größter Meßwert

4.5.2.4 Stroma

Bei geringen Rezeptorkonzentrationen in den Drüsenepithelien waren auch für die stromalen Fibrozyten überwiegend schwache Immunreaktionen zu verzeichnen. Während am 15., 30. und 45. Tag des Zyklus negative, schwach und stark positive Fibrozyten etwa gleich häufig zu finden waren, zeigte das Stroma am 60., 75. und 110. Tag eine vorwiegend mittelgradige bis starke Färbeintensität (s. Abb. 16 u. 17).

Positive Signale gingen vorzugsweise von den Zellkernen der Fibrozyten aus, das Zytoplasma zeigte in der Regel keine Reaktion. Es fiel jedoch auf, daß sich in Bereichen mit hoher Rezeptordichte der Zellkerne auch das Zytoplasma hellbraun anfärbte. Dies war besonders in den dicht und zirkulär um immunpositive Drüsen angeordneten Fibrozyten zu beobachten.

Bei einigen Proben war festzustellen, daß lumennahe Bereiche des Stromas schwach reagierten, wenn auch die oberflächlichen Drüsenepithelien keine Progesteronrezeptoren aufwiesen (Jana, 15. Tag; Cora, Jeani, 30. Tag). Waren dagegen die oberflächlichen Drüsenepithelien immun-positiv, so wies das Stroma in dieser Region ebenfalls eine besonders starke Immunantwort auf, während neben positiv gefärbten tiefen Drüsenepithelien immer wieder negative Fibrozyten anzutreffen waren (Daisy, 60. Tag; Ina, Ella, 75. Tag; Tess, 110. Tag).

4.5.2.5 Myometrium

Das Myometrium zeigte bei allen untersuchten Proben einen homogenen Farbniederschlag in den Zellkernen von mittlerer bis starker Intensität. Die Proben vom 15., 30., 45. und stellenweise auch vom 60. Tag p.ov. wiesen im Stratum circulare eine mittelgradige und im Stratum longitudinale eine etwas stärkere Immunreaktion auf. Bei den Zyklusstadien 75. und 110. Tag p.ov. war in Ring- und Längsmuskelschicht dagegen eine starke Anfärbung zu verzeichnen. In vielen Fällen fiel im Stratum longitudinale eine Abnahme der Farbdichte von der Serosa ausgehend in Richtung Gefäßschicht auf (s. Abb. 18; S. 105).

Während in der Ringmuskelschicht nur ausnahmsweise bei besonders hohem Antigengehalt in den Zellkernen auch das Zytoplasma einen leichten, diffusen

Farbniederschlag aufwies, war das Zytoplasma der längs angeordneten Muskelzellen regelmäßig an der Immunreaktion beteiligt.

4.5.2.6 Gefäßschicht

Die Gefäßschicht zeichnete sich durch ein einheitliches Reaktionsmuster bei allen untersuchten Proben unabhängig vom Zyklusstadium aus.

In den Arterien waren dabei die stärksten Immunreaktionen zu beobachten. Sowohl das Gefäßendothel, als auch die Tunica media wiesen starke Farbniederschläge in den Zellkernen, letztere auch im Zytoplasma auf. In den Zellkernen der Adventitia wurden etwas schwächere Reaktionen registriert. Keine oder nur schwache Signale gingen dagegen von den Gefäßwänden der Venen aus.

Im Bindegewebe der Gefäßschicht waren die Fibrozyten von der Immunreaktion unterschiedlich stark betroffen. Es ließen sich negative, mittelgradig- und stark positive Zellkerne ausmachen.

4.5.2.7 Serosa

Im peritonealen Überzug des Uterus waren bei allen Proben sowohl negative als auch schwach bis mittelgradig positive Zellkerne anzutreffen. Ein Unterschied zwischen den einzelnen Zyklusgruppen war nicht zu verzeichnen (s. Abb. 18 C).

Abb. 13: Immunhistochemische Darstellung des nukleären Östrogenrezeptors im luminalen Epithel (LE) und in den oberflächlichen Drüsen (OD) des caninen Endometriums im Verlauf des Diöstrus und frühen Anöstrus anhand von Gefrierschnitten

Am Tag 15 p.ov. waren in durchschnittlich 10,5 % (LE) bzw. 6,12 % (OD) der Zellkerne Östrogenrezeptoren nachweisbar (Abb. 13 A), am Tag 30 p.ov. verminderte sich der Anteil auf mittlere 0,25 % (LE) bzw. 3,68 % (OD) (Abb. 13 B). Ein Anstieg der Östrogenrezeptorkonzentration war ab Tag 60 p.ov. festzustellen (s. Tab. 15), deren Maximum bei 89,76 % (LE) bzw. 93,5 % (OD) am Tag 110 p.ov. lag (Abb. 13 C). Die in den beschriebenen Regionen liegenden stromalen Fibrozyten zeigten lediglich an den Tagen 75 und 110 p.ov. positive Immunreaktionen.

LE: Luminales Epithel

OD: Oberflächliche Drüsen

S: Stroma

▶: immun-positive Zellkerne

→: immun-negative Zellkerne

Abb. 13 A

Hündin „Ferdi“
15. Tag p.ov.

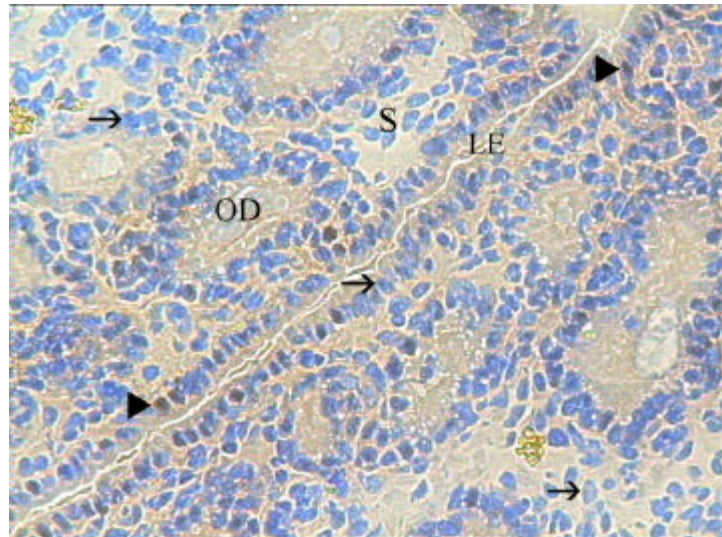


Abb. 13 B

Hündin „Cora“
30. Tag p.ov.

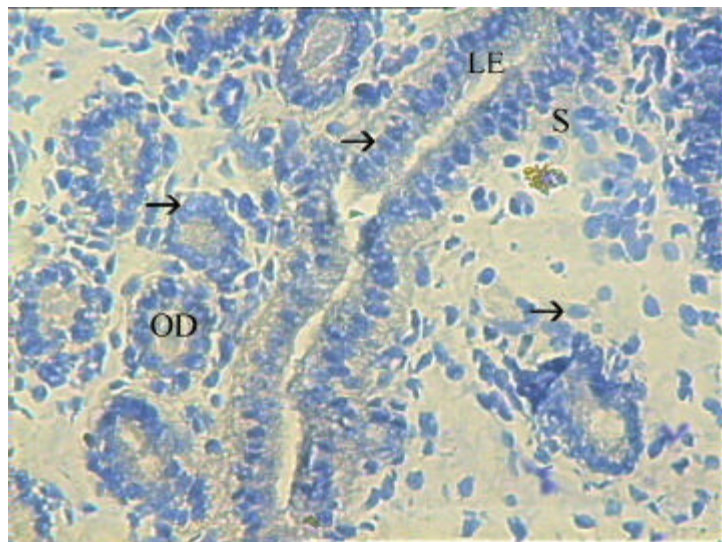


Abb. 13 C

Hündin „Tess“
110. Tag p.ov.

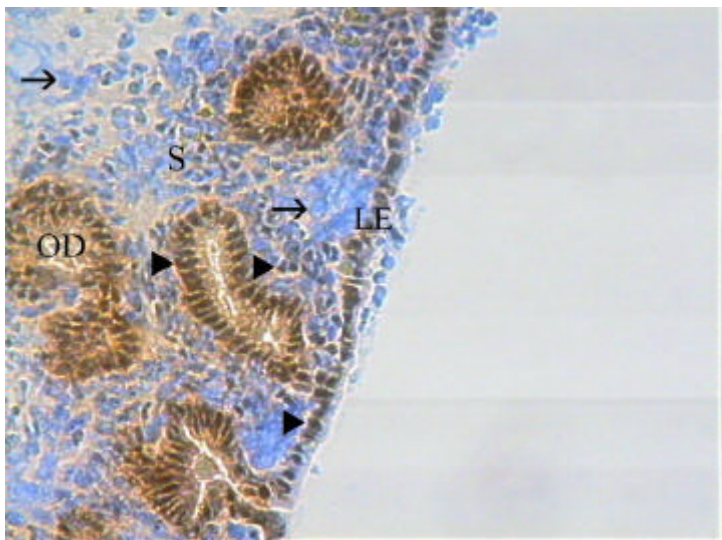


Abb. 14: Immunhistochemische Darstellung des nukleären Östrogenrezeptors in den tiefen Drüsen (TD) des caninen Endometriums im Verlauf des Diöstrus und frühen Anöstrus anhand von Gefrierschnitten

Am Tag 15 p.ov. lag der durchschnittliche Anteil Östrogenrezeptor-positiver Zellkerne bei 90,18 % (Abb. 14 A); am Tag 30 p.ov. verminderte er sich auf 35,95 % (Abb. 14 B). Ab Tag 60 p.ov. war eine kontinuierliche Zunahme immun-positiver Zellkerne zu beobachten (s. Tab. 15), so daß am Tag 110 p.ov. ein Wert von 81,17 % erreicht wurde. Im Stroma fanden sich insbesondere an den Tagen 75 und 110 p.ov. (vereinzelt am Tag 15 p.ov.) positive Immunreaktionen (Abb. 14 C).

TD: Tiefe Drüsen

S: Stroma

▶: immun-positive Zellkerne

→: immun-negative Zellkerne

Abb. 14 A

Hündin „Sally“

15. Tag p.ov.

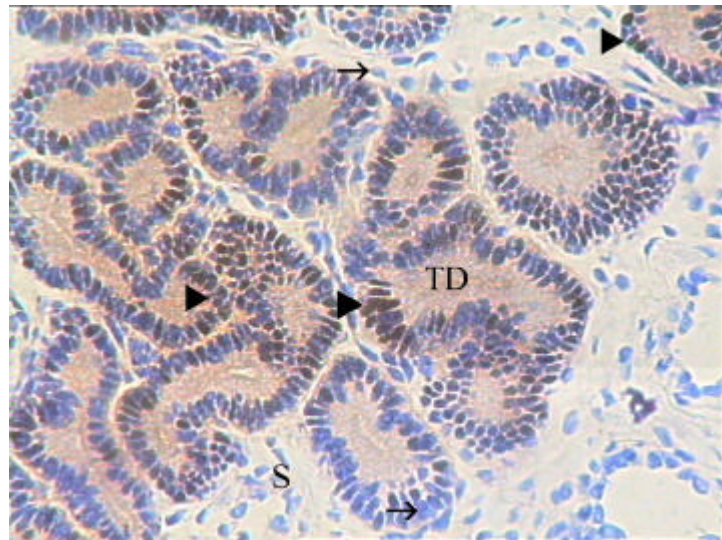


Abb. 14 B

Hündin „Biene“

30. Tag p.ov.

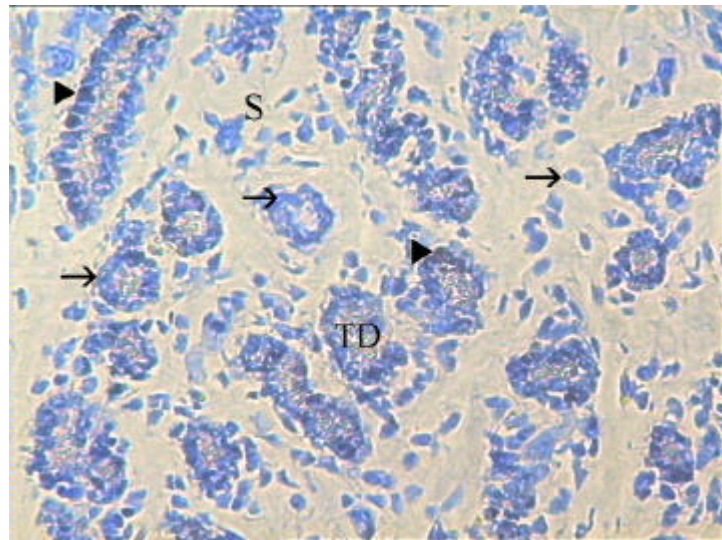


Abb. 14 C

Hündin „Luise“

75. Tag p.ov.

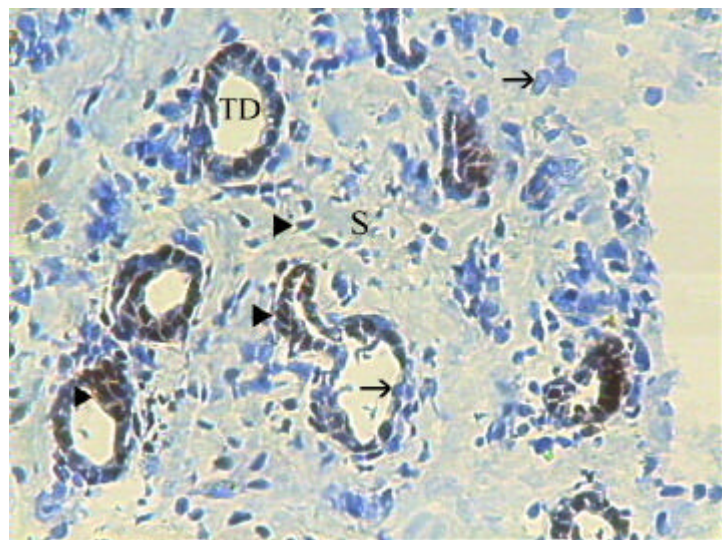


Abb. 15: Immunhistochemische Darstellung des nukleären Östrogenrezeptors in Myometrium und Serosa des caninen Uterus im Verlauf des Diöstrus und frühen Anöstrus anhand von Gefrierschnitten

Im Zeitraum 15. bis 60. Tag p.ov. waren in der Ringmuskelschicht keine Östrogenrezeptoren nachweisbar (Abb. 15 A). Am 110. Tag p.ov. fielen dagegen ausgeprägte Immunreaktionen auf, in die auch das Zytoplasma mit einbezogen war (Abb. 15 B). Unabhängig vom Zyklusstadium war in der Längsmuskelschicht eine geringe, von innen nach außen zunehmende Antigenität zu verzeichnen. Die Serosa zeigte - abgesehen von vereinzelt gefärbten Zellkernen - keine Immunreaktionen (Abb. 15 C).

RM: Ringmuskelschicht

LM: Längsmuskelschicht

Se: Serosa

▶: immun-positive Zellkerne

→: immun-negative Zellkerne

Abb. 15 A

Hündin „Daisy“
60. Tag p.ov.

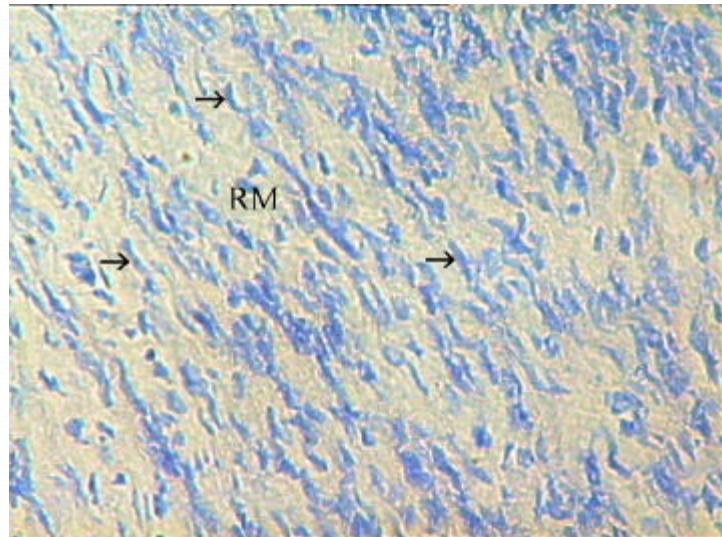


Abb. 15 B

Hündin „Tess“
110. Tag p.ov.

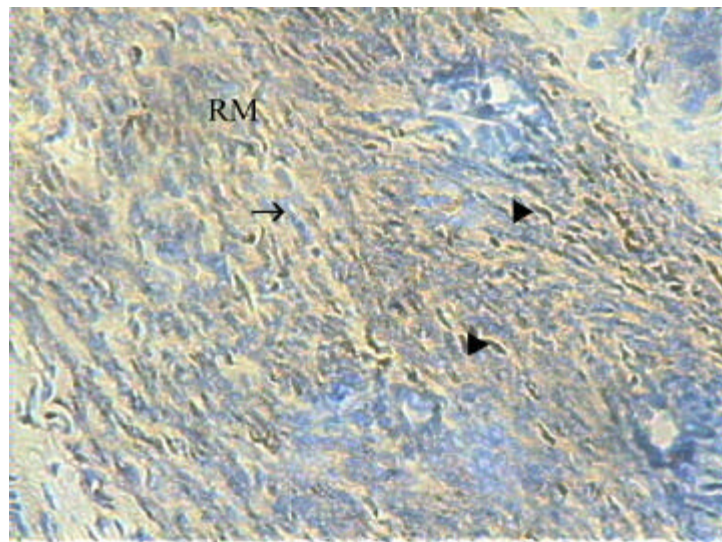


Abb. 15 C

Hündin „Tess“
110. Tag p.ov.

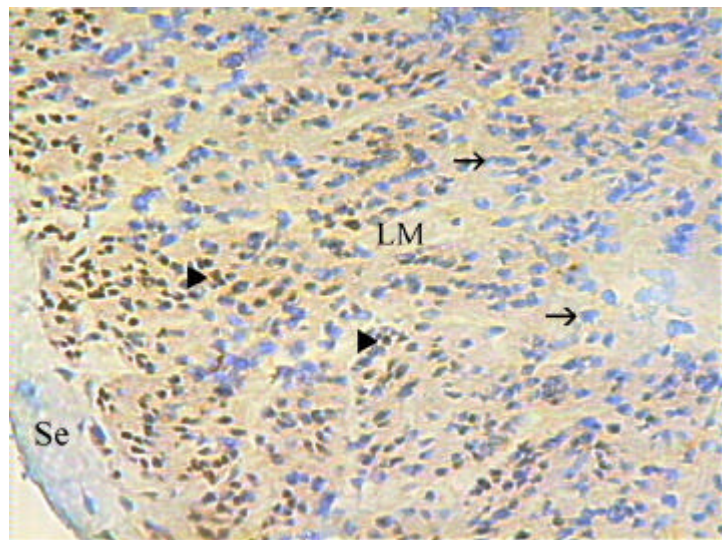


Abb. 16 Immunhistochemische Darstellung des nukleären Progesteronrezeptors im luminalen Epithel (LE) und in den oberflächlichen Drüsen (OD) des caninen Endometriums im Verlauf des Diöstrus und frühen Anöstrus anhand von Gefrierschnitten

Am 15. Tag p.ov. waren überwiegend immun-negative sowie ein Anteil von knapp 30 % schwach positiver Zellkerne zu beobachten (Abb. 16 A). Eine Abnahme der Progesteronrezeptorkonzentration erfolgte am Tag 30 p.ov.; hier zeigten lediglich 12 % (LE) bzw. 6 % (OD) der Zellkerne eine schwache Immunreaktion (Abb. 16 B). Ab dem 45. Tag p.ov. kam es zu einem Anstieg der Rezeptorkonzentration mit einer maximalen Färbeintensität an den Tagen 75 (OD) und 110 p.ov. (LE), (Abb. 16 C). Die stromalen Fibrozyten konnten im Zeitraum 15. bis 45. Tag p.ov. zu etwa gleichen Teilen als negativ, schwach oder stark positiv angesprochen werden. Im weiteren Zyklusverlauf zeigten sie Immunreaktionen von vorwiegend mittlerer bis starker Intensität (Pfeile).

LE: Luminales Epithel

OD: Oberflächliche Drüsen

S: Stroma

▶: immun-positive Zellkerne

→: immun-negative Zellkerne

Abb. 16 A

Hündin „Ferdi“

15. Tag p.ov.

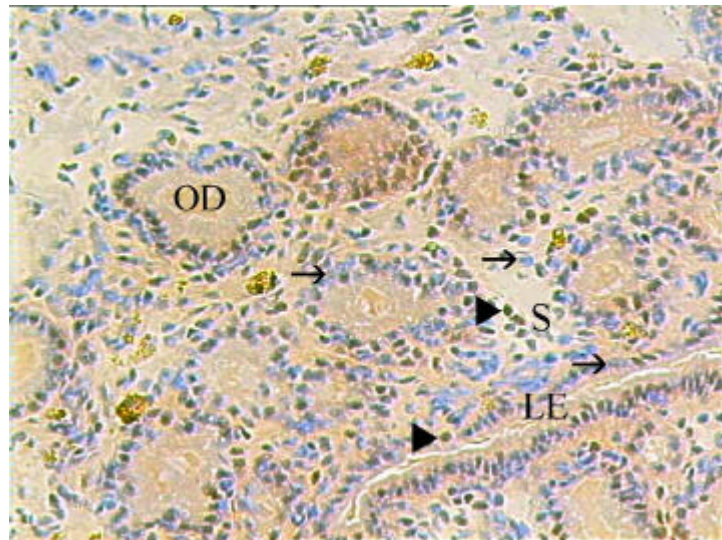


Abb. 16 B

Hündin „Cora“

30. Tag p.ov.

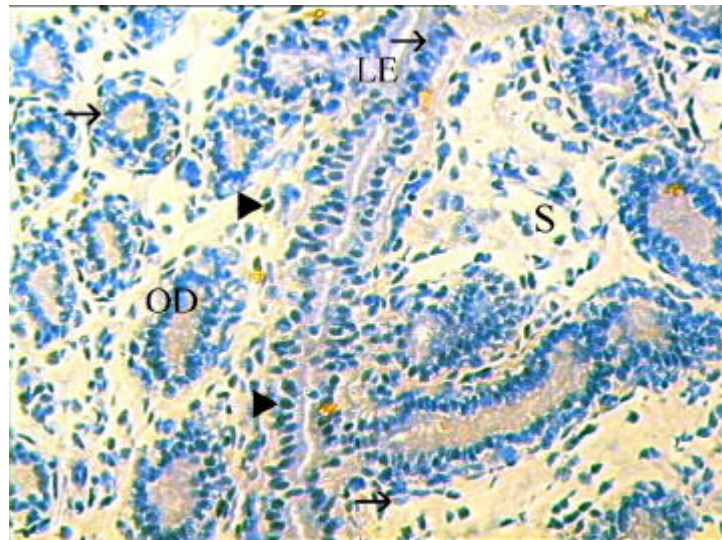


Abb. 16 C

Hündin „Cocki“

110. Tag p.ov.

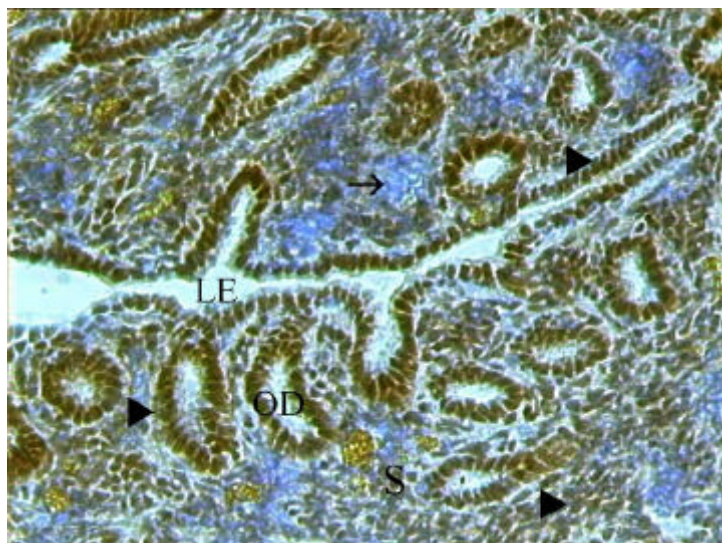


Abb. 17 Immunhistochemische Darstellung des nukleären Progesteronrezeptors in den tiefen Drüsen (TD) des caninen Endometriums im Verlauf des Diöstrus und frühen Anöstrus anhand von Gefrierschnitten

Hohe Progesteronrezeptorkonzentrationen waren am 15. Tag p.ov. mit ca. 90 % stark und ca. 10 % mittelgradig gefärbten Zellkernen zu verzeichnen (Abb. 17 A). In den Proben vom 30. und 45. Tag p.ov. waren deutlich niedrigere Rezeptorgehalte festzustellen (Abb. 17 B). Ab dem 60. Tag p.ov. nahm der Anteil positiver Immunreaktionen erneut zu und stieg auf Werte von 76 % (75. Tag p.ov.) bzw. 59 % (110. Tag p.ov.) stark immun-positiver Zellkerne an (Abb. 17 C). In den stromalen Fibrozyten waren außer an den Tagen 30 und 45 p.ov. überwiegend mittlere und starke Rezeptorgehalte vorhanden (Pfeile).

TD: Tiefe Drüsen

S: Stroma

▶: immun-positive Zellkerne

→: immun-negative Zellkerne

Abb. 17 A

Hündin „Jana“
15. Tag p.ov.

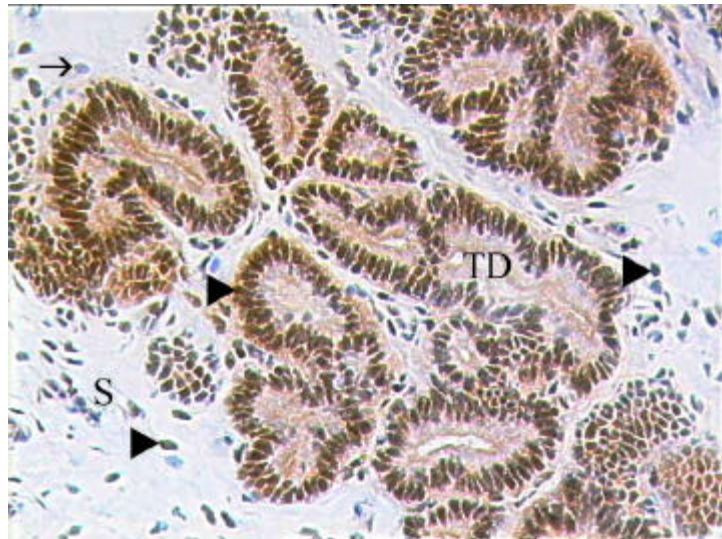


Abb. 17 B

Hündin „Billy“
45. Tag p.ov.

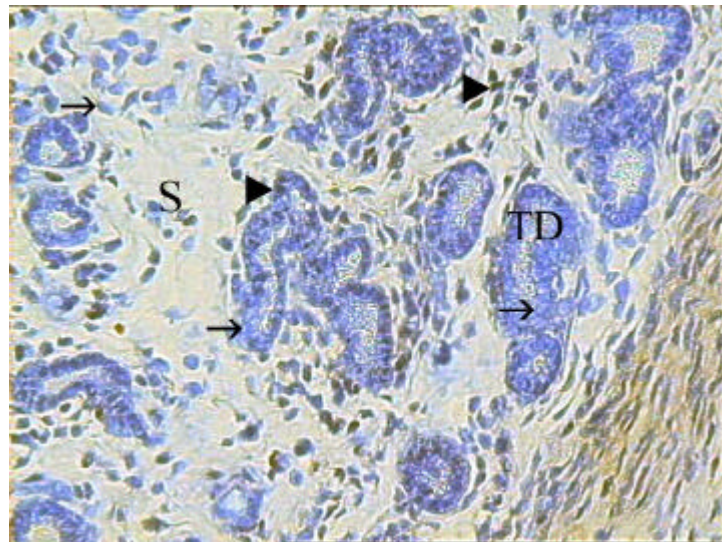


Abb. 17 C

Hündin „Luise“
75. Tag p.ov.

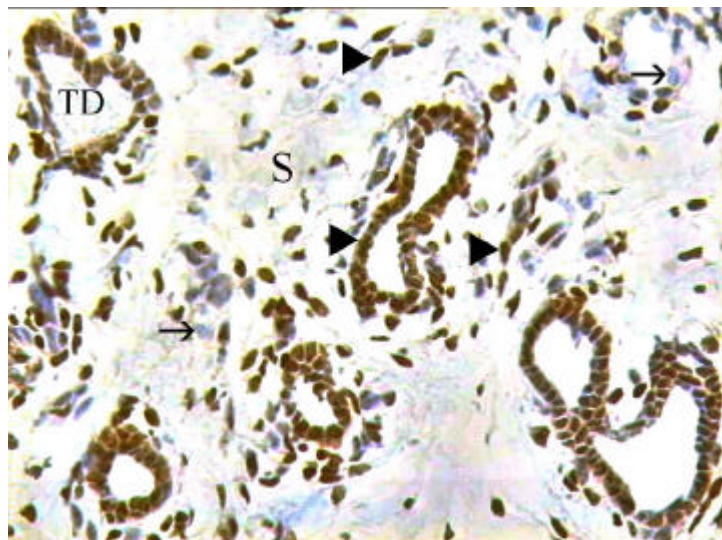


Abb. 18: Immunhistochemische Darstellung des nukleären Progesteronrezeptors in Myometrium und Serosa des caninen Uterus im Verlauf des Diöstrus und frühen Anöstrus anhand von Gefrierschnitten

Vom Tag 15 bis 45 p.ov. waren in der Ringmuskelschicht Immunreaktionen von mittlerer (Abb. 18 A), in der Längsmuskelschicht von etwas stärkerer Intensität zu beobachten. Ab Tag 60 und insbesondere an den Tagen 75 und 110 p.ov. lagen in den meisten Zellkernen beider Schichten hohe Antigen-Konzentrationen vor (Abb. 18 B u. C). Die Serosa wies bei allen untersuchten Proben sowohl negative als auch schwach und stark positive Zellkerne auf.

RM: Ringmuskelschicht

LM: Längsmuskelschicht

Se: Serosa

▶: immun-positive Zellkerne

→: immun-negative Zellkerne

Abb. 18 A

Hündin „Ferdie“
15. Tag p.ov.

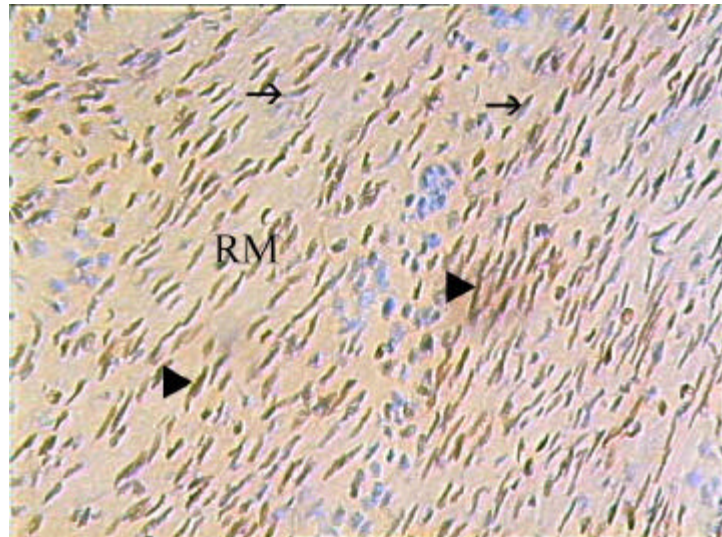


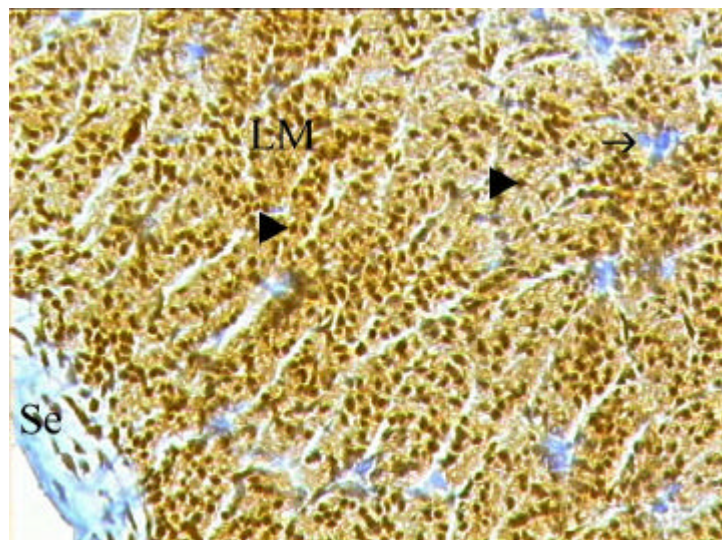
Abb. 18 B

Hündin „Pebbels“
60. Tag p.ov.



Abb. 18 C

Hündin „Tess“
110. Tag p.ov.



5. DISKUSSION

Unter dem Einfluß ovarieller Steroidhormone kommt es im Verlauf des Reproduktionsgeschehens zu umfangreichen strukturellen und funktionellen Veränderungen innerhalb des Uterus (BARRAU et al., 1975; BUHI et al., 1992; CUNHA et al., 1983). Als Besonderheit für den Hund ist dabei zu vermerken, daß der Hormonstatus sowohl bei graviden als auch nicht graviden Tieren nahezu identisch ist und auch im Fall einiger Metropathien, wie z. B. bestimmten Formen der Pyometra, kaum Abweichungen zeigt (HOFFMANN et al., 1992, 1996; BLENDINGER et al., 1997; DE COCK, 1997). Damit stellt sich die Frage, welche Faktoren neben den Sexualhormonen zur endokrinen Regulation der Uterusfunktion beitragen. Nachdem Sexualhormone ihre Wirkung über spezifische Rezeptoren entfalten, war es Ziel vorliegender Arbeit, ein komplexes Bild über den Verlauf der Konzentrationen und Lokalisationen von Progesteron- und Östrogenrezeptoren im Verlauf des Diöstrus und frühen Anöstrus zu erhalten, da gerade in dieser Phase mit Metropathien gerechnet werden kann. Parallel dazu erfolgte die Bestimmung der entsprechenden Sexualhormone, d.h. von Progesteron und Estradiol-17 β .

5.1 Diskussion des Versuchsaufbaus

Im Vergleich zu den polyöstrischen Haussäugetieren sind bei der monöstrischen Hündin die Zyklusabschnitte Proöstrus, Östrus und Diöstrus mit insgesamt ca. 90 – 130 Tagen außergewöhnlich lang; eine Besonderheit stellt auch der Anöstrus mit einer Dauer von 1 bis 9 Monaten dar (CONCANNON, 1987). Vorangegangene Rezeptorstudien beschäftigten sich vorwiegend mit dem Zeitraum vom Proöstrus bis zum Östrus (LESSEY, GORELL, 1980 a, b; LESSEY et al., 1981; JOHNSTON et al., 1985) bzw. fokussierten lediglich auf einzelne Stichtage des Zyklus, wie bei DHALIWAL et al. (1997), deren Studien sich auf den Ovulationszeitpunkt und den 21. Tag p.ov. beziehen.

Erstmals geben VERMEIRSCH et al. (1999, 2000) - kurz vor Fertigstellung der eigenen Arbeit - einen kompletten Überblick über den Verlauf der Östrogen- und Progesteronrezeptorkonzentrationen während des Zyklus im Genitaltrakt der Hündin. Allerdings handelt es sich bei den in dieser Studie aufgenommenen Tiere um Patienten,

so dass – anders als in den eigenen Untersuchungen – die Zuordnung zum Zyklusstadium lediglich abgeschätzt werden konnte. Auch die kritische Phase des mittleren Diöstrus wurde nicht erfasst (VERMEIRSCH et al., 2000). Darüber hinausgehend erfolgt in den eigenen Untersuchungen eine Verifizierung der immunhistochemischen Befunde durch die Erfassung der Rezeptorkonzentrationen mittels Radioligand-Bindungs-Test. Zusätzliche Informationen ergeben sich weiterhin durch die genau definierten und eng gestaffelten Untersuchungsintervalle.

5.2 Diskussion der Methodik

Zunächst wurden die Konzentrationen der Östrogen- und Progesteronrezeptoren im Zytosol der Uterusproben mittels Sättigungsanalyse unter Verwendung geeigneter Radioliganden quantitativ bestimmt. Es handelt sich dabei um ein etabliertes Meßprinzip mit hoher Präzision, das seit über 20 Jahren routinemäßig eingesetzt wird (E.O.R.T.C. Breast Cancer Cooperative Group, 1973; LECLERCQ, 1984). Vorangegangene Studien beim Hund belegen die Gewebespezifität der caninen Östrogen- und Progesteronrezeptoren, ihre Bindungsspezifität für Estradiol-17 β bzw. Promegeston, ihre Sättigbarkeit und ihre Eigenschaft, sich im Scatchard Plot als einheitliche Klasse von Bindungsproteinen darzustellen (s. S. 21-22), (LESSEY, GORELL, 1980 a, b). Die vorliegende Arbeit orientierte sich methodisch stark an den Vorgaben von GREEN und LEAKE (1987) zur Rezeptorbestimmung.

Die Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit des eingerichteten Meßverfahrens wurden durch Überprüfung der Linearität und der Präzision nachgewiesen. Die eingesetzte Menge an Zytosol stand in einem linearen Zusammenhang mit der ermittelten Rezeptorkonzentration. Die Überprüfung der Intra-assay-Variabilität ergab einen Variationskoeffizienten von 5,6 % bei der Östrogenrezeptor-Bestimmung und von 7,9 % bei der Progesteronrezeptor-Bestimmung. Für die Inter-assay-Variabilität lag der Variationskoeffizient bei 15,0 % (Östrogenrezeptor) bzw. 17,3 % (Progesteronrezeptor). Die Genauigkeit der Methode entspricht der vergleichbarer Untersuchungen (KLAUKE, HOFFMANN, 1992) und genügt damit den Qualitätskriterien.

Bei den Untersuchungen wurde nicht zwischen gebundenen und freien bzw. zytosolischen und nukleären Rezeptoren differenziert, da deren biochemische Trennung vielerorts als Artefakt angesehen wird (KING, GREENE, 1984; WELSHONS et al.,

1985). Bestimmt wurde vielmehr die Gesamtrezeptorkonzentration im Zytosol, die – ebenso wie die zytosolische und die totale Rezeptorfraktion - parallel zu dem Gehalt an immunhistochemisch darstellbaren nukleären Rezeptoren verläuft und daher vermutlich ein realistisches Bild des Rezeptorstatus vermittelt (BRENNER et al., 1988).

Die quantitative Rezeptorbestimmung mittels Radioligand-Bindungs-Test macht die Homogenisierung des Gewebes notwendig. Demnach liefert sie lediglich Durchschnittswerte der Rezeptorkonzentration, Aussagen über den Rezeptorgehalt in bestimmten Zellpopulationen können nicht gemacht werden. Die „rauhe“ Behandlung der labilen Proteine birgt stets auch das Risiko, einen Teil der Rezeptoren zu zerstören bzw. zu denaturieren. Weiterhin können hohe endogene Hormonkonzentrationen die Rezeptoren blockieren und zu falsch negativen Ergebnissen führen.

Immunhistochemische Untersuchungen an Gefrierschnitten ermöglichen dagegen, durch bestmögliche Schonung des Gewebes die Rezeptoren quasi im Nativzustand zu belassen. Dadurch können zusätzliche Erkenntnisse über Verteilung und Heterogenität der Rezeptorproteine gewonnen werden. Das Verfahren liefert reproduzierbare Ergebnisse, die mit denen des Radioligand-Bindungstests korrelieren (KING et al., 1985). In der vorliegenden Arbeit wurde eine gute Übereinstimmung der Resultate beider Untersuchungsmethoden erzielt.

Die Überprüfung der Spezifität der in dieser Arbeit eingesetzten Antikörper erfolgte an verschiedenen bekannt positiven bzw. negativen Geweben. Uteruspräparate von Hündinnen, deren Rezeptorgehalt bekannt war, färbten sich immunhistochemisch an, dagegen zeigten quergestreifte Muskulatur und Darm - bis auf einige Drüsenanschnitte in der Darmmukosa - keine Immunreaktion. Bei Ersatz der Primärantikörper durch in derselben Spezies hergestellte Antikörper gleichen Isotyps mit Ausrichtung gegen ein in der Probe nicht vorkommendes Antigen, war kein Signal zu verzeichnen. Positive und negative Kontrollen wurden jeweils zusammen mit den unbekannt Proben untersucht, um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu sichern (DAKO Corporation, 1989).

Der gegen den humanen Progesteronrezeptor gerichtete monoklonale Antikörper 1408 (IMMUNOTECH) färbte vorwiegend die Zellkerne an. Häufig war auch eine leichte Zytoplasma- sowie Hintergrundfärbung zu registrieren. Dies war nur in Bereichen mit hoher Rezeptordichte festzustellen, so daß es sich dabei vermutlich um ausgewaschene, in das umliegende Gewebe diffundierte Antigen-Antikörperkomplexe handelte.

Von den verschiedenen überprüften Östrogenrezeptor-Antikörpern eignete sich lediglich der gegen den humanen Östrogenrezeptor gerichtete monoklonale Antikörper *6F11* (LOXO). Er zeichnete sich durch ein sehr spezifisches Signal in den Zellkernen ohne jegliche Hintergrundfärbung aus. Allerdings wies er, abweichend vom Progesteronrezeptor-Nachweis, Rezeptoren hauptsächlich in den endometrialen Epithelien nach; anders als in der Literatur beschrieben (LI et al., 1992; BRENNER et al., 1988) ergaben sich in Stroma und Myometrium nur schwache Signale. Möglicherweise lag der Rezeptorgehalt in diesen Zellen unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten Antikörpers. Denkbar wäre auch die Existenz unterschiedlicher Rezeptorformen, die nicht in gleicher Weise von dem Antikörper erkannt werden. Dafür spricht die Tatsache, daß der Progesteronrezeptor-Antikörper bei der Immunfärbung insgesamt stärkere Reaktionen hervorrief, obwohl bei den biochemischen Untersuchungen (Ligand-Bindungs-Test) die Östrogenrezeptoren deutlich höhere Konzentrationen aufwiesen.

Für die Darstellung der Antigen-Antikörperreaktion stehen in der Immunhistochemie verschiedene Techniken zur Verfügung. Die hier verwendete Avidin-Biotin-Methode besitzt gegenüber dem direkten oder indirekten Verfahren eine höhere Sensitivität und im Vergleich zur Peroxidase-Anti-Peroxidase-Methode eine größere Avidität, d.h. Bindungsstärke, des Sekundärantikörpers zum Primärantikörper. Dadurch ist der Einsatz hochverdünnter Primärantiseren möglich.

Der Testablauf folgte dem vom Immunochemischen Labor der Firma DAKO Corporation herausgegebenen Protokoll für Immunperoxidase Färbemethoden (1989). Das Verfahren wurde auf die eigenen Bedürfnisse zugeschnitten, indem die einzelnen Schritte in unterschiedlichen Variationen hinsichtlich Inkubationszeiten und Konzentrationen überprüft und optimiert wurden.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

Die ermittelten Estradiol-17 β - und Progesteronkonzentrationen im Blutplasma der Versuchstiere stimmten mit den Literaturangaben überein (HOFFMANN et al., 1992, 1996). Der im mittleren Diöstrus zu verzeichnende relative Anstieg der Estradiol-17 β -Konzentrationen entspricht etwa 15-25 % der im Proöstrus gemessenen Werte. HOFFMANN et al. (1996) erwähnen übereinstimmend eine gesteigerte Verfügbarkeit

von Estradiol-17 β im gleichen Zeitraum, deren Ursache und Funktion allerdings nicht bekannt sind.

Die im Uterus während des Zyklus der Hündin mittels Ligand-Bindungs-Test gemessenen durchschnittlichen Östrogenrezeptorkonzentrationen fielen von 590,2 fmol/mg zytosol. Protein im frühen Diöstrus auf 211,35 fmol/mg zytosol. Protein im mittleren Diöstrus ab. Zum 75. Tag p.ov. war wieder eine starke Zunahme der Rezeptoren auf 762,1 fmol/mg zytosol. Protein festzustellen, die sich im Anöstrus fortsetzte, wo ein maximaler Wert von 1013,9 fmol/mg zytosol. Protein am 110. Tag p.ov. erreicht wurde.

Im Hinblick auf den Verlauf der Östrogenrezeptorkonzentrationen bestätigen die eigenen Untersuchungen die Beobachtungen von FERNANDES et al. (1989) und DONNAY et al. (1995), die nach hohen Werten im frühen Diöstrus einen folgenden Abfall feststellen und von erneut hohen Werten im späten Diöstrus bzw. frühen Anöstrus berichten. Auch die eigenen immunhistochemischen Untersuchungen sowie die von VERMEIRSCH et al. (1999) bestätigen diesen Verlauf der Östrogenrezeptorkonzentrationen, so daß Angaben über deren Abfall im späten Diöstrus bzw. frühen Anöstrus (LESSEY et al., 1981; JOHNSTON et al., 1985) wohl als nicht zutreffend angesehen werden müssen.

Auch der mittels Ligand-Bindungs-Test ermittelte Verlauf der uterinen Progesteronrezeptorkonzentrationen verlief ähnlich wie der der Östrogenrezeptorkonzentrationen. Von einem durchschnittlichen Gehalt von 132,1 fmol/mg zytosol. Protein am 15. Tag p.ov. fiel der Wert auf 38,6 bzw. 62,8 fmol/mg zytosol. Protein im mittleren Diöstrus ab. Am 60. Tag p.ov. war wieder ein Anstieg auf 274,2 fmol/mg zytosol. Protein zu verzeichnen, die höchsten Konzentrationen ergaben sich im späten Diöstrus und Anöstrus (75. bzw. 110. Tag p.ov.) mit 401,8 bzw. 467,7 fmol/mg zytosol. Protein.

Die eigenen Daten widersprechen nicht den Angaben anderer Autoren, die von einem Abfall der Progesteronrezeptorkonzentrationen vom Proöstrus zum frühen Diöstrus sprechen (LESSEY et al., 1981; JOHNSTON et al., 1985; FERNANDES et al., 1989; DONNAY et al., 1995). Allerdings fällt der in den eigenen Untersuchungen festgestellte erneute Anstieg im späten Diöstrus und frühen Anöstrus erheblich deutlicher aus als dort beschrieben.

Der Verlauf der uterinen Östrogen- und Progesteronrezeptorkonzentrationen (gemessen mittels Radioligand-Bindungs-Test) war während der erfaßten Zyklusphasen weitgehend parallel ($r = 0,85$; $p < 0,001$). In Übereinstimmung damit war der Verlauf der Progesteronwerte im Plasma mit dem Verlauf der Progesteronrezeptorkonzentrationen mit $p < 0,01$ signifikant korreliert, wobei sich mit $r = -0,79$ eine negative Korrelation ergab. Auch zum Verlauf der Östrogenrezeptorkonzentrationen ergab sich mit $r = -0,43$ eine negative Korrelation, die allerdings nicht abgesichert werden konnte. Ab Tag 45 p.ov. war auch der Verlauf der Estradiolwerte im Plasma signifikant ($p < 0,01 - 0,001$) negativ korreliert mit dem Verlauf der Östrogen- und Progesteronrezeptorkonzentrationen.

Beide Proteine reagieren somit in ähnlicher Weise auf die zugrunde liegenden auf- bzw. abregulierenden Mechanismen.

Unter der Einwirkung von Estradiol-17 β kommt es während der Follikelphase zu einer erhöhten Expression von Östrogenrezeptor-mRNA sowie -Protein (LEAVITT et al., 1983; BERGMAN et al., 1992; KOJI, BRENNER, 1993). Den gleichen Einfluß üben Östrogene auch auf Progesteronrezeptor-mRNA und -Protein im Uterus aus (KRAUS, KATZENELLENBOGEN, 1993; SUMIDA et al., 1988). Umgekehrt bewirken die nach der Ovulation rückläufigen Estradiolkonzentrationen in Verbindung mit der zunehmenden lutealen Progesteronsynthese den Rückgang der Östrogen- und Progesteronrezeptorkonzentrationen im Diöstrus. Bei in dieser Studie gemessenen Progesteronspiegeln von 86,4 bzw. 41,5 nmol/l im mittleren Diöstrus wurden die niedrigsten Rezeptorkonzentrationen festgestellt. Der Uterus ist in dieser Phase refraktär gegenüber einer weiteren Stimulierung durch Gestagene (ATTARDI, 1984).

Die Bedeutung der Suppression der Östrogen- und Progesteronrezeptoren durch Progesteron wird erkennbar angesichts pathologischer Prozesse, die mit einer Dysregulation des Rezeptorspiegels einhergehen. Bei der Pyometra der Hündin wird von erhöhten uterinen Rezeptorkonzentrationen berichtet (DE COCK, 1997), während die Progesteronwerte im Blut in der Regel nicht von der Norm abweichen (BLENDINGER et al., 1997). Dadurch kommt es zu einer gesteigerten Proliferation und Sekretion des Endometriums und unter Umständen zur Manifestation von verschiedenen Krankheitsbildern (DE COCK, 1997).

Bei polyöstrischen Tieren ist unmittelbar im Anschluß an niedrige Rezeptorgehalte im Diöstrus ein erneuter Rezeptorzuwachs in der folgenden Follikelphase zu verzeichnen (KOZIOROWSKI et al., 1984; LEAVITT et al., 1983; VESANEN et al., 1991). Dieser Vorgang wird im Allgemeinen auf den in der Follikelphase stattfindenden Östrogenanstieg zurückgeführt. Beim Hund schließt sich dem Diöstrus die durch weitgehende Ovarruhe gekennzeichnete Phase des Anöstrus an. Trotzdem wurde in den eigenen Untersuchungen und denen von VERMEIRSCH et al. (1999, 2000) zu Beginn des Anöstrus ein signifikanter Anstieg der Progesteron- und Östrogenrezeptorkonzentrationen beobachtet. Dies läßt folgern, daß beim Hund die Aufregulierung der Rezeptoren weniger eine Folge erhöhter Estradiol-17 β -Konzentrationen ist, sondern vielmehr aus dem Wegfall der Progesteronblockade resultiert. Literaturangaben zufolge stimulieren neben Estradiol-17 β auch andere Regelfaktoren, wie z.B. IGF I und cyclo-AMP (ARONICA, KATZENELLENBOGEN, 1991) sowie EGF (SUMIDA et al., 1988) die Rezeptorsynthese.

Die Aufregulierung der Steroidhormonrezeptoren am Ende des Diöstrus und Beginn des Anöstrus erfolgt demnach unter einer anderen hormonellen Konstellation als im Östrus. Parallelen sind bei dem Vergleich mit juvenilen und ovariectomierten Tieren erkennbar. Auch hier sind bei basalen Steroidhormonkonzentrationen überdurchschnittlich hohe Rezeptorspiegel aufzufinden (ROSSER et al., 1993).

Ziel der immunhistochemischen Untersuchungen war es, die mittels Ligand-Bindungs-Test erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren und zu ergänzen. Darüber hinaus sollten Aussagen über die Verteilung der Rezeptoren innerhalb definierter Zellpopulationen während der erfaßten Zyklusphasen getroffen werden.

Die immunhistochemische Darstellung der Östrogen- und Progesteronrezeptoren im caninen Uterus bestätigte die mittels Sättigungsanalyse ermittelten Konzentrationsverläufe im Zytosol und ist in weitgehender Übereinstimmung mit den von VERMEIRSCH et al. (1999, 2000) publizierten Daten, wobei in Hinblick auf den Progesteronrezeptor die eigenen Untersuchungen allerdings sehr viel deutlicher quantitative Unterschiede erkennen lassen.

Die Gehalte und Verteilungsmuster beider Steroidrezeptoren verliefen parallel zueinander und in Abhängigkeit vom Hormon- bzw. Zyklusstatus.

Die vorliegenden Ergebnisse demonstrieren darüberhinausgehend die sich unter dem Einfluß von Estradiol und Progesteron in den spezifischen uterinen Zelltypen vollziehenden Änderungen im Hinblick auf die Lokalisation der Östrogen- und Progesteronrezeptoren. Diese fanden überwiegend im Endometrium statt, wohingegen das Myometrium, die Gefäßschicht und die Serosa wenig Variabilität bezüglich der Rezeptorkonzentrationen aufwiesen.

Das Vorkommen beider Rezeptortypen war im luminalen Epithel und in den oberflächlichen Drüsenepithelien vergleichbar, jedoch verschieden von dem Vorkommen in den tiefen Drüsenepithelien. Im luminalen Epithel und in den oberflächlichen Drüsen verliefen die Rezeptorgehalte nahezu analog zu den biochemisch gemessenen Rezeptorkonzentrationen. Am 15. Tag p.ov. waren an diesen Lokalisationen geringe Immunreaktionen festzustellen, die beim Übergang zum 30. Tag p.ov. fast völlig zurück gingen. Am 45. Tag p.ov. war stellenweise eine leichte Zunahme an Rezeptor-positiven Zellen zu verzeichnen. Ein abrupter Umschlag der Färbereaktion in Richtung positiv fand am 60. Tag p.ov. statt, worauf im weiteren Zyklusverlauf in allen Epithelzellen ein hoher Rezeptorgehalt vorlag. Während die Färbeintensität im luminalen Epithel eher kontinuierlich zunahm, vollzog sich der Wechsel in den oberflächlichen Drüsenepithelien sehr plötzlich.

Die Östrogen- und Progesteronrezeptoren im luminalen Epithel bzw. den oberflächlichen Drüsen des Endometriums erfahren im Diöstrus demnach durch Progesteron eine maximale Suppression, die am Ende der Lutealphase durch den Wegfall der Progesteronblockade aufgehoben wird.

Dagegen waren in den tiefen Drüsen-schichten am 15. Tag p.ov. nahezu in allen Epithelzellen Östrogen- und Progesteronrezeptoren anzutreffen. Diese Beobachtung erklärt die zum gleichen Zeitpunkt mittels Radioligand-Bindungs-Test gemessene vergleichsweise höhere Rezeptorkonzentration im Uterus. Ebenso wie in den lumennahen Bereichen ging auch in den tiefen Schichten die Zahl an Rezeptor-positiven Zellen am 30. und 45. Tag p.ov. zurück. Abweichend waren hier jedoch noch in ca. 20 % der Zellen Rezeptoren nachweisbar, die wahrscheinlich für die mittels Sättigungsanalyse festgestellten geringen Rezeptorkonzentrationen im mittleren Diöstrus verantwortlich sind. Eine kontinuierliche Zunahme der Immunreaktivität war ab dem 60. Tag p.ov. zu verzeichnen, im Anöstrus enthielten nahezu alle Epithelzellen Rezeptoren.

Demnach reagieren die verschiedenen endometrialen Zellpopulationen unterschiedlich auf hormonelle Einflüsse. Der durch Progesteron induzierte Abbau der Rezeptoren schreitet von innen nach außen fort. Die oberflächlichen Bereiche sind davon zeitlich früher und in stärkerem Ausmaß betroffen als die tiefen Schichten. Offensichtlich steht dies im Zusammenhang mit Regressionsvorgängen im Endometrium während des Diöstrus, die vor allem in den lumennahen Drüsenschichten stattfinden. Die Zellen der Kryptenzone degenerieren, dagegen bleiben die basalen Drüseneithelien intakt (BARRAU et al., 1975). Trotz anhaltender Progesteron-Exposition bleibt in den basalen Epithelien ein geringer Rezeptorgehalt bestehen. Diese Zellen behalten ihre Reaktivität für ovarielle Hormone und reichen möglicherweise aus, die spezifischen Effekte zu vermitteln.

In Übereinstimmung damit wird auch an anderen Stellen ein vom luminalen Epithel in Richtung Myometrium fortschreitender Rezeptorabbau während der Lutealphase beschrieben, und zwar in erster Linie für den Hund (DHALIWAL et al., 1997; DE COCK et al., 1997), gleiches gilt jedoch auch für den Affen (BRENNER et al., 1988, 1990). VERMEIRSCH et al. (1999, 2000) berichten über ähnliche Beobachtungen und Schlussfolgerungen, wobei für den Östrogenrezeptor allerdings keine Differenzierung zwischen tiefen und oberflächlichen Epithelien getroffen wird.

Sowohl für den Hund (VERMEIRSCH et al., 1999, 2000), als auch für andere Spezies (BRENNER et al., 1988; WATSON et al., 1992; BOOS et al., 1996) werden deutliche hormonabhängige Fluktuationen der Östrogen- und Progesteronrezeptorkonzentrationen in den stromalen Fibrozyten des Endometriums beschrieben. In den eigenen semiquantitativen Untersuchungen wiesen diese Zellen dagegen nur einen sehr geringen Gehalt an Östrogenrezeptoren auf. Dies kann keinesfalls auf methodische Probleme zurück geführt werden, da die unmittelbar daneben liegenden Drüseneithelien in Abhängigkeit vom Zyklustag deutlich positiv reagierten. Im Vergleich dazu war der Gehalt an Progesteronrezeptoren in den stromalen Fibrozyten deutlich höher und verlief gleichsinnig mit der Konzentration der Progesteronrezeptoren in den Drüseneithelien, er zeigte damit ebenfalls eine Zyklusabhängigkeit.

In der Ringmuskelschicht des Myometriums wurden vom 15. bis 60. Tag p.ov. keine Östrogenrezeptoren und nur ein mittlerer Gehalt an Progesteronrezeptoren nachgewiesen. Am 75. und 110. Tag p.ov. stiegen die Konzentrationen beider

Rezeptoren an, so daß auch hier eine Zyklusabhängigkeit erkennbar wird. Andere Quellen belegen ein hohes Vorkommen von Östrogenrezeptoren im Myometrium während des Östrus, bestätigen darüber hinaus aber auch einen signifikanten Rückgang der Konzentration im Diöstrus (KLAUKE, HOFFMANN, 1992; DÖCKE, 1994). In einer weiteren Studie wurden während der Lutealphase ebenfalls Progesteron- aber keine Östrogenrezeptoren immunhistochemisch nachgewiesen (DHALI WAL et al., 1997), wohingegen VERMEIRSCH et al. (1999, 2000) das Vorkommen beider Rezeptoren im Myometrium belegen - sie konnten einen signifikanten Rückgang der Färbintensität parallel zum lutealen Progesteronanstieg feststellen. Im Gegensatz dazu wiesen LI et al. (1992) bei der Katze unter anhaltender Progesteroneinwirkung und während der Gravidität hohe Östrogenrezeptorgehalte im Myometrium nach.

Im Gefäßendothel und in der Muskelschicht der myometrialen Arterien wurden in den vorliegenden Untersuchungen Progesteron-, jedoch keine Östrogenrezeptoren nachgewiesen. Übereinstimmend beschreiben auch VERMEIRSCH et al. (1999) die myometrialen Blutgefäße als Östrogenrezeptor-negativ. Die eigenen Beobachtungen decken sich mit Aussagen von BRENNER et al. (1988) und DÖCKE (1994), stehen jedoch im Widerspruch zu den Verhältnissen beim Rind (BOOS et al., 1996) und Mensch (PRESS, GREEN, 1988), wo keine Rezeptoren in der Tunica media lokalisiert wurden.

Demnach lassen sich z.T. erhebliche Differenzen bezüglich des Rezeptorgehaltes in den verschiedenen Zellpopulationen verzeichnen. Ob diese grundsätzliche tierartliche Unterschiede widerspiegeln oder vielmehr durch unterschiedliche Antikörper und /oder Sensitivität der Zellen zustande kommen, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden.

Die geschilderten Beobachtungen lassen den Uterus der Hündin sowohl in der Phase des Übergangs vom Östrus zum Diöstrus als auch vom Diöstrus zum Anöstrus als ein Östrogen- und Progesteron-sensitives Organ erkennen. Er stellt damit über einen weiten Zeitraum des Zyklus ein für hormonelle Einflüsse hoch sensibles Zielgewebe dar.

Obwohl keine grundsätzlichen Unterschiede zur Regulation der uterinen Progesteron- und Östrogenrezeptorkonzentrationen bei anderen Spezies zu erkennen sind (KLAUKE, HOFFMANN, 1992; MARTEL et al., 1980; BRENNER et al., 1988; LI et

al., 1992), ergibt sich aus der langen Phase des Diöstrus, gefolgt vom Anöstrus, eine Besonderheit für den Hund. Die Anwendung von Sexualhormonen bei der Hündin ist demnach auch während des späten Diöstrus und frühen Anöstrus mit uterinen Wirkungen verbunden, woraus sicher auch klinisch relevante Situationen resultieren können.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel vorliegender Arbeit war es, mögliche Wechselwirkungen zwischen Ovar- und Uterusfunktion durch Erfassung der Östrogen (ÖR) - und Progesteronrezeptoren (PR) im caninen Uterus parallel zur ovariellen Östrogen- und Progesteronsekretion im Verlauf des Diöstrus und frühen Anöstrus näher darzustellen.

Nach Entnahme von Blutproben für die Bestimmung von Estradiol-17 β und Progesteron wurden jeweils 3 bis 4 Hündinnen (19 Beagle, 1 Cocker Spaniel) am 15., 30., 45., 60., 75. und 110. Tag nach der Ovulation (p.ov.) ovariohysterektomiert. Jeweils definierte Abschnitte der beiden Uterushörner wurden sowohl für die biochemische als auch immunhistochemische Darstellung der Östrogen- und Progesteronrezeptoren konserviert. Die biochemische Erfassung erfolgte nach Gewinnung des uterinen Zytosols mittels eines Radioligand-Bindungs-Tests, wobei nicht zwischen Endometrium und Myometrium differenziert wurde. Die Berechnung der Rezeptorkonzentrationen und Assoziationskonstanten erfolgte mittels Scatchard Plot.

Anhand von Gefrierschnitten wurden die Östrogen- und Progesteronrezeptoren immunhistochemisch dargestellt (monokl. Maus IgG anti hum. ER: 6F11, LOXO; monokl. Maus IgG2a anti hum. PR: 1408, IMMUNOTECH) und deren Verteilung im Endometrium und Myometrium analysiert. Die Auswertung erfolgte durch Auszählen der Rezeptor-positiven und -negativen Zellen im luminalen Epithel, in den oberflächlichen und tiefen Drüsenepithelien sowie semiquantitativ im Myometrium, in der Gefäßschicht und in der Serosa.

Die im Ligand-Bindungs-Test gemessenen Östrogen- und Progesteronrezeptorkonzentrationen zeigten vom Tag 15 auf Tag 30 p.ov. einen starken Rückgang. Vom 30. bis zum 45. (PR) bzw. 60. (ÖR) Tag p.ov. wiesen die Rezeptorgehalte bei fallenden, aber im Vergleich zum Anöstrus noch erhöhten Progesteronwerten einen Tiefststand auf. Parallel zu den im späten Diöstrus auf Basalniveau sinkenden Progesteronspiegeln fand ein bis zum Anöstrus fortdauernder Anstieg der Rezeptorkonzentrationen statt; sie erreichten hier maximale Werte. Die Konzentrationen der Östrogen- und Progesteronrezeptoren verliefen im Untersuchungszeitraum gleichsinnig und waren mit den Progesteronkonzentrationen im Plasma negativ korreliert.

Am 15. Tag p.ov. ließen sich lediglich in den tiefen Drüsenepithelien des Endometriums Östrogenrezeptoren immunhistochemisch in großer Zahl nachweisen; ihr Anteil ging im mittleren Diöstrus deutlich zurück. Im Gegensatz dazu war an den gleichen Tagen im luminalen Epithel und im Epithel der oberflächlichen Drüsen der Anteil Östrogenrezeptor-positiver Zellkerne deutlich niedriger. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Ligand-Bindungs-Tests stieg die Zahl der Östrogenrezeptoren am Tag 60 p.ov. in den oberflächlichen und tiefen Drüsen an, im luminalen Epithel erfolgte ein entsprechender Anstieg am Tag 75 p.ov.. Am 75. und 110. Tag p.ov. waren bei maximaler Färbeintensität in allen Epithelzellen die Unterschiede zwischen den Lokalisationen weitgehend aufgehoben. Die Fibrozyten des endometrialen Stromas erwiesen sich an den Tagen 30, 45 und 60 p.ov. als Östrogenrezeptor-negativ. Hinweise auf das Vorkommen von Östrogenrezeptor-positiven Fibrozyten ergaben sich an den Tagen 15, 75 und 110 p.ov. vor allem in unmittelbarer Nähe Östrogenrezeptor-positiver Endometriumdrüsen. Für das Myometrium fanden sich geringe Mengen Östrogenrezeptoren in der äußeren Längsmuskelschicht und bei den Proben vom 75. und 110. Tag p.ov. auch in der Ringmuskelschicht, während sie in der Gefäßschicht bis auf wenige Ausnahmen nicht nachweisbar waren.

Die Immunfärbung der Progesteronrezeptoren fiel insgesamt stärker und differenzierter aus. Qualitativ war jedoch in den Drüsenepithelien des Endometriums eine mit den Östrogenrezeptoren nahezu identische Verteilung feststellbar. Von den Fibrozyten gingen Progesteronrezeptor-positive Signale im gesamten Untersuchungszeitraum aus, sie waren jedoch am 60., 75. und 110. Tag p.ov. stärker ausgeprägt. Im Myometrium waren bei allen Proben Progesteronrezeptoren zu verzeichnen, in der Gefäßschicht konnten sie in erster Linie den Arterien zugeordnet werden.

Die vorliegenden Ergebnisse belegen die hormon- bzw. zyklusabhängige Regulation der Östrogen- und Progesteronrezeptorkonzentrationen. Sie zeigen darüber hinaus, daß die Aufregulierung der Steroidhormonrezeptoren am Ende des Diöstrus und Beginn des Anöstrus unter einer anderen hormonellen Konstellation erfolgt als im Östrus.

7. SUMMARY

In order to gain further information on interactions between ovarian and uterine functions the expression of oestrogen and progesterone receptors in the canine uterus was determined parallel to the assay of oestrogen and progesterone concentrations in peripheral plasma during the course of dioestrus and early anoestrus.

20 bitches were divided into six groups of three to four bitches which were ovariectomized on days 15, 30, 45, 60, 75 and 110 after ovulation (p.ov.). Defined sections of both uterine horns were conserved for biochemical and immunohistochemical receptor determination. Biochemical determination was by radio-receptor-assay and saturation-analysis using an uterine cytosolic preparation; determination of receptor concentrations and association constant was by Skatchard plot analysis.

For immunohistochemical receptor determination cryo-sections were prepared using the monoclonal mouse IgG anti hum. ER 6F11, LOXO, and monoclonal mouse IgG 2a anti hum. PR 1408, IMMUNOTEC, as primary antibodies. Evaluation was based on the determination of positive nuclear staining; evaluation in myometrium and stroma was semi-quantitative, it was quantitative by determining receptor positive and negative nuclei in the luminal, the superficial and the basal glandular epithelium.

Oestrogen- and progesterone receptors as determined by radio-receptor-assay decreased from day 15 to day 30 p.o.. Lowest values were reached on days 30 and 45 p.ov. (progesterone receptor) and day 60 p.ov. (oestrogen receptor), respectively. Concomitant with the decrease of progesterone during late dioestrus, receptor concentrations increased towards anoestrus, reaching maximum values during this period of time. The course of oestrogen- and progesterone receptor concentrations was positively correlated, and negatively correlated (both receptors) to the course of progesterone concentrations in plasma.

As determined by immunohistochemistry on day 15 p.o. significant amounts of oestrogen receptors could only be detected in the basal glands; there the percentage of positive stained nuclei decreased towards days 30 and 45 p.ov.. Compared to the basal glands the percentage of oestrogen receptor positive nuclei in the luminal epithelium

and in the superficial cells was distinctly lower on day 15 p.o.. In agreement with the results obtained by radio-receptor-assay the percentage of oestrogen receptor positive cells in the superficial and basal glands was again increased on day 60 p.o., a respective increase in the luminal epithelium was observed on day 75 p.o.. With maximum values no distinction between the three localisation could be made on days 75 and 110 p.o.. Nuclei of fibrocytes were negative for oestrogen receptors on days 30, 45 and 60 p.o., slightly positive results, particularly in the vicinity of oestrogen receptors positive endometrial glands, were observed on days 15, 75 and 110 p.o.. At all time points investigated the stratum longitudinale of the myometrium showed few positive nuclear stainings, the stratum circulare was only slightly positively stained on days 75 and 110 p.ov..

Compared to the staining of the oestrogen receptor immunostaining of the progesterone receptor yielded a stronger and more differentiated signal. However, on a qualitative basis receptor changes in the endometrium followed the same pattern. At all times of investigations positively stained fibrocytes could be detected, with the signal being highest on days 60, 75 and 110 p.o.. Similarly the myometrium stained positive at all points of investigation. The obtained results clearly demonstrate the hormone and cycle dependent expression of uterine oestrogen and progesterone receptors. Based on the different hormonal profiles during prooestrus, oestrus and at the end of dioestrus/begin of anoestrus, it is further postulated that the upregulation of sex hormone receptors at the onset of anoestrus is differently controlled compared to the upregulation during oestrus.

8. LITERATURVERZEICHNIS

Adams, N.R.; Ritar, A.J. (1986)

Measurement of estrogen receptors in the ovariectomized ewe is affected by body condition and secondary binding sites
Biol. Reprod., 35, 828-832

Alexandrova, M.; Soloff, M.S. (1980)

Oxytocin receptors and parturition. I, II and III
Endocrinology, 106, 730-743

Al-Khouri, H.; Greenstein, B.D. (1985)

Progesterone receptors in rat brain and uterus: Dependence on the hormonal milieu
J. Endocr., 107, 159-162

Allen, W.E. (1992 a)

Chapter 2: Physiology of the oestrus cycle.
In: Allen, W.E., Fertility and Obstetrics in the Dog.
Blackwell Scientific Publications, London, 9-13

Anderson, J.N.; Peck, E.J.; Clark, J.H. (1975)

Estrogen-induced uterine responses and growth: Relationship to receptor estrogen binding by uterine nuclei
Endocrinology, 96, 160-167

Arbeiter, K. (1994)

Anwendung von Hormonen in der Reproduktion von Hund und Katze
In: F. Döcke: Veterinärmedizinische Endokrinologie
Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, 823-828

- 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
- Attardi, B. (1984)
Progesterone modulation of the luteinizing hormone surge: Regulation of hypothalamic and pituitary progestin receptors
Endocrinology, 115, 2113-2122
- Auricchio, F.; Migliaccio, A.; Rotundi, A. (1981)
Inactivation of oestrogen receptor in vitro by nuclear dephosphorylation
Biochem. J., 194, 564-574
- Barrau, M.D.; Abel, J.H.; Verhage, H.G.; Tietz, W.J. (1975)
Development of the endometrium during the estrous cycle in the bitch
Am. J. Anat., 142, 47-66
- Bayard, F.; Damilano, S.; Robel, P.; Baulieu, E.E. (1978)
Cytoplasmic and nuclear estradiol and progesterone receptors in human endometrium
J. Clin. Endocrinol. Metab., 46, 635-648
- 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
- Blendinger, K.; Bostedt, H.; Hoffmann, B. (1997)
Hormonal state and effects of the use of an antiprogestin in bitches with pyometra
J. Reprod. Fert., Suppl. 51, 317-325

- Boos, A.; Meyer, W.; Schwarz, R.; Grunert, E. (1996)
Immunohistochemical assessment of oestrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle
Animal Reproduction Science, 44, 11-21
- Brenner, R.M.; McClellan, M.; West, N.B. (1988)
Immunocytochemistry of estrogen and progestin receptors in the primate reproductive tract
In: Moudgil VK (ed.), Steroid receptors in health and disease, New York: Plenum Publishers, 47-70
- Brenner, R.M.; West, N.B.; McClellan, M. (1990)
Estrogen and progestin receptors in the reproductive tract of male and female primates
Biol. of Reprod., 42, 11-19
- Buhi, W.C.; Thatcher, M.-J.; Shille, V.M.; Alvarez, I.M.; Lannon, A.P.; Johnson, J. (1992)
Synthesis of uterine endometrial proteins during early diestrus in the cyclic and pregnant dog, and after estrogen and progesterone treatment
Biol. of Reprod., 47, 326-336
- Chen, T.J.; Leavitt, W.W. (1979)
Nuclear progesterone receptor in hamster uterus: Measurement by [³H]-progesterone exchange during the estrous cycle
Endocrinology, 104, 1588-1597
- Concannon, P.W. (1987)
The physiology of ovarian cycles, pregnancy and parturition in the domestic dog.
Proc. Ann. Meeting Soc. Theriogenology, 161-197

- Cunha, G.R.; Chung, L.W.K.; Shannon, J.M.; Taguchi, O.; Fujii, H. (1983)
Hormone-induced morphogenesis and growth: Role of mesenchymal-epithelial interactions
Recent Progress in Hormone Research, 39, 559-599
- DAKO Corporation (1989)
Handbuch I der Immunperoxidase Färbemethoden
DAKO Diagnostika GmbH, Postfach 700407, 22004 Hamburg
- Dauvois, S.; White, R.; Parker, M.G. (1993)
The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling
Journal of Cell Science, 106, 1377-1388
- Dayani, N.; McNaught, R.W.; Shenolikar, S.; Smith, R.G. (1990)
Receptor interconversion model of hormon action. 2. Requirement of both kinase and phosphatase activities for conferring estrogen binding activity to the estrogen receptor
Biochemistry, 29, 2691-2698
- De Cock, H.; Vermeirsch, H.; Ducatelle, R.; De Schepper, J. (1997)
Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in cystic-endometritis-pyometra complex in the bitch
Theriogenology, 48, 1035-1047
- Denton, R.R.; Koszewski, N.J.; Notides, A.C. (1992)
Estrogen receptor phosphorylation
Biol. Chem., 267, 7263-7268
- Dhaliwal, G.K.; England, G.C.W.; Noakes, D.E. (1997)
Immunocytochemical localization of oestrogen and progesterone receptors in the uterus of the normal bitch during oestrus and metoestrus
J. Reprod. Fert., Supplement, 51, 167-176

- Dixon, W.J. (1993)
BMDP Statistical Software Manual Volume 1 and 2
University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London
- Döcke, F. (1994)
Veterinärmedizinische Endokrinologie, 3. Auflage
Gustav Fischer Verlag, Jena, 426-434
- Donnay, I.; Wouters-Ballman, P.; Devleeschouwer, N.; Leclercq, G.; Verstegen, J.
(1995)
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
Veterinary Research Communications, 19, 101-113
- Dougherty, J.J.; Puri, R.K.; Toft, D.O. (1982)
Phosphorylation in vivo of chicken oviduct progesterone receptor
J. Biol. Chem., 257, 14226-14230
- Ekena, K.; Weis, K.E.; Katzenellenbogen, J.A.; Katzenellenbogen, B.S. (1996)
Identification of amino acids in the hormone binding domain of the human
estrogen receptor important in estrogen binding
J. Biol. Chem., 271, 20053-20059
- E.O.R.T.C. Breast Cancer Cooperative Group (1973)
Standards for the assessment of estrogen receptors in human breast cancer
Europ. J. Cancer, 9, 379-381
- Evans, R.M. (1988)
The steroid and thyroid hormone receptor superfamily
Science, 240, 889-895

- Feldman, E.C.; Nelson, R.W. (1987)
Canine and female reproduction
In: Canine and feline endocrinology and reproduction,
W.B. Saunders, Philadelphia, London, Toronto, 399-480
- Fernandes, P.A.; Bowen, R.A.; Sawyer, H.R.; Nett, T.M.; Gorell, T.A. (1989)
Concentration of receptors for estradiol and progesterone in canine endometrium
during estrus and diestrus
Am. J. Vet. Res., 50, 64-67
- Gasc, J.-M.; Baulieu, E.-E. (1986)
Steroid hormone receptors: intracellular distribution
Biology of the Cell, 56, 1-6
- Gehring, U.; Helmreich, E.; Schultz, G. (1989)
Molecular mechanisms of hormone action
Colloquium der Gesellschaft für Biologische Chemie, 40
Springer-Verlag, Berlin
- Gerres, S. (1991)
Untersuchungen zur Bedeutung von Progesteron als Regelfaktor bei der
Entstehung der Pseudogravidität der Hündin
Diss. Vet. Med., Gießen
- Gorski, J.; Welshons, W.; Sakai, D. (1984)
Remodeling the estrogen receptor model
Mol. Cell. Endocrinol., 36, 11-15
- Green, B.; Leake, R.E. (1987)
Steroid hormone receptors: Assay and characterization
In: Steroid hormones: a practical approach
IRL Press, 67-98

Green, S.; Chambon, P. (1988)

Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation
Trends in Genetics, 4, 309-314

Hoffmann, B. (1977)

Bestimmung von Steroidhormonen beim weiblichen Rind: Entwicklung von
Messverfahren und physiologischen Daten.
(Fortschritte der Veterinärmedizin; H. 26)
1. Aufl.; Berlin, Hamburg: Parey,

Hoffmann, B.; Höveler; Hasan; Failing (1992)

Ovarian and pituitary function in dog after hysterectomy
J. Reprod. Fert., 96, 837-845

Hoffmann, B.; Riesenbeck, A.; Klein, R. (1996)

Reproductive endocrinology of bitches
Animal Reproduction Science, 42, 275-288

Hoffmann, B.; Riesenbeck, A.; Schams, D.; Steinetz, B.G. (1999)

Aspects on hormonal control of normal and induced parturition in the dog
Reprod. Dom. Anim., 34, 219-226

Hoffmann, B.; Schuler, G. (2000)

Receptor blockers – general aspects with respect to their use in domestic animal
reproduction
Animal Reproduction Science, 60-61, 295-312

Ibuki, R.; Haga, N.; Muramatsu, S.; Mizumoto, A.; Itoh, Z. (1997)

Long-term observation of uterine contractions in nonpregnant dogs
Biol. Reprod., 56, 632-639

Isola, J.; Ylikomi, T.; Tuohimaa, P. (1986)

Nuclear origin of progesterone receptor of the chick oviduct cytosol
Histochemistry, 86, 53-58

- 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
- Jungblut, P.W.; Hekim, N.; Meyer, H.H.D.; Sierralta, W.D.; Szendro, P.I. (1983)
Subcellular distribution, properties and interrelationship of oestrogen receptors in endometrium and other target tissues
Clin. Chem. Clin. Biochem., 21, 473-480
- Karthikeyan, N.; Thampan, R.V. (1996)
Plasma membrane is the primary site of localization of the nonactivated estrogen receptor in the goat uterus: Hormone binding causes receptor internalization
Archives of Biochemistry and Biophysics, 325, 47-57
- King, W.J. (1982)
Cytoplasmic receptors for steroid hormones - characteristics and assay
In: Zaneveld, L.J.D.; Chatterton, R.: Biochemistry of Mammalian Reproduction; New York, 455-483
- King, W.J.; Greene, G.L. (1984)
Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells
Nature, 307, 747-749
- King, W.J.; DeSombre, E.R.; Jensen, E.V.; Greene, G.L. (1985)
Comparison of immunocytochemical and steroid-binding assays for estrogen receptor in human breast tumors
Cancer Research, 45, 293-304
- 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
Animal Reproduction Science, 29, 195-203

- Koji, T.; Brenner, R.M. (1993)
Localization of estrogen receptor messenger ribonucleic acid in rhesus monkey uterus by nonradioactive in situ hybridization with digoxigenin-labeled oligodeoxynucleotides
Endocrinology, 132, 382-392
- Koziorowski, M.; Kotwica, G.; Stefanczyk, S.; Krzymowski, T. (1984)
Estradiol, progesterone and testosterone receptors for pig endometrium and myometrium at various stages of the estrous cycle
Exp. Clin. Endocrinol., 84, 285-293
- 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.; McInerney, E.M.; Katzenellenbogen, B.S. (1995)
Ligand-dependent, transcriptionally productive association of the amino- and carboxyl-terminal regions of a steroid hormone nuclear receptor
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 12314-12318
- Leavitt, W.W.; MacDonald, R.G.; Okulicz, W.C. (1983)
Hormonal regulation of estrogen and progesterone receptor systems
In: G. Litwack (Editor), Biochemical Action of Hormones
Academic Press, New York, 323-356
- Leclercq, G. (1984)
Routine assays for steroid hormone receptors
Recent Results in Cancer Research, 91, 12-17
- Lessey, B.A.; Gorell, T.A. (1980 a)
A cytoplasmic estradiol receptor in the immature beagle uterus
J. Steroid Biochem., 13, 211-217

- Lessey, B.A.; Gorell, T.A. (1980 b)
Analysis of the progesterone receptor in the beagle uterus and oviduct
J. Steroid Biochem., 13, 1173-1180
- Lessey, B.A.; Wahawisan, R.; Gorell, T.A. (1981)
Hormonal regulation of cytoplasmic estrogen and progesterone receptors in the beagle uterus and oviduct
Molecular and Cellular Endocrinology, 21, 171-180
- Li, W.; Boomsma, R.A.; Verhage, H.G. (1992)
Immunocytochemical analysis of estrogen and progestin receptors in uteri of steroid-treated and pregnant cats
Biol. of Reprod., 47, 1073-1081
- Martel, D.; Malet, C.; Olmedo, C.; Monier, M.-N.; Dubouch, P.; Psychoyos, A. (1980)
Oestrogen receptor in the baboon endometrium: Cytosolic receptor, detection, characterization and variation of its concentration during the menstrual cycle
Journal of Endocrinology, 84, 261-272
- McInerney, E.M.; Tsai, M.J.; O'Malley, B.W.; Katzenellenbogen, B.S. (1996)
Analysis of estrogen receptor transcriptional enhancement by a nuclear hormone receptor coactivator
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 10069-10073
- Meyer, H.H.D. (1994)
Hormonrezeptoren: Überträger der Hormonwirkung in den Zielzellen
In: F. Döcke, Veterinärmedizinische Endokrinologie
3. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Jena, 76-91
- Meyer, H.H.D.; Rapp, M. (1985)
Estrogen receptor in bovine skeletal muscle
J. Anim. Sci., 60, 294-300

Meyer, M.E.; Quirin-Stricker, C.; Lerouge, T.; Bocquel, M.T.; Gronemeyer, H. (1992)

A limiting factor mediates the differential activation of promoters by the human progesterone receptor isoforms

J. Biol. Chem., 267, 10882-10887

Nakao, M.; Moudgil, V.K. (1989)

Hormone specific phosphorylation and transformation of chicken oviduct progesterone receptor

Biochem. Biophys. Res. Comm., 164, 295-303

Nickel, R.; Schummer, A.; Seiferle, E. (1987)

Anatomie der Haustiere, Band II, Eingeweide

6. Auflage, Verlag Paul Paray, Hamburg, Berlin

Nirmala, P.B.; Thampan, R.V. (1995)

A 55-kDa protein (p55) of the goat uterus mediates nuclear transport of the estrogen receptor

Archives of Biochemistry and Biophysics, 319, 562-569

Nomura, K. (1985)

Progesterone receptors in the endometrium of dogs with pyometra

J. of the Japan Veterinary Medical Association, 38, 174-176

Ohta, Y.; Sato, T.; Iguchi, T. (1993)

Immunocytochemical localization of progesterone receptor in the reproductive tract of adult female rats

Biol. of Reprod., 48, 205-213

Oettel, M. (1979)

Reproduktionsbiologie der Hündin

Mh. Vet.-Med., 34, 937-942

- Phemister, R.D.; Holst, P.A.; Spano, J.S.; Hopwood, M.L. (1973)
Time of ovulation in the beagle bitch
Biol. Reprod., 8, 74-82
- Piva, M.; Flieger, O.; Rider, V. (1996)
Growth factor control of cultured rat uterine stromal cell proliferation is progesterone dependent
Biol. Reprod., 55, 1333-1342
- Press, M.F.; Greene, G.L. (1988)
Localization of progesterone receptor with monoclonal antibodies to the human progestin receptor
Endocrinology, 122, 1165-1175
- Press, M.F.; Nousek-Goebel, N.A.; Greene, G.L. (1985)
Immunoelectron microscopic localization of estrogen receptor with monoclonal estrophilin antibodies
J. Histochem. Cytochem., 33, 915-924
- Redeuilh, G.; Secco, C.; Baulieu, E.-E.; Richard-Foy, H. (1981)
Calf uterine estradiol receptor
J. Biol. Chem., 256, 11496-11502
- Rexroad, C.E. (1981)
Estrogen and progestogen binding in the myometrium of the ewe.
I. During the estrous cycle, II Regulation by estradiol and progesterone
J. Anim. Sci., 53, 1057-1076
- Roberts, D.K.; Walker, N.J.; Lavia, L.A. (1988)
Ultrastructural evidence of stromal/epithelial interactions in the human endometrial cycle
Am. J. Obstet. Gynecol., 158, 854-861

- Rosser, M.; Chorich, L.; Howard, E.; Zamorano, P.; Mahesh, V.B. (1993)
Changes in rat uterine estrogen receptor messenger ribonucleic acid levels during estrogen- and progesterone-induced estrogen receptor depletion and subsequent replenishment
Biol. Reprod., 48, 89-98
- Sachs, L. (1992)
In: Angewandte Statistik (7. Auflage)
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York, Tokio, 354
- Saffran, J.; Loeser, B.K. (1980)
The effect of progesterone in vivo on the subcellular distribution and properties of progesterone receptors in the guinea pig uterus
J. Steroid Biochem., 13, 589-598
- Saito, Y.; Sakamoto, H.; MacLusky, N.J.; Naftolin, F. (1985)
Gap junctions and myometrial steroid hormone receptors in pregnant and postpartum rats: A possible cellular basis for the progesterone withdrawal hypothesis
Am. J. Obstet. Gynecol., 151, 805-812
- Salih, M.A.; Sims, S.H.; Kalu, D.N. (1996)
Putative intestinal estrogen receptor: evidence for regional differences
Mol. Cell Endocrinol., 121, 47-55
- Salloch, R.R. (1969)
Wirkungen auf Morphologie und Motilität der Uterusmuskulatur
In: Die Gestagene, Teil 2; K. Junkmann (HRSG)
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 285-313
- Scatchard, G. (1949)
The attractions of proteins for small molecules and ions
Ann. New York Acad. Sci., 51, 660-672

Schuler, G. (2000)

Plazentare Steroide beim Rind. Biosynthese und Beziehungen zu Wachstum und Differenzierung der Plazentome
Habilitationsschrift Fachbereich Veterinärmedizin Justus-Liebig-Universität
Gießen

Schütz, G. (1988)

Control of gene expression by steroid hormones
Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 369, 77-86

Sierralta, W.D.; Bortsch, A.C.; Gaus, J.; Szendro, P.I.; Jungblut, P.W. (1992 a)

Estradiol-promoted accumulation of receptor in nuclei of porcine endometrium cells
Receptor, 2, 17-28

Simerly, R.B.; Young, B.J. (1991)

Regulation of estrogen receptor messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus by sex steroid hormones
Endocrinology, 5, 424-432

Smith, C.L.; Onate, S.A.; Tsai, M.J.; O'Malley, B.W. (1996)

CREB binding protein acts synergistically with steroid receptor coactivator-1 to enhance steroid receptor-dependent transcription
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 8884-8888

Södergard, R. (1986)

A method for the determination of estrogen receptor concentration in calf uterus and other tissues using an aqueous two-phase system
J. Steroid Biochem., 24, 597-605

Stabenfeldt, G.H.; Shille, V.M. (1977)

Reproduction in the dog and cat
In: Reproduction in Domestic Animals; Cole, H.H.; Cupps, P.T. (eds.),
Academic Press, New York, San Francisco, London, 499-527

- Sullivan, W.P.; Toft, D.O. (1993)
Mutational analysis of hsp90 binding to the progesterone receptor
J. Biol. Chem., 268, 20373-20379
- Sumida, C.; Lecerf, F.; Pasqualini, J.R. (1988)
Control of progesterone receptors in fetal uterine cells in culture: Effects of estradiol, progestins, antiestrogens and growth factors
Endocrinology, 122, 3-11
- Sumida, C.; Pasqualini, J.R. (1989)
Antiestrogens antagonize the stimulatory effect of epidermal growth factor on the induction of progesterone receptor in fetal uterine cells in culture
Endocrinology, 124, 591-597
- Takimoto, G.S.; Tasset, D.M.; Eppert, A.C.; Horwitz, K.B. (1992)
Hormone-induced progesterone receptor phosphorylation consists of sequential DNA-independent and DNA-dependent stages: Analysis with zinc finger mutants and the progesterone antagonist ZK 98299
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3050-3054
- Van der Horst, C.J.G.; Vogel, F. (1981)
Cyclical changes in the indole-protein-complex metabolism and the presence of porphyrins in dog endometrium
Microbios Letters, 16, 103-109
- Van Hoeven, K.H.; Menendez-Botet, C.J.; Strong, E.W.; Huvos, A.G. (1993)
Estrogen and progesterone receptor content in human thyroid disease
Am. J. Clin. Pathol., 99, 175-181
- Vermeirsch, H.; Simoens, P.; Lauwers, H.; Coryn, M. (1999)
Immunohistochemical detection of estrogen receptors in the canine uterus and their relation to sex steroid hormone levels
Theriogenology, 51, 729-743

- 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, 789-802
- Vesanen, M.; Isomaa, V.; Alanko, M.; Vihko, R. (1991)
Bovine uterine, cervical and ovarian estrogen and progesterone receptor
concentrations
Animal Reproduction Science, 26, 61-71
- Vu Hai, M.T.; Milgrom, E. (1978)
Characterization and assay of the progesterone receptor in rat uterine cytosol
J. Endocr., 76, 21-31
- Watson, E.D.; Skolnik, S.B.; Zanecosky, H.G. (1992)
Progesterone and estrogen receptor distribution in the endometrium of the mare
Theriogenology, 38, 581-587
- Weilenmann, R.; Arnold, S.; Döbeli, M.; Rüschi, P.; Zerobin, K. (1993)
Östradiol- und Progesteronkonzentrationen im Plasma von nicht trächtigen
Hündinnen während des Sexualzyklus
Schweiz. Arch. Tierheilk., 135, 51-57
- Welshons, W.V.; Krummel, B.M.; Gorski, J. (1985)
Nuclear localization of unoccupied receptors for glucocorticoids, estrogens and
progesterone in GH3 cells
Endocrinology, 117, 2140-2147
- Welshons, W.V.; Lieberman, M.E.; Gorski, J. (1984)
Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptors
Nature, 307, 747-749

Yamamoto, K.R. (1985)

Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene network

Ann. Rev. Genet., 19, 209-252

Zachariah, N.Y.; Chakmakjian, Z.H. (1983)

Stability of estrogen- and progesterone-receptor concentrations in human uterus
tissue

Clinical Chemistry, 29, 1070-1072

9. ANHANG

Tab. 19: Einzelwerte: Estradiol-17 β - und Progesteronkonzentrationen im peripheren Blut der untersuchten Hündinnen im Verlauf des Diöstrus und frühen Anöstrus

Zyklusstadium	Hund	Estradiol-17 β (pmol/l Plasma)	Progesteron (nmol/l Plasma)
15. Tag p.ov.	Ferdi	29,05	97,47
	Sally	29,24	114,32
	Jana	48,57	104,69
30. Tag p.ov.	Jeani	86,03	150,65
	Cora	37,30	68,19
	Biene	46,34	64,72
	Asta	77,95	83,83
45. Tag p.ov.	Hexe	56,32	44,98
	Jule	57,62	49,21
	Billy	119,79	32,36
60. Tag p.ov.	Anka	44,03	7,12
	Daisy	53,84	15,39
	Pebbels	51,99	16,05
75. Tag p.ov.	Ina	36,39	7,95
	Ella	50,02	4,39
	Gipsy	16,60	5,79
	Luise	40,66	9,47
110. Tag p.ov.	Cocki	22,83	2,29
	Lena	-	3,05
	Tess	28,31	1,40

Tab. 20: Einzelwerte: Konzentrationen und Assoziationskonstanten des Östrogen- und Progesteronrezeptors im Uterus der untersuchten Hündinnen während des Diöstrus und frühen Anöstrus

Z.	Hund	Rezeptorkonzentration (fmol/mg zytos. Prot.)		Assoziationskonstante (l/nmol)	
		ÖR	PR	ÖR	PR
15	Ferdi	633,53	97,54	3,528	0,672
	Sally	470,98	88,70	9,285	1,105
	Jana	687,43	266,29	4,788	0,930
30	Jeani	150,26	33,93	11,149	0,612
	Cora	247,99	35,59	7,148	0,788
	Biene	282,76	47,28	5,326	1,173
	Asta	188,59	-	9,703	-
45	Hexe	273,13	60,34	7,295	1,280
	Jule	266,19	97,83	12,115	1,781
	Billy	209,88	41,90	9,261	5,160
60	Anka	255,33	276,12	7,963	3,312
	Daisy	229,59	322,80	9,700	2,094
	Pebbels	471,57	231,65	8,537	1,206
75	Ina	1060,48	437,13	7,279	1,372
	Ella	669,96	360,40	8,139	1,348
	Gipsy	611,98	407,70	11,416	1,248
	Luise	772,38	407,18	10,295	1,973
110	Cocki	1338,37	442,92	8,671	1,061
	Lena	914,83	589,73	10,158	0,663
	Tess	852,83	392,35	5,076	1,401

Z.: Zyklusstadium (Tage post ovulationem)

ÖR: Östrogenrezeptor

PR: Progesteronrezeptor

Tab. 21: Einzelwerte: Uterusgewicht, -länge und -fläche sowie Stärk von Edometrium und Myometrium der untersuchten Hündinnen im Verlauf des Diöstrus und frühen Anöstrus

Z.	Hund	Uterusgewicht (g)	Uteruslänge (cm)	Uterusfläche (mm ²)	Endometrium (µm)	Myometrium (µm)
15	Ferdi	37,11	18	67,7	1863	3182
	Sally	34,18	19	81,5	1647	3457
	Jana	24,19	16	69,0	2003	3212
30	Jeani	21,73	14	74,8	2002	2625
	Cora	27,22	17	68,3	1427	3114
	Biene	24,70	18	56,2	1267	2918
	Asta	25,86	17	-	2454	2372
45	Hexe	14,44	13	53,9	1332	2194
	Jule	20,24	18	84,4	2176	2613
	Billy	20,04	16	67,6	1321	2407
60	Anka	23,60	16	68,5	1665	2794
	Daisy	28,23	16	-	704	2226
	Pebbels	10,50	9	64,2	1081	2468
75	Ina	14,14	22	44,9	1403	1208
	Ella	14,84	18	57,7	1319	1498
	Gipsy	14,70	17	49,7	1050	2083
	Luise	10,76	13	46,8	1648	1249
110	Cocki	6,31	17	17,6	691	882
	Lena	4,62	12	-	-	-
	Tess	11,05	14	34,8	953	1121

Z.: Zyklusstadium (Tage post ovulationem)

Tab. 22: Einzelwerte: Prozentualer Anteil Östrogenrezeptor-positiver Zellkerne im Endometrium der untersuchten Hündinnen im Verlauf des Diöstrus und frühen Anöstrus

Zyklus- stadium p.ov.	Hund	Luminales Epithel (%)	Oberflächliche Drüsen (%)	Tiefe Drüsen (%)
15	Ferdi	29	21	92
	Sally	10	3	86
	Jana	1	1	92
30	Jeani	0	0	4
	Cora	4	5	64
	Biene	0	5	29
	Asta	0	10	59
45	Hexe	4	3	51
	Jule	12	27	71
	Billy	41	2	3
60	Anka	19	70	99
	Daisy	6	99	57
	Pebbels	76	100	67
75	Ina	71	95	67
	Ella	76	92	72
	Gipsy	73	90	54
	Luise	79	95	93
110	Cocki	81	94	85
	Tess	96	93	77

Tab. 23: Einzelwerte: Prozentualer Anteil Progesteronrezeptor-positiver und -negativer Zellkerne im Endometrium der untersuchten Hündinnen im Verlauf des Diöstrus und frühen Anöstrus

Z.	Hund	Luminales Epithel (%)			Oberflächliche Drüsen (%)			Tiefe Drüsen (%)		
		-	+	++	-	+	++	-	+	++
15	Ferdi	62	37	1	77	23	0	0	5	95
	Sally	80	20	0	86	14	0	0	29	71
	Jana	67	33	1	57	41	2	0	3	97
30	Jeani	93	7	0	99	1	0	98	2	0
	Cora	88	12	0	98	2	0	78	22	0
	Biene	82	18	0	77	23	0	63	37	0
45	Hexe	46	48	6	52	48	0	12	88	0
	Jule	-	-	-	56	44	0	40	60	0
	Billy	86	14	0	98	2	0	98	2	0
60	Anka	89	11	0	0	53	47	1	74	24
	Daisy	13	84	3	1	60	39	35	50	16
	Pebbel s	10	56	34	0	66	34	1	49	50
75	Ina	0	12	88	0	4	96	0	11	89
	Ella	40	36	24	3	24	72	3	35	63
	Luise	0	17	83	0	1	99	0	26	74
110	Cocki	2	28	70	0	11	89	0	14	86
	Tess	3	19	78	2	28	70	4	69	28

Z.: Zyklusstadium (Tage post ovulationem)

DANKSAGUNG

An dieser Stelle danke ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. B. Hoffmann danke ich für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Durchführung, der Abfassung und der Korrektur der Arbeit.

Allen Beschäftigten im Labor der Professur für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung II - insbesondere Frau C. Schuhmacher und Herrn W. Damm - danke ich für die immer hilfsbereite und geduldige Einführung in die Labortechniken und die stets gewährte Hilfe.

Den wissenschaftlichen Mitarbeitern sei für ihre freundliche Aufnahme und Kollegialität herzlich gedankt. Ganz besonderer Dank gebührt vor allem Frau Dr. R. Klein, die mich nicht nur bei der Betreuung der Hunde tatkräftig unterstützte, sondern mir auch in Sachen EDV immer wieder wertvolle Tipps geben konnte („*Wie bekomme ich nur die Legende unter die Grafik ??*“).

Für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung bedanke ich mich bei Herrn Dr. Failing von der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung im Fachbereich Veterinärmedizin Gießen.

Frau Dr. H. Schoepe vom Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen überließ mir den Substitutions-Antikörper. Auch hierfür vielen Dank.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann, der alle Höhen und Tiefen bei der Fertigstellung der Arbeit geduldig ertrug, und mich unermüdlich moralisch und praktisch unterstützte. Nicht zuletzt hielt er die Computer-Technik stets auf dem neuesten Stand („*Schon wieder eine neue Windows Version !?*“).

Ein spezieller Gruß geht an Fabian, der mich von Anfang seines Lebens an mit der Uni teilen musste, und der in Höhe Frankfurter Straße 106 jedes Mal feststellt: „*Und hier wohnt die Uni !*“.